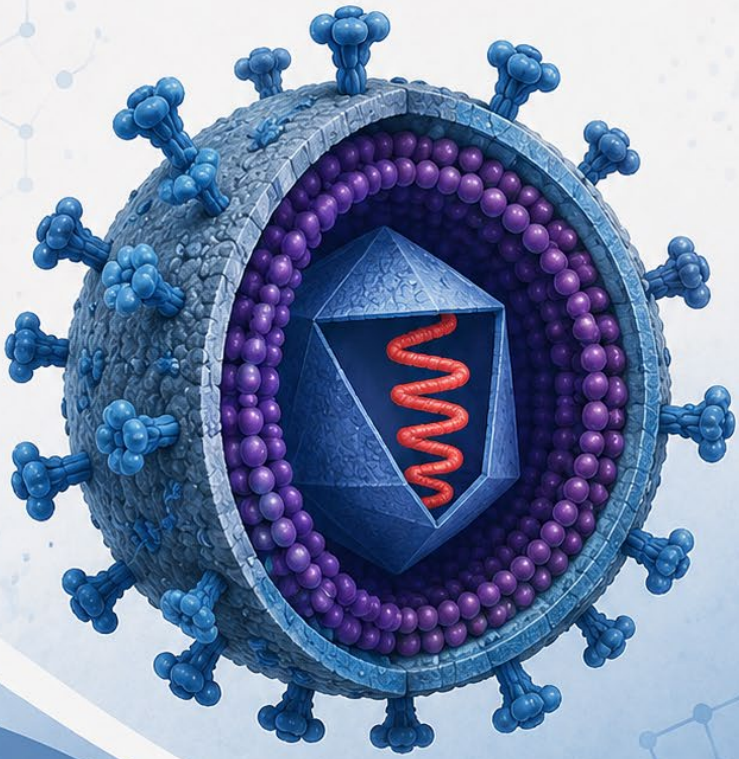
О. В. Кеца

ВІРУСОЛОГІЯ

Навчально-методичний посібник
для лабораторних занять









Міністерство освіти і науки України
Чернівецький національний університет
імені Юрія Федьковича

О. В. Кеца

ВІРУСОЛОГІЯ

Навчально-методичний посібник для лабораторних занять

Видання друге, перероблене

Чернівці
Чернівецький національний університет
імені Юрія Федьковича
2026

УДК 578(076.5)
К-377

Друкується за ухвалою Вченої ради навчально-наукового інституту біології, хімії та біоресурсів Чернівецького національного університету імені Юрія Федьковича (протокол № 8 від 11 червня 2026 року)

Кеца О. В.

К-377 Вірусологія : навч.-метод. посібник для лабораторних занять. 2-е видання, перероблене. Чернівці : Чернівец. нац. ун-т. ім. Ю. Федьковича, 2026. 222 с.

ISBN 978-617-8711-42-9

У навчально-методичному посібнику представлено теоретичний матеріал щодо основних методів дослідження вірусів на різних біологічних об'єктах, а також сучасних підходів до діагностики вірусних інфекцій. Посібник містить різнорівневі практичні та тестові завдання, спрямовані на закріплення теоретичних знань і формування професійних компетентностей здобувачів освіти. Структурована побудова навчального матеріалу сприяє ефективній організації самостійної й аудиторної роботи студентів.

Для студентів біологічних спеціальностей закладів вищої освіти всіх форм навчання.

УДК 578 (076.5)

ISBN 978-617-8711-42-9

© О. В. Кеца, 2026
© Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича, 2026

ПЕРЕДМОВА

Навчально-методичний посібник для лабораторних занять укладено відповідно до програми нормативної навчальної дисципліни «Вірусологія» для студентів біологічних спеціальностей. Видання призначене для поглиблення теоретичної підготовки студентів, формування практичних умінь і навичок та забезпечення ефективної самостійної роботи під час опанування курсу.

Метою навчально-методичного посібника є сприяння системному засвоєнню основних положень вірусології, формуванню цілісного уявлення про закономірності організації, функціонування та відтворення вірусів, їхню взаємодію з клітинами організму-хазяїна, а також сучасні підходи до діагностики, профілактики та лікування вірусних інфекцій.

Основна увага приділена вивченню структурної організації вірусів, особливостей їхньої взаємодії між собою та з клітинами, механізмів репродукції, методів лабораторної діагностики вірусних інфекцій, закономірностей формування противірусного імунітету та принципів застосування противірусних хіміотерапевтичних засобів.

Матеріал навчально-методичного посібника систематизовано за тематичними розділами, що забезпечує послідовне опрацювання та полегшує засвоєння значного обсягу теоретичної і практичної інформації. Кожний розділ містить теоретичні відомості, завдання для лабораторних занять, схеми, ілюстративний матеріал та електронні мікрофотографії. Виконання запропонованих завдань спрямоване на формування навичок аналізу, порівняння, узагальнення та інтерпретації отриманої інформації.

Для студентів біологічних спеціальностей закладів вищої освіти всіх форм навчання.

РОЗДІЛ 1.
СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ВІРУСІВ

ТЕМА 1.1. СТРУКТУРНИЙ АНАЛІЗ ВІРІОНІВ РІЗНИХ СИСТЕМАТИЧНИХ ГРУП

Мета: ознайомитися з основними біологічними властивостями вірусів, особливостями їхньої молекулярно-генетичної організації та принципами структурної побудови віріонів простих і складних вірусів. Сформувати цілісне уявлення про взаємозв'язок між будовою вірусних частинок, складом їхнього генетичного матеріалу та функціональними властивостями.

Компетенції: розуміти особливості типів упакування вірусних капсидів та молекулярну архітектуру віріонів; знати типи симетрії віріонів.

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Віруси – це неклітинні інфекційні агенти, генетичний матеріал яких представлений ДНК або РНК і які реалізують свою біологічну програму лише в клітинах чутливого організму. На відміну від клітинних організмів, віруси не мають власної повноцінної системи синтезу білка, енергетичного метаболізму та більшості метаболічних систем. Тому їх називають облігатними внутрішньоклітинними паразитами.

Зріла інфекційна вірусна частинка називається віріоном. Вона являє собою структурно організовану систему, основними компонентами якої є вірусний геном і білкові структури, що забезпечують його захист, упакування та передачу від однієї клітини до іншої.

Хімічний склад віріонів

Обов'язковими компонентами вірусних частинок є:

нуклеїнова кислота – ДНК або РНК, яка містить генетичну інформацію вірусу;

білки – формують капсид, а в окремих вірусів також входять до складу оболонки та виконують структурні, ферментативні й регуляторні функції;

неорганічні компоненти – іони та інші низькомолекулярні речовини, необхідні для стабілізації окремих структур.

До складних вірусів додатково входять ліпіди, вуглеводи, поліаміни та ферменти. Ліпіди переважно є компонентом вірусної оболонки та походять із мембран клітини-хазяїна. Вуглеводні компоненти найчастіше представлені олігосахаридами, приєднаними до вірусних глікопротеїнів.

Таким чином, за хімічним складом та особливостями структурної організації вірусні частинки характеризуються значним різноманіттям.

Геном вірусів

Вірусний геном може бути представлений ДНК або РНК, причому в межах одного віріона міститься лише один тип нуклеїнової кислоти. Залежно від виду вірусу геном може бути одно- або дволанцюговим, лінійним або кільцевим, суцільним або сегментованим.

Організація геному визначає особливості реплікації вірусу, експресії його генів і взаємодії з клітиною-хазяїном. Деякі віруси додатково містять у складі віріона ферменти, необхідні для початкових етапів реалізації генетичної інформації.

Капсид і нуклеокапсид

Геном більшості вірусів оточений білковою оболонкою – капсидом. Він складається з повторюваних структурних білкових субодиниць – капсомерів. Капсид захищає нуклеїнову кислоту від пошкодження, бере участь у формуванні віріона та в окремих вірусів безпосередньо забезпечує прикріплення до клітини.

Комплекс, утворений вірусним геномом і пов’язаними з ним білками, називають нуклеокапсидом. У простих

вірусів нуклеокапсид може відповідати практично всій інфекційній частинці. У складних вірусів нуклеокапсид додатково оточений ліпідною оболонкою та пов'язаними з нею білками.

Типи симетрії вірусних частинок

Просторове розташування структурних білків у віріоні визначає характер його симетрії. Основними типами симетрії є:

спіральна (гелікальна) симетрія;

ікосаедрична (кубічна) симетрія;

складна симетрія, характерна для вірусів, будова яких не відповідає простій спіральній або ікосаедричній організації.

За спіральної симетрії структурні білкові субодиниці послідовно розташовуються навколо вірусної нуклеїнової кислоти, формуючи спіральну структуру. Нуклеїнова кислота взаємодіє з білковими субодиницями та фактично є частиною спірального нуклеокапсиду. Така організація характерна, зокрема, для багатьох РНК-вмісних вірусів. Залежно від особливостей упаковки нуклеокапсид може бути прямолінійним, зігнутим або спірально закрученим.

Ікосаедрична симетрія є одним із найпоширеніших способів організації вірусного капсиду. Її основу становить ікосаедр – геометричне тіло з 20 рівносторонніми трикутними гранями, 12 вершинами та 30 ребрами.

Така організація є надзвичайно ефективною з погляду самозбирання вірусної частинки, оскільки дає змогу сформувати стабільну замкнену структуру з великої кількості повторюваних білкових субодиниць. Використання однакових або близьких за структурою білків забезпечує економне кодування компонентів капсиду вірусним геномом.

Важливою характеристикою ікосаедричного капсиду є триангуляційне число (T). Воно характеризує спосіб організації структурних субодиниць у межах кожної

трикутної грані ікосаедра та визначає розмір і геометричну організацію капсиду.

Триангуляційне число визначають за формулою:

$$T = h^2 + hk + k^2,$$

де h – кількість переходів від одного пентамера до іншого;
k – кількість поворотів.

Для ікосаедричних капсидів можливі різні значення Т, зокрема Т = 1, 3, 4, 7, 9, 12, 13, 16, 19, 21, 25, 27, 28 та інші. Зі збільшенням Т зростає кількість структурних елементів, що формують капсид, а відповідно можуть збільшуватися його розміри та місткість.

Наприклад, для деяких вірусів характерні такі значення: у поліовірусу – Т = 1, у папіломавірусів – Т = 7, у вірусу простого герпесу – Т = 16. Водночас конкретна структура капсиду визначається не лише значенням Т, а й особливостями взаємодії вірусних білків.

Деякі віруси мають складну просторову організацію, яку неможливо повністю описати лише спіральною або ікосаедричною симетрією. У таких віріонів окремі структурні компоненти можуть мати різні принципи організації.

Прикладом є поксвіруси, які мають складну багатокомпонентну будову та не формують типового ікосаедричного капсиду.

Вірусна оболонка

У багатьох вірусів зовнішнім структурним компонентом є ліпідна оболонка. Такі віруси називають оболонковими. Оболонка формується переважно з ліпідного бішару клітинного походження, у який вбудовані вірусні білки та глікопротеїни.

На поверхні оболонки часто розташовуються вірусні глікопротеїнові шипи (пепломери). Вони відіграють

важливу роль у взаємодії вірусу з клітиною, зокрема забезпечують розпізнавання специфічних клітинних рецепторів і беруть участь у проникненні вірусу в клітину. Глікопротеїни оболонки також є важливими мішенями для антитіл та інших компонентів противірусної імунної відповіді.

На відміну від безоболонкових вірусів, оболонкові віруси зазвичай характеризуються меншою стійкістю до впливу органічних розчинників, детергентів, висушування та інших факторів, що руйнують ліпідні мембрани.

Прості та складні віруси

За особливостями структурної організації віріона умовно розрізняють прості та складні віруси.

Прості віруси складаються переважно з нуклеїнової кислоти та білкового капсиду. У них відсутня зовнішня ліпідна оболонка. До цієї групи належать, зокрема, багато вірусів рослин, бактерій і тварин.

Складні віруси мають додаткові структурні компоненти. До них належать оболонкові віруси, у яких нуклеокапсид оточений ліпідною мембраною з вірусними білками та глікопротеїнами. У деяких представників наявні також матриксні білки, ферменти та інші структурні або функціональні компоненти.

Отже, структурна організація віріона є результатом чіткої взаємодії вірусного геному з білковими та, у частини вірусів, ліпідними компонентами. Форма, симетрія, склад і архітектура віріона безпосередньо пов’язані з його стабільністю, здатністю розпізнавати клітину-хазяїна, проникати в неї, забезпечувати доставку геному та формувати нове покоління вірусних частинок. Вивчення цих особливостей є основою для класифікації вірусів, розуміння механізмів їхньої репродукції та розроблення методів лабораторної діагностики, профілактики й противірусної терапії.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 1

Завдання 1. За особливостями хімічного складу та структурної організації віріони умовно поділяють на прості та складні.

1.1. На рис. 1 представлено схематичну будову віріона SARS-CoV-2. Визначте основні структурні компоненти вірусної частинки, позначені цифрами, та запишіть їх відповідні назви.

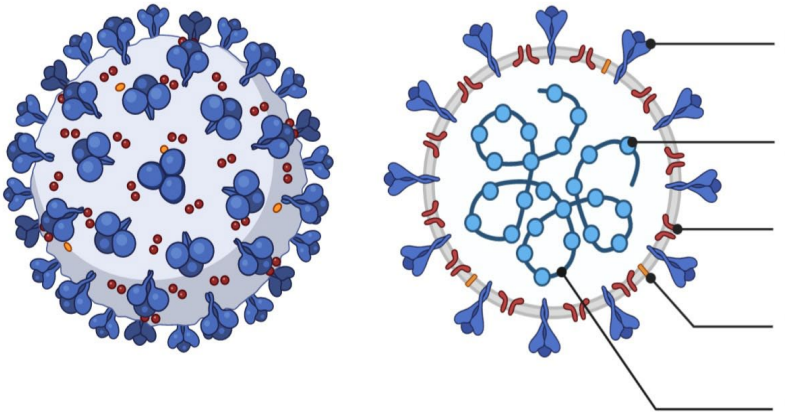


Рис.1. Структура віріону SARS-CoV-2

1._____

2._____

3._____

4._____

5._____

1.2. Розгляньте наведені схематичні зображення віріонів простих і складних вірусів. Ідентифікуйте представлені структурні компоненти та зазначте їхні назви.

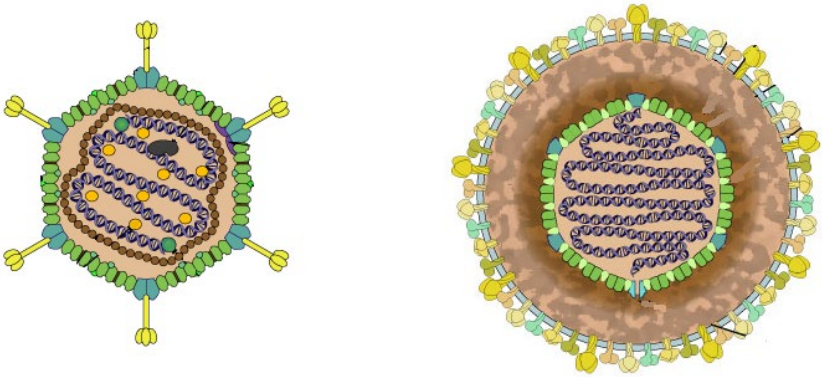


Рис.2. Структура простого і складного вірусів

1._____ 6._____

2._____ 7._____

3._____ 8._____

4._____ 9._____

5._____ 10._____

Завдання 2. Порівняльна характеристика вірусів зі спіральною та ікосаедричною симетрією.

За характером просторової організації та взаємного розташування білкових субодиниць капсиду розрізняють основні типи симетрії вірусних частинок – спіральну (гелікальну) та ікосаедричну (кубічну). Окрему групу

становлять віруси зі складною організацією віріона, яка не відповідає цим типам симетрії.

2.1. Розгляньте схематичні зображення віріонів, представлені на рисунках 3 і 4. Визначте особливості просторового розташування білкових субодиниць капсиду та встановіть відповідний тип симетрії.

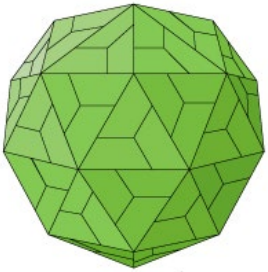


Рис.3. _____

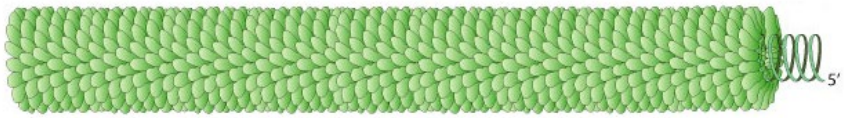


Рис.4. _____

2.2. Заповніть таблицю, порівнявши особливості структурної організації та функціональні характеристики вірусів зі спіральною та ікосаедричною (кубічною)

симетрією. Для кожного типу симетрії зазначте характер розташування білкових субодиниць капсиду, взаємодію з вірусним геномом, форму віріона та інші характерні ознаки.

Ознака	***Спіральний тип симетрії***	***Кубічний тип симетрії***
Кількість варіантів самозбирання		
Взаємодія між білком та нуклеїновою кислотою		
Площа поверхні Віріону		
Звільнення геномної нуклеїнової кислоти		

Завдання 3. Класифікація структурних форм віріонів

Морфологічні особливості та просторова організація віріонів дають змогу виокремити п'ять основних груп їхніх структурних форм.

Ознайомтеся з основними типами морфологічної організації вірусних частинок та визначте п'ять груп структурних форм віріонів. Для кожної відповідної структурної форми наведіть:

1) назви родин вірусів, представники яких мають відповідну структурну організацію;

2) 2–3 типових представники вірусів, які мають відповідну структурну форму.

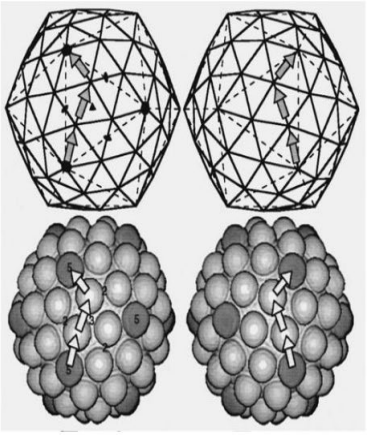
	Структурна форма	***Родина***	***Типовий представник***
1.			
2.			
3.			
4.			
5.			

Завдання 4. Визначення триангуляційного числа

Триангуляційне число дає змогу оцінити складність ікосаедричного капсиду та кількість структурних елементів, що припадають на одну трикутну грань.

4.1. Розгляньте рис. 5, на якому схематично представлено ікосаедричний віріон, сформований 60 шестивалентними та 12 п’ятивалентними капсомерами. Для наведеного віріона розрахуйте:

1) триангуляційне число (T);
2) кількість пентамерів;
3) кількість білкових субодиниць;
4) кількість гексамерів.



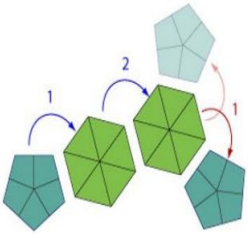


Рис.5. Структура віріону

Розрахунок

1) триангуляційне число (Т)

2) кількість пентамерів;

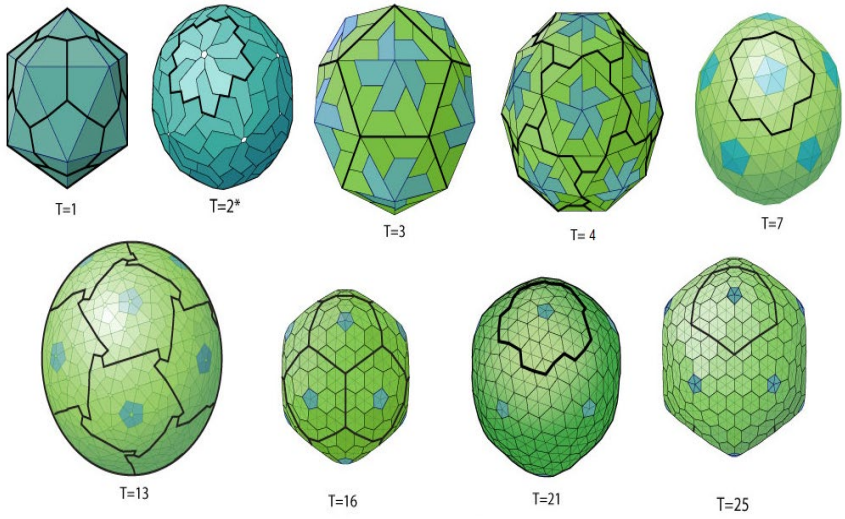
3) кількість білкових субодиниць

4) кількість гексамерів

_____
_____
_____
_____
_____

4.2. Проведіть аналіз ікосаедричних віріонів із різними триангуляційними числами

Розгляньте наведені схематичні зображення ікосаедричних віріонів, що характеризуються різними значеннями триангуляційного числа (Т). Проаналізуйте особливості просторової організації їхніх капсидів та встановіть, як зміна значення Т впливає на структуру вірусної частинки.



Заповніть таблицю, систематизувавши основні характеристики ікосаедричних віріонів із різними значеннями триангуляційного числа (Т). Для кожного наведеного значення визначте особливості просторової організації капсиду та наведіть відповідну таксономічну і біологічну характеристику вірусу.

У таблиці зазначте:

триангуляційне число (Т);

кількість пентамерів та гексамерів;

загальну кількість білків;

родину вірусу;

типового представника відповідної групи;

Тріангуляційне число	***Кількість пентамерів***	***Кількість гексамерів***	***Загальна кількість білків***	***Родина***	***Типовий представник***

Завдання 5. Сформулюйте визначення ключових понять і термінів, що стосуються структурної організації та будови вірусів:

Вірус……

……..……..…..

Віріон……...……

……..

Капсид…….…

…….…….

Нуклеокапсид……..

……..

Капсомер…….

……..

Пентамер…..……..

……..

Гексамер...…..…….

……..

Спіральна симетрія……...……

..……

Кубічна симетрія……..……

……..

Триангуляційне число…….

…….…….

Вірусна оболонка……

……...…

ВИСНОВКИ

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____.

КОНТРОЛЬНІ ЗАВДАННЯ ТА ПИТАННЯ

1. Охарактеризуйте віруси як неклітинні форми організації живого та облігатні внутрішньоклітинні паразити.
2. Що таке віріон і які основні компоненти визначають його структурну організацію?
3. Охарактеризуйте хімічний склад вірусних частинок.
4. Які типи нуклеїнових кислот можуть входити до складу вірусного геному?
5. У чому полягають структурні відмінності між спіральною та ікосаедричною симетрією?
6. Що таке складна симетрія та які віруси характеризуються такою організацією?
7. Що таке триангуляційне число і яке його значення для характеристики ікосаедричних капсидів?
8. Наведіть приклади вірусів зі спіральною та ікосаедричною симетрією.
9. Наведіть приклади вірусів із різними значеннями триангуляційного числа.
10. Поясніть взаємозв'язок між структурою віріона, способом його проникнення в клітину та особливостями репродукції.
11. Визначте кількість структурних елементів капсиду для віріона з T = 1, T = 3 та T = 7.

ТЕМА 1.2. КЛАСИФІКАЦІЯ ВІРУСІВ. СУБВІРУСНІ АГЕНТИ

Мета: ознайомитися з сучасними принципами класифікації, систематики та номенклатури вірусів, засвоїти основні таксономічні категорії та критерії, які використовують для їх диференціації. Сформувати уявлення про сучасний підхід до систематизації вірусів з урахуванням особливостей їхнього геному, структури віріона, механізмів репродукції, філогенетичних зв'язків та інших біологічних характеристик.

Компетенції: розуміти принципи визначення систематичної належності вірусів та вміти встановлювати їхнє таксономічне положення за морфологічними особливостями віріона.

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Сучасна класифікація вірусів ґрунтується на комплексній оцінці їхніх генетичних, структурних, молекулярно-біологічних, біофізичних та біологічних властивостей. На відміну від традиційних підходів, за яких основну увагу приділяли морфології віріона та типу нуклеїнової кислоти, сучасна систематика значною мірою враховує еволюційні та філогенетичні взаємозв'язки між вірусами.

Порівняння сукупності характерних ознак дає змогу встановити відмінності між вірусами, об'єднати споріднені форми в таксономічні групи та визначити їхнє систематичне положення.

Основні критерії класифікації вірусів

Під час характеристики та систематизації вірусів враховують широкий комплекс ознак.

1. *Особливості вірусного геному***.** Визначають тип нуклеїнової кислоти – ДНК або РНК, її одно- чи дволанцюгову організацію, лінійну або кільцеву форму,

полярність РНК, сегментованість геному, кількість і розміри сегментів, молекулярну масу, нуклеотидний склад, особливості генетичної організації та наявність характерних модифікацій.

2. *Морфологічні характеристики віріона*. Аналізують форму та розміри вірусної частинки, тип симетрії або псевдосиметрії капсиду, особливості організації нуклеокапсиду, кількість і спосіб розташування капсомерів, а також наявність чи відсутність зовнішньої ліпідної оболонки.

3. *Біофізичні властивості*. До них належать коефіцієнт седиментації, плавуча густина, молекулярна маса та інші фізико-хімічні характеристики, які дають змогу додатково диференціювати вірусні частинки.

4. *Білковий склад*. Визначають кількість структурних і неструктурних білків, їх молекулярну масу, локалізацію у віріоні, амінокислотний склад та функціональне значення. Особливу увагу приділяють білкам, які беруть участь у прикріпленні до клітини, проникненні, реплікації геному та формуванні нових віріонів.

5. *Ліпідний і вуглеводний склад*. Для оболонкових вірусів оцінюють склад ліпідів та особливості їхньої взаємодії з вірусними білками. Додатково аналізують глікозилювання поверхневих білків та інші вуглеводні компоненти.

6. *Особливості репродукції*. Враховують здатність вірусу розмножуватися у певних клітинних культурах, типи клітин, які він інфікує, механізми проникнення в клітину, реплікації геному, синтезу вірусних білків, складання та виходу дочірніх віріонів.

7. *Коло природних хазяїв і біологічні властивості*. Аналізують спектр хазяїв, тканинну та клітинну тропність, особливості патогенезу, характер інфекційного процесу, здатність спричиняти гострі або хронічні інфекції, а для окремих груп – онкогенні властивості.

8. *Стійкість до фізичних і хімічних факторів.* Досліджують чутливість вірусів до температури, висушування, опромінення, детергентів, органічних розчинників, зміни pH та дії інших фізико-хімічних факторів. Особливе значення має стійкість або чутливість вірусної оболонки до речовин, що руйнують ліпідний бішар.

9. *Антигенні властивості.* Визначають антигенну структуру вірусних білків, взаємодію з антитілами, антигенну спорідненість та відмінності між варіантами одного виду вірусу.

Сукупність цих ознак дає змогу систематизувати віруси незалежно від того, яких організмів вони інфікують: хребетних, безхребетних, рослини, гриби, бактерії, археї та інші організми**.**

Сучасна вірусна таксономія та номенклатура

Систематикою вірусів займається Міжнародний комітет з таксономії вірусів (ICTV)**.** Сучасна таксономія ґрунтується не лише на морфологічних ознаках, а й на порівнянні геномних послідовностей, еволюційних зв'язків, особливостей реплікації та інших характеристик.

У сучасній системі використовують ієрархічну структуру таксонів, яка включає, зокрема, вид, рід, родину, порядок, клас, тип (phylum), царство (kingdom), домен (realm) та інші ранги. Отже, сучасна класифікація є значно ширшою, ніж традиційна система, у якій основну увагу приділяли порядкам і родинам.

Назви таксонів мають стандартизовану форму. Зокрема, назви родин вірусів традиційно мають суфікс -viridae**,** підродин – virinae, родів – -virus, а порядків – -virales**.** Водночас конкретні правила номенклатури та перелік таксонів регулярно переглядаються ICTV у міру накопичення нових геномних і філогенетичних даних.

Важливо розрізняти таксономічні категорії та поняття, які використовують для опису внутрішньовидового різноманіття. Для характеристики генетично або антигенно

відмінних варіантів можуть використовуватися терміни штам, ізолят, серотип, генотип та варіант – залежно від групи вірусів і конкретного контексту дослідження.

Серотип визначається насамперед антигенними відмінностями та характером взаємодії з антитілами, тоді як генотип характеризує відмінності у нуклеотидній послідовності або генетичній організації. Наприклад, різні серотипи можуть мати подібний геном, але відрізнятися антигенними властивостями.

Субвірусні агенти

Поряд із вірусами в природі існують інфекційні агенти, які мають значно простішу організацію та не відповідають типовій структурі вірусного віріона. Їх традиційно об'єднують поняттям субвірусні агенти.

До основних груп субвірусних агентів належать:

- ✓ пріони**;**
- ✓ віроїди**;**
- ✓ сателіти та сателітні нуклеїнові кислоти**.**

Вони істотно відрізняються між собою за хімічною природою, структурою, механізмами реплікації або розмноження та колом хазяїв.

Пріони – це інфекційні білкові агенти, які не містять нуклеїнової кислоти. Назва походить від англійського *proteinaceous infectious particle* – «інфекційна білкова частинка».

Основою пріонної інфекції є патологічне конформаційне перетворення нормального клітинного пріонного білка PrP^{c} (*cellular*) у патологічну форму PrP^{sc} (*scrapie*). Аномальна форма білка здатна взаємодіяти з нормальною формою та сприяти її конформаційному перетворенню.

PrP^{sc} характеризується:

- ✓ підвищеним вмістом β-складчастих структур;
- ✓ відносним зменшенням частки α-спіральних структур;
- ✓ схильністю до олігомеризації та агрегації;

- ✓ підвищеною стійкістю до протеолізу;
- ✓ значною стійкістю до деяких фізичних і хімічних впливів.

Пріони пов'язані з розвитком трансмісивних губчастих енцефалопатій у людини та тварин. Ураження характеризується прогресивними змінами центральної нервової системи.

Віроїди – це найпростіші відомі рослинні інфекційні агенти, які представлені невеликими кільцевими одноланцюговими молекулами РНК. На відміну від вірусів, вони не мають білкового капсиду та не кодують власних білків.

Віроїдна РНК має значний ступінь внутрішньомолекулярної комплементарності, завдяки чому формує характерну вторинну структуру. Реплікація віроїдів відбувається з використанням ферментних систем клітини-хазяїна.

Віроїди є переважно фітопатогенами та спричиняють захворювання культурних і дикорослих рослин. Серед відомих прикладів – збудник веретеноподібності бульб картоплі, збудник каданг-каданг кокосової пальми та віроїд сонячної плямистості авокадо.

Сателіти – це субвірусні агенти, реплікація яких залежить від наявності в клітині вірусу-помічника. Вони не мають повного набору генетичної інформації, необхідного для самостійної реалізації циклу репродукції, тому використовують функції вірусу-помічника.

Геноми сателітів мають власні нуклеотидні послідовності, які істотно відрізняються від геному вірусу-помічника. Залежно від структурної організації та здатності кодувати білки розрізняють сателітні віруси та сателітні нуклеїнові кислоти**.**

Сателітні віруси утворюють власні вірусоподібні частинки та кодують білки, необхідні для формування їхнього капсиду або інших структурних компонентів.

Сателітні нуклеїнові кислоти можуть кодувати окремі білки або взагалі не мати білок-кодуючих послідовностей. Для реплікації та/або упаковки вони використовують функції вірусу-помічника.

Таблиця 1

Порівняльна характеристика субвірусних агентів

Ознака	**Пріони**	**Віроїди**	**Сателіти**
Хімічна природа	Білок	РНК	Нуклеїнова кислота
Наявність нуклеїнової кислоти	Відсутня	Є	Є
Капсид	Відсутній	Відсутній	Може бути наявним у сателітних вірусів
Самостійна репродукція	Не здійснюють реплікації у класичному розумінні	Здійснюють реплікацію за участю клітинних систем	Залежить від вірусу-помічника
Основні хазяї	Людина та тварини	Рослини	Залежно від системи «сателіт – вірус-помічник – господар»
Основні прояви	Пріонні нейродегенеративні захворювання	Хвороби рослин	Залежні від вірусу-помічника та хазяїна

Отже, віруси та субвірусні агенти утворюють широкий спектр неклітинних інфекційних систем, які істотно відрізняються за рівнем структурної організації та механізмами взаємодії з хазяїном. Знання принципів

класифікації та номенклатури вірусів дає змогу правильно визначати їхнє систематичне положення, порівнювати споріднені групи та пов'язувати структурно-генетичні особливості з біологічними властивостями. Водночас вивчення пріонів, віроїдів і сателітів розширює уявлення про різноманітність інфекційних агентів та межі між класичними вірусами й іншими формами біологічної організації.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 2

Завдання 1. Під час класифікації вірусів враховують тип симетрії (спіральний або кубічний), наявність або відсутність оболонки. Ліпопротеїновою оболонкою володіють складні віруси, яка визначає форму віріону.

1.1. На основі відомостей про структурну організацію вірусів визначте родину та типового представника для кожного наведеного вірусу. Укажіть, до якої групи він належить – простих або складних вірусів – та охарактеризуйте особливості його будови. Під час заповнення таблиці зверніть увагу на наявність або відсутність додаткових структурних компонентів вірусної частинки.

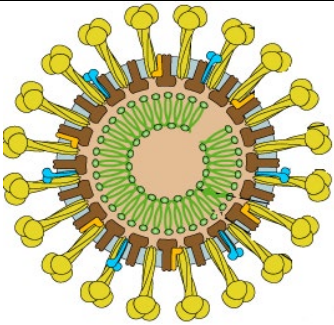
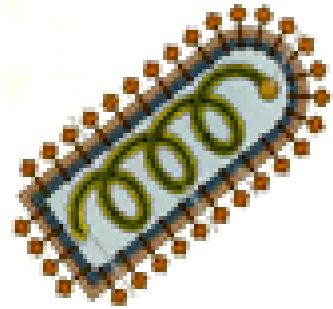
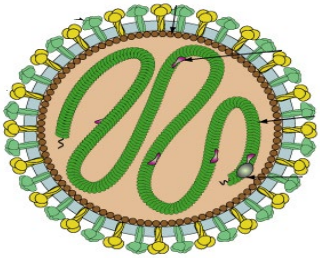
Прості віруси	
Родина	***Типовий представник***
1. _____	_____
2. _____	_____
3. _____	_____
4. _____	_____
5. _____	_____

Структурні особливості _____ _____ _____ _____ _____ _____ _____
Складні віруси
Родина / ***Типовий представник***
1. _____ / _____ 2. _____ / _____ 3. _____ / _____ 4. _____ / _____ 5. _____ / _____
Структурні особливості _____ _____ _____ _____ _____ _____ _____

1.2. Заповніть таблицю, зазначаючи родину, типовий представник та основні особливості будови вірусів зі спіральним і кубічним типами симетрії. Для кожного вірусу визначте відповідний тип симетрії та наведіть його характерні структурні ознаки.

Віруси зі спіральною симетрією	
Родина	***Типовий представник***
1. _____ 2. _____ 3. _____ 4. _____ 5. _____	_____ _____ _____ _____ _____
Характеристика симетрії _____ _____ _____ _____ _____ _____ _____	
Віруси з кубічною симетрією	
Родина	***Типовий представник***
1. _____ 2. _____ 3. _____ 4. _____ 5. _____	_____ _____ _____ _____ _____
Характеристика симетрії _____	

1.3. Розгляньте схематичні зображення віріонів та заповніть таблицю, визначивши для кожного вірусу його родину, типового представника, тип симетрії та характерну форму віріон.

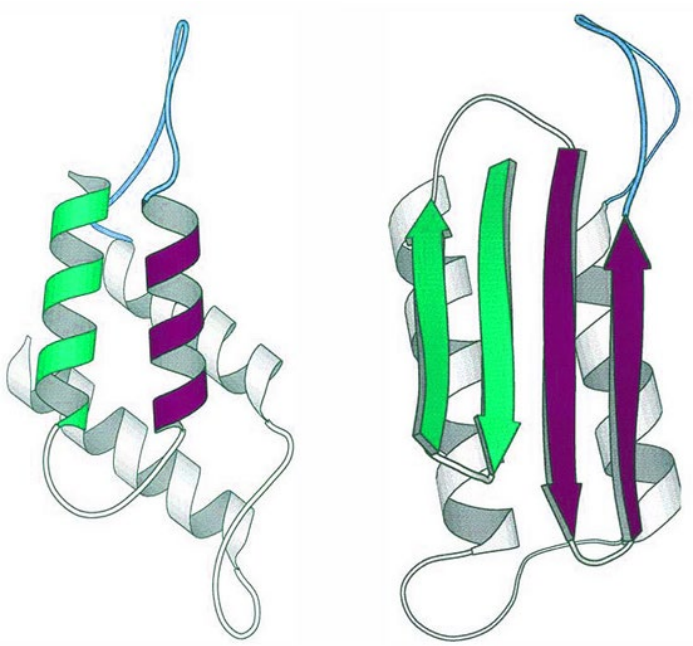
 *1.*	 *2.*
 *3.*	 *4.*

Родина	*Типовий представник*	*Тип симетрії*	*Форма віріону*
1. 2. 3. 4.			

Завдання 2. Субвірусні агенти: пріони та віроїди

У природі, окрім вірусів, існують особливі інфекційні агенти – субвірусні агенти, до яких належать, зокрема, пріони та віроїди. Вони відрізняються від вірусів особливостями структурної організації та механізмами інфекційності.

2.1. Розгляньте зображені на рис. 6 структури пріонових білків та, спираючись на їхні просторові й структурні особливості, визначте, який із них відповідає аномально сконформованій пріоновій формі білка (PrP^{Sc}), а який – нормальній клітинній формі пріонового білка людини (PrP^{C}). Обґрунтуйте свій вибір, зазначивши основні відмінності між нормальною та патологічною формами білка.



А. ***Б.***

Рис.6. Елементи вторинної структури пріонових білків

А. _____

Б. _____

2.2. Заповніть таблицю, порівнявши віроїди та віруси за основними структурними й біологічними характеристиками. Визначте їхні спільні та відмінні ознаки, звертаючи увагу на будову, склад генетичного матеріалу, наявність білкової оболонки, розміри, особливості реплікації та організми-хазяї.

Відмінні ознаки віроїдів від вірусів

Завдання 3. Сформулюйте визначення основних понять і термінів, що стосуються теми заняття.

Штам……...……...

…….

Серотип……..

…….

Віроїд……..

……..

Сателіт……..

……..

Пріон……

……..

ВИСНОВКИ

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____ .

КОНТРОЛЬНІ ЗАВДАННЯ ТА ПИТАННЯ

1. Охарактеризуйте основні принципи сучасної класифікації вірусів.
2. Які критерії використовують для визначення систематичної належності вірусів?
3. Принципи формування назв таксонів у сучасній вірусній номенклатурі.
4. Роль ICTV у систематиці та номенклатурі вірусів.
5. Опишіть відмінності між поняттями «штам», «ізолят», «серотип», «генотип» і «варіант».
6. Структурна організація та властивості пріонів.
7. Особливості нормальної та патологічної форм пріонного білка.
8. Зазначте пріонні захворювання людини і тварин.
9. Структурно-функціональні особливості віроїдів.
10. У чому відмінності віроїдів від вірусів?
11. Рослинні захворювання, спричинені віроїдами.
12. Структура та біологічні властивості сателітів.
13. Залежність репродукції сателітів від вірусу-помічника.
14. Відмінності між сателітними вірусами та сателітними нуклеїновими кислотами.
15. Під час дослідження невідомого вірусу встановлено: наявність РНК-геному, оболонкового віріона, певного типу симетрії капсиду та специфічних поверхневих глікопротеїнів. Які додаткові характеристики необхідно дослідити для визначення його систематичної належності?
16. У рослини виявлено інфекційний агент, який складається лише з невеликої кільцевої молекули РНК і не кодує білків. До якої групи субвірусних агентів його слід віднести? Обґрунтуйте відповідь.
17. Виявлено патологічний білок, здатний спричиняти конформаційні зміни нормального клітинного білка. Визначте природу агента та поясніть механізм його інфекційної дії.

ТЕМА 1.3. МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ ВІРУСІВ. ВИКОРИСТАННЯ ЛАБОРАТОРНИХ ТВАРИН У ВІРУСОЛОГІЇ

Мета: сформувати цілісне уявлення про сучасні підходи до дослідження вірусів, основні способи їх культивування, методи виявлення вірусних компонентів та оцінювання інфекційної активності.

Компетенції: знати основні методи вивчення вірусів; уміти розпізнавати та характеризувати цитопатичні зміни, спричинені вірусною інфекцією, визначати тип інфекційного процесу, обґрунтовано підбирати методи культивування, виявлення та ідентифікації вірусів відповідно до поставленого.

***Матеріальне забезпечення*:** лабораторні тварини (лабораторні миші або щурі), одноразові захисні рукавички, водні розчини пікринової кислоти та фуксину для маркування тварин, ефір, стерильна вата, ексикатори, пінопластові або парафінові фіксаційні дошки та голки, 2% спиртовий розчин йоду, скляні палички, 75% розчин етанолу, стерильні шприци об'ємом 2 мл із голками, фізіологічний розчин, піпетки Пастера, стерильний хірургічний інструментарій (ножиці, пінцети, корнцанги, скальпелі), ємності з дезінфекційним розчином для обробки інструментів, стерильні чашки Петрі для розміщення секційного патологічного матеріалу, герметичні пакети для утилізації відходів, мило та рушник.

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Лабораторних тварин застосовують як біологічні тест-об'єкти для виявлення вірусів у патологічному матеріалі, тобто для проведення біологічної проби (біопроби). Для цього досліджуваний матеріал вводять чутливим лабораторним тваринам, після чого оцінюють характер і вираженість реакції організму на інфікування.

У багатьох випадках прояви вірусного ураження є неспецифічними. Це дає змогу встановити факт наявності вірусного агента, тобто здійснити його **індикацію**, але не дозволяє достовірно визначити конкретний вид вірусу – провести його **ідентифікацію**. Наприклад, симптомокомплекс ураження верхніх дихальних шляхів може виникати під впливом різних груп вірусів, зокрема аденовірусів, ортоміксовірусів, параміксовірусів, герпесвірусів та риновірусів. Водночас у разі розвитку характерних клінічних проявів, властивих певній вірусній інфекції, результати біологічної проби можуть мати не лише діагностичне значення щодо наявності вірусу, а й допомагати встановити його **видову належність**.

Лабораторні тварини можуть використовуватися також як біологічний індикатор наявності вільного інфекційного вірусу під час проведення реакції біологічної нейтралізації.

У вірусологічних дослідженнях важливим завданням є тривале збереження вірусів у стабільному та інфекційно активному стані. Для цього застосовують методи консервації та, за необхідності, послідовного перенесення вірусу на чутливі біологічні системи. Таке підтримання вірусу може передбачати чергування його збереження у законсервованому вигляді та відновлення інфекційної активності шляхом наступного пасажу.

Пасаж – це послідовне перенесення вірусу на чутливу біологічну систему з метою його розмноження та отримання нової популяції вірусних частинок. Після отримання вірусного матеріалу його за необхідності знову переводять у відповідні умови зберігання. У сучасній лабораторній практиці вибір системи для підтримання вірусу залежить від його біологічних властивостей та завдань дослідження.

Важливою характеристикою вірусного матеріалу є його **інфекційний титр –** показник, що характеризує концентрацію інфекційно активного вірусу та визначається за

його здатністю спричиняти специфічну реакцію у чутливій тест-системі. Для визначення титру досліджуваний вірусний матеріал оцінюють у серії розведень і встановлюють рівень, за якого спостерігається певна частота позитивних реакцій у тест-об'єктах.

Для кількісної характеристики інфекційності вірусу також використовують показники $\mathbf{ID_{50}}$ та $\mathbf{LD_{50}}$. **$\mathbf{ID_{50}}$ (інфекційна доза 50) –** це кількість інфекційного агента, яка за визначених умов спричиняє встановлену специфічну інфекційну реакцію у 50% тест-об'єктів. **$\mathbf{LD_{50}}$ (летальна доза 50) –** доза вірусу, яка за визначених умов призводить до загибелі 50% тест-об'єктів. Такі показники використовують для кількісного оцінювання біологічної активності та інфекційних властивостей вірусного матеріалу.

Маркування лабораторних тварин

Під час проведення вірусологічних експериментів важливо забезпечити надійну індивідуальну ідентифікацію лабораторних тварин упродовж усього дослідження. Для цього використовують різні способи маркування, вибір яких залежить від виду тварини, тривалості експерименту та необхідної точності ідентифікації. До таких підходів належать татуювання, використання спеціальних міток, радіопередавачів, індивідуальних номерів, кольорового маркування та інших методів.

1. Татуювання вушних раковин.

У тварин із достатньо великими та непігментованими вухами (наприклад, кролів, собак, тхорів) індивідуальні позначки можуть наноситися на вушні раковини за допомогою спеціальних татуювальних пристроїв. Як барвник використовують туш або спеціальні пігменти. Для окремих видів тварин татуювання можна наносити й на інші ділянки тіла, зокрема на внутрішню поверхню стегна у мавп.

2. Механічне маркування вух.

Ідентифікацію окремих тварин можна здійснювати шляхом створення стандартних надрізів, насічок або отворів на вушних раковинах. Такий підхід застосовують у тварин, вуха яких мають достатні розміри для нанесення індивідуальної комбінації позначок, зокрема у кролів, морських свинок та свиней.

3. Вистригання шерсті.

Для короткотривалих експериментів може використовуватися видалення шерсті на певних ділянках тіла – наприклад, на спині або стегнах. Метод придатний для мавп, кролів, тхорів, хом'яків та котів. Його основним недоліком є тимчасовий характер позначки, оскільки в міру відростання шерсті вона поступово втрачає свою інформативність.

4. Ідентифікація за природними особливостями забарвлення.

У деяких випадках окремих тварин можна розрізняти без нанесення додаткових міток – за характерними плямами, смугами або іншими особливостями природного забарвлення шерсті. Такий спосіб доцільний, якщо особини одного виду мають добре помітні індивідуальні відмінності зовнішнього вигляду, наприклад морські свинки.

5. Маркування за допомогою жетонів, кілець та номерних бирок.

Для індивідуальної ідентифікації можуть застосовуватися металеві або інші номерні мітки. Залежно від виду тварини їх фіксують на вусі, кінцівці, крилі або використовують як нашийники з індивідуальним номером. Такий спосіб забезпечує тривале маркування, проте під час експерименту необхідно регулярно контролювати стан тварини та її реакцію на мітку. Якщо вона спричиняє подразнення, травмування або суттєво змінює поведінку, її слід замінити іншим, менш обтяжливим способом ідентифікації.

6. Маркування ембріонів багатоплідних тварин.

Для індивідуального розпізнавання ембріонів у багатоплідних видів, зокрема мишей та пацюків, у спеціалізованих експериментальних умовах можуть застосовуватися методи нанесення підшкірної кольорової мітки. Після народження така мітка проявляється у вигляді помітної плями або смуги, що дає змогу розрізняти потомство.

7. Кольорове маркування.

Одним із поширених способів індивідуального розпізнавання дрібних лабораторних тварин є нанесення на шерсть кольорових позначок за заздалегідь визначеною схемою. Метод особливо зручний для альбіносних мишей, пацюків та кролів, оскільки на світлій шерсті мітки добре помітні. Для маркування можуть використовуватися різні барвники, кожному з яких відповідає певне числове значення. Комбінація кольорів і розташування плям дають змогу створювати індивідуальні коди для значної кількості тварин.

Окремим варіантом є метод Тойффеля, який передбачає використання одного барвника та певної системи розташування позначок. Поверхню спини умовно поділяють на окремі ділянки, кожна з яких відповідає певному розряду числа. Комбінація плям або смуг у визначених зонах дозволяє сформувати індивідуальний номер тварини та використовувати один барвник для маркування великої кількості особин.

Недоліки кольорового маркування.

Основною проблемою цього способу є обмежена стійкість більшості барвників. У разі тривалого експерименту позначки можуть поступово втрачати інтенсивність або зникати внаслідок росту та зміни шерсті. Тому для довготривалих досліджень необхідно обирати барвники з достатньою стійкістю та періодично перевіряти чіткість нанесених міток.

Наркоз тварин

Для проведення процедур із лабораторними тваринами, що можуть супроводжуватися болем або значним дискомфортом, застосовують загальну або місцеву анестезію відповідно до виду тварини, характеру маніпуляції та затвердженого протоколу дослідження. Вибір анестетика та спосіб його застосування мають здійснюватися ветеринарним фахівцем з урахуванням фізіологічного стану тварини та вимог біоетики.

У наведеному методичному матеріалі описано застосування інгаляційних анестетиків для різних видів лабораторних тварин. Зокрема, для мишей, хом'яків, морських свинок, тхорів, курей, кролів і собак традиційно використовували ефір або хлороформ, тоді як для пацюків і котів перевагу надавали ефіру через їхню низьку переносимість хлороформу. Інгаляційне введення передбачало надходження речовини через дихальні шляхи. Зазначені речовини та дозування є історичними й не повинні використовуватися як сучасна практична інструкція, оскільки ефір і хлороформ мають значні ризики та в багатьох сучасних протоколах замінені безпечнішими анестетиками.

Для великих лабораторних тварин перед проведенням анестезії могли застосовувати премедикацію з метою зменшення тривоги та рухової активності, після чого вводили основний анестетичний препарат. У старих методичних описах також наведено використання тіопенталу та хлоралгідрату для досягнення й підтримання анестезії. Водночас конкретний препарат, його концентрацію, шлях введення та дозу сьогодні визначають лише відповідно до затвердженого ветеринарного протоколу, оскільки ці параметри залежать від виду, маси, віку та стану тварини.

Місцеве знеболювання застосовують у випадках, коли необхідно зменшити больову чутливість певної ділянки без проведення загальної анестезії. У класичних методичних

джерелах для цього описували місцеві анестетики, зокрема кокаїн і новокаїн. Для анестезії слизових оболонок носа, очей, ротової порожнини та прямої кишки використовували відповідні місцеві форми препаратів. У сучасній практиці вибір місцевого анестетика здійснюється ветеринарним лікарем відповідно до виду тварини та характеру процедури.

Необхідно враховувати, що чутливість до анестетиків істотно відрізняється між видами тварин. Наприклад, пацюки мають низьку переносимість хлороформу, а тхори можуть бути надзвичайно чутливими до ефіру. Передозування або неправильний підбір анестетика здатні спричинити тяжкі ускладнення, зокрема порушення дихання та серцевої діяльності.

Таким чином, під час роботи з лабораторними тваринами необхідно суворо дотримуватися принципів гуманного поводження, правил біоетики та затверджених ветеринарних протоколів. Анестезія має забезпечувати адекватне знеболення й мінімізувати стрес та страждання тварини, а всі маніпуляції повинні проводитися під відповідним професійним наглядом.

Зараження лабораторних тварин. Методи.

Вибір способу зараження лабораторних тварин залежить від ***тропізму вірусу***, тобто його здатності вибірково проникати та реплікуватися у певних типах клітин, тканин або органів. Залежно від переважного місця репродукції віруси поділяють на кілька груп. Віруси, що переважно уражають нервову тканину, називають ***нейротропними*** (наприклад, вірус сказу); ті, що реплікуються переважно в клітинах шкіри, – ***дерматотропними*** (вірус віспи); віруси, для яких основною мішенню є клітини дихальної системи, – ***пневмотропними*** (вірус грипу); а віруси, що переважно уражають клітини шлунково-кишкового тракту, – ***ентеротропними*** (вірус гепатиту А).

Віруси, здатні розмножуватися у кількох різних типах клітин або тканин, характеризують як політропні. Прикладом може бути вірус інфекційного ринотрахеїту великої рогатої худоби, який уражає клітини дихальної та репродуктивної систем. Віруси з особливо широким спектром клітинної чутливості називають ***пантропними***; до них відносять, зокрема, вірус чуми собак. Такий підхід до характеристики вірусів за переважним напрямом ураження тканин пов'язують із класифікацією Хюбнера.

Відомості про тропізм вірусу дають змогу визначити, які біологічні системи є потенційно чутливими до нього та які органи можуть бути мішенями інфекційного процесу. У сучасній експериментальній вірусології вибір моделі, способу введення та інших параметрів зараження здійснюють відповідно до властивостей конкретного вірусу, затвердженого протоколу дослідження та вимог біобезпеки.

Наприклад, віруси з переважним тропізмом до дихального епітелію можуть досліджуватися із застосуванням інтраназальних моделей, тоді як для вивчення вірусів, що уражають шкіру, використовують відповідні моделі локального зараження. Для нейротропних вірусів застосовують спеціалізовані експериментальні моделі, розроблені з урахуванням їхньої здатності уражати нервову тканину. Пантропні віруси характеризуються здатністю поширюватися та репліку-ватися в широкому спектрі тканин.

Якщо характер тропізму досліджуваного вірусу недостатньо встановлений, у наукових дослідженнях можуть використовуватися різні експериментальні моделі та біологічні системи, що дає змогу порівняти чутливість різних тканин і визначити особливості взаємодії вірусу з організмом. При цьому умови експерименту, зокрема кількість досліджуваного матеріалу та спосіб його введення, мають бути стандартизовані відповідно до затвердженого протоколу.

У старій експериментальній вірусологічній літературі також описували методи штучного зниження резистентності організму тварин, зокрема опромінення або застосування глюкокортикоїдів. Такі підходи розглядалися як спосіб підвищення сприйнятливості тварин до інфекції та полегшення подальшого виявлення вірусу. Однак ці методи можуть спричиняти значний стрес і фізіологічні порушення, тому не повинні застосовуватися поза спеціально затвердженими ветеринарними та біоетичними протоколами.

Взаємозв'язок тропізму вірусу, способу зараження чутливого організму та типу патологічного матеріалу

Група вірусів за тропізмом (класифікація за Хюбнером)	***Приклад вірусу***	***Метод ураження***	***Вид патологічного матеріалу***
Пневмотропні	Віруси грипу, парагрипу, аденовіруси, риновіруси	Інграназальний (аспіраційний)	Носоглоткові змиви, шматочки легенів та бронхів
Нейротропні	Вірус сказу, віруси герпесу	Інтраспінальний Інтрацеребральний Субокципітальний	Кров, спинно-мозкова рідина, шматочки головного та спинного мозку і периферичних нервів*

Дерматропні	Віруси віспи, вісповакцини, герпесу	Перкутанний Кутанний Інтракутанний Субкутанний Інтравенозний Інтрамускулярний	Ділянки шкіри та слизової оболонки, кров, вміст пустул та везикул
Ентеротропні	Ентеровіруси, вірус гепатиту А	Оральний Ректальний Безпосередньо у шлунок Інтраперітонеальний	Фекалії, сеча, блювотні маси, шлунково-кишковий тракт з печінкою, селезінкою, жовчним міхуром та підшлунковою залозою.
Пантропні	Вірус чуми собак, вірус поліомієліту	Інтравенозний Інтракардіальний Інтрамускулярний Оральний Інтраназальний Інтраперітонеальний Субкутанний	Кров, лімфа, змиви носоглотки, спинномозкова рідина, екскрети, секрети, всі органи.

Підготовка вірусовмісного матеріалу та загальні принципи роботи з лабораторними тваринами

Перед використанням у дослідженнях вірусовмісний патологічний матеріал проходить попередню підготовку, метою якої є видалення великих тканинних частинок та

отримання більш однорідного зразка. Тканини за необхідності механічно подрібнюють із використанням відповідного лабораторного обладнання, після чого готують суспензію або екстракт у придатному фізіологічному чи буферному середовищі. Отриманий матеріал додатково очищують від великих частинок відповідно до методики дослідження.

У класичних вірусологічних методиках для підготовки тканинних суспензій застосовували певні концентрації фізіологічного розчину, сироватки, бульйону або буферних систем. Після механічної обробки матеріал піддавали центрифугуванню, унаслідок чого великі клітинні та тканинні компоненти осідали, а надосадова фракція містила більшу частину досліджуваних вірусних частинок. Подальше використання такого матеріалу здійснюють відповідно до затвердженого протоколу та вимог біобезпеки.

Якщо патологічний матеріал містить бактеріальну мікрофлору, необхідно враховувати можливість її впливу на результати вірусологічного дослідження. У методичних підходах для цього описано використання бактеріальних фільтрів або відповідних антимікробних засобів. Водночас фільтрація може призводити до часткової втрати вірусних частинок через їх адсорбцію на фільтрувальному матеріалі, тому такий метод застосовують лише тоді, коли це передбачено конкретною методикою. Вибір способу очищення та антимікробної обробки має здійснюватися з урахуванням властивостей досліджуваного вірусу.

Зараження лабораторних тварин може проводитися з різною експериментальною метою: отримання або накопичення вірусу, його пасажування, визначення інфекційної активності, титрування, дослідження патогенності та виконання інших вірусологічних завдань. Сукупність процедур, пов’язаних із введенням вірусовмісного матеріалу тварині для вивчення інфекційного процесу, традиційно позначають терміном «ураження лабораторних тварин». У сучасних протоколах конкретний спосіб введення та його параметри визначаються виключно затвердженою методикою.

Якщо метою дослідження є отримання специфічної антисироватки або антитіл до певного вірусу, введення антигенного матеріалу розглядають як імунізацію лабораторних тварин. На відміну від одноразового експериментального зараження, ***імунізація*** передбачає повторні введення антигену за заздалегідь визначеною схемою, що дає змогу сформувати виражену специфічну імунну відповідь.

Для посилення імунної відповіді до антигенного матеріалу можуть додавати ***ад'юванти*** – речовини, здатні підвищувати ефективність формування імунної відповіді. У класичних імунологічних дослідженнях широко застосовували ад'юванти Фрейнда, які поділяють на повний і неповний. Повний ад'ювант містить мінеральну олію та інактивовані мікобактеріальні компоненти, тоді як неповний не містить бактеріального компонента. Через виражену реактивність повного ад'юванта його використання потребує суворого дотримання затвердженого протоколу; внутрішньовенне введення повного ад'юванта не допускається. Сучасне використання ад'ювантів також має відповідати вимогам біоетики та ветеринарного контролю.

Важливою умовою проведення експериментальних процедур є дотримання ***асептики*** та запобігання контамінації. Для цього застосовують стерильні інструменти й матеріали, а процедури виконують відповідно до встановлених правил лабораторної безпеки. У разі маніпуляцій, під час яких порушується цілісність шкірних покривів, місце введення попередньо обробляють відповідним антисептиком згідно із затвердженим протоколом. Для природних шляхів надходження матеріалу, зокрема інтраназального та перорального, така підготовка має свої особливості.

Отже, підготовка вірусовмісного матеріалу, його введення тваринам та проведення імунізації повинні здійснюватися за стандартизованими методиками, з урахуванням властивостей вірусу, мети дослідження, вимог біобезпеки та принципів гуманного поводження з лабораторними тваринами.

Інтраназальне (аспіраційне) зараження

Інтраназальний метод передбачає надходження вірусовмісного матеріалу через носові ходи та використовується переважно для моделювання інфекцій дихальної системи. У класичних вірусологічних методиках описано кілька варіантів його проведення.

Один із традиційних підходів полягає в нанесенні досліджуваного матеріалу на слизову оболонку носа за допомогою піпетки або іншого відповідного лабораторного пристрою у тварини, яка перебуває під анестезією. При цьому важливе значення має стан дихання: надмірне подразнення слизової оболонки може спричинити чхання та викидання матеріалу в навколишнє середовище, тоді як надто глибока анестезія може порушувати нормальну вентиляцію легень.

Такі процедури потребують особливої уваги до біобезпеки, оскільки утворення крапель або аерозолю може призвести до поширення інфекційного матеріалу. Тому роботу з потенційно інфекційними зразками проводять лише в обладнаних лабораторіях із застосуванням відповідних засобів індивідуального захисту та інженерних засобів контролю аерозолів.

Іншим варіантом є використання спеціалізованих інструментів для доставки матеріалу до нижніх відділів дихальних шляхів. Такі інвазивні методики застосовують лише у спеціально організованих експериментальних умовах, оскільки вони потребують професійної підготовки, належного знеболення та ветеринарного контролю.

Окремим різновидом є ***інгаляційне зараження***, за якого тварина вдихає аерозоль, що містить вірусні частинки. Для експериментальних моделей використовують спеціальні системи контрольованої експозиції. У разі утворення дрібнодисперсного аерозолю частинки можуть проникати у глибокі відділи дихальних шляхів, включно з альвеолярною зоною.

Інгаляційний метод має певні обмеження, зокрема потребує спеціального обладнання для формування та контролю аерозолю, а також суворого дотримання вимог біобезпеки. Крім того, його проведення може вимагати значної кількості стандартизованого вірусовмісного матеріалу.

Таким чином, інтраназальний та інгаляційний способи дають змогу досліджувати взаємодію вірусів із дихальною системою, проте конкретний варіант експериментальної моделі визначають відповідно до властивостей вірусу, мети дослідження, затвердженого протоколу та вимог біобезпеки.

Методи зараження через травний тракт

Інфікування лабораторних тварин через шлунково-кишковий тракт у класичних вірусологічних дослідженнях здійснювали кількома способами. Вибір конкретного підходу залежав від властивостей вірусу, його тропізму та мети експерименту.

*1. Пероральний спосіб***.**

Вірусовмісний матеріал можна змішувати з кормом або додавати до питної води. Також використовувати лікарські форми, зокрема таблетки чи желатинові капсули, до складу яких включали досліджуваний матеріал. Такий підхід дає змогу змоделювати природне потрапляння інфекційного агента через ротову порожнину та травний тракт. У лабораторних умовах тварин зазвичай утримують окремо, щоб контролювати надходження матеріалу та запобігати його передачі між особинами.



Рис.7. Оральне зараження

2. Введення матеріалу безпосередньо у шлунок.

Інший підхід передбачає доставку досліджуваного матеріалу до шлунка за допомогою

спеціальних лабораторних пристроїв – зондів, катетерів або канюль. Цей спосіб дає змогу точніше контролювати надходження матеріалу до травного тракту та застосовується в експериментальних моделях відповідно до виду тварини й затвердженого протоколу.

3. Ректальний спосіб.

За цього підходу досліджуваний матеріал вводять через пряму кишку, моделюючи надходження інфекційного агента до нижніх відділів травного тракту. У сучасних експериментальних дослідженнях така процедура потребує спеціального ветеринарного контролю та виконання відповідно до затверджених вимог гуманного поводження з тваринами.

Окрім способів, пов'язаних із травним трактом, у вірусологічних дослідженнях існують *парентеральні та інші експериментальні методи введення,* за яких інфекційний матеріал потрапляє в організм, минаючи шлунково-кишковий тракт. До них належать методи, спрямовані на доставку матеріалу до певних тканин, органів або систем залежно від тропізму досліджуваного вірусу.

Окрему групу становлять методи зараження через шкірні покриви. Їх застосовують для вивчення вірусів, що мають тропізм до шкіри або здатні проникати через пошкоджені чи спеціально підготовлені ділянки шкірного покриву. Вибір конкретної експериментальної моделі визначається біологічними властивостями вірусу, метою дослідження та вимогами біобезпеки.

Інтраплевральне зараження

Інтраплевральний метод передбачає введення досліджуваного матеріалу в плевральну порожнину лабораторної тварини. У класичних методиках описується фіксація тварини у боковому положенні, що забезпечує доступ до міжреберної ділянки. Після цього матеріал вводять через міжреберний простір із використанням відповідного інструментарію.

Цей метод належить до інвазивних способів експериментального інфікування та може супроводжуватися ризиком травмування тканин і розвитку ускладнень. Тому його застосування можливе лише в межах затвердженого експериментального протоколу, із забезпеченням належної анестезії, асептики та ветеринарного контролю.

Перкутанне (нашкірне) зараження

Нашкірний метод інфікування передбачає нанесення вірусовмісного матеріалу на поверхню неушкодженої шкіри лабораторної тварини. У класичних вірусологічних методиках передбачалося попереднє видалення шерсті з відповідної ділянки, після чого досліджуваний матеріал наносили та обережно розподіляли по поверхні шкіри за допомогою стерильного інструментарію.

Ефективність такого способу зараження залежить від біологічних властивостей вірусу, насамперед його тропізму до шкірних покривів, а також від здатності збудника проникати через неушкоджений шкірний бар'єр. За даними класичних досліджень, при застосуванні цього методу позитивна реакція спостерігалася рідко, тому його діагностична та експериментальна ефективність є обмеженою.

Кутанне (шкірне) зараження

Шкірний метод інфікування лабораторних тварин із попереднім ушкодженням шкіри ґрунтується на нанесенні вірусовмісного матеріалу на поверхню, попередньо підготовлену шляхом скарифікації. Такий підхід застосовують у дослідженнях вірусів, для яких шкірні покриви можуть бути важливим місцем проникнення або репродукції.

Для проведення експерименту обирають ділянку тіла, доступ до якої для самої тварини є максимально обмеженим. Залежно від виду тварини в класичних методиках використовували різні анатомічні ділянки, зокрема спину, бокову поверхню тулуба, живіт, грудну ділянку або поверхню кінцівок.

Перед нанесенням досліджуваного матеріалу відповідну ділянку шкіри звільняють від шерсті та обробляють

антисептиком. Після цього на поверхні створюють контрольовані поверхневі ушкодження, достатні для полегшення контакту матеріалу з тканинами, але без вираженого травмування та кровотечі. На підготовлену ділянку наносять досліджуваний матеріал і рівномірно розподіляють його стерильним інструментом.

Скарифікаційний метод є інвазивною процедурою, тому його проведення має відповідати затвердженому протоколу дослідження, правилам асептики та принципам гуманного поводження з лабораторними тваринами. У сучасній практиці конкретні технічні параметри процедури визначаються ветеринарним фахівцем та відповідною методикою.

Субкутанне (підшкірне) зараження

Підшкірний метод інфікування передбачає введення досліджуваного вірусовмісного матеріалу в підшкірну тканину лабораторної тварини. Вибір ділянки для проведення процедури визначається особливостями анатомічної будови тварини та можливістю безпечно сформувати шкірну складку. У різних видів тварин у класичних методиках використовували ділянки спини, бокової поверхні тулуба, шиї, живота, плеча та кінцівок.

Перед проведенням процедури відповідну ділянку звільняють від шерсті та обробляють антисептичним засобом. Після цього шкіру обережно піднімають, формуючи складку, а досліджуваний матеріал вводять у підшкірний простір за допомогою стерильного інструментарію.

Підшкірний спосіб належить до парентеральних методів введення та дає змогу доставити досліджуваний матеріал безпосередньо в тканини, минаючи природні бар'єри травного та дихального трактів. Конкретні параметри процедури, включно з об'ємом матеріалу, видом інструментарію та технікою введення, визначаються відповідно до затвердженого експериментального протоколу, виду тварини та вимог ветеринарного контролю.



Рис. 8. Субкутанне зараження

Інтракутанне (внутрішньошкірне) зараження

Інтракутанний, або внутрішньошкірний, метод передбачає введення досліджуваного матеріалу безпосередньо в товщу шкіри. Ділянку для проведення процедури попередньо готують аналогічно до підшкірного способу: звільняють від шерсті та обробляють відповідним антисептичним засобом. У класичних методичних описах для внутрішньошкірного введення використовували тонку голку, яку розташовували майже паралельно поверхні шкіри. Під час введення невеликої кількості матеріалу на поверхні шкіри утворювалося характерне локальне підвищення у вигляді невеликого пухирця, яке традиційно порівнювали з «лимонною кіркою». Така місцева реакція свідчить про потрапляння матеріалу саме в поверхневі шари шкіри.

Метод належить до інвазивних способів експериментального введення, тому його проведення має здійснюватися відповідно до затвердженого протоколу, із дотриманням асептики, належного знеболення та вимог гуманного поводження з лабораторними тваринами.



Рис.9. Інтракутанне зараження

Інтравенозне (внутрішньовенне) та інтракардіальне (внутрішньосерцеве) зараження

Інтравенозний метод передбачає введення досліджуваного матеріалу безпосередньо у венозне русло. Вибір судини залежить від виду, розмірів та анатомічних особливостей лабораторної тварини. У різних експериментальних моделях можуть використовуватися доступні периферичні або великі вени, зокрема хвостові у дрібних гризунів, вушні у кролів, а також інші венозні судини у великих тварин. У птахів для внутрішньовенного введення доступною є поверхнева вена крила.

У дрібних гризунів, зокрема мишей та пацюків, у класичних методиках найчастіше описується використання бічних хвостових вен. Для полегшення візуалізації судини застосовують методи, що сприяють її розширенню, після чого здійснюють введення матеріалу відповідно до затвердженого протоколу. Правильне положення голки визначають за відсутністю підшкірного набряку та вільним надходженням матеріалу.

У морських свинок для внутрішньовенного введення можуть використовуватися доступні периферичні вени кінцівок. У світлошерстих тварин окремі судини можуть бути достатньо добре помітними, що полегшує їх ідентифікацію.

Для кролів традиційно використовують крайову вену вушної раковини. Перед процедурою ділянку очищують і знезаражують, а саму вену візуалізують та забезпечують відповідний доступ. Після завершення введення місце пункції притискають стерильним матеріалом для запобігання кровотечі та утворенню гематоми. У разі повторних процедур доцільно змінювати ділянки доступу, щоб зменшити ризик пошкодження судини.

У випадках, коли периферичний венозний доступ є складним або технічно недоступним, у старій експериментальній літературі описувалося інтракардіальне введення, тобто безпосереднє введення матеріалу в порожнину серця. Така процедура є високоризиковою та інвазивною, тому в сучасній практиці вона допускається лише за наявності чітко обґрунтованої наукової необхідності, відповідного дозволу та виконання спеціально підготовленим персоналом.

Інтракардіальне введення потребує глибокого знання анатомії відповідного виду тварини, належної анестезії та суворого контролю стану тварини. Через високий ризик травмування серця, кровотечі, порушень серцевого ритму та інших ускладнень конкретна техніка, місце пункції та інші параметри процедури визначаються лише ветеринарним фахівцем відповідно до затвердженого протоколу, а не за універсальною схемою.

Особливу увагу під час підготовки матеріалу для внутрішньосудинного введення приділяють його однорідності та відсутності сторонніх частинок. Наявність великих механічних домішок або повітряних бульбашок може становити серйозну небезпеку, оскільки здатна спричинити порушення кровообігу та інші гострі ускладнення.

Таким чином, інтравенозний та інтракардіальний способи належать до інвазивних методів введення, які потребують спеціальної підготовки персоналу, стерильних умов, належного знеболення та постійного контролю стану лабораторної тварини.

Інтрамускулярне (внутрішньом'язеве) зараження

Внутрішньом'язовий метод передбачає введення досліджуваного матеріалу безпосередньо в товщу скелетного м'яза. У класичних методиках для цього обирали ділянки шиї, грудної клітки, сідничної або стегнової області залежно від виду та анатомічних особливостей тварини.

Після підготовки місця ін'єкції стерильним інструментарієм матеріал вводять у м'язову тканину. У птахів, зокрема курей, традиційно як місце введення розглядали великий грудний м'яз.

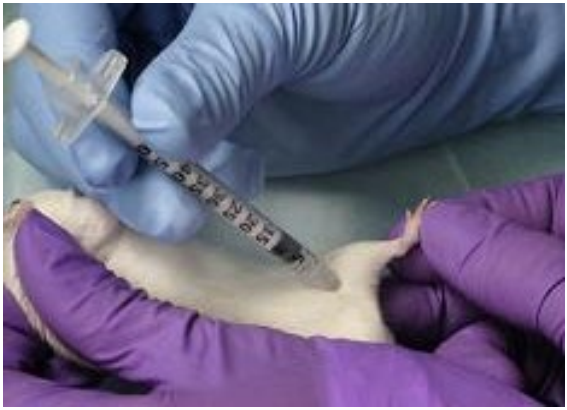


Рис. 10. Інтрамускулярне зараження

Цей спосіб належить до парентеральних методів введення та застосовується в експериментальних моделях відповідно до тропізму вірусу й мети дослідження. Конкретні умови проведення процедури мають визначатися затвердженим протоколом, із дотриманням правил асептики, належного знеболення та гуманного поводження з лабораторними тваринами.

Інтраперітонеальне (внутрішньочеревинне) зараження

Внутрішньочеревний (інтраперитонеальний) метод передбачає введення досліджуваного матеріалу в черевну порожнину. У класичних методиках перед проведенням процедури тварину фіксували таким чином, щоб зменшити ймовірність травмування внутрішніх органів під час маніпуляції.

Ділянку для введення обирали на нижній частині передньої черевної стінки, де забезпечувався відповідний доступ до черевної порожнини. Шкіру та черевну стінку обережно фіксували, після чого здійснювали введення інструмента відповідно до анатомічних особливостей конкретного виду тварини.

Оскільки процедура є інвазивною та потенційно травматичною, її проведення потребує спеціальної підготовки, належного знеболення, стерильних умов і ветеринарного контролю. Технічні параметри, зокрема місце та глибину введення, визначають за затвердженим протоколом для конкретного виду тварини; наведені в старих методичних джерелах універсальні значення не слід переносити на сучасні експерименти без відповідної ветеринарної оцінки.



Рис.11. Інтраперітонеальне зараження

Під час внутрішньочеревного введення спочатку долають шкірні покриви та м'язовий шар черевної стінки, після чого здійснюють проникнення в черевну порожнину. У класичних методичних описах правильність доступу визначали за зміною опору тканин та іншими тактильними ознаками. Після завершення маніпуляції інструмент обережно видаляють, а місце проколу обробляють відповідно до вимог асептики.

Для великих лабораторних тварин доступ до черевної порожнини може передбачати невеликий розріз шкіри, через який надалі здійснюють необхідну маніпуляцію. Такий спосіб є більш травматичним і потребує відповідного знеболення, стерильних умов та ветеринарного нагляду.

У старих протоколах також зазначалося попереднє обмеження годування тварин перед процедурою. У сучасних дослідженнях режим годування визначають ветеринарним фахівцем відповідно до виду тварини, характеру анестезії та затвердженого протоколу, оскільки тривале голодування не є універсально необхідним для всіх видів і процедур.

Субощипітальне (каркове) зараження

Інтрацистернальний метод передбачає введення досліджуваного матеріалу в ділянку великої мозкової цистерни та в класичних експериментальних методиках застосовувався переважно для великих лабораторних тварин, зокрема кролів і собак. У дрібних тварин цей підхід суттєво обмежений анатомічними особливостями через невеликий простір між мозковими оболонками та структурами головного мозку.

У старих методичних описах тварину під анестезією фіксували таким чином, щоб забезпечити доступ до краніоцервікальної ділянки. Після підготовки операційного поля шерсть видаляли, а шкіру обробляли антисептичним засобом. Пункцію виконували в ділянці між основою черепа

та першим шийним хребцем, орієнтуючись на серединну лінію. Точність розташування мала принципове значення, оскільки відхилення від анатомічних орієнтирів могло спричинити травмування судинних або нервових структур.

Для доступу до великої мозкової цистерни використовували спеціальний пункційний інструментарій. У класичних протоколах зазначалося, що голку вводили дуже обережно та поступово, контролюючи проходження тканин. Поява спинномозкової рідини розглядалася як ознака потрапляння до відповідного анатомічного простору.

Після отримання спинномозкової рідини в історичних методиках описувалося її часткове вилучення з подальшим введенням досліджуваного матеріалу в аналогічному об'ємі. Сучасне виконання таких процедур потребує спеціалізованої підготовки, ветеринарного контролю, адекватної анестезії та суворого дотримання асептики.

Інтрацистернальні маніпуляції є складними та потенційно небезпечними через близькість головного мозку, мозкових оболонок і великих судин. Тому конкретні анатомічні орієнтири, глибину пункції, об'єм рідини та інші технічні параметри визначають лише відповідно до затвердженого протоколу для конкретного виду тварини, а наведені в застарілих джерелах числові значення не слід використовувати як універсальну практичну інструкцію.

Інтраспінальне (внутрішньоспинномозкове, люмбосакральне, крижово-поперекове) зараження

Наркотизовану тварину фіксують у положенні, що забезпечує виражене згинання хребта в поперековокрижовій ділянці. Пункцію виконують тонкою голкою в зоні переходу останнього поперекового хребця до першого крижового, дещо латеральніше від серединної лінії. У класичних методиках голку спрямовували під кутом приблизно 45° до поверхні тіла.

Інтрацеребральне (внутрішньомозкове) зараження

Інтрацеребральний метод передбачає введення досліджуваного матеріалу безпосередньо в тканину головного мозку або в простір під твердою мозковою оболонкою. Такий спосіб застосовують у дослідженнях вірусів, що мають виражений тропізм до нервової тканини, а також у спеціальних експериментальних моделях.

У класичних методиках для введення матеріалу до головного мозку використовували переважно ділянки черепа з відносно тонкою кісткою та мінімальною кількістю м'яких тканин. Вибір анатомічної зони визначався будовою черепа конкретного виду тварини та необхідністю мінімізувати ризик пошкодження великих кровоносних судин.

У великих лабораторних тварин процедуру традиційно проводили під анестезією через спеціально сформований отвір у кістках черепа. Після підготовки операційного поля забезпечували доступ до мозкових оболонок, після чого досліджуваний матеріал вводили відповідно до експериментального протоколу. Після завершення процедури операційну ділянку обробляли та закривали з дотриманням правил асептики.

Для деяких видів тварин у класичних вірусологічних дослідженнях описували менш інвазивні варіанти доступу, за яких спеціальний отвір у черепі створювали без повноцінної трепанації. Вибір способу залежав від розміру тварини, товщини кісток черепа та особливостей анатомічної будови.

У дрібних лабораторних тварин доступ до мозкових структур також здійснювали за допомогою спеціалізованих пункційних методик. При цьому особливу увагу приділяли правильному вибору анатомічної ділянки, оскільки необхідно було уникати пошкодження великих венозних синусів та інших важливих структур.

Окремо в історичних методичних джерелах описувався трансорбітальний доступ у кролів, за якого використовували анатомічні особливості ділянки очниці. Такий підхід вважався альтернативою безпосередній трепанації черепа, однак також належить до високотравматичних інвазивних процедур.

Після введення матеріалу в окремих тварин могли спостерігатися короткочасні реакції, пов'язані з подразненням центральної нервової системи або самої процедурою.

Зараження в периферичний нерв

Інфікування сідничного нерва є рідкісним експериментальним методом, який у класичних вірусологічних дослідженнях застосовували переважно щодо великих лабораторних тварин. Його використовували для вивчення особливостей поширення та взаємодії вірусів із нервовою тканиною.

Процедуру проводили під відповідною анестезією та за умов належної фіксації тварини. Після підготовки операційного поля забезпечували хірургічний доступ до ділянки проходження сідничного нерва. У класичних описах передбачалося обережне розведення м'язових тканин для візуалізації нерва та подальше введення досліджуваного матеріалу безпосередньо в нервову тканину.

Після завершення маніпуляції операційну ділянку обробляли, а розріз закривали відповідним способом. Особливу увагу приділяли недопущенню потрапляння досліджуваного матеріалу на прилеглі тканини та забезпеченню асептичних умов.

Такий метод належить до складних і високотравматичних інвазивних процедур, тому в сучасних дослідженнях його застосування суттєво обмежене та потребує спеціального обґрунтування, відповідного дозволу, анестезії й ветеринарного контролю. Конкретна техніка виконання має визначатися лише затвердженим експериментальним протоколом.

Інтратестикулярне (впутрішньосім'яникове) зараження

Інтратестикулярний метод передбачає введення досліджуваного матеріалу безпосередньо в тканину сім'яника. У класичних вірусологічних дослідженнях цей спосіб переважно застосовували на кролях для вивчення особливостей репродукції та локалізації окремих вірусів у тканинах статевої системи.

Перед проведенням процедури тварину відповідним чином фіксували та забезпечували належне знеболення. Досліджувану ділянку готували з дотриманням правил асептики, після чого забезпечували доступ до сім'яника та його стабілізацію для виконання маніпуляції.

Метод належить до інвазивних експериментальних способів зараження, тому його проведення потребує спеціальної підготовки, ветеринарного контролю, адекватної анестезії та дотримання принципів гуманного поводження з лабораторними тваринами. Конкретні технічні параметри процедури визначаються відповідно до затвердженого протоколу дослідження.

Інтраокулярне зараження

До методів експериментального інфікування, пов'язаних із органом зору, належать корнеальний, інтракорнеальний, кон'юнктивальний та інтраокулярний способи. Вони відрізняються локалізацією введення досліджуваного матеріалу та дають змогу моделювати взаємодію вірусів із різними структурами ока.

Інтраокулярний метод передбачає введення досліджуваного матеріалу в передню камеру ока. У класичних вірусологічних дослідженнях його застосовували переважно на великих лабораторних тваринах, зокрема кролях, собаках та морських свинках. Процедуру проводили під анестезією з попередньою підготовкою операційного поля та забезпеченням нерухомості очного яблука.

У традиційних методиках після місцевого знеболення забезпечували доступ до передньої камери ока та за

допомогою тонкого інструментарію здійснювали пункцію в ділянці, близькій до краю рогівки. Після потрапляння до передньої камери частину внутрішньоочної рідини могли видаляти, а потім заміщувати відповідним об'ємом досліджуваного матеріалу.

Інтраокулярне введення є високоспеціалізованою та травматичною процедурою, оскільки неправильне виконання може призвести до пошкодження рогівки, райдужної оболонки, кришталика або інших структур ока. Тому в сучасних експериментальних дослідженнях такі маніпуляції виконують лише фахівці з відповідною підготовкою, із застосуванням затверджених протоколів анестезії, асептики та ветеринарного контролю. Детальні параметри процедури визначаються окремо для кожної експериментальної моделі.

Корнеальне зараження

Корнеальний метод інфікування передбачає нанесення досліджуваного матеріалу на рогівку ока. У класичних вірусологічних методиках перед процедурою здійснювали місцеве знеболення та забезпечували нерухомість очного яблука.

Після підготовки ока поверхню рогівки обережно піддавали поверхневій скарифікації, створюючи неглибокі лінійні пошкодження. На підготовлену ділянку наносили досліджуваний матеріал, забезпечуючи його контакт із поверхнею рогівки.

Корнеальний метод використовували для дослідження вірусів, здатних уражати тканини ока, а також для вивчення локальних проявів вірусної інфекції. Оскільки процедура пов'язана з пошкодженням рогівки та ризиком розвитку запальних ускладнень, у сучасних дослідженнях її проводять лише за затвердженим протоколом, із належним знеболенням, асептикою та ветеринарним контролем.

Інтракорнеальне зараження

Інтракорнеальний метод передбачає введення досліджуваного матеріалу безпосередньо в товщу рогівки. Підготовку тварини та ока здійснюють за принципами, аналогічними до корнеального способу, із забезпеченням належного знеболення, фіксації та асептики.

У класичних методичних описах досліджуваний матеріал вводили в окремі ділянки рогівки за допомогою тонкого інструментарію. Такий підхід давав змогу локалізувати вплив вірусного матеріалу безпосередньо в тканині рогівки та оцінювати подальші місцеві зміни.

Інтракорнеальне введення є інвазивною офтальмологічною процедурою, що може спричинити пошкодження рогівки та запальні ускладнення. Тому в сучасній лабораторній практиці її проведення потребує спеціальної підготовки, затвердженого протоколу, адекватної анестезії та ветеринарного контролю.

Кон'юнктивальне зараження

Кон'юнктивальний метод передбачає нанесення досліджуваного матеріалу на слизову оболонку кон'юнктиви ока. У класичних вірусологічних методиках інфекційний матеріал наносили на поверхню ока крапельним способом, не пошкоджуючи рогівку.

Такий підхід дає змогу моделювати потрапляння вірусного агента через кон'юнктиву та досліджувати місцеву реакцію тканин ока. На відміну від корнеального та інтракорнеального способів, при цьому методі цілісність рогівки не порушується.

Процедуру проводять із дотриманням правил асептики та відповідно до затвердженого експериментального протоколу, оскільки робота з вірусовмісним матеріалом потребує належних заходів біобезпеки та ветеринарного контролю.

Одержання патологічного матеріалу від інфікованих лабораторних тварин

Якість та правильність відбору біологічного матеріалу є важливою передумовою для успішної індикації та подальшої ідентифікації вірусів. Вибір зразка визначається особливостями перебігу інфекції та насамперед тропізмом конкретного вірусу, тобто його здатністю розмножуватися у певних клітинах, тканинах або органах.

Таким чином, між тропізмом вірусу, способом експериментального інфікування та вибором патологічного матеріалу існує безпосередній взаємозв'язок. Вірус вводять у ділянку, де розташовані чутливі до нього клітини, а після розвитку інфекційного процесу досліджують ті органи, тканини або біологічні рідини, у яких очікується найбільше накопичення збудника.

За часом отримання патологічний матеріал умовно поділяють на прижиттєвий та секційний. Прижиттєві зразки отримують від тварини під час проведення експерименту без припинення її життя. Секційний матеріал відбирають після розтину тварини – після завершення експерименту або у випадку її передчасної загибелі.

Секрети та екскрети

Секрети – це біологічні речовини, які синтезуються та виділяються клітинами або залозами організму. До них належать, зокрема, слина, піт, молоко, шкірне сало, шлунковий секрет, жовч, а також окремі біологічні рідини організму.

Екскрети – це кінцеві або побічні продукти метаболізму, які виводяться з організму в зовнішнє середовище. До цієї групи належать сеча, кал, піт, надлишок води та солей, а також деякі речовини, що виводяться через дихальні шляхи та інші системи організму.

Відбір матеріалу з верхніх дихальних шляхів

Для дослідження вірусів, локалізованих у дихальних шляхах, можуть отримувати мазки зі слизових оболонок.

Зразок відбирають стерильним тампоном, після чого переносять його у відповідне транспортне середовище або фізіологічний розчин. Надалі матеріал піддають необхідній лабораторній підготовці, спрямованій на видалення клітинного детриту та сторонніх домішок.

Після первинної обробки зразки можуть тимчасово зберігатися в умовах, що забезпечують максимальне збереження інфекційної активності вірусу. У сучасній практиці умови транспортування та зберігання визначаються властивостями конкретного збудника і вимогами відповідного лабораторного протоколу.

Матеріал із везикул та пустул

У разі вірусних інфекцій, що супроводжуються утворенням везикул або пустул, їхній вміст може бути цінним джерелом для вірусологічного дослідження. Зразок відбирають стерильним способом і переносять у відповідне транспортне середовище.

Перед відбором матеріалу поверхню ураженої ділянки обробляють відповідно до затвердженої методики, щоб зменшити ризик сторонньої мікробної контамінації. Отриманий матеріал використовують для подальшої лабораторної діагностики або зберігають у відповідних умовах.

Дослідження сечі та калу

Сечу та кал можуть збирати протягом експерименту для визначення можливого виділення вірусу з організму. Сечу отримують у стерильну ємність, після чого за необхідності проводять її первинне очищення від клітинних та інших домішок.

Зразки калу поміщають у стерильні герметичні контейнери. Для подальшого вірусологічного дослідження з них готують суспензію у відповідному фізіологічному або буферному середовищі. Після механічного перемішування матеріал очищують від великих частинок, наприклад шляхом центрифугування, а отриману рідку фракцію використовують для подальшого аналізу.

Якщо отримати кал безпосередньо неможливо, альтернативою можуть бути ректальні мазки. Тампон після відбору переносять у транспортне середовище, після чого отриману суспензію використовують для вірусологічного дослідження.

Отримання кісткового мозку

Кістковий мозок може бути джерелом патологічного матеріалу під час прижиттєвого дослідження. Його отримують методом пункції з відповідної кістки, вибір якої залежить від виду лабораторної тварини або птаха та мети дослідження.

У різних видів тварин доступними для отримання кісткового мозку можуть бути грудина, клубова або стегнова кістки. У птахів використовують анатомічно доступні ділянки скелета. Такі процедури проводять із застосуванням відповідного знеболення та ветеринарного контролю.

Отримання спинномозкової рідини

Спинномозкову рідину (ліквор) отримують шляхом люмбальної пункції. Відібраний матеріал збирають у стерильний контейнер і використовують для подальшого вірусологічного дослідження.

Якщо зразок не має ознак бактеріального забруднення, його можуть досліджувати без додаткової обробки. За наявності еритроцитів або інших клітинних домішок проводять відповідну лабораторну підготовку, зокрема очищення зразка від клітинного матеріалу.

Отже, вибір патологічного матеріалу повинен ґрунтуватися на тропізмі вірусу, локалізації інфекційного процесу та особливостях його виділення з організму. Правильний відбір, транспортування, первинна обробка та зберігання зразків мають вирішальне значення для достовірності результатів вірусологічного дослідження.

Одержання крові від лабораторних тварин

Відбір крові у лабораторних тварин здійснюють із суворим дотриманням правил асептики. Перед процедурою відповідну ділянку шкіри обробляють дезінфекційним засобом, використовують стерильні інструменти та посуд, а експериментатор працює у спеціальному захисному одязі. Для запобігання гемолізу еритроцитів шприц перед забором крові має бути сухим.

Вибір способу кровозабору визначається необхідним об'ємом матеріалу. Залежно від завдання дослідження кров можуть отримувати з периферичних вен, шляхом пункції серця або кровопусканням із великих судин.

За необхідності отримання невеликої кількості крові використовують доступні поверхневі судини. У кроликів, пацюків і мурчаків матеріал можна отримувати з крайової вушної або бічної хвостової вени. У мишей, пацюків, хом'яків та мурчаків можливий відбір із кінцевих ділянок пальців. У птахів для цього використовують підкрильцеву вену або гребінь.

У кроликів, мурчаків і тхорів перед пункцією крайової вушної вени тварину фіксують, а ділянку судини обробляють спиртом. Для кращого наповнення вени допускається застосування тепла або інших дозволених засобів, однак їх залишки не повинні потрапляти у зразок, оскільки це може спричинити гемоліз. Після створення умов для наповнення судини виконують її пункцію. Надмірне стискання місця відбору небажане, оскільки домішування тканинної рідини може вплинути на результати подальшого аналізу. За можливості повторних відборів слід чергувати ділянки або судини.

У мишей і щурів невеликий об'єм крові можна отримувати з бічних вен хвоста. Перед процедурою хвіст обробляють і створюють умови для розширення судин. Після отримання проби місце пошкодження обов'язково обробляють для запобігання ускладненням.

У мавп невеликі зразки крові беруть із периферичних ділянок пальців за допомогою стерильного інструменту, придатного для проведення пункції. У курей кров у невеликій кількості отримують переважно з підкрильцевої вени або гребеня. Після процедури необхідно забезпечити надійне припинення кровотечі.

Для отримання значного об'єму крові застосовують пункцію серця або забір із великих вен, зокрема яремної, стегнової, ліктьової чи підкрильцевої.

Пункцію серця проводять у відповідно підготовлених та анестезованих тварин. Ділянку втручання очищають, визначають проєкцію серцевого поштовху та виконують забір крові стерильним інструментарієм. Обсяг крові, який можна отримати, залежить від виду, маси та фізіологічного стану тварини. Цей спосіб пов'язаний із ризиком ускладнень, тому його проведення потребує відповідної кваліфікації та ветеринарного контролю.

Кров із яремної вени отримують у різних видів лабораторних і сільськогосподарських тварин. У разі потреби судину попередньо роблять доступнішою та забезпечують її наповнення. Після пункції кров збирають у стерильну ємність.

Забір крові зі стегнової вени здійснюють у тварин, для яких цей судинний доступ є анатомічно доцільним. У великих тварин використовують пункцію судини, тоді як у дрібних тварин доступ до неї може потребувати хірургічної підготовки.

Для отримання великого об'єму крові у великих тварин також може застосовуватися кровопускання з артеріальних судин**.** Процедуру виконують в умовах належної асептики та під відповідним контролем, оскільки вона супроводжується значною крововтратою.

Отриману кров у лабораторних дослідженнях використовують у різних формах: цільну кров, плазму, сироватку, еритроцити та лейкоцити. Вибір конкретного компонента залежить від мети дослідження та характеру аналізу.

Якщо необхідно запобігти згортанню крові, використовують антикоагулянти. До них належать цитрати, оксалати, фториди, гепарин та інші речовини, що перешкоджають утворенню згустку. Антикоагулянт додають до стерильної пробірки до внесення крові у відповідному співвідношенні, після чого зразок обережно перемішують.

Під час роботи з кров'ю важливо враховувати, що вибір антикоагулянта може впливати на результати окремих лабораторних тестів. Тому його підбирають відповідно до мети дослідження, а отримані зразки бажано досліджувати без зайвої затримки.

Евтаназія

Після завершення експерименту тварин, які залишилися живими та більше не залучаються до дослідження, піддають ***евтаназії.*** Під цим поняттям розуміють гуманне припинення життя тварини з мінімізацією болю, страху та стресу.

Евтаназію проводять у спеціально призначеному приміщенні, окремо від інших тварин, із дотриманням вимог біоетики, асептики та безпеки. Процедуру здійснюють своєчасно, не допускаючи розвитку тяжкого або болісного стану після завершення експерименту.

Метод евтаназії обирають з урахуванням виду, розміру та фізіологічного стану тварини, а також мети подальшого дослідження. Перевагу надають методам, які забезпечують швидку втрату свідомості та подальше безболісне припинення життєвих функцій. У сучасній лабораторній практиці переважно застосовують фармакологічні методи, зокрема введення відповідного анестетика або препарату для евтаназії під контролем кваліфікованого персоналу.

Для дрібних лабораторних тварин метод евтаназії також визначають відповідно до затверджених ветеринарних протоколів. Фізичні методи, зокрема ***декапітація*** (відрізання голови) чи інші механічні способи, допуска-

ються лише у випадках, передбачених нормативними документами та етичними правилами, і повинні виконуватися спеціально підготовленим персоналом.

У випадках, коли після евтаназії необхідно провести патологоанатомічне або вірусологічне дослідження, важливо враховувати вплив обраного методу на стан тканин, органів і біологічних зразків. Якщо досліджуваним об'єктом є головний мозок або інші тканини, спосіб припинення життя тварини обирають таким чином, щоб мінімізувати зміни, які можуть перешкоджати подальшому аналізу.

За необхідності отримання крові після евтаназії може проводитися тотальне знекровлення. У великих лабораторних тварин кров отримують із великих судин, а у дрібних – після відповідної підготовки шляхом доступу до судин шиї. Отриманий матеріал збирають у стерильні ємності та використовують відповідно до мети дослідження.

Отже, завершальний етап роботи з лабораторними тваринами передбачає не лише припинення експерименту, а й правильний вибір методу евтаназії, проведення необхідного відбору біологічного матеріалу та подальше патологоанатомічне дослідження. Усі процедури мають виконуватися відповідно до сучасних принципів гуманного поводження з лабораторними тваринами та чинних біоетичних і ветеринарних вимог.

Розтин лабораторних тварин – порядок та техніка

Перед проведенням розтину необхідно ознайомитися з анамнезом тварини, тобто зібрати відомості про перебіг експерименту, характер захворювання та попередні зміни її стану. Аналіз цієї інформації допомагає правильно зорієнтуватися під час дослідження, визначити найбільш суттєві патологічні зміни та оцінити наслідки захворювання.

Розтин розпочинають із зовнішнього огляду трупа. Визначають вид, стать, приблизний вік, масу, розміри та особливості будови тіла, оцінюють вгодованість і ступінь розвитку мускулатури. Окремо описують наявні деформації або інші відхилення, зокрема зміни форми хребта чи кінцівок, а також розміри та форму живота.

Під час оцінювання вгодованості після зняття шкіри звертають увагу на кількість підшкірної жирової тканини та стан м'язів. За значного виснаження жирові відкладення майже відсутні, а кісткові структури добре контуруються. При надмірній вгодованості, навпаки, жир накопичується у підшкірній клітковині, міжм'язових просторах та навколо внутрішніх органів, зокрема нирок.

Важливою складовою зовнішнього огляду є оцінювання трупних змін. Насамперед визначають ступінь охолодження тіла, який залежить від умов навколишнього середовища. За наявності трупного задубіння оцінюють нерухомість і щільність скелетної мускулатури, зокрема рухливість щелепи та кінцівок у суглобах. На пізніших етапах розкладання можуть з'являтися характерне сіро-зелене забарвлення тканин і специфічний запах.

Трупні плями оцінюють на внутрішній поверхні шкіри та в підшкірній клітковині, переважно в ділянках, які після смерті розташовувалися нижче. На відміну від крововиливів, вони зазвичай мають нечіткі контури та можуть частково бліднути при натисканні.

Під час дослідження шкіри та її похідних оцінюють стан шерсті, волосся або пір'я: їх блиск, густоту, характер розташування та наявність ділянок облисіння. Визначають колір, еластичність і цілісність шкірного покриву, звертають увагу на наявність висипань, ерозій, виразок, рубців, пустул, папул та крововиливів. Також оглядають роги, копита, кігті, гребені та інші шкірні утворення, визначаючи їх форму, консистенцію та можливі патологічні зміни.

Далі оцінюють природні отвори – ротову та носову порожнини, очі, анальний отвір, а у птахів також клоаку. Встановлюють, чи відкриті вони, досліджують стан слизових оболонок, їх забарвлення, блиск, цілісність, наявність патологічних змін та характер виділень.

Під час огляду поверхневих лімфатичних вузлів визначають їх розміри, форму, консистенцію, колір і ступінь кровонаповнення. За необхідності оцінюють також вигляд тканини вузла на розрізі.

Після завершення зовнішнього огляду переходять до внутрішнього дослідження, яке передбачає розкриття грудної та черевної порожнин, огляд і вилучення внутрішніх органів. За потреби досліджують також порожнини носа та придаткові пазухи, ділянку шиї, череп і хребет, після чого оглядають головний та спинний мозок.

Положення трупа під час розтину залежить від виду та розмірів тварини. Для великих тварин використовують бокове положення, тоді як для більшості середніх і дрібних лабораторних тварин – положення на спині.

У вірусологічних дослідженнях розтин бажано проводити якомога швидше після загибелі тварини, оскільки посмертні зміни та активність тканинних ферментів можуть негативно впливати на збереження вірусного матеріалу. Відібрані під час розтину органи та тканини досліджують відповідно до мети експерименту.

Під час проведення патологоанатомічного дослідження необхідно суворо дотримуватися вимог ***асептики*** (комплекс заходів, спрямованих на недопущення потрапляння мікроорганізмів у рану, біологічний матеріал, стерильні інструменти та досліджувані зразки), ***антисептики*** (комплекс заходів, спрямованих на знищення або пригнічення мікроорганізмів), біологічної безпеки та правил роботи з потенційно інфікованим матеріалом. Це забезпечує достовірність результатів вірусологічного дослідження та знижує ризик контамінації зразків і зараження персоналу.

Для точного визначення природного забарвлення тканин і внутрішніх органів розтин доцільно проводити при достатньому денному освітленні. Секційне приміщення має бути обладнане необхідними дезінфекційними засобами та інструментами. Для знезараження робочої поверхні можуть використовуватися відповідні дезінфектанти, а для обробки трупного матеріалу та рук дослідника – дозволені антисептичні засоби. Набір секційних інструментів включає ножі, скальпель, ножиці, пінцети, пилку та інші інструменти, необхідні для проведення розтину. Усі інструменти перед роботою мають бути стерильними.

Перед початком розтину поверхню трупа обробляють відповідним дезінфекційним розчином. У роботі з великими тваринами знезаражують шкірний покрив у ділянці передбачуваного розрізу. Для дрібних тварин застосовують відповідний спосіб зовнішньої дезінфекції згідно з установленими правилами біобезпеки.

Трупи великих лабораторних тварин розміщують і фіксують на спеціальних секційних столах, кюветах або інших пристосованих поверхнях, які забезпечують стабільне положення тіла та запобігають поширенню біологічних рідин. Дрібних тварин фіксують у необхідному положенні на спеціальній дошці або секційній поверхні за допомогою відповідних фіксувальних пристроїв.

Робочі поверхні та обладнання повинні бути захищені матеріалами, які легко піддаються дезінфекції або утилізації після завершення роботи. Усі маніпуляції виконують із дотриманням правил асептики, антисептики та біологічної безпеки, щоб запобігти забрудненню досліджуваного матеріалу та поширенню інфекційного агента.

Основні правила та послідовність розтину

Під час проведення розтину трупного матеріалу необхідно дотримуватися правила, за яким безпосередній контакт із тілом тварини допускається лише за допомогою секційних інструментів або в захисних рукавичках. Розтин середніх і дрібних лабораторних тварин проводять за встановленими схемами. Одним із варіантів є *схема Вагенера.* Шкірний покрив розсікають уздовж білої лінії живота – від ділянки лобкового зрощення до шиї. Щоб не пошкодити черевну стінку та внутрішні органи, шкіру спочатку піднімають пінцетом і роблять невеликий поперечний надріз. Через утворений отвір вводять ножиці та продовжують розріз у напрямку шиї.

Для забезпечення доступу до поверхневих лімфатичних вузлів розрізи шкіри додатково продовжують у напрямку кінцівок – до пахвових і пахвинних ділянок. Шкіру обережно відокремлюють від підшкірної клітковини та м'язів тупим інструментом, після чого шкірні клапті відводять у боки та фіксують. Важливим етапом є запобігання контамінації досліджуваного матеріалу вмістом травного каналу. Тому дослідження грудної порожнини та відбір необхідних зразків проводять до відкриття черевної порожнини.

Для огляду грудної порожнини в ділянці над діафрагмою виконують поперечний розріз м'язів. Мечоподібний відросток обережно захоплюють пінцетом, після чого ножицями розсікають ребра вздовж обох боків груднини. Відведення груднини разом із прилеглими ребрами забезпечує доступ до грудної порожнини та дає змогу провести її візуальне дослідження.

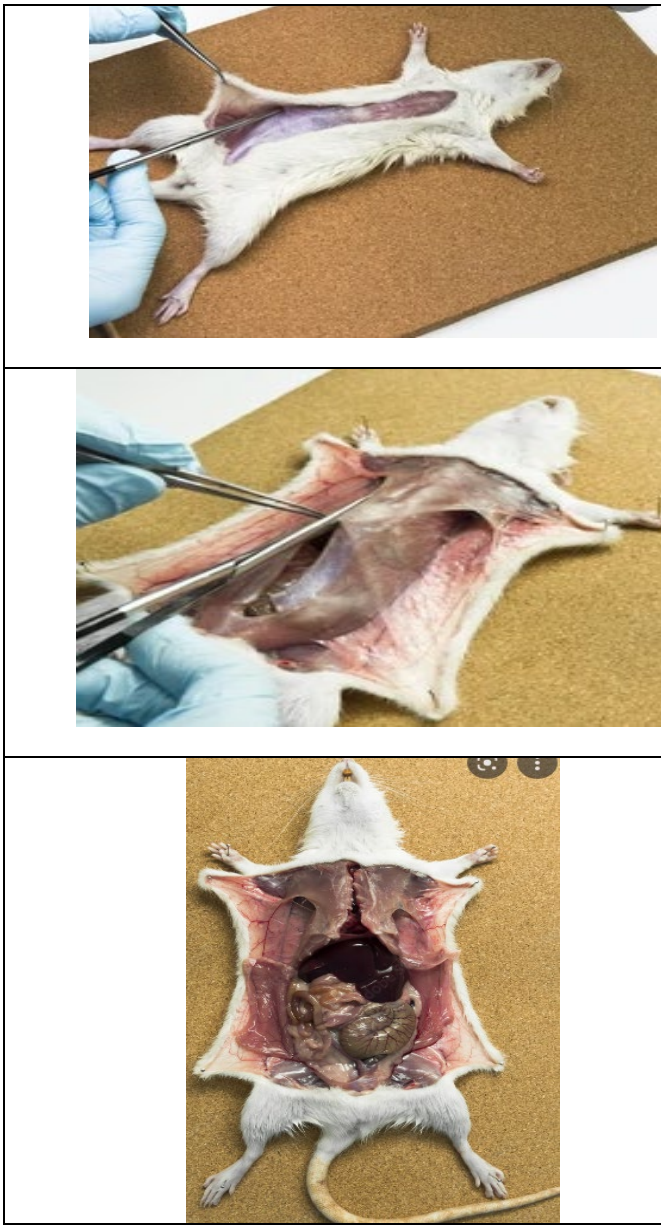


Рис.12. Етапи розтину лабораторного щура

Дослідження грудної порожнини розпочинають з оцінювання стану легень і плеври. Визначають загальний об'єм та консистенцію легень, колір і характер поверхні плеври, її блиск, наявність крововиливів, вузлових утворень та інших патологічних змін. Під час дослідження серця звертають увагу на його форму, стан передсердь і шлуночків, епікарда, жирової тканини та можливі крововиливи. Після розкриття камер серця оцінюють стан ендокарда, міокарда, клапанного апарату, а також характер крові. Зразки органів і тканин грудної порожнини відбирають до відкриття черевної порожнини та поміщають у стерильні ємності.

Дослідження черевної порожнини проводять після заміни секційного інструментарію. Після її відкриття оцінюють загальний стан органів, їх взаємне розташування та наявність видимих патологічних змін. Органи вилучають і досліджують окремо, дотримуючись встановленої послідовності.

Огляд селезінки передбачає оцінювання її величини, форми, стану країв, кольору та консистенції. Також визначають наявність ділянок некрозу, інфарктів, крововиливів та інших структурних порушень.

Під час *дослідження печінки* характеризують її розміри, форму та стан країв, консистенцію, забарвлення і поверхню. Звертають увагу на можливі зернисті, вузлуваті або інші патологічно змінені ділянки. У нирках оцінюють розміри, форму, консистенцію, стан капсули та колір. Для сечового міхура визначають його наповнення, стан серозної оболонки та властивості вмісту.

За необхідності окремо *досліджують шлунок і кишечник.* При цьому оцінюють стан їхніх стінок і слизових оболонок, а також характер, колір та інші властивості вмісту травного каналу.

Дослідження органів дихальної та верхньої частини травної систем. За відповідними показаннями оглядають ротову й носову порожнини, язик, мигдалики, глотку та стравохід. Визначають стан слизових оболонок, їх колір, наявність запальних змін, виразок, гнійних утворень та патологічних виділень. Окремо досліджують гортань, трахею та великі бронхи. Оцінюють стан слизових оболонок і характер їхнього вмісту. За необхідності оглядають також щитоподібну, прищитоподібні та інші залози відповідної анатомічної ділянки.

Дослідження центральної нервової системи проводять, якщо метою дослідження є вивчення центральної нервової системи, додатково обстежують головний і спинний мозок. Після відкриття черепної коробки головний мозок обережно вилучають та оцінюють його зовнішній вигляд, форму, консистенцію, колір і стан поверхні.

Після цього досліджують внутрішню будову мозку, зокрема шлуночки, мозочок, довгастий мозок, гіпокамп та інші анатомічні структури. Оскільки патологічні зміни при різних вірусних інфекціях можуть мати неоднакову локалізацію, за необхідності проводять дослідження окремих ділянок мозкової тканини та готують матеріал для подальшого лабораторного аналізу.

Спинний мозо досліджують у різних відділах хребта. Оцінюють його зовнішній вигляд, колір, консистенцію, кровонаповнення та структурні особливості. На поперечному зрізі звертають увагу на співвідношення і чіткість меж сірої та білої речовини, а також можливі патологічні зміни.

Під час ***дослідження опорно-рухового апарату*** оглядають скелетні м’язи та визначають ступінь їх розвитку, колір, консистенцію та характер м’язового рисунка. Враховують ознаки атрофії або гіпертрофії, а також зміни міжм’язової сполучної тканини.

При дослідженні кісток оцінюють їхню цілісність, форму, розміри та консистенцію, стан надкісниці, кісткової тканини й кісткового мозку. Для суглобів визначають форму, стан суглобових структур і характер внутрішньосуглобового вмісту.

Зберігання патологічного матеріалу та завершення роботи

Відібрані зразки патологічного матеріалу зберігають відповідно до мети подальшого дослідження та вимог до конкретного виду зразків. Для цього можуть застосовуватися консервування або заморожування в умовах, що забезпечують збереження діагностично важливих властивостей матеріалу.

Після завершення секційного дослідження всі використані інструменти, обладнання та робочі поверхні підлягають обов'язковій дезінфекції та подальшій стерилізації відповідно до встановлених правил. Трупний матеріал, залишки корму, підстилку та інші потенційно контаміновані відходи утилізують методами, дозволеними для відповідної категорії біологічних відходів. Обладнання та предмети догляду за тваринами також піддають належній дезінфекційній обробці.

Такий варіант суттєво змінює структуру й формулювання оригіналу, але зберігає його навчальний зміст і логіку викладу.

Застережні заходи під час роботи з інфікованими лабораторними тваринами

До роботи з лабораторними тваринами, інфікованими патогенними агентами, допускають лише персонал, який має відповідну професійну підготовку та пройшов інструктаж із правил біобезпеки. Роботи виконують відповідно до чинних санітарних норм, вимог біобезпеки та затверджених лабораторних протоколів.

Особливе значення має індивідуальний захист працівників. Під час догляду за тваринами використовують спеціальний захисний одяг, рукавички, захисне взуття та інші засоби індивідуального захисту залежно від характеру роботи та рівня біологічного ризику. Захисний одяг повинен використовуватися виключно в лабораторних приміщеннях і зберігатися окремо від особистих речей. Багаторазові засоби захисту після роботи очищують і знезаражують відповідно до встановленого протоколу.

У приміщеннях, де утримують експериментальних тварин, необхідно забезпечити належні санітарно-гігієнічні умови: доступ до води, засобів для миття рук, дезінфектантів та обладнання для проведення санітарної обробки. Особливу увагу приділяють підтриманню чистоти повітря та недопущенню утворення пилу, що особливо важливо під час роботи з птахами та іншими тваринами, здатними сприяти його поширенню.

Маніпуляції з інфікованими тваринами – їх вилучення з кліток, фіксацію, обстеження, проведення експериментальних процедур та завершальні процедури – повинні виконувати лише навчені працівники. Залежно від виду тварини та характеру маніпуляції застосовують спеціальні засоби фіксації та допоміжне обладнання, що зменшує ризик травмування персоналу й тварини.

Під час роботи з матеріалом, потенційно небезпечним для людини, необхідно використовувати відповідний комплекс засобів індивідуального та колективного захисту. Маніпуляції, які можуть спричинити утворення аерозолів або розбризкування біологічного матеріалу, проводять у спеціально обладнаних зонах із належною вентиляцією та, за потреби, у біологічній шафі безпеки.

Обладнання, інструменти та інші предмети, які могли контактувати з інфікованими тваринами або біологічним матеріалом, не повинні залишати контрольовану лабораторну зону без попередньої дезінфекції або іншої передбаченої процедури знезараження.

Заходи безпеки під час секційного дослідження

Розтин інфікованих лабораторних тварин проводять лише у спеціально призначеному приміщенні та відповідно до затверджених правил біобезпеки. Працівник використовує захисний одяг, рукавички, захисне взуття та засоби захисту обличчя й очей відповідно до оціненого ризику.

Перед початком роботи необхідно перевірити справність обладнання, підготувати стерильний інструментарій та засоби знезараження. Особливу увагу приділяють цілісності шкіри рук і правильному використанню рукавичок. За наявності пошкоджень шкіри працівник повинен діяти відповідно до внутрішнього протоколу лабораторії та оцінки професійного ризику.

Після завершення секційного дослідження руки, робочі поверхні, інструменти та багаторазові засоби індивідуального захисту підлягають очищенню та дезінфекції відповідно до затверджених процедур. Одноразові матеріали та інші контаміновані відходи збирають у спеціальну герметичну тару та утилізують як біологічно небезпечні відходи.

Трупи інфікованих тварин і залишки патологічного матеріалу підлягають знезараженню та утилізації методами, дозволеними для відповідного рівня біологічної небезпеки. Після завершення роботи приміщення та всі поверхні, які могли контактувати з біологічним матеріалом, піддають ретельному очищенню й дезінфекції.

Основний принцип біобезпеки: усі маніпуляції з інфікованими тваринами та патологічним матеріалом мають виконуватися так, щоб максимально обмежити можливість контакту персоналу з інфекційним агентом, утворення аерозолів і контамінації навколишнього середовища.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 3

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

Викладач демонструє основні етапи роботи з лабораторними тваринами та патологічним матеріалом, зокрема:

а) проведення первинного огляду тварини перед початком експерименту;

б) правила поводження зі стерильним інструментарієм та підготовки шприцевого обладнання;

в) порядок маркування, анестезії та фіксації тварин, а також підготовки операційного поля;

г) принципи проведення евтаназії та патологоанатомічного розтину за схемою Вагенера;

д) правила відбору секційного матеріалу для подальшого лабораторного дослідження – зразків головного мозку, легень, серця, печінки, селезінки та нирок.

Завдання 2. Відпрацювання техніки маркування, анестезії, фіксації та експериментального інфікування лабораторних тварин

2.1. Виконайте маркування лабораторних тварин із використанням водних розчинів фуксину та пікринової кислоти. Проведіть анестезію тварини інгаляційним методом або шляхом ін'єкційного введення відповідного анестетика. Надійно зафіксуйте тварину на спеціальній фіксаційній дошці.

Підготуйте стерильний шприц і заповніть його стерильним фізіологічним розчином для моделювання процедури введення матеріалу. Під керівництвом викладача відпрацюйте техніку виконання інтраназального, інтрам'язового, внутрішньовенного та внутрішньочеревного введення.

2.2. На рисунку лабораторного щура зазначте типи введення вірусовмісного матеріалу та місця його введення. Стрілками позначте ділянки тіла, у які здійснюється введення, а біля кожної стрілки вкажіть назву методу введення.



Завдання 3. Відпрацювання методики евтаназії лабораторних тварин шляхом інгаляції у замкненому просторі з подальшим проведенням розтину за методом Вагенера та відбором секційного патологічного матеріалу в стерильні чашки Петрі.

3.1. Проведіть візуальну оцінку стану експериментально інфікованих лабораторних тварин та визначте наявність або відсутність характерних клінічних ознак захворювання. Ознайомтеся з методами евтаназії лабораторних тварин відповідно до встановлених ветеринарно-біоетичних вимог. Проведіть розтин експериментально

інфікованої лабораторної тварини та визначте наявність патолого-анатомічних змін у внутрішніх органах. Відібрані зразки органів (мозок, легені, серце, печінка, селезінка, нирки) розмістіть у стерильні чашки Петрі для подальшого дослідження.

3.2. Проведіть розділення компонентів крові – еритроцитів, лімфоцитів та сироватки – відповідно до стандартних лабораторних методик. Підготуйте отримані зразки до подальшого зберігання.

3.3. На рисунку лабораторної тварини позначте органи-мішені та вкажіть тропність відповідних вірусів до них. Для кожного зазначеного вірусу вкажіть його таксономічну належність – родину.



Завдання 4. Дайте визначення основним поняттям і термінам:

Модельний об'єкт……

……

Інфекційний титр……

……

Тропізм……

……

Пасаж……

……

Ураження лабораторних тварин……

……

Імунізація лабораторних тварин……

……

Ад'ювант……

……

Евтаназія……

……

Індикація вірусу……

……

Ідентифікація вірусу……

……

Асептика……

……

Антисептика……

……

Контамінація……

……

Сироватка……

……

Плазма……

……

ВИСНОВКИ

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____ .

КОНТРОЛЬНІ ЗАВДАННЯ ТА ПИТАННЯ

1. Визначити основні ознаки клінічного стану лабораторної тварини після експериментального зараження.
2. Охарактеризувати основні етапи підготовки лабораторної тварини до патолого-анатомічного дослідження.
3. Визначити органи, які підлягають відбору для подальшого вірусологічного дослідження.
4. Що розуміють під тропністю вірусів?
5. Які органи лабораторних тварин найчастіше досліджують при вірусних інфекціях?
6. Які патолого-анатомічні зміни можуть спостерігатися у лабораторних тварин при вірусних захворюваннях?
7. Яке значення має правильний відбір патологічного матеріалу для лабораторної діагностики?
8. Які компоненти можна виділити зі зразка крові?
9. Які правила асептики необхідно дотримуватися під час роботи з патологічним матеріалом?
10. Для чого патологічний матеріал поміщають у стерильні ємності?
11. Яке значення має визначення органів-мішеней під час дослідження вірусної інфекції?
12. За якими ознаками можна встановити наявність патологічного процесу у лабораторної тварини?
13. Яке значення має дотримання біоетичних та біобезпечних вимог під час роботи з експериментальними тваринами?
14. На схемі лабораторної тварини позначити органи-мішені для різних груп вірусів та вказати їхню тропність.
15. Чим еритроцити відрізняються від лімфоцитів за будовою та функціями?

16. Що таке сироватка крові та яке її діагностичне значення?
17. Визначити основні компоненти крові, які можуть бути використані для лабораторних досліджень, та охарактеризувати їх призначення.
18. Встановити відповідність між родинами вірусів та органами, до яких вони мають тропність.

ТЕМА 1.4. МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ ВІРУСІВ. КУРЯЧІ ЕМБРІОНИ ТА ЇХ ВИКОРИСТАННЯ У ВІРУСОЛОГІЇ

Мета: ознайомитися з основними методами дослідження вірусів, способами їх культивування, виявлення вірусних компонентів та визначення інфекційної активності.

Компетенції: знати основні прояви цитопатичної дії вірусів, уміти визначати тип вірусної інфекції, обирати відповідні методи культивування та ідентифікації вірусів.

***Матеріальне забезпечення*:** ембріоновані курячі яйця віком 9 та 11 діб, овоскоп і спеціальні штативи для їх утримання, непатогенний для людини вірус грипу, йодований спирт, пробірки, чашки Петрі та піпетки місткістю 2–5 мл. Для проведення маніпуляцій потрібен стерильний інструментарій: шприци об'ємом 1 мл, анатомічні пінцети, ін'єкційні голки та ножиці. Додатково використовують фізіологічний і дезінфекційний розчини, маркери та навчальні матеріали зі схемами будови курячого ембріона і способів його зараження. Для дотримання санітарно-гігієнічних вимог необхідні герметичні пакети для утилізації відходів, мило та рушник.

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Використання курячих ембріонів як експериментальної моделі для вирощування вірусів набуло широкого поширення після досліджень Вудраффа та Гудпасчура, які у 1931 році продемонстрували можливість зараження хоріоналантоїсної оболонки курячого ембріона вірусом курячої віспи. Це відкриття стало важливим етапом у розвитку експериментальної вірусології та сприяло подальшому вивченню особливостей репродукції вірусів.

У 1940-х роках було опубліковано значну кількість досліджень, присвячених культивуванню різних вірусів у

курячих ембріонах. Серед них були збудники віспи, вакцинії, простого герпесу, гарячки долини Ріфт, весняно-літнього енцефаліту, Омської геморагічної гарячки та інших вірусних захворювань. У процесі таких досліджень було встановлено, що різні віруси характеризуються певною тканинною та органною тропністю, тобто здатністю переважно розмножуватися у визначених тканинах або структурах ембріона.

Залежно від біологічних властивостей вірусу можуть використовуватися різні ділянки курячого ембріона. Наприклад, вірус натуральної віспи активно розмножувався у хоріоналантоїсній оболонці, вірус паротиту – переважно в амніотичній оболонці, а вірус грипу – в амніоні та алантоїсній порожнині. Така вибірковість має важливе практичне значення, оскільки правильний вибір ділянки інокуляції підвищує ефективність виділення та накопичення вірусу.

Курячий ембріон є зручною біологічною моделлю для вірусологічних досліджень завдяки наявності різних ембріональних оболонок і порожнин, які можуть забезпечувати репродукцію певних груп вірусів. Крім того, ця модель дає можливість спостерігати характерні зміни, що виникають унаслідок розмноження вірусу, та використовувати їх для його подальшої характеристики.

У практичній вірусології курячі ембріони можуть застосовуватися для:

- ✓ виявлення вірусів у досліджуваному патологічному матеріалі;
- ✓ первинного виділення вірусів із біологічних зразків;
- ✓ культивування та накопичення вірусного матеріалу для подальших досліджень;
- ✓ визначення інфекційної активності та титру вірусу;
- ✓ проведення серологічних досліджень, зокрема використання ембріонів як біологічної тест-системи в реакціях нейтралізації;

- ✓ дослідження біологічних властивостей вірусів та їхньої тканинної тропності;
- ✓ оцінювання дії противірусних засобів та визначення їхньої ефективності в експериментальних умовах;
- ✓ одержання вірусного матеріалу для подальших діагностичних і наукових досліджень.

Використання цього методу у вірусології дозволило накопичити значний обсяг інформації про особливості репродукції вірусів, їхню тропність до різних тканин та умови культивування. Водночас у сучасній вірусології курячі ембріони застосовують поряд із культурами клітин та іншими стандартизованими моделями, вибір яких залежить від властивостей конкретного вірусу та мети дослідження.

Будова курячого ембріону

Куряче яйце зовні вкрите шкаралупою, яка має численні пори, що забезпечують надходження кисню та видалення вуглекислого газу. Безпосередньо під шкаралупою розташовані підшкаралупні оболонки. Після запліднення та послідовного поділу яйцеклітини формуються три зародкові листки – ектодерма, мезодерма та ентодерма. У процесі подальшого розвитку з них формуються тканини, органи та системи організму ембріона.

Одночасно з формуванням самого зародка виникають позазародкові оболонки, до яких належать амніон, хоріон та алантоїс. Вони виконують захисну, дихальну, трофічну та видільну функції й забезпечують необхідні умови для розвитку ембріона.

Амніон розташований найближче до тіла зародка та утворює замкнений мішок, заповнений амніотичною рідиною. Ембріон перебуває всередині цього мішка та захищений від механічних впливів. На початкових етапах розвитку амніотична рідина за складом близька до фізіологічного сольового розчину, а згодом у ній збільшується вміст білкових речовин. На 10–11-ту добу розвитку об’єм амніотичної рідини становить приблизно 1 мл.

Хоріон, або серозна оболонка, прилягає до підшкаралупних оболонок. У процесі розвитку від нього формується алантоїс, який являє собою порожнинне утворення. Він швидко збільшується в розмірах і поширюється між амніоном та хоріоном, поступово оточуючи ембріон разом із жовтком. Найінтенсивніше алантоїс розвивається приблизно з 4-ї до 13-ї доби інкубації.

Унаслідок зрощення алантоїсної оболонки з хоріоном формується хоріоналантоїсна оболонка. Вона виконує важливу дихальну функцію, оскільки містить густу мережу кровоносних і лімфатичних судин. Через неї відбувається газообмін між кровоносною системою ембріона та зовнішнім середовищем. Наприкінці ембріонального розвитку хоріоналантоїсна оболонка поступово атрофується, а після вилуплення курча переходить до легеневого дихання.

Алантоїсна порожнина виконує переважно видільну функцію. Спочатку вона містить прозору рідину, яка в процесі розвитку накопичує продукти обміну, зокрема урати та азотовмісні й фосфоровмісні сполуки. Приблизно з 12–13-ї доби рідина може ставати каламутною, а після охолодження в ній утворюється осад сечової кислоти. Максимальний об’єм алантоїсної рідини – близько 6–8 мл – спостерігається на 11–13-ту добу, після чого її кількість поступово зменшується.

Важливе значення для розвитку ембріона має жовток, який є основним джерелом поживних речовин. Він оточений жовтковою оболонкою та поступово зменшується в міру використання поживних компонентів ембріоном.

Ембріональні тканини характеризуються високою інтенсивністю обміну речовин та активним поділом клітин, що робить їх придатними для використання в експериментальній вірусології. Особливий інтерес становлять позазародкові оболонки, клітини яких можуть бути чутливими до певних вірусів.

Залежно від властивостей конкретного вірусу та мети дослідження можуть використовуватися різні структури курячого ембріона. У навчальній та експериментальній практиці ембріони певного віку обирають з урахуванням ступеня розвитку відповідної структури та наявності в ній клітин, чутливих до досліджуваного вірусу. Загалом курячі ембріони віком приблизно від 5-ї до 12-ї доби розвитку можуть застосовуватися як модель для вірусологічних досліджень.

Підготовка курячих ембріонів до ураження

Курячі ембріони після вилучення з інкубатора доставляють до лабораторії для подальшого використання в дослідженні. До моменту проведення необхідних процедур їх утримують у термостаті за температури близько 37 °С та відносної вологості 60–70 %. Яйця встановлюють у спеціальні штативи таким чином, щоб повітряна камера була спрямована догори, що забезпечує правильне положення ембріона під час подальших маніпуляцій.

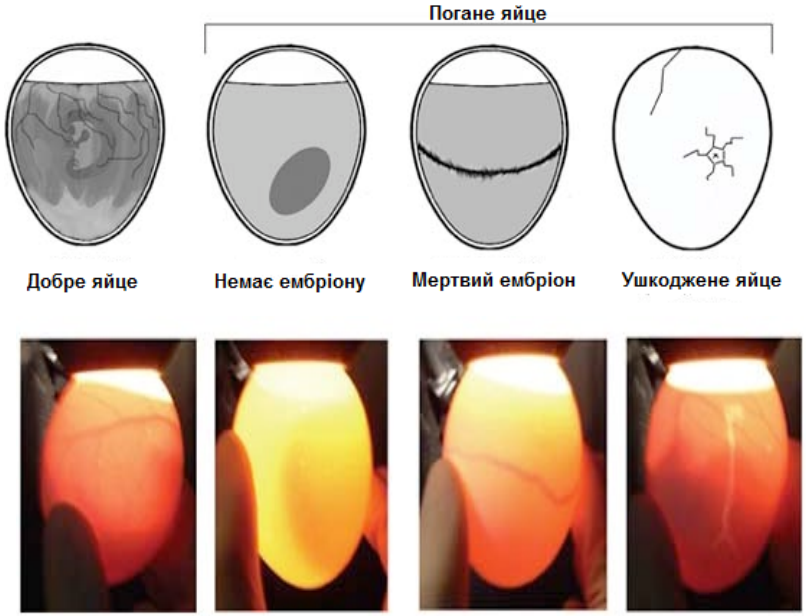


Рис.13. Овоскопування курячих яєць перед їх використанням

Підготовчі заходи перед ураженням курячих ембріонів передбачають проведення овоскопування, дезінфекцію шкаралупи та належну організацію робочого місця. Під час овоскопування на поверхні шкаралупи за допомогою олівця позначають межі повітряної камери, місце розташування зародка, а також ділянку безсудинної зони розміром 0,5 × 0,5 см. Нанесені позначки використовують як орієнтири для визначення місця подальшого введення вірусовмісного матеріалу. Перед проведенням маніпуляції відповідну ділянку шкаралупи та місця ін'єкції обробляють йодованим спиртом.

Методи експериментального ураження курячих ембріонів

Для експериментального ураження курячих ембріонів застосовують декілька методів, вибір яких визначається тропністю досліджуваного вірусу та метою проведення дослідження. Найчастіше вірусовмісний матеріал спрямовують в алантоїсну порожнину або хоріоналантоїсну оболонку. Рідше використовують амніотичну порожнину та жовтковий мішок. Значно рідше матеріал вводять безпосередньо в тіло зародка або кровоносні судини хоріоналантоїсної оболонки.

Незалежно від обраного способу ураження, для введення використовують 0,1–0,2 мл інфекційного матеріалу.

Ураження в алантоїсну порожнину.

За такого способу добре репродукуються віруси грипу, хвороби Ньюкасла, ринопневмонії коней, везикулярного стоматиту та деякі інші віруси. Метод має кілька варіантів виконання.

В одному з варіантів ембріон розміщують вертикально, тупим кінцем догори. У шкаралупі, приблизно на 5–6 мм вище межі повітряної камери, роблять невеликий отвір діаметром близько 1 мм. Голку спрямовують паралельно поздовжній осі яйця та вводять на глибину 10–12 мм. Після введення вірусовмісного матеріалу голку обережно витягують, а утворений отвір герметично закривають краплею розплавленого стерильного парафіну.

Інший варіант передбачає використання отвору, зробленого над повітряною камерою, для часткового виходу повітря. Окремий отвір для введення матеріалу формують у ділянці безсудинної зони хоріоналантоїсної оболонки з боку зародка. Голку вводять на глибину 2–3 мм, після чого вносять 0,1–0,2 мл вірусовмісної рідини. Завершальним етапом є герметизація отвору парафіном.



Рис. 14. Ураження в алантоїсну порожнину

Ураження в хоріоналантоїсну оболонку.

Цей спосіб ураження курячих ембріонів переважно застосовують для культивування епітеліотропних і пантропних вірусів, зокрема вірусів віспи, інфекційного ларинготрахеїту птиці, катаральної лихоманки овець та інших. Ураження хоріоналантоїсної оболонки (ХАО) можна здійснювати через природну або штучно сформовану повітряну камеру.

При використанні природної повітряної камери ембріон встановлюють у штативі так, щоб повітряна камера була

спрямована догори. У шкаралупі над повітряною камерою формують віконце діаметром приблизно 15–20 мм. Через утворений отвір за допомогою пінцета обережно видаляють підшкаралупну оболонку, відкриваючи доступ до поверхні хоріоналантоїсної оболонки. На оголену ділянку ХАО наносять 0,2 мл вірусовмісної суспензії. Після завершення процедури отвір закривають лейкопластирем або покривним склом, яке додатково фіксують парафіном.

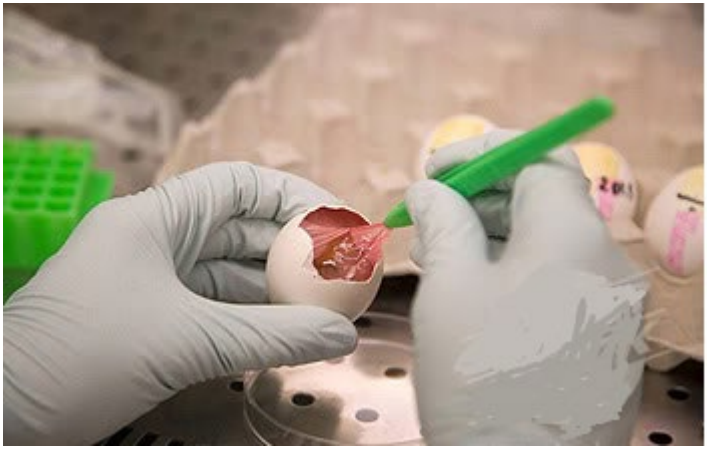


Рис.15. Ураження в хоріоналантоїсну оболонку

Метод ураження через штучно створену повітряну камеру застосовують частіше, ніж використання природної повітряної камери. Це пов’язано з тим, що такий спосіб дає змогу забезпечити контакт вірусовмісного матеріалу з більшою площею ХАО, що сприяє накопиченню більшої кількості вірусу.

Для проведення процедури ембріон розміщують у штативі горизонтально, зародком догори. У шкаралупі формують два отвори: перший, невеликий, розташовують над центральною частиною повітряної камери та

використовують для видалення повітря; другий, діаметром 0,2–0,5 см, роблять збоку, з боку розташування зародка.

Особливість цього методу полягає у необхідності обережного формування другого отвору. Спочатку видаляють відповідну ділянку шкаралупи, після чого, не пошкоджуючи ХАО, зміщують підшкаралупну оболонку вбік таким чином, щоб забезпечити проходження повітря через утворений отвір. Далі за допомогою гумової груші через перший отвір видаляють повітря з природної повітряної камери. Унаслідок цього через бічний отвір надходить повітря, формується штучна повітряна камера, дном якої слугує хоріоналантоїсна оболонка.

Після формування штучної камери на поверхню ХАО через бічний отвір наносять інфекційну рідину, після чого отвір закривають лейкопластирем. Перший отвір додаткової герметизації не потребує, оскільки внутрішній листок підшкаралупної оболонки залишається неушкодженим і продовжує виконувати захисну функцію, перешкоджаючи проникненню мікроорганізмів із навколишнього середовища.

Подальше інкубування ембріонів, оброблених цим способом, здійснюють у горизонтальному положенні, при цьому бічний отвір має бути спрямований догори.

Ураження в жовточний мішок.

Метод ураження жовткового мішка найчастіше використовують під час роботи з вірусами хвороби Марека, ринопневмонії коней та катаральної лихоманки овець. Для цього переважно застосовують курячі ембріони віком 5–7 діб. У деяких випадках можуть використовуватися ембріони віком 2–3 доби, зокрема при дослідженні вірусу гарячки долини Ріфт.

Залежно від способу проведення маніпуляції виділяють два варіанти ураження. За першим варіантом ембріон встановлюють у штативі повітряною камерою догори. У

шкаралупі над повітряною камерою роблять отвір, через який голку спрямовують углиб яйця приблизно на 3,5–4 см під кутом 45° до вертикальної осі, орієнтуючи її в напрямку, протилежному розташуванню зародка.

За другим варіантом яйце фіксують горизонтально, при цьому зародок розміщується в нижній частині, а жовток – над ним. Після проведення маніпуляції отвір у шкаралупі герметично закривають краплею розплавленого парафіну.

Ураження в амніотичну порожнину.

Для цього способу використовують курячі ембріони віком 6–10 діб. Метод застосовують переважно під час культивування вірусів грипу, ньюкаслської хвороби, ринопневмонії коней та інших вірусів. Виділяють два основні варіанти проведення ураження – закритий та відкритий.

Закритий спосіб. Яйце розташовують на овоскопі горизонтально, спрямовуючи зародок догори. Через попередньо підготовлений отвір у шкаралупі над повітряною камерою голку з тупим кінцем спрямовують у бік зародка. Про потрапляння голки в амніотичну порожнину свідчить переміщення тіла зародка в напрямку руху голки.

Відкритий спосіб. Ділянку шкаралупи над повітряною камерою видаляють таким чином, щоб сформувати отвір діаметром приблизно 1,5–2,5 см. Через нього пінцетом обережно знімають підшкаралупну оболонку. Далі анатомічним пінцетом захоплюють ХАО та обережно підтягують її до сформованого отвору. Утримуючи оболонку пінцетом, вводять вірусовмісний матеріал. Після цього оболонки повертають у попереднє положення, отвір закривають лейкопластирем, а ембріон залишають для подальшої інкубації у вертикальному положенні.

Наведені способи належать до найбільш поширених методів роботи з курячими ембріонами у лабораторній практиці. Введення матеріалу безпосередньо в тіло зародка або в кровоносні судини ХАО.

Ураження тіла зародка та подальша інкубація.

Для проведення такого виду ураження використовують курячі ембріони віком 7–12 діб. Застосовують два основні варіанти

- Перший варіант виконують аналогічно до закритого способу ураження амніотичної порожнини, однак використовують гостру голку. Під час контролю на овоскопі про потрапляння голки безпосередньо в тіло зародка судять за тим, що зародок переміщується відповідно до напрямку руху голки.
- Другий варіант проводять за принципом відкритого способу ураження амніону. Через сформований отвір у шкаралупі за допомогою пінцета обережно підтягують тіло зародка. Вірусовмісний матеріал спрямовують у головний мозок або визначену ділянку тіла ембріона. При використанні цих методів спостерігається досить високий відсоток загибелі ембріонів.

Описані способи експериментального ураження курячих ембріонів можуть мати різні технічні модифікації залежно від особливостей дослідження та властивостей конкретного вірусу.

Інкубація уражених ембріонів

Після ураження курячі ембріони переносять у термостат для подальшої інкубації. У цей період відбувається репродукція вірусу та його накопичення у відповідних структурах ембріона. Температурний режим інкубації може становити приблизно 33–38 °С і залежить від біологічних властивостей вірусу, який використовують у дослідженні.

За станом ембріонів здійснюють регулярне спостереження, зокрема проводять їх періодичний огляд за допомогою овоскопа. Якщо ембріон гине протягом перших 24 годин після ураження, така загибель найчастіше пов’язана не з репродукцією вірусу, а з іншими чинниками: потраплянням грибкової або бактеріальної

мікрофлори разом з інокулятом чи механічним пошкодженням під час маніпуляцій. Таку загибель розглядають як неспецифічну. У більш пізні терміни загибель ембріонів, як правило, пов'язують із активним розмноженням вірусу.

Особливості культивування вірусу грипу

Під час роботи з вірусом грипу важливо враховувати, що максимальне накопичення вірусу може спостерігатися при використанні його розведених суспензій. Надмірно високі концентрації вірусу, навпаки, можуть знижувати його вихід через формування дефектних інтерферуючих частинок – явище, відоме як феномен фон Магнуса. Значне вірусне навантаження також може спричиняти загибель ембріона.

Під час серійного пасажування вірусу грипу для отримання культури з високою інфекційною активністю традиційно використовували розведення в межах 10^{-3}–10^{-4}.

Тривалість інкубації визначають з урахуванням особливостей конкретного вірусу та навіть окремого його штаму. Період, необхідний для досягнення максимального рівня накопичення вірусу, може становити від 2 до 7–8 діб. Після завершення необхідного періоду інкубації ембріони охолоджують при температурі близько 4 °С протягом 3–4 годин, після чого проводять їх подальше дослідження та розтин.

Ознаки розмноження вірусу в курячому ембріоні

Одним із показників інфікування курячого ембріона вірусом є його загибель у певний, характерний для конкретного вірусу період. Однак сама загибель ембріона не завжди є достатньою ознакою, тому додатково оцінюють морфологічні зміни, які виникають у різних його структурах унаслідок репродукції вірусу.

До важливих ознак належать патолого-анатомічні зміни ХАО. Вона може набрякати, на ній можуть з'являтися крововиливи, вузлики та інші характерні ураження.

Подібні зміни можуть спостерігатися при інфікуванні курячих ембріонів вірусами віспи птиці, інфекційного ларинготрахеїту птиці, хвороби Ауески та деякими іншими вірусами.

Вплив вірусної інфекції може позначатися і на самому зародку. У деяких випадках спостерігається уповільнення його росту та розвитку, що проявляється так званим феноменом карликовості.

Певні морфологічні зміни можуть виникати також у внутрішніх органах ембріона. Наприклад, збільшення печінки, яка набуває жовто-зеленого або темно-зеленого забарвлення, може свідчити про репродукцію вірусу гепатиту гусей у курячому ембріоні.

Водночас існують віруси, репродукція яких у курячих ембріонах не супроводжується ні загибеллю зародка, ні вираженими патолого-анатомічними змінами. Прикладом може бути штам В1 вірусу ньюкаслської хвороби. У таких випадках для підтвердження наявності вірусу застосовують спеціальні лабораторні методи, зокрема реакцію гемаглютинації або імуноферментний аналіз.

Іноді навіть після розтину інфікованого ембріона видимих ознак репродукції вірусу не виявляють, хоча вірус фактично присутній у досліджуваному матеріалі. Такий результат першого пасажу називають «сліпим пасажем». У подібній ситуації для виявлення вірусу проводять подальші дослідження відповідно до методики, передбаченої для конкретного збудника.

Розтин курячого ембріону та отримання вірусовмісного препарату

Розтин курячих ембріонів проводять із суворим дотриманням асептичних умов. Залежно від тропності вірусу та структури ембріона, у якій відбувалася його репродукція, для подальшого дослідження можуть відбирати ХАО, тканини зародка, жовтковий мішок,

алантоїсну та амніотичну рідини. Екстраембріональні рідини, зокрема алантоїсна та амніотична, можуть містити значну кількість вірусного матеріалу та використовуватися для подальших лабораторних досліджень.

Перед проведенням розтину поверхню шкаралупи обробляють йодованим спиртовим розчином. Маніпуляції виконують стерильними інструментами в спеціально підготовленому боксі. Шкаралупу розкривають у ділянці над природною або штучною повітряною камерою. Яйце при цьому утримують під нахилом, щоб уламки шкаралупи не потрапляли всередину. Під час розкриття необхідно уникати пошкодження оболонки, розташованої під повітряною камерою, тому лінію зрізу проводять вище її межі.

Алантоїсну рідину відбирають за допомогою пастерівської піпетки відповідного об'єму, проколюючи підшкаралупну оболонку та ХАО над ділянкою розташування зародка.

Амніотичну рідину відбирають обережно, вводячи піпетку в амніотичну порожнину в ділянці між головою та тулубом зародка, під його шиєю. Об'єм отриманого матеріалу може становити до 1 мл.

Для вилучення ХАО спочатку обережно підрізають її ножицями. Потім ембріон разом із жовтковим мішком і залишками білка переносять у чашку Петрі, унаслідок чого отримують деембріоноване яйце. ХАО відокремлюють від внутрішньої поверхні шкаралупи та переносять у стерильну чашку Петрі для подальшого макроскопічного дослідження.

Під час огляду ХАО звертають увагу на характерні патологічні зміни. Найтиповішими є дрібні округлі непрозорі осередки запалення, білуваті або перламутрові бляшки, у центральній частині яких можуть спостерігатися ділянки некрозу.

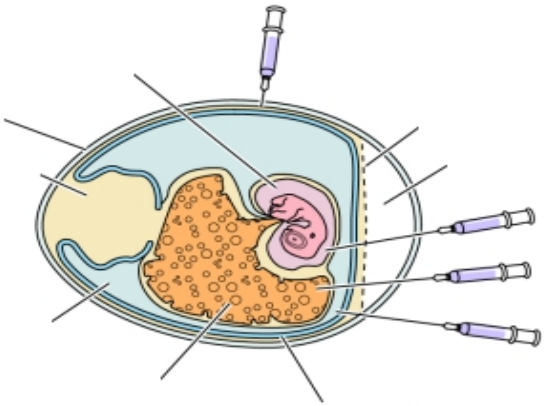
ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 4

Завдання 1. Опанування методики експериментального ураження курячих ембріонів та вирощування вірусів у цій біологічній моделі.

1.1. Ознайомтеся за ілюстративними матеріалами з особливостями будови курячого ембріона. Проведіть його підготовку до подальшого дослідження, що включає овоскопування, встановлення розташування повітряної камери, основних кровоносних судин і тіла ембріона, а також антисептичну обробку шкаралупи йодованим розчином. Підготуйте шприци з вірусовмісним препаратом, призначеним для ін'єкцій.

Відпрацюйте методи експериментального ураження курячого ембріона непатогенним для людини вірусом грипу із застосуванням відкритого та закритого способів. Розгляньте введення матеріалу в різні структури ембріона: ХАО, алантоїсну та амніотичну порожнини, жовтковий мішок і тіло ембріона.

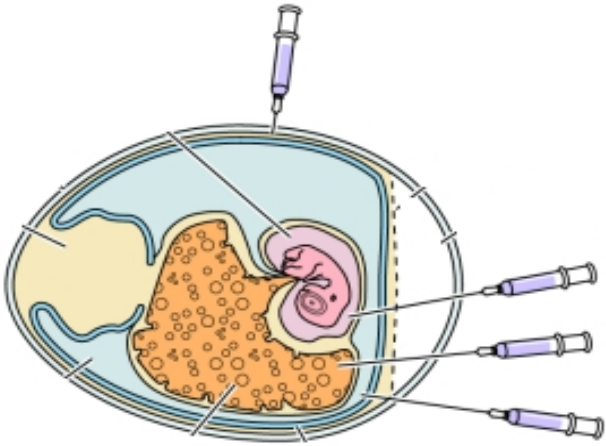
1.2. На рисунку підпишіть основні структурні частини курячого ембріона та позначте відповідні способи його ураження.



Завдання 2. Відпрацювання методики відбору вірусовмісного матеріалу з курячих ембріонів

2.1. Проведіть розтин експериментально уражених курячих ембріонів із дотриманням правил асептики. Оцініть загальний стан ембріона та наявність видимих патологічних змін у його оболонках, тканинах і внутрішніх органах. Залежно від способу ураження та тропності досліджуваного вірусу здійсніть відбір вірусовмісного матеріалу з відповідних структур курячого ембріона, зокрема з екстраембріональних рідин, оболонок, жовткового мішка та тканин зародка. Отримані зразки підготуйте для подальшого вірусологічного дослідження. Проведіть деембріонування яйця та зафіксуйте результати макроскопічного огляду.

2.2. На рисунку позначте види вірусів та їхні родини, які здатні реплікуватися у відповідних структурах курячого ембріона.



ВИСНОВКИ

_____

_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____ .

КОНТРОЛЬНІ ЗАВДАННЯ ТА ПИТАННЯ

1. Визначте, які структури курячого ембріона можуть використовуватися для культивування різних груп вірусів.
2. За наведеними патолого-анатомічними змінами визначте можливе ураження ембріона та структуру, у якій відбувається репродукція вірусу.
3. Для яких вірусологічних досліджень може використовуватися жовтковий мішок?
4. Яке значення має хоріоналантоїсна оболонка?
5. Яку функцію виконує алантоїсна порожнина?
6. Проаналізуйте результати овоскопічного спостереження за ембріоном та визначте можливі ознаки його ураження.

7. Визначте відмінності між специфічною та неспецифічною загибеллю курячого ембріона.
8. Які віруси характеризуються тропністю до хоріона-лантоїсної оболонки?
9. Які особливості використання амніотичної порожнини для культивування вірусів?
10. Охарактеризуйте значення курячих ембріонів як біологічної моделі у вірусологічних дослідженнях.
11. Контрольні питання
12. Що являє собою курячий ембріон як експериментальна модель у вірусології?
13. Які основні позазародкові оболонки формуються під час розвитку курячого ембріона?
14. Яку функцію виконує амніон?
15. Яке біологічне значення має жовтковий мішок?
16. Що таке тропність вірусу та як вона впливає на вибір структури ембріона для культивування?
17. Які основні способи ураження курячих ембріонів застосовують у вірусологічній практиці?

ТЕМА 1.5. МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ ВІРУСІВ. ВИКОРИСТАННЯ КЛІТИННИХ КУЛЬТУР У ВІРУСОЛОГІЇ

Мета: ознайомитися з основними підходами до дослідження вірусів, методами їх культивування, виявлення вірусних компонентів та визначення інфекційної активності.

Компетенції: знати основні прояви цитопатичного впливу вірусів та вміти їх розпізнавати, визначати характер і тип вірусної інфекції, а також обґрунтовано підбирати відповідні методи культивування й ідентифікації вірусних збудників.

***Матеріальне забезпечення*:** зафіксовані гістологічні препарати тканинних зрізів із характерними проявами цитопатичної дії вірусів, світловий мікроскоп та атлас мікроскопічних зображень цитопатичних змін, спричинених вірусами різних систематичних груп.

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Клітинні культури є важливою складовою сучасних вірусологічних досліджень і застосовуються для вирішення широкого спектра діагностичних та експериментальних завдань. Основними напрямами їх використання є:

1. Первинне виділення вірусів із патологічного матеріалу або об’єктів навколишнього середовища.
2. Отримання та накопичення вірусного матеріалу, зокрема для виробництва вакцин, діагностичних препаратів та інших біологічних засобів.
3. Збереження лабораторних штамів вірусів і підтримання їхніх властивостей у контрольованих умовах.
4. Визначення інфекційного титру та оцінювання кількості інфекційно активного вірусу.
5. Дослідження взаємодії вірусів із клітинами, включаючи особливості перебігу інфекційного процесу та його динаміку.

6. Ідентифікація та диференціація вірусів за характерними проявами їхньої взаємодії з клітинною культурою.

7. Застосування як біологічної тест-системи в реакції нейтралізації для оцінювання взаємодії вірусу зі специфічними антитілами.

8. Дослідження противірусної активності різних речовин та оцінювання їхнього впливу на репродукцію вірусів.

Сучасні методи культивування дають змогу підтримувати значну кількість різноманітних типів клітин. До них належать клітини сполучної тканини, зокрема фібробласти, елементи кісткової та хрящової тканини, а також клітини скелетних, серцевих і гладеньких м'язів.

Широко представлені й епітеліальні клітини, отримані з різних органів і тканин, зокрема печінки, легень, молочної залози, шкіри, сечового міхура та нирок. У культурі також можуть підтримуватися клітини нервової системи – нейрони та гліальні клітини. При цьому зрілі нейрони, на відміну від багатьох інших клітин, характеризуються обмеженою або відсутньою здатністю до проліферації.

Окрему групу становлять ендокринні клітини, зокрема клітини наднирників, гіпофіза та острівців Лангерганса. Крім того, у лабораторних умовах культивують меланоцити та численні різновиди клітин пухлинного походження.

Таким чином, різноманітність доступних клітинних культур дає можливість підбирати відповідну модель залежно від біологічних властивостей конкретного вірусу, його тропності до клітин та мети дослідження.

Класифікація тваринних культур клітин

Систематизація клітинних культур, які вирощують *in vitro,* має певні складнощі, оскільки поняття «тканинна культура» з часом зазнало суттєвого розширення. Спочатку цим терміном позначали експланти цілих

фрагментів тканин, у яких передбачалося часткове збереження їхньої гістологічної структури. Нині поняття «культура тканин» використовують ширше – воно охоплює як органні культури, де зберігається архітектоніка тканини або цілого ембріонального органа, так і культури окремих клітин.

Органна культура передбачає експлантацію відносно великих фрагментів тканини або цілого ембріонального органа зі збереженням його структурної організації. У таких культурах зберігаються міжклітинні взаємозв'язки, а гістологічні та біохімічні характеристики можуть підтримуватися протягом тривалого часу. Після первинного пошкодження органна культура зазвичай переходить у стан відносної рівноваги, який може зберігатися протягом декількох діб або навіть тижнів. Водночас здатність таких культур до активної проліферації є обмеженою або взагалі відсутня.

На відміну від органних, **клітинні культури** характеризуються значною втратою початкової структурної організації тканини. Клітини диспергуються механічним, ферментативним шляхом або внаслідок їхньої спонтанної міграції з експланта. У подальшому вони можуть рости у вигляді моношару, прикріпленого до поверхні субстрату, або клітинної суспензії. При цьому втрачається характерна гістотипова архітектура тканини та частина пов'язаних із нею біохімічних властивостей.

Важливою перевагою клітинних культур є їхня здатність до розмноження. Це дає можливість отримувати значну кількість клітин, формувати паралельні культури та проводити стандартизовані дослідження. Окремі клітинні популяції можна детально характеризувати та тривалий час зберігати шляхом кріоконсервації.

Ідентифікацію та характеристику клітин здійснюють за їхніми фенотиповими властивостями, здатністю рости в селективних поживних середовищах, за допомогою

фізичного відбору, клонування або генетичних методів. Це дозволяє отримувати відносно однорідні клітинні популяції, необхідні для експериментальних і діагностичних досліджень.

За здатністю до проліферації всі клітинні культури умовно поділяють на переживаючі та ростучі.

Переживаючі культури представлені переважно органними культурами, у яких проліферація клітин в умовах in vitro є дуже слабкою або зовсім не відбувається. Їх, у свою чергу, поділяють на культури, які підтримують у рідкому поживному середовищі, та культури, що вирощуються на твердому середовищі. Культури в рідкому середовищі можуть зберігати життєздатність протягом тривалого часу – до кількох десятків діб – і в окремих випадках демонструвати обмежене розмноження.

Ростучі культури характеризуються активною проліферацією клітин у лабораторних умовах. До них належать культури фіксованих фрагментів тканин, одношарові (моношарові) та суспензійні клітинні культури. Культури фрагментів тканин можуть вирощуватися у вигляді капельно-плазмових культур, у флаконах Карреля, нерухомих або обертових пробірках.

У практичній вірусології найбільшого поширення набули одношарові культури та суспензійні культури клітин, оскільки вони дають змогу створювати стандартизовані умови для вивчення репродукції вірусів, їхньої взаємодії з клітинами та проявів цитопатичної дії.

Одношарові культури клітин

Метод одношарових культур ґрунтується на вирощуванні клітин, які найчастіше отримують у результаті ферментативного роз'єднання тканин, на поверхні скла або іншого відповідного субстрату у вигляді одного шару клітин – моношару. Основою цього способу є властивість клітин до адгезії, тобто здатність прикріплюватися до

поверхні та утворювати на ній суцільний клітинний шар. До одношарових культур належать ***первинні (первинно-трипсинізовані), диплоїдні, гетероплоїдні*** та ***постійні (перещеплювані)*** культури клітин.

Первинною культурою називають культуру, яку отримують безпосередньо з клітин або органів, вилучених з організму людини чи тварини. Для їх одержання можуть використовувати різні органи та тканини.

Після відповідної підготовки тканину подрібнюють на невеликі фрагменти, а потім піддають дії протеолітичних ферментів, таких як трипсин, версен або колагеназа. Ці ферменти сприяють руйнуванню міжклітинних контактів і забезпечують утворення суспензії окремих клітин, які можна підраховувати та переносити на поживне середовище для подальшого культивування.

Культуру вважають первинною до моменту її першого пасажування (субкультивування). Після пересівання клітин на нове поживне середовище вони вже належать до наступного пасажу.

Первинні культури, отримані з ембріональних тканин, зазвичай характеризуються кращою життєздатністю та швидшим ростом, ніж аналогічні культури, виділені з тканин дорослих організмів. Це пов’язано з меншою спеціалізацією ембріональних клітин та наявністю в них клітин із високим проліферативним потенціалом.

Одержання та подальше культивування первинних клітин із дорослих тканин, особливо ниркової, є складнішим процесом. Такі клітини мають, як правило, обмежену тривалість існування in vitro. У наведених умовах культури з дорослих тканин можуть зберігатися приблизно до 20 генерацій, тоді як клітини, отримані з ембріональних тканин, здатні підтримуватися до приблизно 50 генерацій.

Важливою характеристикою первинних культур є їхня різна чутливість до вірусів. Вона залежить як від походження клітин і типу тканини, з якої їх було отримано,

так і від тропізму конкретного вірусу. Тому вибір первинної клітинної культури має відповідати біологічним властивостям досліджуваного вірусу.

До прикладів первинних культур належать культури клітин нирок ембріона людини, нирок макаки-резус, нирок африканської зеленої мавпи, нирок ембріона свині, а також фібробласти курячих ембріонів та інші клітинні культури.

Табл.

Чутливість первинних культур клітин до вірусів людини

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

Після отримання субкультури ***первинна культура*** набуває статусу клітинної лінії. За тривалістю існування *in vitro* клітинні лінії поділяють на обмежені та постійні. ***Обмежені лінії*** здатні до культивування протягом певного числа пасажів, після чого втрачають здатність до подальшого розмноження. До них, зокрема, належать диплоїдні фібробласти людини та тварин. ***Постійні,*** або безперервні (перещеплювані), клітинні лінії можуть підтримувати проліферацію in vitro протягом необмежено тривалого часу.

Штам клітин – це популяція відносно однорідних клітин, що характеризуються певними морфологічними, біохімічними, генетичними або іншими маркерними ознаками та зберігають специфічні властивості протягом визначеного періоду культивування. Штам може бути отриманий як із первинної культури, так і з уже існуючої клітинної лінії внаслідок цілеспрямованого відбору або клонування клітин із потрібними властивостями.

Клоновою лінією, або клоном, називають популяцію клітин, яка походить від однієї вихідної клітини та утворилася внаслідок її послідовного розмноження.

Після перенесення клітин у поживне середовище вони проходять початковий період адаптації (лаг-фазу), який зазвичай триває від 2 до 24 годин. Після завершення адаптації настає експоненційна, або логарифмічна, фаза росту, що характеризується активним поділом клітин та збільшенням їх кількості в певні, відносно сталі проміжки часу.

У міру збільшення кількості клітин поверхня культурального субстрату поступово заповнюється. Коли клітини формують суцільний шар і вступають у контакт одна з одною, швидкість їх проліферації знижується. Це явище отримало назву контактного гальмування. У результаті формується шар клітин завтовшки в одну клітину, тому такі культури називають одношаровими або моношаровими.

Після досягнення високої щільності клітин культура переходить у фазу уповільненого росту, або стаціонарну (фазу плато). Якщо в цей період клітини не перенести на свіже поживне середовище та не створити належних умов для їх подальшого росту, культура поступово переходить до фази старіння, а згодом – до загибелі клітин.

У більшості випадків повноцінний моношар формується протягом 3–5 діб. Тривалість цього процесу залежить від виду та властивостей клітин, віку донора, складу й якості поживного середовища, початкової концентрації клітин, умов культивування та інших чинників.

Поживне середовище періодично замінюють у міру накопичення в ньому продуктів клітинного метаболізму та зниження концентрації необхідних поживних компонентів. За оптимальних умов моношар може зберігати життєздатність приблизно 7–21 добу, хоча цей показник залежить від типу клітин та складу середовища.

Диплоїдні клітинні лінії (напівперещеплювані лінії) характеризуються збереженням нормального диплоїдного каріотипу вихідного типу клітин. У класичному визначенні до диплоїдних відносять культури, в яких не менше 75 % клітин мають нормальний для вихідної тканини каріотип. Такі культури не виявляють онкогенної активності під час відповідного експериментального тестування.

Водночас наявність диплоїдного числа хромосом не завжди свідчить про повну відповідність каріотипу нормальному. У процесі культивування можливі хромосомні перебудови, втрата одних хромосом та набуття інших. У такому випадку загальна кількість хромосом може залишатися диплоїдною, хоча структура каріотипу вже відрізняється від вихідної. Такі клітини характеризують як псевдодиплоїдні.

Диплоїдні культури здатні до багаторазового пасажування і можуть зберігати проліферативну активність протягом значної кількості популяційних

поділів – у деяких випадках до приблизно 80 поділів. Разом із тим вони досить чутливі до змін умов культивування, що обмежує їх практичне використання, зокрема у вірусологічних дослідженнях. Саме тому в літературі диплоїдні культури нерідко називають напівперещеплюваними культурами клітин.

До прикладів диплоїдних клітинних культур належать WI-38 – фібробласти легень людини, MRC-5 – диплоїдні фібробласти людини, а також ТМ-4 – клітинна лінія, отримана з тестикулярного епітелію миші.

Якщо частка клітин із нормальним диплоїдним каріотипом становить менше 75 %, таку культуру відносять до гетеродиплоїдних клітинних ліній. Саме по собі поняття «гетеродиплоїдна» не є синонімом злоякісної трансформації та не означає автоматично здатності клітин до необмеженої проліферації.

Постійна (безперервна, перещеплювана) клітинна лінія – це культура клітин, яка після відповідної адаптації до умов *in vitro* набуває здатності до тривалого, практично необмеженого проліферативного росту та багаторазового пасажування. Такі лінії можуть походити від пухлинних клітин або бути отримані внаслідок спонтанної чи індукованої трансформації нормальних клітин. Вони широко застосовуються у вірусології, цитології, молекулярній біології, токсикології та інших експериментальних дослідженнях.

Постійні клітинні лінії можуть бути отримані з пухлинних або морфологічно нормальних тканин людини чи тварин, клітини яких зазнали трансформації та характеризуються змінами каріотипу. Порівняно з первинними та диплоїдними культурами, постійні клітинні лінії мають низку переваг, що зумовлює їх широке застосування у вірусологічних дослідженнях.

На сучасному етапі розвитку клітинної біології немає чітко визначеного моменту, коли культивована *in vitro*

популяція набуває стабільної здатності до необмежено тривалого росту. У класичних експериментальних дослідженнях фібробластоподібних клітин людини було показано, що для підтвердження безперервного характеру лінії необхідне багаторазове субкультивування – приблизно 70 пасажів з інтервалами близько трьох діб. Водночас сучасне визначення безперервної клітинної лінії ґрунтується не лише на кількості пасажів, а й на підтвердженні стабільних властивостей та здатності клітин до тривалої проліферації.

Для постійних клітинних ліній характерні трансформаційні зміни. Під клітинною трансформацією розуміють стійке, переважно незворотне набуття клітинами нових біологічних властивостей, насамперед змін у характері росту та проліферації. Трансформовані клітини можуть втрачати обмеження, властиві нормальним клітинам, і набувати здатності до тривалого або практично необмеженого поділу.

Трансформаційні зміни супроводжуються перебудовою багатьох клітинних процесів, зокрема механізмів регуляції проліферації, клітинного метаболізму, міжклітинної взаємодії та властивостей плазматичної мембрани. Внаслідок цього змінюються характер росту клітин, їхня взаємодія із субстратом, потреба у факторах росту та окремі антигенні характеристики. Водночас конкретні молекулярні зміни можуть істотно відрізнятися залежно від походження та способу отримання клітинної лінії.

Спонтанна трансформація клітин, отриманих із нормальних тканин, трапляється відносно рідко. Частота виникнення трансформованих клітин може підвищуватися під впливом різних мутагенних або вірусних факторів. У дослідженнях клітинної трансформації, зокрема, використовували онкогенні віруси, серед яких SV40 та вірус Епштейна-Барр.

Трансформовані клітини за певних умов можуть демонструвати онкогенний потенціал і спричиняти утворення пухлин у відповідних експериментальних моделях. Проте здатність клітин до тривалого росту *in vitro* або сам факт їх трансформації не слід автоматично ототожнювати зі злоякісністю. Трансформація є ширшим біологічним поняттям і може супроводжуватися різним ступенем змін фенотипу та онкогенних властивостей.

Характер взаємодії вірусу з клітинами культури тканин визначається сукупністю чинників. Одним із найважливіших є чутливість клітин до конкретного вірусу, яка залежить від наявності відповідних рецепторів, внутрішньоклітинних умов для реплікації вірусу та інших властивостей клітини. Значний вплив також мають склад поживного середовища, температура, тривалість культивування, щільність клітин та інші умови експерименту.

Різні постійні клітинні лінії характеризуються неоднаковою сприйнятливістю до вірусної інфекції. Тому під час вірусологічних досліджень для кожного вірусу добирають клітинну систему, у якій забезпечується його ефективне розмноження та, за можливості, чітко проявляються характерні зміни клітин. Такі зміни можуть використовуватися для виявлення та подальшого дослідження вірусної інфекції.

До широко відомих постійних клітинних ліній належать HeLa – клітини карциноми шийки матки людини; HEp-2 – клітини, що походять від карциноми гортані; KB – клітини, які використовувалися як модель карциноми ротової порожнини; MCF-7 – клітини карциноми молочної залози людини; Vero – клітини нирки африканської зеленої мавпи; L – лінія мишачих фібробластів; C-1300 – клітини нейробластоми миші; СПЕВ – клітини нирки ембріона свині. До трансформованих клітинних моделей також належать лінії, отримані внаслідок експериментальної

вірусної трансформації.

Окремим напрямом розвитку технології культивування є суспензійне вирощування клітин. Цей підхід набув важливого значення у вірусології завдяки можливості отримувати значні об'єми клітинного матеріалу та масштабувати процес культивування. Суспензійні культури також широко використовують у біотехнологічних процесах для одержання біологічно активних речовин та інших продуктів клітинного метаболізму.

Адаптація клітин ссавців до росту в суспензії є складнішим процесом, ніж культивування мікроорганізмів. Тваринні клітини зазвичай більш чутливі до механічного впливу та інших фізичних факторів, можуть легко осідати, потребують складніших поживних середовищ і характеризуються нижчою швидкістю проліферації порівняно з багатьма бактеріальними культурами.

Важливу роль у розвитку суспензійного культивування відіграли методи ферментативного диспергування тканин, які дали змогу ефективніше отримувати окремі клітини з тканинних фрагментів. Подальше створення та відбір постійних клітинних ліній, здатних тривалий час проліферувати в суспензійному стані, сприяли широкому впровадженню цього підходу у вірусологію та біотехнологію.

Умови культивування клітин *in vitro*

Перенесення клітин із цілісного організму в штучно створені умови культивування призводить до зміни їхнього звичайного функціонального стану. В організмі клітини є складовими частинами тканин і органів та перебувають під постійним впливом нейрогуморальної регуляції. Після ізоляції та культивування *in vitro* вони втрачають безпосередній контроль з боку систем організму й починають функціонувати відповідно до умов створеного штучного середовища. Одним із наслідків цього є зміна

характеру проліферації, зокрема підвищення швидкості поділу клітин порівняно з умовами *in vivo*.

Ефективність та життєздатність клітин при культивуванні *in vitro* визначаються комплексом фізичних, хімічних і біологічних чинників.

1. Стерильність.

Дотримання асептичних умов є обов'язковою передумовою успішного культивування клітин. Необхідно запобігати контамінації культури бактеріями, грибами, вірусами, мікоплазмами, а також клітинами інших культур. Відповідні вимоги поширюються на приміщення та обладнання, лабораторний посуд, інструменти, поживні середовища, реагенти й матеріал, з якого отримують культуру клітин.

2. Щільність клітинної популяції.

Концентрація клітин у культурі безпосередньо впливає на їхню проліферацію та життєздатність. Після досягнення певної щільності поділ клітин може сповільнюватися або припинятися. Це особливо характерно для клітин, яким властиве контактне гальмування. Водночас окремі гетероплоїдні клітини можуть продовжувати проліферацію та формувати багатошарові клітинні структури.

У суспензійних культурах надмірне збільшення концентрації клітин може призводити до виснаження поживних компонентів і накопичення продуктів метаболізму. У системах із постійним або періодичним надходженням свіжого поживного середовища та видаленням метаболітів, зокрема перфузійних системах і хемостатах, можливе підтримання значно вищої щільності клітинної популяції та отримання висококонцентрованих культур.

3. Склад поживного середовища.

Для нормального росту та поділу клітин необхідна збалансована система поживних компонентів. До складу культурального середовища входять неорганічні солі, вуглеводи, амінокислоти, білки або їхні компоненти,

вітаміни, гормони та інші біологічно активні речовини. Важливе значення має також газовий склад середовища.

Особливу роль відіграє вуглекислий газ (CO_2), який бере участь у підтриманні кислотно-лужної рівноваги культурального середовища. У багатьох системах культивування використовується буферна система, пов'язана з концентрацією CO_2 та бікарбонатів. Необхідна концентрація CO_2 підтримується шляхом використання контрольованої газової атмосфери або герметичних систем, у яких частина CO_2 утворюється внаслідок метаболічної активності клітин.

4. Реакція середовища (pH).

Кислотність культурального середовища є одним із ключових факторів, що визначає активність клітинних ферментів, транспорт речовин через мембрану та загальну життєздатність клітин. Для більшості клітин ссавців оптимальні значення pH перебувають приблизно в межах 7,2–7,6. Значні відхилення від фізіологічного діапазону можуть негативно впливати на метаболічні процеси, проліферацію та виживання клітин.

5. Температура культивування.

Температурний режим добирають відповідно до видової та тканинної належності клітин. Для більшості клітин ссавців і птахів оптимальною є температура, близька до фізіологічної, – приблизно 37 °C. Надмірне підвищення температури прискорює денатурацію білків і порушує клітинний метаболізм, що може призводити до незворотного ушкодження клітин.

Оптимальна температура може відрізнятися для різних типів клітин. Наприклад, деякі клітини ембріонального походження та епітеліальні клітини можуть краще розмножуватися за дещо нижчої температури. Клітини риб та інших холоднокровних організмів зазвичай культивують при значно нижчих температурах, ніж клітини ссавців. Аналогічні особливості характерні для культур тканин амфібій.

6. Осмотичний тиск.

Осмотичність культурального середовища має підтримуватися в межах, сумісних із фізіологічним станом клітин. Вона визначається сумарною концентрацією розчинених речовин, передусім неорганічних іонів, а також глюкози та інших компонентів середовища. Значну роль відіграють іони натрію та хлору, проте на загальну осмотичність впливають також калій, кальцій, магній та інші розчинені речовини.

Клітини здатні певною мірою адаптуватися до зміни осмотичності, однак різкі коливання цього показника можуть порушувати водно-електролітний баланс, змінювати об'єм клітин і негативно впливати на їхню життєздатність. Тому під час культивування необхідно підтримувати стабільну осмотичність середовища та уникати швидких змін її значень.

Контамінація культур клітин

Під час проведення вірусологічних досліджень із використанням клітинних культур необхідно систематично контролювати їх на наявність сторонніх мікроорганізмів (контамінантів). До них належать віруси, бактерії, гриби, мікоплазми, а також клітини інших культур. На відміну від організму людини, де захист від інфекцій забезпечується комплексом механізмів імунної системи, клітини, що культивуються *in vitro*, не мають такого природного захисту. Тому запобігання контамінації значною мірою залежить від дотримання дослідником правил асептики та правильної організації роботи з культурами.

Одними з найпоширеніших і водночас найскладніших для своєчасного виявлення контамінантів є мікоплазми. Первинні культури клітин, отримані безпосередньо з тканин за належних умов, зазвичай не містять мікоплазм, проте окремі клітинні лінії та штами, особливо ті, що тривалий час підтримуються в культурі, можуть бути контаміновані цими мікроорганізмами.

Джерелами мікоплазм можуть бути компоненти поживних середовищ, зокрема сироватка тваринного походження, лабораторне обладнання, реагенти, а також персонал, який працює з клітинними культурами. Серед мікоплазм, що можуть виявлятися в клітинних культурах, описані *Mycoplasma arginini*, *M. hominis*, *M. pharyngis* та *M. salivarium*. Останні можуть потрапляти в культуру внаслідок порушення правил асептичної роботи, оскільки здатні колонізувати слизові оболонки верхніх дихальних шляхів людини.

Небезпека мікоплазмової контамінації полягає в тому, що на відміну від бактеріального або грибкового забруднення вона часто не супроводжується очевидними змінами зовнішнього вигляду культури. Мікоплазми можуть тривалий час залишатися непомітними під час звичайного мікроскопічного контролю. Саме тому регулярне спеціалізоване тестування клітинних культур на їх наявність є важливою складовою контролю якості.

Наявність мікоплазм та інших прихованих контамінантів може істотно впливати на біологічні властивості клітин. Таке забруднення здатне змінювати клітинний метаболізм, швидкість проліферації, експресію окремих генів і стабільність хромосомного набору, а також впливати на сприйнятливість клітин до вірусів. Особливу проблему становлять латентні або малопомітні інфекції, які можуть тривалий час не проявлятися зовнішніми ознаками, але водночас спотворювати результати експерименту.

Для запобігання росту бактеріальних і грибкових контамінантів у культуральні середовища за певних умов можуть додавати антибактеріальні та протигрибкові препарати. Їх застосування може бути корисним під час окремих етапів роботи, однак постійне використання антимікробних засобів не є бажаною заміною належної

асептичної техніки. Тривале застосування таких препаратів може маскувати приховану контамінацію, створювати додаткові фактори впливу на клітини та ускладнювати оцінювання їхнього фізіологічного стану.

Основним способом запобігання контамінації є суворе дотримання правил асептики та стерильності на всіх етапах роботи з клітинними культурами. Важливе значення мають належна підготовка приміщень та обладнання, використання стерильного посуду й реагентів, правильне поводження з культурами та регулярний контроль їхнього стану.

Для забезпечення достовірності вірусологічних досліджень клітинні культури необхідно періодично перевіряти на наявність бактеріальних, грибкових і мікоплазмових контамінантів із використанням відповідних методів контролю. Такий комплексний підхід дає змогу своєчасно виявляти забруднення, запобігати поширенню контамінованої культури та підвищувати відтворюваність і надійність результатів досліджень.

Методи виявлення та ідентифікації вірусів у клітинних культурах

Для виявлення вірусів у культурах клітин використовують комплекс методів, які дають змогу встановити факт репродукції вірусу, оцінити його вплив на клітини та, за необхідності, провести подальшу ідентифікацію. До основних методів індикації вірусів належать:

- визначення цитопатичного ефекту (ЦПЕ) або цитопатичної дії;
- виявлення внутрішньоклітинних включень;
- дослідження за допомогою електронної мікроскопії;
- застосування імуноферментного (ІФА) та радіоімунного аналізу (РІА);

- реакція гемадсорбції (РГАд);
- метод імунофлуоресценції;
- виявлення вірусної інтерференції;
- визначення пригнічення клітинного метаболізму за допомогою кольорової проби;
- метод бляшкоутворення.

Цитопатичний ефект

Важливим етапом лабораторної діагностики багатьох вірусних інфекцій є виділення вірусу та його розмноження в культурі клітин. Для цього досліджуваний матеріал вносять у підготовлений клітинний моношар, після чого протягом певного часу спостерігають за станом клітин. Репродукція вірусу може супроводжуватися характерними морфологічними змінами, які реєструють переважно за допомогою світлової мікроскопії.

Цитопатичним ефектом (ЦПЕ) називають сукупність морфологічних і структурних змін клітин, що виникають унаслідок вірусної інфекції та можуть бути виявлені під час мікроскопічного дослідження. Характер ЦПЕ залежить як від виду вірусу, так і від типу клітинної культури та умов її культивування.

До типових проявів цитопатичного ефекту належать зміна форми та розмірів клітин, їх набухання або зморщування, порушення цілісності моношару, дегенеративні зміни, відокремлення клітин від поверхні субстрату, а також формування багатоядерних клітин – синцитіїв. У деяких випадках вірусна репродукція супроводжується появою внутрішньоклітинних включень у ядрі, цитоплазмі або в обох компартментах.

Для детальнішої характеристики морфологічних змін використовують цитологічне фарбування. Клітинний моношар попередньо фіксують, після чого обробляють

відповідними барвниками, які дають змогу краще візуалізувати клітинні структури та патологічні зміни. Залежно від тинкторіальних властивостей включення можуть бути базофільними, тобто такими, що інтенсивніше забарвлюються основними барвниками, або ацидофільними (оксифільними) – такими, що сприймають переважно кислі барвники.

Внутрішньоклітинні включення мають різне походження та морфологічне значення. Вони можуть являти собою ділянки активної репродукції вірусу, скупчення вірусних компонентів, агрегати вірусних частинок або продукти змін клітинних структур. Класичними прикладами вірус-асоційованих включень є тільця Гварнієрі, характерні для інфекції, спричиненої вірусом натуральної віспи, та тільця Бабеша—Негрі, які виявляють у нейронах при сказі. Окремі типи ядерних включень описувалися також при інших вірусних інфекціях.

Одним із найпоширеніших способів забарвлення клітинних препаратів є фарбування гематоксиліном та еозином (ГЕ; H&E staining). Гематоксилін забезпечує переважно забарвлення ядерних структур, тоді як еозин контрастує цитоплазматичні компоненти та низку позаклітинних структур. Така методика дає змогу оцінити загальну морфологію клітин і виявити характерні патологічні зміни.

Сукупність морфологічних ознак – форма та розмір клітин, характер змін моношару, наявність синцитіїв, а також локалізація й тинкторіальні властивості внутрішньоклітинних включень – у деяких випадках може мати діагностичне значення. Водночас цитопатичний ефект зазвичай не є достатньо специфічним для остаточної ідентифікації вірусу, тому його результати доцільно підтверджувати специфічними імунологічними, молекулярно-біологічними або іншими методами.

Табл.

Приклади цитопатичного ефекту при ураженні вірусами різних систематичних груп

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

При інфікуванні клітин ***аденовірусом*** спостерігаються характерні цитопатичні зміни. Заражені клітини набувають округлої форми, поступово втрачають прикріплення до поверхні субстрату, що може супроводжуватися порушенням цілісності клітинного моношару.

У ядрах інфікованих клітин виявляються інтенсивно базофільні включення, які добре сприймають гематоксилін і тому мають пурпурово-синє забарвлення. Такі внутрішньоядерні включення пов'язані з накопиченням вірусних компонентів у клітині та є характерною морфологічною ознакою аденовірусної репродукції.

Морфологічне виявлення округлення клітин, відокремлення їх від субстрату та формування внутрішньоядерних включень може використовуватися як ознака цитопатичної дії аденовірусу в культурі клітин. Водночас для остаточної ідентифікації збудника необхідне застосування специфічних методів дослідження.

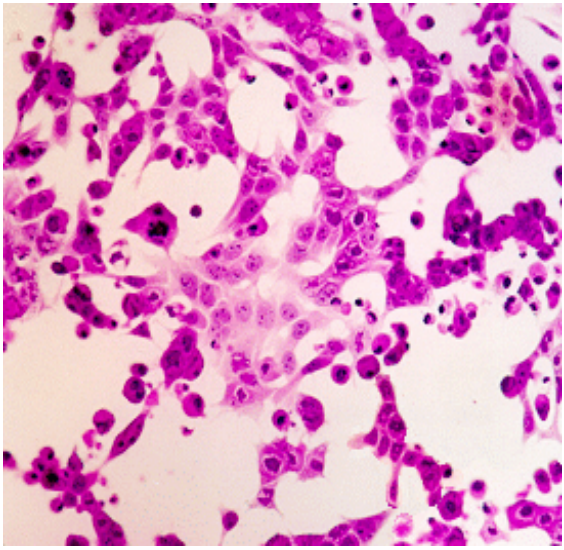


Рис.16. Мікрофотографія цитопатичної дії аденовірусів

Репродукція ***реовірусів*** відбувається переважно в цитоплазмі інфікованих клітин. На пізніх етапах вірусного циклу формування нових віріонів пов'язане з мембранними структурами ендоплазматичного ретикулума, через які відбувається вихід сформованих вірусних частинок.

У цитоплазмі інфікованих клітин можуть формуватися ділянки накопичення вірусних компонентів. Під час фарбування гематоксиліном та еозином ці структури набувають еозинофільного забарвлення, що проявляється характерним насиченим рожевим відтінком. Такі цитоплазматичні включення можуть бути морфологічною ознакою репродукції реовірусу в клітинній культурі.



Рис.17. Мікрофотографія цитопатичної дії реовірусів

Багато оболонкових вірусів мають у складі поверхневої оболонки спеціалізовані ***фузійні білки***, які забезпечують злиття вірусної оболонки з плазматичною мембраною клітини-хазяїна. Завдяки цьому вірусний генетичний матеріал отримує можливість потрапити всередину клітини та розпочати інфекційний процес.

У процесі реплікації деяких оболонкових вірусів фузійні білки синтезуються в інфікованій клітині та транспортуються до її плазматичної мембрани. Їхня присутність на поверхні клітини може спричиняти злиття мембран сусідніх клітин. У результаті утворюються великі багатоядерні клітини, які називають ***синцитіями.*** Формування синцитіїв є одним із характерних проявів цитопатичної дії низки вірусів.

Особливо виражене утворення синцитіїв може спостерігатися під час репродукції вірусу кору в культурі клітин. Утворені багатоядерні клітини можуть досягати значних розмірів і містити велику кількість ядер.

Ще однією морфологічною ознакою корової інфекції є поява еозинофільних внутрішньоядерних включень в

інфікованих клітинах. У складі синцитіїв ядра часто розташовуються групами навколо ділянки інтенсивно забарвленої цитоплазми, пов'язаної з перебудовою внутрішньоклітинних мембранних структур, зокрема комплексу Гольджі. Внутрішньоядерні включення за відповідного фарбування добре візуалізуються під час світлової мікроскопії.

Поєднання вираженого синцитієутворення та внутрішньоядерних включень може бути важливою морфологічною ознакою цитопатичної дії ***вірусу кору*** в клітинній культурі, хоча для остаточної ідентифікації вірусу необхідне застосування специфічних методів..

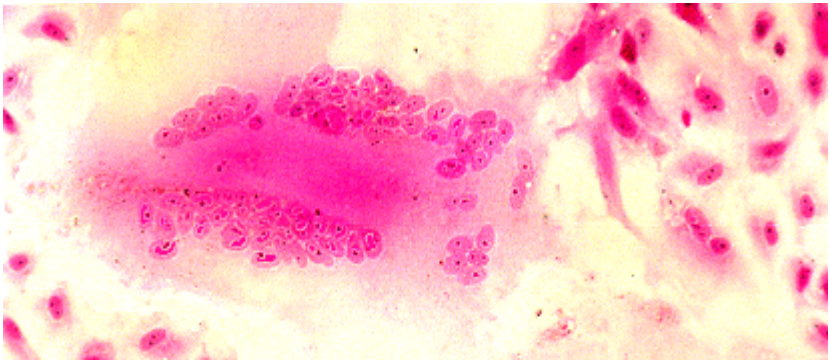


Рис. 18. Мікрофотографія цитопатичної дії вірусу кору

Респіраторно-синцитіальний вірус (РСВ) отримав свою назву завдяки характерній здатності спричиняти утворення великих багатоядерних клітин – синцитіїв. У процесі інфекції ядра уражених клітин, як правило, не містять виражених внутрішньоядерних включень. Водночас у цитоплазмі можуть виявлятися слабко забарвлені еозинофільні включення, які є однією з морфологічних ознак вірусної репродукції.

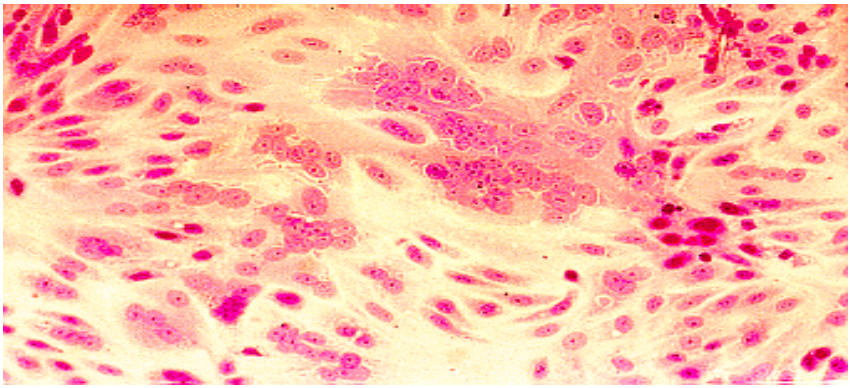


Рис. 19. Мікрофотографія цитопатичної дії респіраторно-синцитіального вірусу

Цитопатичні зміни, що виникають під час інфікування ***вірусом паротиту***, за морфологічними проявами можуть бути подібними до змін, характерних для РСВ. Однією з основних ознак є формування багатоядерних клітин унаслідок злиття сусідніх клітин.

Вірус паротиту кодує поверхневий гемаглютинін, який входить до складу вірусної оболонки. Під час репродукції вірусу відповідний білок транспортується до плазматичної мембрани інфікованої клітини та накопичується в ділянках, де відбувається формування і вихід нових вірусних частинок. Наявність вірусних білків на поверхні інфікованих клітин також може сприяти їхньому злиттю із сусідніми клітинами та формуванню синцитіїв.

Отже, синцитієутворення є характерним проявом цитопатичної дії як РСВ, так і вірусу паротиту, хоча морфологічні особливості включень та інші ознаки можуть відрізнятися.

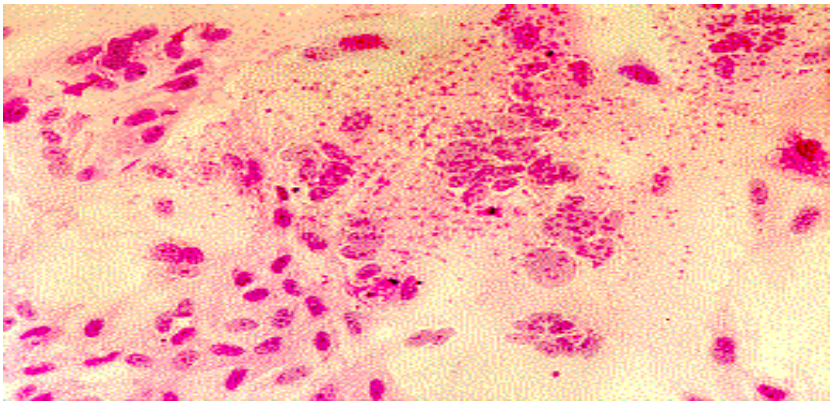


Рис.20. Мікрофотографія цитопатичної дії вірусу паротиту

Одним із додаткових методів виявлення вірусів у клітинних культурах є реакція гемадсорбції. Якщо до моношару клітин, інфікованих певним вірусом, додати еритроцити, вони можуть вибірково прикріплюватися до поверхні уражених клітин. Таке явище називають ***гемадсорбцією***. Воно зумовлене появою на мембрані інфікованих клітин вірусних білків, здатних взаємодіяти з рецепторами еритроцитів. Реакція гемадсорбції може бути використана як додатковий критерій для виявлення вірусної репродукції, зокрема під час дослідження інфекцій, спричинених вірусом паротиту та респіраторно-синцитіальним вірусом.

Для ***герпесвірусів*** характерною особливістю є реплікація вірусного геному та формування основних компонентів нових віріонів у ядрі інфікованої клітини. У процесі вірусної репродукції в ядрах накопичуються вірусні та клітинні компоненти, внаслідок чого можуть формуватися характерні внутрішньоядерні включення, які при відповідному фарбуванні мають переважно еозинофільне забарвлення.

Цитопатичний ефект різних представників родини герпесвірусів має як спільні, так і специфічні морфологічні ознаки. Саме ці відмінності можуть використовуватися для попередньої диференціації вірусів, хоча для їх остаточної ідентифікації необхідні специфічні лабораторні методи.

Для *вірусу простого герпесу 1 типу (ВПГ-1)* у культурі клітин можуть формуватися чітко окреслені вогнища ураження, представлені округлими клітинами. Уражені клітини збільшуються або змінюють форму, а їхні ядра деформуються та можуть містити характерні еозинофільні включення.

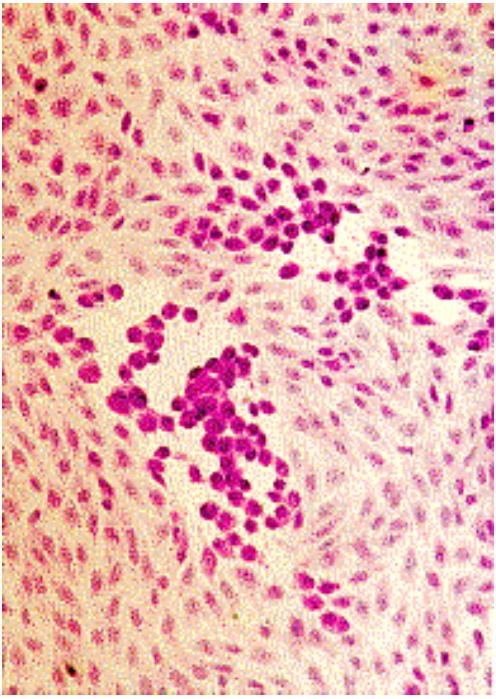


Рис.21. Мікрофотографія цитопатичної дії вірусу простого герпесу

До інших проявів цитопатичної дії герпесвірусів належать утворення багатоядерних клітин (гігантських клітин) та формування синцитієподібних структур. Виражене синцитієутворення може бути більш характерним для *ВПГ-2*, що разом з іншими морфологічними ознаками може враховуватися під час диференційної оцінки цитопатичного ефекту.

Водночас морфологічні прояви ЦПЕ не є абсолютно специфічними, тому результати мікроскопічного дослідження доцільно підтверджувати серологічними, імунофлуоресцентними або молекулярно-біологічними методами.

Цитомегаловірус людини (ЦМВ) характеризується вираженою тропністю до певних типів клітин і в культурі *in vitro* найкраще репродукується у фібробластах, хоча його клітинний тропізм в організмі є значно ширшим.

Репродукція ЦМВ у культурі клітин відбувається повільно, тому цитопатичні зміни зазвичай розвиваються поступово та формують невеликі, чітко відмежовані осередки ураження. У міру розвитку інфекції інфіковані клітини можуть збільшуватися в розмірах, що відповідає характерному цитомегалічному ефекту.

Однією з найбільш характерних морфологічних ознак ЦМВ-інфекції є поява у ядрах уражених клітин *великих еозинофільних внутрішньоядерних включень*, оточених світлим обідком. Через характерний вигляд такі включення традиційно називають включеннями за типом ***«совиного ока»***. Їх виявлення під час цитологічного або гістологічного дослідження може мати важливе діагностичне значення, однак для підтвердження ЦМВ-інфекції застосовують специфічні лабораторні методи.

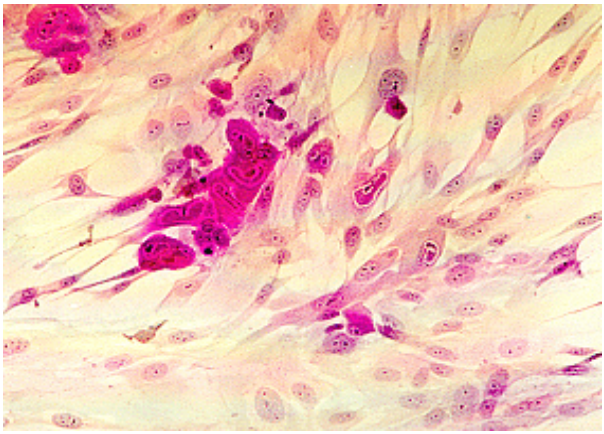


Рис.22. Мікрофотографія цитопатичної дії цитомегаловірусу

Вірус варіцела-зостер (VZV) здатний репродукуватися в різних типах клітин, зокрема в епітеліальних клітинах і фібробластах. У культурі клітин його розмноження супроводжується розвитком характерного цитопатичного ефекту.

Порівняно з вірусом простого герпесу (ВПГ), цитопатичні зміни при інфікуванні VZV формуються повільніше та потребують тривалішого часу для прояву. Така особливість може використовуватися як один із додаткових морфологічних критеріїв під час диференційної оцінки герпесвірусних інфекцій у культурі клітин. Однак лише за швидкістю розвитку ЦПЕ надійно встановити вид вірусу неможливо, тому остаточна ідентифікація потребує застосування специфічних методів.

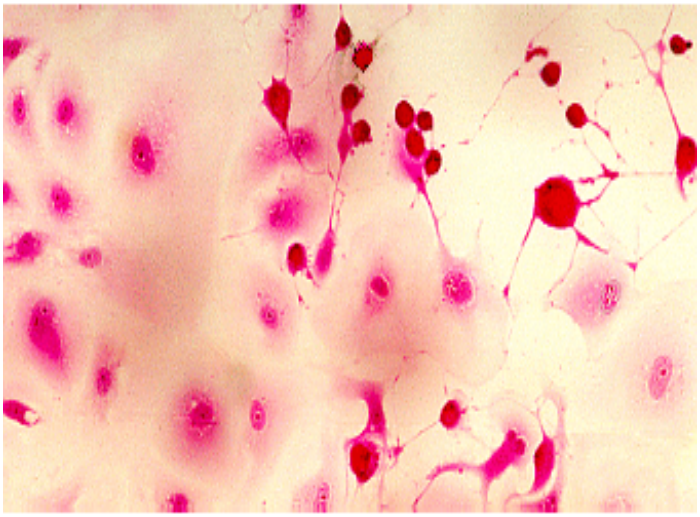


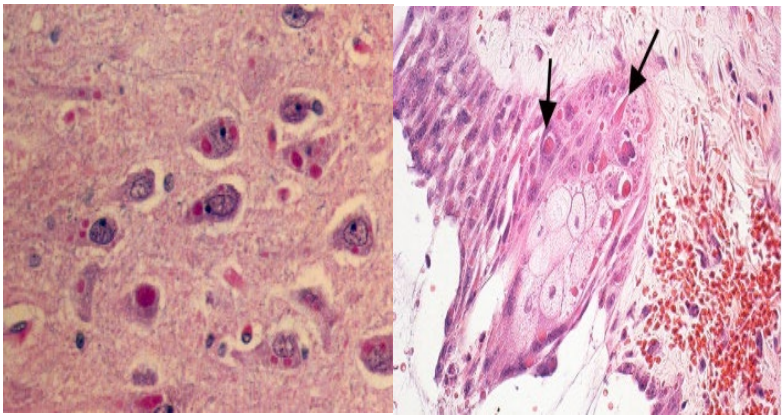
Рис.23. Мікрофотографія цитопатичної дії вірусу варіцела-зостер

У процесі розвитку інфекції ядра уражених клітин збільшуються в розмірах, а в їхній структурі з'являються добре помітні еозинофільні внутрішньоядерні включення. На пізніх етапах інфекційного процесу характерними морфологічними ознаками стають округлення клітин та виражена еозинофілія їхніх структур під час фарбування.

При інфікуванні вірусом сказу у нервових клітинах на гістологічних препаратах можуть виявлятися характерні внутрішньоцитоплазматичні включення – тільця Бабеша – Негрі. Їх наявність є важливою морфологічною ознакою сказу, хоча негативний результат не виключає інфекцію.

Тільця Бабеша-Негрі – це характерні внутрішньоцитоплазматичні включення, які можуть виявлятися в нейронах при інфікуванні вірусом сказу. Вони мають округлу або овальну форму, зазвичай еозинофільно забарвлюються та можуть мати розміри приблизно 2–10 мкм. Найчастіше такі включення виявляють у нейронах гіпокампа,

зокрема в ділянці рогів Аммона, а також у клітинах кори мозочка та інших структур центральної нервової системи.



а ***б***

Рис.24. Тільця Бабеша-Негрі (а) і Гварнієрі (б)

Тільця Бабеша-Негрі містять компоненти вірусних рибонуклеопротеїнів і є результатом накопичення вірусних та клітинних структур у цитоплазмі інфікованих нейронів.

При інфікуванні поксвірусами, зокрема вірусом натуральної віспи, у цитоплазмі уражених клітин можуть формуватися характерні тільця Гварнієрі – внутрішньоцитоплазматичні включення, які належать до так званих включень типу В. Після фарбування гістологічних або цитологічних препаратів вони можуть мати вигляд еозинофільних рожевих структур різної форми та розміру, локалізованих у цитоплазмі інфікованих епітеліальних клітин.

Тільця Гварнієрі пов’язані з цитоплазматичними ділянками репродукції поксвірусів, де відбувається синтез і накопичення вірусних компонентів та формування нових вірусних частинок. Тому їх виявлення може мати важливе морфологічне значення під час дослідження поксвірусних інфекцій.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 5

Завдання 1. Виявлення цитопатичного ефекту вірусів у культурі клітин

Репродукція вірусу в клітині супроводжується порушенням її нормальної життєдіяльності та може спричиняти комплекс характерних морфологічних змін. Вираженість і характер таких змін залежать від виду вірусу, типу клітинної культури, тривалості інфекційного процесу та умов культивування. До проявів ЦПЕ можуть належати зміна форми й розмірів клітин, округлення, набухання або зморщування, порушення цілісності моношару, відокремлення клітин від поверхні субстрату, утворення багатоядерних клітин (синцитіїв), а також поява внутрішньоклітинних включень.

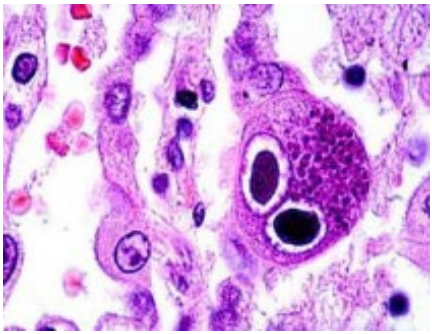
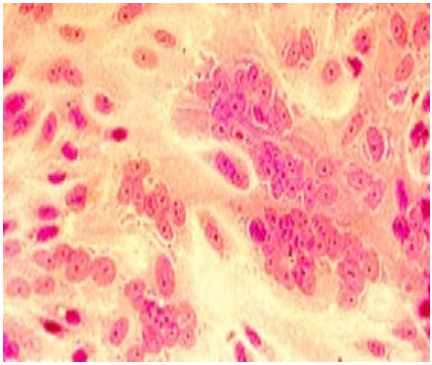
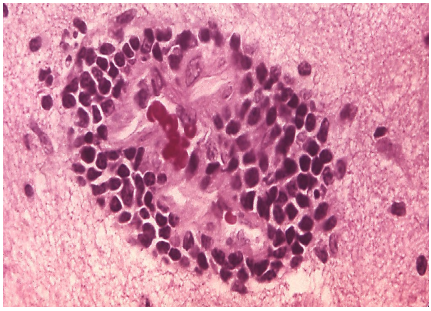
1.1. Розгляньте запропоновані мікрофотографії культур клітин, уражених різними вірусами, та проведіть порівняльний аналіз характерних морфологічних змін. На підставі побачених ознак визначте особливості цитопатичної дії кожного вірусу та наявність внутрішньоклітинних включень. За результатами спостережень заповніть таблицю. Для кожної представленої мікрофотографії або вірусної інфекції внесіть відповідну інформацію до всіх граф таблиці:

Видова приналежність вірусу	Родина	Цитопатична дія вірусу	Внутрішньо-клітинна локалізація

Видова приналежність вірусу	Родина	Цитопатична дія вірусу	Внутрішньо-клітинна локалізація

1.2. Розгляньте запропоновані мікрофотографії культур клітин, інфікованих різними вірусами, та проаналізуйте характер морфологічних змін, що виникли внаслідок вірусної репродукції. Порівняйте мікрофотографії з наведеними варіантами цитопатичних змін та встановіть відповідність між зображенням і відповідним типом ЦПЕ.

З'єднайте стрілками кожну мікрофотографію з відповідною характеристикою цитопатичної дії вірусу. Під час виконання завдання зверніть увагу на такі морфологічні ознаки: зміну форми та розмірів клітин; округлення, набухання або зморщування клітин; втрату клітинами прикріплення до поверхні субстрату; порушення цілісності або руйнування клітинного моношару; формування локальних осередків ураження; утворення багатоядерних клітин та синцитіїв; появу внутрішньоядерних або внутрішньоцитоплазматичних включень; інші характерні морфологічні зміни, що дають змогу диференціювати цитопатичну дію різних вірусів.

	Везикули Бабеша
	Великі клітини з типовими ядерними включеннями – «очі сови».
	Утворення синцитію

Завдання 2. Дайте визначення основним поняттям і термінам:

Культура клітин……

……

Клітинна лінія……

……

Поживне середовище……

……

Середовище Ігла……

……

Штам клітин……

……

Первинна культура клітин……

……

Лінія гетеродиплоїдних клітин……

……

Постійна клітинна лінія……

……

Цитопатичний ефект……

……

Синцитій……

……

Гемадсорбція……

……

Клітинні включення……

……

Тільця Каудрі……

……

Тільця Бабеша-Негрі……

……

Тільця Гварнієрі……

……

Гематоксилін……

……

Еозин……

……

Пасаж клітин……

……

ВИСНОВКИ

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____.

КОНТРОЛЬНІ ЗАВДАННЯ ТА ПИТАННЯ

1. Що називають клітинною культурою?
2. У чому полягає принцип методу одношарових культур клітин?
3. Що таке адгезія клітин і яке її значення для формування моношару?
4. Які основні види одношарових культур клітин розрізняють?
5. Встановіть відповідність між типом клітинної культури та її характеристиками.
6. Охарактеризуйте принцип отримання первинної культури клітин.
7. Визначте роль протеолітичних ферментів під час отримання первинної культури.
8. Порівняйте властивості первинних культур, отриманих з ембріональних і дорослих тканин.
9. Що таке первинна культура клітин?
10. З яких джерел можуть отримувати первинні клітинні культури?
11. Для чого тканину під час отримання первинної культури піддають ферментативній обробці?
12. Яку роль відіграють трипсин, версен і колагеназа?
13. Коли культуру клітин вважають первинною?
14. Визначте чинники, від яких залежить чутливість клітинної культури до певного вірусу.
15. Наведіть приклади первинних культур клітин, які використовують у вірусології.
16. Чим відрізняються первинні, диплоїдні, гетероплоїдні та перещеплювані культури?
17. Які переваги мають клітинні культури як моделі для вивчення вірусів?
18. Які основні завдання можна виконувати за допомогою клітинних культур у вірусології?

ТЕМА 1.6. ПОШИРЕННЯ ВІРУСІВ. ОСОБЛИВОСТІ ЖИТТЄВИХ ЦИКЛІВ ВІРУСІВ

Мета: ознайомитися з основними шляхами поширення вірусів рослин і хребетних у природних умовах, особливостями їхньої репродукції та основними типами перебігу вірусних інфекцій.

Компетенції: знати основні типи та механізми поширення вірусів, уміти розрізняти їх за особливостями взаємодії з чутливими організмами та визначати тип вірусної інфекції на основі морфофункціональних характеристик уражених клітин і організмів.

***Матеріальне забезпечення*:** атлас ілюстративних матеріалів зі схемами основних шляхів поширення вірусів різних систематичних груп; навчальні таблиці та схеми механізмів передачі вірусних інфекцій; мікрофотографії уражених клітин і тканин; схеми життєвих циклів та репродукції вірусів; довідкові матеріали з морфологічних і біологічних властивостей вірусів; мультимедійні матеріали та презентації за темою заняття.

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Поширення вірусів рослин

Фітовіруси здатні досить швидко поширюватися в природних рослинних угрупованнях, використовуючи різноманітні механізми передачі від інфікованих рослин до здорових. Особливості їх поширення значною мірою визначаються біологічними властивостями самого вірусу, сприйнятливістю рослини-хазяїна та наявністю відповідних переносників.

Одним із найпоширеніших шляхів передачі є векторний, за якого вірус переноситься живими організмами. У ролі переносників можуть виступати комахи, кліщі, нематоди та деякі ґрунтові гриби. Значну роль у поширенні окремих

фітовірусів відіграють попелиці та інші комахи-фітофаги, які під час живлення на інфікованих рослинах можуть набувати вірус і передавати його наступним рослинам.

Віруси також можуть поширюватися вегетативним шляхом. Збудник зберігається в інфікованому рослинному матеріалі та передається до нового покоління під час використання бульб, цибулин, живців, пагонів та інших органів вегетативного розмноження. Цей механізм має особливе значення для сільськогосподарських культур, оскільки дає змогу вірусу зберігатися в рослинному матеріалі протягом тривалого часу.

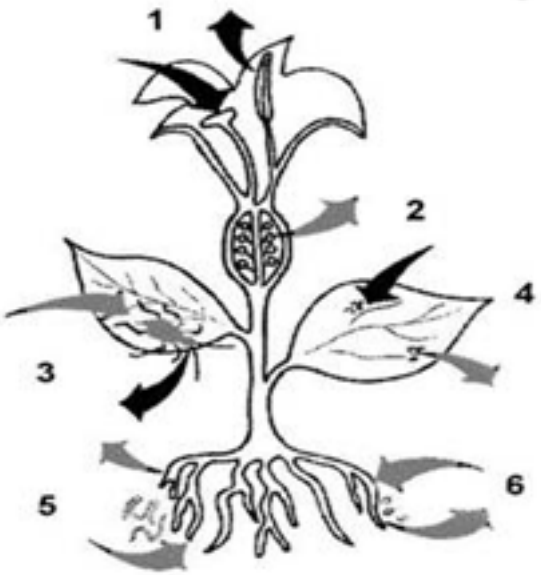


Рис. 25. Основні шляхи передачі фітовірусів

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

Окремі фітовіруси передаються під час щеплення, коли інфіковані тканини контактують із тканинами здорової рослини. Можлива також насіннєва передача, за якої вірус потрапляє до насіння та може передаватися наступному поколінню рослин. Для частини фітовірусів важливим резервуаром є ґрунт, де збудник або його переносники можуть зберігатися та забезпечувати зараження рослин без безпосередньої участі комах-переносників.

Важливу роль у збереженні та поширенні вірусів рослин відіграють рослини-резерватори, які можуть тривалий час підтримувати вірусну інфекцію, часто без виражених зовнішніх ознак захворювання. Значну частину таких рослин становлять бур'яни, що зростають поблизу сільськогосподарських угідь. Щириця біла, гірчиця біла, суріпиця звичайна, пирій повзучий та інші бур'яни можуть бути природним резервуаром фітовірусів і створювати умови для їх подальшого перенесення на культурні рослини. Тому наявність бур'янів є одним із факторів, що сприяють збереженню та поширенню вірусних інфекцій і, відповідно, можуть негативно впливати на продуктивність сільськогосподарських культур.

Значна частина фітовірусів поширюється за допомогою біологічних переносників – векторів. До них належать переважно членистоногі, зокрема комахи та кліщі, а також нематоди й деякі ґрунтові гриби. Векторний шлях передачі забезпечує переміщення вірусу від інфікованої рослини до здорової та відіграє важливу роль у формуванні природних осередків вірусних інфекцій.

Серед комах найбільше значення як переносники фітовірусів мають попелиці. Їхня висока чисельність, поширеність у різних рослинних угрупованнях і здатність переміщуватися між рослинами роблять їх ефективними векторами багатьох вірусів. Дальність природного поширення вірусів може збільшуватися завдяки перенесенню самих комах повітряними потоками. Зокрема,

попелиці здатні переміщуватися на значні відстані, що сприяє поширенню інфекції за межі первинного осередку.

Вектори фітовірусів належать до різних систематичних груп. Серед членистоногих особливе значення мають представники класів *Insecta* (комахи) та *Arachnida* (павукоподібні). Серед комах важливими переносниками є попелиці, цикадки та білокрилки. Їхні морфологічні та фізіологічні особливості, зокрема будова ротового апарату, забезпечують ефективну взаємодію з рослинними тканинами та сприяють перенесенню вірусних частинок.

Попелиці мають колюче-сисний ротовий апарат, за допомогою якого вони проникають у тканини рослини та живляться її соками. Під час живлення на інфікованій рослині вірус може потрапляти до організму комахи, а під час наступного живлення на здоровій рослині – передаватися новому хазяїну. Залежно від властивостей конкретного вірусу механізми його передачі вектором можуть відрізнятися.

До видів попелиць, які можуть бути переносниками різних фітовірусів, належать, зокрема: Sitobion avenae (велика злакова попелиця), Rhopalosiphum padi (черемхова попелиця), Rhopalosiphum maidis (кукурудзяна, або соргова, попелиця), Schizaphis graminum (звичайна злакова попелиця), Myzus persicae (зелена персикова попелиця), Aphis fabae (бурякова попелиця), Macrosiphum euphorbiae (велика картопляна попелиця), Phorodon humuli (хмелева попелиця), Brachycaudus helichrysi (геліхризова попелиця) та інші види.

Таким чином, поєднання рослин-резерваторів і біологічних векторів формує важливу ланку природного циклу багатьох фітовірусів. Наявність джерел інфекції та відповідних переносників визначає можливість циркуляції вірусів у природних і агроекосистемах та їхнього переходу від диких рослин до сільськогосподарських культур.

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

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

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

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

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

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

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

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

Крім вірусів, які переносяться або нематодами з родів *Longidorus*, *Xiphinema* і *Trichodorus*, або зооспорами ґрунтових грибів з родів *Polymixa* і *Olpidium*, існує група ґрунтових вірусів, представники якої «вільними» віріонами зустрічаються в грунті і воді та можуть переходити без допомоги векторів від інфікованих до здорових рослин, хоча деякі з них можуть переноситися нематодами або грибами. На сьогодні відомі дві групи вірусів рослин, що можуть передаватися нематодами. Представники групи *Tobravirus* мають паличкоподібні віріони та розповсюджуються нематодами родини *Trichodoridae* родів *Tricodorus* та *Paratrichodorus*.

Потрапляння фітовірусів у ґрунт може відбуватися різними шляхами. За прямого надходження джерелом вірусної контамінації є рослинні рештки – листки, стебла, корені та інші частини інфікованих рослин, що залишаються в ґрунті після їх відмирання або механічного пошкодження. Додатковим джерелом може бути виділення вірусних частинок кореневою системою живих інфікованих рослин.

Непряме надходження вірусів у ґрунт можливе разом із вірусовмісними виділеннями та екскрементами організмів, а також унаслідок переміщення вірусних частинок із забрудненого ґрунту поверхневими або дощовими водами. Таким чином, ґрунт може виступати не лише середовищем накопичення вірусу, а й важливою ланкою його циркуляції в природних екосистемах.

Джерелом зараження раніше вільного від вірусів ґрунту можуть бути навіть поодинокі інфіковані рослини, здатні тривалий час виділяти вірусні частинки через корені. Для деяких фітовірусів ґрунтовий шлях передачі має особливе значення. Такі віруси можуть уражати переважно кореневу

систему рослин або окремі підземні чи надземні органи, що ускладнює виявлення інфекції за зовнішніми симптомами.

Прихований характер ґрунтової інфекції може призводити до недооцінювання реального поширення таких вірусів у природних угрупованнях. Тому під час фітовірусологічних досліджень важливо враховувати не лише стан рослини, а й можливу наявність збудника в ґрунті та інших компонентах навколишнього середовища.

Фітовіруси можуть зберігатися не тільки в ґрунті, а й у поверхневих водах, особливо в районах із інтенсивним землеробством. Здатність вірусу адсорбуватися на частинках ґрунту та тривалість збереження його інфекційних властивостей залежать від комплексу абіотичних і біотичних факторів. Важливе значення мають механічний склад і властивості ґрунту, його вологість, pH, температура, концентрація органічних речовин та інтенсивність мікробіологічних процесів.

За сприятливих умов окремі віруси можуть тривалий час зберігати інфекційність у ґрунтовому середовищі – від кількох тижнів до кількох місяців. Зараження рослин у таких випадках може відбуватися без безпосередньої участі біологічних переносників, хоча для деяких вірусів важливу роль у передачі через ґрунт відіграють ґрунтові нематоди та рухливі спори (зооспори) окремих грибів.

Передача вірусу з ґрунту або води до рослини може здійснюватися через кореневу систему, зокрема за контакту коренів із контамінованим середовищем. Потрапляння вірусів до водних об’єктів створює додаткові можливості для їхнього поширення. Зокрема, вірусні частинки, що знаходяться у воді струмків та інших поверхневих водотоків, можуть переміщуватися на значні відстані та потрапляти до нових ділянок.

Дослідження природних екосистем засвідчують можливість виявлення вірусів у ґрунті та воді, зокрема представників таких таксономічних груп, як *Potexvirus,*

Tombusvirus, Tobamovirus, Potyvirus та *Necrovirus*. Наявність вірусів у цих компонентах довкілля свідчить про важливу роль ґрунтово-водного середовища у збереженні та циркуляції окремих фітовірусів.

Таким чином, ґрунт і вода можуть бути природними резервуарами та шляхами передачі вірусів рослин, забезпечуючи їх збереження між сезонами, переміщення в межах екосистем і зараження нових рослин. Урахування цих шляхів поширення має важливе значення для моніторингу та профілактики вірусних захворювань сільськогосподарських культур.На високородючих грунтах ймовірність розповсюдження вірусних хвороб збільшується. На ступінь ураження, безперечно, впливає живлення рослин, пригнічуючи симптоми або роблячи їх більш чіткими. Інактивація вірусу проходить швидше у вологих, добре аерованих грунтах, ніж у сухих, щільних або заболочених.

Термін життя окремої рослини обмежений, тому необхідною умовою виживання віруса є перехід його від одної рослини до іншої. Джерелом інфекції може бути насіння або пилок, вегетативні частини рослини, бур'яни, комахи (у випадку персистентних вірусів), грунт. Передача вірусів за допомогою насіння представляє собою дуже ефективний спосіб ураження будь-якої культури на ранніх стадіях розвитку, так як на ділянці, де вирощується дана культура, з'являються хаотично розміщені осередки інфекції. Трансплантаційна передача вірусів може проходити за допомогою вегетативних частин рослини (пагонів, бульб, цибулин, вусиків), щепленням (привій, підвій). Механічний або контактний спосіб передачі віруса має особливо важливе практичне значення на ранніх етапах росту польових культур. В природніх умовах віруси можуть передаватися при контакті між собою, при застосуванні агротехнічних засобів. В останні роки велика кількість фітопатогенних вірусів, що не переносяться

векторами, була виявлена в грунтах, ґрунтових водах, ріках, озерах та в морі. Коли листя зараженої вірусом рослини торкається листя здорової рослини, краї листя і листові волоски можуть пошкоджуватися. В результаті цього з соком інфікованої рослини вірус може проникнути в травму здорової рослини і заразити її. Таке зараження наймовірніше в тих випадках, коли віруси присутні в соку у високих концентраціях, а рослини легко пошкоджуються і стають високочутливі до інфекції. Саме таким шляхом розповсюджується в агроценозах вірус мозаїки люцерни, причому найшвидше розповсюджуються ті штами вірусу, які досягають в заражених рослинах найвищих концентрацій. Вірус мозаїки люцерни передається від рослини до рослини також при контакті рослин під землею, швидше за все при зіткненні здорового коріння із зараженими. Проте слід зазначити, що розповсюдження вірусів за рахунок механічного контакту відбувається украй рідко.

Рослинні патогени можуть різними методами попадати в грунт. Найбільш ймовірним є проникненя вірусів з інфікованими рослинами або рослинними залишками, в яких віруси можуть прямим або опосередкованим шляхом попадати в грунт. Прямий шлях полягає в тому, що вірусінфіковані рослинні залишки залишаються в грунті (корінці) або з залишками рослин попадають в грунт (паростки, вегетативні органи). При цьому слід звернути увагу на те, що віруси, які містяться в рослинних залишках частіше довше залишаються інфекційними, ніж віруси, які знаходяться в грунті у вигляді вільних віріонів. Вірусінфіковані рослини, які вживають люди та тварини, що можуть проходити через шлунок без втрати інфекційності та контамінувати грунт через екскременти, представляють непрямий шлях контамінації грунту.

Поширення вірусів хребетних

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

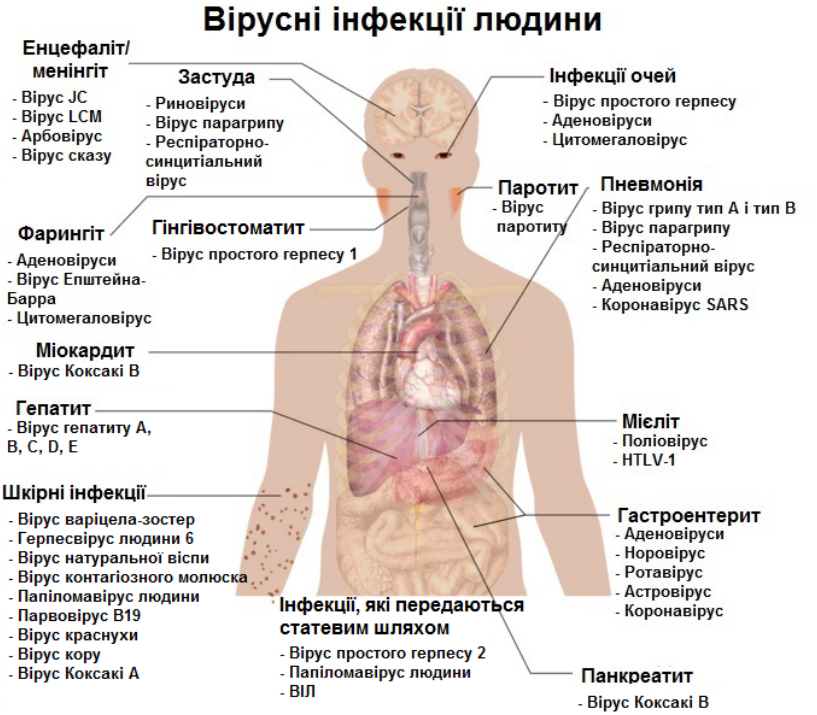


Рис.26. Основні типи вірусних інфекцій людини

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

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

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

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

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

Поширення вірусних інфекцій серед людини та тварин відбувається за допомогою різних механізмів і шляхів передачі. Вибір конкретного шляху залежить від біологічних властивостей вірусу, локалізації збудника в організмі, наявності відповідних факторів передачі та способу проникнення вірусу до нового хазяїна.

Парентеральний механізм пов'язаний із циркуляцією вірусу в крові та його передачею разом із кров'ю або біологічними рідинами, що містять інфекційний агент. Можливими шляхами поширення є переливання інфікованої крові та використання контамінованих медичних інструментів. Окремі віруси можуть також передаватися під час статевих контактів, якщо збудник присутній у відповідних біологічних рідинах. Реалізація цього механізму значною мірою залежить від здатності вірусу тривалий час зберігати інфекційність поза організмом та проникати безпосередньо в кровотік або тканини.

Аліментарний (ентеральний) механізм. За аліментарного механізму вірус потрапляє до організму через слизові оболонки травного тракту. Найпоширенішим варіантом є *фекально-оральний шлях* передачі, за якого

вірус із виділеннями інфікованої людини або тварини потрапляє до навколишнього середовища, а потім – до організму нового хазяїна через забруднену воду, харчові продукти або руки.

Для вірусів із таким механізмом передачі характерною є здатність зберігати інфекційні властивості під час проходження через зовнішнє середовище та травний тракт. Порушення санітарно-гігієнічних норм, недостатня якість води та забруднення харчових продуктів сприяють поширенню відповідних вірусних інфекцій.

Аерогенний механізм реалізується через слизові оболонки дихальних шляхів, які є вхідними воротами для багатьох респіраторних вірусів. Передача збудника відбувається переважно *повітряно-крапельним* та *аерозольним шляхами* під час дихання, розмови, кашлю або чхання інфікованої особи.

Ефективність аерогенного поширення залежить від стійкості вірусу в повітряному середовищі, концентрації вірусних частинок, тривалості контакту та умов навколишнього середовища. Скупченість людей у приміщеннях може сприяти швидшій передачі респіраторних вірусів.

Контактний механізм передбачає проникнення вірусу через пошкоджені шкірні покриви або слизові оболонки безпосередньо під час контакту з інфікованою людиною, твариною або контамінованими предметами.

Для окремих вірусів можливе проникнення через пошкоджену шкіру разом із біологічними виділеннями. Наприклад, вірус сказу може потрапити в організм через ушкоджені ділянки шкіри або слизових оболонок унаслідок контакту із слиною інфікованої тварини. Таким чином, наявність ушкоджень шкіри може створювати умови для проникнення збудника до тканин.

Вертикальний механізм характеризується передачею вірусу від матері до дитини. Зараження може відбуватися

ще під час внутрішньоутробного розвитку, під час пологів або, для окремих вірусів, у післяпологовий період.

Внутрішньоутробна передача може здійснюватися трансплацентарно, коли збудник долає плацентарний бар'єр і потрапляє до організму плода. Інфікування також можливе внаслідок контакту плода з інфікованими навколоплідними водами або оболонками. Під час пологів зараження може відбутися при проходженні дитини через родові шляхи матері.

Вертикальна передача має особливе значення для вірусних інфекцій, здатних спричиняти ураження плода або новонародженого. Наслідки такого інфікування залежать від виду вірусу, терміну вагітності, на якому відбулося зараження, та стану імунної системи матері й дитини.

Отже, механізм передачі визначається сукупністю біологічних властивостей вірусу та умов його циркуляції в популяції. Знання основних механізмів передачі має важливе значення для розуміння закономірностей поширення вірусних інфекцій і розроблення заходів їх профілактики.

Вірусні інфекції характеризуються різноманітними варіантами взаємодії вірусу з клітиною та організмом-хазяїном. Залежно від способу існування вірусного геному, результату його репродукції та тривалості перебігу інфекційного процесу виділяють автономний та інтеграційний типи інфекції, продуктивну й абортивну інфекцію, а також гостру, хронічну, латентну та персистуючу форми.

Автономна вірусна інфекція характеризується тим, що вірусний геном функціонує та реплікується в клітині незалежно від реплікації клітинного геному. У процесі інфекції відбувається синтез вірусних нуклеїнових кислот і білків, формування нових вірусних частинок та їх вихід із клітини.

Інтеграційна вірусна інфекція виникає тоді, коли вірусний генетичний матеріал повністю або частково включається до геному клітини-хазяїна. Інтегрований вірусний геном може реплікуватися разом із клітинною ДНК та передаватися дочірнім клітинам під час їх поділу. Такий стан може тривалий час не супроводжуватися утворенням повноцінних інфекційних віріонів.

Продуктивна інфекція – це форма вірусної інфекції, за якої в інфікованій клітині відбувається повний або достатньо завершений цикл репродукції з утворенням нових інфекційних вірусних частинок.

Абортивна інфекція характеризується незавершеним циклом репродукції вірусу. У клітині можуть синтезуватися окремі вірусні компоненти, проте повноцінне формування інфекційного потомства не відбувається або його кількість є недостатньою для ефективного поширення інфекції. Причиною цього можуть бути властивості самого вірусу, особливості клітини-хазяїна або несприятливі умови для завершення вірусного циклу.

Гостра вірусна інфекція характеризується швидким розвитком інфекційного процесу та відносно коротким періодом репродукції вірусу. Після завершення циклу інфекції вірус може бути елімінований з організму, а інфікована клітина – загинути або відновити свою функціональну активність.

Залежно від впливу вірусу на життєздатність клітини гостру інфекцію поділяють на цитолітичну та нецитолітичну.

Цитолітична (цитоцидна) інфекція завершується руйнуванням і загибеллю інфікованої клітини. Репродукція вірусу супроводжується вираженими структурними та функціональними порушеннями, які можуть проявлятися характерним цитопатичним ефектом.

Нецитолітична (нецитоцидна) інфекція не спричиняє негайного руйнування клітини. Інфікована клітина може

зберігати життєздатність і певний час продукувати вірусні частинки або окремі вірусні компоненти.

Хронічна вірусна інфекція характеризується тривалим збереженням вірусу в організмі та його періодичною або постійною репродукцією. Інфіковані клітини можуть продовжувати функціонувати та тривалий час синтезувати вірусні компоненти або продукувати інфекційні вірусні частинки. Такий перебіг може бути наслідком здатності вірусу уникати або модифікувати імунну відповідь хазяїна.

Латентна інфекція – це форма вірусної інфекції, за якої вірус зберігається в організмі, але його активна репродукція та клінічні прояви відсутні або мінімальні. Генетичний матеріал вірусу може перебувати в клітині в інтегрованому стані або існувати як окремий генетичний елемент – епісома. За певних умов, наприклад під впливом змін імунного статусу чи інших факторів, латентна інфекція може реактивуватися.

Персистуюча інфекція характеризується тривалим збереженням вірусу в організмі за умов постійної або періодичної його репродукції. На відміну від латентної інфекції, при персистенції вірус може тривалий час залишатися реплікативно активним. При цьому інтенсивність утворення вірусних частинок може бути невисокою, а пошкодження клітин – недостатніми для швидкої загибелі тканин.

Персистенція може забезпечуватися різними механізмами: обмеженою репродукцією вірусу, зміною експресії вірусних генів, локалізацією збудника в клітинах, менш доступних для імунного контролю, або здатністю вірусу протидіяти механізмам противірусного захисту.

Основні варіанти прихованого перебігу вірусних інфекцій

Приховане збереження вірусного агента в організмі може мати різні форми. До прикладів інфекцій, які можуть характеризуватися тривалим або прихованим перебігом, належать:

Хронічні інфекції: інфекції, спричинені вірусом гепатиту В, вірусом гепатиту С, ВІЛ та деякі випадки цитомегаловірусної інфекції.

Латентні інфекції: інфекції, спричинені вірусом простого герпесу (ВПГ) та вірусом варіцела-зостер (ВЗВ), для яких характерне збереження вірусного геному в організмі з можливістю подальшої реактивації. Латентний стан також може бути властивим окремим аденовірусним та ретровірусним інфекціям.

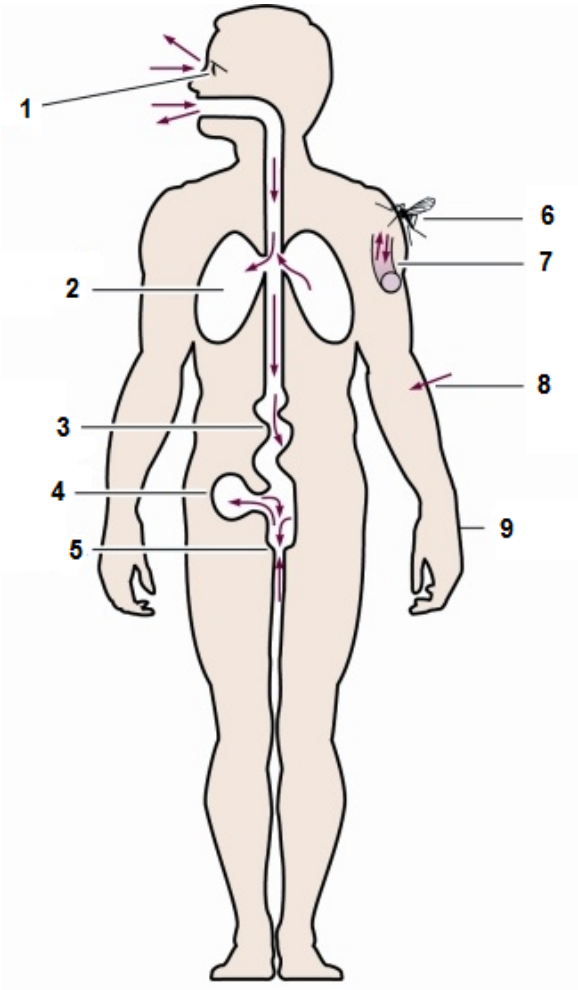
Повільні інфекції: характеризуються тривалим інкубаційним періодом і поступовим розвитком патологічного процесу. До цієї групи належать, зокрема, деякі пріонні захворювання, такі як куру та хвороба Крейтцфельдта-Якоба, а також окремі повільні вірусні інфекції.

Отже, характер вірусної інфекції визначається не лише здатністю вірусу до репродукції, а й особливостями його взаємодії з клітиною та імунною системою хазяїна. Розуміння відмінностей між продуктивною, абортивною, гострою, хронічною, латентною та персистуючою інфекціями має важливе значення для оцінювання механізмів патогенезу, тривалості інфекційного процесу та можливості повторної активації вірусу.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 6

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

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



1.2. Заповніть таблицю.

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

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

Механізм	*Віруси*	*Родина*

Завдання 2. Характер вірусної інфекції визначається особливостями відтворення вірусного геному.

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

Тип згідно класифікації Балтимора	***Тип геному***	***Родина***	***Типовий представник***

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

Тип інфекції	***Віруси***	***Родина***

Завдання 3. Мутації у вірусах і в організмах-господарях та зміни клімату призвели до зростання частки «нових вірусів»

3.1. Заповніть таблицю, відзначаючи місце спалахів «нових вірусних інфекцій» та зазначаючи назву віруса та його систематичне положення.

Регіон	***Вірус***	***Родина***

Завдання 4. Дайте визначення основним поняттям і термінам:

Горизонтальне поширення……

……

Вертикальне поширення.……

……

Вектор……

……

Циркуляційне поширення……

……

Нециркуляційне поширення..……

……

Білки руху……

……

Пермісивні клітини……

……

Арбовірусні інфекції……

……

Автономна вірусна інфекція……

……

Інтеграційна вірусна інфекція……..

……

Продуктивна інфекція.……

……

Абортивна інфекція……

……

Цитоцидна інфекція……..

……

Латентна інфекція..……

……

Персистуюча інфекція……

……

Класифікація Балтимора……

……

ВИСНОВКИ

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____ .

КОНТРОЛЬНІ ЗАВДАННЯ ТА ПИТАННЯ

1. Визначення механізму передачі вірусної інфекції.
2. Основні механізми передачі вірусів.
3. Особливості аерогенного механізму передачі вірусів.
4. Характеристика аліментарного механізму передачі вірусів.
5. Фекально-оральний шлях передачі вірусів.
6. Особливості контактного механізму передачі вірусів.
7. Характеристика гемоконтактного механізму передачі вірусів.
8. Вертикальна передача вірусів та її основні шляхи.
9. Основні шляхи поширення вірусів рослин у природі.
10. Роль рослин-резервуарів у збереженні та поширенні фітовірусів.
11. Значення бур'янів у природній циркуляції вірусів рослин.
12. Роль попелиць у передачі та поширенні вірусів рослин.
13. Основні шляхи потрапляння фітовірусів у ґрунт.
14. Значення ґрунту та води у поширенні вірусів рослин.
15. Характеристика автономного типу вірусної інфекції.
16. Особливості інтеграційного типу вірусної інфекції.
17. Характеристика продуктивної вірусної інфекції.
18. Особливості абортивної вірусної інфекції.
19. Характеристика гострої вірусної інфекції.
20. Відмінності між цитолітичною та нецитолітичною вірусними інфекціями.
21. Характеристика латентної вірусної інфекції.Проведіть порівняльний аналіз продуктивної та абортивної вірусних інфекцій.
22. Порівняйте гостру, хронічну, латентну та персистуючу форми вірусної інфекції.
23. Проаналізуйте роль рослин-резерваторів, векторів, ґрунту та води у природній циркуляції фітовірусів.

РОЗДІЛ 2.
БІОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ ВІРУСІВ ТА ЇЇ ПРАКТИЧНІ НАСЛІДКИ

ТЕМА 2.1. ПРОТИВІРУСНИЙ ІМУНІТЕТ. МЕТОДИ ДІАГНОСТИКИ ВІРУСНИХ ІНФЕКЦІЙ

Мета: сформувати знання про сучасні підходи та методи лабораторної діагностики вірусних інфекцій, їх принципи, можливості та практичне застосування.

Компетенції: уміти оцінювати й інтерпретувати результати лабораторних досліджень вірусних інфекцій, отриманих із застосуванням серологічних та молекулярно-генетичних методів, а також визначати їх діагностичне значення**.**

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

У процесі еволюції в організмів сформувалася багаторівнева система імунного захисту, яка забезпечує розпізнавання та нейтралізацію широкого спектра вірусних збудників. Імунна відповідь на вірусну інфекцію має низку характерних особливостей, пов’язаних зі специфікою взаємодії вірусів із клітинами та компонентами імунної системи.

Основними особливостями противірусної імунної відповіді є:

1. Раннє залучення системи інтерферону та природних кілерів. На початкових етапах проникнення вірусу в організм важливу роль відіграють інтерферони та натуральні (природні) кілери. Вони забезпечують швидку неспецифічну відповідь ще до формування повноцінної специфічної імунної реакції.

2.Вірусні антигени не завжди забезпечують достатню стимуляцію В-лімфоцитів без участі інших клітин імунної системи. Для їх повноцінної активації, проліферації та

диференціації важливе значення мають Т-хелпери. У представленні та розпізнаванні вірусних антигенів також беруть участь макрофаги та інші антигенпрезентувальні клітини.

Серологічні методи становлять важливу складову лабораторної діагностики вірусних інфекцій, оскільки дають змогу виявляти специфічні антитіла, що формуються у відповідь на проникнення вірусного антигену. Після первинного інфікування спочатку з'являються антитіла класу IgM, а згодом відбувається підвищення рівня специфічних IgG. При повторному інфікуванні або реактивації інфекції характерним є швидше та інтенсивніше наростання титру IgG, тоді як рівень IgM може залишатися незміненим або підвищуватися незначно.

Для серологічної діагностики використовують різні лабораторні методи, зокрема імуноферментний аналіз (ІФА), радіоімунний аналіз (РІА), реакцію зв'язування комплементу (РЗК) та інші серологічні реакції. Залежно від методики можна визначати окремі класи антитіл або загальний рівень специфічних імуноглобулінів.

Діагностична цінність серологічного тесту визначається його чутливістю, специфічністю та відтворюваністю, а також властивостями антигену, використаного в тест-системі. Застосування рекомбінантних білків і синтетичних пептидних антигенів у багатьох випадках дає змогу підвищити специфічність дослідження порівняно з використанням цільних або інактивованих вірусних частинок.

Для підтвердження інфікування конкретним вірусом та його ідентифікації можуть застосовуватися реакція нейтралізації, реакція гальмування гемадсорбції, реакція імунофлуоресценції, а також сучасні молекулярно-генетичні методи, спрямовані на безпосереднє виявлення вірусного генетичного матеріалу. Поєднання серологічних,

імунологічних і молекулярних методів підвищує достовірність лабораторної діагностики та дає змогу комплексно оцінити характер вірусної інфекції.

Критерії для діагностики первинної інфекції:

1. Динамічне підвищення титру специфічних IgG або загального рівня антитіл.

Первинну інфекцію можна підтвердити за умови суттєвого зростання рівня специфічних антитіл у парних сироватках, отриманих у гострий період захворювання та під час одужання. Значущість такого підвищення залежить від застосованого серологічного методу. Наприклад, при використанні реакції зв'язування комплементу діагностично важливим зазвичай вважають чотириразове або більше підвищення титру антитіл. Водночас цей критерій має ретроспективний характер, оскільки друга проба сироватки береться вже на етапі одужання, коли клінічні прояви інфекції можуть зникнути.

2. Виявлення специфічних антитіл класу IgM.

Наявність IgM може свідчити про недавнє первинне інфікування та використовуватися для ранньої серологічної діагностики. Для їх визначення застосовують, зокрема, ІФА, РІА та імунофлуоресцентні методи. Водночас інтерпретація результатів потребує обережності, оскільки на них можуть впливати неспецифічні реакції, зокрема ревматоїдний фактор, повторне інфікування, а також тривале збереження IgM після перенесеної інфекції.

3. Сероконверсія.

Сероконверсією називають зміну серологічного статусу від відсутності специфічних антитіл до їх виявлення. Вона є важливою ознакою нещодавнього інфікування та встановлюється шляхом дослідження парних зразків сироватки. Такий критерій може застосовуватися, наприклад, при лабораторному підтвердженні деяких вірусних інфекцій після відомого контакту з джерелом інфекції.

4. *Одноразове виявлення високого титру IgG або загальних антитіл.*

Ізольоване визначення високого рівня специфічних IgG має обмежене діагностичне значення. Без результатів попередніх досліджень або даних про динаміку титру антитіл складно встановити, коли саме відбулося інфікування. Тому для підтвердження первинної інфекції перевагу надають дослідженню парних сироваток, визначенню IgM та встановленню сероконверсії.

Критерії для діагностування реінфікування чи реактивації

Диференціація первинної інфекції, реінфекції та реактивації за серологічними показниками може бути складною, оскільки імунна відповідь при цих станах має певні спільні ознаки. У більшості клінічних ситуацій таке розмежування не є принципово необхідним, однак у деяких випадках воно має важливе діагностичне та прогностичне значення. Наприклад, при інфікуванні вірусом краснухи на ранніх термінах вагітності первинна інфекція становить значно більший ризик для плода, ніж повторне інфікування.

Основними серологічними ознаками реінфекції або реактивації можуть бути:

1. Значне та швидке підвищення титру специфічних IgG або загальних антитіл. При повторному контакті з вірусом імунна система реагує швидше, тому рівень антитіл зростає інтенсивніше, ніж під час первинної інфекції.

2. Низький рівень або відсутність IgM. При реінфекції специфічні IgM часто не визначаються або виявляються лише в невисокій концентрації, що пов’язано з характером вторинної імунної відповіді.

3. Наявність раніше сформованих IgG. Виявлення специфічних IgG до появи ознак повторної інфекції свідчить про попередній контакт організму з відповідним вірусом.

4. Динаміка серологічних показників. Для достовірнішої оцінки доцільно порівнювати результати дослідження парних сироваток та враховувати зміни рівня специфічних антитіл у часі.

Отже, для реінфекції або реактивації більш характерним є швидке наростання рівня IgG на тлі вже сформованого імунітету, тоді як виражена IgM-відповідь частіше асоціюється з первинним інфікуванням..

При реінфекції IgM може бути відсутнім або бути присутнім на низькому рівні.

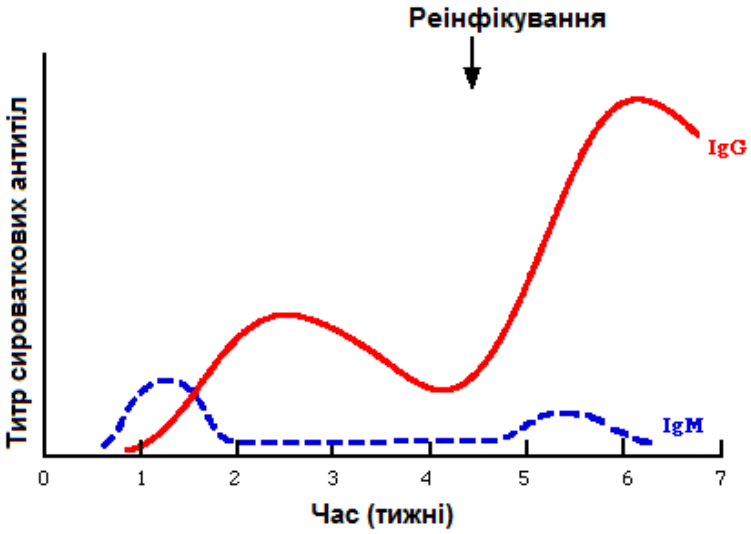


Рис.27. Серологічні події після первинної інфекції та реінфекції.

Обмеження серологічних методів. Діагностична цінність серологічного дослідження значною мірою залежить від особливостей конкретного вірусу, характеру імунної відповіді та часу проведення аналізу. Виявлення специфічних антитіл не завжди дає змогу своєчасно встановити факт активної інфекції.

1. *Вірусні інфекції з ранньою появою антитіл*. При деяких інфекціях, зокрема краснусі та гепатиті А, формування специфічної гуморальної відповіді відбувається приблизно одночасно з появою клінічних проявів. Тому виявлення специфічних IgM або суттєвого підвищення титру IgG може свідчити про активний інфекційний процес.
2. *Інфекції з відстроченим формуванням антитіл*. При багатьох респіраторних та шлунково-кишкових вірусних інфекціях клінічні прояви виникають раніше, ніж формується достатній рівень специфічних антитіл. У таких випадках серологічне дослідження часто має переважно ретроспективне значення і не завжди придатне для своєчасного підтвердження захворювання.
3. *Інфекції з тривалим латентним періодом*. Для окремих вірусів клінічні прояви можуть виникати через значний проміжок часу після формування серологічної відповіді. Прикладом можуть бути ВІЛ-інфекція та сказ. У таких ситуаціях сам факт виявлення специфічних антитіл може мати важливе діагностичне значення, але його інтерпретація повинна враховувати особливості конкретної інфекції та застосованого тесту.

Основні обмеження серологічної діагностики

1. *Тривалість проведення дослідження*. Встановлення діагнозу за результатами парних сироваток потребує певного проміжку часу між забором зразків у гострій фазі та в періоді одужання.
2. *Недостатня імуногенність локальних інфекцій*. Деякі локалізовані вірусні інфекції можуть не супроводжуватися достатньо вираженою системною гуморальною відповіддю, що знижує інформативність серологічних тестів.
3. *Антигенна перехресна реактивність*. Споріднені віруси можуть мати спільні або подібні антигенні структури, через що антитіла до одного збудника здатні реагувати з

антигенами іншого. Це може призводити до хибнопозитивних результатів.

4. *Ослаблена імунна відповідь*. У пацієнтів з імунодефіцитними станами утворення специфічних антитіл може бути зниженим або відсутнім. Тому негативний серологічний результат не завжди виключає наявність інфекції.
5. *Неспецифічні реакції*. За окремих захворювань, зокрема інфекційного мононуклеозу та деяких системних захворювань сполучної тканини, можливе виникнення неспецифічних реакцій, які ускладнюють інтерпретацію результатів і можуть спричиняти хибнопозитивні результати.
6. *Вплив переливання крові та її компонентів*. У пацієнтів, які нещодавно отримували кров або препарати крові, виявлення антитіл може бути пов'язане з їх пасивним надходженням із донорським матеріалом, що також може ускладнювати правильну оцінку серологічного статусу.

Отже, серологічні методи доцільно інтерпретувати з урахуванням термінів розвитку інфекції, особливостей імунної відповіді, клінічних даних та специфічності тест-системи. За необхідності серологічну діагностику доповнюють методами безпосереднього виявлення вірусного антигену або генетичного матеріалу.

Антитіла у цереброспінальній рідині (ЦСР). У здорової людини в цереброспінальній рідині антитіла або відсутні, або містяться у дуже низькій концентрації. При вірусному менінгіті чи енцефаліті в ЦСР можуть синтезуватися специфічні антитіла проти вірусу лімфоцитами, які перебувають у спинномозковій рідині.

Виявлення антитіл у ЦСР вважається значущим, якщо співвідношення титру антитіл у сироватці крові до їх титру в ЦСР становить менше 100. Однак достовірність такого показника залежить від збереження цілісності гемато-енцефалічного бар'єру.

Проблема полягає в тому, що при багатьох випадках менінгіту та енцефаліту гематоенцефалічний бар'єр може пошкоджуватися, унаслідок чого антитіла із сироватки крові проникають у ЦСР. Аналогічна ситуація можлива при травматичному проведенні спинномозкової пункції, коли цереброспінальна рідина може містити домішки крові.

Для оцінювання цілісності гематоенцефалічного бар'єру можна використовувати сурогатні антитіла, які наявні у більшості людей, наприклад антитіла до вірусу кору, оскільки значна частина населення була вакцинована. Якщо гематоенцефалічний бар'єр не пошкоджений, у ЦСР має визначатися дуже низький рівень або повна відсутність антитіл до вірусу кору.

Радіоімунологічний аналіз (РІА) належить до групи методів зв'язування (*binding assays*), принцип яких ґрунтується на специфічній взаємодії антигену з антитілом. Метод дає змогу виявляти та кількісно визначати дуже низькі концентрації різних речовин, зокрема вірусів, мікроорганізмів, антитіл, лікарських препаратів, гормонів і ферментів. РІА був розроблений R. Yalow та S. Berson у 1960 році для кількісного визначення інсуліну в плазмі крові людини. За цю розробку вчені були удостоєні Нобелівської премії з фізіології та медицини у 1977 році.

Завдяки високій чутливості та специфічності РІА широко застосовувався у теоретичній і практичній вірусології. Його використовували для діагностики вірусних інфекцій, виявлення вірусів у досліджуваних матеріалах, визначення кількісних і якісних характеристик антитіл, дослідження антигенної структури вірусів, а також вивчення їхніх імунохімічних і молекулярно-біологічних властивостей. Метод застосовували, зокрема, під час досліджень вірусів грипу, поліомієліту, герпесу, сказу, віспавакцини, альфа- та онковірусів людини й тварин.

У вірусології РІА може використовуватися для кількісного визначення відомого радіоактивно міченого антигену після його взаємодії з відповідними антитілами, які попередньо контактували з невідомим немміченим антигеном. Якщо досліджуваний антиген має антигенну спорідненість із міченим антигеном, він зв'язується з відповідними антитілами та блокує частину їхніх активних центрів. Унаслідок цього доданий згодом мічений антиген зв'язується з антитілами лише частково або залишається у вільному стані. Кількість незв'язаного або зв'язаного міченого антигену визначають за допомогою радіометричного вимірювання.

Ступінь конкуренції між відомим міченим і невідомим немміченим антигенами залежить від подібності їхніх антигенних властивостей. При цьому кількість міченого антигену, що утворює імунний комплекс з антитілами, обернено пропорційна кількості немміченого антигену, який уже зв'язався з антитілами досліджуваного зразка. Такий підхід називають прямим конкурентним РІА.

Одним із варіантів методу є твердофазний РІА, за якого антиген або антитіла, залежно від мети дослідження, фіксують на поверхні твердого носія. Як тверду фазу можуть використовувати різні полімерні матеріали, зокрема сефадекс, целюлозу, похідні полістиролу та пластикові поверхні лабораторного посуду.

Для виявлення вірусу в досліджуваному матеріалі, наприклад у секреті носової порожнини, на твердому носії іммобілізують специфічні антитіла. При цьому антитіла повинні зберігати здатність вибірково зв'язувати відповідний вірусний антиген. Умови іммобілізації підбирають з урахуванням властивостей конкретного носія.

Твердофазний варіант РІА спрощує відокремлення утвореного на поверхні носія імунного комплексу від міченого вірусу або антигену, який залишився незв'язаним у рідкій фазі. Подальше радіометричне визначення дає

змогу оцінити кількість міченого компонента та, відповідно, визначити концентрацію досліджуваного антигену.

Імуноферментний аналіз (ІФА) – це імунохімічний метод, основу якого становить специфічна взаємодія антигену з відповідним антитілом із формуванням комплексу антиген–антитіло. Для виявлення такого комплексу застосовують кон'югати антигенів, антитіл або обох компонентів, поєднані з ферментом. Наявність реакції визначають за ферментативною зміною субстрату, унаслідок чого утворюється забарвлений продукт, інтенсивність якого можна оцінити візуально або за допомогою спеціального приладу.

Нині ІФА широко застосовують для діагностики інфекційних захворювань людини, тварин і рослин, а також у галузях онкології, ендокринології та інших напрямів біомедицини.

До основних переваг ІФА належать:

- висока чутливість і специфічність;
- висока відтворюваність результатів;
- відносна простота проведення;
- доступність і стабільність реагентів;
- можливість адаптації та модифікації методики відповідно до завдань дослідження;
- швидкість отримання результатів;
- можливість автоматизації та одночасного аналізу великої кількості зразків.

Умовно процедуру ІФА можна поділити на три послідовні етапи:

1. Утворення специфічного імунного комплексу – взаємодія антигену з відповідним антитілом.

2. Приєднання ферментної мітки – введення до сформованого комплексу компонента, кон'югованого з ферментом.

3. Виявлення ферментної мітки – додавання відповідного субстрату та реєстрація забарвлення, що утворюється внаслідок ферментативної реакції.

Залежно від способу проведення ІФА поділяють на гомогенні та гетерогенні методи.

Гомогенні методи не передбачають попереднього розділення зв'язаних і вільних компонентів реакції. Їх використання можливе за умови, що активність мічених молекул у складі комплексу з антитілами істотно відрізняється від активності вільних мічених молекул.

Гетерогенні методи передбачають розділення мічених компонентів на дві фракції: ту, що зв'язалася з антитілами, та вільну. Після такого розділення визначають активність міченого компонента у зв'язаній фракції. До цієї групи належить твердофазний імуноферментний аналіз (ТІФА).

У ТІФА як тверду фазу найчастіше використовують 96-лункові полістиролові планшети, поверхня яких здатна адсорбувати різні макромолекули. Окрема лунка планшета використовується для проведення реакції з відповідним досліджуваним зразком, що дає змогу одночасно аналізувати значну кількість проб.

Основними складовими ТІФА є імуносорбент, імуноферментний кон'югат та досліджуваний матеріал. Імуносорбент являє собою антигени або антитіла, попередньо іммобілізовані на поверхні твердої фази відповідно до мети дослідження. Імуноферментний кон'югат – це антиген або антитіло, ковалентно поєднане з ферментом. Досліджуваним матеріалом можуть бути різні біологічні рідини.

Як антигенний матеріал використовують очищені природні антигени мікроорганізмів, а також їх штучно отримані аналоги – рекомбінантні білки та синтетичні пептиди.

Для проведення ІФА застосовують поліклональні та моноклональні антитіла. ***Поліклональні антитіла*** являють собою сукупність специфічних імуноглобулінів, отриманих із сироватки тварин. ***Моноклональні антитіла***

є однорідною популяцією антитіл із визначеною специфічністю, отриманих із використанням методів клітинної інженерії.

Імуноферментні кон'югати – це комплекси, у яких антиген або антитіло ковалентно поєднані з ферментом. Основою їх використання в ІФА є висока каталітична активність ферментів, завдяки якій навіть невелика кількість імунного комплексу може бути виявлена за зміною забарвлення субстрату.

Основними ферментами, які використовують як мітки, є:

- пероксидаза хрону – одна з найбільш поширених ферментних міток; містить вуглеводні компоненти, через які може здійснюватися її зв'язування з антитілами або антигенами;
- лужна фосфатаза – характеризується високою стабільністю, хоча є відносно дорогою;
- β-D-галактозидаза – використовується порівняно рідко;
- глюкозооксидаза – також застосовується обмежено.

Загалом ІФА включає три основні етапи: утворення специфічного комплексу антиген–антитіло, приєднання ферментної мітки та її подальше виявлення за допомогою відповідної фізико-хімічної реакції.

Перед проведенням ІФА необхідно підготувати компоненти дослідження. Це може включати отримання біологічного матеріалу з моноінфекцією, виділення та очищення вірусних препаратів, одержання антисироваток із високим титром специфічних антитіл, виділення імуноглобулінів класу IgG та їх подальше кон'югування з ферментом.

Залежно від принципу побудови реакції після іммобілізації антигену або антитіла на твердій фазі можуть використовуватися прямий, непрямий, конкурентний та сандвіч-варіанти ІФА.

Прямий ІФА

У прямому варіанті поверхню лунок мікропланшета покривають досліджуваним антигеном. Після інкубації та видалення незв'язаного матеріалу додають специфічні противірусні антитіла, з'єднані з ферментом. Після наступного відмивання вносять відповідний субстрат або хромоген. У результаті ферментативної реакції виникає забарвлення, інтенсивність якого прямо залежить від кількості антигену в досліджуваному зразку.

Непрямий ІФА

У непрямому методі ферментна мітка приєднана не безпосередньо до специфічних противірусних антитіл, а до антивидових антитіл, які розпізнають ці імуноглобуліни. Спочатку на твердій фазі формується комплекс антиген–специфічне антитіло, після чого до нього додають фермент-мічені антивидові антитіла. Виникнення забарвлення після додавання субстрату свідчить про наявність відповідного імунного комплексу.

Сандвіч-метод

У сандвіч-варіанті на твердій поверхні послідовно фіксують первинні специфічні антитіла, досліджуваний антиген та вторинні антитіла. Таким чином, антиген виявляється між двома антитілами, подібно до «сендвіча». У класичному варіанті ферментна мітка безпосередньо приєднана до вторинних антитіл. У модифікованому варіанті використовують додаткові антивидові імуноглобуліни, кон'юговані з ферментом.

За характером взаємодії компонентів ІФА умовно поділяють на неконкурентні (послідовні) та конкурентні методи.

При конкурентному гетерогенному ІФА мічений та немічений антигени одночасно конкурують за зв'язування з антитілами, іммобілізованими на твердій фазі. Після

завершення інкубації незв'язані компоненти видаляють шляхом відмивання, після чого додають субстрат для ферменту. За інтенсивністю отриманого сигналу оцінюють результат реакції.

Однією з основних переваг ІФА є висока чутливість, яка забезпечується використанням ферментних кон'югатів із високою каталітичною активністю, оптимізацією тривалості інкубації та ретельним дотриманням послідовності етапів реакції. Особливо ефективним є підхід, за якого антиген спочатку зв'язується з іммобілізованими на твердій фазі антитілами, а на наступному етапі взаємодіє з ферментміченими специфічними антитілами.

Імунофлюоресцентний метод. Імунофлюоресценція – це метод виявлення антигенів або антитіл, що ґрунтується на використанні антитіл, переважно імуноглобулінової фракції IgG, мічених флюорохромом. Таке антитіло специфічно взаємодіє з відповідним антигеном, утворюючи комплекс антиген–антитіло. Утворений комплекс виявляють за допомогою люмінесцентного мікроскопа в ультрафіолетовому випромінюванні, яке спричиняє світіння флюорохрому.

Залежно від принципу проведення розрізняють декілька варіантів реакції імунофлюоресценції: прямий, непрямий, сандвіч-метод, а також модифікацію непрямого методу із застосуванням комплементу.

Пряму імунофлюоресценцію використовують для дослідження клітинних антигенів, виявлення вірусів у заражених клітинах, а також для ідентифікації бактерій і рикетсій у мазках. Наприклад, для лабораторної діагностики сказу відбитки тканини мозку інфікованої тварини обробляють люмінесцентною антирабічною сироваткою. За позитивного результату в цитоплазмі нервових клітин виявляються яскраво-зелені флуоресцентні включення.

Більш широке застосування має непряма імуно-флюоресценція, яка передбачає виявлення сформованого комплексу антиген–антитіло за допомогою флюоресцентно міченої імунної сироватки, специфічної до IgG. Метод використовують не лише для виявлення антигенів, а й для визначення та титрування антитіл. Він застосовується, зокрема, у серологічній діагностиці герпесвірусних інфекцій, цитомегаловірусної інфекції та лихоманки Ласса.

При проведенні непрямої реакції досліджувану сироватку крові наносять на відповідний препарат та інкубують за температури 37 °С, забезпечуючи утворення специфічних імунних комплексів. Після видалення незв'язаних компонентів комплекси виявляють за допомогою флюоресцентно міченої сироватки проти імуноглобулінів людини.

Застосування мічених антитіл, специфічних до IgM або IgG, дає змогу розмежовувати ці класи антитіл і визначати характер імунної відповіді. Зокрема, виявлення IgM може свідчити про ранню фазу гуморальної відповіді.

Метод імунофлюоресценції широко застосовують не тільки у вірусології, а й у бактеріології, паразитології та імунопатології, зокрема для виявлення антитіл до тканинних антигенів.

Важливою перевагою імунофлюоресцентного аналізу порівняно з багатьма іншими методами є можливість безпосередньо визначати внутрішньоклітинну локалізацію антигену, що дає змогу оцінювати не лише його наявність, а й місце накопичення в клітині.

Реакція гемаглютинації. Реакція гемаглютинації (РГА) є одним із простих, швидких і доступних методів, які використовують у вірусологічних дослідженнях для виявлення вірусів, здатних аглютинувати еритроцити, а також для орієнтовного визначення їх концентрації (титру).

В основі РГА лежить здатність вірусних частинок взаємодіяти з рецепторами на поверхні еритроцитів і спричиняти їх аглютинацію. Специфічні антитіла при цьому безпосередньої участі в реакції не беруть. Гемаглютинуючі властивості вірусу зумовлені поверхневими білками – *гемаглютинінами*. У простих вірусів відповідні білки локалізовані в капсиді, а в оболонкових вірусів – переважно у складі глікопротеїнів суперкапсиду. Гемаглютиніни взаємодіють із глікопротеїнами мембрани еритроцитів, унаслідок чого окремі клітини з'єднуються між собою та формують великі агрегати.

За позитивної реакції еритроцити не утворюють компактного осаду, а розподіляються по поверхні дна лунки або пробірки у вигляді характерної тонкої плівки, що нагадує перевернуту парасольку. Такий результат свідчить про наявність гемаглютинуючого вірусу. За негативної реакції, коли гемаглютинуючий вірус відсутній, еритроцити осідають компактним утворенням у нижній частині лунки або пробірки.

Взаємодія вірусних частинок з еритроцитами може бути зворотною. У деяких випадках відбувається елюція – вивільнення вірусу з поверхні еритроцитів. Цей процес може бути пов'язаний із дією вірусного ферменту нейрамінідази, який порушує зв'язки між вірусними гемаглютинінами та рецепторами еритроцитів. Швидкість елюції залежить від температури, pH та іонного складу середовища. Здатність окремих вірусів до елюції, зокрема вірусу грипу, може використовуватися під час лабораторного отримання та очищення вірусного матеріалу.

Результати РГА залежать від виду вірусу, його штамових особливостей та типу еритроцитів, які використовують у дослідженні. Різні віруси характеризу-

ються неоднаковою спорідненістю до рецепторів еритроцитів різних видів тварин. Наприклад, для виявлення вірусу грипу можуть використовувати еритроцити курей, людини 0 (I) групи та морських свинок; для деяких вірусів енцефаліту – еритроцити гусей; для вірусу кору – еритроцити мавп. Окремі фітовіруси здатні аглютинувати еритроцити барана. Отже, вибір відповідного типу еритроцитів є важливою умовою правильної постановки реакції.

У лабораторній практиці часто застосовують еритроцити птахів, оскільки вони забезпечують швидке та добре помітне формування аглютинатів. Інтенсивність гемаглютинації також залежить від температури, pH та біологічних властивостей конкретного вірусу. Для різних вірусів оптимальні умови проведення реакції можуть відрізнятися. РГА зазвичай проводять в ізотонічних розчинах із близьким до фізіологічного значенням pH. Значні відхилення pH у кислий або лужний бік можуть знижувати або повністю втрачати гемаглютинуючу активність вірусу.

Для постановки РГА можуть використовуватися пробірки, планшети з лунками та спеціальні лабораторні пристрої. Досліджуваний вірусовмісний матеріал послідовно розводять, після чого до відповідних проб додають суспензію еритроцитів. Паралельно ставлять контроль, у якому еритроцити змішують із відповідним безвірусним ізотонічним розчином. Після інкубації за температурних умов, оптимальних для конкретного вірусу, оцінюють характер осаду еритроцитів.

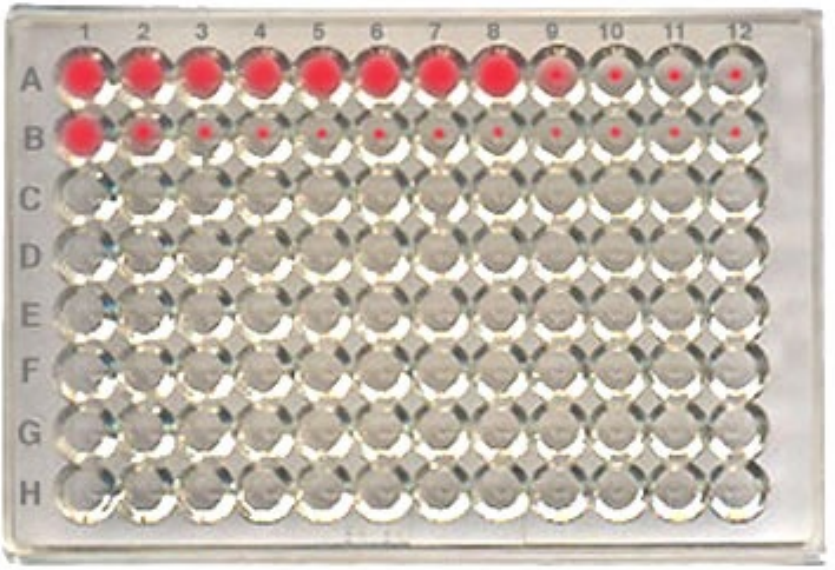


Рис.28. Реакція гемаглютинації

Інтерпретація результатів ґрунтується на порівнянні дослідних проб із контролем. Наявність характерного дифузного розподілу еритроцитів свідчить про гемаглютинацію, тоді як формування компактного осаду вказує на її відсутність. При дослідженні серії послідовних розведень вірусовмісного матеріалу за результатами РГА можна визначити його гемаглютинуючий титр – найбільше розведення зразка, за якого ще спостерігається позитивна реакція.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 7

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

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

Хід роботи

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

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

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

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

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

6. Струсніть планшет і залишіть при 37 ^{0}С приблизно на півгодини.

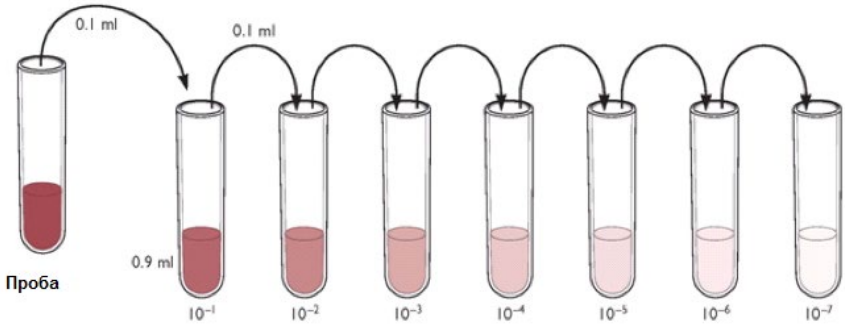


Рис.28. Спосіб розведення вірусного матеріалу

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

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

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

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

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

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

Занотуйте результати досліджень.

_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____

Завдання 2. Методи діагностики вірусних інфекцій ґрунтуються на особливостях відтворення вірусів.

2.1. Заповніть таблицю, зазначаючи найоптимальніші методи діагностики найпоширеніших вірусних інфекцій людини.

Інфекційний вірус	***Родина***	***Метод(и) діагностики***	***Компонент, що виявляється***

Завдання 3. Дайте визначення основним поняттям і термінам:

Електронна мікроскопія……

……

Імунна електронна мікроскопія……

……

Серологія……

……

Імуноферментний аналіз……

……

Радіоімуноаналіз……

……

Полімеразна ланцюгова реакція……

……

Агарозний гель-електрофорез……
……
Сероконверсія……
……
Гемаглютинація……
……
IgM……
……
IgG……
……
Реакція зв'язування комплементу……
……
Реакція гальмування гемаглютинації……
……
Реакція нейтралізації……
……
Радіальний гемоліз……
……
Вестерн блот……
……

ВИСНОВКИ

_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____.

КОНТРОЛЬНІ ЗАВДАННЯ ТА ПИТАННЯ

1. Принцип реакції гемаглютинації та її значення у вірусологічних дослідженнях.
2. Гемаглютинуючі властивості вірусів та їх біологічна основа.
3. Гемаглютинін вірусів: локалізація та функціональне значення.
4. Роль рецепторів поверхні еритроцитів у розвитку гемаглютинації.
5. Види еритроцитів, які використовують для проведення реакції гемаглютинації.
6. Умови, необхідні для отримання достовірних результатів реакції гемаглютинації.

7. Характеристика позитивного результату реакції гемаглютинації.
8. Характеристика негативного результату реакції гемаглютинації.
9. Поняття про гемаглютинуючий титр вірусу та принцип його визначення.
10. Проаналізуйте вплив виду еритроцитів, температури та pH середовища на інтенсивність гемаглютинації.
11. Встановіть відповідність між характером осаду еритроцитів і результатом реакції гемаглютинації.
12. Порівняйте реакцію гемаглютинації та гемадсорбції за принципом проведення, об’єктом дослідження та характером отриманого результату.

ТЕМА 2.2. ПРОТИВІРУСНА ХІМІОТЕРАПІЯ

Мета: сформувати уявлення про основні стратегії противірусної боротьби та молекулярні мішені, на які спрямована дія противірусних засобів.

Компетенції: знати основні біологічні та методичні труднощі, що виникають під час розроблення ефективних противірусних препаратів; уміти аналізувати окремі етапи вірусної репродукції та оцінювати перспективність їх використання як мішеней для противірусної терапії.

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Серед напрямів сучасної фармакології та розроблення лікарських засобів значне місце посідає створення противірусних препаратів (ПВП). На різних етапах доклінічних і клінічних досліджень перебуває велика кількість сполук із потенційною противірусною активністю, а фармацевтичний арсенал регулярно поповнюється новими засобами. Якщо до початку 1990-х років можливості етіотропного лікування вірусних інфекцій були обмеженими, а основний акцент робили на патогенетичній і симптоматичній терапії, то надалі дослідження у сфері створення противірусних засобів істотно активізувалися.

Залежно від хімічної структури, механізму дії, спектра противірусної активності та тривалості терапевтичного ефекту противірусні засоби традиційно поділяють на три основні групи:

1. Хіміотерапевтичні препарати, безпосередньо спрямовані на окремі етапи життєвого циклу вірусу.
2. Інтерферони та їх індуктори, які впливають на противірусні механізми клітини та імунну відповідь організму.
3. Імуномодулювальні засоби, дія яких спрямована на регуляцію імунних реакцій, що беруть участь у противірусному захисті.

Противірусна терапія ВІЛ-інфекції залежить від клінічної стадії, особливостей перебігу захворювання та наявності супутніх патологічних станів. Комплексний підхід передбачає застосування антиретровірусної терапії, засобів підтримки та корекції імунної відповіді, а також профілактику й лікування опортуністичних інфекцій.

Основною складовою лікування є етіотропна антиретровірусна терапія, метою якої є пригнічення реплікації ВІЛ, зниження вірусного навантаження, уповільнення прогресування імунодефіциту та зменшення ризику передачі вірусу.

Противірусні препарати, що застосовуються проти ВІЛ, спрямовані на ключові ферменти та етапи життєвого циклу вірусу. Серед основних мішеней виділяють зворотну транскриптазу, протеазу, інтегразу та процеси проникнення вірусу в клітину. Блокування цих етапів перешкоджає утворенню повноцінних вірусних частинок і знижує інтенсивність репродукції ВІЛ.

Сучасна антиретровірусна терапія ґрунтується на комбінованому застосуванні препаратів із різними механізмами дії. Поєднання декількох противірусних засобів дає змогу впливати на різні етапи репродуктивного циклу ВІЛ, забезпечувати ефективніше пригнічення вірусної реплікації та зменшувати ймовірність формування лікарської резистентності.

До основних груп антиретровірусних препаратів належать:

- нуклеозидні та нуклеотидні інгібітори зворотної транскриптази;
- ненуклеозидні інгібітори зворотної транскриптази;
- інгібітори протеази;
- інгібітори інтегрази;
- інгібітори проникнення та прикріплення вірусу до клітини.

Комбінована антиретровірусна терапія забезпечує значне зниження вірусного навантаження, сприяє відновленню та підтриманню функції імунної системи, зменшує ризик розвитку опортуністичних інфекцій і покращує довгостроковий прогноз. Важливою перевагою комбінованого підходу є також зниження ймовірності виникнення вірусних варіантів, стійких до окремих препаратів.

Отже, ефективність сучасної противірусної терапії значною мірою визначається правильним вибором молекулярних мішеней вірусу та поєднанням препаратів, які впливають на різні етапи його репродукції. Це є одним із ключових принципів розроблення та вдосконалення противірусних засобів.

Грип та інші ГРВІ. Для профілактики та лікування грипу й інших ГРВІ використовують широкий спектр засобів, серед яких вакцинні препарати, етіотропні противірусні лікарські засоби, специфічні імуноглобуліни, інтерферони та їх індуктори. Антибактеріальні препарати застосовують переважно для профілактики й терапії бактеріальних ускладнень, які можуть виникати на тлі вірусної інфекції.

Особливе значення мають етіотропні противірусні препарати, оскільки їх дія спрямована безпосередньо на вірус або окремі етапи його репродуктивного циклу. Механізм дії таких засобів доцільно розглядати з урахуванням того, яку саме стадію життєвого циклу вірусу вони блокують.

Серед противірусних хіміопрепаратів історично виділяли дві основні групи: блокатори М2-іонних каналів (амантадин, ремантадин) та інгібітори нейрамінідази (занамівір, осельтамівір). Препарати цих груп впливають на різні етапи репродукції вірусу грипу. Водночас застосування блокаторів М2-каналів нині має суттєві обмеження через поширення резистентних штамів вірусу грипу А.

Амантадин і ремантадин належать до ранніх представників специфічних противірусних засобів. Їх дія пов'язана з блокуванням М2-каналу вірусу грипу А, унаслідок чого порушуються процеси проникнення вірусного геному в клітину та подальшої репродукції вірусу. Через значне поширення резистентності ці препарати втратили колишнє клінічне значення.

Окрему групу становлять препарати широкого спектра противірусної активності, зокрема рибавірин. Це синтетичний аналог нуклеозидів, який після проникнення в клітину піддається фосфорилюванню з утворенням активних метаболітів. Рибавірин впливає на низку внутрішньоклітинних метаболічних процесів і може пригнічувати репродукцію деяких РНК- та ДНК-вмісних вірусів. Його застосування обмежується особливостями показань, побічними ефектами та токсичністю.

До противірусних засобів, що в різні періоди досліджувалися або застосовувалися при грипі та інших вірусних інфекціях, належать також арбідол, адапромін, дейтифорин та інші сполуки. Їх противірусна активність пов'язана з впливом на окремі етапи репродукції вірусу, а для деяких препаратів додатково описували інтерфероніндукуючі або імуномодулюючі властивості. Значна частина таких засобів має переважно історичне або обмежене клінічне значення.

Важливим етапом розвитку противірусної терапії грипу стало створення інгібіторів нейрамінідази, зокрема занамівіру та осельтамівіру. Нейрамінідаза бере участь у вивільненні новоутворених вірусних частинок із поверхні інфікованих клітин. Її блокування перешкоджає ефективному поширенню вірусу в організмі та обмежує подальше інфікування клітин. Ефективність цих препаратів найбільша за умови раннього початку терапії.

Окремий напрям противірусної хіміотерапії становлять інгібітори протеолітичного дозрівання вірусних білків.

Представники цієї групи впливають на процеси протеолітичного розщеплення вірусних поліпептидів, необхідного для формування функціонально активних вірусних білків. До таких сполук відносили апротинін, парааміометилбензойну кислоту, амбен та інші препарати.

У різні періоди досліджувалися й інші перспективні противірусні сполуки, спрямовані на окремі ланки репродуктивного циклу вірусів. Зокрема, вивчалася ефективність плеконарилу щодо риновірусів, а також препаратів нового покоління, здатних пригнічувати репродукцію вірусів грипу А і В.

Противірусна терапія грипу та інших ГРВІ не обмежується застосуванням етіотропних засобів. Тактика лікування залежить від виду збудника, тяжкості захворювання, наявності факторів ризику та можливих ускладнень. Важливе значення мають своєчасна симптоматична й патогенетична терапія, а за відповідних показань – застосування специфічних противірусних препаратів. Антибактеріальні засоби не діють безпосередньо на віруси й використовуються лише за наявності або високої ймовірності бактеріальних ускладнень.

Вірусні гепатити. Упродовж останніх десятиліть уявлення про етіологічну структуру вірусних гепатитів суттєво розширилося. Поряд із добре відомими вірусами гепатитів A, B, C, D та E були описані й інші вірусні агенти, зокрема ті, що свого часу пов'язували з гепатитами G, F та TTV. Водночас їх роль у розвитку та перебігу захворювань печінки потребує окремої оцінки, а сучасна класифікація вірусних гепатитів відрізняється від наведеної в застарілій літературі.

Одним із перших системних підходів до противірусної терапії хронічних вірусних гепатитів стало застосування інтерферонів (ІФН). Їх терапевтичний ефект пов'язаний поєднанням противірусної та імуномодулюючої дії. Інтерферони активують внутрішньоклітинні механізми

противірусного захисту, впливають на експресію генів, пов'язаних із противірусною відповіддю, посилюють активність природних кілерів і цитотоксичних Т-лімфоцитів, а також сприяють формуванню специфічної імунної відповіді.

Обмежена ефективність монотерапії інтерферонами стимулювала пошук інших препаратів, здатних безпосередньо впливати на репродукцію вірусів. Одним із таких напрямів стало дослідження нуклеозидних і нуклеотидних аналогів. Після внутрішньоклітинної активації ці сполуки можуть конкурувати з природними компонентами нуклеїнових кислот і порушувати роботу вірусних полімераз або інших ферментів, необхідних для реплікації геному.

Нуклеозидні аналоги знайшли застосування при лікуванні низки вірусних інфекцій. Представниками цієї групи є, зокрема, ламі-вудин, ентекавір, емтрицитабін, клевудин та інші сполуки, які досліджувалися або використовувалися для впливу на реплікацію вірусів гепатиту В. Водночас препарати цієї групи відрізняються за спектром активності, механізмом дії, ефективністю та профілем безпеки.

Особливе значення для терапії хронічного гепатиту В має ламі-вудин, який є аналогом нуклеозиду та після фосфорилювання пригнічує активність вірусної ДНК-полімерази/зворотної транскриптази HBV. Унаслідок цього порушується синтез вірусної ДНК і зменшується реплікаційна активність вірусу.

Серед перспективних на різних етапах розроблення противірусних засобів розглядалися ентекавір (BMS-200475), емтрицитабін, клевудин та інші нуклеозидні або нуклеотидні аналоги. Їх дослідження було спрямоване на пошук препаратів із високою противірусною активністю та можливістю тривалого контролю реплікації HBV.

Важливим обмеженням тривалої монотерапії окремими

противірусними препаратами є формування резистентності. Внаслідок мутацій вірусного геному можуть відбиратися варіанти вірусу зі зниженою чутливістю до препарату. Імовірність появи резистентних штамів залежить від генетичного бар'єра препарату, тривалості терапії, рівня пригнічення реплікації та інших чинників.

Таким чином, розвиток противірусної терапії вірусних гепатитів ґрунтується на пошуку препаратів, здатних цілеспрямовано впливати на ключові етапи репродукції вірусу. Вибір терапевтичної стратегії визначається типом вірусу, стадією інфекційного процесу, активністю реплікації, станом печінки та ризиком формування лікарської резистентності.

Герпес. Герпесвірусні інфекції належать до поширених вірусних захворювань людини. До медично значущих представників родини Herpesviridae належать вірус простого герпесу 1-го та 2-го типів (ВПГ-1, ВПГ-2), вірус варіцела-зостер (VZV), цитомегаловірус (ЦМВ) та інші герпесвіруси. Особливістю цієї групи збудників є здатність після первинного інфікування зберігатися в організмі у латентному стані та за певних умов реактивуватися.

Основною мішенню противірусної хіміотерапії герпесвірусних інфекцій є процес репродукції вірусу. Препарати можуть впливати на окремі етапи вірусного циклу, насамперед на синтез вірусної ДНК. Пригнічення реплікації зменшує утворення нових вірусних частинок, обмежує поширення інфекції та сприяє скороченню тривалості й тяжкості проявів захворювання.

Важливою особливістю герпесвірусів є їх здатність переходити у латентний стан. Тому сучасні противірусні препарати, як правило, пригнічують активну реплікацію вірусу, але не елімінують його з організму та не гарантують повного запобігання подальшим реактиваціям. Основним результатом противірусної терапії є зменшення тривалості та вираженості клінічних проявів, частоти рецидивів і ризику окремих ускладнень.

Найбільш відомими противірусними засобами для терапії інфекцій, спричинених ВПГ та VZV, є ацикловір, валацикловір і фамцикловір. Ці препарати належать до аналогів нуклеозидів і після активації в інфікованих клітинах пригнічують вірусну ДНК-полімеразу, перешкоджаючи синтезу вірусної ДНК.

Ацикловір є синтетичним аналогом нуклеозиду гуанозинового ряду та одним із базових препаратів противогерпесної терапії. У клітинах, інфікованих герпесвірусом, він послідовно фосфорилюється, причому перший етап активації значною мірою забезпечується вірусною тимідинкіназою. Утворений активний трифосфатний метаболіт пригнічує вірусну ДНК-полімеразу та перериває синтез вірусної ДНК. Такий механізм забезпечує відносну вибірковість дії препарату щодо інфікованих клітин.

Недостатня біодоступність ацикловіру при пероральному застосуванні стала одним із чинників розроблення його похідних. До таких препаратів належить валацикловір – проліки ацикловіру, які після всмоктування в організмі перетворюються на ацикловір і забезпечують вищу системну біодоступність. Препарат застосовують для лікування та профілактики рецидивів окремих герпесвірусних інфекцій.

Фамцикловір є проліками пенцикловіру та також належить до аналогів нуклеозидів. Після перетворення на активну форму він пригнічує вірусну ДНК-полімеразу, порушуючи реплікацію герпесвірусів. Препарат застосовують при окремих інфекціях, спричинених ВПГ та VZV.

Для лікування тяжких герпесвірусних інфекцій, особливо у пацієнтів із порушеннями імунної системи, можуть використовуватися препарати з іншими механізмами дії. До них належать ганцикловір, фоскарнет і цидофовір. Їх застосування залежить від типу герпесвірусу, клінічної ситуації та чутливості збудника.

Ганцикловір є аналогом нуклеозиду, активна форма якого пригнічує вірусну ДНК-полімеразу. Препарат має значення насамперед у терапії тяжких ЦМВ-інфекцій. Його використання потребує контролю через можливі серйозні побічні реакції, зокрема гематологічну токсичність.

Фоскарнет безпосередньо пригнічує активність вірусної ДНК-полімерази та деяких інших вірусних ферментів. Його можуть застосовувати у випадках інфекцій, спричинених штамами герпесвірусів, стійкими до препаратів нуклеозидного ряду. Використання фоскарнету обмежується ризиком токсичних ефектів, зокрема порушень функції нирок.

Цидофовір також належить до противірусних аналогів нуклеотидів і здатний пригнічувати реплікацію герпесвірусів. Через можливу нефротоксичність його застосування обмежене й потребує відповідного медичного контролю.

Формування резистентності до противірусних препаратів є однією з важливих проблем терапії герпесвірусних інфекцій. Особливо актуальною вона є для пацієнтів із тривалим або повторним застосуванням противірусних засобів та для осіб з імунодефіцитними станами. При зниженні чутливості вірусу до певного препарату можуть використовуватися засоби з іншим механізмом дії.

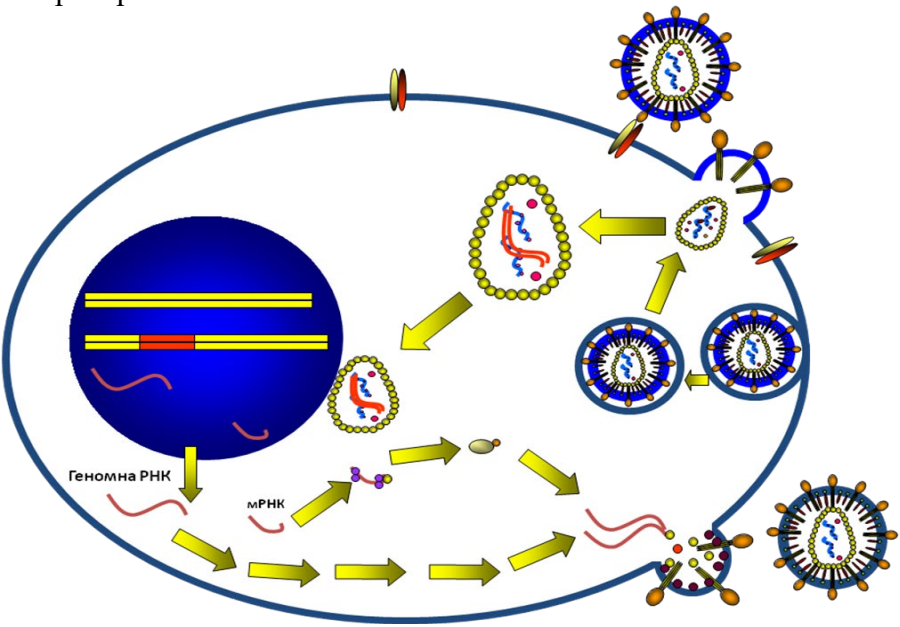
Окремим напрямом досліджень залишається використання препаратів, здатних модулювати противірусну імунну відповідь, зокрема інтерферонів та їх індукторів. Водночас їх роль залежить від конкретного збудника, клінічної форми інфекції та доказової бази конкретного препарату.

Отже, сучасна противірусна терапія герпесвірусних інфекцій ґрунтується переважно на цілеспрямованому пригніченні реплікації вірусу. Вибір препарату визначається видом герпесвірусу, локалізацією та тяжкістю інфекції, імунним статусом пацієнта, наявністю резистентності та ризиком побічних реакцій.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 8

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

1.1. На малюнку позначте мішені противірусних препаратів.



1.2. Проаналізуйте механізми дії противірусних хіміотерапевтичних засобів та заповніть таблицю, указавши назву препарату, основну молекулярну мішень і відповідний спектр противірусної активності.

Противірусний хіміопрепарат	***Мішень дії***	***Чутливий вірус***

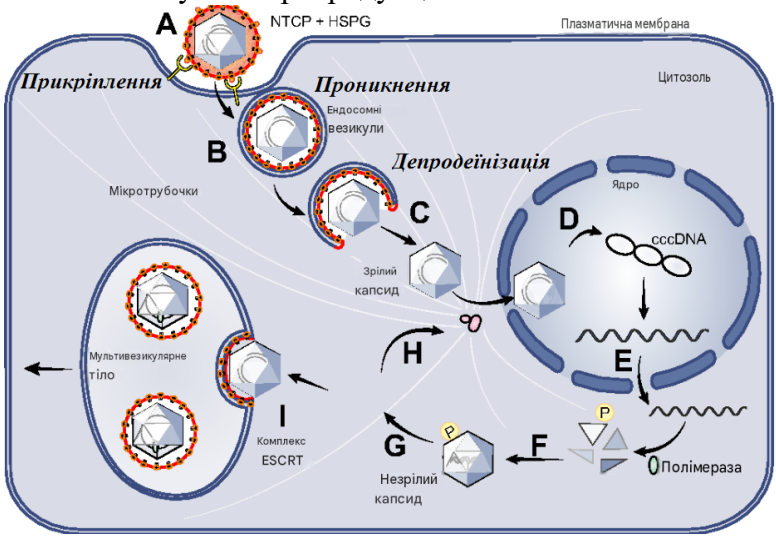
Завдання 2. Проаналізуйте стан сучасної проти-вірусної вакцинації та заповніть таблицю.

Вірусне захворювання	***Наявність і вид вакцини***
ДНК-геномні віруси	
_____ _____ _____ _____	_____ _____ _____ _____

РНК-геномні віруси	

Завдання 3. Аналіз етапів репродукції вірусу як потенційних мішеней противірусної терапії.

Розгляньте схему репродуктивного циклу вірусу та визначте, на яких його етапах можуть діяти противірусні препарати. Для кожної мішені зазначте можливий механізм блокування репродукції.



Адсорбція вірусу на клітині – _____
_____
_____
_____

Проникнення вірусу в клітину – _____
_____
_____
_____

Депротеїнізація – _____
_____
_____
_____

Реплікація вірусного геному – _____
_____
_____
_____

Синтез вірусних білків – _____
_____
_____
_____

Збірка віріонів – _____
_____
_____
_____

Вихід новоутворених віріонів – _____
_____
_____
_____

Завдання 4. Дайте визначення основним поняттям і термінам:

Елімінація……

……

Ерадикація……

……

Резистентність……

……

Скринінг……

……

Інтерферон……

……

Індуктори інтерферону……

……

Ациклічні нуклеозидні аналоги……

……

Похідні адамантану……

……

Протеаза ВІЛ……

……

Нейрамінідаза……

……

Віремія……

……

Цитотоксичність……..

……..

HAART……

……..

Профілактична противірусна терапія……

……..

Нуклеозидні аналоги……..

……..

ВИСНОВКИ

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____ .

КОНТРОЛЬНІ ЗАВДАННЯ ТА ПИТАННЯ

1. Проаналізуйте основні етапи репродуктивного циклу вірусу та визначте можливі мішені противірусної терапії.
2. Розподіліть противірусні препарати за основним механізмом їхньої дії: інгібітори проникнення, реплікації геному, протеолізу, інтеграції та виходу вірусних частинок.
3. Порівняйте механізми дії нуклеозидних і ненуклеозидних інгібіторів вірусних ферментів та визначте їхні основні відмінності.
4. Проаналізуйте переваги та обмеження комбінованої противірусної терапії.
5. Визначте можливі причини формування резистентності вірусів до противірусних препаратів та запропонуйте шляхи її запобігання.
6. Порівняйте етіотропну, імуномодулюючу та симптоматичну терапію вірусних інфекцій.
7. Проаналізуйте сучасні підходи до профілактики вірусних інфекцій та визначте роль активної й пасивної імунопрофілактики.
8. Що таке індуктори інтерферону та яке їхнє значення?
9. Які особливості дії ациклічних нуклеозидних аналогів?
10. Що таке інгібітори зворотної транскриптази?
11. Яку роль відіграє протеаза ВІЛ у репродукції вірусу? Який механізм дії інгібіторів протеази?
12. Які основні біологічні та методичні труднощі виникають під час розроблення противірусних препаратів?
13. Порівняйте противірусні засоби, що застосовуються при ВІЛ-інфекції, грипі, герпесвірусних інфекціях та вірусних гепатитах.

ТЕХНІКА БЕЗПЕКИ
У ВІРУСОЛОГІЧНИХ ЛАБОРАТОРІЯХ

Основні принципи організації вірусологічної лабораторії

Організація роботи вірусологічної лабораторії ґрунтується на біологічних особливостях вірусів та необхідності забезпечення належного рівня біологічної безпеки під час роботи з вірусовмісними матеріалами.

Віруси є неклітинними формами існування генетичного матеріалу, які не мають власного повноцінного апарату для самостійного розмноження. Вони є облігатними внутрішньоклітинними паразитами та використовують метаболічні й біосинтетичні системи клітини-хазяїна для утворення нових вірусних компонентів. Позаклітинна форма існування вірусу представлена віріоном – інфекційною вірусною частинкою, яка забезпечує перенесення вірусного геному до сприйнятливої клітини. Після проникнення в клітину вірусний геном використовує її біохімічний апарат для реалізації генетичної інформації та утворення компонентів нового покоління вірусних частинок.

Такі властивості визначають необхідність особливого підходу до організації вірусологічних досліджень. Робота з вірусовмісним матеріалом має проводитися з дотриманням вимог біологічної безпеки, асептики, антисептики та правил поводження з потенційно інфекційними матеріалами. Організація лабораторного простору, обладнання та робочих процесів повинна мінімізувати ризик контамінації, професійного інфікування персоналу та потрапляння біологічно небезпечного матеріалу в навколишнє середовище.

Асептика та антисептика

Під час роботи у вірусологічній лабораторії необхідно суворо дотримуватися принципів асептики та антисептики.

Асептика – комплекс організаційних, санітарно-гігієнічних і технічних заходів, спрямованих на недопущення потрапляння мікроорганізмів та інших біологічних агентів у досліджуваний матеріал, на стерильні поверхні, інструменти та в організм людини. Вона передбачає використання стерильного обладнання й матеріалів, належну обробку рук, дотримання санітарно-гігієнічних вимог та правильну організацію робочого процесу.

Антисептика – сукупність методів і заходів, спрямованих на знищення або інактивацію патогенних мікроорганізмів та інших біологічних агентів на шкірі, слизових оболонках, ушкоджених тканинах та інших об'єктах з метою запобігання інфікуванню.

Під час роботи з вірусовмісним матеріалом основними завданнями є:

- запобігання виходу потенційно небезпечного матеріалу за межі контрольованої лабораторної зони;
- недопущення перехресної контамінації досліджуваних зразків;
- забезпечення безпеки персоналу;
- правильне використання засобів індивідуального захисту;
- належне знезараження робочих поверхонь, обладнання та відходів;
- дотримання встановлених процедур поводження з біологічними матеріалами.

Рівні біологічної безпеки та організація лабораторій

Класифікація лабораторій за рівнями біологічної безпеки дає змогу визначити комплекс організаційних, інженерних та санітарно-протиепідемічних заходів, необхідних для безпечної роботи з біологічними агентами. Рівень біологічної безпеки лабораторії визначають з урахуванням властивостей конкретного збудника, його потенційної небезпеки для людини та довкілля, характеру

запланованих досліджень, концентрації та об'єму матеріалу, а також можливих шляхів передачі інфекції.

У міжнародній практиці використовують чотири основні рівні біологічної безпеки – BSL-1, BSL-2, BSL-3 та BSL-4. BSL-1 – базовий рівень біологічної безпеки, який призначений для роботи з біологічними матеріалами, що становлять мінімальний потенційний ризик для здорової людини та навколишнього середовища. BSL-2 – базовий рівень із посиленими вимогами до захисту. Застосовується під час роботи з біологічними агентами, які можуть становити помірний ризик для персоналу та навколишнього середовища. BSL-3 – високий рівень біологічної безпеки, який призначений для роботи з патогенами, що можуть спричиняти тяжкі захворювання та становити значний ризик для персоналу, особливо у разі передачі повітряно-крапельним або аерозольним шляхом. BSL-4 – максимальний рівень біологічної безпеки. Цей рівень передбачений для роботи з особливо небезпечними біологічними агентами, які можуть спричиняти тяжкі або потенційно смертельні захворювання та для яких можливості профілактики або ефективного лікування можуть бути обмеженими.

Рівень біологічної безпеки під час роботи з вірусами визначають з урахуванням патогенності та трансмісивності вірусу, способу його передачі, концентрації та об'єму матеріалу, а також характеру лабораторної процедури. З підвищенням потенційного ризику зростають вимоги до ізоляції приміщень, обладнання, засобів захисту персоналу та контролю за біологічним матеріалом.

У навчальній і лабораторній практиці традиційно виділяють такі рівні організації роботи:

1. Базові лабораторії

Це лабораторії загального профілю, до яких належать навчальні, діагностичні, університетські та лабораторії закладів охорони здоров'я. Їх оснащення визначається

характером досліджень та рівнем потенційного біологічного ризику.

У таких лабораторіях можуть проводитися дослідження з матеріалами, що містять збудників із невисоким або помірним рівнем ризику, за умови дотримання відповідних процедур біобезпеки.

2. Лабораторії підвищеного рівня ізоляції

Це спеціалізовані лабораторії, призначені для роботи з біологічними агентами, які становлять підвищений ризик для персоналу або навколишнього середовища. Такі лабораторії мають додаткові інженерні та організаційні бар'єри, контроль доступу та спеціальні процедури поводження з матеріалами.

3. Лабораторії максимального рівня біологічної безпеки

Це спеціалізовані лабораторні комплекси, призначені для роботи з особливо небезпечними патогенами. Вони характеризуються максимальною ізоляцією робочих зон, спеціальними інженерними системами, контрольованим доступом, суворими процедурами знезараження та багаторівневим контролем безпеки.

Конкретний рівень біобезпеки визначають не лише за назвою вірусу, а й з урахуванням виду лабораторної процедури, концентрації та об'єму матеріалу, способу його обробки та потенційного ризику утворення аерозолів.

Незалежно від профілю лабораторії важливим принципом її організації є зонування приміщень. Воно передбачає функціональний поділ лабораторного простору відповідно до рівня потенційного біологічного ризику.

Розмежування зон дає можливість:

- контролювати переміщення персоналу та матеріалів;
- обмежувати поширення контамінації;
- організовувати окремі маршрути для чистих і потенційно забруднених матеріалів;
- проводити цільове знезараження приміщень;

- забезпечувати належну обробку використаного спецодягу та засобів індивідуального захисту;
- безпечно переміщувати матеріали між окремими функціональними зонами.

Загальні вимоги до приміщень

Планування вірусологічної лабораторії визначається напрямами її діяльності, характером досліджень та рівнем біологічного ризику. При цьому лабораторні приміщення повинні забезпечувати достатній простір для безпечного виконання робіт, належне освітлення, вентиляцію, можливість проведення дезінфекції та контрольоване переміщення персоналу і матеріалів.

Лабораторні приміщення доцільно розташовувати в умовах, де відсутні фактори, здатні негативно впливати на роботу лабораторного обладнання, зокрема надмірна вібрація, пил, хімічно агресивні речовини та інші несприятливі чинники.

Робочі приміщення повинні мати достатнє природне та штучне освітлення, ефективну вентиляцію, поверхні, стійкі до дії дезінфекційних засобів, а також можливість регулярного санітарного оброблення.

Організація входу, виходу та переміщення між приміщеннями має відповідати рівню біологічного ризику і встановленим вимогам біобезпеки.

Основні функціональні приміщення

Залежно від профілю базової вірусологічної лабораторії до її складу можуть входити: мийна; стерилізаційна; препараторська; приміщення для роботи з культурами клітин; приміщення для серологічних досліджень; приміщення для зберігання матеріалів і реагентів; приміщення для утримання лабораторних тварин – за необхідності.

Мийна призначена для очищення та первинної обробки лабораторного посуду й інвентарю. Вона повинна бути обладнана мийними поверхнями, раковинами з відповідним водопостачанням, сушильним обладнанням та іншими засобами, необхідними для безпечного оброблення лабораторного посуду. Посуд та інструменти, які контактували з потенційно інфекційним матеріалом, перед подальшим очищенням підлягають установленій процедурі знезараження.

Стерилізаційна призначена для проведення стерилізації лабораторного посуду, інструментів та інших матеріалів, якщо це передбачено технологією роботи лабораторії. У ній можуть використовуватися автоклави, сушильні шафи та інше відповідне обладнання.

Експлуатація стерилізаційного обладнання здійснюється відповідно до інструкцій виробника та чинних вимог охорони праці й біологічної безпеки.

Препараторська використовується для підготовки та зберігання лабораторного посуду, реагентів, діагностичних матеріалів та інших компонентів, необхідних для проведення досліджень.

За наявності в лабораторії експериментального напряму передбачають спеціально організовані приміщення для утримання лабораторних тварин. Їх планування повинно забезпечувати розмежування чистих і потенційно контамінованих зон, можливість санітарної обробки кліток та інвентарю, належне поводження з відходами й дотримання вимог щодо добробуту тварин.

Тварин, які беруть участь у дослідженнях із потенційно інфекційними агентами, утримують ізольовано відповідно до затверджених процедур біобезпеки та ветеринарно-санітарних вимог.

Приміщення, у яких проводять маніпуляції з потенційно інфекційними матеріалами, організовують відповідно до рівня біологічного ризику та вимог до локалізації небезпечних процедур.

Для таких зон можуть передбачатися бокси, передбокси або інші бар'єрні приміщення, призначені для контролю доступу, переміщення персоналу, використання засобів індивідуального захисту та зменшення ризику поширення контамінації. Конструкція дверей, перегородок, вентиляційної системи та інших інженерних елементів визначається вимогами конкретного рівня біобезпеки. Особливу увагу приділяють контролю потоків повітря, запобіганню неконтрольованому переміщенню аерозолів та можливості ефективного знезараження поверхонь.

Усі роботи з потенційно інфекційними матеріалами повинні виконуватися відповідно до затверджених стандартних операційних процедур, з урахуванням оцінки ризику та чинних нормативних вимог біологічної безпеки.

Обладнання вірусологічних лабораторій

Окрім стандартного обладнання та лабораторного посуду, що використовуються під час бактеріологічних і хімічних досліджень, вірусологічні лабораторії повинні бути оснащені спеціальним обладнанням, необхідним для роботи з вірусовмісними матеріалами.

Для тривалого зберігання вірусовмісних зразків, розчинів, сироваток, вакцин, антигенів та інших біологічних матеріалів у незміненому стані використовують холодильне обладнання з широким діапазоном температур – від +4 °С до наднизьких значень. Залежно від призначення застосовують холодильники та холодильні камери (+4 °С, –20 °С), установки глибокого заморожування (близько –30 °С) та обладнання для надглибокого заморожування (до –170 °С).

Для інкубації курячих ембріонів і культур клітин використовують термостати, зокрема сухоповітряні та водяні. Важливе місце займають центрифуги, які застосовують для осадження великих частинок патологічного матеріалу та під час підготовки тканин. Для

очищення вірусних препаратів від баластних компонентів і їх концентрування використовують високошвидкісні центрифуги, обладнані системами охолодження та, за потреби, створення вакууму.

Для проведення маніпуляцій із лабораторними тваринами та курячими ембріонами, а також для відбору вірусовмісного матеріалу необхідний набір спеціальних інструментів. До нього належать шприци різного об'єму, голки, шпателі, скальпелі, анатомічні та хірургічні пінцети, ножиці, корнцанги та інший інструментарій.

Для механічного подрібнення патологічного матеріалу застосовують тканинні гомогенізатори, а також фарфорові ступки з товкачиками.

Вірусологічна лабораторія повинна бути забезпечена достатньою кількістю лабораторного посуду та допоміжного інвентарю. До них належать емальовані ємності, тази, металеві бокси, бактеріальні фільтри, скляний посуд, матеріали для вирощування культур клітин, пробірки, флакони, колби різної місткості, чашки Петрі, мірний посуд, піпетки різних типів і об'ємів, мікропіпетки, ампули, ексикатори, воронки, мірні циліндри та інше лабораторне приладдя. Для роботи з культурами клітин використовують спеціальні матраци, чашки Карреля, пробірки Лейтона та відповідний пластмасовий і скляний посуд.

Для проведення серологічних досліджень необхідні полістиролові планшети. Лабораторія також має бути оснащена різними видами терезів, зокрема хімічними, аналітичними та торсійними, а також центрифужними пристроями для врівноваження пробірок.

Важливою складовою оснащення є мікроскопічна техніка. Залежно від характеру досліджень використовують світлові біологічні, інвертовані, бінокулярні та стереоскопічні мікроскопи, а також люмінесцентні й електронні мікроскопи.

Для організації лабораторної роботи необхідні також штативи для пробірок, гумові пробки різних типів і розмірів, засоби для маркування скла, фільтрувальний папір, лейкопластир та інші допоміжні матеріали.

Значна частина обладнання та лабораторного посуду використовується у стерильному стані. Тому перед проведенням досліджень їх піддають відповідній послідовній обробці, яка включає очищення, миття, дезінфекцію та стерилізацію.

Сучасні вірусологічні лабораторії також оснащують приладами для проведення швидкої діагностики вірусних інфекцій. До основних методів та відповідного обладнання належать засоби для імуноферментного та імунофлуоресцентного аналізу, імуноелектроблотингу, електронної та імуноелектронної мікроскопії, а також полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР).

Правила роботи в учбових вірусологічних лабораторіях

1. До роботи у вірусологічній лабораторії допускаються лише студенти та працівники, які пройшли відповідний інструктаж із техніки безпеки.
2. Роботу з біологічним матеріалом дозволяється виконувати тільки у встановленому спеціальному одязі.
3. Під час проведення маніпуляцій із вірусовмісним матеріалом необхідно дотримуватися спокійної поведінки, не ходити без потреби та не розмовляти.
4. У лабораторному приміщенні забороняється зберігати особисті речі, вживати їжу та напої, палити, користуватися косметичними засобами.
5. Перенесення та дозування інфекційного матеріалу здійснюють лише за допомогою автоматичних або напівавтоматичних піпеток та інших спеціальних пристроїв. Забороняється набирати досліджуваний матеріал у піпетку ротом.

6. Під час використання шприців і голок необхідно дотримуватися особливої обережності, щоб уникнути випадкових уколів та інших травм.
7. Після завершення роботи використані інструменти та лабораторний інвентар, зокрема піпетки, шпателі, предметні й покривні скельця, підлягають знезараженню відповідно до встановленого режиму.
8. Посуд та матеріали, що контактували з інфікованим матеріалом, зокрема використані живильні середовища, кров, мокротиння тощо, необхідно збирати окремо та піддавати обов'язковому знезараженню встановленими методами.
9. Після завершення лабораторної роботи необхідно ретельно вимити руки та, за потреби, провести їх додаткову антисептичну обробку.
10. Забороняється викидати або зливати інфіковані матеріали та лабораторні відходи безпосередньо у каналізаційну систему.
11. У разі виникнення аварійної ситуації, розливу чи іншого контакту з вірусовмісним матеріалом необхідно негайно повідомити викладача або відповідального працівника лабораторії.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

Основна:

1. Вірусологія : навчальний посібник для лабораторних занять / укладач О. В. Кеца. Харків : Мачулін, 2022. 168 с.
2. Сіроткін О. К. Вірусологія : підручник. Київ : DreamBook, 2024. 400 с.
3. Шамрай С. М., Леонтьєв Д. В. Вірусологія : навч. посібник. Харків : ХНПУ імені Г. С. Сковороди, 2024. 320 с.
4. Широбоков В. П. Медична мікробіологія, вірусологія та імунологія : підручник. Київ : Нова Книга, 2021. 920 с.
5. Шмараков І. О., Марченко М. М., Співак М. Я. Основи вірусології : підручник / за ред. В. С. Підгорського. Чернівці : Чернівецький національний університет, 2011. 320 с.

Додаткова:

1. Burrell C. J., Howard C. R., Murphy F. A. Fenner and White's Medical Virology. 5th ed. London : Academic Press, 2017. 656 p.
2. Dimmock N. J., Easton A. J., Leppard K. N. Introduction to Modern Virology. 7th ed. Chichester : Wiley-Blackwell, 2016. 544 p.
3. Flint S. J., Racaniello V. R., Rall G. F., Hatziioannou T., Skalka A. M. Principles of Virology. 5th ed. Washington, D. C. : ASM Press, 2020. 1136 p.
4. Hewlett M. J., Camerini D., Bloom B. R. Basic Virology. 4th ed. Hoboken : Wiley-Blackwell, 2021. 512 p.
5. Pumpens P. Single-Stranded RNA Phages: From Molecular Biology to Nanotechnology. Boca Raton : CRC Press, 2020. 640 p.
6. Pumpens P., Pushko P. Virus-Like Particles: A Comprehensive Guide. Boca Raton : CRC Press, 2022. 674 p.
7. Richman D. D., Whitley R. J., Hayden F. G. Clinical Virology. 4th ed. Washington, D. C. : ASM Press, 2016. 1490 p.
8. Loeffelholz M. J., Hodinka R. L., Young S. A., Pinsky B. A. Clinical Virology Manual. 5th ed. Washington, D. C. : ASM Press, 2016. 680 p.

9. Мікробіологія з основами вірусології : практикум для підготовки й проведення лабораторних робіт / Я. О. Бачинська, І. О. Ликова ; Харківський національний педагогічний університет імені Г. С. Сковороди. Харків : Панов А. М., 2025. 117 с.
10. Шамрай С. М., Леонтьєв Д. В. Вірусологія : підручник. Харків : ХНПУ імені Г. С. Сковороди, 2024. 220 с.

Інформаційні ресурси

1. https://moodle.chnu.edu.ua/course/view.php?id=1856 2.
2. http://viralzone.expasy.org/
3. https://www.bbc.co.uk/bitesize/guides/zxr7ng8/revision/2
4. https://pdb101.rcsb.org/learn/exploring-the-structural-biology-of-viruses
5. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8243/?utm_source

ЗМІСТ

ПЕРЕДМОВА 3

РОЗДІЛ 1. Структурно-функціональна характеристика вірусів 4

ТЕМА 1.1. Структурний аналіз віріонів різних систематичних груп 4
ТЕМА 1.2. Класифікація вірусів. Субвірусні агенти. 20
ТЕМА 1.3. Методи дослідження вірусів. Використання лабораторних тварин у вірусології 35
ТЕМА 1.4. Методи дослідження вірусів. Курячі ембріони та їх використання у вірусології 88
ТЕМА 1.5. Методи дослідження вірусів. Використання клітинних культур у вірусології 106
ТЕМА 1.6. Поширення вірусів. Особливості життєвих циклів вірусів 142

РОЗДІЛ 2. Біологічна активність вірусів та її практичні наслідки 167
ТЕМА 2.1. Противірусний імунітет. Методи діагностики вірусних інфекцій 167
ТЕМА 2.2. Противірусна хіміотерапія 192

ТЕХНІКА БЕЗПЕКИ У ВІРУСОЛОГІЧНИХ ЛАБОРАТОРІЯХ 208

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ 218

Навчальне видання

Кеца *Оксана Віталіївна*

ВІРУСОЛОГІЯ

Навчально-методичний посібник
для лабораторних занять

Літературний редактор ***Лупул О. В.***
Комп'ютерний набір та верстка ***Кеца О. В.***

Електронне видання

Підписано до друку 09.11.2026. Формат 60x84/16.
Ум.-друк. арк. 12,1. Обл.-вид. арк. 13,0. Зам. Н-115.
Видавництво та друкарня Чернівецького національного
університету імені Юрія Федьковича
58002, Чернівці, вул. Коцюбинського, 2.
e-mail: ruta@chnu.edu.ua

Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 819 від 08.04.2002 р.