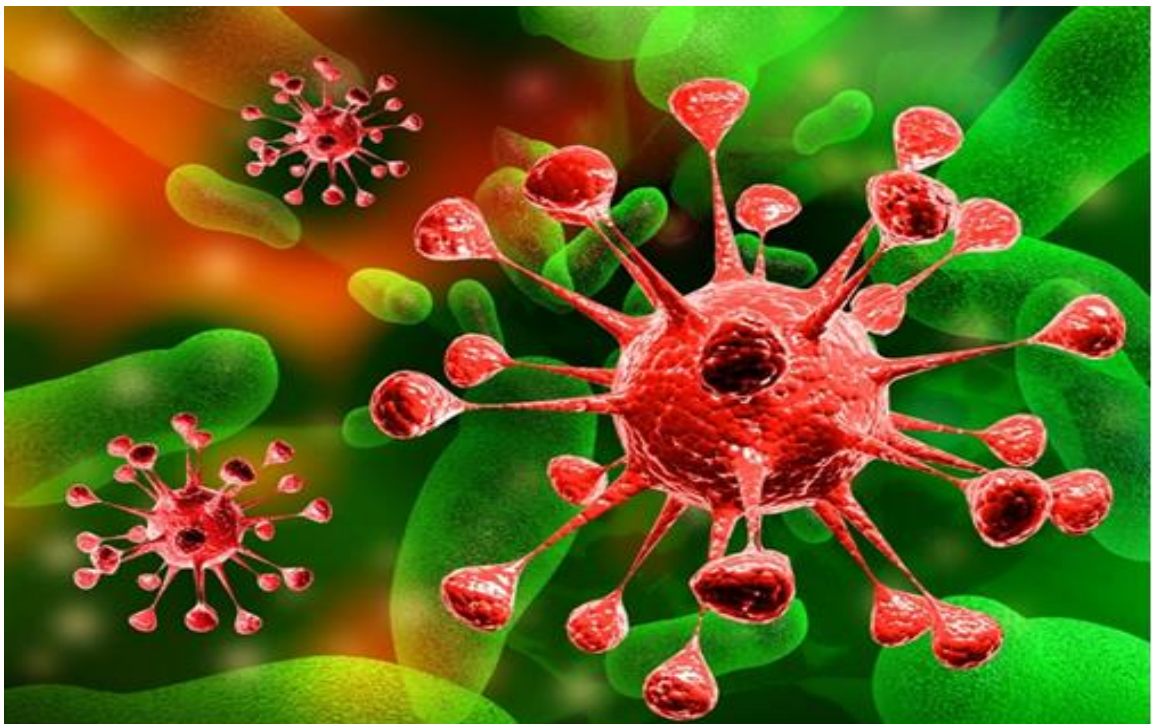


**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ЗАКЛАД ВИЩОЇ ОСВІТИ
«ПОДІЛЬСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ»**

Тетяна СУПРОВИЧ

**ЛАБОРАТОРНИЙ ПРАКТИКУМ З ДИСЦИПЛІНИ
«ВЕТЕРИНАРНА ВІРУСОЛОГІЯ»**

для здобувачів
другого (магістерського) рівня вищої освіти
за спеціальністю Н6 (211) «Ветеринарна медицина»



**м. Кам'янець-Подільський
2025**

УДК 636.09:578

В 39

Авторка:

Тетяна СУПРОВИЧ,

завідувачка кафедри гігієни тварин та
ветеринарного забезпечення
кінологічної служби Національної поліції
України, докторка сільськогосподарських
наук, професорка

Рецензенти:

Олександр ГАЛАТЮК,

завідувач кафедри ветеринарної епідеміології
Поліського національного університету,
доктор ветеринарних наук, професор
професор кафедри мікробіології та вірусології
Львівського національного університету
ветеринарної медицини та біотехнологій імені
С.З. Гжицького, доктор ветеринарних наук,
професор.

РУСЛАН ПЕЛЕНЬО,

провідний науковий співробітник лабораторії
Тернопільської дослідної станції Інституту
ветеринарної медицини НААН, доктор
ветеринарних наук, професор

Микола КУХТИН,

професорка кафедри ветеринарного
акушерства, внутрішньої патології та хірургії
Закладу вищої освіти «Подільський державний
університет», докторка ветеринарних наук,
доцент

Юлія ГОРЮК,

*Рекомендовано до друку вченою радою Закладу вищої освіти
«Подільський державний університет» (протокол № 3 від 22.04
2025 року)*

Супрович Т.М.

Лабораторний практикум з дисципліни «Ветеринарна вірусологія» для
здобувачів другого (магістерського) рівня вищої освіти спеціальності Н6
(211) «Ветеринарна медицина» / Тетяна СУПРОВИЧ. Кам'янець-
Подільський: ЗВО «ПДУ», 2025. 201 с.

У посібнику викладено теми, в яких представлені загальні принципи
діагностики вірусних інфекцій тварин, методи зараження і культивування
вірусів в організмі лабораторних тварин, сучасні методи виділення вірусів у
суспензіях клітин тваринного організму і серологічні реакції для діагностики
більшості вірусних інфекцій. Матеріали посібника призначено для
закріплення здобувачами теоретичних знань і набуття практичних навичок
щодо основних питань ветеринарної вірусології.

УДК 636.09:578

ЗМІСТ

ВСТУП	4
ТЕМА 1. Техніка безпеки і правила роботи з вірусовмісним матеріалом. Загальні принципи діагностики вірусних інфекцій тварин	6
ТЕМА 2. Використання лабораторних тварин у вірусології.....	18
ТЕМА 3. Культивування вірусів на розвинених курячих ембріонах	32
ТЕМА 4. Культивування вірусів у культурах клітин	43
ТЕМА 5. Взаємодія вірусів із клітинами.....	54
ТЕМА 6. Титрування вірусів	67
ТЕМА 7. Реакція затримки гемаглютинації.....	82
ТЕМА 8. Реакція непрямой гемаглютинації. Реакція нейтралізації.....	88
ТЕМА 9. Реакція дифузійної преципітації в агаровому гелі. Лабораторна діагностика сказу тварин	101
ТЕМА 10. Імуноферментний аналіз.....	113
ТЕМА 11. Особливості діагностики віспи тварин.....	119
ТЕМА 12. Використання методу флуоресценції для діагностики вірусних захворювань	133
ТЕСТОВІ ЗАВДАННЯ	147
РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА	189
СЛОВНИК ВИКОРИСТАНИХ ТЕРМІНІВ	190
ПРЕДМЕТНИЙ ПОКАЖЧИК.....	194
ДОДАТОК 1.....	195
ВІДОМОСТІ ПРО АВТОРІВ.....	

ВСТУП

Становлення вірусології як окремої галузі біологічної науки припадає на другу половину минулого століття, і відтоді спостерігається її бурхливий прогрес. З часу відкриття вірусів Д.Й. Івановським у 1892 році вірусологія розвивалася трьома окремими напрямками, кожен з яких був частиною певної практичної галузі. Вірусологія поділялася на медичну (її успіхи найбільш істотні, оскільки людство завжди було небайдужим до свого здоров'я), ветеринарну та сільськогосподарську, або фітовірусологію.

Вірусологія, наука про інфекційні агенти неклітинної природи – віруси. Вона має практичне значення як наука про інфекційні хвороби завдяки ряду наукових відкриттів, що впливають на продуктивність тварин, тривалість життя та благополуччя у всьому світі.

У лабораторному практикумі з дисципліни «Ветеринарна вірусологія», описано сучасні методи індикації вірусів у патологічному матеріалі, культивування вірусів у чутливих біологічних об'єктах (лабораторних тваринах, курячих ембріонах, культурах клітин), методики серологічних реакцій для ідентифікації вірусів і специфічних антитіл. Подано схеми лабораторної діагностики актуальних для ветеринарної практики вірусних інфекцій тварин.

Посібник складається з 11 чотирьох годинних занять, та питань для самоконтролю знань. У посібнику міститься необхідний для засвоєння здобувачами матеріал згідно робочої програми дисципліни, та є провідними вказівками до лабораторних занять із ветеринарної вірусології. Кожне заняття представляє собою самостійне дослідження, де студенти вивчають техніку безпеки і правила роботи з вірусовмісним матеріалом, загальні принципи діагностики вірусних інфекцій тварин, використання лабораторних тварин у вірусології, культивування вірусів на розвинених курячих ембріонах, у культурах клітин, титрування вірусів та серологічні реакції для

діагностики більшості вірусних інфекцій з метою остаточної ідентифікації збудника.

Запропоновано тести для контролю знань студентів із найважливіших питань ветеринарної вірусології.

Список рекомендованої літератури дасть можливість більш поглиблено опрацювати необхідний матеріал. Завдячуючи саме такій структурі навчального посібника здобувачі зможуть достатньо опрацювати всі необхідні теми з дисципліни «Ветеринарна вірусологія».

ТЕМА 1. ТЕХНІКА БЕЗПЕКИ І ПРАВИЛА РОБОТИ З ВІРУСОВМІСНИМ МАТЕРІАЛОМ. ЗАГАЛЬНІ ПРИНЦИПИ ДІАГНОСТИКИ ВІРУСНИХ ІНФЕКЦІЙ ТВАРИН

Основні правила організації вірусологічної лабораторії враховують загальні біологічні властивості вірусів як неклітинної форми життя.

Віруси – це автономні генетичні структури, які можуть функціонувати та репродукуватися в сприйнятливих до них клітинах. Віруси мають субмікроскопічні розміри, це облігатні внутрішньоклітинні паразити.

Ці визначення вказують на дві суттєвих властивості вірусів: по-перше, на наявність у вірусу власного генетичного матеріалу, який використовує біохімічний апарат клітини-хазяїна, та, по-друге, на існування у вірусів позаклітинної інфекційної фази, яка представлена спеціалізованими частками або віріонами, що репродукуються під генетичним контролем цього вірусу і слугують для введення генома вірусу в інші клітини.

Перша властивість наголошує на внутрішньоклітинному паразитизмі вірусу, однак він властивий не лише вірусам. У визначенні вірусів підкреслюється особлива природа паразитизму, який можна назвати паразитизмом на генетичному рівні. Зважаючи на це, робота з вірусами має проводитись, по-перше, у стерильних умовах, а по-друге, облаштування сучасної вірусологічної лабораторії має максимально забезпечувати ефективні заходи для запобігання виходу вірусів у навколишнє середовище і зараженню персоналу та населення вірусними інфекціями.

Працюючи з вірусовмісним матеріалом, необхідно забезпечити виконання таких вимог:

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

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

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

Класифікація вірусів за ступенем біологічної небезпеки

Небезпека вірусів для людини, яка працює з ними, визначається багатьма факторами, такими, як вірулентність вірусу для людини та тварин, здатність вірусу викликати тяжкі епідемічні хвороби, частота летальних випадків при лабораторному зараженні людей, здатність до зараження людей аерозольним шляхом, частота лабораторних заражень та наслідки для осіб, що заразилися, типи експериментів з вірусом, експерименти з вірусними аерозолями, з інфікуванням тварин та членистоногими переносниками, що значно підвищує небезпеку порівняно з експериментами на культурах клітин.

Залежно від ступеню небезпеки віруси розподіляють на групи. Основними критеріями, які використовують для такого розподілу, є:

низький ступінь небезпеки – вірус у звичайних умовах, як правило, не викликає захворювань людей та сільськогосподарських тварин;

середній ступінь небезпеки – вірус може викликати захворювання людей або сільськогосподарських тварин, але в звичайних умовах небезпека для працівників лабораторій і для населення практично відсутня. Лабораторні зараження та захворювання нечасто призводять до серйозних наслідків для захворілих, а наявність ефективних засобів профілактики і лікування виключають можливість розповсюдження інфекції;

високий ступінь небезпеки для працівників лабораторій спостерігається, коли вірус викликає тяжке захворювання у людей, але можливість передачі збудника хвороби від людини до людини відсутня або є незначною.

Високий ступінь небезпеки епідемічного розповсюдження інфекції фіксується в тих випадках, коли вірус часто викликає тяжке захворювання у

людей; він може легко передаватися іншим людям шляхом прямого контакту або опосередковано.

Основними завданнями вірусологічних лабораторій (відділів) є:

- здійснювати діагностику вірусних хвороб на території, яку вони обслуговують;
- контролювати захворюваність тварин, стан і напруженість постінфекційного і поствакцинального імунітету в міжепізоотичний період;
- приймати участь в організації та проведенні профілактичних заходів і в ліквідації вірусних хвороб.

В Україні вірусологічні відділи (вірусологічні лабораторії) існують на рівні Державних регіональних державних лабораторій держпродспоживслужби. В складі державних районних лабораторій ветмедицини вірусологічних відділів не має, а здійснюється лише серологічна діагностика збудників деяких вірусних захворювань (лейкоз, Ньюкаслська хвороба тощо). Таким чином, відібраний вірусовмісний матеріал необхідно надсилати з метою лабораторної діагностики до регіональної державної лабораторії держпродспоживслужби.

Вірусологічну лабораторію слід розміщувати в ізольованому відсіку або краще в двоповерховому приміщенні. Приміщення лабораторії повинно бути повністю ізольованим від інших підрозділів (бактеріологічних, біохімічних).

На першому поверсі знаходяться:

- санітарний пропускник з шафами для спецодягу на кожного працівника лабораторії і душовими кабінками;
- кімната для реєстрації та прийому вірусовмісного матеріалу;
- кімната для попередньої обробки вірусовмісного матеріалу, де проводять розтин трупів тварин і відбір матеріалу для наступного дослідження;
- мийна кімната, призначена для миття посуду, інструментів, апаратури та приладів, а також для прання спецодягу;

- в утилізаційній кімнаті знаходяться автоклави, стерилізаційні прилади, спалювальні пічі (крематорії), установка для знезаражування стічних вод;
- стерилізаційна (автоклавна) кімната, призначена для стерилізації посуду, інструментів, живильних середовищ, апаратури та приладів;
- санвузли, склад лабораторного обладнання, матеріалів і посуду, які на даний момент не використовуються в роботі;
- віварій – приміщення для утримання здорових тварин;
- ізолятор - приміщення для утримання заражених тварин;
- інкубатор – приміщення для культивування та одержання курячих ембріонів.

На другому поверсі розміщуються лабораторні приміщення для безпосередньої роботи з вірусовмісним матеріалом, а також з матеріалом для серологічних і інших методів досліджень.

Основною структурною одиницею вірусологічної лабораторії є **бокс**. Усі роботи з вірусовмісним матеріалом повинні проводитись в боксі за умов стерильності!

Бокси повинні містити два відділення: передбоксник не менше 4 м² і бокс не менше 9 м², які розділені скляною перегородкою. В боксах розміщують столи (вкриті склом, пластиком або некорозійною сталлю), стільці, шафи для скляного посуду, реактивів та інструментів. Над робочим місцем встановлюють бактерицидні лампи типу БУВ-30 для стерилізації повітря; біля входу в бокс кладуть гумовий або з войлоку губчастий дезкилим, просочений дезрозчином.

В передбоксниках розміщують обладнання, яке необхідне для потреб боксу (термостат, холодильник, водяну баню, центрифугу тощо), шафи з стерильними халатами, шапочками, масками, тапочками, окулярами та іншим спецодягом, які одягають перед роботою в боксі. Підлогу в кімнатах лабораторії роблять зі щільного волого-непроникного матеріалу, стійкого до дезінфікуючих засобів (метлахська плитка, пластик, лінолеум); стіни і стелі

покривають матеріалом, який легко миється (олійною фарбою або кахельною плиткою); вікна закривають сітками (від комах).

В лабораторії необхідно мати такі бокси:

- 1). для одержання культури клітин;
- 2). для зараження культури клітин;
- 3). для зараження курячих ембріонів;
- 4). для зараження лабораторних тварин;
- 5). для розтину лабораторних тварин.

По можливості повинен бути бокс для зберігання стерильного посуду, реактивів та інструментів, а також для приготування живильних середовищ і розчинів.

Крім того, на 2 поверсі є відділи для серологічних, гістологічних та інших додаткових досліджень, термостатна кімната, мікроскопічний відділ, приміщення для апаратури, кімната для завідувача лабораторією і співробітників. Лабораторія повинна бути забезпечена холодною і гарячою водою, обладнана системою вентиляції.

В сучасній вірусологічній лабораторії необхідно мати таке обладнання: ламінарні та настільні бокси, автоклави, сушильні шафи, термостати, інкубатори, холодильники, вакуум-насоси, водяні бані з терморегуляцією, центрифуги, фільтрувальні установки з набором фільтрів, гомогенізатори-блендери, апарати Кіппа, стерилізатори, дистилятори, магнітні мішалки, захисні екрани, світлові і люмінесцентні мікроскопи, аналітичні ваги, рН-метри, мікро-титратори Такачі, апаратуру для фотографування, електронний мікроскоп, апарат для ліофільного висушування вірусів і вірусних препаратів, скляний посуд (матраци, флакони, колби, градуйовані піпетки, циліндри, стакани, банки, серологічні, бактеріологічні і центрифужні пробірки, ампули), панелі з пластика для серологічних реакцій, фарфорові ступки, набори інструментів, гумові пробки і груші, гумові рукавиці, овоскопи і лотки для яєць, клітки для тварин і станки для їх фіксації.

Для повсякденної роботи в лабораторії повинні бути фізіологічний і фосфатний буферний розчини, 50%-ий гліцерин, живильні середовища для бактеріологічного контролю вірусовмісного матеріалу, спирт, ефір і хлороформ, дезрозчини, середовища і розчини для культури клітин, різні фіксатори і розчини фарб для фарбування препаратів, антибіотики. У вірусологічній лабораторії необхідно мати повні набори діагностичних препаратів біофабричного виробництва, які використовуються для діагностики вірусних хвороб тварин.

Вірусологічна лабораторія (відділ) повинні мати таку документацію:

1. Журнал реєстрації матеріалу, що надходить в лабораторію.
2. Журнал вірусологічних досліджень (експертиз).
3. Журнал обліку заражених тварин.
4. Журнал обліку виділених вірусів та їх знищення.
5. Журнал обліку переміщення виробничих або музейних штамів та інші книги обліку згідно затверджених інструкцій.

При роботі з вірусовмісним матеріалом необхідно забезпечити виконання таких вимог:

I. Не допускати розсіювання вірусів у навколишньому середовищі

З цією метою дотримуються наступних правил:

- лабораторія повинна працювати у режимі закритого типу;
- вхід у виробничі приміщення стороннім особам, а також вхід співробітників в лабораторію без спецодягу категорично заборонено;
- заборонено вихід за межі лабораторії в спецодязі або надягати верхній одяг на халат;
- система вентиляції повинна бути обладнана фільтрами, а стічні води і залишки матеріалу повинні підлягати обов'язковому знезараженню.

II. Попередити контамінацію (забруднення) вірусовмісного матеріалу сторонньою мікрофлорою. Для цього необхідно:

- працювати з вірусовмісним матеріалом необхідно лише в умовах боксу (стерильних умовах);

- при розпаковуванні матеріалу банки необхідно протирати зовні дезрозчином і ставити на піднос або кювету. Робоче місце на столі покривають декількома шарами марлі, змоченої 5%-ним розчином хлораміну. Вірусовмісні рідини переливають над кюветом з дезрозчином;

- піпетки, предметні скельця і посуд, які використовуються при роботі з інфекційним матеріалом, складають у банки та ексікатори з дезрозчином. Інструментарій стерилізують;

- після закінчення роботи столи обробляють дезрозчином і вмикають бактерицидні лампи. Крім того, щоденно роблять вологе прибирання з застосуванням дезрозчинів;

- вірусовмісний матеріал, необхідний для наступних досліджень, ставлять на збереження в холодильник-сейф, який опечатують.

III. Забезпечити особисту техніку безпеки

- кожен, хто працює з вірусами, піддається ризику зараження в результаті нещасного випадку або при недотриманні відповідних правил техніки безпеки. Основні джерела лабораторних заражень - контакт з вірусовмісним матеріалом, з зараженими лабораторними тваринами, курячими ембріонами або культурами клітин, контакт з контамінованим лабораторним посудом тощо;

- весь матеріал, який поступає в лабораторію на дослідження, потрібно розглядати як інфікований і працювати з ним дуже обережно;

- в лабораторії забороняється палити і приймати їжу;

- не допускається ходіння та розмови під час роботи;

- у випадку попадання заразного матеріалу на халат, руки, стіл, взуття тощо, необхідно негайно повідомити про це завідувачого лабораторією (викладача) і негайно провести під їх контролем дезінфекцію. При підозрі на зараження необхідно звернутись до лікаря;

- в боксі працюють у стерильному халаті, масці, шапочці, а в деяких випадках надівають захисні окуляри, гумові рукавиці і фартух. Обов'язково змінюють взуття;

- працюючи з піпеткою, користуються гумовою грушою;
- відпрацьований інфікований матеріал, трупи дрібних тварин і залишки курячих ембріонів поміщають у пакети з вощеного паперу та автоклавують у металевих контейнерах 30 хв. при тиску 1-1,5 атм. Трупи великих тварин загортають у папір і переносять у трупоспалювач. Халати, шапочки та маски автоклавують; гумові рукавиці, фартух і спецвзуття знезаражують 5%-им розчином хлораміну; захисні окуляри занурюють у 70°-ий спирт. В журналі реєстрації кожен день роблять записи стосовно використаного заразного матеріалу і його утилізації;
- інструменти, а також поверхню робочого стола після роботи одразу ж дезінфікують;
- піпетки, покривні та предметні скельця та інший посуд, що був у використанні, знезаражують, занурюючи в 5% розчин лізолу, фенолу або сірчаної кислоти;
- у вірусологічній лабораторії для дезінфекції використовують різні хімічні речовини: формалін, хлорамін (0,5-5%-ні розчини), фенол, лізол (3-5%-ні), їдкий натрій (2-3%-ний) та ін. Вибір дезінфікуючої речовини та її концентрація залежить від матеріалу, який підлягає дезінфекції;
- забороняється залишати на робочих столах бактеріологічні чашки, пробірки та інший посуд з заразним матеріалом;
- після закінчення роботи робоче місце приводять в порядок і ретельно дезінфікують. Руки ретельно дезінфікують (мильний спирт, 70° спирт тощо);
- лабораторію закривають і опломбовують.

В кожній вірусологічній лабораторії є відповідальна особа за облік вірусних штамів, які надходять до лабораторії для виробничих цілей або виділяють з досліджуваного матеріалу. Штами музейних та виділених вірусів реєструють у спеціальних журналах. На пробірки і флакони з вірусвмісним матеріалом наклеюють етикетки з повною інформацією про вірус (вид, штам, дата одержання, номер пасажу, об'єм, титр та ін.). Штами вірусів зберігають у холодильнику під замком з пломбою або печаткою при низьких

температурах (-20°C, -30°C і -70°C). Для збереження інфекційної активності вірусів при глибокому заморожуванні протягом кількох років до вірусвмісної суспензії додають стабілізатори: 10-30% сироватки крові (інактивованої при 56-60 °C протягом 30 хв.), 0,5-1,5 % желатини, 20-50 % знежиреного молока, 0,1-0,5 % метилцелюлози, 1-5 % пептону, 5-20 % гідролізату тваринного білка, 10 % диметилсульфоксиду. Культуральну рідину, яка містить 2-10 % сироватки крові або гідролізату лактальбуміну, заморожують без додавання стабілізаторів.

Вірусовмісний матеріал можна зберігати при 4 °C із додаванням 10-40 % гліцерину, 1-10 % глюкози, сахарози або мальтози, 5-20 %-ного розчину натрію хлориду та інших вищезгаданих стабілізаторів. При таких умовах віруси зберігають свою активність декілька тижнів, місяців, а в деяких випадках - навіть декілька років.

Розморожують віруси при кімнатній температурі або у водяній бані при 37 °C. Треба мати на увазі, що часте розморожування одного і того самого вірусовмісного матеріалу призводить до зниження титру вірусу. Щоб уникнути цього, вірусовмісний матеріал необхідно розфасовувати невеликими порціями.

Загальні принципи діагностики вірусних інфекцій тварин і птиці

Поставити діагноз на вірусне захворювання – це означає встановити вид (серологічний тип) збудника та характер перебігу захворювання. Своєчасно і правильно поставлений діагноз дозволяє швидко розробити заходи боротьби і ліквідації проти того чи іншого вірусного захворювання.

Постановка діагнозу на вірусні інфекції складається з двох етапів: 1) клініко-епізоотологічна діагностика; 2) лабораторна діагностика.

I. Клініко-епізоотологічна діагностика проводиться безпосередньо на місці виникнення інфекції і включає в себе:

1). *клінічну діагностику*, під якою розуміють виявлення у хворих тварин найбільш характерних ознак клінічного прояву вірусного захворювання;

2). *патологоанатомічну діагностику* – виявлення найбільш характерних змін в тканинах і органах загинувших або вимушено забитих тварин;

3). *епізоотологічну діагностику* – включає в себе відомості про види і вікові групи захворілих тварин, швидкість і широту розповсюдження хвороби, захворюваність і летальність, сезонність, ареал розповсюдження тощо).

На основі аналізу клінічних симптомів хвороби, патологоанатомічних змін органів і тканин та епізоотологічних даних ветлікар повинен:

1. Поставити попередній діагноз.

2. Відібрати дослідний матеріал від хворих, загинувших (вимушено забитих) тварин.

3. Оформити супровідний документ на відібраний матеріал і надіслати його до лабораторії ветеринарної медицини з нарочним для проведення лабораторної діагностики.

II. Лабораторна діагностика.

Лабораторна діагностика проводиться у спеціалізованій лабораторії ветеринарної медицини на основі дослідження патологічного матеріалу від хворих і загиблих тварин. Враховуючи попередній діагноз, інші дані супровідного документу складають план дослідження матеріалу. Для лабораторної діагностики кожної з відомих вірусних інфекцій розроблені схеми діагностики, які мають певні спільні закономірності.

В цілому методи лабораторної діагностики вірусних інфекцій можна розділити на три групи: 1) експрес-методи; 2) вірусологічні методи; 3) серологічні методи (або методи ретроспективної діагностики).

1. Експрес-методи базуються на швидкому виявленні вірусу або його антигенів безпосередньо в патматеріалі. До цієї групи відносяться такі методи:

- виявлення віріонів вірусів методом світлової мікроскопії (при віспі);

- виявлення віріонів вірусів методами електронної та імуноелектронної мікроскопії (при рота- і коронавірусній інфекціях ВРХ);

- виявлення внутрішньоклітинних тілець-включень вірусів методом світлової мікроскопії (при сказі, віспі, чумі собак та ін.);
- виявлення вірусних антигенів у серологічних реакціях: РІФ, РЗК, РДП, РГА і РЗГА, ІФА.

Експрес-методи дозволяють відносно швидко виявити та ідентифікувати вірус у патматеріалі (не більше 8 годин). Але вони не завжди достовірні і тому потребують підтвердження іншими методами.

2. Вірусологічні методи як правило здійснюються в 2 етапи.

На першому етапі для виділення вірусів використовують наступні методи індикації:

- 1.Зараження лабораторних тварин.
- 2.Зараження курячих ембріонів.
- 3.Зараження культури клітин.

При виборі лабораторного об'єкта враховують дані клініко-епізоотологічного діагнозу і вид тварини, від якої взятий матеріал. Сукупність цих даних дозволяє вибрати необхідну лабораторну систему і метод її зараження. В окремих випадках ставлять біопробу на природно сприйнятливих тваринах.

На другому етапі проводять ідентифікацію вірусу в серологічних реакціях. Для цього використовують специфічні діагностичні сироватки. Вибір серологічної реакції визначається головним чином властивостями вірусу. Вірусологічні методи в лабораторній діагностиці вірусних інфекцій є найбільш вірогідними, тому що їх мета - ізоляція збудника з патматеріалу і наступна його ідентифікація. Проте вони потребують багато часу, особливо в разі проведення "сліпих" пасажів.

3. Серологічні методи, або методи ретроспективної діагностики

Незалежно від результатів ізоляції вірусу з патматеріалу та його ідентифікації проводять дослідження парних сироваток крові на наявність специфічних антитіл. З цією метою від тварини беруть кров двічі, з інтервалом 2-3 тижні, на початку і в кінці хвороби. Зростання титру антитіл у

другій пробі сироватки в чотири і більше разів свідчить про перенесену інфекцію.

1. Додаткові методи діагностики

При діагностиці деяких вірусних хвороб певне значення мають гематологічні, гістологічні та деякі інші методи лабораторних досліджень.

Практична робота

1. Законспектувати основні завдання та структуру вірусологічної лабораторії (відділу). Ознайомитись з документацією вірусологічної лабораторії.

2. Законспектувати і засвоїти основні правила роботи у вірусологічній лабораторії.

3. Ознайомитись та засвоїти порядок обліку, етикетування і збереження вірусних штамів у лабораторії.

4. Засвоїти загальні положення діагностики вірусних інфекцій тварин. Замалювати схему діагностики вірусних інфекцій.

Питання для самоконтролю

1. Які задачі ставляться перед вірусологічною лабораторією (відділом) ?
2. Яка структура вірусологічної лабораторії ?
3. Правила роботи і техніка безпеки у вірусологічній лабораторії.
4. Яким чином здійснюється облік, етикетування та збереження вірусів у лабораторії ?
5. Що включає в себе клініко-епізоотологічний етап діагностики вірусних інфекцій ?
6. Яка загальна схема лабораторної діагностики вірусних інфекцій ?

Література:

1. Калініна О. С., Панікар І. І., Скибицький В. Г. Ветеринарна вірусологія. Херсон : ОЛДІ-ПЛЮС, 2022. 416 с.

2. Капрельянц Л. В., Єгорова А. В., Труфкаті Л. В. Лабораторний практикум із загальної мікробіології і загальної мікроболігії і вірусології : навчальний посібник. Херсон : ОЛДІ-ПЛЮС, 2021. 136 с.

3. Льотка Г. І., Радзиховський М. Л., Дишкант О. В. Загальна вірусологія основи ветеринарної та зоонотичної вірусології - навч. посіб. Вінниця : друк, 2020. 204 с. Ч. 1.

4. Основи вірусології : навч.-метод. посібник з лаб. практикуму / уклад. І. О. Шмараков, О. В. Кеца. 2-ге вид., перероб. Харків : Мачулін, 2015. 160 с.

5. Практикум з ветеринарної вірусології / В. Г. Скибіцький та ін. Київ : Вища освіта, 2005. 208 с.

6. Калініна О.С., Панікар І.І., Скибіцький В.Г. Ветеринарна вірусологія: Підручник. - К.: Вища освіта, 2004. - 432 с.

ТЕМА 2. ВИКОРИСТАННЯ ЛАБОРАТОРНИХ ТВАРИН У ВІРУСОЛОГІЇ

На даний момент лабораторних тварин досить широко використовують у вірусологічній лабораторії з такою метою:

- первинного виділення вірусів з вірусвмісного матеріалу в чистому вигляді (в організмі репродукується лише збудник, а уся інша мікрофлора не розмножується);

- для індикації вірусів у матеріалі.

Індикація — встановлення присутності вірусів у матеріалі за характерними клінічними ознаками, загибеллю тварин у визначені строки, наявністю патологоанатомічних змін в тканинах і органах тварин;

- з метою ідентифікації вірусів у матеріалі, лише у тих випадках, коли зміни, що спричинив вірус в організмі лабораторних тварин є патогномонічними (зустрічаються лише при одному захворюванні).

Ідентифікація - це визначення виду збудника у матеріалі.

- для тривалого зберігання вірусів в умовах лабораторії шляхом проведення послідовних перезаражень тварин (пасажів);
- накопичення вірусної маси, яка необхідна для постановки точних методів діагностики, а також одержання вакцин і діагностиків;
- для визначення титру вірусів;
- в якості тест-об'єкту в реакції нейтралізації;
- одержання гіперімунних сироваток;
- постановки біопроб з характерними клінічними ознаками.

Найчастіше у вірусологічних лабораторіях застосовують білих мишей, кролів, білих щурів і морських свинок, рідше - хом'яків і тхорів. В деяких випадках як лабораторні об'єкти використовуються кури, голуби, кошенята, цуценята. І дуже рідко ставлять біопробу на природно-сприйнятливих тваринах.

У вірусологічній практиці можна використовувати лише тварин, які відповідають наступним вимогам:

- тварини повинні мати чутливість до підозрюваного вірусу;
- тварини повинні бути абсолютно здорові, тобто вільними від збудників, у тому числі тих, що можуть спричинювати латентні інфекції;
- як правило, краще використовувати молодих тварин, а іноді навіть новонароджених, через те, що в них є недостатньо сформованою імунна система (вони є більш чутливими);
- тварини повинні мати стандартну чутливість до вірусу. Стандартна чутливість досягається підбором тварин для зараження певним матеріалом за принципом аналогів, тобто одного виду, одного віку і однієї маси. Краще з цією метою використовувати однолінійних (близькоспоріднених) тварин.
- для одержання вірогідних результатів і виключення фактору індивідуальної резистентності деяких тварин однією пробою досліджуваного матеріалу заражають не менше 4 тварин;

- тварини, які надходять до віварію вірусологічної лабораторії, обов'язково витримують в карантині 2-3 тижні. У випадку встановлення інфекційного захворювання всю партію тварин знищують.

При догляді за тваринами дотримуються наступних правил:

- здорових тварин утримують в спеціальному приміщенні, яке називають *віварієм*;

- заражених та інфікованих тварин необхідно утримувати окремо від здорових в *ізоляторі*;

- тварин утримують у віварії з врахуванням їх фізіологічної потреби в освітленості та температурі. Мишам та щурам необхідна напівтемрява і температура повітря близько 20⁰С, морським свинкам, кролям та курям – денне світло і відповідно температура в межах 16-23⁰С, 14-18⁰С і не нижче 0⁰С;

- щільність розміщення тварин повинна складати приблизно 1 г маси на 1 см² дна клітки;

- тварин забезпечують регулярною та повноцінною годівлею і постійно питною водою;

- для догляду за зараженими тваринами використовують окремий інвентар та годівниці;

- обслуговуючий персонал при роботі в віварії, особливо в ізоляторі користується спецодягом, кожен день дезінфікують інвентар і проводять вологе прибирання з використанням дезінфікуючих засобів. По закінченні експерименту клітки дезінфікують, загиблих тварин знищують спалюванням в печах або автоклавуванням.

Перед зараженням лабораторних тварин обов'язково перевіряють їх клінічний стан, проводять термометрію, а при потребі досліджують пульс і дихання (переписати табл.1).

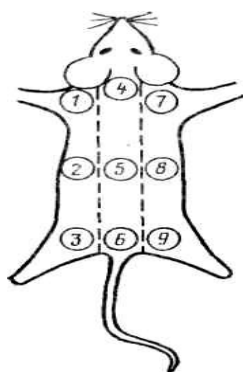
Перед зараженням або одразу після нього необхідно провести маркування лабораторних тварин. В залежності від виду та масті тварини використовують наступні методи маркування тварин.

Таблиця 1

Температура тіла, пульс і дихання у здорових лабораторних тварин

Вид тварин	Температура, °C	Частота пульсу за 1 хв	Частота дихання за 1 хв
Біла миша	37,0-39,0	520-780	140-210
Білий щур	38,5-39,5	345-490	110-150
Морська свинка	37,8-39,5	160-270	100-150
Кріль	37,5-38,8	180-440	50-110
Собака	37,5-39,0	105-125	50-60
Кішка	38,0-39,5	100-120	20-30
Курка	40,5-42,5	180-440	15-30
Голуб	41,0-44,0	140-200	20-40

1. **Кольорова мітка** тварин використовується для маркування тварин білої масті (білих мишей, щурів, іноді інших тварин). Для цього



використовують насичені розчини фарб, краще пікринової кислоти. Одиниці мітять однією фарбою, а десятки іншою. Мічення здійснюють за нижченаведеною схемою.

2. **Ампутація пальців.** Таким способом маркують білих мишей та щурів шляхом ампутації окремих пальців на передніх або задніх кінцівках, кожний з яких відповідає тому або іншому порядковому номеру (на передніх лапах одиниці, на задніх – десятки).

3. При використанні в досліді невеликої кількості тварин і при нетривалому періоді експерименту в тварин, що мають довгу шерсть (кролі) можна її вистригати **знаками**, що відповідають певному номеру на спині або стегнах.

4. Морських свинок можна нумерувати за різним **відтінком**, який реєструють в робочому журналі.

5. **Метод біркування.** Для великих лабораторних тварин і курей використовують металічні чи інші бірки зі штампованим номером. У кролів

бірки фіксують на корені вуха, в морських свинок проколюють вушну раковину, в курей фіксують на кінцівці у формі кільця.

6. Іноді номери ставлять при допомозі *рідкого азоту* (в наукових цілях).

Методи зараження лабораторних тварин.

Вибір методу зараження залежить насамперед від тропізму вірусу. Якщо тропізм вірусу невідомий, то заражають тварин декількома методами.

1. Якщо вірус *дерматотропний*, то заражають тварин:

- підшкірно;
- внутрішньошкірно;
- методом скарифікації.

2. Якщо вірус *пантотропний*, то заражають тварин:

- внутрішньом'язово;
- внутрішньоочеревинно (інтраперитонеально);
- внутрішньовенно;
- інтракардіально.

3. Якщо вірус *пневмотропний*, то проводять інтраназальне зараження.

- Якщо вірус *нейротропний*, то заражають тварин:

- інтрацеребрально;
- інтраспінально;
- субокципітально (підпотилично);
- в периферичний нервовий стовбур (у кролів).

4. Якщо вірус *ентеротропний*, то заражають тварин:

- перорально (з кормом, а також з допомогою тупої голки);
- в шлунок при допомозі зонду або желатинових капсул;
- ректально.

Крім того, іноді використовують інтратестикулярний, інтракорнеальний, інтракон'юнктивальний метод зараження.

Допустимі максимальні дози введення матеріалу наведені в табл. 2.

Таблиця 2

Методи зараження	Кролі	Морські свинки	Білі щурі	Білі миші	Собаки
Внутрішньошкірний	0,1	0,1	0,05	0,02	0,3
Підшкірний	5,0	3,0	3,0	0,5	8,0
Внутрішньом'язовий	5,0	2,0	1,0	0,3	7,0
Інтраперитонеальний	10,0	5,0	2,0	1,0	20,0
Внутрішньовенний	5,0	2,0	2,0	1,0	10,0
Інтраназальний	1,0	0,3	0,1	0,03	5,0
Інтрацеребральний	0,3	0,05	0,03	0,02	0,8

Перед зараженням тварину фіксують, місце введення матеріалу ретельно обробляють: вистригають волосся, шкіру протирають 70⁰ спиртом.

Заражених і мічених тварин розміщують в ізоляторі в окремих клітках і ведуть щоденне спостереження.

Ознаками розмноження вірусів в організмі лабораторних тварин можуть бути клінічні симптоми, патологоанатомічні зміни і загибель. Треба мати на увазі, що загибель тварин у перші дні після зараження може бути пов'язана з травмою або токсичними факторами. Якщо тварини не реагують на зараження, їх вбивають через проміжок часу, що дорівнює двом інкубаційним періодам, і беруть при розтині відповідний патологічний матеріал (з врахуванням тропізму досліджуваного збудника).

Кров у лабораторних тварин беруть з метою одержання сироватки, еритроцитів чи лейкоцитів, іноді для виділення вірусів. Спосіб взяття крові визначається необхідною її кількістю.

Способи взяття великої кількості крові:

1). *пункція серця*: проводять у мишей, щурів, хом'яків, тхорів, морських свинок, кролів, собак і курей; місце введення голки у різних видів тварин таке саме, як при інтракардіальному зараженні;

2). *з яремної вени*: беруть кров у хом'яків, тхорів, морських свинок, кролів, собак і курей у тих випадках, коли не вдається взяти її шляхом пункції серця; вена повинна бути оголена, тварини знаходяться під наркозом;

3). *зі стегнової вени*: беруть кров у мишей, щурів, хом'яків і тхорів; тварину фіксують на спині під наркозом; розрізають шкіру на внутрішній поверхні стегна, оголюють і надрізають судину, збирають кров;

4). *з вени сафена*: беруть кров у собак; тварину фіксують на боці, стискають стегно; пункцію роблять дистально в нижній третині гомілки на латеральному боці;

5). *з підкрильцевої вени*: птицю фіксують на спині, розпрямляють крило, перетискають вену, проколюють її скальпелем і збирають кров.

Способи взяття невеликої кількості крові:

1). *з вушної вени*: беруть кров у кролів, перетискаючи її біля основи вуха;

2). *з хвостової вени*: кров беруть у мишей, щурів і хом'яків під наркозом; хвіст протирають спиртом, ксилолом або занурюють у теплу воду і відрізають його кінчик;

3). *з ретробульбарного сплетіння*: кров беруть у мишей, щурів і хом'яків; тварину фіксують, натискають на шию, затримуючи кровообіг у судинах голови, про що свідчить вип'ячування очей; у внутрішній кут ока вводять капілярну піпетку і спрямовують її в бік гортані; при пошкодженні венозного сплетіння кров потрапляє в піпетку;

4). *з гребня*: кров беруть у курей, проколюючи гребінь або відрізаючи зубець; для попередження кровотечі рану після взяття крові припалюють або обробляють заліза хлоридом.

Після взяття великої кількості крові тваринам вводять підшкірно стерильний фізрозчин: мишам - 1-2 мл, щурам і морським свинкам - 10 мл, кролям - 20 мл.

Знекровлювання тварин

Цю операцію проводять під наркозом наступними методами:

- шляхом розрізання шийних судин або підключичного судинного сплетіння (миші, щурі, хом'яки);
- розрізанням сонної артерії (морські свинки, кролі, собаки);

- відрізають голову або оглушують по голові і перерізають шийні судини (кури).

Умертвіння тварин

Після закінчення досліду тварин, що залишилися живими, необхідно умертвити. Найбільш часто використовують такі способи умертвіння:

- поміщають тварин під скляний ковпак, куди кладуть ватний тампон, змочений ефіром або хлороформом;

- дрібних тварин можна вбити шляхом розриву спинного мозку. Для цього тварину тримають за потилицю та хвіст і швидким коротким рухом розтягають до відчуття обриву нитки;

- декапітація (відрізання голови).

- внутрішньовенна ін'єкція хлоралгідрату (0,5 г/кг) або насиченого розчину магнію сульфату (20-40 мл).

Розтин заражених лабораторних тварин проводять одразу після загибелі з метою аналізу патологоанатомічних змін і відбору вірусовмісного матеріалу.

Розтин проводять у наступному порядку:

1. Труп дрібних тварин фіксують голками на дошці або кюветі з парафіном в спинному положенні. Для великих тварин використовують спеціальні столики або дошки з відповідними фіксуючими пристосуваннями.

2. Розтин проводять з дотриманням правил асептики та антисептики. Основне правило розтину: до трупа можна торкатися тільки інструментами або руками в гумових рукавицях.

3. Перед розтином шкіру обробляють спиртом або дезрозчином (3-5%-ний фенол).

4. Для препарування шкіри і підшкірної клітковини роблять розріз по середній лінії від симфізу до шиї, а далі - в напрямку до кінцівок. Шкіру відпрепаровують і фіксують голками.

5. Для розтину черевної порожнини роблять розріз черевної стінки по середній лінії від симфізу до мечовидного відростка, а далі - під лінією діафрагми. Утворені трикутники черевної стінки відводять вбік і фіксують.

5. Пінцетом відтягують кишечник вліво до появи паренхіматозних органів. Як вірусовмісний матеріал використовують шматочки печінки, селезінки, нирок, мезентеріальних лімфовузлів, ділянок кишечника при наявності патологоанатомічних змін або з врахуванням клінічних ознак перед загибеллю. У дрібних тварин беруть цілі органи. Органи поміщають в стерильні флакони або чашки Петрі.

6. При розтині грудної порожнини розрізають ребра і видаляють їх разом з грудною кісткою. Для дослідження беруть легені, середостінні лімфовузли, трахею.

7. Для розтину черепної порожнини тварину кладуть на черево, фіксують передні кінцівки і голову. Розріз шкіри роблять у ділянці шиї і в напрямку до очниць. Шкіру разом з вухами відпрепаровують і стягують вперед, оголюючи черепну коробку. Розріз черепної кістки проводять від великого мозкового отвору в напрямку до очниць. Потім розрізають черепну кістку між очницями і видаляють усю вирізану ділянку. У великих тварин кістки черепа розпилюють. З основи черепа дістають головний мозок, підрізавши черепно-мозкові нерви.

Патматеріал від заражених лабораторних тварин беруть згідно з тропізмом вірусу і використовують для ідентифікації виділеного збудника або наступних вірусологічних досліджень (проведення пасажу, приготування антигену тощо). Патматеріал зберігають у замороженому стані при -20-70°C.

Техніка зараження лабораторних тварин.

Підшкірне зараження. У тварин місце ін'єкції - в ділянці спини або на боці, у курей - на шиї. Захоплюють та відтягують складку шкіри і в її основу паралельно до поверхні тіла вводять голку.

Внутрішньошкірне зараження. У кролів на боці або череві вистригають і виголюють шерсть. Тонку голку скосом назовні вводять паралельно до

поверхні шкіри так, щоб голка просвічувалася крізь епідерміс. Матеріал вводять до припіднімання шкіри у вигляді бугорка. Дрібним тваринам зараження проводять у плантарну поверхню задньої кінцівки, вводячи голку в шкіру в напрямку від пальців до заплюсневого суглоба.

Зараження у скарифіковану шкіру. У кролів на боці або череві вистригають і виголюють шерсть, роблять декілька поверхневих подряпин голкою або пастерівською піпеткою (до появи крапель лімфи). Потім наносять матеріал і втирають шпателем, скляною паличкою або ватним тампоном. Зараження в скарифіковану шкіру у дрібних тварин проводять в ділянці спини, в півнів - у гребінь і сережки, а також у пір'яні фолікули гомілки зразу після видалення пір'я.

Внутрішньом'язове зараження. Місце зараження у тварин - м'язи стегна, у курей - великий грудний м'яз. Голку вводять через шкіру і підшкірну клітковину в м'язи, спрямовуючи її перпендикулярно до поверхні тіла.

Внутрішньочеревне (інтраперитонеальне) зараження. Тварину фіксують вертикально вниз головою для того, щоб органи черевної порожнини змістилися до діафрагми і не травмувати кишечник при інюкуляції матеріалу. Відтягують задню кінцівку тварини і вводять голку в ділянці паху під кутом 45° до поздовжньої осі тіла на глибину 0,3-0,5 см. У курей місце ін'єкції при внутрішньочеревному зараженні знаходиться на середині відстані між верхівкою грудної кістки і клоакою.

Внутрішньовенне зараження. Кролів заражають у крайову вену вуха, перетискаючи її нижче місця уколу. Голку вводять у судину в напрямку до голови приблизно на 1 см. Білих мишей і щурів заражають у бокові вени хвоста, для розширення яких хвіст розтирають ксилолом або витримують в теплій воді. Хвіст перетискають біля основи, вводять голку скосом назовні у вену нижньої третини хвоста, де шкіра тонша, в напрямку до тулуба. Якщо голка потрапила в судину, то рідина легко поступає із шприца, а судина на всьому проміжку біліє. Для внутрішньовенного зараження хом'яка, морської свинки і тхора необхідне хірургічне оголення яремної вени. У цих тварин

замість внутрішньовенного частіше застосовують інтракардіальне введення інфекційного матеріалу. Собакам внутрішньовенне зараження проводять у вену сафена, у курей - в підкрильцеву вену.

Інтраназальне зараження. Проводять обов'язково під ефірним наркозом (за винятком кролів), щоб уникнути розбризкування вірусомісної суспензії при чханні тварини. Тварин, що заснули, фіксують ніздрями догори. Інфекційний матеріал вводять шприцом у кожну ніздрю.

Інтрацеребральне зараження. У молодих кролів і морських свинок проколюють шкіру і череп у надочному жолобі, де кістка досить тонка. Використовують голку з обмежувачем, який забезпечує її проникнення не більше ніж на 4-5 мм. Кролів старшого віку заражають інтрацеребрально через трепанаційний отвір, зроблений на 2 см вище поперекової лінії, умовно проведеної між зіницями. У мишей і щурів голкою з обмежувачем проколюють шкіру і череп на глибину 1 -2 мм в точці, яка лежить у центрі квадрата, утвореного середньою сагітальною лінією і перпендикуляром до неї по зовнішньому краю очниць.

Субоципітальне (підпотиличне) зараження. Проводять у кролів. Голову тварини нахиляють під прямим кутом. Голку вводять точно по середній лінії потиличної частини голови, між остистим відростком першого шийного хребця і бугром потиличної кістки, перпендикулярно до поверхні шкіри на глибину 0,5 см до відчуття проколу твердої мозкової оболонки. Коли з голки витекло 1-2 краплі спинномозкової рідини, на голку насаджують шприц і вводять інфекційний матеріал в максимальній кількості 1 мл.

Інтраспінальне зараження. Проводять під ефірним наркозом. Тварину фіксують так, щоб хребет був сильно зігнутий в попереку. Голку з обмежувачем вводять у ділянці останнього поперекового і першого крижового хребців, трохи в бік від середньої лінії, в центрострімливому напрямку під кутом 45° до проколу твердої мозкової оболонки.

Зараження в периферичний нервовий стовбур. Проводять у кролів під ефірним наркозом у стовбур сідничного нерва. Тварину фіксують спиною догори. Роблять розріз шкіри на 1,5-2 см по лінії від гребня клубової кістки до великого вертела. З допомогою розширювача відсувають великий сідничний м'яз по середній частині пучка, не розрізуючи його, і в глибині рани виявляють сідничний нерв, який розпізнають по перламутровому забарвленню. Під нервовий стовбур підводять жолобуватий зонд і тонкою голкою в центрострімливому напрямку вводять 0,05 мл інфекційного матеріалу. Рану закривають з допомогою швів.

Інтракардіальне зараження. Проводять під ефірним наркозом. Тварин фіксують на спині, курей - на боці. Місце ін'єкцій: у миші - 0,5 см над верхівковим поштовхом серця, безпосередньо біля грудної кістки; у щура - 1 см над верхівковим поштовхом серця, 1-2 мм від краю грудної кістки; у хом'яка - 4-5-й міжреберний простір, 23 мм від краю грудної кістки; у морської свинки - 2-й міжреберний простір, 2 мм від краю грудної кістки; у тхора - границя 3/4 верхньої і 1/4 нижньої частини довжини грудної кістки, 3 мм від краю грудної кістки; у кроля - 3-й міжреберний простір, 3 мм від краю грудної кістки; у собаки - в залежності від розмірів тварини 2-4 см над верхівковим поштовхом серця, 1-2 см від краю грудної кістки; у курки - 3-4-й міжреберний простір, на лінії плече лопаткового суглоба і каудального кінця грудної кістки. Голку вводять перпендикулярно до поверхні тіла до того моменту, поки не буде відчуватися пульсація серця і в просвіті голки не з'явиться кров.

Інтралестулярне зараження. Проводять у кролів. Тварину фіксують на спині, широко розводять задні кінцівки. Сім'яники відводять трохи вперед, фіксують та інокулюють інфекційний матеріал в дозі 0,3 мл.

Зараження в око. Проводять у кролів такими способами:

1). зараження на рогівку: рогівку знеболюють 10%-ним розчином новокаїну; натискають на край очного яблука, виводячи його з орбіти назовні, і промивають стерильним фізрозчином; вісп'яним ланцетом наносять

на рогівку вертикальні та горизонтальні насічки і стерильним тампоном втирають у скарифіковану рогівку інфекційний матеріал;

2). *зараження в рогівку (внутрішньокорнеальне зараження)*: підготовлюють око вищеописаним способом і тонкою голкою вводять інфекційний матеріал в 2-3 точки;

3). *зараження в передню камеру ока*: після підготовки ока вищеописаним способом вводять тонку голку на рівні краю рогівки в передню камеру ока, не пошкоджуючи райдужної оболонки; коли з голки витече 1-2 краплі очної рідини, насаджують шприц і вводять інфекційний матеріал в максимальній дозі 0,2 мл. Зараження проводять лише в одне око.

Зараження в кон'юнктиву ока. Проводять у кролів. Притримують повіки тварини і вносять 1 -2 краплі інфекційного матеріалу у внутрішній кут ока. Також можна відтягнути нижню повіку і ввести вірусовмісний матеріал у кон'юнктивальний мішок або втерти в кон'юнктиву після попереднього подразнення чи скарифікації.

Зараження через травний тракт. Проводять трьома способами:

1). *перорально*: вірусовмісний матеріал вводять з кормом, а також з допомогою тупої голки, не торкаючись слизової оболонки рота, по парі крапель на один прийом; через декілька секунд процедуру повторюють;

2). *зараження в шлунок*: інфекційний матеріал вводять з допомогою зонда або желатинових капсул;

3). *ректально*: підігрітий до температури тіла вірусовмісний матеріал вводять з допомогою гумової груші або шприца; анальний отвір заклеюють лейкопластиром, створюючи копростаз, що прискорює поширення по організму збудника. Максимальна доза для зараження: для мишей - 0,5 мл, для щурів і морських свинок - 2 мл, для кролів - 5 мл.

Практична робота

1. Законспектувати вимоги щодо лабораторних тварин, особливостей утримання та догляду за ними.

2. Законспектувати особливості підготовки тварин до зараження дослідним матеріалом. Оволодіти методами мічення лабораторних тварин.
3. Засвоїти методи зараження лабораторних тварин.
4. Засвоїти методи та техніку взяття крові від лабораторних тварин.
5. Законспектувати схему розтину лабораторних тварин, оволодіти навичками розтину лабораторних тварин.

Питання для самоконтролю

1. З якою метою використовують лабораторних тварин у вірусологічній практиці ?
2. Які вимоги ставляться до лабораторних тварин перед зараженням ?
3. Умови догляду та утримання лабораторних тварин.
4. Яким чином здійснюється підготовка тварин до зараження ?
5. Які основні методи зараження лабораторних тварин ?
6. Від чого залежить вибір того чи іншого методу зараження тварин ?
7. З якою метою і яким чином беруть кров від лабораторних тварин ?
8. Які ви знаєте методи знекровлювання та умертвіння лабораторних тварин.
9. Відновіть послідовність розтину лабораторних тварин.

Література:

1. Калініна О. С., Панікар І. І., Скибицький В. Г. Ветеринарна вірусологія. Херсон : ОЛДІ-ПЛЮС, 2022. 416 с.
2. Капрельянц Л. В., Єгорова А. В., Труфкаті Л. В. Лабораторний практикум із загальної мікробіології і загальної мікроболігії і вірусології : навчальний посібник. Херсон : ОЛДІ-ПЛЮС, 2021. 136 с.
3. Льотка Г. І., Радзиховський М. Л., Дишкант О. В. Загальна вірусологія основи ветеринарної та зоонотичної вірусології - навч. посіб. Вінниця : друк, 2020. 204 с. Ч. 1.
4. Основи вірусології : навч.-метод. посібник з лаб. практикуму / уклад. І. О. Шмараков, О. В. Кеца. 2-ге вид., перероб. Харків : Мачулін, 2015. 160 с.

5. Практикум з ветеринарної вірусології / В. Г. Скибіцький та ін. Київ : Вища освіта, 2005. 208 с.

6. Калініна О.С., Панікар І.І., Скибіцький В.Г. Ветеринарна вірусологія: Підручник. - К.: Вища освіта, 2004. - 432 с.

ТЕМА 3. КУЛЬТИВУВАННЯ ВІРУСІВ НА РОЗВИНЕНИХ КУРЯЧИХ ЕМБРІОНАХ

Курячі ембріони використовують у вірусології для первинного виділення вірусу з патматеріалу, індикації вірусів у патматеріалі; тривалого зберігання та підтримання вірусних штамів у лабораторії, для накопичення вірусної маси при одержанні вакцин і діагностикумів і з метою постановки серологічних реакцій, титрування вірусів і як тест-об'єкт у реакції нейтралізації.

Курячі ембріони мають ряд суттєвих переваг порівняно із лабораторними тваринами, а саме:

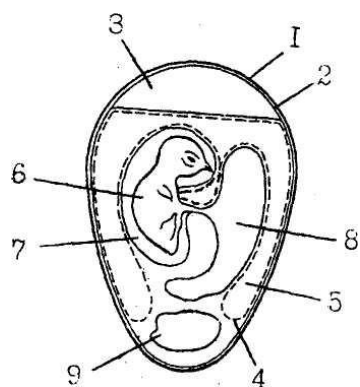
- можливість розширити спектр вірусів, які культивуються в лабораторних умовах;
- в курячих ембріонах розмножуються всі пташині віруси і багато вірусів ссавців, які не розмножуються в організмі лабораторних тварин;
- їм властива висока чутливість до вірусів, що пояснюється недостатнім розвитком захисних механізмів;
- курячі ембріони стерильні. Стерильність пов'язана з шкаралупою, яка в нормі не пропускає всередину яйця мікрофлору;
- при зараженні курячих ембріонів одержують значно більший вихід вірусу;
- курячі ембріони доступні для будь-якої діагностичної лабораторії;
- працювати з ними більш безпечно;

- в залежності від тропізму, віруси можуть репродукуватися в клітинах тіла зародка, амніону, ХАО і жовткового мішка, нагромаджуючись у найбільшій концентрації у відповідних структурах. Одночасно багато вірусів здатні накопичуватись і в порожнинах – алантоїсній та амніотичній.

Будова курячого ембріона представлена на рис. 1.

Усі структури ембріону походять з 3 зародкових листків: ектодерми, ентодерми та мезодерми. На 3 добу розвитку ембріона з енто- та мезодерми починає формуватись алантоїс, як випинання первинної кишки. В процесі ембріогенезу він збільшується в розмірах, огортаючи плід і амніон і до 10-11 доби замикається в гострому кінці яйця. В алантоїсі нагромаджуються до 8-10 мл алантоїсної рідини в якій є сечокислі солі, фосфорні та азотисті сполуки.

Хоріон формується з екто- та мезодерми. На 10 добу розвитку ембріону хоріон оточує усе вмістище яйця. Найбільшою судиною ХАО є головна алантоїсна вена, яка починає пульсувати з 11-12 доби ембріогенезу.



- 1 - шкаралупа
- 2 - підшкаралупна оболонка
- 3 - повітряна камера
- 4 - хоріоалантоїсна оболонка
- 5 - алантоїсна порожнина
- 6 - тіло зародка
- 7 - амніотична порожнина
- 8 - жовтковий мішок
- 9 - білок

Рис. 1 Будова курячого ембріону

На 10-11 добу ембріогенезу зовнішній листок алантоїсу зрощується з внутрішнім листком хоріону, формуючи хоріоалантоїсну оболонку (ХАО), в товщі якої є багато кровоносних судин.

Амніон формується з енто- та мезодерми утворюючи амніотичну порожнину в якій міститься близько 1 мл амніотичної рідини. В амніоні вільно плаває зародок, який розташований ексцентрично (спиною до

шкаралупи, голова спрямована в бік повітряної камери). Зародок пуповиною зв'язаний із жовтковим мішком, який представляє собою резервуар поживних речовин. По мірі росту зародка розміри його зменшуються.

В гострому кінці яйця знаходиться залишок білка.

Зовні ембріон вкритий твердою пористою шкаралупою, до якої прилягає підшкаралупна оболонка. Біля тупого кінця яйця вона розділяється на два листки, між якими утворюється повітряна камера (пуга). До підшкаралупної оболонки прилягає хоріонлантоїсна оболонка (ХАО), що пронизана кровоносними судинами і виконує функцію органа дихання ембріона.

Зараження в ту чи іншу структуру курячого ембріона проводять у період її максимального розвитку, коли кількість чутливих клітин є найбільшою.

Для одержання РКЕ беруть яйці, які відповідають наступним вимогам:

- повинні бути одержані з спеціальних господарств, де проводиться контроль на наявність у курей гострих і особливо латентних інфекцій, оскільки курячі ембріони від зараженої птиці можуть містити різні патогенні агенти (віруси, бактерії, мікоплазми, хламідії), що ускладнює роботу і призводить до помилкових висновків;

- маса яєць повинна бути не менша 52 грамів;

- одержані від курей білих яєчних порід (Леггорн, Російська біла тощо), віком 9 місяців;

- повинні мати правильну форму, тонку білу шкаралупу, без наростів, тріщин та деформацій;

- повинні бути свіжими, від моменту знесення до інкубації не повинно пройти більше 6 діб;

- повинні бути чистими але не митими, оскільки миття призводить до втрати бар'єрної функції шкаралупи;

- повітряна камера повинна бути в тупому кінці яйця, нерухома, діаметром 1,8 см;

- жовток розташований по центру яйця, співвідношення білка до жовтка повинно бути 2 : 1;

- повинні бути повноцінними. Повноцінність контролюється за вмістом вітаміну А (6-8 мкг і більше), вітаміну В₂ (4-6 і більше) і каротиноїдів (15-18 мкг і більше);

- виводимість яєць повинна бути не менше 70%.

Для культивування вірусів бажано використовувати курячі ембріони віком від 5 до 12 днів. Ембріони старшого віку менш чутливі до вірусів, оскільки на 13-14 добу ембріогенезу різко підвищується концентрація неспецифічних інгібіторів.

Підготовка курячих ембріонів до зараження

1. Перед закладанням в інкубатор, а також за 2 години до зараження РКЕ дезінфікують парами формальдегіду при температурі 37°C і вологості 70%.

2. В лабораторії курячі ембріони інкубують в автоматичних інкубаторах при температурі 37°C, вологості 60-70%. Якщо інкубацію здійснюють в звичайних термостатах, то для підтримання вологості на дно термостату ставлять кювети з водою і 3-4 рази на добу вентилюють та перевертають яйці. Вентиляційні отвори в термостаті повинні бути відкриті.

3. Перед зараженням ембріони розглядають на овоскопі в темному приміщенні. При цьому встановлюють їх життєздатність на основі таких ознак: судини ХАО кровонаповненні проглядаються під овоскопом у вигляді безперервних темних тяжів з чітко окресленими краями, зародок самостійно рухається, з 12 доби ембріогенезу, має прояв пульсація головної алантоїсної вени ХАО. Якщо зародок загинув, то по ходу судин спостерігають темні плями – скупчення крові, судини нечіткі, розпливчасті, самостійні рухи ембріону відсутні. Овоскопія дозволяє вибракувати загиблі ембріони та незапліднені (“бовтуни”) яйці.

4. Під час овоскопії проводять також маркування ембріонів для орієнтування під час їх зараження. На шкаралупі простим олівцем відмічають

межу повітряної камери, місце розташування зародка, ділянку безсудинної зони розміром 0,5 x 0,5 см.

5. Шкаралупу перед зараженням обробляють 0,5%-ним спиртовим розчином йоду і протирають спиртовим тампоном, що запалений.

6. Перед зараженням ембріони фіксують у спеціальних підставках, що встановлені на спеціальних підставках в емальованій кюветі з 3-4 шарами марлі змоченою дезінфікуючим розчином.

З метою створення оптимальних умов для репродукції різних вірусів в курячих ембріонах запропоновано ряд нижченаведених методів їх зараження, розроблених з урахуванням тропізму збудників і проводиться введенням 0,1-0,2 мл інфекційного матеріалу.

Існують такі методи зараження РКЕ.

1. Зараження в алантоїсну порожнину. Використовують 9-11-добові ембріони. Розрізняють 2 способи зараження:

а). ембріон розміщують вертикально. В шкаралупі роблять отвір на 5-6 мм вище межі повітряної камери. Голку вводять вертикально на глибину 10-12 мм. Після внесення вірусовмісного матеріалу отвір закривають краплею розплавленого парафіну чи лейкопластиром (рис. 2);

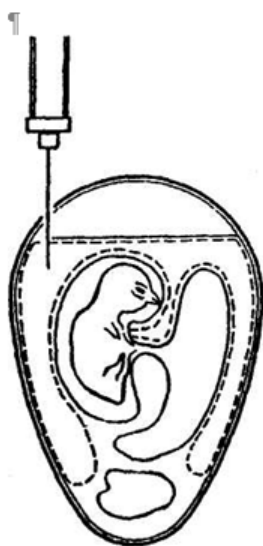


Рис. 2

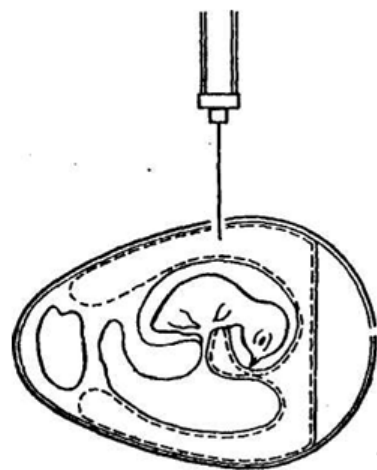


Рис. 3

Двт

б). ембріон кладуть горизонтально. На боковій поверхні шкаралупи роблять отвір (попередньо на овоскопі вибирають ділянку ХАО без судин) і вводять голку на глибину 2-3 мм. Щоб рідина не витікала, необхідно зробити

ще один отвір над повітряною камерою. Після зараження отвори закривають парафіном (рис. 3).

2. Зараження на ХАО. Використовують 10-12-добові РКЕ. Існує 2 способи зараження

а). *через природну повітряну камеру.* Ембріон розміщують вертикально. В шкаралупі над повітряною камерою вирізають отвір діаметром 1,5-2 см. Пінцетом обережно знімають підшкаралупну оболонку, не пошкоджуючи ХАО, і наносять вірусовмісний матеріал. Отвір закривають лейкопластиром (рис. 4).

б). *через штучну повітряну камеру.* Ембріон розміщують горизонтально. В шкаралупі роблять два отвори: один, невеликий, - над центром повітряної камери, а другий, довжиною 6-8 мм і шириною 2 мм, - на боковій поверхні над безсудинною ділянкою ХАО, яку попередньо вибирають на овоскопі. Оголену підшкаралупну оболонку обережно проколюють, не пошкоджуючи ХАО. Гумовою грушою відсмоктують повітря з природної повітряної камери. При цьому ХАО переміщається і утворюється штучна повітряна камера. Через боковий отвір наносять на ХАО вірусовмісний матеріал. Боковий отвір закривають лейкопластиром, а отвір над повітряною камерою - парафіном. Інкубацію ембріонів проводять у горизонтальному положенні боковим отвором догори (рис. 5).

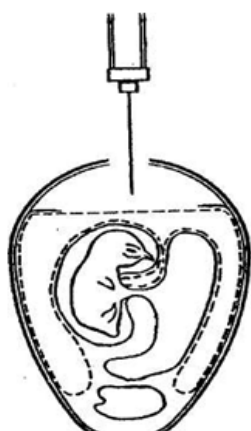


Рис. 4

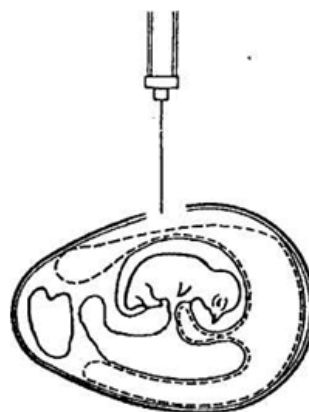


Рис. 5

3. *Зараження в жовтковий мішок.* Використовують 4-6-добові РКЕ. Зараження можна проводити 2 способами:

а). ембріон розміщують вертикально. Роблять отвір у шкаралупі над центром повітряної камери. Голку вводять на глибину 3,5-4 см під кутом 45° до вертикальної осі в напрямку, протилежному місцю знаходження зародка. Після інокуляції вірусовмісного матеріалу отвір закривають парафіном (рис. 6);

б). ембріон розміщують горизонтально так, щоб жовтковий мішок був угорі, а зародок - внизу. Отвір роблять у шкаралупі з боку жовткового мішка на середині довжини яйця. Голку вводять вертикально на глибину 1 см. Після зараження отвір закривають парафіном (рис. 7).

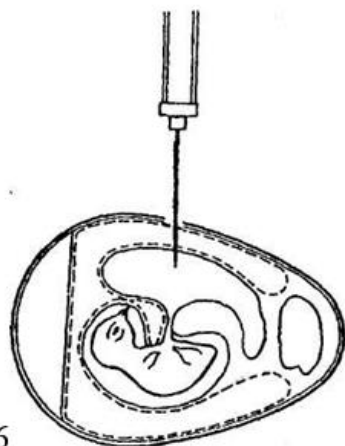


Рис. 6

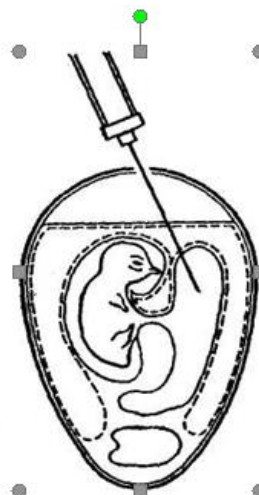


Рис. 7

4. *Зараження в амніотичну порожнину.* Використовують 6-10-добові ембріони. Розрізняють закритий та відкритий спосіб зараження.

а). *закритий спосіб.* Зараження проводять у затемненому боксі на овоскопі. Ембріон розміщують горизонтально. Роблять отвір у шкаралупі по центру повітряної камери. Вводять голку з затупленим кінцем у напрямку до зародка, легким поштовхом проколюють амніон та інокулюють вірусовмісний матеріал. Доказом того, що голка потрапила в амніон, є рух зародка в напрямку пересування голки і відчуття слабкого опору при введенні матеріалу. Якщо голка знаходиться в алантоїсній порожнині,

суспензія зі шприца вільно вводиться в яйце. Після зараження отвір закривають (рис. 8).

б). *відкритий спосіб*. Ембріон кладуть вертикально. В шкаралупі над повітряною камерою вирізають отвір діаметром 1-1,5 см. Пінцетом знімають підшкаралупну оболонку. Пінцет із зімкненими браншами вводять у напрямку до зародка, захоплюють амніотичну оболонку разом з ХАО і підтягують до отвору. Голку вводять в амніон та інокулюють вірусовмісний матеріал. Далі оболонки відпускають, а отвір закривають (рис. 9).

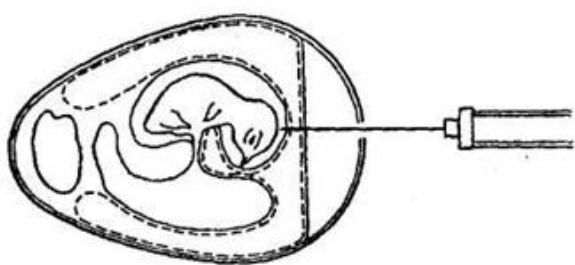


Рис. 8



Рис. 9

5

Зараження зародка в тіло. Використовують 7-12-добові ембріони. Існує 2 способи зараження:

а). заражають так само, як в амніон закритим способом, з тією різницею, що беруть гостру голку. Ознакою того, що голка потрапила в тіло зародка, є підкорення зародка рухам голки.

б). заражають так само, як в амніон відкритим способом. Через отвір в шкаралупі підтягують зародок. Матеріал вводять в різні ділянки тіла зародка або в головний мозок.

б. *Зараження в судини ХАО*. Використовують 11-12-добові ембріони. Заражають 2 способами:

а). зараження проводять на овоскопі. Вибирають велику судину, по ходу якої обережно видаляють невелику ділянку шкаралупи. На підшкаралупну оболонку наносять краплю спирту, оболонка стає прозорою. Тонку голку вводять у судину, що підтверджується її рухливістю при незначних бокових рухах голки. Після введення вірусовмісного матеріалу отвір закривають.

б). ембріон розміщують вертикально, зрізають шкаралупу над повітряною камерою. На підшкаралупну оболонку наносять декілька крапель спирту, оболонка стає прозорою. Вибирають велику судину і вводять вірусовмісний матеріал. Отвір закривають лейкопластиром.

7. Зараження в повітряну камеру. Використовують 8-12-добові ембріони.

Ембріон розміщують вертикально. Роблять отвір у шкаралупі над центром повітряної камери. Голку вводять на глибину до 1 см та інокулюють вірусовмісний матеріал на підшкаралупну оболонку. Отвір закривають парафіном.

Заражені ембріони підписують простим олівцем, кладуть у термостат і щодня розглядають на овоскопі. Ембріони, що загинули, переносять у холодильник і витримують 16-18 год. при 4°C або 1-2 год. при -10-20°C. Це значно полегшує їх наступний розтин внаслідок ущільнення тканини та звуження судин і дає можливість одержати чисті ембріональні рідини.

Загибель ембріонів в перші 24 год. після зараження зумовлена частіше всього бактеріальним чи грибковим забрудненням при нестерильній роботі або травмуванням зародка при зараженні. Така загибель вважається неспецифічною. Але існують віруси, які можуть викликати швидку загибель ембріонів (наприклад, високовірулентні штами вірусів грипу птиці або Ньюкаслської хвороби).

Якщо ембріони не гинуть, їх інкубують до моменту максимального нагромадження збудника (кожний вірус має певний цикл репродукції), а потім умертвляють охолодженням і розтинають.

Розтин курячих ембріонів проводять у стерильних умовах з метою відбору вірусовмісного матеріалу та аналізу патологоанатомічних змін. Як вірусовмісний матеріал можуть бути використані алантоїсна та амніотична рідина, ХАО, жовтковий мішок, тіло зародка (в залежності від тропізму вірусу).

Методика розтину курячих ембріонів

1. Шкаралупу протирають 2%-ним спиртовим розчином йоду і зрізають вище межі повітряної камери.

2. Проколюють підшкаралупну оболонку разом з ХАО (в безсудинній ділянці), пінцетом притримують структури ембріона і пастерівською піпеткою відбирають до 10 мл алантоїсної рідини.

3. Піпетку вводять в амніон під шию зародка і відбирають до 1 мл амніотичної рідини.

4. Пінцетом піднімають верхню частину ХАО, зрізають ножицями і вміщують у чашку Петрі з фізрозчином.

5. Виймають зародок, підтримуючи його за шию і відділяючи від пупкового канатика.

6. Жовтковий мішок і білок вносять у чашку Петрі.

7. Частину ХАО, що залишилася на шкаралупі, виймають пінцетом, поміщають у чашку Петрі з фізрозчином, промивають до одержання прозорої рідини, розправляють двома пінцетами і розглядають на темному фоні.

8. Двома пінцетами беруть жовтковий мішок, витискають його вміст, переносять у чашку Петрі з фізрозчином і промивають.

Вірусвмісний матеріал, одержаний при розтині курячих ембріонів, перевіряють на стерильність (посіви на МПА, МПБ, МППБ, середовище Сабуро) і використовують для ідентифікації виділеного збудника або наступного пасажу. Зберігають матеріал при -20-70°C.

Ознаками розмноження вірусів у РКЕ можуть бути:

1. Загибель (у характерні для кожного виду вірусу строки).
2. Наявність патологоанатомічних змін:

- а) зміна об'єму і кольору ембріональних рідин;
- б) помутніння і набряк ХАО;
- в) утворення на ХАО некротичних вузликів-віспин або вогнищ проліферації - пустул чи бляшок;
- г) набряк амніотичної оболонки;
- д) зміна кольору і морщення жовткового мішка;
- є) карликовість і муміфікація зародка;
- є) гіперемія, крововиливи і набряки на тілі зародка;
- ж) збільшення печінки і селезінки;
- з) некротичні вогнища в печінці, селезінці, нирках;
- и) зміна кольору печінки.

3. Гемаглютинація з ембріональними рідинами. Особливо цінна ця реакція при виявленні вірусів, які розмножуються в курячому ембріоні, але не викликають жодних змін (наприклад, віруси грипу коней, парагрипу-3 ВРХ, слабковірулентні штами вірусу хвороби Ньюкасла).

Практична робота

1. Замалювати схему будови розвиненого курячого ембріону (РКЕ).
2. Законспектувати вимоги щодо яєць які використовуються для одержання РКЕ.
3. Оволодіти навичками підготовки курячих ембріонів.
4. Оволодіти методами зараження РКЕ.
5. Засвоїти методику підготовки до розтину та безпосередньо розтину РКЕ.

Питання для самоконтролю

1. З якою метою використовують РКЕ у вірусології ?
2. Переваги використання РКЕ щодо лабораторних тварин.
3. Будова курячого ембріона.

4. Основні вимоги до яєць, що використовують для одержання курячих ембріонів.
5. Який порядок підготовки РКЕ до зараження ?
6. Відзначте основні методи зараження РКЕ ?
7. Відновіть послідовність розтину РКЕ ?
8. Які основні ознаки розмноження вірусів в РКЕ ?

Література:

1. Калініна О. С., Панікар І. І., Скибицький В. Г. Ветеринарна вірусологія. Херсон : ОЛДІ-ПЛЮС, 2022. 416 с.
2. Капрельянц Л. В., Єгорова А. В., Труфкаті Л. В. Лабораторний практикум із загальної мікробіології і загальної мікроболігії і вірусології : навчальний посібник. Херсон : ОЛДІ-ПЛЮС, 2021. 136 с.
3. Льотка Г. І., Радзиховський М. Л., Дишкант О. В. Загальна вірусологія основи ветеринарної та зоонотичної вірусології - навч. посіб. Вінниця : друк, 2020. 204 с. Ч. 1.
4. Основи вірусології : навч.-метод. посібник з лаб. практикуму / уклад. І. О. Шмараков, О. В. Кеца. 2-ге вид., перероб. Харків : Мачулін, 2015. 160 с.
5. Практикум з ветеринарної вірусології / В. Г. Скибіцький та ін. Київ : Вища освіта, 2005. 208 с.
6. Калініна О.С., Панікар І.І., Скибіцький В.Г. Ветеринарна вірусологія: Підручник. - К.: Вища освіта, 2004. - 432 с.

ТЕМА 4. КУЛЬТИВУВАННЯ ВІРУСІВ У КУЛЬТУРАХ КЛІТИН

У вірусологічній практиці культура клітин використовується для первинного виділення вірусу з патологічного матеріалу, індикації вірусів, підтримання вірусних штамів у лабораторії, нагромадження вірусів при виготовленні вакцин і діагностиків, титрування вірусів і як тест-об'єкт в реакції нейтралізації.

Культури клітин мають суттєві переваги у порівнянні з іншими тест-об'єктами (лабораторними тваринами, розвиненими курячими ембріонами), а саме:

1). культура клітин знімає видові обмеження культивування вірусів, оскільки *in vitro* можна вирощувати будь-які клітини різних видів тварин, практично для усіх відомих вірусів підібрані культури клітин в умовах лабораторії можна виділити будь-який вірус;

2). *in vitro* досягається зараженням практично всіх клітин, що дає можливість одержати вірусовмісний матеріал з найвищою концентрацією вірусу при найменшому вмісті баластних білків;

3). в культурі клітин одержують готову суспензію вірусу (у вигляді культуральної рідини), вільну від бактерій і грибів, яку одразу можна використовувати для індикації та ідентифікації вірусу;

4). культура клітин дає широкі можливості безперервного контролю за ходом інфекційного процесу, а також втручання в нього в будь-який момент, не порушуючи цілісності живої системи;

5). простота інфікування та економічність.

У 1966 р. в Сан-Франциску на щорічному засіданні Асоціації тканинних культур була запропонована уніфікована термінологія для тканинних культур тварин. Згідно сучасної класифікації усі тканинні культури об'єднані збірним поняттям – культура тканин.

Культура тканин – це збірне поняття, що означає систему, в якій клітини, тканини або органи зберігають життєздатність або властивість розмножуватися *in vitro* більше 24 годин.

Розрізняють органну культуру і культуру клітин.

Органна культура – це підтримання *in vitro* фрагментів тканин, цілих органів або їх частин при збереженні їх структури і функції. Органні культури не здатні до розмноження. В органних культурах успішно вирощують шматочки слизової оболонки носа і трахеї, шкіри, легень, печінки, селезінки та інших органів. При цьому зберігається не тільки

структура тканини, але й деякі функціональні особливості (миготіння війок, секреція слизу).

Культура клітин – це клітини, одержані в результаті диспергування тканин, які живуть і розмножуються *in vitro* (без утворення тканини). Культури клітин втрачають гістологічну і біохімічну диференціацію, характерну для вихідної тканини.

Таблиця 1

Властивості	Одношарові культури клітин			
	Первинні	Субкультури	Пересівні	Диплоїдні
Походження	з тканин і органів	з первинних	з первинних	з первинних
Каріотип	диплоїдний	диплоїдний	гетероплоїдний	диплоїдний
Термін життя	до 3 тижнів	до 10 пасажів	необмежений	50±10 дн
Туморогенні властивості	відсутні	відсутні	присутні	відсутні
Типи клітин	змішані	змішані	переважно епітеліоподібні	переважно фібробластоподібні
Контамінація мікрофлорою	часто	часто	можлива	відсутня

Культура клітин поділяється на одношарову і суспензійну. У вірусологічній діагностичній лабораторії використовують одношарові культури клітин.

Одношарова (моношарова) культура клітин – це клітини *in vitro*, які прикріплюються до субстрату і розмножуються, утворюючи моношар (на склі пробірок, флаконів, матраців). Одношарові культури клітин поділяються на первинні, субкультури, перещеплювані і диплоїдні. Основні властивості одношарових культур клітин наведені в таблиці 1.

Характеристика моношарових культур клітин.

1.Первинні культури клітин

Первинна (або первинно-трипсинізована) культура клітин – це культура, для одержання якої використовують тканини або органи, взяті безпосередньо з організму.

Вибір клітин для культивування визначається:

а). чутливістю *in vitro* до того чи іншого вірусу;

б). в певній мірі від тропізму вірусу в організмі господаря. Як правило (не завжди) адаптація вірусу до первинної культури проходить успішніше, якщо вона одержана з органів тварини, природно сприйнятливої до даного вірусу;

в). краще культивуються *in vitro* клітини ембріональних тканин, а також тварин раннього віку, оскільки вони мають вищу потенцію росту, невибагливі до живильних середовищ та є більш чутливими до вірусів.

Для одержання від здорової тварини первинної культури клітин не пізніше 2-3 год. після забою беруть відповідні органи або тканини (найчастіше використовують нирки, легені, тестикули, шкіру), подрібнюють і для дезагрегації тканини обробляють протеолітичними ферментами. Ферменти руйнують міжклітинні речовини, і тканина диспергується на окремі клітини, їх суспендують у живильному середовищі, розливають по пробірках або матрацах, поміщають у термостат при 37°C.

В своєму розвитку культура клітин проходить три фази:

а). *фаза адаптації* триває 2-24 год. Клітини осідають на дно пробірки чи матрацу і за рахунок білка фібронектину сироватки або плазми культурального середовища, який зв'язується зі склом, а клітини прикріплюються до цього фактора з допомогою специфічних рецепторів фібронектину. Така властивість клітин прикріплюватися до твердого субстрату називається *адгезією*;

б). *фаза логарифмічного росту*. Після адаптації до нових умов існування клітини починають ділитися і поступово покривають поверхню скла. Розмноження клітин триває до певного часу – до появи контакту між сусідніми клітинами;

в). *стаціонарна фаза*. Як тільки клітини контактують, їх ділення припиняється. Ця властивість клітин називається *контактною інгібіцією*. Вона зумовлена наявністю з зовнішньої сторони клітинної мембрани білка фібронектину, який утворює на клітинній поверхні відносно нерухому

фібрилярну сітку. Контактна інгібіція клітин призводить до формування на склі моношару через 3-5 днів. Моношар зберігає життєздатність протягом 1-3 тижнів (при періодичній зміні середовища, яке забруднюється продуктами життєдіяльності клітин). З часом клітини старіють, і настає їх неспецифічна дегенерація: вони округлюються, відриваються від скла і гинуть.

2. Субкультури

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

3. Перещеплювані культури клітин.

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

Вважають, що такі клітини з'являються в результаті мутацій або активізації клітинних онкогенів. Перещеплювані культури клітин можна одержати як з нормальних, так із пухлинних тканин тварин і людини.

4. Диплоїдні культури клітин.

Диплоїдна культура клітин (синонім: диплоїдна клітинна лінія) – це морфологічно однорідна популяція клітин, стабілізована в процесі культивування *in vitro*, яка має обмежений строк життя, характеризується трьома фазами росту, зберігає каріотип, властивий вихідній тканині, вільна від контамінантів і не має туморогенної активності при трансплантації хом'ячкам.

Основні розчини, живильні середовища і посуд, які необхідні для одержання культур клітин.

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

Розчини для культури клітин

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

2. Диспергуючі розчини трипсину і версену. 0,25%-ний розчин трипсину використовують для дезагрегації тканини на окремі клітини і для зняття клітин зі скла при пересіві культури клітин. 0,02%-ний розчин версену (натрієва сіль етилендіамінтетраоцтової кислоти) застосовують для зняття клітин зі скла.

Живильні середовища для культури клітин поділяють:

1.За походженням

а). *природні* – складаються з суміші збалансованих сольових розчинів Хенкса або Ерла і природних компонентів (амніотичної рідини ВРХ,

ембріонального екстракту ВРХ або курей, сироватки крові ВРХ або коней, курячої плазми тощо);

б). *напівсинтетичні* – одержують шляхом ферментативного гідролізу природних компонентів. До напівсинтетичних середовищ відносяться 0,5%-ний розчин гідролізату лактальбуміну (середовище ГЛА) – продукт розщеплення білка молока; 0,3%-ний гідролізат м'язових білків (середовище ГМБ); 2,5-5% розчин гемогідролізату – продукт розщеплення згустків крові ВРХ або людини;

в). *синтетичні* – широкого застосування набули середовище 199 і середовище Ігла. Зокрема, до складу середовища 199 входить понад 60 компонентів: 20 амінокислот, 16 вітамінів, складові частини нуклеїнових кислот (пурини, піримідини), коферменти, відновники, джерела ліпідів і вуглеводів, мінеральних солей, глюкоза.

За призначенням:

а). *ростові* середовища застосовують у перші дні культивування клітин, вони забезпечують життя і розмноження клітин. До складу ростових середовищ обов'язково входять природні компоненти (2-10% сироватки крові ВРХ, телят, ембріонів корів), що містять фактори адгезії та росту клітин, без яких клітини не зможуть прикріпитися до скла і розмножуватися;

б). *підтримувальні* середовища не містять природних компонентів. Вони забезпечують життєдіяльність клітин і використовуються після зараження культури клітин вірусами.

До всіх живильних середовищ додають індикатор феноловий червоний (0,002%) для контролю рН, яке має бути в межах 7,2-7,4. Для знищення бактеріальної мікрофлори до середовищ і розчинів додають антибіотики: 100 ОД/мл пеніциліну і 100 мкг/мл стрептоміцину. При необхідності використовують також ністатин 50 ОД/мл для пригнічення росту грибків.

Посуд для культури клітин

Для одержання культури клітин використовують пробірки, матраци (на 50, 100, 250, 500, 1000 і 1500 мл), ролерні колби (на 500, 1000 і 2000 мл),

флакони для живильних середовищ і розчинів, колби для трипсинізації, піпетки, лійки, чашки Петрі та ін. Від якості посуду залежить успішне культивування клітин *in vitro*.

Методика одержання первинної культури клітин

1. Тканину подрібнюють ножицями на шматочки розміром 2-5 мм.
2. Подрібнену тканину промивають декілька разів розчином Хенкса (Ерла) до одержання прозорої рідини.
3. Тканину переносять в колбу з магнітиком, додають 0,25%-ний розчин трипсину у співвідношенні 1:10, поміщають на магнітну мішалку і трипсинізують.
4. Трипсинізацію частіше проводять наступними методами:
 - а). метод теплої трипсинізації – частіше використовують для диспергування ембріональних тканин. Трипсинізацію проводять дробно при температурі 37°C декілька разів по 5-30 хв. (залежно від виду тканини). Першу порцію трипсину виливають. Трипсин з клітинами, що відділилися, зливають через 2-3 шари марлі в колбу, яку поміщають на лід або в холодильник для припинення дії ферменту. До тканини, яка залишилася в колбі, додають свіжу порцію трипсину і знову трипсинізують. Трипсинізацію проводять 3-5 разів до повного виснаження тканини.
 - б). метод холодної трипсинізації використовують для диспергування тканин дорослих тварин. При цьому трипсинізацію проводять в холодильнику при 4-6°C 12-16 год.
5. Суспензію клітин розливають по центрифужних пробірках (флаконах) і центрифугують при 1000 об/хв 10-15 хв.
6. Надосадову рідину виливають, до осаду клітин додають невелику кількість ростового середовища.
7. Підраховують кількість клітин у камері Горяєва. Для цього до 1 мл суспензії клітин додають 1 мл 0,1%-ного розчину кристалвіолету (на 0,1л розчині лимонної кислоти). Переміщують, заповнюють камеру Горяєва і

підраховують у двох камерах нефарбовані клітини з чіткими контурами і ядрами. Кількість клітин в 1 мл суспензії (X) визначають за формулою:

$$X = (A \times 2 \times 1000) : 0,9, \text{ де:}$$

A - середня кількість клітин в одній камері;

0,9 - об'єм камери Горяєва в мм³;

1000 - кількість мм³ в 1 см³;

8- коефіцієнт розведення суспензії.

8. Суспензію клітин розводять ростовим середовищем до оптимальної посівної концентрації, яка становить для клітин багатьох тканин в межах 200-500 тис. клітин в 1 мл.

9. Суспензію клітин розливають по пробірках (по 1 мл) або матрацах (10-15% від об'єму), щільно закривають гумовими пробками (для попередження залуження середовища). На пробірках восковим олівцем проводять поздовжню лінію, кладуть рискою догори в лотки із кутом нахилу 5° і поміщають у термостат при 37°C.

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

Методика одержання субкультури (диплоїдної або перещеплюваної клітинної культури)

1. З матраців із сформованим моношаром клітин зливають живильне середовище.

2. Вносять розчин трипсину або версену, підігрітий до 37°C, в такій кількості, щоб вкрити клітинний моношар.

3. Поміщають у термостат при 37°C на 15-30 хв. (до появи перших ознак відшарування моношару клітин).

4. Матраци енергійно струшують, суспензію клітин розливають по центрифужних пробірках і центрифугують при 1000 об/ хв 5-10 хв.

5. Надосадову рідину виливають, осад клітин розводять ростовим середовищем до посівної концентрації, яку визначають, підраховують кількість клітин у камері Горяєва.

6. Після формування моношару ростове середовище змінюють на підтримувальне.

Субкультуру можна одержувати за методикою без центрифугування. Після внесення в матрац трипсину або версену, коли клітини почали відокремлюватися від скла, зливають диспергуючий розчин, вносять невелику кількість ростового середовища, енергійним струшуванням матрацу повністю відшаровують клітини від скла і розводять ростовим середовищем до посівної концентрації.

Як правило, кількість клітин при пересівах збільшується в 2-2,5 рази. З одно літрового матрацу первинної культури одержують не менше двох матраців або 150 пробірок субкультури.

Методика зараження культур клітин.

1. 3 пробірок або матраців із сформованим моношаром клітин зливають ростове середовище.

2. Культуру клітин промивають 1 -2 рази розчином Хенкса.

3. В пробірки вносять по 0,1-0,2 мл вірусовмісного матеріалу і залишають на 1-2 год. при кімнатній температурі або при 37°C для адсорбції вірусу на поверхні клітин. Кожною пробою заражають по 4-10 пробірок з культурою клітин. В матраци вносять вірусовмісний матеріал в кількості 1-1,5% від його об'єму.

4. Після контакту вірусовмісний матеріал видаляють з пробірок або матраців і наливають підтримувальне середовище (в пробірки – по 1 мл, в матраци – 10-15% від об'єму). При виділенні вірусу з патологічного матеріалу деякі проби (наприклад, фекалії, сеча) можуть мати токсичну дію на клітини. Тому після адсорбції вірусу моношар клітин відмивають 1-2 рази розчином Хенкса (або живильним середовищем) і потім наливають

підтримувальне середовище. Для контролю залишають 4-6 пробірок з незараженою культурою клітин, в якій змінюють тільки середовище.

5. Пробірки і матраци закривають герметично гумовими корками, ставлять у термостат при 37°C і щодня розглядають під малим збільшенням мікроскопа.

Практична робота

1. Законспектувати характеристику моношарових культур клітин.
2. Ознайомитись з основними розчинами, живильними середовищами і посудом, які необхідні для одержання культур клітин.
3. Засвоїти методику одержання первинно-трипсинізованої культури клітин та субкультури.
4. Засвоїти методику зараження культур клітин.

Питання для самоконтролю

1. Що таке культура тканин ?
2. Зазначте класифікацію культур тканин ?
3. Які культури клітин використовують у вірусології ?
4. Первинні культури клітин та субкультури – характеристика, переваги та недоліки у використанні.
5. Перещеплювані культури клітин – основні властивості, переваги та недоліки у використанні.
6. Диплоїдні культури клітин – характеристика, переваги та недоліки у використанні
7. Які розчини, живильні середовища та посуд використовують для одержання культур клітин? Основні вимоги щодо них.
8. Класифікація живильних середовищ.
9. Відновіть методику одержання первинних культур клітин та субкультур?
10. Як проводять зараження культур клітин ?

Література:

11. Калініна О. С., Панікар І. І., Скибицький В. Г. Ветеринарна вірусологія. Херсон : ОЛДІ-ПЛЮС, 2022. 416 с.
2. Капрельянц Л. В., Єгорова А. В., Труфкаті Л. В. Лабораторний практикум із загальної мікробіології і загальної мікроболігії і вірусології : навчальний посібник. Херсон : ОЛДІ-ПЛЮС, 2021. 136 с.
3. Льотка Г. І., Радзиховський М. Л., Дишкант О. В. Загальна вірусологія основи ветеринарної та зоонотичної вірусології - навч. посіб. Вінниця : друк, 2020. 204 с. Ч. 1.
4. Основи вірусології : навч.-метод. посібник з лаб. практикуму / уклад. І. О. Шмараков, О. В. Кеца. 2-ге вид., перероб. Харків : Мачулін, 2015. 160 с.
5. Практикум з ветеринарної вірусології / В. Г. Скибіцький та ін. Київ : Вища освіта, 2005. 208 с.
6. Калініна О.С., Панікар І.І., Скибіцький В.Г. Ветеринарна вірусологія: Підручник. - К.: Вища освіта, 2004. - 432 с.

ТЕМА 5. ВЗАЄМОДІЯ ВІРУСІВ ІЗ КЛІТИНАМИ

Взаємодія клітин і вірусів – складний багатогранний процес, обумовлений багатьма різними чинниками, зокрема типом і видом клітини та вірусу, ступенем чутливості (або резистентності) клітини, кількістю вірусних часток і чистотою популяції вірусу, що інокулюється, дією різноманітних фізичних і хімічних факторів, імунологічним і генетичним статусом макроорганізму та ін.

Продуктивний цикл репродукції вірусів складається з кількох послідовних етапів, які закінчуються утворенням зрілих інфекційних вірусних часток та їхнім виходом із клітини.

Цикл репродукції вірусів може тривати від 6-8 годин (для представників родини Picornaviridae) до 40 годин (цитомегаловірус, родина Herpesviridae).

Врожай (кількість віріонів на 1 клітину) теж залежить від родини, так, наприклад, для вірусу поліомієліту він становить близько 100 тис. часток на клітину.

У циклі репродукції вірусів виділяють ранні та пізні стадії. Під час ранніх стадій відбувається адсорбція віріонів на чутливій клітині, проникнення всередину клітини, роздягання. Пізні стадії включають етапи синтезу ранніх регуляторних білків, структурних білків, реплікацію вірусного генома, збирання віріонів, дозрівання та вихід із клітини.

У циклі репродукції можна виділити такі фази:

1. Початковий період

1. Адсорбція віріону на поверхні клітини (зворотна та незворотна адсорбція) – прикріплення вірусних часток до клітинної поверхні (не характерно для вірусів рослин).

2. Проникнення вірусу в клітину – за рахунок рецепторного ендоцитозу чи злиття вірусної та клітинної мембран.

3. Звільнення вірусного генома (депротеїнізація вірусу, „роздягання” вірусної нуклеїнової кислоти).

2. Середній період („темнова”, екліпс-фаза)

2.1. Синтез ранніх (неструктурних) вірусних білків.

2.2. Синтез компонентів майбутніх вірусних часток – реплікація вірусних нуклеїнових кислот та синтез пізніх (структурних) вірусних білків.

3. Завершальний період

3.1. Формування віріонів – складання вірусних компонентів.

3.2. Вихід віріонів із клітини.

Типи взаємодії вірусів і клітин. Реакція клітин на вірусну інфекцію досить різноманітна. Запропоновано багато способів класифікації реакції клітин на зараження вірусами. Найбільш застосовною є класифікація вірусних інфекцій на клітинному рівні, що запропонована В. М. Ждановим та А. Г. Букринською (1986). Відповідно до цієї класифікації, вірусні інфекції розподіляються на автономні та інтеграційні.

Автономна – тип вірусної інфекції, коли вірусний геном реплікується незалежно від клітинного. Поняття автономії відносне, воно обмежується лише відсутністю фізичного контакту між вірусним і клітинним геномами, хоча їхня взаємодія постійно відбувається в процесі інфікування. Цей тип взаємодії характерний для більшості вірусів тварин.

Інтеграційна – тип вірусної інфекції, коли вірусний геном частково або повністю інтегрується з клітинним геномом і реплікується разом із ним.

Інтеграційна інфекція виникає в результаті фізичного об'єднання генома вірусу та клітини. При цій формі інфекції геном вірусу реплікується й функціонує як складова частина клітинного генома. Інтеграція може зумовити неопластичну трансформацію. Наприклад, трансформація поліомавірусів та їхні онкогенні властивості є результатом експресії вірусоспецифічних ранніх генів і взаємодії з продуктами специфічних клітинних генів (p53, pRB). У трансформованих клітинах і клітинах пухлин ДНК поліомавірусів інтегрована в геном клітини.

Папіломавірусна ДНК часто, але не завжди, є в інтегрованому стані переважно в цервікальних карциномах, тоді як для карциноми шкіри характерна наявність епісомної форми. Онкогенні типи вірусів папіломи людини (ВПЛ) надають клітинам можливості необмеженого поділу. Це результат дії генів E6 та E7. E6 приєднується до p53 і призводить до його деградації, а E7 взаємодіє з клітинним білком pRB та іншими спорідненими білками. Взаємодія вірусних онкобілків із клітинними інгібіторами циклінзалежної кінази (p16, p21, p27) – також важлива подія в процесі переродження.

Для ретровірусів в умовах інфекційного циклу для утворення нових копій РНК необхідним процесом є інтеграція кДНК у геном клітини. Таким чином, провірус є обов'язковою стадією життєвого циклу ретровірусів. У випадку вірусу гепатиту В майже увесь вірусний геном може бути виявлений в інтегрованому стані в геномі гепатоцитів або пухлинних клітинах

первинної карциноми. Найчастіше в геном клітини інтегрується ген вірусу, що відповідає за синтез поверхневого антигену HBsAg.

Продуктивна вірусна інфекція завершується утворенням інфекційного потомства, на відміну від абортівної, для якої не характерне утворення інфекційних часток, або вони утворюються в значно меншій кількості, ніж при продуктивній вірусній інфекції. Абортивна (від лат. aborto, не виношувати, тобто не реалізовувати патогенний потенціал) інфекція розвивається при проникненні збудника в нечутливі клітини (наприклад, коли вірус лейкозу корів проникає в організм людини) або в клітини, не здатні забезпечити повний репродуктивний цикл (наприклад ті, що перебувають у стадії клітинного циклу G0). Здатність клітин підтримувати вірусоспецифічні репродуктивні процеси також пригнічує ІФН.

Розрізняють наступні способи індикації вірусів у культурі клітин:

1. Цитопатогенна дія (ЦПД).
2. Гемадсорбція.
3. Виявлення внутрішньоклітинних тілець-включень.
4. Кольорова проба.
5. Методи, які базуються на явищах інтерференції та екзальтації вірусів.
6. Електронна мікроскопія.
7. Просте флюорохромовування.
8. Реакція імунної флюоресценції.
9. Імуноферментний аналіз.

1. Цитопатогенна дія (ЦПД), або цитопатичний ефект (ЦПЕ) – це будь-які морфологічні зміни клітин, які виникають в результаті розмноження вірусу. Для виявлення ЦПД пробірку або матрац з зараженою культурою клітин поміщають на предметний столик мікроскопа моношаром догори і розглядають при малому збільшенні.

Розрізняють три основні форми ЦПД:

а). округлення клітин – під дією вірусу клітини, що в нормі розпластані на склі, округлюються, відділяються від скла, переходять у культуральну рідину і гинуть;

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

в). утворення симпластів – під дією вірусу клітинні оболонки розплавляються, цитоплазми сусідніх клітин зливаються і утворюються гігантські багатоядерні клітини.

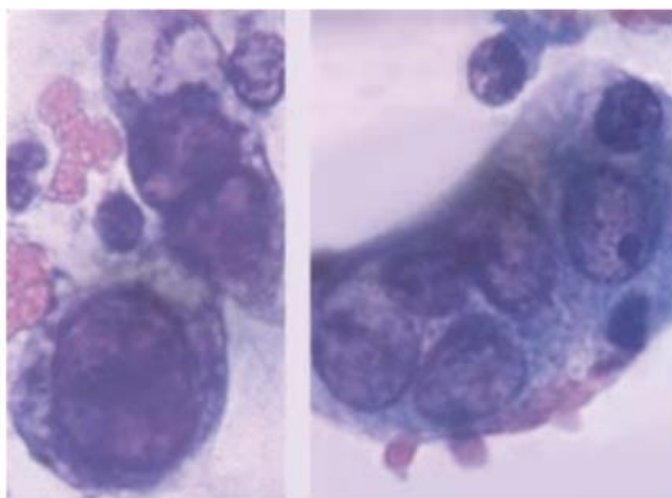
Причини ЦПД:

1. порушення нормальної життєдіяльності клітин в результаті механічного пошкодження клітинних структур вірусними компонентами (дефекти цитоплазматичної мембрани, які виникають в результаті проникнення чи виходу вірусів із клітини);

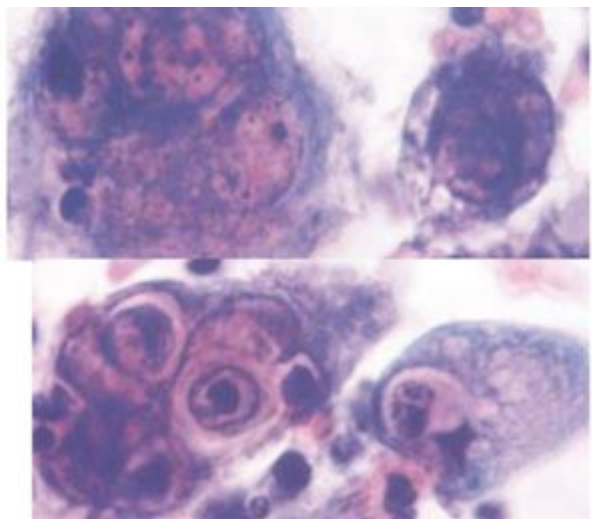
2. руйнування лізосом і вихід ферментів у цитоплазму (автоліз клітин);

3. виснаження білкових та енергетичних ресурсів клітин за рахунок “перемикання” клітинних ферментів та білок-синтезуючого апарату на синтез вірусоспецифічних компонентів;

4. порушення клітинних макромолекул.



А - На ранній стадії розвитку інфекції уражені клітини епітелію збільшені у розмірах, зазвичай містять одне ядро, що має вигляд часового скла, оскільки хроматин розташовується по периферії ядра, а його центральна частина залишається світлою, вільною від хроматину. Ядерця збільшені в розмірах.



Б -Протягом пізньої стадії захворювання, а також при рецидиві інфекції, виявляють багатоядерні клітини ураженого епітелію. Ядра містять включення – комплекси вірусних часток. Навколо ядер спостерігається освітлення цитоплазми.

Рис. 1. Цитопатогенна дія вірусу

ЦПД проявляється через 3-14 днів (залежно від виду вірусу та типу культури клітин) і оцінюється в плюсах: + (25%) – деструкція окремих клітин культури; ++ (50%) – деструкція половини клітин культури; +++ (75%) – деструкція більшості клітин культури, утворення пустот в моношарі внаслідок відшарування клітин від скла; ++++ (100%) – деструкція всіх клітин культури, на склі залишаються невеликі вогнища змінених клітин.

Ставлять наступні контролі:

- контроль неспецифічної дегенерації клітин – залишають пробірки з незараженою культурою клітин, в яких лише змінюють середовище;
- контроль на токсичність досліджуваного матеріалу – інфікованою культуральною рідиною заражають нові пробірки з культурою клітин. Якщо дегенерація була зумовлена токсичним фактором, то ЦПД в другому пасажі не проявляється.

2. Гемадсорбція – називають фіксацію еритроцитів до поверхні клітин заражених гемаглютинуючим вірусом. Гемадсорбція виникає за рахунок вірусного глікопротеїду гемаглютиніну, який модифікує клітинну мембрану, і вона стає спорідненою з рецепторами еритроцитів. Кожен вірус здатний викликати адсорбцію еритроцитів того виду, який він аглютинуює. Цей метод використовується для індикації в культурі клітин вірусів грипу тварин і

птиці, парагрипу-3 ВРХ, та інших гемаглютинуючих вірусів. Гемадсорбція проявляється швидше, ніж ЦПД.

В деяких випадках гемадсорбцію спричинюють не гемаглютинуючі віруси. Це стосується, зокрема, вірусу африканської чуми свиней. Припускається наявність у цього вірусу гемадсорбуючого антигена.

Є декілька видів гемадсорбції залежно від виду вірусу та типу клітин:

а). *дифузна гемадсорбція* – еритроцити адсорбуються на поверхні клітин, що заражені вірусом рівномірно по всьому моношару (вірус парагрипу-3 великої рогатої худоби);

б). *вогнищева гемадсорбція* – еритроцити адсорбуються на поверхні заражених вірусом клітин і зосереджені локально у певних місцях моношару (вірус паротиту, грипу);

в). *гемадсорбція у вигляді "намиста"* – еритроцити адсорбуються по периферії моношару у вигляді "намиста" (вірус африканської чуми свиней).

3. Метод бляшок. Бляшки (негативні колонії) – це обмежені вогнища загиблих під дією вірусу клітин в суцільному моношарі культури, що вкритий агаровим середовищем, яке обмежує поширення вірусу. При наявності вірусів вони проникають у клітини, проходять цикл репродукції. В суцільному моношарі живих клітин виникають вогнища зруйнованих клітин як наслідок репродукції вірусу. Над живими клітинами середовище закислоється продуктами метаболізму і стає червоно-рожевого кольору під впливом індикатору нейтрального червоного, який входить в склад агарового середовища. Над вогнищами загиблих клітин середовище безбарвне. Це і є бляшки. Кожна бляшка являється результатом розмноження одного віріона. При високій концентрації вірусу бляшки зливаються.

Метод бляшок застосовують для титрування вірусів, а також для виявлення нецитопатогенних вірусів, які розмножуються в культурі клітин без прояву ЦПД.

4. Метод виявлення внутрішньоклітинних тілець-включень

В заражених вірусом клітинах при деяких вірусних інфекціях утворюються тільця-включення. При більшості вірусних інфекцій тільця-включення представляють собою "вірусні фабрики", тобто місця, де відбувається синтез вірусних білків і нуклеїнових кислот та збирання віріонів потомства. У "вірусних фабриках" виявляють клітинні структури (рибосоми, мембрани, мікротрубочки, осміофільні волокна тощо).

Тільця включення різняться за походженням, локалізацією в організмі та клітині, складом нуклеїнової кислоти, тинкторіальними властивостями, гомогенністю.

Деякі тільця-включення одержали спеціальні назви: при сказі – тільця Бабеша-Негрі, при віспі корів – тільця Гварнієрі, при віспі птиці – тільця Боллінгера, при інфекційному ларинготрахеїті птиці – тільця Зейфреда, при чумі м'ясоїдних – тільця Лентца, при інфекційному гепатиті собак – тільця Рубарта.

Морфологія, тинкторіальні властивості і локалізація тілець-включень специфічні для кожного вірусу. Тому виявлення їх у патматеріалі загиблих тварин має діагностичне значення. Особливо це стосується такої хвороби, як сказ. Тільця-включення при сказі мають специфічну локалізацію, структуру, форму, що дозволяє поставити точний діагноз на цю хворобу при їх виявленні.

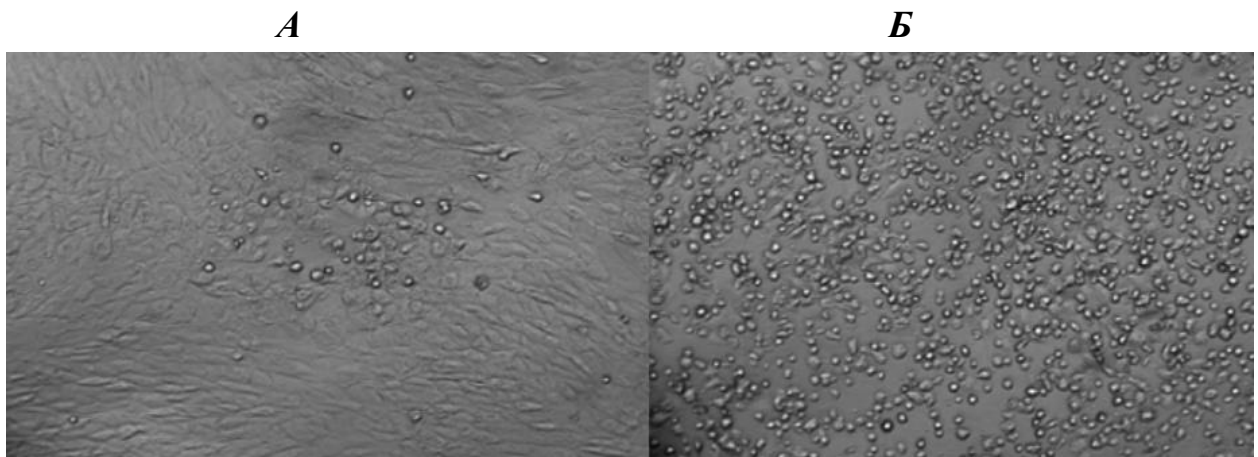


Рис.2. ЦПД: А – заокруглення клітин у випадку зараження культури клітинентеровірусом великої рогатої худоби та Б – аденовірусний тип ЦПД (збільшення x100) (Suchman, Erica, Blair, Carol, 2014)

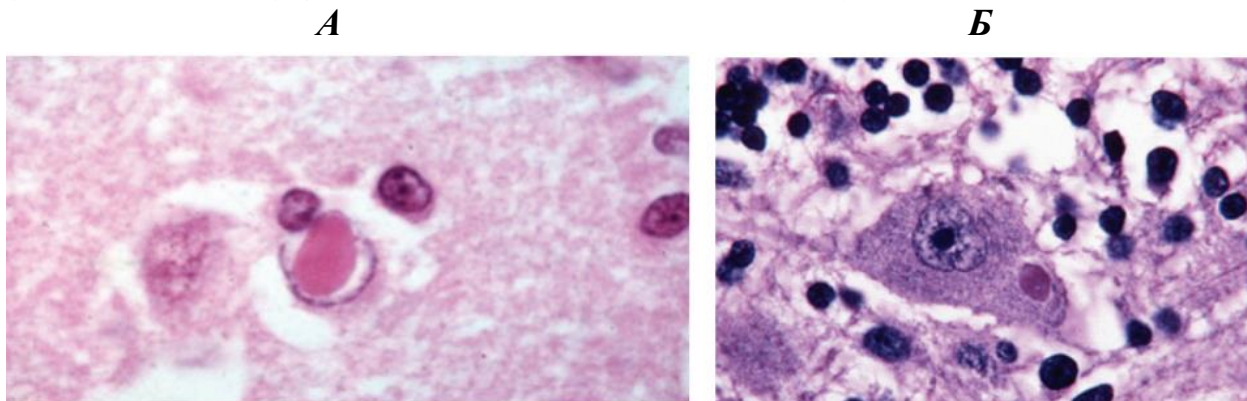


Рис.3. Вірусні включення: типові внутрішні ядерні включення при герпесвірусній інфекції в гліальних клітинах (А) (за матеріалами сайту <http://peir.path.uab.edu>), цитоплазматичні включення Бабеша-Негрі при сказі (Б) (за матеріалами сайту <https://www.reddit.com>)

5. Кольорова проба. Це орієнтовний метод виявлення вірусу в культурі клітин. Принцип методу полягає в тому, що в незаражених культурах під впливом продуктів метаболізму клітин середовище, яке містить індикатор феноловий червоний, закислоється і стає жовтого кольору. В той час в заражених культурах клітини гинуть під дією вірусу, і середовище зберігає червоний колір. Найчіткіші результати дають віруси з високою швидкістю розмноження при культивуванні їх у культурах, що повільно ростуть. В інших випадках вірогідність методу невисока.

6. Методи, які базуються на явищах інтерференції та екзальтації вірусів

Ці методи доцільно використовувати для виявлення нецитопатогенних вірусів.

Інтерференція – це здатність деяких вірусів пригнічувати розмноження інших вірусів. Інтерференція між вірусами може проявлятися на різних стадіях репродукції в результаті конкуренції за місця синтезу вірусних компонентів, а також за рахунок утворення особливого білка – інтерферона, який виробляється в заражених клітинах і має протівірусну активність. На основі інтерференції можна виявити в культурі клітин нецитопатогенні

віруси шляхом спільного культивування їх з цитопатогенними, репродукцію яких вони гальмують. Так, якщо культуру клітин заразити спочатку нецитопатогенним вірусом чуми свиней, а потім вірусом ящура, то ЦПД вірусу ящура не проявляється внаслідок феномену інтерференції. Нечитопатогенні штами вірусу трансмісивного гастроентериту свиней гальмують розвиток ЦПД вірусу діареї ВРХ.

Екзальтація – це прояв ЦПД у культурі клітин, що заражена двома вірусами: один з них нецитопатогенний, а другий – цитопатогенний, але в даній культурі не розмножується. За наявності в дослідному матеріалі нецитопатогенного вірусу відбувається прояв ЦПД цитопатогенного штаму і навпаки. Наприклад, клітини тестикул поросят або телят, відповідно заражені нецитопатогенним вірусом чуми свиней або вірусної діареї, під дією вірусу Ньюкаслської хвороби лізуються.

7. Електронна мікроскопія

Електронна мікроскопія – один з важливих методів індикації або ідентифікації вірусів в культурі клітин, який дає можливість диференціювати їх за морфологією.

Досліджувані об'єкти для електронного мікроскопа повинні бути у вигляді ультратонких зрізів або вірусвмісних суспензій, які поміщають на мідні предметні сітки, вкриті колодієвими, формваровими або вуглецевими плівками-підкладками.

Для одержання чіткого зображення необхідно створити різну електронну щільність між фоном і об'єктом. Як контрастуючі речовини використовують 2-4%-ні водні розчини фосфорно-вольфрамової кислоти, молібденовокислого амонію, кремне-вольфрамовокислого натрію; 0,5-2%-ий водний розчин оцтовокислого уранілу (ураніл-ацетату); 0,5%-ий водний розчин щавелевокислого уранілу (ураніл-оксалату); 1%-ий водний розчин мурашинокислого уранілу (ураніл-форміату). Для створення контрасту біологічних об'єктів застосовують методи негативного і позитивного контрастування.

При негативному контрастуванні контрастуюча речовина високої електронної щільності оточує об'єкт більш низької щільності і він виглядає світлішим на темному фоні, що оточує його. Час негативного контрастування препарату вимірюється секундами (в середньому 15-40 сек).

При позитивному контрастуванні, навпаки, об'єкт виглядає темнішим на світлому фоні. Час позитивного контрастування препарату вимірюється хвилинами і годинами.

8. Імуноелектронна мікроскопія (ІЕМ)

ІЕМ базується на виявленні в електронному мікроскопі комплексів віріонів з антитілами. При взаємодії вірусу зі специфічними антитілами утворюються комплекси у вигляді агрегатів віріонів і антитіл, які легше виявити в електронному мікроскопі, ніж поодинокі вірусні частки. Метод ІЕМ чутливіший від прямої ЕМ в 10-100 разів. Він дає змогу виявляти віріони при титрі вірусу близько 10^{35} ЕД⁵⁰/мл. В ІЕМ звичайно використовують нативну сироватку, освітлену низькошвидкісним центрифугуванням або фільтруванням.

9. Метод простого флуорохромовання

Одною з перших спроб виявлення елементарних тілець вірусів цим методом є роботи Хагемана та Барнера (1937 р).

Флуорохромовання – це обробка дослідних препаратів одним або декількома флуорохромами. Воно збільшує силу та контрастність свічення досліджуваного об'єкту. Даний метод з успіхом використовують для виявлення великих вірусів: ектромелії, вісповакцини, ектими овець та кіз, аденовірусних інфекцій, збудників грипу, ящуру тощо, а також для діагностики хламідіозів.

10. Метод імуофлуоресціюючих антитіл (РІФ)

Реакцію імуофлуоресценції (син.: метод флуоресціюючих антитіл – МФА) вперше запропонували Кумбс, Кріч та Джонсон в 1941 році.

Принцип даного методу полягає в тому, що антитіла з'єднані з флуорохромами, зберігають здатність вступати в специфічні реакції з

гомологічними антигенами (вірусами). Комплекс антиген-антитіло, що утворився виявляють під люмінесцентним мікроскопом по присутньому в ньому флуорохрому, який дає специфічне свічення. Реакція в цьому разі позитивна. Якщо комплекс антиген-антитіло не утворився, то світіння буде відсутнє. Реакція негативна.

11. Імуноферментний аналіз (ІФА)

Останнім часом в діагностиці хвороб людини і тварин стали застосовувати методи, які базуються на використанні антигенів і антитіл, мічених ферментами. Ця група методів називається імуноферментним аналізом (ІФА). ІФА характеризується високою специфічністю і чутливістю, яка в сотні разів перевищує чутливість інших серологічних реакцій. Цей метод розроблений для ідентифікації вірусів і виявлення антитіл при багатьох вірусних інфекціях (інфекційний ринотрахеїт ВРХ, респіраторно-синцитіальна інфекція ВРХ, чума ВРХ, ринопневмонія коней, трансмісивний гастроентерит свиней, Ньюкаслська хвороба, хвороба Марека та ін.).

Існують два варіанти ІФА:

- 1). гістохімічний варіант, або імунопероксидазна реакція;
- 2). методи твердофазного ІФА.

Гістохімічний варіант базується на використанні антитіл, мічених ферментом пероксидазою хрому (імунопероксидазний кон'югат). Утворення комплексу антиген-антитіло виявляють за допомогою бензидинового субстрату (діамінобензидинтетрахлорид), який під дією ферменту розкладається, утворюючи кольоровий продукт ферментативної реакції, видимий у світловому мікроскопі (спочатку блакитного кольору, який швидко переходить у коричневий).

Методи твердофазного ІФА базуються на застосуванні антигенів або антитіл, фіксованих на нерозчинних носіях. Як твердофазні носії в ІФА використовують мікропанелі, пробірки, плівки з синтетичних полімерів, що мають високу сорбційну здатність – полістиролу, поліакриламід, поліпропілену тощо, а також гранули з сефарози, целюлози,

карбоксиметилцелюлози, нітроцелюлозні мембрани (фільтри). У твердофазному ІФА використовують пероксидазні і лужно-фосфатазні кон'югати.

Практична робота

1. Засвоїти методи індикації вірусів у культурах клітин. Провести мікроскопію зафарбованих мікропрепаратів культур клітин в нормі і з різними формами ЦПД.

Питання для самоконтролю

1. Які основні методи індикації вірусів у культурах клітин та їх характеристика.
2. Які причини виникнення та розвитку ЦПД вірусів?
3. Класифікація ЦПД.
4. Що таке внутрішньоклітинні включення? Яка їхня природа?
5. Методи виявлення вірусоспецифічних включень.
6. Від чого залежать перебіг та ступінь завершеності циклу репродукції в культурі клітин?

Література:

1. Калініна О. С., Панікар І. І., Скибицький В. Г. Ветеринарна вірусологія. Херсон : ОЛДІ-ПЛЮС, 2022. 416 с.
2. Капрельянц Л. В., Єгорова А. В., Труфкаті Л. В. Лабораторний практикум із загальної мікробіології і загальної мікроболії і вірусології : навчальний посібник. Херсон : ОЛДІ-ПЛЮС, 2021. 136 с.
3. Лютка Г. І., Радзиховський М. Л., Дишкант О. В. Загальна вірусологія основи ветеринарної та зоонотичної вірусології - навч. посіб. Вінниця : друк, 2020. 204 с. Ч. 1.

4. Основи вірусології : навч.-метод. посібник з лаб. практикуму / уклад. І. О. Шмараков, О. В. Кеца. 2-ге вид., перероб. Харків : Мачулін, 2015. 160 с.
5. Практикум з ветеринарної вірусології / В. Г. Скибіцький та ін. Київ : Вища освіта, 2005. 208 с.
6. Калініна О.С., Панікар І.І., Скибіцький В.Г. Ветеринарна вірусологія: Підручник. - К.: Вища освіта, 2004. - 432 с.

ТЕМА 6: ТИТРУВАННЯ ВІРУСІВ

На практиці досить часто потрібно встановити не лише якісні зміни, що спричинює той чи інший вірус при зараженні ним біологічних систем (лабораторних тварин, розвинених курячих ембріонів, культур клітин), але й знати кількість вірусу, що міститься в дослідному матеріалі, зокрема, при одержанні противірусних вакцин, сироваток і діагностичних препаратів, при зараженні живих лабораторних систем, при постановці серологічних реакцій. Кількість вірусу виражається його титром.

Титр вірусу – це його кількість, що міститься в одиниці об'єму вірусвмісного матеріалу. Титр вірусу не можна визначити в абсолютних цифрових значеннях або грамах через їх малі розміри і значні кількості навіть в мізерних об'ємах матеріалу. Проте вірус володіє інфекційною активністю, яка має прямий зв'язок з кількістю вірусу. Тому на практиці титр вірусу визначають в **одинацях інфекційної активності (ОІА)**.

Є основних три типи ОІА.

1. Інфекційні одиниці локальних пошкоджень, що викликаються вірусами і оцінюються по одиничному ефекту (БТО, ВТО).
2. Інфекційні одиниці 50% дії вірусу на чутливий тест-об'єкт, що оцінюється статистично в ЕД₅₀.
3. Гемаглютинувальні одиниці, які визначаються при постановці реакції гемаглютинації.

Деякі віруси здатні утворювати локальні пошкодження: бляшки в культурі клітин або віспини на ХАО курячих ембріонів. Інфекційна активність таких вірусів можна визначити бляшкотвірних та віспотвірних одиницях.

Доза вірусу необхідна для утворення однієї бляшки в культурі клітин носить назву **бляшкотвірної одиниці (БТО)**, а доза вірусу необхідна для утворення однієї віспини на ХАО курячих ембріонів є **віспотвірною одиницею (ВТО)**.

Число ВТО або БТО в 1 мл матеріалу виражає титр вірусу в цьому матеріалі. Методика визначення титру вірусу в БТО і ВТО аналогічна, тільки в першому випадку заражають культури клітин, а в другому – РКЕ.

Методика визначення інфекційного титру вірусу в БТО або ВТО

1. Вірусвмісним матеріалом в певному розведенні та однаковому об'ємі заражають декілька матраців з культурою клітин або курячих ембріонів на ХАО.

2. Через певний час підраховують кількість бляшок або віспин.

Титр вірусу визначають за формулою:

$$T = n/Va, \text{ де}$$

n - середнє арифметичне кількості бляшок на один матрац або віспин на один курячий ембріон;

a - розведення вірусвмісного матеріалу, яке взяте для зараження;

V - об'єм суспензії вірусу взятого для зараження.

Приклад. Перед зараженням матрацу з культурою клітин вірусну суспензію ящуру розвели в 1000 раз (1 : 1000 або 10^{-3}). Для зараження культур клітин використали 0,3 мл суспензії. Через 5 днів інкубації отримано 37 бляшок.

Розрахувати титр вірусу в БТО.

При розрахунку користуємось вищезгаданою формулою.

$a = 1:1000 = 0,001$; $V=0,3$ мл; $n = 37$, тоді:

$T = 37/0,3 \times 0,001 = 37/0,0003 = 123333$ БТО/мл.

Отже, в кожному мілілітрі міститься 123333 доз вірусу ящуру, кожна з яких здатна викликати утворення однієї бляшки.

Перевагою цієї методики розрахунку титру вірусу є те, що вона досить проста в розрахунках.

Недоліки:

1). не усі віруси утворюють на культурах клітин і на РКЕ, відповідно бляшки та віспини;

2). техніка одержання віспин на ХАО і особливо бляшок в культурах клітин доволі тонка і одержати їх не завжди вдається (висока чистота та стерильність усіх реактивів та скляного посуду, суворе дотримання методики одержання тощо);

3). кількість бляшок та віспин підрахувати буває важко внаслідок злиття їх між собою через високу концентрацію вірусів у матеріалі. Підрахунку піддаються бляшки і віспини, якщо їх кількість не перевищує 50 на матрац або на ХАО.

Тому, для отримання більш вірогідного результату, для титрування вірусу використовують ряд десятикратних розведень вірусу (із коефіцієнтом 10), кожним з яких рівними об'ємами заражають по декілька матраців з культурою клітин або курячих ембріонів. Титр вірусу тоді можна вирахувати за формулою:

$$T = n_1 + n_2 + n_3 + \dots n_n / V (a_1 + a_2 + a_3 + \dots a_n), \text{ де}$$

$n_1 + n_2 + n_3 + \dots n_n$ – середньо арифметична сума кількості бляшок або віспин для різних розведень вірусу;

$a_1 + a_2 + a_3 + \dots a_n$ – відповідні розведення вірусу;

V - об'єм вірусвмісної суспензії.

Приклад. Для виявлення титру вірусу віспи корів зробили чотири десятикратно зростаючих розведення вірусу (1 :10 – 1 : 10 000). Кожним розведенням в об'ємі 0,2 мл заразили по три матраци із сформованим

моношаром клітин. Через 5 днів підрахунок бляшок дав наступні результати (табл 1).

Підставимо одержані дані у формулу. При цьому дані для розведення 1 : 10 відкинемо через злиття бляшок у 2 матрацах (підрахувати неможливо).

$$T = 21 + 7 + 2/0,2 (0,01 + 0,001 + 0,0001) = 30/0,2 \times 0,0111 = 30/0,00222 = 13513 \text{ БТО/мл.}$$

Таблиця 1

Розведення вірусу	Доза зараження, мл	Кількість матраців	Число бляшок на кожний матрац	Середнє арифметичне число бляшок
a_1 1 : 10	0,2	3	злились + 48 + злились	Підрахувати неможливо
a_2 1 : 100	0,2	3	17 + 24 + 22	21
a_3 1 : 1000	0,2	3	4 + 11 + 6	7
a_4 1 : 10 000	0,2	3	2 + 1 + 3	2

Найбільш універсальним є метод визначення титру вірусу в одиницях 50% інфекційної дії його на чутливі тест-об'єкти. У зв'язку з неоднаковою чутливістю тест-об'єктів до вірусу інфекційний титр вірусів у переважній більшості випадків може бути визначений як статистична величина.

Чому саме за критерій оцінки беруть 50% дію вірусу на тест-об'єкти? Експериментально доведено, що доза вірусу яка спричинює 50% ефект найменш піддається коливанням і є найбільш визначеною з усіх можливих інфекційних доз.

Виходячи з цього за одиницю кількості вірусу приймається така його доза, що здатна викликати інфекційний ефект в 50% заражених тест-об'єктів. Вона позначається як ***ЕД₅₀ – ефективна 50% доза.***

В залежності від виду тест-об'єкту і форми прояву інфекційного ефекту ЕД₅₀ називається по-різному в кожному конкретному випадку:

ЛД₅₀ – доза вірусу, що спричинює загибель 50% заражених лабораторних тварин;

ІД₅₀ – доза вірусу, що спричинює клінічні ознаки або ж патзміни 50% заражених лабораторних тварин;

ЕЛД₅₀ – доза вірусу, що спричинює загибель 50% заражених РКЕ;

ЕІД₅₀ – доза вірусу, що викликає патзміни або прояв гемаглютинації в 50% заражених РКЕ;

ЦПД₅₀ – доза вірусу, що спричинює цитопатичний ефект у 50% заражених культур клітин.

Кількість ЕД₅₀ (ЛД₅₀, ІД₅₀, ЕЛД₅₀, ЕІД₅₀, ЦПД₅₀) вірусу, що міститься в одиниці об'єму вірусмісного матеріалу, буде вираженням титру вірусу в цьому матеріалі.

Методика визначення титру вірусу в ЕД₅₀

1. Готують ряд послідовних 10-кратних розведень вірусу (інтервал 1 lg) на збалансованому сольовому розчині або середовищі для культури клітин (в залежності від виду тест-об'єкта). Для цього в ряд пробірок вносять 9 частин фізрозчину, в першу додають 1 частину вірусу, перемішують трикратним піпетуванням і переносять 1 частину в наступну пробірку і т. д. Кожне розведення вірусу готують стерильною піпеткою. Ступінь розведення вірусу залежить від його вихідної концентрації, що передбачається. Якщо ми не знаємо приблизно концентрацію вірусу, то краще робити 10 розведень. В останніх розведеннях інфекційна дія вірусу не повинна проявлятися. Чому готують саме 10-кратні розведення? Тому, що існує пряма залежність між 10-кратними розведеннями вірусу та його інфекційною дією, особливо в точці ЕД₅₀ та навколо неї. Крім того, при 10-кратних розведеннях зручніше проводити наступні розрахунки.

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

3. За зараженими тест-об'єктами спостерігають певний час (5-12 днів), враховують результати дії вірусу (загибель, клінічні ознаки, патологоанатомічні зміни чи ЦПД).

4. Розраховують в якому розведенні вірус проявив свою дію на 50% заражених тест-об'єктів. Переважно користуються 2 методами:

а) за методом Ріда і Менча;

б) за методом Кербера.

5. Коли знайшли розведення вірусу, що містить 1 ЕД₅₀, визначають, скільки ЕД₅₀ містить такий самий об'єм нерозведеного вірусу. Потім перераховують кількість ЕД₅₀ на 1 мл вірусвмісного матеріалу, що і буде показником титру вірусу.

Приклад: протитрувати вірус сказу (12 мл) на білих мишах, заражаючи їх інтрацеребрально в об'ємі 0,1 мл по 4 миші на одне розведення вірусу; титр вірусу визначити в ЛД₅₀. Всього зробили 8 десятикратно зростаючих розведень вірусу. Визначити титр вірусу за методом Ріда та Менча?

Як результат експерименту одержали наступні дані (табл. 2).

Таблиця 2

Розведення вірусу	Експериментальні дані			Кумулятивні дані			
	вижило	загиноуло	% летальності	вижило	загиноуло	відношення загиблих до заражених	% летальності
10 ⁻¹	0 ↓	4	100	0	16	16 : 16	100
10 ⁻²	0 ↓	4	100	0	12	12 : 12	100
10 ⁻³	1	3	75	1	8	8 : 9	90
В10 ⁻⁴	1	3	75	2	5	5 : 7	71 в
А10 ⁻⁵	3	1	25	5	2	2 : 7	28 а
10 ⁻⁶	3	1	25	8	1	1 : 9	10
10 ⁻⁷	4	0 ↑	0	12	0	0 : 12	0
10 ⁻⁸	4	0 ↑	0	16	0	0 : 16	0

Метод Ріда і Менча передбачає використання кумулятивних даних (sumulacio – накопичення). Їх одержують, виходячи з припущення, що мишка, яка вижила при зараженні високою дозою вірусу, тим більше виживе від меншої дози і, навпаки, тварина, що загинула від низької дози вірусу, тим більше загине від високої дози.

Виходячи з таких міркувань, підсумовують фактичні дані. Спочатку одержують кумулятивні дані відносно тварин, що вижили, додаючи їх кількість від більших доз вірусу до менших. Від розведення вірусу 10⁻¹ і 10⁻²

жодна миша не вижила, а від розведення 10^{-3} вижила одна. Ці цифри переписують у відповідну графу кумулятивних даних. Від розведення 10^{-4} фактично вижила 1 миша плюс одна, що вижила від більшої дози вірусу (10^{-3}), разом буде 2. Від розведення 10^{-5} фактично вижило 3 миші плюс дві, які вижили від більших доз (10^{-3} і 10^{-4}), разом буде 5. Від розведення 10^{-6} фактично вижило 3 миші плюс 5, які вижили від більших доз (10^{-3} - 10^{-5}), разом буде 8. А при розведенні 10^{-7} , якщо скласти всі фактичні дані, отримаємо 12 мишок. Розведення 10^{-1} і 10^{-8} фактично можна відкинути, бо ефект в даному випадку аналогічний, що й при розведенні вірусмісним матеріалом, відповідно 10^{-2} і 10^{-7} .

Аналогічно вираховують кумулятивні дані відносно тварин, що загинули, підсумовуючи їх кількість від менших доз вірусу до більших. Випишуємо в таблицю одержані кумулятивні дані відносно загинувших та виживших тварин, записуємо відношення числа загиблих до числа заражених тварин і вираховуємо % летальності для кожного розведення вірусу, користуючись отриманими кумулятивними даними.

Вірусмісний матеріал в розведенні, що дав ефект вище 50% позначають буквою *B*, а нижче 50% - буквою *A*. Процент летальності відповідно позначають малою буквою *b* та *a*. Нам необхідно знайти в даному випадку таке розведення вірусу, яке б викликало загибель 50% тварин (LD_{50}). Це значення знаходиться між розведеннями 10^{-4} і 10^{-5} . Для цього використовуємо формулу Ріда та Менча.

$$lg LD_{50} = lg B - \frac{b-50}{b-a} \times Igd, \text{ де:}$$

lg LD₅₀ - розведення вірусу, що містить 1 LD_{50} ;

B – доза (розведення) вірусу, яке дає ефект більше 50% (в даному випадку 10^{-4});

b - процент, що відповідає розведенню *B* (71,0);

a - процент, відповідає розведенню *A* (28,0);

d - коефіцієнт розведення вірусу (10).

$Lg LD_{50} = lg10^{-4} - 71 - 50/71 - 28 \times lg10 = -4 - 21/43 = -4 - 0,5 = -4,5$.
Отже, 0,1 мл вірусу, розведеного в $10^{-4,5}$ або ж $1 : 10^{4,5}$ разів, містить 1 LD_{50} . Тоді в 0,1 мл нерозведеної вірусвмісної суспензії таких доз міститься $10^{4,5}$. Значить, титр вірусу становить: $T = 10^{4,5} LD_{50} / 0,1$ мл, або $10 \times 10^{4,5} LD_{50}/мл$.

Звичайно в такому вигляді титр залишають, його також можна легко перевести в абсолютну величину, використовують таблицю антилогарифмів (наприклад В.М. Брадіса). Беруть цифру 4,5; цифра 4 показує, що в абсолютному числі повинно бути 5 знаків. Антилогарифм цифри 4,5 складає 3162, тобто в ній є лише 4 знаки, тому 5 знак додаємо у вигляді 0. Відповідно титр вірусу складе: $T = 10 \times 31620 LD_{50}/мл$ або $T = 316200 LD_{50}/мл$.

Недоліки методу Ріда і Менча:

1. Більш висока доза вірусу не завжди дає більший інфекційний ефект.
2. При підрахунках збільшується кількість тест-об'єктів, які фактично були взяті в дослід.

Титрування вірусів за методом Кербера. Цей метод простіший, не вимагає розрахунку кумулятивних даних, а лише експериментальних (табл. 2), проте для одержання точних даних, необхідно, щоб позитивний ефект спричинений вірусом був від 0 до 100%.

Визначимо LD_{50} , для тих самих результатів титрування, що і в попередньому прикладі, за формулою:

$$Lg LD_{50} = lgD + lgd/2 - lg \sum r/n, \text{ де}$$

D - найвище розведення вірусу, яке дає 100%-ний ефект (10^{-2});

d - коефіцієнт розведення вірусу (10);

n - кількість заражених тест-об'єктів на кожне розведення (4);

r - кількість позитивно реагуючих тест-об'єктів на кожне розведення;

$\sum r/n$ - сума відношень позитивно реагуючих тест-об'єктів до заражених для усіх розведень вірусу, які дають ефект від 0 до 100%.

Підставимо у формулу значення з таблиці 2.

$$\text{Lg ЛД}_{50} = \lg 10^{-2} + \lg 10/2 - \lg 10 (0/4 + 1/4 + 1/4 + 3/4 + 3/4 + 4/4) = -2 + 1/2 - 12/4 = -2 + 0,5 - 3 = -4,5.$$

Далі розмірковуємо аналогічно, що й при визначенні титру вірусу методом Ріда та Менча. В даному випадку титр вірусу розрахований двома методами співпав.

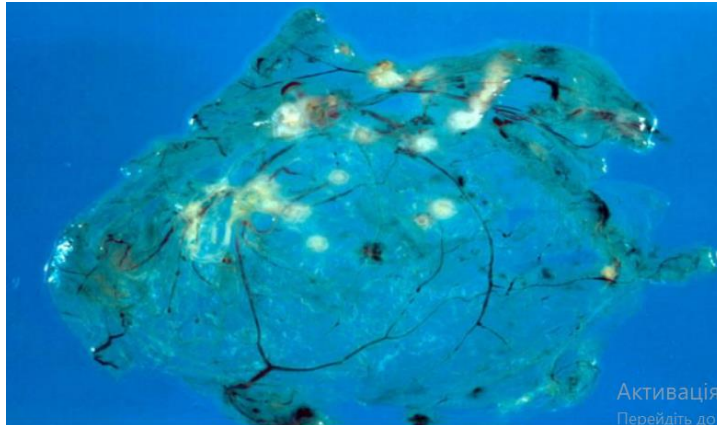


Рис.1. Симптоми ураження ХАО під дією вірусу вісти птахів через 6 днів після інфікування

Проте невелике розходження титру вірусу, розрахованого двома методами, може відбутись через відсутність їх абсолютної точності.

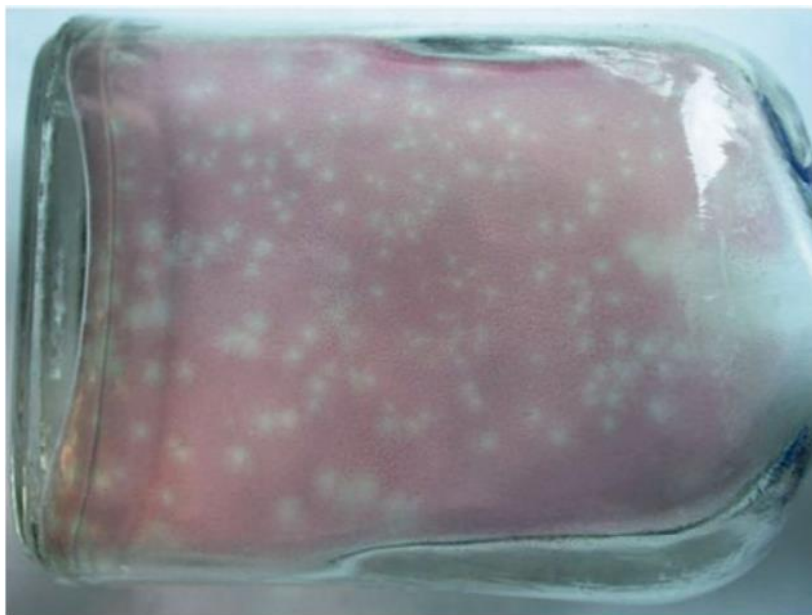


Рис. 2. Утворення бляшок у культурі клітин, уражених вірусом

Деякі віруси мають здатність аглютинувати еритроцити певних видів тварин при відповідних умовах.

Вперше в 1941 році Херст і незалежно від нього Мак Кіленд та Хейр відмітили, що вірус грипу аглютинує еритроцити курей. Пізніше було встановлено, що окрім ортоміксовірусів, гемаглютинувальною активністю володіють параміксо-, тога-, адено-, поксвіруси та деякі інші.

Ця реакція не відноситься до серологічних, тому що в ній не приймає участь імунна сироватка, тобто антитіла.

Умовно реакцію поділяють на 3 етапи (Рис.3).

I - адсорбція вірусів на поверхні еритроцитів

На поверхні еритроцитів є рецептори мукопротеїнової природи, що здатні адсорбувати до 10 000 віріонів, а на поверхні гемаглютинуючих вірусів є гемаглютиніни глікопротеїнової природи, що мають ферментативну активність. При змішуванні еритроцитів з вірусвмісною суспензією гемаглютиніни вірусу при допомозі ферменту муцинази вступають у взаємодію з рецепторами еритроцитів. Як результат цього відбувається адсорбція вірусів на еритроцитах.

II - аглютинація (склеювання) еритроцитів

Віріони адсорбовані на одному еритроциті вільними поверхнями (гемаглютинінами) взаємодіють з іншими еритроцитами, утворюючи при цьому “містки” між ними, в результаті чого еритроцити склеюються.

III - елюція - звільнення вірусів від еритроцитів

Адсорбція вірусів на еритроцитах є ензиматичним (зворотнім) процесом. Через деякий час після прояву гемаглютинації зв'язок між вірусом і еритроцитами порушується під дією вірусного ферменту нейромінідази. Віруси “сповзають” з еритроцитів і останні осідають на дно пробірки (лунки) у вигляді червоного диску.

Відбувається за рахунок взаємодії рецепторів вірусів з рецепторами еритроцитів з наступним склеюванням останніх.

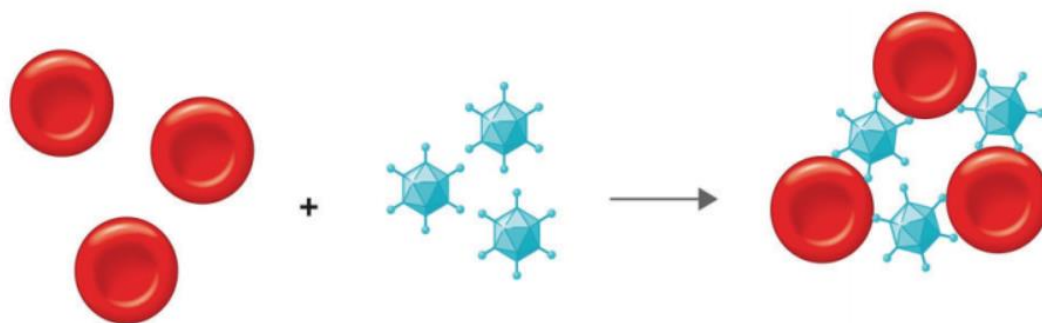


Рис.3. Схематичне зображення реакції гемаглютинації

Фактори, що впливають на перебіг РГА:

- температура – більшість вірусів краще аглютинують еритроцити при температурі 30-37 С;
- рН середовища (більшість вірусів дають реакцію при рН 7,0-7,4);
- якісний вірусвмісний матеріал (повинен містити вірус в достатньому титрі і бути чистим без сторонніх зависних часток);
- концентрація еритроцитів. Для постановки реакції використовується 1-5%-суспензія еритроцитів;
- вид еритроцитів. Кожний гемаглютинувальний вірус склеює лише певний видовий спектр еритроцитів.

Основні гемаглютинувальні властивості вірусів наведені в додатку 1.

Методика постановки пластинкової (крапельної) РГА.

1. На чисте і добре знежирене предметне скло наносять піпеткою одну краплю вірусвмісного матеріалу.
2. Додають одну краплю 5% завису еритроцитів.
3. Перемішують скляною паличкою. В позитивному випадку через декілька хвилин (залежно від температури) виникає аглютинація еритроцитів з утворенням пластівців. В негативному випадку пластівці не утворюються, рідина залишається прозорою.

Реакцію використовують:

- для індикації гемаглютинувальних вірусів у дослідному матеріалі. Позитивний результат реакції свідчить про наявність вірусу;
- для орієнтовної діагностики. Позитивний результат реакції дає підставу виключити із кола підозрюваних усі віруси, які не мають гемаглютинувальних властивостей;
- для диференційної діагностики. За різницею в можливості аглютинації еритроцитів різних видів тварин, можна диференціювати віруси, які викликають подібний клінічний перебіг.

Методика постановки пробіркової РГА.

Використовують крім вищезазначеного для:

- визначення титру вірусу в гемаглютинувальних одиницях (ГАО);
- для виділення вірусу в чистому вигляді (використовуючи елюцію).

Реакцію ставлять в пробірках або на спеціальних панелях з лунками. Схеми реакції наведені в таблиці 1.

Результат та інтенсивність прояву реакції оцінюють в хрестах:

- +++ - максимальний прояв. При цьому усі еритроцити аглютинували і утворили суцільний рівний шар на дні і стінках пробірки (лунки) у вигляді парасольки, краї парасольки рівні;
- ++ - приблизно 50% еритроцитів аглютинували і утворили парасольку. В центрі видно скупчення невеликої кількості неаглютинованих еритроцитів у вигляді компактного диску ("гудзика"). При нахилі пробірки еритроцити майже не сповзають, краї парасольки хвилясті;
- + - основна маса еритроцитів не аглютинувала і осіла в центрі у вигляді червоного диску. Навколо нього на дні видно деяку кількість аглютинованих еритроцитів, тобто невелику та нечітку парасольку з нерівними краями.

Схема пробіркової РГА

Компоненти, мл	Розведення вірусу									Кон- троль еритро- цитів
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	
	Номер лунки (пробірки)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Ізотонічний розчин	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Вірусвмісний матеріал	0,5	Послідовне перенесення по 0,5 мл								-
1% суспензія еритроцитів	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Облік результатів	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	-	-	-

Примітка: з останньої пробірки (9) 0,5 мл видаляють в дезрозчин.

При нахилі пробірки еритроцити сповзають;

- негативна реакція. Усі еритроцити не аглютиновані та осіли в самому глибокому місці пробірки (центрі) у вигляді “гудзика” з рівними краями. При нахилі пробірки еритроцити сповзають.

Контроль еритроцитів ставиться для виявлення спонтанної гемаглютинації при умові наявності в складі компонентів реакції неспецифічних гемаглютининів.

Гемаглютинувальний титр вірусу оцінюється в гемаглютинувальних одиницях (ГАО). Під однією ГАО розуміють найбільше розведення (найменшу кількість вірусу) при якому спостерігається аглютинація еритроцитів не менше ніж на два хрести. Ця кількість приблизно відповідає 50% аглютинованих еритроцитів.

В такому ж об'ємі нерозведеної вірусвмісної суспензії кількість ГАО буде в стільки разів більшою, в скільки разів ми його розвели, що б одержати 1 ГАО. Отже, кількість ГАО в дослідному вірусвмісному матеріалі називають *титром* вірусу.

При аналізі таблиці 1 видно, що найбільше розведення вірусу яке відповідає результату реакції на ++ становить 1 : 64. Звідси титр вірусу буде 64 ГАО.

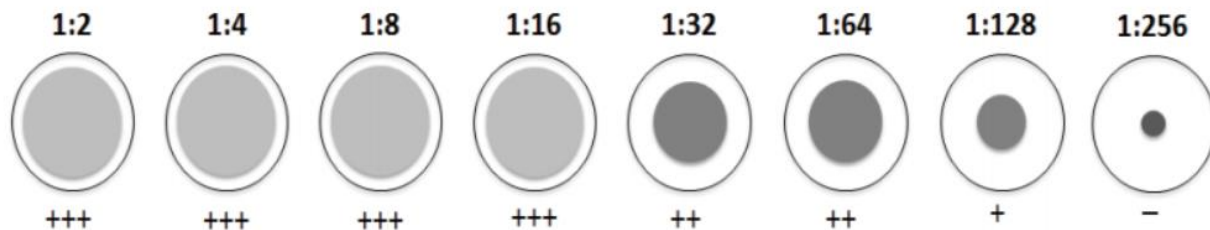


Рис. 4. Обчислення результатів реакції гемаглютинації ($T=1:64$)

Практична робота

1. Засвоїти методику визначення інфекційного титру вірусу в БТО або ВТО.
2. Опрацювати методику визначення титру вірусу в ЕД₅₀
3. Засвоїти методику титрування вірусів за методом Кербера
4. Засвоїти методику постановки пластинкової (крапельної) РГА.
5. Засвоїти методику постановки пробіркової РГА.

Питання для самоконтролю

1. Дайте поняття титру вірусу.
2. Назвіть одиниці інфекційної активності вірусу за якими визначають його титр.
3. Що таке віспотвірна (ВТО) і бляшкотвірна одиниці (БТО) ?
4. Яким чином визначають титр вірусу в БТО (ВТО) ?
5. Дайте визначення ефективній дозі п'ятдесят (ЕД₅₀). Як вона трансформується залежно від виду тест-об'єкту та форми прояву дії вірусу на нього ?
6. Як визначають титр вірусу в ЕД₅₀ за методом Ріда і Менча ?
7. Як визначають титр вірусу в ЕД₅₀ за методом Кербера ?

8. Який принцип та механізм реакції аглютинації (РГА)?
9. Які фактори впливають на перебіг РГА ?
10. Компоненти та механізм крапельної РГА.
11. Компоненти та механізм пробіркової РГА.
12. З якою метою використовують РГА у вірусології ?
13. Який принцип визначення титру вірусу в ГАО ?
14. Яка загальна схема лабораторної діагностики вірусних інфекцій ?
15. Які переваги та недоліки різних методів титрування вірусів ?

Література:

1. Калініна О. С., Панікар І. І., Скибицький В. Г. Ветеринарна вірусологія. Херсон : ОЛДІ-ПЛЮС, 2022. 416 с.
2. Капрельянц Л. В., Єгорова А. В., Труфкаті Л. В. Лабораторний практикум із загальної мікробіології і загальної мікроболігії і вірусології : навчальний посібник. Херсон : ОЛДІ-ПЛЮС, 2021. 136 с.
3. Льотка Г. І., Радзиховський М. Л., Дишкант О. В. Загальна вірусологія основи ветеринарної та зоонотичної вірусології - навч. посіб. Вінниця : друк, 2020. 204 с. Ч. 1.
4. Основи вірусології : навч.-метод. посібник з лаб. практикуму / уклад. І. О. Шмараков, О. В. Кеца. 2-ге вид., перероб. Харків : Мачулін, 2015. 160 с.
5. Практикум з ветеринарної вірусології / В. Г. Скибіцький та ін. Київ : Вища освіта, 2005. 208 с.
6. Калініна О.С., Панікар І.І., Скибіцький В.Г. Ветеринарна вірусологія: Підручник. - К.: Вища освіта, 2004. - 432 с.

ТЕМА 7. РЕАКЦІЯ ЗАТРИМКИ ГЕМАГЛЮТИНАЦІЇ

Для діагностики більшості вірусних інфекцій з метою остаточної ідентифікації збудника використовують серологічні реакції, які по суті є заключним етапом лабораторної діагностики.

В основі цих реакцій лежить взаємодія імуноглобулінів (антитіл) з антигенами *in vitro*. Віруси в більшості своїй є добрими антигенами. Причому на певний вид вірусу (вірусні білки) синтезуються специфічні (власні) антитіла, які вступають у взаємодію з тим вірусом на який вони утворились.

Звичайно джерелом антитіл служить сироватка крові (serum) і тому реакції взаємодії антитіл з антигенами *in vitro* носять назву серологічних. Виходячи з вищезазначеного у вірусології серологічні реакції в основному використовують:

- 1). для ідентифікації (типізації) вірусу – вони є найкращим і доступним методом встановлення виду (штаму) вірусу;
- 2). для виявлення специфічних противірусних антитіл (ретроспективна діагностика);
- 3). для перевірки напруженості поствакцинального та постінфекційного імунітету, з метою прогнозування епізоотичної ситуації;
- 4). вивчення антигенної структури вірусів;
- 5). встановлення антигенної спорідненості вірусів;
- 6). оцінки активності діагностичних препаратів;
- 7). вивчення патогенезу вірусних інфекцій.

У вірусологічній практиці широкого застосування знайшли наступні серологічні реакції:

- 1). реакція затримки гемаглютинації (РЗГА), реакція нейтралізації затримки гемаглютинації (РНЗГА);
- 2). реакція непрямой гемаглютинації (РНГА) та її затримки (РЗНГА);
- 3). реакція затримки гемадсорбції (РЗГАд);
- 4). реакція нейтралізації гемадсорбції (РНГАд);

- 5). реакція аглютинації латексу (РАЛ);
- 6). реакція імунофлюоресценції (РІФ);
- 7). реакція дифузійної преципітації в агарі (РДПа);
- 8). реакція зв'язування комплементу (РЗК);
- 9). реакція нейтралізації (РН);
- 10). імуноферментний аналіз (ІФА).

Невдовзі після відкриття феномену гемаглютинації було помічено, що антивірусні імунні сироватки з'єднані з відповідним вірусом здатні нейтралізувати його гемаглютинуючу активність, тобто блокувати процес гемаглютинації.

Виходячи з цього, РЗГА ґрунтується на тому, що антитіла при зустрічі з специфічним вірусом нейтралізують не лише його інфекційну, а й гемаглютинуючу активність, шляхом блокування вірусних гемаглютинінів, утворюючи з ними комплекс антиген-антитіло. До суміші вірусу з сироваткою (антитілами) додають еритроцити і в даному випадку гемаглютинація не наступить, бо антитіла блокували вірусні гемаглютиніни. Реакція позитивна.

При відсутності специфічних антитіл еритроцити будуть аглютиновані вірусом (гемаглютинінами). Реакція вважається негативною.

Антитіла, що приймають участь у цій реакції називають **антигемаглютинінами**, а антигени – **гемаглютинінами**.

Реакція дозволяє вирішувати наступні завдання:

- ідентифікувати невідомий гемаглютинуючий вірус за відомими сироватками;
- визначити ступінь антигенної спорідненості двох гемаглютинуючих вірусів;
- визначити антитіла та їх титр антитіл в сироватці до певного гемаглютинуючого вірусу.

Підготовка сироватки

В сироватці часто містяться неспецифічні інгібітори вірусних гемаглютининів. Вони володіють здатністю вступати в зв'язок з вірусами і гальмувати спричинену ними гемаглютинацію. В цьому випадку навіть сироватка від здорових тварин може спричинити затримку гемаглютинації. Для звільнення сироватки від термолабільних інгібіторів достатньо одноразового прогрівання впродовж 30 хвилин при температурі 56-61⁰ С.

Термостабільні інгібітори витримують високі температури, тому їх усувають іншими методами, зокрема адсорбцією сироватки на каоліні, обробкою сироватки СО₂, фільтратом холерного вібріону, ефіром чи хлороформом, трипсином, папаїном і деякими вірусами, руйнування інгібіторів перйодатом калію та деякими іншими речовинами.

В сироватці крові часто містяться аглютиніни до еритроцитів тварин гетерологічних, а іноді й гомологічних видів. В усіх випадках, коли сироватку не розводимо до такої ступені, при якій ці аглютиніни вже неактивні, їх усувають адсорбцією сироватки концентрованою суспензією відповідних еритроцитів при 4⁰ С.

Приготування 1% суспензії еритроцитів

Для постановки реакції беруть еритроцити того виду тварин, з яким досліджуваний вірус дає найбільш постійний результат. Свіжоодержану асептично кров дефібринують в банці з скляними бусами (дефібринована кров), або змішують з одним з антикоагулянтів (стабілізована кров). Проводять відмивання еритроцитів шляхом центрифугування при 2,5-3 тис. об/хв 5-10 хвилин і ресуспендуванням у фізрозчині одержаного завису еритроцитів. Відмивання еритроцитів проводять до тих пір поки надосад не стане прозорим (5-6 разів). З осаду суспензії еритроцитів, що рахується 100%, готують 1% суспензію.

Визначення робочої дози вірусу

Спочатку проводять титрування вірусу в РГА, щоб визначити те його розведення, що містить 1 ГАО. Для головного дослідження частіше використовують розведення вірусу, що містить 4 ГАО. Наприклад: титр

вірусу, що містить 1 ГАО відповідає 1 : 64, тоді 4 ГАО будуть міститись в розведенні вірусу 1 : 16.

Реакцію використовують у 2 модифікаціях:

- 1). для виявлення антитіл;
- 2). для виявлення вірусу.

Таблиця 1

Схема РЗГА в модифікації для виявлення антитіл та їх титру.

Компоненти, мл	Основний дослід								Контроль					
	Розведення сироватки								сироватки	еритроцитів	ГАО вірусу			
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256					2	1
Номер лунки	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Ізотонічний розчин	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Дослідна сироватка	0,2	Послідовне перенесення по 0,2 мл*							0,2	-	-	-	-	-
Позитивний вірусний антиген (Т = 4 ГАО)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	-	-	0,4	Перенесення по 0,4 мл**		
	Експозиція від 30 хвилин до 18 годин за відповідної температури (4 ⁰ С, 18-22 ⁰ С, 37 ⁰ С) залежно від виду вірусу													
1% суспензія відповідних еритроцитів	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
	Експозиція 40-90 хвилин за температури 18-22 ⁰ С													
Облік результатів	-	-	-	-	+	++	+++	+++	-	-	+++	++	-	-

Примітка: * - з останньої лунки (8) видаляють 0,2 мл;
 ** - з останньої лунки (14) видаляють 0,4 мл;
 - затримка гемаглютинації;
 +++ (+, ++) – наявність гемаглютинації.

Виявлення антитіл в РЗГА

Компоненти реакції:

- 1).дослідні сироватки – сироватка крові, одержана від досліджуваних тварин (шукаємо антитіла);
- 2).специфічна (позитивна) сироватка – є біофабричного виробництва і містить специфічні антитіла до певного вірусу;
- 3).нормальна (негативна) сироватка – сироватка від здорових тварин, не містить специфічних антитіл;
- 4).відомий вірус (позитивний антиген);
- 5).1%-суспензія еритроцитів;
- 6).ізотонічний розчин NaCl.

Схема реакції наведена в таблиці 1.

Для контролю специфічності, одночасно ставлять реакцію за наведеною схемою основного досліду. Лише замість дослідної сироватки використовують нормальну та позитивні сироватки.

Якщо дослідна сироватка спричинює затримку гемаглютинації, то в ній є антигемаглютиніни до відповідного вірусу (позитивний результат). В такому разі визначають **титр антитіл** – найвище розведення сироватки, яке спричинює повну затримку гемаглютинації. Згідно наведеної схеми реакції титр антитіл склав 1 : 16. Якщо відбувається гемаглютинація, то в сироватці немає специфічних антитіл (негативна реакція).

Позитиви РЗГА

- технічно реакція досить проста;
- відноситься до експрес методів діагностики;
- висока специфічність реакції;
- висока чутливість реакції;
- не потребує стерильності та математичних розрахунків;
- досить дешева.

Недоліки РЗГА

- вплив на результат неспецифічних інгібіторів, іноді гемаглютинінів, які містяться в сироватках крові тварин;

- постановка реакції можлива лише з вірусами, які мають гемаглютинувальні властивості.

-

Практична робота

1. Опанувати принцип та механізм реакції затримки гемаглютинації (РЗГА).
2. Ознайомитись з компонентами реакції та їх підготовкою до проведення основного дослід.
3. Відпрацювати схему постановки основного дослід реакції для виявлення антитіл.

Питання для самоконтролю

1. Який принцип серологічних реакцій ?
2. З якою метою використовують серологічні реакції у вірусології ?
3. Які серологічні реакції використовують у вірусології ?
4. Охарактеризуйте принцип РЗГА.
5. Які компоненти приймають участь в РЗГА ?
6. З якою метою звільняють сироватки крові від неспецифічних інгібіторів та гемаглютинінів ?
7. Яким чином звільняють сироватки від неспецифічних інгібіторів та гемаглютинінів ?
8. Як визначають робочу дозу вірусу для постановки РЗГА ?
9. Яка методика проведення основного дослід РЗГА в модифікації для виявлення антитіл та їх титру ?
10. Дайте визначення титру антитіл в РЗГА.
11. Яка методика проведення основного дослід РЗГА в модифікації для виявлення вірусу ?
12. Як проводять оцінку результатів реакції ?
13. Охарактеризуйте переваги і недоліки РЗГА.

Література:

1. Калініна О. С., Панікар І. І., Скибицький В. Г. Ветеринарна вірусологія. Херсон : ОЛДІ-ПЛЮС, 2022. 416 с.
2. Капрельянц Л. В., Єгорова А. В., Труфкаті Л. В. Лабораторний практикум із загальної мікробіології і загальної мікроболігії і вірусології : навчальний посібник. Херсон : ОЛДІ-ПЛЮС, 2021. 136 с.
3. Льотка Г. І., Радзиховський М. Л., Дишкант О. В. Загальна вірусологія основи ветеринарної та зоонотичної вірусології - навч. посіб. Вінниця : друк, 2020. 204 с. Ч. 1.
4. Основи вірусології : навч.-метод. посібник з лаб. практикуму / уклад. І. О. Шмараков, О. В. Кеца. 2-ге вид., перероб. Харків : Мачулін, 2015. 160 с.
5. Практикум з ветеринарної вірусології / В. Г. Скибіцький та ін. Київ : Вища освіта, 2005. 208 с.
6. Калініна О.С., Панікар І.І., Скибіцький В.Г. Ветеринарна вірусологія: Підручник. - К.: Вища освіта, 2004. - 432 с.

ТЕМА 8. РЕАКЦІЯ НЕПРЯМОЇ ГЕМАГЛЮТИНАЦІЇ. РЕАКЦІЯ НЕЙТРАЛІЗАЦІЇ

Реакція непрямой гемаглютинації (РНГА) вперше була описана Бернетом та Андерсом в 1946 році. Цілий ряд вірусів здатні адсорбуватися на еритроцитах і при цьому не викликати їх аглютинацію. Якщо до таких, сенсibilізованих вірусами (антигенами) еритроцитів додати специфічну сироватку то відбувається їх склеювання за рахунок утворення комплексу антиген-антитіло. Отже, принцип РНГА полягає в тому, що еритроцити, на яких попередньо адсорбовані вірусні антигени, набувають здатності аглютинуватися в присутності гомологічних антитіл (рис. 1). З'ясувалось, що

на еритроцити також можна адсорбувати специфічні антитіла, в такому разі при додаванні до них гомологічних їм вірусів теж відбувається гемаглютинація.

РНГА використовується для діагностики інфекційного ринотрахеїту ВРХ, аденовірусної інфекції ВРХ, респіраторно-синцитіальної інфекції ВРХ, ящуру, класичної чуми свиней тощо.

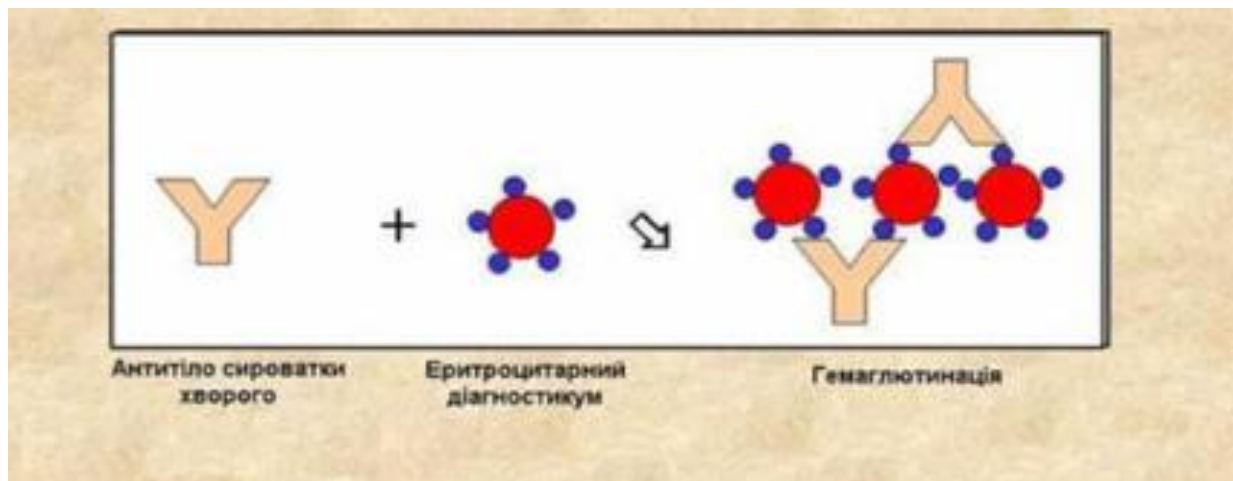


Рис. 1 Схема реакції непрямой гемаглютинації

Реакцію використовують в 2 варіантах:

1. Для виявлення антитіл та визначення їх титру

Компоненти реакції:

- 1). досліджувані сироватки;
- 2). специфічна і нормальна сироватки;
- 3). 1%-ний антитигенний еритроцитарний діагностикум (еритроцитарний антиген);
- 4). фізрозчин (з 1% нормальної сироватки крові кроля).

2. Для виявлення та ідентифікації антигенів (у тому числі вірусних)

Компоненти реакції:

- 1). досліджуваний антиген;
- 2). специфічний і нормальний антигени;

3). 1%-ний антитільний еритроцитарний діагностикум (еритроцитарне антитіло);

4). фізрозчин (з 1% нормальної сироватки крові кроля).

Підготовка еритроцитарних діагностикумів включає наступні етапи:

1). приготування суспензії еритроцитів. Найчастіше використовують еритроцити барана або людини О групи. Кров беруть загальноприйнятим методом, дефібринують і тричі відмивають фізрозчином при центрифугуванні. Осад еритроцитів ресуспендують до 50%-ного в 0,15 М фосфатно-буферному розчині (ФБР), що містить 0,15 М натрію хлориду (рН 7,2).

2). стабілізація еритроцитів. З'єднують рівні об'єми 50%-ної суспензії відмитих еритроцитів і 50%-ного розчину формаліну. Після 2-годинного контакту при 37° С з періодичним струшуванням еритроцити тричі відмивають ФБР з рН 7,2 і ресуспендують в ньому у вигляді 3%-ної суспензії. Стабілізовані еритроцити набувають властивостей зберігатися при 4° С тривалий час (декілька років), не гемолізуючись. Можна також для цього використати глутаровий чи акріловий альдегіди.

3). танізація еритроцитів. Змішують рівні об'єми 3%-ної суспензії формалінізованих еритроцитів на ФБР рН 7,2 і розводять у ФБР рН 6,4 до 10%-ної концентрації. Танізовані еритроцити можна зберігати при 4° С до 7 днів. Як результат танізації оболонка еритроцитів ущільнюється і зморщується. Такі еритроцити характеризуються високою здатністю адсорбувати білки, в тому числі вірусні антигени чи антитіла.

4). сенсibilізація еритроцитів. Змішують рівні об'єми 10% - ної суспензії танізованих еритроцитів на ФБР рН 6,4 і вірусвмісної чи антитільної рідини. Суміш витримують 60 хв. при 37° С, періодично струшуючи, центрифугують. Осад сенсibilізованих еритроцитів відмивають 2-3 рази ФБР рН 7,2 і розводять у ньому (з додаванням 1% нормальної сироватки крові кроля) до 1% концентрації. Оптимальну сенсibilізуючу дозу

антигену чи антитіл для різних вірусів підбирають в пробних дослідах сенсibiliзації еритроцитів.

Підготовка дослідних сироваток

Звільняють сироватки від неспецифічних інгібіторів та гемаглютининів за методиками, що описані в РЗГА.

Схема основного досліду наведена в таблиці 1.

Таблиця 1

Схема РНГА в модифікації для виявлення антитіл та їх титру

Компоненти, мл	Основний дослід								
	Розведення сироватки								
	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560
Номер лунки	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Ізотонічний розчин з 1% нормальної сироватки кроля	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Дослідна сироватка в розведенні 1:5	0,2	Послідовне перенесення по 0,2 мл*							
1% еритроцитарний антиген	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	-
	Панелі струшують і витримують 1,5-2 год за температури 18-22°C.								
Облік результатів	+++	+++	+++	+++	++	+	-	-	-

Примітка: * - з останньої лунки (9) видаляють 0,2 мл;

Результати реакції оцінюють у плюсах, аналогічно що й в РГА. За позитивний результат вважають наявність гемаглютинації еритроцитів в присутності дослідних сироваток, за негативний – її відсутність.

Крім цього, дана модифікація дозволяє виявити титр антитіл. Титром антитіл вважають найвище розведення сироватки, яке викликає гемаглютинацію не менше ніж на два плюси.

Паралельно з основним дослідом ставлять контролю:

1). контроль специфічності реакції – ставлять РНГА із специфічною і нормальною сироватками, згідно схеми основного досліду. При цьому із специфічною сироваткою має бути обов'язкова гемаглютинація, а з нормальною – її відсутність;

2). контроль еритроцитарного антигену (0,2 мл 1%-ного еритроцитарного антигену + 0,2 мл фізрозчину з 1 % нормальної сироватки кроля). Має бути відсутність гемаглютинації;

3). контроль досліджуваної сироватки (0,2 мл дослідної сироватки + 0.2 мл несенсибілізованих еритроцитів). Має бути відсутність гемаглютинації.

Позитиви РНГА

- технічно реакція досить проста;
- відноситься до експрес методів діагностики;
- висока специфічність реакції;
- висока чутливість реакції;
- не потребує стерильності та математичних розрахунків;

Недоліки РНГА

- труднощі в приготуванні стабільних еритроцитарних діагностиків, не всі віруси чи антитіла до них добре нашаровуються на еритроцити;
- можливість гемолізу еритроцитарних діагностиків.

РЕАКЦІЯ НЕЙТРАЛІЗАЦІЇ (РН) рахується однією з найбільш універсальною високо специфічною реакцією, тому вона служить еталоном при оцінці інших реакцій в вірусології. Реакція нейтралізації (РН) базується на здатності імунної сироватки при додаванні до відповідного вірусу блокувати його здатність до репродукції.

В серологічній діагностиці РН застосовується для виявлення наростання титру нейтралізуючих антитіл до певного (відомого) вірусу в парних сироватках крові.

Суть реакції полягає в тому, що при змішуванні вірусу з сироваткою, яка містить специфічні антитіла, вірус втрачає інфекційні властивості, тобто здатність розмножування в чутливих лабораторних тест-об'єктах. В залежності від виду тест-об'єктів РН ставлять на лабораторних тваринах (найчастіше – новонароджених білих мишах), курячих ембріонах або в культурах клітин. Антитіла, що нейтралізують інфекційні властивості вірусу носять назву *віруснейтралізуючі*.

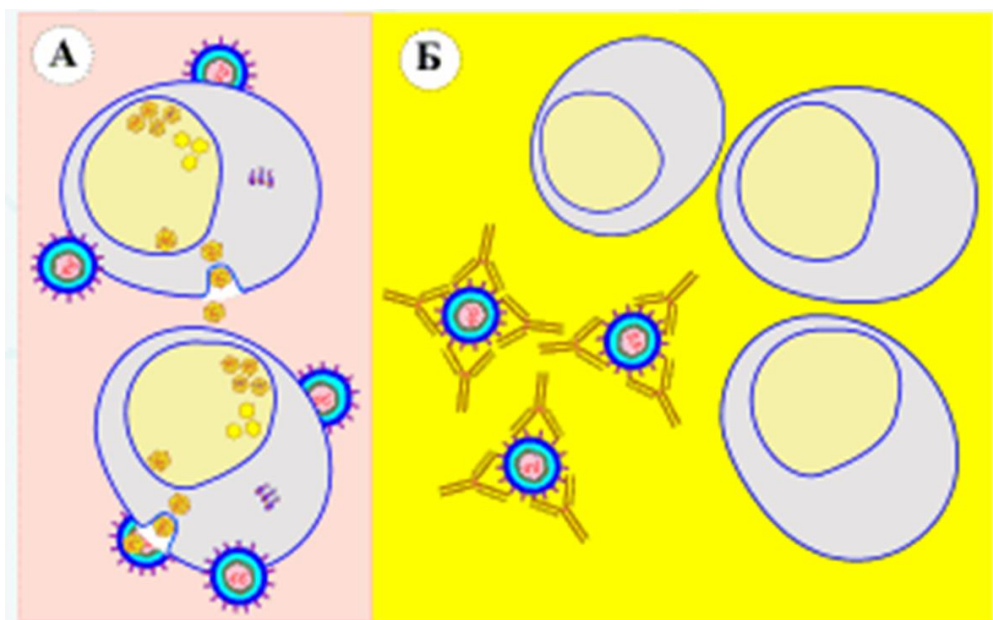


Рис. 2. Реакція нейтралізації

Антигени з сироваткою з'єднують в рівних об'ємах, проте, враховують, що віруси з антитілами реагують в певних кількісних співвідношеннях, які завчасно невідомі, один з компонентів реакції беруть в постійній дозі, а інший в змінній. Тому реакцію ставлять в 2 модифікаціях:

1) з постійною дозою вірусу і різними розведеннями сироватки (частіше використовується для виявлення антитіл);

2) з постійним розведенням сироватки і різними дозами вірусу (частіше використовується для ідентифікації вірусу).

Постановка РН з різними розведеннями сироватки і постійною дозою вірусу для виявлення антитіл.

Компоненти реакції:

- 1) досліджувані сироватки;
- 2) еталонний штам вірусу;
- 3) тест-об'єкти (лабораторні тварини, курячі ембріони або пробірки з культурою клітин);
- 4) фізрозчин, розчин Хенкса або середовище для культури клітин.

Постановка реакції:

1. Визначення робочої дози вірусу.

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

Якщо, наприклад, в реакції вирішили використовувати 1000 ЛД₅₀/мл. Титр вірусу після його визначення складає 10⁸ ЛД₅₀/мл, тоб то 1 мл вірусу в розведенні 10⁻⁸ містить мінімальну його дозу що викликає загибель 50% тварин (ЛД₅₀), тоді 1 мл розведення 10⁻⁷ містить відповідно 10 ЛД₅₀, а 10⁻⁵ – 1000 ЛД₅₀. Це й є робочий титр (розведення) вірусу.

Якщо титр дрібне число то розведення вірусу корегують за спеціальною таблицею (табл. 2).

Таблиця 2

Співвідношення вірусу і розчинів для одержання розведень в межах 1 lg.

Інтервал в межах 1 lg	Співвідношення вірусу та фізрозчину
0,1 lg	1:1,2 (1 частина вірусу + 0,2 частини фізрозчину)
0,2 lg	1:1,6 (1 частина вірусу + 0,2 частини фізрозчину)
0,3 lg	1:2,0 (1 частина вірусу + 0,2 частини фізрозчину)

0,4 lg	1: 2,5 (1 частина вірусу + 0,2 частини фізрозчину)
0,5 lg	1:3,2 (1 частина вірусу + 0,2 частини фізрозчину)
0,6 lg	1:4,0 (1 частина вірусу + 0,2 частини фізрозчину)
0,7 lg	1:5,0 (1 частина вірусу + 0,2 частини фізрозчину)
0,8 lg	1:6,3 (1 частина вірусу + 0,2 частини фізрозчину)
0,9 lg	1:8,0 (1 частина вірусу + 0,2 частини фізрозчину)

Приклад: вірус має при титруванні з використанням РКЕ $10^{7,5}$ ЕІД₅₀/мл. В реакції використовують 100 ЕІД₅₀/мл. Для одержання робочої дози вірусу вихідну його суспензію розводять 10^{-5} рази і додають до 1 мл цього розведення, згідно таблиці 2,2 мл буферного розчину.

2. Основний дослід РН.

а) готують двократні розведення досліджуваної сироватки від 1:4 до 1:256 і вище на фізрозчині, розчині Хенкса або середовищі в однаковому об'ємі (при постановці реакції на новонароджених мишенятах - 0,1-0,5 мл в залежності від методу зараження, при постановці реакції на курячих ембріонах і в культурах клітин - 0,5 мл);

б) до кожного розведення сироватки додають рівний об'єм вірусу в робочій дозі 100 або 1000 ЕД₅₀ на один тест-об'єкт;

в) суміші сироватки з вірусом струшують і витримують певний час (від 30 хв до 18 год.) при відповідній температурі (при кімнатній температурі або 37°C чи 4°C) в залежності від умов досліду і властивостей вірусу. Кожною сумішню сироватки з вірусом заражають рівні групи (частіше по 4) тест-об'єкти в однаковому об'ємі (новонародженим мишенятам інокулюють по 0,01 мл і/ц і 0,1-0,2 мл в/ч або п/ш; курячим ембріонам - по 0,2 мл; в пробірки з культурою клітин - по 0,2 мл суміші і 0,8 мл середовища).

в) за зараженими тест-об'єктами спостерігають протягом 5-12 днів, враховують результати;

г) використовуючи метод Кербера або ж Ріда і Менча, розраховують розведення сироватки, яке захищає 50% тест-об'єктів від інфекційної дії

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

д) одночасно ставлять контролю:

- контроль вірусу (вірус у робочій дозі 100 або 1000 ЕД₅₀ на один тест-об'єкт змішують у рівних об'ємах з фізрозчином, розчином Хенкса або середовищем і заражають 4 тест-об'єкти);
- контроль робочої дози вірусу 100 або 1000 ЕД₅₀ на один тест-об'єкт (готують 10-кратні розведення робочої дози вірусу включно до 0,1 ЕД₅₀ і заражають кожним розведенням по 4 тест-об'єкти);
- контроль сироватки на токсичність (сироватку в розведенні 1:4 змішують в рівних об'ємах з фізрозчином, розчином Хенкса або середовищем і заражають 4 тест-об'єкти);
- контроль тест-об'єктів (4 тест-об'єкти залишають незараженими, в пробірках з культурою клітин змінюють середовище).

Якщо в якості тест-об'єктів використовують лабораторних тварин, то результати оцінюють по здатності антитіл запобігати загибелі 50% тварин.

При використанні РКЕ результати оцінюють по здатності антитіл запобігати загибелі 50% РКЕ, затримувати появу 50% віспин на ХАО РКЕ, знижати титр гемаглютинінів у 50% РКЕ.

Результати реакції в культурі клітин оцінюють по здатності антитіл затримувати прояв 50% ЦПД.

Ця модифікація реакції дозволяє встановити:

- 1) титр віруснейтралізуючих антитіл (вірус нейтралізуючий ефект сироватки);
- 2) провести ідентифікацію досліджуваних антитіл (а через них і вірусу);
- 3) встановити антигенну спорідненість вірусів за умови однакових титрів при постановці реакції з однією сироваткою.

Приклад.

Потрібно визначити титр протівісп'яних антитіл в сироватці крові курей.

Вірус віспи птахів спричинює утворення віспин на ХАО РКЕ. Тому в дослід взяли РКЕ 10-добового віку. В кожний ембріон будемо вводити по 0,2 мл суміші вірусу з відповідним розведенням сироватки.

Робоча доза вірусу повинна скласти 100 ЕІД₅₀/мл, проте ми беремо на один РКЕ лише 0,1 мл вірусу. Тому титр вірусу повинен скласти 1000 ЕІД₅₀/мл, що б в кожний ембріон попало 100 таких доз.

Після титрування вірусу титр склав 10^{6,4} ЕІД₅₀/мл (розведення яке містить одну ЕД₅₀). Відповідно 1000 таких доз буде відповідати розведенню вірусу 10^{-3,4}. Користуючись таблицею 1 робимо поправку на 0,4 lg, тоб то на 1 мл вірусвмісної суспензії в розведенні 10⁻³ додаємо 1,5 мл буферного розчину. Це фактично відповідає робочій дозі вірусу, яку використовують при постановці основного досліді.

Після цього готуємо послідовні двократні розведення сироватки від 1:2 до 1:256 в об'ємі 0,5 мл. До кожного розведення додаємо по 0,5 мл вірусу в робочій дозі. Суміші витримують близько 60 хв при кімнатній температурі і заражають на ХАО РКЕ (по 4 на кожне розведення). Результат зараження враховують після появи віспин на ХАО. За позитивний результат приймають відсутність віспин на ХАО (+), а за негативний (-) – їх наявність. Одержані результати наведені в таблиці 3.

Таблиця 3

Результати РН з розведеннями сироватки

Компоненти реакції	Розведення сироватки SS								Контроль вірусу
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	
SS+AS	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Контроль сироватки	+								
	+								
	+								
	+								

Для розрахунку титру антитіл в сироватці складемо таблицю 4.

Таблиця 4

Результати РН з розведеннями сироватки

Розведення сироватки	Кількість заражених РКЕ	Доза зараження, мл	Відсутність віспин (+)	Наявність віспин (-)
1:2 = $10^{-0,3}$	4	0,2	4	0
1:4 = $10^{-0,6}$	4	0,2	3	1
1:8 = $10^{-0,9}$	4	0,2	3	1
1:16 = $10^{-1,2}$	4	0,2	2	2
1:32 = $10^{-1,5}$	4	0,2	2	2
1:64 = $10^{-1,8}$	4	0,2	1	3
1:128 = $10^{-2,1}$	4	0,2	0	4
1:256 = $10^{-2,4}$	4	0,2	0	4

Одержані результати свідчать, що сироватка захищає 50% РКЕ від дії 100 ЕІД₅₀ вірусу в розведенні між 1:16 та 1:32. Для точного розрахунку використовуємо формулу Кербера в модифікації Троценко.

$$\text{Lg ЛД}_{50} = \text{lgD} + \text{lgd}/2 - \text{lgd} \sum r/n, \text{ де}$$

D- найвище розведення вірусу, яке дає 100%-ний ефект (10^{-2});

d - коефіцієнт розведення вірусу (10);

n - кількість заражених тест-об'єктів на кожне розведення (4);

r - кількість позитивно реагуючих тест-об'єктів на кожне розведення;

$\sum r/n$ - сума відношень позитивно реагуючих тест-об'єктів до заражених для усіх розведень вірусу, які дають ефект від 0 до 100%.

Підставимо у формулу значення з таблиці 3.

$$\text{Lg ЛД}_{50} = \text{lg}10^{-0,3} + \text{lg}2/2 - \text{lg}2 (0/4 + 1/4 + 1/4 + 2/4 + 2/4 + 3/4 + 4/4) = -2 + 1/2 - 12/4 = -0,3 + 0,3/2 - 0,3 \times 13/4 = -0,3 + 0,15 - 0,3 \times 3,25 = -0,15 - 0,975 = -1,125.$$

Отже сироватка в розведенні $10^{-1,125}$ захищає 50% КЕ від дії 100 ЕІД₅₀ вірусу віспи птахів. Тоб то титр $T = 10^{-1,125} = 1:10^{1,125}$. Таке число, згідно таблиці антилогарифмів, відповідає абсолютному значенню 1: 18. Відповідно $T_{\text{ант}} = 1:18$.

Таблиця 5

Приклад РН в модифікації з розведеннями вірусу

Компоненти реакції	Розведення вірусу								Контроль сироваток
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	
Специфічна сироватка 1:10 (SS) + різні розведення вірусу (AS)	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Нормальна сироватка 1:10 (SN) + різні розведення вірусу (AS)	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Фізрозчин + різні розведення вірусу (AS) (контроль вірусу)	+	+	+	+	+	+	+	+	
	+	+	+	+	+	+	+	-	
	+	+	+	+	+	+	-	-	
	+	+	+	+	+	-	-	-	

Дана модифікація дозволяє визначити:

- 1) індекс нейтралізації, що характеризує концентрацію антитіл в дослідній (специфічній) сироватці;
- 2) ідентифікувати невідомий вірус з допомогою специфічної сироватки;
- 3) встановити антигенну спорідненість між вірусами.

Переваги реакції:

- 1) універсальність – РН можна ставити з усіма вірусами і на всіх біологічних об'єктах, що використовуються для виділення вірусів;
- 2) висока специфічність і достовірність одержаних результатів.

Недоліки:

- 1) дуже трудомістка, вимагає багато часу, зусиль і матеріальних витрат;
- 2) потребує стерильності в роботі;
- 3) потребує математичних розрахунків.

Практична робота

1. Законспектувати та відпрацювати схему постановки основного дослідження реакції для виявлення антитіл та їх титру.

2. Опрацювати схему реакції нейтралізації з постійною дозою вірусу і різними розведеннями сироватки.

Питання для самоконтролю

1. Охарактеризуйте принцип РНГА.
2. Які компоненти приймають участь в РНГА ?
3. Охарактеризуйте еритроцитарні діагностикуми.
4. Яким чином готують еритроцитарні діагностикуми ?
5. Яка методика проведення основного дослідження РНГА в модифікації для виявлення антитіл ?
6. Дайте визначення титру антитіл в РНГА.
7. Як проводять облік результатів реакції ?
8. Як контролюють достовірність результатів реакції ?
9. Охарактеризуйте принцип РН.
10. Які існують модифікації реакції нейтралізації?
11. Яка методика проведення РН в модифікації з різними розведеннями сироватки і постійною дозою вірусу для виявлення антитіл?
12. Дайте визначення титру антитіл в РН.
13. Як проводять облік результатів реакції в згаданій модифікації?

Література:

1. Калініна О. С., Панікар І. І., Скибицький В. Г. Ветеринарна вірусологія. Херсон : ОЛДІ-ПЛЮС, 2022. 416 с.
2. Капрельянц Л. В., Єгорова А. В., Труфкаті Л. В. Лабораторний практикум із загальної мікробіології і загальної мікроболігії і вірусології : навчальний посібник. Херсон : ОЛДІ-ПЛЮС, 2021. 136 с.

3. Льотка Г. І., Радзиховський М. Л., Дишкант О. В. Загальна вірусологія основи ветеринарної та зоонотичної вірусології - навч. посіб. Вінниця : друк, 2020. 204 с. Ч. 1.

4. Основи вірусології : навч.-метод. посібник з лаб. практикуму / уклад. І. О. Шмараков, О. В. Кеца. 2-ге вид., перероб. Харків : Мачулін, 2015. 160 с.

5. Практикум з ветеринарної вірусології / В. Г. Скибіцький та ін. Київ : Вища освіта, 2005. 208 с.

6. Калініна О.С., Панікар І.І., Скибіцький В.Г. Ветеринарна вірусологія: Підручник. - К.: Вища освіта, 2004. - 432 с. 3. Панікар І.І., Скибіцький В.Г., Калініна О.С. Практикум з ветеринарної вірусології. Суми: Козацький вал. 2007. 236 с.

ТЕМА 9: РЕАКЦІЯ ДИФУЗІЙНОЇ ПРЕЦИПІТАЦІЇ В АГАРОВОМУ ГЕЛІ. ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА СКАЗУ ТВАРИН

Сказ – це зооантропонозна хвороба, що супроводжується важким ураженням центральної нервової системи і закінчується, як правило, загибеллю тварини.

Хвороба відома з часів глибокої давнини, реєструється у всіх країнах світу.

Вірус сказу відноситься до родини *Rhabdoviridae* роду *Lissavirus*, має кулеподібну форму, діаметр віріону 50-95 нм, а довжина 170-180 (130-380) нм. Нуклеокапсид спіральний, оточений суперкапсидом з поверхневими виступами – пепломерами.

Геном вірусу – лінійна одноланцюгова РНК із молекулярною масою $3,5 - 4,6 \times 10^6$ Д. Віріони містять 5 структурних поліпептидів, включаючи транскриптазу (РНК-залежну полімеразу). Вірус сказу може виявляти гемаглютинуючу активність завдяки наявності поверхневого глікопротеїну С1,

який відповідає за створення вірус нейтралізуючих антитіл, антигемаглютининів і формування імунітету.

Вірус сказу стійкий до гниття, відносно стійкий до фенолу і йоду, до висушування на повітрі. Для нього згубні високі температури, при температурі 60 °C він руйнується через 5-10 хвилин, при температурі 70 °C – миттєво, в оточуючому середовищі зберігається до 15 діб. Вірус стійкий до низьких температур, швидко інактивується дезінфікуючими розчинами лугів і кислот. Для нього згубні ультрафіолетові промені.

Вірус сказу містить два антигенних компоненти: S та V. S-антиген є загальним для усіх представників роду *Lyssavirus* і викликає утворення комплементфіксуючих і преципітуючих антитіл. V- антиген (поверхневий) індукує утворення нейтралізуючих антитіл і відповідає за формування імунітету. Гемаглютинувальна активність вірусу пов'язана з пепломерами. Вірус сказу аглютинує еритроцити гусаків при температурі від 0 до плюс 4°C, рН 6,4.

До вірусу сказу сприйнятливі всі теплокровні тварини; найбільш сприйнятливі лисиці, вовки, шакали, кішки і ВРХ. Середня чутливість відзначена у собак, овець, кіз, коней і приматів, а низька – у птиці.

Вірус сказу є нейротропним.

Передача вірусу від хворого до здорового відбувається, як правило, при укусі, тому що вірус виділяється із організму зі слиною. Джерело збудника є хворі тварини і вірусоносії за 8-10 днів до прояву клінічних ознак хвороби. Носіями збудника можуть бути 22 види диких тварин. На території України головним джерелом є червона лисиця та вовк, рідше борсуки, куниці, тхори, ласки і видри.

При зараженні вірус з місця проникнення потрапляє по доцентрових нервових волокнах у спинний і головний мозок. Розмноження вірусу в сірій речовині мозку викликає розвиток негнійного енцефаліту. З мозку по відцентрових нервових волокнах вірус потрапляє в слинні залози. Тут у

нервових вузлах він репродукується і після загибелі нервових клітин виходить у протоки слинних залоз та інфікує слину.

Інкубаційний період варіює між 20-тим і 50-тим днями з коливаннями від 15 до 90 днів. Описані випадки і більш тривалого інкубаційного періоду – рік і більше.

Хвороба характеризується стадійністю:

- продромальна стадія – 12-72 години. У зараженої тварини підвищується чутливість до шуму, світла, підвищується температура тіла, виявляють збочений апетит;

- стадія збудження – характеризується порушенням чутливості, буйством, звуженням зіниць, судомами, парезами жувальних м'язів;

- стадія парезів і паралічів.

За типового перебігу хвороби у собак розрізняють буйну і тиху (паралітичну) форму розвитку хвороби. У тварини змінюється поведінка. Вона ховається по темних кутках, пригнічення може різко змінюватись пожвавленням, пізніше з'являється лютість і агресивність, спотворений апетит, а ковтання утруднене. Потім настає остання стадія хвороби – паралічі.

У тварин інших видів сказ може виявлятися по-різному, частіше в буйній формі з агресивністю. Якщо сільськогосподарські тварини на прив'язі, то рвуть її, прагнуть утекти, нападають на інших тварин і людину. Агресивність особливо відзначена у вовків – нападають на тварин і людей. Лисиці є головним резервуаром збудника у Європі. Клінічний прояв сказу у лисиць виявляється незвичною поведінкою – вони не бояться людей.

При підозрі на сказ трупи розтинати не можна.

Трупи тварин, що загинули від сказу виснажені, мають сліди укусів і розчосів, шерсть скуйовджена і змочена слиною. Шлунок порожній, іноді у м'ясоїдних тварин містить неїстівні предмети. Відмічають катаральне запалення слизової оболонки шлунково-кишкового тракту, іноді з точковими крововиливами. У внутрішніх органах відмічають застійну гіперемію. Головний мозок набряклий, з крововиливами. При гістологічному

дослідженні встановлюють дифузний негнійний енцефаліт лімфоцитарного типу.

Діагноз і диференційний діагноз ставлять на підставі епізоотологічних, клінічних даних і результатів лабораторних досліджень.

Нижче наведена схема лабораторної діагностики сказу (табл. 1).

Таблиця 1

Схема лабораторної діагностики сказу

Матеріал для дослідження	Експрес-методи	Вірусологічні методи		Ретроспективна діагностика	Диференційна діагностика
		Ізоляція та індикація вірусу	Ідентифікація вірусу		
Голова з двома першими шийними хребцями або головний мозок, трупи дрібних тварин	Цитоплазматичні тільця-включення Бабеша-Негрі, РІФ, РДПа, РЗК, ІФА	1. Білі мишенята, зараження і/ц і п/ш. Через 7-10 діб виявляють скуйовдженість шерсті, горбатість спини, порушення координації рухів, параліч кінцівок і загибель. 2. Клітинна культура (ВГНК, НГУК) через 48 год після зараження	Цитоплазматичні тільця-включення Бабеша-Негрі, РІФ, РДП, РН	Не використовується	Хвороба Ауескі, чума м'ясоїдних (нервова форма), енцефаломієліти коней (східний, західний, венесуельський)

Взяття і транспортування матеріалу. У лабораторію відправляють голову або труп тварини (можна і головний мозок), суворо дотримуючись правил взяття і особистої безпеки.

При транспортуванні підозрілого матеріалу не повинна виникати небезпека інфікування людей. Для цього головний мозок поміщають в герметичний жорсткий контейнер, голови тварин необхідно завертати в

адсорбуючий матеріал. Матеріал бажано транспортувати в охолодженому вигляді.

Матеріал і супровідний документ, в якому вказують адресу, вид тварини, анамнестичні дані і обґрунтування підозр в захворюванні тварини сказом, дату і підпис лікаря ветмедицини відправляють з нарочним.

В головному мозку вірус сказу, головним чином, локалізується в таламусі, варолієвому мосту і довгастому мозку.

У лабораторних умовах вірус сказу культивують на лабораторних тваринах (білих мишках, кролях), розвинених курячих ембріонах і культурах клітин.

Експрес-діагностика базується на швидкому виявленні вірусних антигенів безпосередньо в патматеріалі.

З цією метою досить часто використовують реакцію імунофлуоресценції (РІФ). Цей метод за правильного виконання має 99-100% специфічність.

Методика постановки РІФ.

1. На знежирених предметних скельцях готують тонкі мазки-відбитки або мазки з різних відділів головного мозку лівої і правої сторони (амонів ріг, кора на півкуль, мозочок і довгастий мозок). Можна використовувати спинний мозок, під щелепові слинні залози). Для контролю роблять аналогічні препарати із мозку здорової тварини (звичайно білої миші).
2. Препарати висушують на повітрі, фіксують в охолоджену ацетоні (-15-20 °С) від 4 до 12 годин і знову висушують.
3. Наносять флуоресціюючий кон'югат (специфічний імуноглобулін мічений ФІТЦ), поміщають у вологу камеру за 37 °С на 25-30 хвилин.
4. Ретельно промивають фосфатним буфером з рН 7,4, споліскують дистильованою водою, висушують на повітрі.
5. Наносять не флуоресціюючу імерсійну олію і продивляються під люмінесцентним мікроскопом.

За позитивного результату виявляють антиген вірусу сказу різної величини і форми у вигляді жовто-зелених гранул в нейронах або частіше поза ними. Інтенсивність світіння має бути не менше ніж на 3-4 плюси. В контрольних препаратах такого світіння немає.

Матеріал від тварин вакцинованих проти сказу може давати специфічне світіння впродовж 3 місяців з моменту щеплення.

Метод пригнічення імунофлуоресценції (РІФ) – мазки обробляють антирабічним гамаглобуліном, а потім флуоресціюючим кон'югатом – світіння буде відсутнє.

В РІФ не досліджують тканини консервовані гліцерином, а також матеріал, що має ознаки незначного розкладу.

В останньому випадку можна використати ***реакцію дифузної преципітації в агаровому гелі (РДП)***

Метод базується на властивості антитіл і антигенів дифундувати в агаровому гелі і при зустрічі утворювати візуальні лінії преципітації (комплекс антиген-антитіло). Проте специфічність цього методу коливається від 45 до 70%.

Методика постановки.

1. На предметні скельця наливають 2,5-3 мл розплавленого 1,5% агару.
2. Після застигання в агарі роблять лунки по трафарету діаметром 4-5 мм, який розташований під предметним скельцем з агаром.
3. Лунки в агарі заповнюють компонентами згідно схеми (рис. 1).
4. Від великих тварин досліджують всі відділи головного мозку з лівого і правого боку, від середніх (щури, хом'яки) – будь-які 3 відділи мозку, у мишей – увесь мозок.
5. При допомозі пінцету з мозку готують пастоподібну масу, яку поміщають у відповідні лунки.
6. Контролі з позитивними і негативними антигенами проводять на окремому склі по тому ж трафарету.

7. Після заповнення лунок компонентами препарати поміщають у вологу камеру і ставлять в термостат при 37 °С на 6 годин, далі за кімнатної температури на 18 годин. Облік результатів проводять впродовж 48 годин.

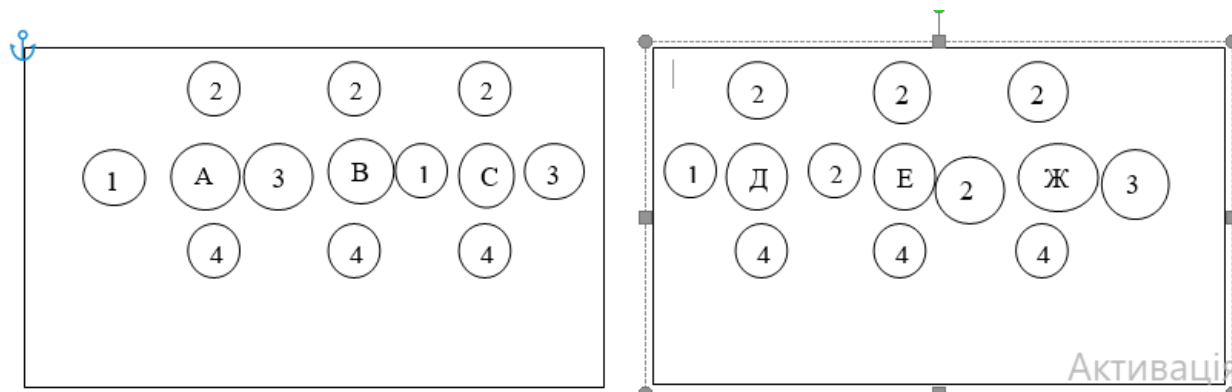


Рис. 1. Схема РДП за діагностиці сказу:

A – кора (ліва півкуля); B – кора (права півкуля); C – амонів ріг (лівий); D – амонів ріг (правий); E – мозочок; Ж – довгастий мозок; 1, 2, 3, 4 – розведення специфічної антирабічної сироватки 1:2, 1:4, 1:8, 1:16.

За позитивного результату виявляють лінії преципітації між лунками, що містять суспензію мозку і антирабічного гамма-глобуліну (рис. 2).

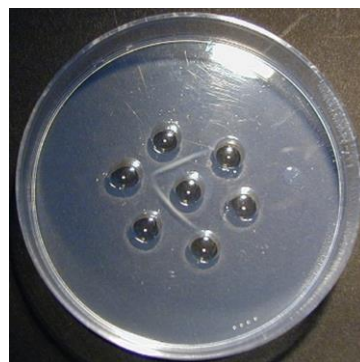
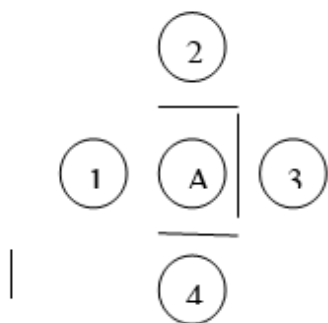


Рис. 2. Позитивна РДП розведеннями глобуліну 1:4 (2), 1:8 (3), 1:16 (4) з матеріалом взяти з кори (ліва півкуля).

Виявлення тілець Бабеша-Негрі (гістологічний метод).

Тільця включення при сказі мають специфічну локалізацію, структуру, форму, що дозволяє при їх виявленні поставити точний діагноз на цю хворобу.

Тільця Бабеша-Негрі представляють собою скупчення нуклеокапсидів вірусу сказу (без зовнішньої оболонки) в поєднанні з продуктами клітинної реакції. Їх виявляють у цитоплазмі заражених нервових клітин: при буйній формі сказу частіше всього в клітинах амонових рогів, а при паралітичній формі – в довгастому і спинному мозку.

Тільця Бабеша-Негрі мають різну величину (від 0,25 до 25 мкм) і форму (округла, яйцеподібна, грушоподібна, трикутна, сигароподібна). Найчастіше зустрічаються тільця округлої форми діаметром від 4 до 10 мкм. Вони оточені оболонкою і містять зернисті включення (від 1 до 15, *специфічна ознака*). В кожному тільці одне або декілька більших зерен займають центральне положення, а дрібні їх оточують або розміщуються по периферії. Тільця зафарбовуються кислими фарбами, а їх внутрішня зернистість – основними. Така зерниста структура дозволяє диференціювати тільця Бабеша-Негрі від інших внутрішньоклітинних включень.

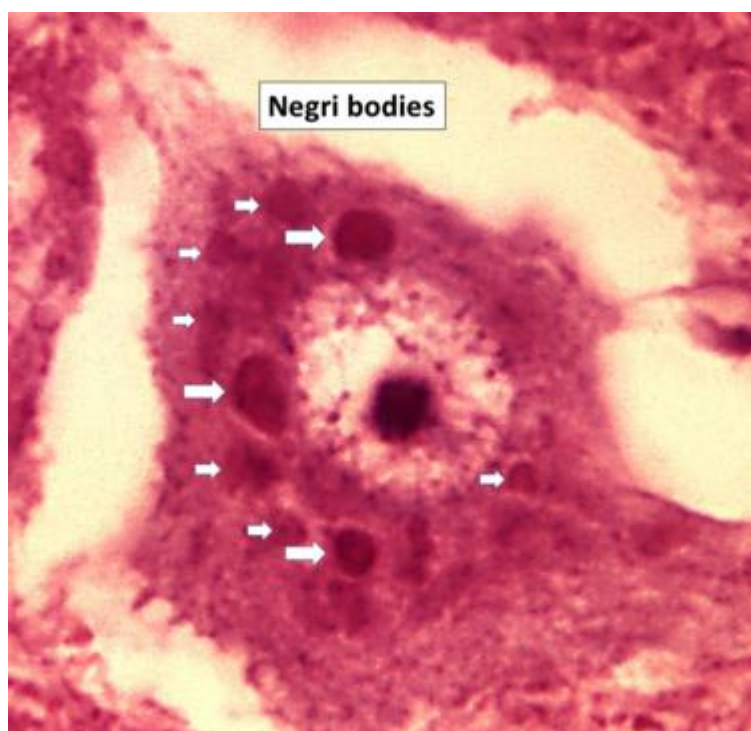


Рис.3. Гістопатологія тілець Бабеша-Негрі енцефаліту при сказі

Тільця Бабеша-Негрі виявляють лише у 65-85 % випадків сказу. Для індикації у патматеріалі тілець Бабеша-Негрі готують відбитки, мазки або найкраще – гістозрізи з різних відділів головного мозку (кора великих півкуль, мозочок, довгастий мозок, амонів ріг). Готують не менше двох препаратів з кожного відділу мозку.

Для виявлення тілець Бабеша-Негрі використовують різні методи фарбування (за Селером, Муромцевим, Манном, Ленцом), найчастіше за Муромцевим або Селером.

Фарбування за Муромцевим:

1. Свіжі, вологі препарати фіксують 1-2 год. в етиловому або метиловому спирті при кімнатній температурі або 15-20 хв. у спирті, підігрітому до 50-70 °С, промивають дистильованою водою.
2. Препарати фарбують у розчині синьки Мансона 1:40 (2 г бури розчиняють у 25 мл бідистильованої води при кип'ятінні, додають у гарячий розчин 0,5 г метиленової синьки і доводять бідистильованою водою до 1 л) – 5-10 хв.
3. Препарати зразу занурюють у 10%-ий розчин таніну на 5-10 хв. до появи блакитного відтінку, промивають дистильованою водою, висушують фільтрувальним папером.
4. Препарати проводять через абсолютний спирт або спирт з ацетоном (1:1) протягом декількох секунд, висушують на повітрі.

Препарати розглядають у світловому мікроскопі під імерсійною олією. Фон і цитоплазма нервових клітин блідо-блакитні, ядра сині, ядерця темно-сині, еритроцити помаранчево-червоні, а тільця Бабеша-Негрі різко окреслені, фіолетового кольору з рожевим відтінком і чітко вираженою темно-фіолетовою зернистістю.

Фарбування за Селером:

1. На свіжі, вологі препарати наносять фарбу: суміш 1 %-их спиртових розчинів основного фуксину і метиленової синьки у співвідношенні 1:2, витримують 10 сек.

2. Препарати промивають дистильованою водою, висушують на повітрі. В пофарбованих препаратах нервові клітини (цитоплазма, ядра і ядерця) сині, інтерстиціальна тканина рожева, еритроцити цегляно-червоні, а тільця Бабеша-Негрі пурпурово-червоного кольору з темно-синьою зернистістю.

Перспективним експрес-методом є імунофементний аналіз (ІФА) для виявлення антигену у патологічному матеріалі.

Для ідентифікації антигену використовують прямий імунопероксидазний варіант ІФА. В цьому випадку використовують імунопероксидазний кон'югат (антитіла мічені ферментом пероксидазою хрому). Цей метод є також досить високоспецифічним. Проте ризик одержання неправильних результатів все ж вищий ніж при постановці РІФ.

Одним з варіантів імунохімічного тесту є імуноферментний аналіз (ELISA), при допомозі якого можна швидко виявити антиген вірусу сказу безпосередньо в патологічному матеріалі.

Також розроблена схема діагностики антигенів вірусу сказу при допомозі реакції зв'язування комплементу (РЗК). Реакцію ставлять згідно загальноприйнятої методики.

Вірусологічні методи. Слід відзначити, що з патматеріалу надісланого в лабораторію не завжди вдається виявити вірусні антигени експрес-методами. Тому негативні або сумнівні результати РІФ, ІФА, РДПа, РЗК та гістологічного методу не виключають сказ.

У такому випадку обов'язково проводять біопробу на білих мишах. Для зараження готують 10%-ну суспензію з різних відділів мозку (за необхідності додають антибіотики). Відбирають від 5 до 10 мишей у віці 3-4 тижнів (12-20 г) або гніздо 2-добових мишенят-сисунів. Суспензію вводять інтрацеребрально (по 0,03 мл на тварину), або підшкірно у верхню губу (по 0,1-0,2 мл на тварину). Спостереження ведуть впродовж 28-30 діб. Загиблих у перші 48 годин не враховують. Від загиблих пізніше досліджують головний мозок в РІФ, РДПа, гістологічним методом. За присутності вірусу в

патматеріалі звичайно загибель мишей настає через 9 діб після зараження.

Також вірус можна ідентифікувати у реакції нейтралізації (РН), використовуючи як тест-об'єкт білих мишей.

Негативний діагноз на сказ може бути поставлений лише через 28-30 діб, за відсутності специфічної загибелі мишей.

Для пришвидшення результатів досліджень можна заражати 20-30 мишей і починаючи з 3 дня після зараження щодобово забивати по 1-2 тварини для дослідження їх головного мозку в РІФ (можна ІФА). Специфічне свічення з'являється дещо раніше а ніж клінічний прояв сказу в мишей.

Окрім мишей виділяти вірус з патматеріалу можна зараженням культур клітин (лінії ВГНК, НГУК). Присутність вірусу сказу в клітинах виявляють при допомозі РІФ. Результати можна одержати вже через 18 годин (один цикл реплікації вірусу в клітинах) з моменту зараження культур. Звичайно інкубація триває впродовж 48годин, максимум до 4 діб.

Цей метод за чутливістю не поступається методу біопроби на білих мишах. Зважаючи на його економічність і трудомісткість, в перспективі, виділення вірусу при зараженні культур клітин, має стати провідним у лабораторній практиці.

Діагноз варто вважати встановленим при одержанні позитивних результатів досліджень хоча б в одному із зазначених методів.

Диференційна діагностика.

Необхідно виключити хворобу Ауескі, при якій хворі не агресивні; у багатьох тварин спостерігають сверблячку і розчоси.

У собак виключають нервову форму чуми, що характеризується затяжним перебігом, відсутністю агресії і можливістю одужання.

Сказ коней відрізняється від інфекційного енцефаломієліту за наявністю сильної іктеричності слизових оболонок і відсутністю агресії при останньому.

В будь-якому випадку остаточну диференціацію можна провести лише на основі проведення специфічних лабораторних досліджень.

Практична робота

1. Засвоїти послідовність і основні методи лабораторної діагностики сказу.
2. Опрацювати схему лабораторної діагностики сказу.
3. Засвоїти методику постановки РІФ.
4. Опрацювати реакцію дифузної преципітації в агаровому гелі (РДП)
5. Опрацювати гістологічний метод діагностики сказу.
6. Опрацювати методи фарбування за Селером, Муромцевим.

Питання для самоконтролю.

1. Назвіть основні властивості вірусу сказу.
 2. Які основні епізоотологічні особливості прояву сказу?
 3. Які основні клінічні ознаки виявляють у тварин при сказі?
 4. Назвіть особливості патологоанатомічної діагностики при сказі?
 5. Який матеріал необхідно відбирати у тварин при підозрі на сказ?
- Які методи лабораторної діагностики використовують при підозрі на сказ?

Література:

1. Калініна О. С., Панікар І. І., Скибицький В. Г. Ветеринарна вірусологія. Херсон : ОЛДІ-ПЛЮС, 2022. 416 с.
2. Капрельянц Л. В., Єгорова А. В., Труфкаті Л. В. Лабораторний практикум із загальної мікробіології і загальної мікроболігії і вірусології : навчальний посібник. Херсон : ОЛДІ-ПЛЮС, 2021. 136 с.
3. Льотка Г. І., Радзиховський М. Л., Дишкант О. В. Загальна вірусологія основи ветеринарної та зоонотичної вірусології - навч. посіб. Вінниця : друк, 2020. 204 с. Ч. 1.

4. Основи вірусології : навч.-метод. посібник з лаб. практикуму / уклад. І. О. Шмараков, О. В. Кеца. 2-ге вид., перероб. Харків : Мачулін, 2015. 160 с.
5. Практикум з ветеринарної вірусології / В. Г. Скибіцький та ін. Київ : Вища освіта, 2005. 208 с.
6. Калініна О.С., Панікар І.І., Скибіцький В.Г. Ветеринарна вірусологія: Підручник. - К.: Вища освіта, 2004. - 432 с.

ТЕМА 10: ІМУНОФЕРМЕНТНИЙ АНАЛІЗ

Імуноферментний аналіз (ІФА) ґрунтується на взаємодії антигенів із міченими ферментом антитілами. Цей метод характеризується високою специфічністю і чутливістю, яка в сотні разів перевищує чутливість інших серологічних реакцій. ІФА використовується для діагностики багатьох вірусних хвороб (інфекційний ринотрахеїт ВРХ, чума ВРХ, сказ, ринопневмонія коней, хвороба Марека, ньюкаслська хвороба та ін.).

Існують два варіанти ІФА:

- 1) гістохімічний варіант, або імунопероксидазна реакція;
- 2) методи твердофазного ІФА.

Імунопероксидазна реакція

Цей метод за суттю аналогічний РІФ. Він базується на використанні антитіл, мічених ферментом пероксидазою хрому (імунопероксидазний кон'югат). Утворення комплексу антиген – антитіло виявляють за допомогою бензидинового субстрату (діамінобензидинтетрахлорид). Субстрат під дією ферменту розкладається, утворюючи кольоровий продукт ферментативної реакції, видимий у світловому мікроскопі (спочатку блакитного кольору, який швидко переходить у коричневий).

Реакцію ставлять прямим і непрямим методами (рис. 1).

Прямий імунопероксидазний метод

Компоненти реакції:

- 1) дослідний вірус (мазки-відбитки або гістозрізи з патологічного матеріалу хворих тварин, препарати з інфікованої культури клітин);
- 2) імунопероксидазний кон'югат;
- 3) бензидиновий субстрат;
- 4) препарати з культури клітин, зараженої відомим вірусом;
- 5) препарати з органів здорових тварин або незараженої культури клітин;
- 6) 0,9%-й розчин NaCl

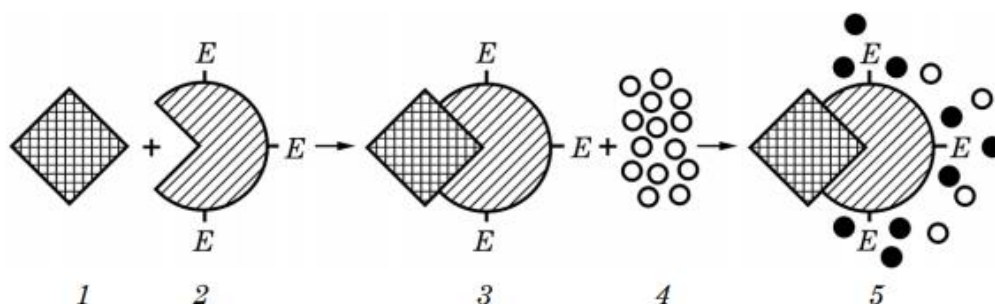


Рис 1. Схема прямого імунопероксидазного методу ІФА (В.М. Сюрін та ін., 1986):

1 – антиген; 2 – мічене антитіло (імунопероксидазний кон'югат); 3 – комплекс антиген – антитіло – фермент; 4 – бензидиновий субстрат; 5 – комплекс антиген – антитіло – фермент, який виявляють за допомогою субстрату

Постановка реакції:

1. Препарати фіксують 10 хв у охолодженому ацетоні ($-10...-20^{\circ}\text{C}$), висушують на повітрі.
2. На препарати наносять імунопероксидазний кон'югат, витримують 1 – 2 год (для гістозрізів — 6 год) у вологій камері при $+37^{\circ}\text{C}$, промивають 0,9%-м розчином NaCl 15 хв, споліскують дистильованою водою, висушують на повітрі.
3. На препарати наносять бензидиновий субстрат, витримують 5 – 10 хв у вологій камері за кімнатної температури, знову промивають 0,9%-м розчином NaCl 15 хв, споліскують дистильованою водою, висушують і розглядають у світловому мікроскопі під іммерсією.

4. Реакція вважається позитивною, якщо в клітинах виявляють дифузне жовто-коричнєве забарвлення або гранули коричнево - чорного кольору.

5. Одночасно ставлять контролю:

– у заражені відомим вірусом клітини, оброблені імунопероксидазним кон'югатом;

– у незаражені клітини, оброблені імунопероксидазним кон'югатом.

Непрямий імунопероксидазний метод (рис.2)

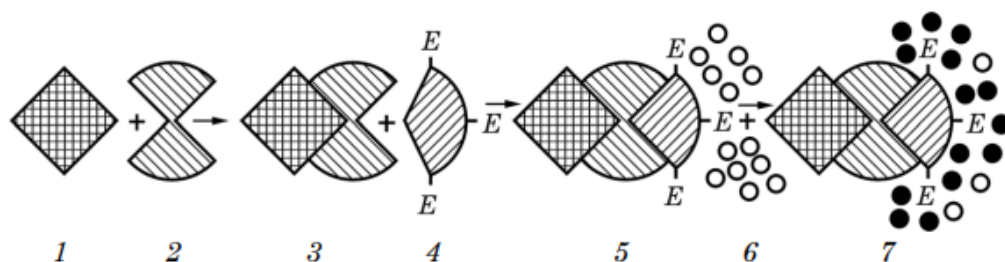


Рис 2. Схема непрямому імунопероксидазному методу ІФА (В.М. Сюрін та ін., 1986):

1 - антиген; 2 — антитіло; 3 - комплекс антиген - антитіло; 4 - антивидове анти- тіло (антивидовий імунопероксидазний кон'югат); 5 - комплекс антиген – антиті- ло – антивидове антитіло – фермент; 6 - бензидиновий субстрат; 7 - комплекс антиген – антитіло – антивидове антитіло – фермент, який виявляють за допомогою субстрату

Компоненти реакції:

1) дослідний вірус (препарати з патологічного матеріалу хворих тварин або зараженої культури клітин);

2) специфічна сироватка;

3) антивидовий імунопероксидазний кон'югат;

4) бензидиновий субстрат;

5) препарати з культури клітин, зараженої відомим вірусом;

6) препарати з органів здорових тварин або незараженої культури клітин;

7) 0,9%-й розчин NaCl.

Постановка реакції:

1. На фіксовані в ацетоні препарати наносять специфічну сироватку, витримують 1 – 2 год у вологій камері при +37°C, промивають 0,9%-м розчином NaCl 5 хв, висушують на повітрі.

2. На препарати наносять антивидовий імунопероксидазний кон'югат, витримують 1 – 6 год у вологій камері при +37 °C, промивають 0,9%-м розчином NaCl 15 хв, споліскують дистильованою водою, висушують.

3. Препарати обробляють бензидиновим субстратом 5 – 10 хв у вологій камері за кімнатної температури, промивають 0,9%-м розчином NaCl 15 хв, споліскують дистильованою водою, висушують і розглядають у світловому мікроскопі під імерсією.

4. При наявності вірусу в дослідному матеріалі утворюються складні комплекси: антиген – антитіло – антивидове антитіло (мічене ферментом), і в результаті бензидиновий субстрат розкладається з утворенням кольорового продукту ферментативної реакції.

5. Одночасно ставлять контролю:

– у заражені вірусом клітини, оброблені спочатку специфічною сироваткою, а потім – антивидовим імунопероксидазним кон'югатом;

– у незаражені клітини, оброблені спочатку специфічною сироваткою, а потім – антивидовим імунопероксидазним кон'югатом.

Методи твердофазного ІФА

Ці методи ґрунтуються на застосуванні антигенів або антитіл, фіксованих на нерозчинних носіях. Як твердофазні носії в ІФА використовують планшети, пробірки, плівки із синтетичних полімерів, що мають високу сорбційну здатність, - полістиролу, поліакриламід, поліпропілену тощо, а також гранули із сефарози, целюлози, карбоксиметилцелюлози, нітроцелюлозні мембрани (фільтри). Особливо широкого застосування набули полістиролові планшети. Використання їх та автоматизація процесу постановки й обліку результатів реакції дають змогу за короткий час дослідити велику кількість проб сироваток крові на наявність антитіл або вірусовмісного матеріалу на наявність вірусних антигенів.

У твердофазному ІФА використовують пероксидазні та лужнофосфатазні кон'югати. Для дослідження великої кількості проб за допомогою твердофазного ІФА потрібно мати: полістиролові планшети з плоским дном, автоматичні піпетки з перемінним або постійним об'ємом від 50 до 200 мкл, автоматичне або напіваавтоматичне промивне обладнання, спеціальну реєструвальну апаратуру. При відсутності такого обладнання продуктивність методу значно знижується.

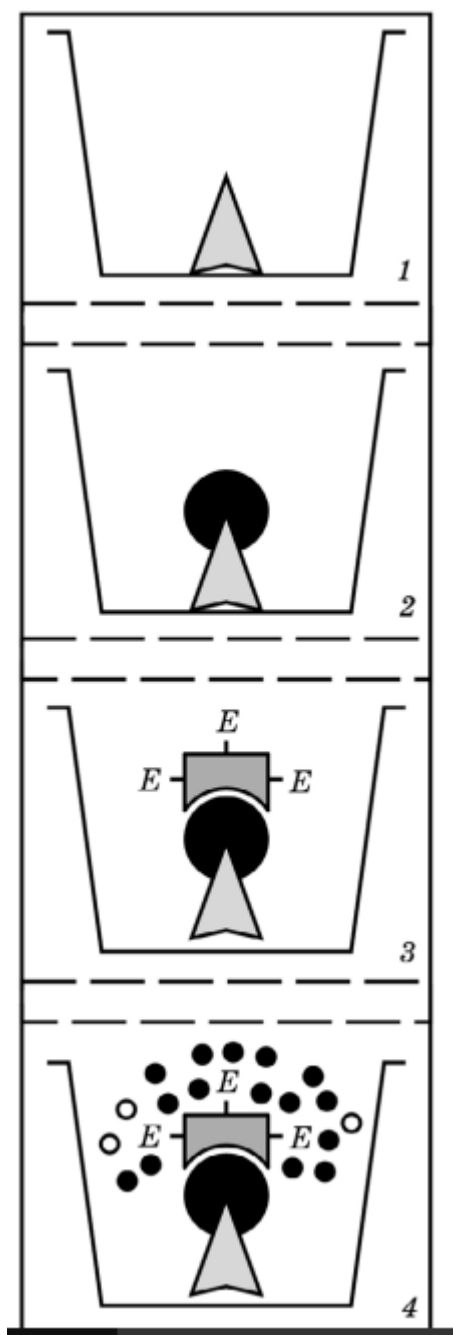


Рис. 3. Схема твердофазного ІФА: ELISA-метод (сандвіч-метод, або метод подвійних антитіл; В.М.Сюрін та ін., 1986):

1 - адсорбція антитіл; 2 - внесення дослідного антигену; 3 - внесення мічених ферментом антитіл; 4 - додавання субстрату та утворення кольорового продукту ферментативної реакції

Найпоширенішим методом твердофазного ІФА є ELISA-метод (enzyme-linked immunosorbent assay - реакція ензимомічених антитіл). Існує кілька варіантів постановки ELISA. Для ідентифікації вірусів найчастіше використовують сандвіч-метод, або метод подвійних антитіл (рис. 4). Для цього лунки полістиролових планшетів сенсibiliзують імуноглобуліном, виділеним із специфічної до дослідного антигену сироватки. У лунки додають спочатку вірусомісний матеріал, а потім після відмивання - мічені ферментом антитіла (гомологічні антигену) і нарешті - субстрат: ортофенілєндіамід або 5-аміносаліцилова кислота (для пероксидази) і р-нітрофенілфосфат (для лужної фосфатази). Якщо в дослідному матеріалі є відповідний антиген, він зв'язується з адсорбованими в лунках антитілами, до утворених імунних комплексів приєднуються мічені ферментом антитіла. Таким чином, утворюються складні комплекси: антитіло – антиген – мічене антитіло, які виявляють за допомогою субстрату.

Під дією ферменту субстрат розкладається з утворенням кольорового продукту ферментативної реакції: ортофенілєндіамід дає оранжево-коричнєве забарвлення, 5-аміносаліцилова кислота - інтенсивно-коричнєве, а р-нітрофенілфосфат - жовте. Результати реакції враховують візуально за інтенсивністю забарвлення або з допомогою спектрофотометрів за оптичним поглинанням. За позитивний результат приймають підвищення оптичної щільності дослідних проб над контрольними в 5 – 10 разів

Практична робота

1. Опрацювати методику постановки прямого імунопероксидазного методу.
2. Опрацювати методику постановки непрямого імунопероксидазного методу.
3. Засвоїти методику постановки твердофазного ІФА

Питання для самоконтролю

1. На яких реагентах ґрунтується імуноферментний аналіз?

2. Назвіть два варіанти ІФА.
3. На чому базується прямий імунопероксидазний метод?
4. Назвіть компоненти непрямого імунопероксидазного методу.

Література:

1. Калініна О. С., Панікар І. І., Скибицький В. Г. Ветеринарна вірусологія. Херсон : ОЛДІ-ПЛЮС, 2022. 416 с.
2. Капрельянц Л. В., Єгорова А. В., Труфкаті Л. В. Лабораторний практикум із загальної мікробіології і загальної мікроболігії і вірусології : навчальний посібник. Херсон : ОЛДІ-ПЛЮС, 2021. 136 с.
3. Лютка Г. І., Радзиховський М. Л., Дишкант О. В. Загальна вірусологія основи ветеринарної та зоонотичної вірусології - навч. посіб. Вінниця : друк, 2020. 204 с. Ч. 1.
4. Основи вірусології : навч.-метод. посібник з лаб. практикуму / уклад. І. О. Шмараков, О. В. Кеца. 2-ге вид., перероб. Харків : Мачулін, 2015. 160 с.
5. Практикум з ветеринарної вірусології / В. Г. Скибіцький та ін. Київ : Вища освіта, 2005. 208 с.
6. Калініна О.С., Панікар І.І., Скибіцький В.Г. Ветеринарна вірусологія: Підручник. - К.: Вища освіта, 2004. - 432 с.

ТЕМА 11. ОСОБЛИВОСТІ ДІАГНОСТИКИ ВІСПИ ТВАРИН

Віруси віспи відносяться до родини *Poxviridae*. Вони значно поширені в природі, спричинюючи захворювання хребетних і безхребетних, з летальним наслідком або з легким і тривалим перебігом інфекції з утворенням доброякісних пухлин. На віспу хворіють більш ніж 23 видів ссавців і 5 видів птахів.

Маючи значну генетичну інформацію віруси віспи індукують синтез різноманітних ферментів і тим самим забезпечують можливість репродукуватися в цитоплазмі клітин.

Репродукція вірусів супроводжується утворенням включень типу В (вірусні фабрики) і типу А, що видно в світловий мікроскоп.

Віруси даної родини подібні за розміром, морфологією, молекулярній масі ДНК, антигенним властивостям. Усі вони мають спільний NP-антиген, що виявляється в РЗК і РІФ.

Віруси віспи є самими великими вірусами. Віріони більшості поксвірусів хребетних мають форму цеглини із заокругленими кутами, розміром (300-450) x (170-260) нм. Виняток становлять представники роду *Parapoxvirus*, віріони яких овоїдної форми, розміром (220-300) x (140 - 170) нм, і роду *Molluscipoxvirus* – овоїдної або моллюскоподібної форми, розміром 320 x 250 нм. Поксвіруси комах представлені як цеглиноподібними, так і овоїдними віріонами розміром (300-400) x (175-250) нм.

Встановлено, що орто-, аві-, і лепоріпоксвіруси мають більш витягнуту форму, ніж інші віруси віспи. Парапоксвіруси мають набагато менший розмір (260-160 нм) і нитковидну структуру зовнішньої поверхні (одна довга нитка обвиває усю поверхню у вигляді спіралі, що закручена вліво).

На відміну від інших ДНК-вмісних вірусів, поксвірусам не властива ікосаедральна симетрія, будова їх складна. Віріон складається із зовнішньої оболонки (товщина 22 нм) з трубчастими ворсинками, яка має ліпопротеїнову природу (3 шари) і синтезується в цитоплазмі заражених клітин. Вона містить в своєму складі усі фосфоліпіди, що входять в склад вірусу. Поверхня віріону вкрита хаотично розташованими трубочками, що являють собою подвійні гребені, завдовжки 70-100 нм (пепломери), що побудовані з сферичних субодиниць діаметром близько 5 нм. Зовнішня оболонка оточує серцевину (нуклеоїд) у вигляді двовгнутого диска (фігура вісімки). По боках серцевини в місцях угинань розміщені овальні структури – бічні тіла, функція яких невідома. Серцевина містить дволанцюгову ДНК із

мол. масою $(85-250) \times 10^6$ Д (85-250 МД), асоційовану з трьома білками. Оболонка серцевини складається з внутрішньої гладенької мембрани і зовнішнього шару з циліндричних субодиноць. Нуклеоїд містить віріонну ДНК і 20-25% структурних білків.

Встановлено, що ДНК вірусу віспи може кодувати 150-200 білків з молекулярною масою 10-100 кД. Використовуючи різні методики вдавалось виділяти від 52 до 100 структурних білків з молекулярною масою 10-250 кД. Більшість ідентифікованих поліпептидів розташовані у серцевині, з яких головними є поліпептиди з молекулярною масою 60 і 62 кД. Віріони містять два глікопротеїди (38 і 41 кД), які розташовані між суперкапсидом і серцевиною віріону. На долю фосфопроїдів, які переважно розташовані в суперкапсиді віріону приходитьсь близько половини усіх білків. До головних білків також відноситься поліпептид трубочок (пепломерів) з молекулярною масою 58 кД.

Віруси віспи мають складну антигенну структуру. Проте антигенна активність визначена лише по відношенню частини структурних поліпептидів. Розрізняють поверхневий розчинний LS-антиген, внутрішній нуклеопротеїдний NP-антиген і гемаглютинін в ортопоксвірусів.

LS-антиген складається з двох антигенів: термолабільного L-антигену і термостабільного S-антигену. Перший руйнується при 60 °С, другий витримує нагрівання до 90 °С. LS-антиген володіє преципітуючою і комплементфіксуючою активністю. Має певну видову специфічність.

NP-антиген являє собою білок нуклеокапсиду. Він виділяється при дезінтеграції вірусних часток в лужному середовищі і ідентичний в усіх представників даної родини. За індукцію віруснейтралізуювальних антитіл напевне відповідальні антигени, що розташовані на поверхні зовнішньої оболонки віріону. Встановлено, що антисироватка до білку (58 кД), що виділений з трубочок (ворсинок, пепломерів) вірусу віспи, нейтралізувала інфекційність вірусу і запобігала утворенню синцитію в культурі заражених клітин. Отже цей білок відповідальний за утворення імунітету.

До розчинних антигенів відносяться також гемаглютиніни, які виявляються в реакції гемаглютинації з еритроцитами курей. Гемаглютиніни є глікопротеїдами, що складається з білка і фосфоліпиду. Гемаглютинуюча активність обумовлена білковим компонентом. Структурний гемаглютинін локалізується на зовнішній оболонці позаклітинних вірусних часток.

В одних тварин віспа спричинюється одним збудником (генуїнним), в інших, окрім генуїнного, ще 2-3 вірусами інших видів.

В деяких тварин захворювання викликають кілька вірусів з цієї групи.

Зокрема велику рогату худобу уражують віруси віспи (вісповакцини), папульозного стоматиту, паравакцини (псевдовіспи) і нодулярного дерматиту (бугорчатки).

Кролів уражують віруси віспи, міксоматозу і фіброматозу, овець (кіз) – віспи і контагіозного пустульозного дерматиту.

В природних умовах до віспи найбільш чутливими є вівці, кози, свині, верблюди, кури. В них перебіг інфекції часто генералізований. Менш чутливими є велика рогата худоба, а коні хворіють дуже рідко. В останніх видів тварин віспа перебігає частіше місцево (осередково).

Усі віруси віспи споріднені між собою, тому деякі з них здатні заражати не лише свій вид тварин але й інші. Так, до вірусу віспи корів чутливі коні, свині, кролики, верблюди, а також людина. До вірусу віспи свиней чутливі кури. Вірусом віспи голубів можна заразити курей. При цьому може створюватися перехресний імунітет.

Джерелом інфекції є хворі тварини, особливо у період генералізації процесу, а також вірусоносії в інкубаційний період та певний час після клінічного одужання.

Шляхи передачі – контактний, аерогенний, аліментарний. Можливий трансмісивний (у свиней свиняча воша – 1 рік і більше; в птахів кліщі та клопи – до 2 років), трансоваріальний, інтраперитонеальний шляхи, а при ураженні вимені через молоко.

Шляхи виділення – з висохлими лусочками (зберігає активність до 2 років), молоком, слиною, з носовими та очними витоками, при аборті з навколо плодовими водами.

В овець, кіз, птахів, свиней віспа частіше перебігає у формі епізоотій; корів, коней – ензоотій або спорадій.

Загострення хвороби відбувається частіше взимку і рано навесні, на фоні холодної, сирої погоди, авітомінозів, зниження опірності організму.

Летальність за доброякісного перебігу не перевищує 1-2%. За зливної та геморагічної форм серед молодняка може сягати 50-80%.

Клінічно віспа в усіх тварин має багато спільних ознак. Ураження спостерігають на слизових оболонках і шкірі переважно на безшерстих (безпірйових) ділянках тіла з одночасною можливою генералізацією процесу, особливо в овець, свиней та курей.

За типового перебігу ураження шкіри та слизових оболонках має чіткий стадійний прояв. Спочатку утворюються розеоли (почервоніння), що поступово переходять в папули (припухання) та везикули (міхурці заповнені серозним ексудатом). Останні з часом перетворюються на пустули, які містять гнійний ексудат.

Пустули лопаються і коли підсихають утворюються кірочки, після відпадання яких залишаються білі або рожеві плями. Якщо некротизуються глибокі шари шкіри, утворюються товсті струпи, які відпадають через 5-6 днів або пізніше.

З ознак генералізації процесу для віспи характерні гарячка, млявість, втрата апетиту, набряк підшкірної клітковини, у курей – дифтероїдні нашарування на слизових дихальних шляхів.

Найбільш вірулентним є збудник віспи овець. В них часто, як ускладнення виникає зливна і геморагічна форми віспи. Генуїнний вірус віспи свиней теж може спричинити зливну, рідше геморагічну форму віспи. Досить важко перебігає віспа у курей у вигляді шкірної і дифтеритичної форм.

При патолого-анатомічному дослідженні на шкірі (частіше малошерстних та безшерстних ділянках) і видимих слизових оболонках виявляють вісп'яні ураження на різних стадіях розвитку.

При зливній формі віспи в тварин виявляють набряки шкіри та підшкірної клітковини. В птахів, овець, кіз виявляють ураження слизової дихальних шляхів та шлунково-кишкового тракту (в свиней – геморагічного характеру). Виявляють збільшення та гіперемію лімфовузлів, за генералізованої форми крововиливи та дистрофічні зміни печінки, нирок, серця, інших органів.

Нижче наведена схема лабораторної діагностики віспи тварин (табл. 1).

Таблиця 1

Схема лабораторної діагностики віспи тварин

Матеріал для дослідження	Експрес-методи	Вірусологічні методи		Ретро-спектив-на діаг-ностика	Диферен-ційна діагностика
		Ізоляція та індикація вірусу	Іденти-фікація вірусу		
Віспа корів					
Ураження шкіри на стадіях папули, везикули, пустули і струпа, везику-лярна та пустульоз-на рідини, парні сироватки крові	Вірусоскопія, цитоплаз-матичні включен-ня типу тілець Гварнієрі (вірус віс-повакци-ни), РДПа	1. РКЕ 10-12 днів, зараження на ХАО і в алантоїсну порожнину. Через 3-6 діб загибель, на ХАО віспини – ге-морагічні (вірус віспи корів) або білі (вірус вісповакцини); при зараженні в алантоїсну порожнину через 3 дні загибель (вірус віспи корів) 2. Культури клітин нирок телят або ембріона корови,	Вірусоскопія, РІФ, РДПа	РДП	Ящур, паравакцина, везикулярний стоматит

		фіброblastів курячого ембріона. Через 3 доби ЦПД: округлення клітин, цитоплазматичні тільця-включення 3. Кролі, зараження в скарифіковану шкіру або інтракорнеально. Через 3-5 діб на шкірі інфільтрати (з некрозом і геморагіями від вірусу віспи корів) і віспяні ураження; на рогівці через 2-3 доби плями і крапки оточені вінчиком і цитоплазматичні включення типу тілець Гварнієрі (вірус вісповакцини) 4. Телята – зараження в скарифіковану шкіру. Через 3-9 діб віспяні ураження шкіри			
Віспа овець					
Ураження шкіри на стадіях папули, везикули, пустули і струпа, везикулярна та пустульозна рідини, парні сироватки крові	Вірусоскопія, електронна мікроскопія, цитоплазматичні тільця-включення	Культура клітин нирок і сім'яників ягнят та козенят. Через 2-4 доби ЦПД: округлення клітин, цитоплазматичні тільця-включення Вівці – зараження в/ш у безшерстну ділянку хвоста. Через 6-8 діб віспяні ураження шкіри	Вірусоскопія, РІФ, РДПа	РДП	Контагіозна ектима, парша, короста, пустульозна екзема
Віспа кіз					

Ураження шкіри на стадіях папули, везикули, пустули і струпа, везикулярна та пустульозна рідини, парні сироватки крові	Вірусоскопія, на мікроскопія, цитоплазматичні тільця-включення	Культура клітин нирок і сім'яників козенят та ягнят. Через 2-4 доби ЦПД: округлення клітин, цитоплазматичні тільця-включення Козенята – зараження в скарифіковану шкіру. Через 6-8 діб віспяні ураження шкіри	Вірусоскопія, РІФ, РДПа	РДПа	Ящур, контагіозна ектима
Віспа свиней					
Ураження шкіри на стадіях папули, пустули і струпа, пустульозна рідина	Вірусоскопія, електронна мікроскопія, цитоплазматичні тільця-включення	Поросята – зараження в скарифіковану шкіру. Через 6-8 діб віспяні ураження шкіри	Вірусоскопія	-	Ящур, везикулярна хвороба, везикулярна екзантема, трихофітія, екзантеми при сальмонельозі, стрептококозі, ензоотичній пневмонії, екзантеми неінфекційної етіології (авітамінози, гіпокальцемія, гіперкератози
Віспа коней					
Ураження шкіри і слизових оболонок на стадіях папули, везикули і пустули	Вірусоскопія	Кролі – зараження в скарифіковану шкіру або рогівку. Через 3-5 діб на шкірі інфільтрати (з некрозом і геморагіями від вірусу віспи корів) і віспяні	Вірусоскопія	-	Везикулярний стоматит, сап, епізоотичний лімфангіт, незаразний міхурцевий стоматит

		ураження; на рогівці через 2-3 доби плями і крапки оточені вінчиком і цитоплазматичні включення типу тілець Гварнієрі (вірус вісповакцини) Лошата – зараження в скарифіковану шкіру або в слизову оболонку рота. Через 2-4 доби віспяні ураження шкіри або слизової оболонки рота			
Віспа кролів					
Ураження шкіри на стадіях папули, везикули, пустули і струпа, паренхіматозні органи, головний мозок	Вірусоскопія, РДПа	1.РКЕ 10-12-добового віку – зараження на ХАО. Через 3 доби загибель, геморагічні віспини на ХАО, крововиливи на тілі зародка 2.Кролі – зараження в/ш або в скарифіковану шкіру. Через 5-6 діб набряк і некроз шкіри	Вірусоскопія, РДПа	-	Виразковий стоматит, еймеріоз
Віспа птиці					
Ураження з гребеня, борідок і сережок, дифтеритичні ураження гортані й трахеї, парні сироватки крові	Вірусоскопія, електронна мікроскопія, цитоплазматичні тільця-включення	1.РКЕ 10-12-добового віку – зараження на ХАО. 2.Культури клітин фібробластів курячого ембріона. Через 3 доби ЦПД: округлення клітин, симпласти 3.Курчата, зараження в скарифіковану шкіру	Вірусоскопія, РІФ, РДПа	РДПа, РНГА, ELISA	Інфекційний ларинготрахеїт, інфекційний бронхіт, пастерельоз, аспергільоз, парша, респіраторний мікоплазмоз, кандидамікоз, авітаміноз А

	ня Боллін- гера, РДПа, РІФ	гребеня і борідок або в пир'яні фолікули гомілки. Через 5-6 діб віспяні ураження шкіри гребеня і борідок, на гомілці фолікуліт			
--	--	--	--	--	--

Взяття і транспортування матеріалу. Основним матеріалом для дослідження служить секрет віспяних уражень, їх стінки та лусочки (до настання їх нагноєння). При віспі птахів надсилають цілі трупи, можна епітеліоми і дифтеритичні нашарування. У лабораторію відправляють голову або труп тварини (можна і головний мозок), суворо дотримуючись правил взяття і особистої безпеки.

Для ретроспективної діагностики беруть парні сироватки крові.

Матеріал поміщають в герметичний жорсткий контейнер. Його бажано транспортувати в охолоджену або заморожену вигляді.

Матеріал і супровідний документ, в якому вказують адресу, вид тварини, анамнестичні дані і обґрунтування підозр в захворюванні тварини віспою, дату і підпис лікаря ветмедицини відправляють з нарочним.

Експрес-діагностика базується на швидкому виявленні вірусних антигенів безпосередньо в патматеріалі.

В зв'язку з тим, що віруси віспи мають середні розміри близько 300 нм одним з основних методів для його виявлення є вірусоскопія.

Вірусоскопією називають виявлення віріонів віспи в світловий мікроскоп.

Першим етапом вірусоскопії є приготування мазків.

Мазки готують зі свіжих везикул або пустул. Для цього їх обережно (щоб уникнути кровотечі) зрізують лезом бритви і внутрішньою поверхнею зрізу проводять однократним рухом по знежиреному предметному скельцю. Мазки висушують на повітрі і поміщають на 3 хв. в дистильовану воду.

Другим етапом є фарбування мазків. Для фарбування віріонів віспи запропоновано декілька методів: Морозова, Пашена, Герцберга. Найзручнішим і загальнодоступним є метод Морозова.

Фарбування за Морозовим:

Спочатку необхідно приготувати 3 види реактивів. Далі проводять фарбування в такій послідовності:

1. На висушений мазок наносять реактив № 1 – рідина Руге (1 мл льодової оцтової кислоти, 2 мл 40%-ного формальдегіду і 100 мл дистильованої води), витримують 1 хв.; препарати промивають дистильованою водою.
2. Далі наносять реактив № 2 – розчин таніну (5 г таніну, 100 мл дистильованої води і 1 мл рідкої карболової кислоти) на 1-2 хв. при підігріванні до появи парів; препарати промивають дистильованою водою.
3. Далі наносять реактив № 3 – розчин аміачного срібла (5 г срібла нітрату розчиняють у 100 мл води і додають по краплях 25%-ий розчин аміаку, поки не розчиниться утворений буро-чорний осад і не залишиться лише легка опалесценція; для фарбування реактив розводять дистильованою водою 1:10) на 1-2 хв. при легкому підігріванні до появи темно-коричневого забарвлення; препарати промивають дистильованою водою.
4. Висушені на повітрі або фільтрувальним папером препарати розглядають у світловому мікроскопі під імерсійною олією.

Наявність на жовтому фоні препарату великої кількості дрібних темно-коричневих тілець округлої форми, які розміщені у вигляді скупчень, рядами або дифузно, свідчить про присутність вірусу віспи в досліджуваному матеріалі.

Перевагою методу вірусоскопії є швидкість одержання результатів (протягом 0,5-1 год. після доставки матеріалу в лабораторію), простота і доступність техніки виконання.

Недоліком є те, що найчіткіші результати можна отримати тільки при дослідженні мазків із свіжих везикул або везикулярної рідини. При використанні мазків з пустул достовірність методу значно знижується.

Методом вірусоскопії не завжди вдається відрізнити віріони від подібних за формою клітинних елементів. Крім того, вірусоскопія не дозволяє диференціювати різні види вірусів віспи.

В зв'язку з тим, що віруси віспи мають характерну форму і розміри як експрес-метод лабораторної діагностики можна використовувати електронну мікроскопію.

Для дослідження шматочків ураженої шкіри при експрес-діагностиці хвороб, що викликаються поксвірусами (віспа тварин і птиці, контагіозна ектима овець і кіз), використовують два методи:

1) метод тиснених препаратів – використовують мідні предметні сітки, покриті колодієвими, формваровими або вуглецевими плівками-підкладками. Шматочок зрізу епідермісу шкіри кладуть на предметне скло зрізом догори і на його поверхню наносять 2-3 краплі дистильованої води. Тупим кінцем скальпеля обережно натискають на зріз, не викликаючи надмірного помутніння води. На краплю суспензії кладуть предметну сітку плівкою-підкладкою вниз. Через 2 хв. предметну сітку промивають в 2-3 краплях дистильованої води і контрастують. Як контрастуючі речовини використовують 2-4%-ні водні розчини фосфорно-вольфрамової кислоти, молібденовокислого амонію, кремне-вольфрамовокислого натрію; 0,5-2%-ий водний розчин оцтовокислого уранілу (ураніл-ацетату); 0,5%-ий водний розчин щавелевокислого уранілу (ураніл-оксалату); 1%-ий водний розчин мурашинокислого уранілу (ураніл-форміату);

2) метод відбитків – роблять біопсію шкіри з вісп'яними ураженнями разом з власне шкірою і підшкірною клітковиною. Потім шматочок тканини розрізують перпендикулярно лезом бритви. До поверхні зрізу обережно прикладають предметну сітку плівкою-підкладкою вниз. Через 2 хв. предметну сітку промивають в 2-3 краплях дистильованої води і контрастують. Метод дозволяє визначити не лише розміри досліджуваних вірусів, але й форму і структуру.

Також розроблені експрес-методи серологічної діагностики антигенів вірусу віспи ссавців і птахів при допомозі РДПа та РІФ. Реакції ставлять згідно загальноприйнятих методик.

Гістологічне дослідження дозволяє виявити в гістозрізах, мазках відбитках цитоплазматичні оксифільні тільця-включення, зокрема тільця Гварнієрі у корів (вісповакцини), Болінгера у птахів. Проте цей експрес-метод є індикативним і не дозволяє поставити остаточний діагноз.

Вірусологічні методи. Слід відзначити, що з патматеріалу надісланого в лабораторію не завжди вдається виявити віруси (вірусні антигени) експрес-методами. Тому негативні або сумнівні результати вірусоскопії, РІФ, РДПа та гістологічного методу не виключають віспу.

У такому випадку обов'язково проводять виділення вірусу з патматеріалу шляхом зараження чутливих тест-об'єктів.

Як правило при віспі тварин проводять біопробу на природно сприйнятливих тваринах. Цей метод є досить специфічним і дозволяє провести точну діагностику даної інфекції. Усі віруси віспи дерматотропні, і тому експериментальне зараження ними вдається при введенні дослідного матеріалу внутрішкірно або методом скарифікації. Специфічні зміни, які виникають в разі наявності збудника подані в таблиці 1.

За позитивної біопроби, електронної мікроскопії або вірусоскопії необхідності проводити інші методи лабораторної діагностики немає.

З метою виділення і накопичення дослідного вірусу можна використовувати інші тест-об'єкти.

Так, для індикації вірусів віспи птиці, кролів, корів, вісповакцини можна використати 10-12-добові ембріони шляхом їх зараження на ХАО, а для індикації вірусів віспи корів, овець, кіз та птахів відповідні культури клітин (табл. 1). Проте використання згаданих тест-об'єктів в разі позитивного результату не дозволяє ставити точний діагноз. Тому виділений вірус ідентифікують при допомозі вірусоскопії, РІФ, РДПа.

Ретроспективні методи.

Для виявлення антитіл та їх приросту в парних сироватках використовують при діагностиці віспи корів, овець та кіз РДПа, а віспи птиці – РДПа, РНГА, ELISA. Постановку реакцій здійснюють згідно стандартних методик.

Ці методи використовують рідко. Причиною цьому є низький титр антитіл при більшості віспяних інфекцій (домінує клітинний імунітет). Навіть за високого титру антитіл їх авидність є низькою і тому з певної частини проб антитіла виявляти не вдається.

Практична робота

1. Опрацювати особливості репродукції поксвірусів.
2. Опрацювати схему лабораторної діагностики віспи тварин.
3. Законспектувати правила взяття і транспортування матеріалу за віспи тварин.
4. Опрацювати експрес-діагностику віспи тварин.
5. Опрацювати вірусологічні методи діагностики віспи тварин.

Питання для самоконтролю.

1. Назвіть основні властивості вірусів віспи.
2. Які основні епізоотологічні особливості прояву віспи?
3. Які основні клінічні ознаки виявляють у тварин при віспі?
4. Назвіть особливості патологоанатомічної діагностики при віспі?
5. Який матеріал необхідно відбирати у тварин при підозрі на віспу?
6. Які методи лабораторної діагностики використовують при підозрі на віспу?

Література

1. Калініна О. С., Панікар І. І., Скибицький В. Г. Ветеринарна вірусологія. Херсон : ОЛДІ-ПЛЮС, 2022. 416 с.

2. Капрельянц Л. В., Єгорова А. В., Труфкаті Л. В. Лабораторний практикум із загальної мікробіології і загальної мікроболігії і вірусології : навчальний посібник. Херсон : ОЛДІ-ПЛЮС, 2021. 136 с.

3. Льотка Г. І., Радзиховський М. Л., Дишкант О. В. Загальна вірусологія основи ветеринарної та зоонотичної вірусології - навч. посіб. Вінниця : друк, 2020. 204 с. Ч. 1.

4. Основи вірусології : навч.-метод. посібник з лаб. практикуму / уклад. І. О. Шмараков, О. В. Кеца. 2-ге вид., перероб. Харків : Мачулін, 2015. 160 с.

5. Практикум з ветеринарної вірусології / В. Г. Скибіцький та ін. Київ : Вища освіта, 2005. 208 с.

6. Калініна О.С., Панікар І.І., Скибіцький В.Г. Ветеринарна вірусологія: Підручник. - К.: Вища освіта, 2004. - 432 с.

ТЕМА 12: ВИКОРИСТАННЯ МЕТОДУ ФЛУОРЕСЦЕНЦІЇ ДЛЯ ДІАГНОСТИКИ ВІРУСНИХ ЗАХВОРЮВАНЬ

Люмінесценцію широко використовують в біології. Розрізняють *біоломінесценцію* - світіння, що спостерігається у деяких живих організмах; *рентгенолюмінісценцію* - світіння виникає під впливом рентгенівських променів; *фотоломінесценцію* - світіння виникає під впливом сонячного світла (ультрафіолетового спектру) тощо. В свою чергу вона поділяється на флюоресценцію та фосфоресценцію.

Флуоресценція - це світіння речовин під впливом різних видів енергії, що виникає як результат перетворення енергії поглинутою даною речовиною і триває лише в момент поглинання енергії.

Фосфоресценція - свічення речовин під впливом різних видів енергії, що виникає як результат перетворення енергії поглинутою даною речовиною і спостерігається тривалий час після поглинання енергії.

У вірусологічній практиці використовують явище *фотofлуоресценції*.

Принцип флюоресценції полягає в тому, що атоми деяких речовин поглинаючи деякі види енергії переходять в збудливий стан і, вертаючись у вихідний стан, виділяють поглинену енергію у вигляді світлового випромінювання. Такі речовини, що володіють первинною інтенсивною флюоресценцією одержали назву *флуорохромів* (флуоресціюючих барвників).

Флуорохроми використовують для обробки речовин (об'єктів), що мають слабку первинну флуоресценцію або ж не мають її взагалі, з метою її підсилення. Така флуоресценція називається *вторинною* (наведеною).

Для виникнення явища фотофлуоресценції використовують *люмінесцентні* мікроскопи, зокрема "Люмам И-1, "МЛ-2", "МЛД" та ін., з ртутно-кварцовою лампою ДРШ-250, збуджуючими фільтрами ФС-1-2, СС-15-2, БС-8-2 і запірними фільтрами № 1 або № 2.

Існують основних 2 методи люмінесцентної мікроскопії, що використовують у вірусології:

- Просте флуорохромовування.
- Реакція імунофлуоресценції - РІФ (син.: метод флуоресціюючих антитіл - МФА).

Флуорохроми, що мають найбільш яскраву флуоресценцію, відносять до наступних груп:

- 1) ксантенова група (флуоресцеїн, еозин, родамін);
- 2) акрідинова група (акрідиновий оранжевий, акрідиновий жовтий, тріпафлавін, коріфосфін);
- 3) тіазолова група (примулін);
- 4) азофарби.

Однією з перших спроб виявлення елементарних тілець вірусів цим методом є роботи Хагемана та Барнера (1937 р).

Флуорохромовування – це обробка дослідних препаратів одним або декількома флуорохромами. Воно збільшує силу та контрастність свічення досліджуваного об'єкту. Даний метод з успіхом використовують для

виявлення великих вірусів: екромелії, вісповакцини, ектими овець та кіз, аденовірусних інфекцій, збудників грипу, ящуру тощо, а також для діагностики хламідіозів.

Найбільшу зацікавленість у вірусології має акрідиновий оранжевий, що викликає поліхроматичну флуоресценцію нуклеїнових кислот вірусів.

Препарати для методу простого флуорохромування можна готувати 2 способами:

1). На предметне скельце наносять краплю розчину акрідинового оранжевого (1:10 000, рН 3,8), поміщають в неї вірусовмісний матеріал (зіскоби з слизових оболонок, подрібнені тканини легень або інших органів тощо), вкривають покривним скельцем, наносять на нього нефлуоресціюючу імерсійну олію і одразу ж досліджують під люмінесцентним мікроскопом;

2). На предметне скельце поміщають вірусовмісний матеріал (дослідні суспензії, інфіковані культури клітин тощо) і фіксують його нагріванням або хімічним способом (метиловим спиртом, ацетоном тощо) впродовж 10-30 хвилин. Промивають ФБР, висушують і наносять 1-2 краплі акрідинового оранжевого (1 : 10 000). Через 5-10 хвилин препарат вкривають покривним скельцем, наносять нефлуоресціюючу імерсійну олію і досліджують під люмінесцентним мікроскопом.

В обидвох випадках як позитивний результат обробки препаратів акрідиновим оранжевим, ДНК, що міститься в ядрах клітин, дає смарагдово-зелене свічення, а РНК та її похідні, що містяться в цитоплазмі, світяться червоним або помаранчевим кольором.

З метою встановлення походження нуклеїнових кислот препарати обробляють 0,5% розчином РНК-ази або ДНК-ази впродовж 5-10 хвилин або ж проводять опромінення препаратів ультрафіолетовими променями. При цьому свічення клітинних РНК або ж ДНК одразу зникає, а вірусних триває ще 20-30 хвилин.

На даний момент метод використовують переважно для вивчення заражених дослідним вірусовмісним матеріалом одношарових культур

клітин, проте в більшості випадків цей метод не дає змоги остаточно диференціювати збудників хвороби.

Реакцію імунофлуоресценції (син.: метод флуоресціюючих антитіл – МФА) вперше запропонували Кумбс, Кріч та Джонсон в 1941 році.

Принцип даного методу полягає в тому, що антитіла з'єднані з флуорохромами, зберігають здатність вступати в специфічні реакції з гомологічними антигенами (вірусами). Комплекс антиген-антитіло, що утворився виявляють під люмінесцентним мікроскопом по присутньому в ньому флуорохрому, який дає специфічне свічення. Реакція в цьому разі позитивна. Якщо комплекс антиген-антитіло не утворився, то свічення буде відсутнє. Реакція негативна.

В якості флуорохромів для антитіл переважно використовують:

ФІТЦ (флуоресцеїну ізотіоціанат - дає смарагдово-зелене свічення);

РСХ (родаміну сульфохлорид - дає смарагдово-червоне свічення).

Метод імунофлуоресценції заснований на деяких законах фізики (люмінесценція), хімії (хімічне з'єднання барвника з антитілами) та імунобіології (утворення комплексу антиген-антитіло).

Приготування флуоресціюючих гіперімунних сироваток.

Такі сироватки готують на біофабриках. Спочатку багатократно у невеликих дозах імунізують специфічним антигеном лабораторних тварин (коней тощо). В результаті від таких тварин одержують специфічні гіперімунні сироватки, які максимально звільняють від гетероантитіл. З таких сироваток виділяють фракції, що містять специфічні до вірусу антитіла і обробляють їх флуорохромами. Антитіла, що мічені флуорохромом носять назву **кон'югатів**. Їх консервують шляхом ліофілізації, а перед використанням перевіряють робочий титр.

Приготування препаратів. Можуть бути використані: препарати-відбитки, мазки, гістологічні зрізи, препарати з тканинних культур.

а) приготування препаратів-відбитків і мазків;

- предметні скельця повинні бути чистими, знежиреними, тонкими, безбарвними і не мати подряпин;
- дослідний матеріал розташовують в кюветах і припалюють поверхню розпеченим металевим шпателем;
- вирізають з цієї ділянки стерильним скальпелем невеликий шматочок органу; поверхнею розрізу 2-3 рази доторкаються до предметного скельця (препарат-відбиток) або ж проводять по ньому (мазок);
- для виготовлення мазка з рідкого матеріалу (ексудат), його беруть шляхом просочування ватного тампону, який поміщають в пробірку з фосфатно-буферним розчином (Хенкса, Ерла тощо). В лабораторії тампон відтискають, рідину центрифугують і з осаду роблять мазки діаметром 1,5 см на предметному скельці;
- можна брати зіскоби з слизових оболонок (кон'юнктиви, піхви тощо), препарати готують з клітин скарифікованих ділянок, що містять базальні шари епітелію (поверхневі шари мають сильну аутофлуоресценцію);
- обов'язково для контролю готують аналогічні препарати-відбитки або мазки з органів та секретів здорових тварин.

б) приготування гістозрізів;

- гістозрізи роблять мікротомами за спеціальною методикою, товщиною 2-5 мкм, шляхом заморожування частини органу;
- не можна використовувати гістозрізи одержані з органів залитих парафіном, тому що парафін теж має флуоресціюючі властивості.

в) приготування препаратів з тканинних культур;

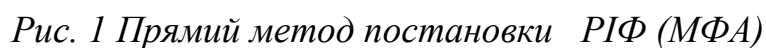
- препарати з тканинних культур вирощують на вузьких пластинках покривного чи годинникового скелець, які попередньо, ще до утворення моношару, розташовують в пробірках;
- проводять зараження дослідним матеріалом;
- починаючи з 2 доби після зараження в різні терміни витягають покривні або годинникові скельця з пробірок з культурою клітин;

Усі без винятку препарати сушать і фіксують етиловим спиртом, краще метиловим спиртом і ще краще хімічно чистим ацетоном охолодженим до $-10-15^{\circ}\text{C}$ впродовж 10-20 хвилин і зберігають в холодильнику до дослідження.

Прямий метод (одноступінчастий) використовують для ідентифікації різних вірусних антигенів використовуючі відповідні кон'югати біофабричного виробництва.

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

Схема реакції наведена на рис. 1.



1. Препарати висушують на повітрі, фіксують 10-15 хв в охолоджену ацетоні (-10-15°C).
2. На препарати наносять флуоресціюючу специфічну сироватку, витримують 30 хв у вологій камері при кімнатній температурі або в термостаті при 37°C (в залежності від виду вірусу).

3. Препарати відмивають 0,01 М ФБР (рН 7,2-7,4) тричі по 10 хв і ополіскують дистильованою водою.

4. Препарати висушують на повітрі і досліджують у люмінесцентному мікроскопі, застосовуючи нефлуоресціюючу олію для імерсії.

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

- ++++ - яскраве свічення смарагдово-зеленого кольору;
- +++ - яскраве свічення зеленого кольору;
- ++ - слабе свічення жовто-зеленого кольору;
- +
- дуже слабе свічення невизначеного кольору;
- відсутність флуоресценції.

Реакція вважається позитивною, якщо в препараті виявляється не менше 3-5 уражених вірусом клітин, які флуоресціюють яскраво-зеленим кольором на три-чотири плюси (в результаті утворення комплексів антиген-антитіло). Флуоресценція буває дифузною і гранулярною залежно від виду вірусу і стадії його нагромадження в клітині.

Одночасно ставлять контролю:

- незаражені препарати, оброблені флуоресціюючою специфічною сироваткою;
- заражені препарати, оброблені флуоресціюючою нормальною сироваткою;
- заражені препарати, оброблені спочатку неміченою специфічною сироваткою, а потім флуоресціюючою специфічною сироваткою;
- заражені препарати, оброблені спочатку неміченою нормальною сироваткою, а потім флуоресціюючою специфічною сироваткою.

Методика постановки непрямого (двоступінчастого) методу реакції.

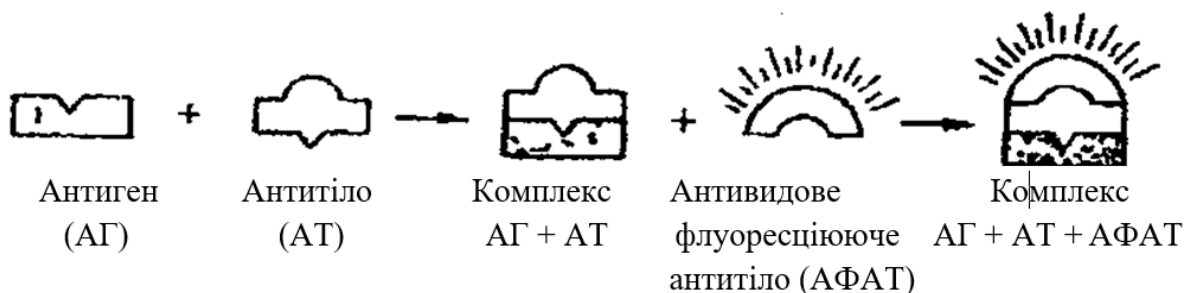
Є основні 2 модифікації даного методу:

А) виявлення антигену при допомозі флуоресціюючої антивидової сироватки (антиглобуліну).

Компоненти реакції:

- досліджуваний вірус (препарати з патматеріалу хворих тварин або зараженої культури клітин);
- специфічна і нормальна сироватки;
- флуоресціююча антивидова сироватка;
- препарати з органів здорових тварин або незараженої культури клітин.

Антивидові сироватки одержують, імунізуючи тварин певного виду глобулінами тварин тих видів, які служать продуцентами антивірусних сироваток. Найчастіше використовують сироватки проти глобулінів кроля, коня, морської свинки і курей. Схема реакції для виявлення вірусних антигенів наведена на рис. 2.



О

Рис. 2. Непрямий метод постановки РІФ (МФА)

Постановка реакції:

1. На фіксовані препарати наносять специфічну сироватку, витримують 30 хв у вологій камері при температурі 18-22° С або 37° С, потім відмивають (аналогічно, як при прямому методі РІФ).

2. На препарати наносять флуоресціюючу антивидову сироватку, витримують 30 хв. у вологій камері при температурі 18-22°С або 37°С.

3. Препарати знову відмивають, висушують на повітрі і досліджують у люмінесцентному мікроскопі.

При наявності вірусного антигену виникає флуоресценція заражених вірусом клітин (як результат утворення складних комплексів антиген-антитіло-антивидове антитіло).

Одночасно ставлять контролі:

- незаражені препарати, оброблені флуоресціюючою антивидовою сироваткою;
- заражені препарати, оброблені флуоресціюючою антивидовою сироваткою;
- заражені препарати, оброблені спочатку нормальною сироваткою, а потім флуоресціюючою антивидовою сироваткою;
- заражені препарати, оброблені спочатку специфічною сироваткою (після попередньої адсорбції антитіл гомологічним антигеном), а потім флуоресціюючою антивидовою сироваткою.

Переваги даної модифікації непрямого методу РІФ:

- 1) метод потребує лише однієї флуоресціюючої сироватки - антивидової, з допомогою якої можна виявити антигени різних вірусів (при умові, що антисироватки до цих вірусів одержані шляхом імунізації тварин одного виду);
- 2) значно вища чутливість;
- 3) метод використовують не тільки для ідентифікації вірусних антигенів, але й для виявлення і титрування антитіл.

Виявлення антитіл непрямим методом РІФ.

Компоненти реакції:

- досліджувані сироватки;
- специфічний антиген (препарати з культури клітин, зараженої відомим вірусом);
- флуоресціююча антивидова сироватка;
- специфічна і нормальна сироватки;
- препарати з незараженої культури клітин.

Постановка реакції:

1. На фіксовані препарати з культури клітин, зараженої відомим вірусом, наносять двократні розведення досліджуваної сироватки (від 1:10 до 1:1280), витримують 30 хв у вологій камері при температурі 18-22°C або 37°C, потім відмивають.

2. На препарати наносять флуоресціюючу антивидову сироватку, витримують 30 хв. у вологій камері при температурі 18-22°C або 37°C.

3. Препарати знову відмивають, висушують на повітрі і досліджують у люмінесцентному мікроскопі.

4. Специфічні антитіла в досліджуваних сироватках виявляють по яскраво-зеленому світінню вірусного антигену в заражених клітинах. За титр антитіл приймають найвище розведення сироватки, при якому виявляється чітка флуоресценція гомологічного антигену.

5. Одночасно ставлять контролю:

- незаражені клітини оброблені флуоресціюючою антивидовою сироваткою;

- заражені клітини, оброблені флуоресціюючою антивидовою сироваткою;

- заражені клітини, оброблені спочатку нормальною сироваткою (в двократних розведеннях), а потім флуоресціюючою антивидовою сироваткою;

- заражені клітини, оброблені спочатку специфічною сироваткою (в двократних розведеннях), а потім флуоресціюючою антивидовою сироваткою.

Б) виявлення антигену при допомозі флуоресціюючого антикомплементарного глобуліну.

Компоненти реакції:

1. Досліджуваний вірус (препарати з патматеріалу хворих тварин або зараженої культури клітин);

2. Специфічна і нормальна сироватки;

3. Комплемент;

4. Флуоресціюючий антикомплементальний глобулін;

5. Препарати з органів здорових тварин або незараженої культури клітин

Постановка реакції:

1. На фіксовані препарати наносять специфічну сироватку (аналогічно, як при прямому методі РІФ).

2. На препарати наносять флуоресціюючий антикомплементарний глобулін, витримують 30 хв. у вологій камері при температурі 18-22°C або 37°C.

3. Препарати знову відмивають, висушують на повітрі і досліджують у люмінесцентному мікроскопі.

4. При наявності вірусного антигену виникає флуоресценція заражених вірусом клітин (як результат утворення складних комплексів антиген-антитіло-комплемент- антикомплементарний глобулін (антитіло)).

5. Одночасно ставлять контролю:

- незаражені препарати, оброблені флуоресціюючим антикомплементарним глобуліном;

- заражені препарати, оброблені флуоресціюючим антикомплементарним глобуліном;

- заражені препарати, оброблені спочатку нормальною сироваткою і комплементом, а потім флуоресціюючим антикомплементарним глобуліном;

- заражені препарати, оброблені спочатку специфічною сироваткою (після попередньої адсорбції антитіл гомологічним антигеном) і комплементом, а потім флуоресціюючим антикомплементарним глобуліном;

- заражені препарати, оброблені одним комплементом морської свинки (1 : 10) або ж в суміші з неімунною (нормальною сироваткою), а потім флуоресціюючим антикомплементарним глобуліном;

- заражені препарати оброблені специфічною сироваткою без комплементу, а потім флуоресціюючим антикомплементарним глобуліном.

Переваги даної модифікації непрямого методу РІФ:

1) метод взагалі є універсальним, бо потребує лише однієї антикомплементарної флуоресціюючої сироватки для виявлення специфічних вірусів різних видів тварин.

Основні переваги та недоліки РІФ.

Переваги:

- РІФ характеризується високою чутливістю, специфічністю і швидким одержанням результатів (особливо непрямі методи);

- особливо цінна ця реакція для ідентифікації тих вірусів, які не мають цитопатогенних, гемаглютинуючих і гемадсорбуючих властивостей;

- РІФ дає можливість вивчити процеси взаємодії вірусів з клітинами, дослідити динаміку нагромадження вірусних антигенів у клітині, антигенні зв'язки вірусів, а також патогенез вірусних інфекцій;

- особливо важливе значення цього методу при дослідженні змішаних і хронічних інфекцій.

Недоліки:

- чутливість РІФ не абсолютна;

- специфічність не завжди висока, між близькоспорідненими вірусами часто виникають перехресні реакції;

- часто виникає неспецифічна флуоресценція викликана: власним свіченням антигену або супутніх речовин (тканин тварин, грибків тощо); фіксацією флуоресціюючої сироватки на елементи препарату неімунологічної природи (лейкоцити, тромбоцити, волокна, денатуровані білки); свічення препарату можуть викликати так звані природні (натуральні) антитіла, що містяться в дослідних сироватках, а іноді і в кон'югатах (навіть високоочищених).

Практична робота

1. Опанувати метод простого флуорохромування.
2. Опанувати принцип реакції імунофлуоресценції (РІФ).
3. Відпрацювати техніку підготовки компонентів реакції для постановки основного досліджу.
4. Відпрацювати техніку постановки прямого методу реакції.
5. Відпрацювати методику постановки непрямого (двоступінчастого) методу реакції.
6. Законспектувати основні переваги та недоліки РІФ.

Питання для самоконтролю

1. Що таке флуоресценція?
2. Охарактеризуйте принцип простого флуорохромовування.
3. Які компоненти приймають участь при постановці цього методу?
4. Які методики постановки цього методу ви знаєте?
5. Охарактеризуйте переваги і недоліки методу простого флуорохромовування.
6. Який принцип РІФ?
7. Як готують компоненти реакції до РІФ?
8. Яка методика проведення основного дослідження РІФ в прямому варіанті?
9. Яка методика проведення основного дослідження РІФ непрямим варіантом в модифікації з використанням антивидового кон'югату?
10. Яка методика проведення основного дослідження РІФ непрямим варіантом в модифікації з використанням флуоресціюючого антикомплементарного глобуліну?
11. Як проводять облік результатів реакції?
12. Як контролюють достовірність результатів реакції?
13. Охарактеризуйте переваги і недоліки РІФ.

Література:

1. Калініна О. С., Панікар І. І., Скибицький В. Г. Ветеринарна вірусологія. Херсон : ОЛДІ-ПЛЮС, 2022. 416 с.
2. Капрельянц Л. В., Єгорова А. В., Труфкаті Л. В. Лабораторний практикум із загальної мікробіології і загальної мікробіології і вірусології : навчальний посібник. Херсон : ОЛДІ-ПЛЮС, 2021. 136 с.
3. Лютка Г. І., Радзиховський М. Л., Дишкант О. В. Загальна вірусологія основи ветеринарної та зоонотичної вірусології - навч. посіб. Вінниця : друк, 2020. 204 с. Ч. 1.

4. Основи вірусології : навч.-метод. посібник з лаб. практикуму / уклад. І. О. Шмараков, О. В. Кеца. 2-ге вид., перероб. Харків : Мачулін, 2015. 160 с.

5. Практикум з ветеринарної вірусології / В. Г. Скибіцький та ін. Київ : Вища освіта, 2005. 208 с.

6. Калініна О.С., Панікар І.І., Скибіцький В.Г. Ветеринарна вірусологія: Підручник. - К.: Вища освіта, 2004. - 432 с.

ТЕСТОВІ ЗАВДАННЯ

для проведення самоконтролю
з дисципліни «Ветеринарна вірусологія»
для здобувачів другого (магістерського) рівня вищої освіти
з спеціальності 211 - «Ветеринарна медицина»

ТЕМА 1. ФІЗИЧНА СТРУКТУРА ВІРІОНІВ

1. Які є вірусоподібні структури:

А. провірус; Б. вірус-сателіт; В. віріон, провіріон; Г. плазмід, віроїд, пріон.

2. Капсид вірусу побудовано з:

А. вібріонів; Б. нуклеотидів; В. пепломерів; Г. капсомерів; Д. гліколіпідів.

3. Зовнішня оболонка складних віріонів – це:

А. матрикс; Б. капсид; В. нуклеокапсид; Г. суперкапсид; Д. нуклеоїд.

4. Зовнішня оболонка простих віріонів – це:

А. матрикс; Б. капсид; В. серцевина; Д. пеплос; Г. суперкапсид.

5. У складних віріонів може існувати три оболонки:

А. матрикс; Б. капсид; В. серцевина; Г. суперкапсид; Д. пеплос

6. У складних віріонів, які не мають серцевини і великої кількості пепломерів, існують такі оболонки:

А. матрикс; Б. капсид; В. нуклеокапсид; Г. суперкапсид; Д. пеплос.

7. Максимальна кількість оболонок у простих віріонів :

А. три; Б. дві; В. чотири; Г. одна; Д. оболонки відсутні.

8. Максимальна кількість оболонок у складних віріонів :

А. три; Б. дві; В. чотири; Г. одна; Д. оболонки відсутні.

9. Окрему вірусну частинку можна назвати:

А. вірус; Б. клітина; В. віріон; Г. набір органоїдів; Д. геном.

10. Білкова оболонка простого віріону з серцевиною називається:

А. матрикс; Б. капсид; В. нуклеокапсид; Г. суперкапсид; Д. пеплос.

11. Речовини мембрани клітини-хазяїна входять до складу:

А. матриксу; Б. капсиду; В. нуклеокапсиду; Г. суперкапсиду; Д. серцевини.

12. Комплекс нуклеїнової кислоти віріону з внутрішніми білками називається:

А. матрикс; Б. капсид; В. нуклеокапсид; Г. суперкапсид; Д. серцевина.

13. Білки капсиду віріонів разом з нуклеїною кислотою – це:

А. матрикс; Б. серцевина; В. нуклеокапсид; Г. пеплос; Д. геном.

14. Якщо білок серцевини безпосередньо зв'язаний з геном – це білок, асоційований з:

А. нуклеїною кислотою; Б. матриксом; В. нуклеотидом; Г. пеплосом; Д. нуклеокапсидом.

15. Кожен капсомер простого віріону складається з:

А. 1-2 типів молекул білка;
Б. 1-3 типів молекул ліпідів;
В. 1-5 типів молекул нуклеїнових кислот;
Г. 1-5 типів молекул білка;
Д. 2-3 типів молекул вуглеводів.

16. Кожен капсомер складного віріону складається з:

А. 1-2 типів молекул білка;
Б. 1-3 типів молекул ліпідів;
В. 1-2 типів молекул нуклеїнових кислот;
Г. 1-5 типів молекул білка;
Д. 2-3 типів молекул вуглеводів.

17. Віріони хребетних мають декілька типів симетрії:

А. 2; Б. 3; В. 4; Г. 3-4; Д. 1-2

18. Для віріонів, що вражають тварину та людину, найменш характерний такий тип симетрії як:

А. складна; Б. кубічна; В. спіральна; Г. циліндрична; Д. симетрична.

19. Більша частина віріонів хребетних має такий тип симетрії:

А. складна; Б. тільки кубічна; В. тільки спіральна; Г. спіральна і кубічна; Д. ікосаедрична.

20. Тварин та людину найчастіше вражають віріони із:

А. складною; Б. кубічною та спіральною; В. спіральною та складною;
Г. циліндричною та складною; Д. кубічною та складною.

21. Виступи ліпопротеїнової оболонки складного віріона мають назву:

А. шипи; Б. нуклеокапсиди; В. пепломери; Г. капсомери; Д. пептиди.

22. Пепломери найчастіше мають таку форму:

А. паличковидну; Б. кулясту; В. звивисту; Г. тороїдальну; Д. трапецієвидну.

23. Дефектні віріони не мають:

А. всього геному; Б. частини геному; В. суперкапсиду; Г. матриксу;
Д. капсиду.

24. Простий віріон з нуклеокапсидом має однаковий діаметр у:

А. віріона і геному; Б. віріона і нуклеокапсиду; В. віріона і суперкапсиду;
Г. геному і нуклеокапсиду; Д. віріону і матриксу.

25. У складних вірусів діаметр віріону більший, ніж діаметр:

А. нуклеокапсиду; Б. капсиду; В. геному; Г. матриксу; Д. суперкапсиду.

26. Одною з функцій капсиду є захист:

А. внутрішніх білків вібріону; Б. геному вібріону; В. суперкапсиду вібріону;
Г. матриксу вібріону; Д. пепломерів вібріону.

27. Спільна риса всіх вірусів з оболонками - це наявність:

А. геному; Б. серцевини; В. пеплосу; Г. суперкапсиду; Д. нуклеокапсиду.

28. Спільна риса всіх безоболонкових вірусів - це наявність:

А. геному; Б. матриксу; В. капсиду; Г. пеплосу; Д. суперкапсиду.

29. Головною функцією суперкапсиду є:

А. захист вібріону;
Б. прикріплення до клітини-хазяїна;
В. надання форми вібріону;
Г. формування типу симетрії вібріону;
Д. передача спадкової інформації.

30. Функція пепломерів полягає в:

А. передачі інформації;
Б. захисті вібріону;
В. прикріпленні до мембрани клітини-хазяїна;
Г. прикріпленні до ядра;
Д. прикріплення до рибосом клітини-хазяїна.

31. Функція геному полягає в:

А. передачі інформації;
Б. захисті вібріону;
В. прикріпленні до мембрани клітини-хазяїна;
Г. захисті серцевини;
Д. захисті матриксу.

32. Функція матриксу полягає в:

- А. передачі інформації;
- Б. формуванні зовнішнього вигляду вібріона;
- В. прикріпленні до мембрани клітини-хазяїна;
- Г. прикріпленні до ядра;
- Д. здійсненні ферментативних реакцій при розмноженні вібріонів.

33. Функція серцевини полягає в:

- А. передачі інформації;
- Б. захисті генома вібріону;
- В. прикріпленні до мембрани клітини-господаря;
- Г. прикріпленні до ядра;
- Д. здійсненні ферментативних реакцій при розмноженні вібріонів.

34. Функція нуклеокапсиду простого віріона полягає в:

- А. передачі інформації;
- Б. захисті вібріону;
- В. прикріпленні до мембрани клітини-хазяїна;
- Г. прикріпленні до ядра;
- Д. формуванні вигляду віріона

35. Функція нуклеокапсиду складного віріона полягає в:

- А. передачі інформації;
- Б. захисті геному вібріону;
- В. прикріпленні до мембрани клітини-хазяїна;
- Г. формуванні внутрішньої структури вібріона;
- Д. здійсненні певних процесів при розмноженні вібріонів.

36. Що таке віруси ?

- А. Унікальна неклітинна форма життя;
- Б. Мікроорганізми, яким властива фільтривність і нездатність розмножуватись на штучних живильних середовищах;
- В. Облігатні внутрішньоклітинні паразити;
- Г. Автономні генетичні структури, які здатні функціонувати і репродукуватися лише в чутливих клітинах організмів.

37. Як називається неактивна форма існування вірусів?

- А. епівірус; Б. провірус; В. віроїд; Г. віріон

38. Які є вірусоподібні структури?

- А. провірус; Б. вірус-сателіт;
- В. віріон, провіріон; Г. плазмід, віроїд, пріон.

39. Як називається білкова оболонка віріона, що оточує нуклеїнову кислоту?

- А. білкова мембрана; Б. Капсид;
- В. суперкапсид; Г. прокапсид

40. Як називається зовнішня ліпопротеїнова оболонка віріона?

- А. білкова мембрана; Б. Капсид;
В. суперкапсид; Г. прокапсид

41. Морфологічна одиниця капсиду, яку видно в електронний мікроскоп:

- А. білкова субодиниця; Б. структурна одиниця;
В. капсомер; Г. пепломер.

42. Морфологічна одиниця суперкапсиду, що видно в електронний мікроскоп:

- А. білкова субодиниця; Б. структурна одиниця;
В. капсомер; Г. пепломер.

ТЕМА 2. ХІМІЧНИЙ СКЛАД ВІРІОНІВ

1. Геном віріона складається з таких нуклеїнових кислот:

- А. тільки ДНК; Б. тільки РНК; В. ДНК та інформаційна РНК; Г. ДНК або РНК; Д. тільки транспортна РНК.

2. Мономером нуклеїнової кислоти є:

- А. ген; Б. нуклеотид; В. триплет; Г. амінокислота; Д. олігопептид.

3. Азотисті основи, які рідко зустрічаються в геномі віріону називаються:

- А. мінорними; Б. піримідиновими; В. антикварними; Г. пуриновими;
Д. нуклеотидними.

4. Будь-який нуклеотид має такі компоненти:

- А. залишок фосфорної кислоти; Б. поліцукор; В. моноцукор; Г. дипептид;
Д. азотиста основа.

5. До складу нуклеїнових кислот вірусів входять такі вуглеводи:

- А. рибоза; Б. манноза; В. лактоза; Г. дезоксирибоза; Д. арабіноза.

6. До складу нуклеїнових кислот вірусів входить залишок такої неорганічної кислоти:

- А. соляна; Б. сірчана; В. азотна; Г. фосфорна; Д. плавікова.

7. До складу нуклеїнових кислот вірусів входять такі азотовмісні органічні сполуки:

- А. пурини; Б. поліаміни; В. пептиди; Г. піримідини; Д. ауксини.

8. За хімічним складом ДНК та РНК розрізняються наявністю різних:

- А. моноцукрів; Б. азотистих основ; В. амінокислот; Г. неорганічних кислот;
Д. поліцукрів.

9. Синонімом терміну “полінуклеотидний ланцюг” у віріонів є:
А. геном; Б. ДНК; В. РНК; Г. нуклеотид; Д. ядро.
10. Розміри молекул вірусних нуклеїнових кислот вимірюються в:
А. мікрометрах; Б. міліметрах; В. греях; Г. дальтонах; Д. нанометрах.
11. Маса молекул вірусних нуклеїнових кислот вимірюються в:
А. мікрометрах; Б. міліметрах; В. греях; Г. дальтонах; Д. нанометрах.
12. Просторова відповідальність пар азотистих основ в дволанцюгових молекулах ДНК та РНК вірусів називається:
А. компліментарність; Б. полярність; В. трансмісивність;
Г. реплікативність; Д. транзитивність.
13. Вірусні нуклеїнові кислоти кодують вірусні:
А. прості білки; Б. ліпіди; В. вуглеводи; Г. спирти; Д. складні білки.
14. Нуклеїнові кислоти вірусів розрізняються за:
А. принципом побудови нуклеотида;
Б. будовою ланцюга;
В. наявністю залишків різних неорганічних кислот;
Г. функціями;
Д. формою молекул.
15. За формою молекул вірусний геном може бути:
А. кільцевим; Б. лінійним; В. ікосаедричним; Г. сегментованим;
Д. сферичним.
16. За кількістю ланцюгів нуклеїнових кислот вірусний геном може бути:
А. одно спіральним; Б. двоспіральним; В. фрагментованим; Г. розірваним;
Д. багато спіральним.
17. У вірусів, геном яких складається з декількох окремих молекул нуклеїнової кислоти, він називається:
А. сегментованим; Б. одно спіральним; В. фрагментованим; Г. розірваним;
Д. багато спіральним.
18. РНК – вмісні віруси з фрагментованим геномом називаються:
А. ретровіруси; Б. диплорнавіруси; В. амбісенс-віруси; Г. аденовіруси;
Д. поксвіруси.
19. Наявність фрагментованого геному – це особливість будови:
А. РНК-вірусів; Б. ДНК-вірусів; В. всіх віріонів; Г. +ДНК-вірусів; Д. – ДНК-вірусів.

20. РНК- вмісні геноми:

А. мають 50 % вірусів; Б. мають 20 % вірусів; В. мають 15 % вірусів;
Г. мають 80 % вірусів; Д. мають тільки віруси комах.

21. ДНК-вмісні геноми:

А. мають 50 % вірусів; Б. мають 20 % вірусів; В. мають 15 % вірусів;
Г. мають 80 % вірусів; Д. мають тільки бактеріофаги.

22. Односпіральні ДНК-вмісні вірусні геноми мають або позитивну, або негативну:

А. компліментарність; Б. послідовність; В. трансмісивність; Г. полярність;
Д. направленість.

23. РНК – вмісні односпіральні віруси поділяються на 2 групи:

А. віруси з позитивним геномом;
Б. віруси з негативним геномом;
В. віруси з полярним геномом;
Г. віруси з комплементарним геномом;
Д. віруси з неполярним геномом.

24. РНК вірусів з позитивним геномом має властивості:

А. інформаційної РНК; Б. транспортної РНК; В. ядерної ДНК;
Г. мітохондріальної ДНК; Д. матричної РНК.

25. При проникненні в клітину-хазяїна РНК-вірус з позитивним геномом одразу взаємодіє з:

А. мембраною; Б. ядром; В. рибосомою; Г. лізосомою; Д. мітохондрією.

26. В чутливій клітині віруси з позитивним геномом здатні швидко розпочати синтез:

А. суперкапсиду; Б. білка; В. ДНК; Г. вуглеводів; Д. ліпідів.

27. Інфекційна структура вірусів з негативним геномом - це РНК в комплексі з:

А. вуглеводами; Б. білками; В. ліпідами; Г. коферментами; Д. ДНК.

28. Білки вірусів з негативним геномом в клітині-хазяїні виконують функції:

А. вуглеводів; Б. ферментів; В. ліпідів; Г. коферментів; Д. нуклеотидів.

29. Структурні білки віріонів не виконують таких функцій:

А. захист нуклеїнової кислоти від пошкоджуючих факторів;
Б. збереження спадкової інформації;
В. проникнення вірусу в чутливу клітину;
Г. взаємодія з мембраною чутливої клітини;
Д. кодування амінокислотної послідовності вірусних ферментів.

30. *Неструктурні білки віріонів виконують такі функції:*

- А. захист нуклеїнової кислоти від пошкоджуючих факторів;
- Б. руйнування вірусу;
- В. взаємодія з мембраною чутливої клітини;
- Г. ферментативні;
- Д. руйнування клітини-хазяїна.

31. *В зрілих віріонах білки входять до:*

- А. пепломерів; Б. фосфоліпідів; В. матриксу; Г. капсиду; Д. серцевини.

32. *Прості віріонні білки розрізняються за:*

- А. будовою; Б. участю в репродукції вібріонів;
- В. наявністю азотистих основ; Г. наявністю поліцукрів;
- Д. можливістю виділення молекул конкретного білка із вірусного матеріалу.

33. *Склад ліпідів віріона залежить від:*

- А. ліпідного складу мембрани клітини-хазяїна;
- Б. амінокислотного складу пепломерів;
- В. амінокислотного складу білків капсиду;
- Г. структури геному вірусу;
- Д. від температури тіла хазяїна.

34. *Функціями ліпідів є:*

- А. ізоляція внутрішнього шару віріонів від речовин зовнішнього середовища;
- Б. стабілізація структури вібріона;
- В. утримання та взаємодія пепломерів;
- Г. забезпечення перших етапів взаємодії з клітиною-хазяїном;
- Д. передача спадкової інформації.

35. *Вуглеводами віріонів можуть бути:*

- А. рибоза або дезоксирибоза; Б. фруктоза сахароза; В. нейраміновою кислота;
- Г. лимонна кислота; Д. глюкозамін.

36. *Прикріпні білки в структурі суперкапсиду складно організованих вірусів забезпечують:*

- А. регуляцію експресії вірусного геному;
- Б. інтеграцію капсиду з плазмолемою та проникнення вірусу в клітину;
- В. транскрипцію та реплікацію вірусного геному;
- Г. адсорбцію віріона на поверхні клітини.

37. *Які функції виконують геномні білки в структурі капсиду просто- і складно організованих вірусів, що ковалентно з'єднані з кінцем нуклеїнової кислоти?*

- А. забезпечення адсорбції віріона на поверхні клітини;

- Б. забезпечення проникнення вірусу в клітину;
- В. участь у транскрипції та реплікації вірусного геному;
- Г. регуляція експресії вірусного геному.

38. Які функції виконують ферменти в структурі капсиду складно організованих вірусів?

- А. забезпечення адсорбції віріона на поверхні клітини;
- Б. забезпечення проникнення вірусу в клітину;
- В. участь у транскрипції та реплікації вірусного геному;
- Г. регуляція експресії вірусного геному.

39. Назвіть функції неструктурних вірусних білків:

- А. ферменти транскрипції та реплікації вірусного геному і модифікацій вірусних білків;
- Б. регулятори експресії вірусного геному;
- В. інгібітори клітинного біосинтезу та індуктори деструкції клітин;
- Г. усі перелічені.

40. Які функції виконують ліпіди, що знаходяться в суперкапсидній оболонці складно організованих вірусів?

- А. стабілізація структури віріона;
- Б. забезпечення взаємодії глікопротеїнів;
- В. ізоляція нуклеокапсиду або серцевини від гідрофільних речовин навколишнього середовища;
- Г. усі перелічені.

41. Які функції виконують вуглеводи, що знаходяться в суперкапсидній оболонці складно організованих вірусів?

- А. збереження конформації суперкапсидних білків;
- Б. захист суперкапсидних білків від протеолітичних ферментів;
- В. вплив на антигенні властивості;
- Г. усі перелічені.

ТЕМА 3.НОМЕНКЛАТУРА ТА КЛАСИФІКАЦІЯ ВІРІОНІВ

1. Згідно сучасної класифікації всі відомі віруси розподілено в:

- А. 10 родин; Б. 15 родин; В. 5 родин; Г. 28 родин; Д. 8 родин.

2. В сучасній класифікації вірусів до РНК-вмісних належать:

- А. 3 родини; Б. 15 родин; В. 8 родин; Г. 18 родин; Д. 4 родини.

3. В сучасній класифікації вірусів до ДНК-вмісних належать:

- А. 7 родин; Б. 5 родин; В. 8 родин; Г. 10 родин; Д. 2 родини.

4. Згідно сучасної класифікації безоболонкові РНК-вмісні віруси належать:
А. до 7 родин; Б. до 5 родин; В. до 6 родин; Г. до 11 родин; Д. до 4 родин.
5. Згідно сучасної класифікації безоболонкові ДНК-вмісні віруси належать:
А. до 7 родин; Б. до 5 родин; В. до 8 родин; Г. до 11 родин; Д. до 4 родин.
6. Згідно сучасної класифікації оболонкові ДНК-вмісні віруси належать:
А. до 7 родин; Б. до 3 родин; В. до 8 родин; Г. до 11 родин; Д. до 5 родин.
7. Згідно сучасної класифікації оболонкові РНК-вмісні віруси належать:
А. до 7 родин; Б. до 3 родин; В. до 8 родин; Г. до 11 родин; Д. до 4 родин.
8. Розміри всіх безоболонкових вірусів хребетних знаходяться в інтервалі:
А. від 20 до 100 нм; Б. від 10 до 30 нм; В. від 120 до 300 нм; Г. від 70 до 90 нм;
Д. від 100 до 400 нм.
9. Максимальні розміри складних ДНК-вмісних вірусів:
А. 100 нм; Б. 30 нм; В. 300 нм; Г. 450 нм; Д. від 100 до 400 нм.
10. Максимальні розміри (250-350 нм) мають:
А. всі віруси;
Б. РНК-вмісні з оболонками; В. ДНК-вмісні з оболонками;
Г. РНК-вмісні без оболонок; Д. ДНК-вмісні без оболонок.
11. Мінімальні розміри (20-30 нм) мають:
А. всі віруси; Б. РНК-вмісні з оболонками;
В. ДНК-вмісні з оболонками; Г. РНК-вмісні без оболонок;
Д. ДНК-вмісні без оболонок.
12. РНК-вмісні безоболонкові віруси мають:
А. спіральний тип симетрії; Б. складний тип симетрії;
В. кубічний тип симетрії; Г. квадратний тип симетрії;
Д. фаговий тип симетрії.
13. ДНК-вмісні безоболонкові віруси хребетних мають:
А. спіральний тип симетрії; Б. складний тип симетрії;
В. кубічний тип симетрії; Г. квадратний тип симетрії;
Д. фаговий тип симетрії.
14. РНК-вмісні оболонкові віруси найчастіше мають:
А. спіральний тип симетрії; Б. складний тип симетрії;
В. кубічний тип симетрії; Г. квадратний тип симетрії;
Д. ікосаедричний тип симетрії.

15. РНК- та ДНК-вмісні віруси, зовнішньою оболонкою яких є капсид мають:

- А. спіральний тип симетрії;
- Б. складний тип симетрії;
- В. кубічний тип симетрії;
- Г. квадратний тип симетрії;
- Д. фаговий тип симетрії.

16. Складний тип симетрії мають такі родини ДНК-вмісних вірусів:

- А. ірідовіруси; Б. гепаднавіруси; В. поксвіруси; Г. паповавіруси;
- Д. герпесвіруси.

17. Складний тип симетрії мають такі родини РНК-вмісних вірусів:

- 1. арена віруси; 2. ретровіруси; 3. каліцивіруси; 4. рабдовіруси; 5. реовіруси.

18. Серед РНК-вмісних складних вірусів негативний геном мають представники:

- А. 5 родин; Б. 8 родин; В. 7 родин; Г. 2 родини; Д. 4 родини.

19. Серед РНК-вмісних складних вірусів позитивний геном мають представники:

- А. 5 родин; Б. 8 родин; В. 3 родин; Г. 2 родини; Д. 4 родини.

20. Фрагментація нуклеїнової кислоти характерна:

- А. для всіх вірусів;
- Б. для РНК-вмісних складних;
- В. для ДНК-вмісних складних;
- Г. для РНК-вмісних простих;
- Д. для ДНК-вмісних простих.

21. Фрагментовану РНК мають віруси таких родин:

- А. пікорнавірус; Б. реовірус; В. арена вірус; Г. ортоміксовірус; Д. ретровірус.

22. Геном більшості ДНК-вмісних складних вірусів – це молекула:

- А. двохспіральної лінійної нуклеїнової кислоти;
- Б. односпіральної лінійної нуклеїнової кислоти;
- В. двохспіральної лінійної амінокислоти;
- Г. односпіральної кільцевої нуклеїнової кислоти;
- Д. двохспіральної кільцевої нуклеїнової кислоти.

23. Геном простих ДНК-вмісних вірусів представлений молекулою:

- А. двохспіральної нуклеїнової кислоти;
- Б. односпіральної нуклеїнової кислоти;
- В. двохспіральної амінокислоти;
- Г. односпіральної амінокислоти;
- Д. фрагментованої нуклеїнової кислоти.

24. З 18 родин РНК-вмісних вірусів суперкапсид мають:

А. 4; Б. 5; В. 8; Г. 10; Д. 12.

25. З 10 родин ДНК-вмісних вірусів суперкапсид мають:

А. 4; Б. 5; В. 2; Г. 1; Д. 3.

26. Серед всіх родин ДНК-вмісних вірусів капсид є зовнішньою оболонкою у:

А. 4; Б. 5; В. 2; Г. 7; Д. 3.

27. Серед всіх родин РНК-вмісних вірусів капсид є зовнішньою оболонкою у:

А. 4; Б. 6; В. 2; Г. 12; Д. 3.

28. Всі ДНК-вмісні прості віруси з кубічною симетрією не мають:

А. Геному; Б. Суперкапсиду; В. Матриксу; Г. Капсиду; Д. Пепломерів.

29. Всі ДНК-вмісні віруси із складною симетрією обов'язково мають такі структури:

1. геном; 2. суперкапсид; 3. пеплос; 4. капсид; 5. серцевину.

30. До морфологічних ознак, за якими класифікують віруси, належать:

А. будова геному; Б. географічне розповсюдження; В. коло хазяїв; Г. патогенність; Д. наявність ліпопротеїдної оболонки.

31. До важливих характеристик будь-якої вірусної родини належать:

А. тип і структура нуклеїнової кислоти;
Б. кількість вуглеводних молекул у віріоні;
В. розмір віріона;
Г. тип симетрії;
Д. кількість пепломерів в суперкапсиді.

32. В основу поділу віріонів на роди та типи покладено такі їх властивості :

А. розмір; Б. будову геному; В. коло хазяїв; Г. спосіб передачі; Д. антигенні властивості.

33. До вірусних родин, представники яких здатні розмножуватись і в організмі хребетних, і в організмі безхребетних належать:

А. каліцивіруси; Б. пікорнавіруси; В. паповавіруси; Г. арена віруси; Д. буньявіруси.

34. Віруси із суперкапсидом є збудниками таких хвороб як:

А. віспа; Б. ящур; В. аденовірусна інфекція; Г. африканська чума свиней; Д. герпес.

35. Віруси із капсидом є збудниками таких хвороб як:

А. віспа; Б. ящур; В. лейкоз; Г. хвороба Тешена; Д. аденовірусна інфекція.

ТЕМА 4. РЕПРОДУКЦІЯ ВІРІОНІВ

1. Головною фізіологічною особливістю вірусів є те, що вони:

- А. сапрофіти; Б. облигатні паразити; В. ауксотрофи;
- Г. внутрішньоклітинні паразити; Д. автотрофи.

2. Вірусний геном подвоюється:

- А. разом з ДНК хазяїна;
- Б. разом з РНК хазяїна;
- В. незалежно від подвоєння ядерного матеріалу хазяїна;
- Г. незалежно від подвоєння нуклеїду хазяїна;
- Д. під час поділу клітини-хазяїна.

3. Диз'юнктивний біосинтез – це біосинтез структурних компонентів віріона:

- А. в ядрі клітини-хазяїна; Б. в рибосомі клітини-хазяїна;
- В. в мітохондріях клітини-хазяїна; Г. на мембрані клітини-хазяїна;
- Д. в різних відсіках клітини-хазяїна одночасно;

4. Синтез вірусних білків відбувається:

- А. в рибосомі клітини-хазяїна; Б. в ядрі клітини-хазяїна; В. в серцевині віріона
- Г. в капсидівіріона; Д. в нуклеокапсидівіріона.

6. Подвоєння вірусних нуклеїнових кислот:

- А. відбувається за рахунок одного механізму;
- Б. відбувається за рахунок декількох механізмів;
- В. відбувається за рахунок подвоєння ядерної ДНК клітини-хазяїна;
- Г. відбувається за рахунок тільки РНК-залежних механізмів;
- Д. відбувається за рахунок тільки ДНК-залежних механізмів.

7. В загальному вигляді репродукція віріонів складається з:

- А. 5 етапів; Б. 3 етапів; В. 2 етапів; Г. 1 етапу; Д. 20 етапів.

8. Різні етапи репродукції здійснюються:

- А. тільки послідовно; Б. тільки паралельно;
- В. незалежно один від одного; Г. послідовно або послідовно-паралельно;
- Д. спочатку паралельно, а потім – послідовно.

9. Під час першої фази репродукції відбувається:

- А. проникнення вірусу в клітину;
- Б. реплікація вірусного геному;
- В. біосинтез вірусних білків;
- Г. утворення нових віріонів;

Д. прикріпленні до оболонок клітини-хазяїна.

10. Під час другої фази репродукції відбувається:

- А. проникнення вірусу в клітину;
- Б. реплікація вірусного геному;
- В. біосинтез вірусних білків;
- Г. утворення нових віріонів;
- Д. адсорбція на оболонках клітини-хазяїна.

11. Під час третьої фази репродукції відбувається:

- А. проникнення вірусу в клітину;
- Б. реплікація вірусного геному;
- В. вихід вірусу з клітини-хазяїна;
- Г. утворення нових віріонів;
- Д. прикріпленні до оболонок клітини-хазяїна.

12. Первинний контакт вірусу із сприйнятливою клітиною макроорганізму відбувається:

- А. випадково;
- Б. внаслідок хаотичного броуновського руху;
- В. внаслідок взаємодії рецепторів вірусу та клітини-хазяїна;
- Г. в оточуючому середовищі;
- Д. внаслідок взаємодії заряджених груп в речовинах вірусу та макроорганізму.

13. Одиночний зв'язок вірусу з клітиною макроорганізму – це:

- А. зворотня адсорбція;
- Б. незворотня адсорбція;
- В. мультівалентнеприкріплення;
- Г. неспецифічна адсорбція;
- Д. специфічна адсорбція.

14. “Роздягання” вірусу – це процес:

- А. подвоєння РНК;
- Б. подвоєння ДНК;
- В. синтезу білків;
- Г. руйнування білків;
- Д. видалення оболонок вірусу та вивільнення його геному

15. Процес “роздягання” у вірусів відбувається:

- А. тільки в лізосомах;
- Б. тільки в апараті Гольджі;
- В. в різних відсіках клітини в залежності від виду вірусу;
- Г. в просторі біля ядра;
- Д. тільки на ядерній мембрані.

16. У руйнуванні вірусних оболонок основну роль відіграють:

- А. гідролітичні ферменти цитоплазми клітини-хазяїна;
- Б. ферменти лізосом клітини-хазяїна;

- В. структурні білки вібріонів;
- Г. пепломери суперкапсиду;
- Д. неструктурні білки вібріонів.

17. Вихід нових віріонів з клітини-хазяїна відбувається шляхом:

- А. деструкції; 2. вибуху; 3. адсорбції; 4. брунькування; 5. бінарного поділу.

18. Під час виходу віріонів клітина-хазяїн:

- А. гине;
- Б. прискорює розмноження;
- В. зменшується в розмірах;
- Г. продовжує розвиватись, доки не вичерпаються її поживні речовини;
- Д. втрачає окремі органоїди;

19. Під час утворення нових віріонів здійснюються такі процеси:

- А. реплікація вірусного геному;
- Б. диз'юнктивний біосинтез;
- В. мутації;
- Г. біосинтез вірусних білків;
- Д. самоорганізація новоутворених компонентів в зрілі віріони.

20. Особливості подвоєння нуклеїнових кислот віруса залежать від:

- А. структури геному; Б. структури капсиду; В. кількості пепломерів;
- Г. будови клітини-хазяїна; Д. наявності серцевини.

21. Синтез вірусних білків відбувається особливим шляхом при наявності в геномі:

- А. +РНК; Б. –РНК; В. фрагментованих нуклеїнових кислот; Г. +Днк; Д. - ДНК

22. Реплікація нуклеїнових кислот віруса відбувається за механізмом, відмінним від інших біологічних об'єктів у:

- А. вірусів з негативним геномом;
- Б. вірусів з позитивним геномом;
- В. ретровірусів;
- Г. диплорнавірусів;
- Д. амбісенсвірусів.

23. В репродукції вірусів хребетних приймають участь:

- А. тільки ферменти віріонів;
- Б. тільки ферменти клітини-хазяїна;
- В. ферменти віріонів та клітини-хазяїна;
- Г. ферменти бактеріофагів;
- Д. ферменти бактерій.

24. *Шляхом піноцитозу в клітину-хазяїна потрапляють:*

- А. всі віруси;
- Б. найбільші за розмірами віруси;
- В. віруси з фрагментованим геномом;
- Г. найменші за розмірами віруси;
- Д. віруси великої рогатої худоби.

25. *Злиття з мембраною клітини-хазяїна відбувається:*

- А. при проникненні вірусу в клітину;
- Б. при подвоєнні нуклеїнової кислоти;
- В. під час біосинтезу білків;
- Г. під час виходу віріонів;
- Д. при адсорбції віріону на клітині.

26. *Як називається процес прикріплення віріона до поверхні клітини ?*

- А. адгезія; Б. адсорбція; В. дезінтеграція; Г. депротейнізація.

27. *Що являє собою рецепторний ендоцитоз ?*

- А. прикріплення віріона до специфічних рецепторів плазмолем;
- Б. злиття з плазмолемою оболонки віріона, зв'язаного з клітинними рецепторами;
- В. інвагінація плазмолем та утворення ендоцитарної вакуолі, яка містить зв'язаний із клітинними рецепторами віріон;
- Г. усі перелічені.

28. *Як називається процес переписування генетичної інформації з вірусного геному на і РНК ?*

- А. реплікація; Б. трансформація; В. трансляція; Г. транскрипція.

29. *Як називається процес переведення генетичної інформації з вірус специфічної і-РНК на послідовність амінокислотних залишків у поліпептидному ланцюгу білка ?*

- А. реплікація; Б. трансформація; В. трансляція; Г. транскрипція.

30. *Як називається синтез вірусних нуклеїнових кислот – точних копій геному вірусу ?*

- А. реплікація; Б. трансформація; В. трансляція; Г. транскрипція.

31. *Назвіть загальний принцип формування віріонів потомства просто організованих вірусів:*

- А. формування віріонів за принципом самоскладання;
- Б. формування провіріонів, які в результаті модифікацій білків перетворюються у віріони;
- В. формування нуклеокапсидів або серцевин, з якими взаємодіють суперкапсидні білки;
- Г. усі перелічені.

32. Як називаються клітинні структури, де відбувається синтез вірусних компонентів і складання віріонів потомства?

- А. клітинні матрикси, віро пласти; Б. вірусні “фабрики”;
В. тільця включення; Г. усі перелічені.

ТЕМА 5. СТІЙКІСТЬ ВІРУСІВ ДО УМОВ ОТОЧУЮЧОГО СЕРЕДОВИЩА

1. Сляний посуд після контакту з патматеріалом знезаражують по схемі:

- А. фламбування – промивання – дезінфекція;
Б. дезінфекція – промивання – стерилізація;
В. дезінфекція – стерилізація – обробка кислотами;
Г. дезінфекція – стерилізація – промивання.
Д. дезінфекція – кип’ятіння – обробка кислотами – промивання – стерилізація.

2. Вибір виду дезрозчину при проведенні вірусологічних досліджень залежить від:

- А. наявності дезінфектанту;
Б. властивостей пат матеріалу;
В. видів вірусологічних досліджень;
Г. хімічного складу дезінфектанту;
Д. кількості дезінфектанту та площі бокса.

3. Металеві інструменти після роботи стерилізують по такій схемі:

- А. автоклавування – фламбування;
Б. УФ-опромінення – дезінфекція;
В. дезінфекція – кип’ятіння;
Г. фільтрування – фламбування;
Д. дезінфекція – промивання – кип’ятіння.

4. Опромінення повітря боксу перед початком вірусологічних досліджень проводять впродовж:

- А. 20 хвилин; Б. 30 хвилин; В. 1-2 години; Г. 5-10 годин; Д. 3 годин.

5. Опромінення повітря боксу перед початком вірусологічних досліджень проводять для:

- А. знищення бактерій;
Б. знищення мікоплазм і грибів;
В. знищення мікроорганізмів всіх морфологічних груп, які можуть знаходитись в повітрі, на робочому столі та інших поверхнях;
Г. для знищення бактерій і вірусів в повітрі;

Д. для знищення бактерій і вірусів в повітрі на робочому столі та інших поверхнях.

6. Фільтри після роботи стерилізують по такій схемі:

- А. автоклавування – фламбування;
- Б. УФ-опромінення – дезінфекція;
- В. обробка кислотами – промивання;
- Г. дезінфекція – автоклавування;
- Д. дезінфекція – кип'ятіння – автоклавування.

7. Піпетки після роботи стерилізують по такій схемі:

- А. автоклавування – фламбування;
- Б. УФ-опромінення – дезінфекція;
- В. дезінфекція – кип'ятіння – обробка кислотами – стерилізація;
- Г. кип'ятіння – промивання;
- Д. кип'ятіння – обробка кислотами;

8. Гумові вироби стерилізують по такій схемі:

- А. автоклавування – фламбування;
- Б. УФ-опромінення – дезінфекція;
- В. кип'ятіння – промивання;
- Г. дезінфекція – кип'ятіння – обробка кислотами;
- Д. стерилізація сухим жаром – автоклавування.

9. Шприци для роботи стерилізують по такій схемі:

- А. дезінфекція – промивання – автоклавування;
- Б. кип'ятіння – промивання;
- В. кип'ятіння – обробка кислотами;
- Г. автоклавування – фламбування;
- Д. УФ-опромінення – дезінфекція.

10. Для обробки обладнання вірусологічної лабораторії не використовують:

- А. кип'ятіння; Б. автоклавування; В. обробку кислотами;
- Г. тиндалізацію; Д. стерилізацію сухим жаром.

11. Найуживаніші методи для стерилізації посуду у вірусології - це:

- А. кип'ятіння та дезінфекція;
- Б. автоклавування та фламбування;
- В. обробка кислотами та стерилізація сухим жаром;
- Г. тиндалізація та УФ-опромінення;
- Д. пастеризація та обробка кислотами.

12. Для стерилізації рідких відходів у вірусології використовують:

- А. кип'ятіння та дезінфекцію;
- Б. автоклавування;

- В. обробку кислотами та стерилізацію сухим жаром;
- Г. тиндалізацію та УФ - опромінення;
- Д. пастеризацію та обробку кислотами.

13. Найуживанішими дезінфектантами у вірусологічній лабораторії є:

- А. етиловий спирт; Б. сірчана і соляна кислоти; В. луги;
- Г. перманганат калію; Д. хлорамін.

14. Використання кислот при обробці скляного посуду дозволяє зруйнувати:

- А. тільки білки віріонів; Б. полісахариди віріонів; В. білки та ліпіди віріонів;
- Г. тільки азотисті основи; Д. всі речовини віріонів.

15. Після відбору пат матеріалу дезінфекція території проводиться:

- А. обов'язково;
- Б. в залежності від пори року;
- В. в залежності від наявності дезінфектанту;
- Г. в залежності від небезпечності інфекційної хвороби;
- Д. в залежності від виду хворої тварини.

16. При обговоренні питання про стійкість вірусу в навколишньому середовищі необхідно враховувати особливості:

- А. будови віріону;
- Б. хімічного складу чутливої клітини;
- В. будови геному;
- Г. особливостей розмноження віріону;
- Д. хімічного складу віріону.

17. Фізичні фактори, які негативно діють на віріони в умовах ферми – це:

- А. УФ - промені; Б. висушування; В. магнітне поле;
- Г. висока та низька температура; Д. γ - та β -промені.

18. Фізичні фактори, які застосовують в умовах лабораторії – це:

- А. УФ-промені; Б. висушування; В. низька температура;
- Г. висока температура; Д. γ - та β -промені.

19. Віріони дезактивуються або гинуть, коли хімічні речовини:

- А. змінюють рН в кислую сторону; Б. змінюють рН в лужну сторону;
- В. є хлорвмісними агентами; Г. заморожують віріони;
- Д. випромінюють γ - та β -промені.

20. Біологічні фактори, які застосовують в умовах лабораторії – це:

- А. УФ-промені; Б. бактеріофаги; В. зневоднення; Г. антибіотики; Д. фітонциди.

21. При обговоренні питання про стійкість вірусу в навколишньому середовищі необхідно враховувати такі фактори:

- А. дію сонячного світла;
- Б. дію дезінфектантів;
- В. методику відбору пат матеріалу;
- Г. дію висушування;
- Д. кількість опадів.

22. Для обробки боксу перед проведенням вірусологічних досліджень використовують:

- А. гарячу воду; Б. розчини дезінфектантів; В. кислоти; Г. антибіотики;
- Д. УФ-промені.

23. Використання дезінфектантів призводить до:

- А. знищення всіх вірусів в патматеріалі;
- Б. знищення частини вірусів в патматеріалі;
- В. розмноження вірусів;
- Г. мутацій вірусів;
- Д. втрати функцій рецепторів для прикріплення у білків капсиду або суперкапсиду.

24. Розчини для вірусологічних робіт, з речовинами яких під дією тепла відбуваються зміни, звичайно стерилізують:

- А. автоклавуванням; Б. пастеризацією; В. УФ-опроміненням; Г. фільтрацією
- Д. гамма-опроміненням.

25. Механізм впливу різних дезінфектантів на віріон полягає:

- А. в необоротному руйнуванні вірусних частинок
- Б. в зміні структури пепломерів у всіх вірусів
- В. в зміні структури рецепторів оболонок
- Г. безпосередньому руйнуванні геному
- Д. уповільненні розмноження вірусу в чутливій клітині

26. Механізм впливу сірчаної або соляної кислот на віріон полягає:

- А. в необоротному руйнуванні всіх структур вірусних частинок;
- Б. в тимчасовій зміні структури пепломерів у оболонкових вірусів;
- В. в тимчасовій зміні структури капсидних білків у безоболонкових вірусів;
- Г. в утворенні дефектних віріонів;
- Д. в зміні полярності вірусних нуклеїнових кислот;

27. Недоліки під час стерилізації можуть призвести до:

- 1. позитивних наслідків при проведенні досліджень;
- 2. негативних наслідків при проведенні досліджень;
- 3. прискорення розвитку вірусу з пат матеріалу;

4. неможливості виділення та ідентифікації вірусу;
5. розвитку представників супутньої мікрофлори.

28. Отвори в лабораторному посуді для вірусологічних робіт під час стерилізації сухим жаром закривають:

- А. ватно-марлевими пробками;
- Б. гумовими пробками;
- В. пластиковими пробками;
- Г. металевою фольгою;
- Д. металевою фольгою і папером.

29. Отвори в лабораторному посуді для вірусологічних робіт при проведенні автоклавування закривають:

- А. ватно – марлевими пробками;
- Б. гумовими пробками;
- В. спеціальними пластиковими пробками;
- Г. металевою фольгою;
- Д. металевою фольгою і папером.

30. Для створення ситуації, наближеної до умов в організмі віруси транспортують в:

- А. розчині трипсину; Б. розчині Хенкса; В. розчині Ерла; Г. дистильованій воді; Д. фізіологічному розчині.

31. Для тривалого збереження вірусовмісний матеріал зберігають:

- А. при кімнатній температурі; Б. при 4-5 °С; В. при – 20°С;
- Г. в ліофілізованому стані; Д. при 35-37 °С.

32. При температурі 4-5 °С вірусну суспензію можна зберігати:

- А. 1-2 дні; Б. один місяць; В. 1-2 роки; Г. багато років; Д. 1 тиждень.

33. При температурі від -20 °С до – 70 °С вірусну суспензію можна зберігати:

- А. 1-2 дні; Б. декілька місяців (залежить від виду вірусу);
- В. 1-2 роки; Г. декілька років (залежить від виду вірусу);
- Д. 1 тиждень.

34. Для найкращого збереження до вірусного матеріалу перед ліофілізацією додають:

- А. желатин; Б. сироватку; В. пептон; Г. молоко; Д. воду.

35. Дезінфекція у вірусологічній лабораторії:

- А. дозволяє вбити всі віруси в патматеріалі;
- Б. дозволяє запобігти розповсюдженню інфекції;
- В. дозволяє належним чином підготувати робоче місце перед проведенням

досліджень;

Г. дозволяє належним чином обробити робоче місце після досліджень;

Д. не є обов'язковим методом роботи.

ТЕМА 6. КУЛЬТИВУВАННЯ ВІРУСІВ

1. *Що таке віроскопія ?*

А. виявлення віріонів вірусів в світловий мікроскоп;

Б. виявлення антигенів вірусів в серологічних реакціях;

В. усі перелічені;

Г. імуноелектроноскопія.

2. *Зазначте мету використання розвинених курячих ембріонів:*

А. усі перелічені;

Б. для одержання гіперімунних сироваток;

В. як тест-об'єкт в реакції нейтралізації;

Г. як тест-об'єкт в реакції гемаглютинації.

3. *Як називається система, в якій клітини, тканини чи органи зберігають життєздатність або властивість розмножуватись in vitro більше 24 годин ?*

А. культура клітин; Б. культура тканин; В. культура органів; Г. субкультура.

4. *Як називається система in vitro, в якій фрагменти тканин, цілі органи або їхні частини зберігають життєздатність, структуру і функції?*

А. культура клітин; Б. культура тканин; В. культура органів; Г. субкультура.

5. *Як називаються клітини, одержані в результаті ферментативної дезагрегації тканин, які живуть і розмножуються in vitro, без утворення тканини ?*

А. культура клітин;

Б. культура тканин;

В. суспензійна культура клітин;

Г. одношарова культура клітин.

6. *Як називаються клітини, одержані в результаті ферментативної дезагрегації тканин, які прикріплюються до субстрату і розмножуються invitro з утворенням моношару (на склі пробірок, флаконів, матриців) ?*

А. одношарова культура клітин;

Б. Субкультура;

В. суспензійна культура клітин;

Г. первинна культура клітин.

7. *Як називаються клітини, одержані безпосередньо з тканин організму шляхом їхньої ферментативної дезагрегації, які живуть і розмножуються in vitro з утворенням моно шару ?*

А. суспензійна культура клітин;

Б. одношарова культура клітин;

В. первинна культура клітин;

Г. субкультура.

8. Як називаються клітини, одержані в результаті ферментативної дезагрегації тканин, які живуть і розмножуються *in vitro* в завислому стані (завдяки постійному перемішуванню живильного середовища) ?

А. суспензійна культура клітин;

Б. одношарова культура клітин;

В. первинна культура клітин;

Г. субкультура.

9. Як називаються клітини *in vitro*, що одержують із первинних культур шляхом пересівів (до 8-10 разів) ?

А. суспензійна культура клітин;

Б. одношарова культура клітин;

В. первинна культура клітин;

Г. субкультура.

10. Як називаються клітини *in vitro*, що одержують із первинних культур шляхом тривалих пересівів (не менше 70 разів із триденними інтервалами), які мають гетероплоїдний набір хромосом, необмежений строк життя та онкогенні властивості ?

А. суспензійна культура клітин;

Б. диплоїдна культура клітин;

В. перещеплювана культура клітин;

Г. субкультура.

11. Як називаються клітини *in vitro*, що одержують із первинних культур шляхом тривалих пересівів, які зберігають каріотип вихідної тканини, мають обмежений строк життя (40-60 пасажів), вільні від контамінантів і позбавлені онкогенних властивостей ?

А. суспензійна культура клітин;

Б. диплоїдна культура клітин;

В. перещеплювана культура клітин;

Г. субкультура

12. Назвіть основні методи лабораторної діагностики вірусних хвороб:

А. експрес-методи;

Б. вірусологічні методи;

В. ретроспективні методи;

Г. усі перелічені.

13. Як називається здатність клітин прикріплюватись до твердого субстрату?

А. адаптація;

Б. адсорбція;

В. адгезія;

Г. контактна інгібіція.

14. Як називається здатність клітин припиняти поділ при дотиканні одна до одної ?

А. адаптація;

Б. адсорбція;

В. адгезія;

Г. контактна інгібіція.

15. Що відбувається у фазі адаптації?

А. прикріплення клітин до скла;

Б. розмноження клітин;

В. формування моношару;

Г. округлення і відривання клітин від скла.

16. Що відбувається у фазу логарифмічного росту?

- А. прикріплення клітин до скла; Б. розмноження клітин;
В. формування моношару; Г. округлення і відривання клітин від скла.

17. Що відбувається в стаціонарну фазу?

- А. прикріплення клітин до скла; Б. розмноження клітин;
В. формування моношару; Г. округлення і відривання клітин від скла.

18. Назвіть вірусологічні методи лабораторної діагностики вірусних хвороб.

- А. Виділення вірусів на чутливих тест-об'єктах;
Б. Ідентифікація вірусу в серологічних реакціях;
В. Виділення вірусу на культурах клітин;
Г. Усі перелічені.

19. Назвіть основну ознаку розмноження вірусу в культурі клітин:

- А. Цитопатогенна дія; Б. Цитопроліферативний ефект;
В. Гемадсорбція, утворення бляшок; Г. Кольорова проба.

20. Як називаються будь-які морфологічні зміни в культурі клітин, що виникають унаслідок репродукції вірусу ?

- А. цитопатогенна дія; Б. цитолітичний ефект;
В. цитопроліферативний ефект; Г. усі перелічені.

21. Як називається здатність онкогенних вірусів стимулювати розмноження заражених клітин ?

- А. цитопатогенна дія; Б. цитолітичний ефект;
В. цитопроліферативний ефект; Г. усі перелічені.

22. Які методи базуються на швидкому виявленні вірусів або його компонентів безпосередньо в патологічному матеріалі:

- А. експрес-методи; Б. вірусологічні методи;
В. серологічні методи; Г. усі перелічені.

23. Назвіть форми прояву цитопатогенної дії вірусу в культурі клітин:

- А. округлення і фрагментація клітин; Б. усі перелічені;
В. кольорова проба; Г. реакція гемадсорбції.

24. Які методи базуються на виявленні антитіл у парних сироватках крові тварин-реконвалесцентів.

- А. експрес-методи; Б. вірусологічні методи;
В. ретроспективні методи; Г. мікроскопічні методи.

25. Як називаються гігантські багатоядерні клітини, що утворюються в зараженій культурі внаслідок злиття плазматичних мембран сусідніх клітин ?

А. бляшки; Б. фокуси трансформації; В. симпласти; Г. тільця-включення.

26. Як називаються в зараженій культурі скупчення з кількох шарів округлих клітин, які під дією онкогенного вірусу втратили властивість контактної інгібіції та набули здатність до необмеженого поділу ?

А. бляшки; Б. фокуси трансформації; В. симпласти; Г. тільця-включення.

27. Як називаються обмежені осередки загиблих під дією вірусу клітин у суцільному моношарі культури ?

А. бляшки; Б. фокуси трансформації; В. симпласти; Г. тільця-включення.

28. Що являють собою тільця-включення, які утворюються в зараженій вірусом культурі клітин ?

А. обмежені осередки загиблих клітин;
Б. фокуси трансформації;
В. місця синтезу вірусних компонентів і складання віріонів потомства;
Г. гігантські багатоядерні клітини.

29. Як називається прикріплення еритроцитів до поверхні культури клітин, що заражена гемаглютинувальним вірусом ?

А. адгезія; Б. гемадсорбція; В. гемаглютинація; Г. гемоліз.

30. Як називається феномен прояву ЦПД у культурі клітин, зараженій двома вірусами: один із них нецитопатогенний, а другий – цитопатогенний, але в даній культурі не розмножується ?

А. інтерференція вірусів; Б. екзальтація вірусів;
В. рекомбінація вірусів; Г. комплементация вірусів.

31. На якому явищі базується метод індикації в культурі клітин нецитопатогенного вірусу шляхом спільного культивування його з цитопатогенним збудником, репродукція якого гальмується (ЦПД не проявляється) ?

А. інтерференція вірусів; Б. екзальтація вірусів;
В. рекомбінація вірусів; Г. комплементация вірусів.

ТЕМА 7. ПРОТИВІРУСНИЙ ІМУНІТЕТ

1. Як називається сукупність процесів, спрямованих на захист організму від генетично чужорідних субстанцій і збереження постійності внутрішнього середовища ?

- А. неспецифічна (природна) резистентність; Б. імунологічна реактивність;
В. імунологічний нагляд; Г. імунітет.

2. Як називається імунітет, що виникає внаслідок перехворювання ?

- А. природний; Б. активний; В. постінфекцій; Г. нестерильний (інфекційний).

3. Як називається імунітет, що виникає внаслідок вакцинації ?

- А. штучний; Б. активний; В. стерильний; Г. поствакцинальний.

4. Як називається імунітет, що забезпечується Т-лімфоцитами ?

- А. активний; Б. гуморальний; В. клітинний; Г. секреторний.

5. Яка кардинальна особливість противірусного імунітету ?

- А. захист клітин від вірусної генетичної інформації та пригнічення репродукції вірусу;
Б. нейтралізація антитілами інфекційної активності вірусу;
В. фагоцитоз віріонів і заражених клітин;
Г. комплементозалежний лізис віріонів і заражених клітин;

6. Як називаються вірусні антигени, що спричиняють утворення захисних (віруснейтралізуювальних) антитіл ?

- А. повноцінні; Б. протективні; В. гомологічні; Г. специфічні.

7. Які вірусні антигени мають першочергове значення в противірусному імунітеті ?

- А. поверхневі антигени – білки прикріплення;
Б. поверхневі антигени – білки злиття;
В. антигени серцевини;
Г. геномні білки.

8. Назвіть функції Т-лімфоцитів:

- А. розпізнавання, обробка і презентація антигену;
Б. забезпечення клітинного імунітету і регуляція імунної відповіді;
В. забезпечення гуморального імунітету;
Г. бар'єрна функція (недопущення збудника в кров і лімфу).

9. Назвіть функції В-лімфоцитів:

- А. розпізнавання, обробка і презентація антигену;
Б. забезпечення клітинного імунітету і регуляція імунної відповіді;
В. забезпечення гуморального імунітету;

Г. бар'єрна функція (недопущення збудника в кров і лімфу).

10. Клітини - мішені, які містять на своїй поверхні чужорідні антигени (вірусоспецифічні, пухлинні або чужорідні гістосумісності), розпізнають і лізують:

- | | |
|----------------------------------|------------------------------|
| А. природні кілери (NK-клітини); | Б. цитотоксичні Т-лімфоцити. |
| В. кілери (К-клітини); | Г. Т-ампліфайєри. |

11. Т-клітинну імунну відповідь активізують:

- | | |
|------------------------------|-------------------------------------|
| А. Т-ефектор; | Б. Т-хелпери; |
| В. Т _H 1-клітини; | Г. Т-клітини імунологічної пам'яті. |

12. Які клітини обмежують проліферацію Т- і В-лімфоцитів на різних стадіях імунної відповіді та блокують аутоімунні реакції?

- | | |
|-------------------|--|
| А. Т-ампліфайєри; | Б. Т-хелпери; |
| В. Т-супресори; | Г. Т- і В-клітини імунологічної пам'яті. |

13. Гіперчутливість сповільненого типу обумовлюють:

- | | |
|------------------------------|------------------------------|
| А. Т-ампліфайєри; | Б. Т-хелпери; |
| В. Т _H 1-клітини; | Г. цитотоксичні Т-лімфоцити. |

14. Як називаються білки-імуноглобуліни, що синтезуються в організмі у відповідь на введення антигену і здатні специфічно взаємодіяти з ним?

- | | |
|------------------------|-----------------------|
| А. антитіла; | Б. аутоантитіла; |
| В. нормальні антитіла; | Г. природні антитіла. |

15. Який механізм віруснейтралізувальної дії антитіл ?

- А. зв'язування з вірусними прикріпними білками, внаслідок чого блокується адсорбція віріона на поверхні клітини;
- Б. зв'язування з вірусними білками злиття, внаслідок чого блокується проникнення вірусу в клітини;
- В. комплементозалежний лізис складно організованих вірусів і заражених клітин із локалізованими на плазмолемі вірусними антигенами;
- Г. усі перелічені.

16. Назвіть механізм неспецифічної віруснейтралізувальної дії інгібіторів:

- А. зв'язування з вірусними прикріпними білками, внаслідок чого блокується адсорбція віріона на поверхні клітини;
- Б. зв'язування з вірусними білками злиття, внаслідок чого блокується проникнення вірусу в клітину;
- В. опсонізація та аглютинація віріонів, що сприяє фагоцитозу;
- Г. усі перелічені.

17. Яка роль комплексу в протівірусному імунітеті?

- А. посилення віруснейтралізуючої активності антитіл завдяки утворенню великих імунних комплексів;
- Б. лізис складно організованих вірусів;
- В. антитілозалежний лізис складно організованих вірусів і заражених клітин із локалізованими на плазмолемі вірусними антигенами;
- Г. усі перелічені.

18. Назвіть найважливіші індуктори інтерферону:

- А. бактерії та їхні токсини, екстракти з бактерій і грибів;
- Б. лектини (фітогемаглютиніни);
- В. віруси, вірусні дволанцюгові РНК, синтетичні дволанцюгові полірибонуклеотиди;
- Г. усі перелічені.

19. У чому проявляється протівірусна дія інтерферону ?

- А. нейтралізація інфекційної активності позаклітинного вірусу;
- Б. пригнічення внутрішньоклітинних стадій репродукції вірусу;
- В. індукція в незаражених клітинах антивірусного стану;
- Г. усі перелічені.

20. У чому проявляється антивірусний стан клітин, який зумовлюють ферменти протеїназа і синтетаза, що синтезуються в незаражених клітинах під дією інтерферону ?

- А. блокування адсорбції, проникнення і депротейнізації вірусу;
- Б. блокування транскрипції та реплікації вірусного геному;
- В. блокування трансляції вірусних іРНК та їхнє руйнування;
- Г. блокування складання віріонів потомства і виходу їх із клітини.

21. У чому проявляється антипроліферативна активність інтерферону ?

- А. індукція в незаражених клітинах антивірусного стану;
- Б. усі перелічені;
- В. вплив на диференціацію клітин, пригнічення розмноження клітин;
- Г. блокування транскрипції та реплікації вірусного геному.

22. У чому проявляється імуномодулювальна дія інтерферону ?

- А. стимуляція антиген презентабельної функції макрофагів, цитотоксичної активності макрофагів, Т-лімфоцитів і природніх кілків;
- Б. індукція експресії антигенів головного комплексу гістосумісності;
- В. імунодепресивна дія;
- Г. усі перелічені.

23. Як називається порушення імунологічної реактивності організму, пов'язане з дефектами клітинної та (або) гуморальної ланок імунної системи?

- А. аутоімунні реакції;
- Б. імунокомплексна патологія;

Г. імунологічна толерантність.

24. Як називається надмірне утворення імунних комплексів та відкладення їх у тканинах зараженого організму?

A. аутоімунні реакції;

Б. імунокомплексна патологія;

В. алергія;

Г. імунологічна реактивність.

25. Як називається поява в організмі антитіл або сенсibiliзованих лімфоцитів проти власних антигенів, змінених під дією вірусів ?

A. аутоімунні реакції;

Б. імунокомплексна патологія;

В. алергія;

Г. імунологічна реактивність.

26. З якою метою використовують серологічні реакції в лабораторній діагностиці вірусних хвороб ?

А. для ідентифікації вірусу, виділеного на чутливих лабораторних об'єктах;

Б. для ретроспективної діагностики;

В. для експрес-діагностики;

Г. усі перелічені.

27. Який профілактичний захід відноситься до спеціальних ?

А. проведення дезінфекцій;

Б. вакцинація;

В. наявність на фермах ізолятору і карантину;

Г. усі перелічені.

28. Доза вірусу необхідна для утворення однієї бляшки в культурі клітин називають:

1. BTO;

2. ΓΑΟ;

3. БТО;

4. ЕД₅₀.

ТЕМА 8. ПРИНЦИПИ РОБОТИ З ВІРУСАМИ ТА МЕТОДИ ЇХ ДОСЛІДЖЕННЯ

1. Вірусологічна лабораторія повинна мати такі приміщення:

А. автоклавну і бокс;

Б. бокс і передбокснік;

В. віварій, прийомну, передбоксник, бокс, автоклавну, мийну;

Г. віварій, передбоксник, бокс, автоклавну;

Д. прийомну і бокс.

2. Для забезпечення нормальної роботи в стерилізаційній кімнаті вірусологічної лабораторії необхідно мати:

А. автоклав, 1 сушильну шафу;

Б. 1 сушильну шафу, водонагрівач;

В. 2 автоклава, декілька сушильних шаф;

Г. дистилятор, термостат;

Д. 2 автоклава, термостат.

3. Спецодягом для проведення вірусологічних досліджень є:

- А. халат, шапочка;
- Б. халат, шапочка, рукавиці, бахіли, захисні окуляри, маска, спецвзуття;
- В. спецодяг і спецвзуття;
- Г. халат, маска, шапочка, спецвзуття;
- Д. спецвзуття, окуляри.

4. При транспортуванні вірусовмісного матеріалу упаковка складається з:

- А. первинної ємкості в контейнері;
- Б. первинної ємкості з поглинаючим матеріалом в пластиковому мішку;
- В. первинної ємкості в контейнері з охолоджуючим матеріалом;
- Г. первинної ємкості, внутрішньої упаковки, контейнеру з охолоджуючим матеріалом;
- Д. пластикового пакету в термосі.

5. При транспортуванні вірусовмісного матеріалу необхідно помістити їх в умови, які:

- А. уповільнюють процес інактивації вірусу;
- Б. прискорюють процес інактивації вірусу;
- В. призводять до остаточного зникнення вірусу з патматеріалу;
- Г. уповільнюють процеси інактивації вірусу та розвитку супутньої мікрофлори;
- Д. прискорюють розвиток супутньої мікрофлори.

6. При відборі вірусовмісного патматеріалу в нього можуть потрапити:

- А. різноманітні патогенні бактерії;
- Б. сапрофітні гриби;
- В. різні віруси;
- Г. сапрофітні бактерії та гриби;
- Д. патогенні актиноміцети.

7. Виявлення сторонньої мікрофлори в патматеріалі проводиться:

- А. для перевірки ефективності дії антибіотиків;
- Б. для культивування вірусу;
- В. для вирощування культури клітин;
- Г. для перевірки ефективності центрифугування;
- Д. для розведення патматеріалу;

8. Наявність блискучих, слизуватих колоній на м'ясо-пептонному агарі свідчить про наявність в патматеріалі:

- А. грибів;
- Б. вірусів;
- В. бактерій;
- Г. актиноміцетів;
- Д. рикетсій.

9. Наявність шорохуватих, опушених колоній на агарі Сабуро або Чапека свідчить про наявність в патматеріалі:

- А. грибів;
- Б. вірусів;
- В. бактерій;
- Г. актиноміцетів;
- Д. мікоплазм.

10. Наявність на твердому середовищі дрібних колоній, які нагадують “яєшню” свідчить про те, що в патматеріалі залишились:

А. грибів; Б. вірусів; В. бактерій; Г. актиноміцетів; Д. мікоплазм.

11. Інактивації вірусів в патматеріалі не спостерігається при додавання:

А. білка; Б. сироватки крові; В. знежиреного молока; Г. желатини; Д. розчину Хенкса.

12. Висів вірусовмісного патматеріалу із сторонньою мікрофлорою:

А. призведе до інтенсивного розвитку вірусу;
Б. не дасть можливості виділити вірус;
В. призведе до інтенсивного розвитку бактерій, грибів та вірусу;
Г. призведе до відсутності розвитку будь-якого мікроорганізму;
Д. призведе до інтенсивного розвитку культури клітин.

13. Діагноз на вірусне захворювання ставиться на основі аналізу:

А. тільки клінічних ознак;
Б. тільки лабораторного діагнозу;
В. клінічних ознак та лабораторної діагностики;
Г. даних долабораторної та лабораторної діагностики;
Д. епізоотичної ситуації в господарстві.

14. При постановці первинного діагнозу необхідно звертати увагу на:

А. клінічні симптоми, патанатомічні зміни і результати мікроскопічних досліджень;
Б. клінічні симптоми, патанатомічні зміни і епізоотичну ситуацію;
В. клінічні симптоми, епізоотичну ситуацію та дані по культивуванню вірусу;
Г. результати мікроскопічних та вірусологічних досліджень;
Д. клінічні симптоми.

15. Помилка в попередньому діагнозі в випадку вірусної хвороби призводить до:

А. значних економічних збитків і швидкої ліквідації хвороби;
Б. значних економічних збитків;
В. швидкого знищення вогнища хвороби;
Г. значних економічних збитків, розповсюдження хвороби та ускладнення ліквідації наслідків;
Д. розповсюдження хвороби.

16. Первинний діагноз допомагає:

А. точно визначити збудника хвороби;

- Б. вибрати метод лабораторних досліджень для ідентифікації збудника;
- В. визначити швидкість розповсюдження хвороби;
- Г. встановити розміри економічних витрат для ліквідації хвороби;
- Д. ліквідувати хворобу.

17. Суть постановки остаточного діагнозу полягає в :

- А. виділенні збудника і визначенні його вірулентності
- Б. виділенні збудника і постановці серологічних реакцій
- В. виділенні збудника і ідентифікації його
- Г. виділенні збудника і розмноженні його
- Д. виділенні збудника і мікроскопії його

18. Вірусовмісний патологічний матеріал пересилають:

- А. поштою;
- Б. залізницею без супровіду спеціаліста;
- В. будь-яким шляхом з відповідними документами в супроводі спеціаліста;
- Г. без відповідних документів в супроводі спеціаліста;
- Д. за допомогою хазяїна хворої тварини.

19. В супровідному документі на вірусовмісний патматеріал вказують:

- А. дату відбору, підпис і прізвище лікаря;
- Б. вид тварини, дату відбору, попередній діагноз;
- В. назву господарства, вид тварини, дату відбору, підпис і прізвище лікаря, епізоотичні дані, заходи по ліквідації хвороби, попередній діагноз;
- Г. назву господарства, вид тварини, дату відбору, заходи по ліквідації хвороби.

20. Будь-який вірусовмісний патологічний матеріал відбирається в:

- А. порожній стерильний посуд;
- Б. стерильний посуд з поживним середовищем;
- В. нестерильний посуд із стабілізатором;
- Г. стерильний посуд з розчином антибіотиків;
- Д. нестерильний посуд.

21. При відборі патматеріалу в скляну пробірку або флакон етикетка робиться з:

- А. лейкопластирю; Б. паперу; В. картону; Г. фанери; Д. не потрібна.

22. При використанні гліцерину для консервації патматеріалу необхідно:

- А. вказати це на етикетці;
- Б. переслати мазки-відбитки разом з патматеріалом;
- В. додавати значну кількість антибіотиків в патматеріал;
- Г. вказати це в супровідному документі;
- Д. додати додаткову кількість розчину Хенкса в патматеріал.

23. Для транспортування змивів з носоглотки, прямої кишки та клоаки птиці не використовують:

- А. розчин Хенксу із стабілізатором;
- Б. середовища для культур клітин з антибіотиками;
- В. дистильовану воду з антибіотиками;
- Г. середовище Ігла з антибіотиками та 0,5% желатиною;
- Д. середовище Ігла.

24. До відібраного патматеріалу додають слідуючі антибіотики:

- А. тільки пеніцилін;
- Б. тільки ністатин;
- В. пеніцилін, стрептоміцин, ністатин;
- Г. пеніцилін, стрептоміцин;
- Д. препарати проти різних груп супутніх мікробів.

25. Для консервації вірусовмісних проб застосовують:

- А. низьку температуру;
- Б. антисептики;
- В. низьку температуру і хімічні консерванти;
- Г. тільки хімічні консерванти;
- Д. іонізуюче випромінювання.

26. Консервація вірусовмісного патматеріалу гліцерином може заважати проведенню:

- А. мікроскопічних досліджень;
- Б. вірусологічних досліджень
- В. серологічних досліджень;
- Г. біопроби;
- Д. гістологічних досліджень

27. Для діагностики вірусних хвороб обов'язково застосовують такі методи:

дослідження:

- 1. мікроскопічні;
- 2. вірусологічні;
- 3. бактеріологічні;
- 4. серологічні;
- 5. біохімічні.

28. Для діагностики вірусних хвороб не завжди застосовують такі методи дослідження:

- А. мікроскопічні;
- Б. вірусологічні;
- В. гістологічні;
- Г. серологічні.

29. Для діагностики вірусних хвороб ніколи не застосовують:

- А. мікроскопічні методи дослідження;
- Б. вірусологічні методи дослідження;
- В. бактеріологічні методи дослідження;
- Г. серологічні методи дослідження;
- Д. біохімічні методи дослідження.

30. Найуживанішими експрес-методами у вірусології є:

- А. світлова мікроскопія;
- Б. люмінесцентна мікроскопія;

- В. біопроба; Г. імуноферментний аналіз;
Д. постановка серологічних реакцій.

31. При респіраторних інфекціях максимальна кількість вірусу міститься в:

- А. змивах з носоглотки, зіскобах трахеї, шматках легень;
Б. змивах з носоглотки, головному мозку;
В. калі, шматках легень;
Г. крові, зіскобах трахеї, мазках з носа;
Д. спинному мозку.

32. При ентеровірусних інфекціях максимальна кількість вірусу міститься:

- А. в крові та слизових оболонках кишечника;
Б. в селезінці та нирках;
В. в легенях та в крові;
Г. в калі, вмісті ШКТ, слизових оболонках кишечника;
Д. в слині та спинному мозку.

33. При нейротропних інфекціях максимальна кількість вірусу міститься:

- А. в крові;
Б. тільки в шматках головного мозку;
В. тільки в шматках спинного мозку;
Г. в шматках головного та спинного мозку;
Д. в легенях та вмісті шлунково-кишкового тракту.

34. При дермотропних інфекціях максимальна концентрація вірусу буде спостерігатись в:

1. свіжих змивах зі шкіри; 2. крові, лімфовузлах; 3. носових виділеннях;
4. вмісті афт, везікул, пустул; 5. шматках кишечника.

35. Пантропні віруси здатні розмножуватись:

- А. тільки в крові; Б. тільки в нервовій тканині; В. в тканинах різних типів;
Г. в епітелії; Д. в клітинах імунної системи.

36. З якою метою використовують лабораторних тварин у вірусологічній практиці:

- А. первинного виділення вірусів з вірусовмісного матеріалу в чистому вигляді;
Б. для індикації вірусів у матеріалі;
В. з метою ідентифікації вірусів у матеріалі;
Г. усі перелічені.

37. Назвіть вірусологічні методи лабораторної діагностики вірусних хвороб:

- А. виділення вірусів на чутливих тест-об'єктах;
Б. ідентифікація вірусу в серологічних реакціях;
В. виділення вірусу на культурах клітин;

Г. усі перелічені.

38. Який біологічний препарат називають сироваткою ?

- А. препарати, одержані шляхом трансформації геному бактерій, грибів шляхом добудови до нього гену, що кодує синтез антигенної детермінанти вірусу, яка відповідальна за імунітет;
- Б. біологічний препарат, в склад якого входять специфічні імуноглобуліни;
- В. біологічний препарат, який містить комплекс ферментів;
- Г. біопрепарат, що одержаний шляхом виділення антигенних детермінант збудника при допомозі спеціальних методів (використання гідролізу, ультра центрифугування);

39. Реакцію гемаглютинації використовують для:

- А. Визначення титру вірусу в ГАО;
- Б. Для індикації вірусів в патологічному матеріалі;
- В. Для орієнтовної діагностики вірусних інфекцій;
- Г. Усі перелічені;

40. Яка серологічна реакція базується на властивості антитіл блокувати інфекційну активність вірусу ?

- А. РНГА; Б. РЗГА; В. РН; Г. РІФ.

41. Назвіть серологічну реакцію: до суміші вірусу із сироваткою додають еритроцитарний антиген; при утворенні комплексу вірус-антитіло гемаглютинація затримується:

- А. РНГА; Б. РЗГА; В. РЗГАд; Г. РЗНГА.

42. Як проводять фіксацію еритроцитів з метою одержання еритроцитарних діагностиків для РНГА ?

- А. до крові додають гепарин;
- Б. з'єднують рівні об'єми 50% суспензії еритроцитів і 50% розчину формаліну;
- В. змішують рівні об'єми 3% суспензії еритроцитів і розчину таніну (1:20000);
- Г. змішують рівні об'єми 10% суспензії еритроцитів і вірусовмісної культуральної рідини.

43. Яка серологічна реакція базується на здатності антитіл нейтралізувати гемадсорбуючі властивості вірусів ?

- А. РНГА; Б. РЗГА; В. РЗГАд; Г. РНГАд.

44. Негативним фактором при використанні живих вакцин є:

- А. необхідність ревакцинації через 6 місяців;
- Б. великі дози введення;
- В. необхідність використання після приготування вакцини на протязі 2-ох годин;

Г. можливість введення лише парентеральним шляхом.

45. Яка серологічна реакція базується на здатності вірусних антигенів та антитіл дифундувати в агаровому гелі та при взаємодії утворювати лінії або кільця преципітації ?

А. РЗГА; Б. РЗК; В. РДП; Г. РРГ.

46. Яку з речовин використовують в складі вакцини як ад'ювант ?

А. гідроокис алюмінію; Б. їдкий натр; В. оцтова кислот; Г. усі перелічені.

47. Зазначте метод серологічної діагностики вірусних інфекцій.

А. РГА; Б. РН; В. полімеразна ланцюгова реакція; Г. РГАд

48. Як одержують спліт-вакцини ?

А. способом розшифровки антигенних детермінант з послідуєчим їх штучним синтезом;

Б. шляхом використання природних епізоотичних штамів;

В. шляхом руйнування вірусів протеолітичними ферментами з- послідуєчим виділенням і очищенням їх антигенних детермінант;

Г. методом відбору природних малопатогенних штамів.

49. Як одержують живі вакцини ?

А. шляхом пасажування вірусів через тест-об'єкти що не зовсім підходять для їх репродукції;

Б. шляхом впливу на віруси деякими хімічними речовинами;

В. шляхом руйнування вірусів протеолітичними ферментами з послідуєчим виділенням і очищенням їх антигенних детермінант;

Г. усі перелічені.

50. В якій концентрації використовують еритроцити в РЗГА ?

А. 5% ; Б. 1%; В. 0,5%; Г. 2%.

51. Яка серологічна реакція базується на взаємодії вірусних антигенів із міченими флуорохромами антитілами, внаслідок чого виникає світіння при люмінесцентній мікроскопії ?

А. РІФ; Б. ІФА; В. ЗІЕФ; Г. РДП.

52. Яка серологічна реакція базується на взаємодії вірусних антигенів з антитілами міченими ферментом (пероксидазою хрому або лужною фосфатазою), і при додаванні індикаторного субстрату утворюється кольоровий продукт ферментативної реакції?

А. РІФ; Б. ІФА; В. ЗІЕФ; Г. РІА.

53. Які вакцини називають рекомбінантними ?

А. біологічні препарати, які містять слабо вірулентні або ж ослаблені епізоотичні штами збудника;

Б. вакцина, що одержана шляхом виділення антигенних детермінант збудника при допомозі спеціальних методів (використання гідролізу, ультрацентрифугування тощо);

В. препарат в склад якого входять атенуйовані реасортанти або делеційні мутанти;

Г. препарат, який конструюють на основі атенуйованого вірусного вектора – вірусу віспо вакцини, в геном якого вбудовують гени проєктивних білків інших вірусів;

54. Вкажіть рівень рН при якому для більшості вірусів найкраще проходить РГА:

А. 3,0 – 5,5; Б. 7,0 – 7,2; В. 8,0 – 9, 0; Г. 2,0-3,0

49. З перерахованих речовин зазначте ад'юванти:

А. Танін; Б. Ліпосоми; В. Гормони; Г. Кислоти.

55. Здатність вірусу склеювати еритроцити за рахунок білка гемаглютиніну, який входить до складу капсидної або суперкапсидної оболонок вірусів, носить назву:

А.гемаглютинації; Б. гемолізу; В. гемадсорбції; Г. пасивної гемаглютинації.

56. Яка серологічна реакція базується на внесенні в гелове середовище відомого імунного компонента (специфічного вірусного антигену або специфічної сироватки), а в лунки – дослідного, і при утворенні комплексу антиген-антитіло формуються кільця преципітації ?

А. РДП; Б.РІД; В. ІЕФ; Г. РРГ.

57.Встановіть механізм дії противірусного препарату амантадину:

А. є індуктором інтерферону, блокує трансляцію вірусних іРНК та їхнє руйнування;

Б. блокує стадію депротейнізації ортоміксовірусів;

В. блокує трансляцію вірусних іРНК та їхнє руйнування;

Г. є інгібітором зворотної транскриптази ретровірусів;

58. Який механізм дії противірусного препарату від арабіну ?

А. є інгібітором зворотної транскриптази ретровірусів;

Б. є інгібітором вірусної ДНК-полімерази;

В. блокує трансляцію вірусних іРНК та зумовлює їхнє руйнування;

Г. фосфорилується вірусною тимідинкіназою, вбудовується у вірусну ДНК з утворенням дефектних вірусних білків (в т.ч. вірусної ДНК-полімерази).

59.Який механізм дії противірусного препарату інтерферону ?

А. є інгібітором зворотної транскриптази;

Б. активується під дією клітинних кіназ і вірусних фосфотрансфераз з утворенням три фосфату інгібуючи ДНК-полімеразу вірусів;

В. блокує трансляцію вірусних іРНК та їхнє руйнування;

Г. є інгібітором вірусної ДНК-полімерази.

60. Який тип інтерферону продукують фібробласти ?

А. ІФН- γ ; Б. ІФН- β ; В. ІФН- α ; Г. усі перелічені.

61. Який тип інтерферону продукують лейкоцити ?

А. ІФН- γ ; Б. ІФН- β ; В. ІФН- α Г. усі перелічені.

62. Що таке специфічність вірусних антигенів ?

А. здатність антигену взаємодіяти лише з гомологічними антитілами і сенсibilізованими лімфоцитами;

Б. здатність антигену до взаємодії з гетерологічними антитілами і сенсibilізованими лімфоцитами;

В. генетична відмінність антигену від власних білків організму;

Г. усі перелічені.

63. Що розуміють під імуногенністю вірусних антигенів ?

А. здатність антигену взаємодіяти лише з гомологічними антитілами і сенсibilізованими лімфоцитами;

Б. здатність антигену до взаємодії з гетерологічними антитілами і сенсibilізованими лімфоцитами;

В. здатність антигену індукувати синтез специфічних факторів імунітету;

Г. здатність антигену індукувати специфічний захист організму від нього;

64. Який з перерахованих методів не відноситься до серологічних?

А. РЗГА; Б. РДП; В. РГА; Г. РН.

65. Який біологічний препарат називають сироваткою ?

А. препарати, одержані шляхом трансформації геному бактерій, грибів шляхом добудови до нього гену, що кодує синтез антигенної детермінанти вірусу, яка відповідальна за імунітет;

Б. біологічний препарат, в склад якого входять специфічні імуноглобуліни;

В. біологічний препарат, який містить комплекс ферментів;

Г. біопрепарат, що одержаний шляхом виділення антигенних детермінант збудника при допомозі спеціальних методів (використання гідролізу, ультрацентрифугування).

ТЕМА 9. ЗБУДНИКИ ВІРУСНИХ ІНФЕКЦІЙ

1. Геном вірусів родини *Adenoviridae* містить:

А. плюс РНК;

Б. мінус РНК;

В. дволанцюгова ДНК;

Г. одноланцюгова ДНК;

2. Геном вірусів родини *Parvoviridae* містить:

А. плюс РНК;
В. дволанцюгова ДНК;

Б. мінус РНК;
Г. одноланцюгова ДНК.

3. Для культивування аденовірусів використовують:

А. лабораторних тварин;
В. культури клітин;

Б. розвинуті курячі ембріони;
Г. усі перераховані методи.

4. Спричинюють гострі гастроентерити у телят, норок, собак, кішок, людини:

А. парвовіруси; Б. аденовіруси; В. ретровіруси; Г. усі перелічені.

5. Назвіть просто організовані ДНК-вмісні віруси:

А. покс- і герпесвіруси; Б. іридо- та асфарвіруси;

В. гепаднавіруси; Г. адено-, папілома-, поліома-, парво- і цирковіруси.

6. Геном збудника класичної чуми свиней містить:

А. одноланцюгова лінійна РНК (плюс-нитка);

Б. одноланцюгова лінійна РНК (мінус-нитка);

В. дволанцюгова ДНК;

Г. фрагментарна ДНК.

7. Геном збудника африканської чуми свиней містить:

А. одноланцюгова лінійна РНК (плюс-нитка);

Б. одноланцюгова лінійна РНК (мінус-нитка);

В. дволанцюгова ДНК;

Г. фрагментарна ДНК.

8. Збудник класичної чуми свиней належить до:

А. асфарвіруси; Б. флавівіруси; В. герпесвіруси; Г. ретровіруси.

9. Збудник африканської чуми свиней належить до:

А. асфарвіруси; Б. флавівіруси; В. герпесвіруси; Г. ретровіруси.

10. Переносниками яких вірусів є комарі і кліщі.

А. асфарвіруси; Б. флавівіруси; В. герпесвіруси; Г. ретровіруси;

11. У яких вірусів геном представлений дволанцюговою ДНК?

А. покс- і герпесвіруси;

Б. гепадна-, папілома- і поліомавіруси;

В. іридо- та асфарвіруси;

Г. усі перелічені.

12. У яких вірусів геном представлений одноланцюговою ДНК?

А. покс- і герпесвіруси;

Б. гепадна-, папілома- і поліомавіруси;

В. іридо-, асфар- і аденовіруси;

Г. парво- і цирковіруси.

13. Які віруси мають дволанцюгову фрагментовану РНК?

- А. параміксовіруси; Б. ортоміксо-, арена- і буньявіруси;
В. рео- і бірнавіруси; Г. ретровіруси.

14. Які володіють вираженим тропізмом до клітин лімфоретикулярної і гемапоетичної тканини:

- А. параміксовіруси; Б. ортоміксо-, арена- і буньявіруси;
В. рео- і бірнавіруси; Г. ретровіруси.

15. Дві молекули одноланцюгової РНК (плюс-нитки) містить геном:

- А. поксвіруси; Б. герпесвіруси; В. ретровіруси; Г. коронавіруси.

16. Збудник інфекційного бурситу птахів:

- А. поксвіруси; Б. герпесвіруси; В. бірнавіруси; Г. коронавіруси.

17. Двоспиральну сегментовану РНК містять:

- А. бірнавіруси; Б. ретровіруси; В. герпесвіруси; Г. іридовіруси.

18. Яким РНК-вмісним вірусам властивий спіральний тип симетрії?

- А. тога-, флаві- та артерівіруси;
Б. пікорна-, каліци- і нодавіруси;
В. рео-, бірна- і ретровіруси;
Г. корона-, параміксо-, ортоміксо-, рабдо-, борна-, філо-, арена- і буньявіруси.

19. У яких вірусів дволанцюгова ДНК кільцева і надспіралізована та виглядає як міні-хромосома?

- А. поксвіруси; Б. герпесвіруси; В. гепаднавіруси; Г. папілома- і поліомавіруси.

20. Як називається шлях передавання збудника інфекції через покуси кровосисних членистоногих?

- А. контактний; Б. трансмісивний; В. парентеральний; Г. гематогенний;

21. Геном коронавірусів містить:

- А. одноланцюгову РНК плюс-нитку; Б. одноланцюгову РНК мінус-нитку;
В. дволанцюгову ДНК; Г. одноланцюгову ДНК.

22. Збудник інфекційного гастроентериту свиней належить до:

- А. коронавірусів; Б. ортоміксовірусів; В. герпесвірусів; Г. ретровірусів;

23. Антигенний дрейф і антигенний шифт характерний для:

- А. коронавірусів; Б. ортоміксовірусів; В. герпесвірусів; Г. ретровірусів.

24. Геном ортоміксовірусів містить:

- А. одноланцюгову РНК плюс-нитку;

- Б. одноланцюгову фрагментовану РНК мінус-нитку;
- В. дволанцюгову ДНК;
- Г. одноланцюгову ДНК.

25. *Формування нуклеокапсиду ортоміксовірусів відбувається:*

- А. в ядрі; Б. цитоплазмі; В. мітохондріях; Г. ендоплазматичному ретикулін.

26. *Глюкопротеїди двох видів (нейроамінідази і гемаглютиніни) містять:*

- А. бірнавіруси; Б. ортоміксовіруси; В. герпесвіруси; Г. іридовіруси;

27. *Збудники грипу належать до:*

- А. коронавірусів; Б. ортоміксовірусів; В. герпесвірусів; Г. ретровірусів.

28. *Геном рабдовірусів містить:*

- А. одноланцюгову РНК плюс-нитку; Б. одноланцюгову РНК мінус-нитку;
- В. дволанцюгову ДНК; Г. одноланцюгову ДНК.

29. *Збудник сказу належить до родини:*

- А. Poxviridae; Б. Herpesviridae; В. Lissavirus; Г. Rhabdoviridae .

30. *Репродукція рабдовірусів відбувається у:*

- А. цитоплазмі; Б. ядрі; В. мітохондріях; Г. ендоплазматичному ретикулін.

31. *Тільця Бабеша-Негрі утворюються при:*

- А. грипі; Б. сказі; В. віспі; Г. лейкозі.

32. *Тільця Бабеша-Негрі представляють собою:*

- А. «вірусні фабрики»; Б. антигени; В. включення; Г. усі разом.

33. *Геном пікорновірусів містить:*

- А. одноланцюгову РНК плюс-нитку; Б. одноланцюгову РНК мінус-нитку;
- В. дволанцюгову ДНК; Г. одноланцюгову ДНК;

34. *Збудник ящуру належить до родини:*

- А. Poxviridae; Б. Picornaviridae; В. Lissavirus; Г. Rhabdoviridae.

35. *Морфологія збудника сказу:*

- А. сферична; Б. паличкоподібна; В. кулеподібна; Г. Цеглеподібна.

36. *Що таке специфічність вірусних антигенів ?*

- А. здатність антигену взаємодіяти лише з гомологічними антитілами і сенсibilізованими лімфоцитами;
- Б. здатність антигену до взаємодії з гетерологічними антитілами і сенсibilізованими лімфоцитами;
- В. генетична відмінність антигену від власних білків організму;

Г. усі перелічені.

РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Калініна О. С., Панікар І. І., Скибицький В. Г. Ветеринарна вірусологія. Херсон : ОЛДІ-ПЛЮС, 2022. 416 с.
2. Капрельянц Л. В., Єгорова А. В., Труфкаті Л. В. Лабораторний практикум із загальної мікробіології і загальної мікроболігії і вірусології : навчальний посібник. Херсон : ОЛДІ-ПЛЮС, 2021. 136 с.
3. Льотка Г. І., Радзиховський М. Л., Дишкант О. В. Загальна вірусологія основи ветеринарної та зоонотичної вірусології - навч. посіб. Вінниця : друк, 2020. 204 с. Ч. 1.
4. Основи вірусології : навч.-метод. посібник з лаб. практикуму / уклад. І. О. Шмараков, О. В. Кеца. 2-ге вид., перероб. Харків : Мачулін, 2015. 160 с.
5. Практикум з ветеринарної вірусології / В. Г. Скибіцький та ін. Київ : Вища освіта, 2005. 208 с.
6. Калініна О.С., Панікар І.І., Скибіцький В.Г. Ветеринарна вірусологія: Підручник. - К.: Вища освіта, 2004. - 432 с.

СЛОВНИК ВИКОРИСТАНИХ ТЕРМІНІВ

In situ гібридизація – гібридизація фрагмента ДНК (проба, зонд), міченого радіактивно або флюоресцентно з препаратом хромосом, які підготовлені спеціально для подальшого дослідження під мікроскопом. За допомогою методу вдається визначати розташування ділянок, комплементарних пробі.

1 БУО (1 бляшкоутворювальна одиниця) – те найбільше розведення вірусу, яке в культурі клітин здатне утворити 1 бляшку.

Абортивна вірусна інфекція – інфекція, для якої не характерне утворення інфекційних часток, або вони утворюються в значно меншій кількості, ніж при продуктивній вірусній інфекції.

Автономний тип вірусної інфекції – вірусна інфекція, при якій вірусний геном реплікується незалежно від клітинного генома.

Ад'юванти (найчастіше – ад'юванти Фрейнда) – група комплексних сумішей, які містять мінеральні олії (неповні ад'юванти) та завис клітин інактивованих мікроорганізмів (повні ад'юванти). Використовуються з метою тривалої іммобілізації вірусмісного матеріалу у місці введення для вироблення у тварини стійкішого та специфічнішого імунітету.

Антикоагулянти – група речовин, які перешкоджають зсіданню крові.

Антисептика – хімічне та біологічне знешкодження мікроорганізмів і вірусів для запобігання ураженню.

Антисироватка – сироватка, виділена з крові імунізованої тварини, яка містить специфічні антитіла до певного вірусу (антигена).

Асептика – сукупність профілактичних заходів, спрямованих на створення безмікробних умов для запобігання ураженню.

Бактеріофаги – група вірусів, здатних розмножуватися тільки в бактеріальних клітинах.

Біологічної нейтралізації реакція – встановлення інактивуючої дії сироватки на вірус шляхом введення суміші лабораторній тварині.

Бляшка – результат руйнування клітин у місці взаємодії вірусної частинки (в тому числі бактеріофага) з моношаром клітинної культури.

Гостра вірусна інфекція – така форма інфекції, за якої після утворення вірусного постомства клітина або гине, або видужує і не містить вірусних компонентів.

Деканітація – відрізання тварині голови.

Диплоїдні клітинні лінії – клітинні лінії, в яких щонайменше 75% клітин мають каріотип нормальних клітин вихідного типу; трансплантовані хом'ячкам не проявляють онкогенної активності.

Емболія повітряна – один із поширених способів емболії дрібних лабораторних тварин. Полягає у введенні тварині у кровоносні судини повітря, що спричинює закупорку судин у місцях їхнього галуження і робить неможливим подальший рух крові судинами. В результаті це призводить до загибелі тварини протягом 1-5 хв, залежно від її розміру та об'єму введенного повітря.

Ідентифікація вірусу – встановлення таксономічного розташування вірусу.

Імунізація лабораторних тварин – введення вірусовмісного матеріалу тварині (обов'язково за певною схемою з урахуванням методу та часу введення) з метою отримання специфічної антисироватки до відповідного вірусу.

Індикація вірусу – визначення наявності чи відсутності вірусу в досліджуваному матеріалі.

Інокулят – інфекційний вірусвмісний матеріал, який застосовується для ураження (інокуляції).

Інтеграційний тип вірусної інфекції – вірусна інфекція, при якій вірусний геном частково або повністю інтегрується з клітинним геномом та реплікується разом з ним.

Інфекційний титр – така мінімальна концентрація вірусу, яка ще здатна

викликати позитивну реакцію (інфекційну, гемаглютинуючу, серологічну тощо) у 50% тест-об'єктів.

Контамінація – забруднення.

Лізис – розпад клітини, викликаний руйнуванням її оболонки.

Літична інфекція – інфекція, в результаті якої відбувається лізис у клітині.

Пасаж – зараження чутливої тварини з метою отримання від неї нової популяції вірусу. Проводиться з метою підтримання інфекційності вірусу.

Патогенез – зміни клітин, органів, тканин організму під впливом інфекції.

Первинна культура клітин – культура, яка походить від клітин та органів, взятих безпосередньо з організму. Культури називають первинними до початку пасування чи субкультивування.

Переживаючі клітинні культури – органні культури; проліферація яких в умовах *in vitro* досить обмежена або відсутня.

Підтримуючі поживні середовища – середовища, що забезпечують життєдіяльність клітин, але не їхнє розмноження.

Помірні бактеріофаги – бактеріофаги, здатні лізогенізувати клітину та у вигляді профага перебувати всередині бактеріальної хромосоми або в стані плазмід.

Постійна (безперервна, перецелювана) клітинна лінія – клітини одного типу, що здатні субкультивуватися поза організмом протягом необмеженого числа пасажів.

Прижиттєвий патологічний матеріал – патологічний матеріал, одержаний від живої тварини (протягом експерименту).

Продуктивна вірусна інфекція – інфекція, що завершується утворенням інфекційного потомства.

Титр вірусу – кількість вірусу, яка міститься в одиниці об'єму матеріалу.

Тропізм – здатність вірусу реплікуватися в певних типах клітин організму. Віруси, що репродукуються у нервових клітинах, називають

нейротропними, у клітинах шкіри – дерматропними, в клітинах легень та дихальних шляхів – пневмотропними, в клітинах шлунково-кишкового тракту – ентеротропними. Віруси, які здатні реплікуватися в декількох типах клітин, називають політропними, а в усіх типах клітин – пантропними (класифікація вірусів людини та тварин за Хюбнером).

Хронічна вірусна інфекція – така форма вірусної інфекції, коли клітини продовжують продукувати вірусні частки або їхні компоненти протягом тривалого часу і передають цю здатність спадково.

ЦПД (цитопатична дія) – руйнування структури клітин під впливом вірусів.

ЦПД50 – доза вірусу, яка викликає появу цитопатичного ефекту в 50 % заражених клітин у культурі.

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

ПРЕДМЕТНИЙ ПОКАЖЧИК

Алантоїсна порожнина 36
Ампутація пальців 21
Бляшкотвірна одиниця 68
Бокс 9,10
Віварій 20
Віруси 6
Вірус дерматотропний 22
Вірус пантропний 22
Вірус пневмотропний 22
Вірус нейротропний 22
Вірусологічні методи 16
Вірус сказу 101
Віруси віспи 119
Віспотвірна одиниця 68
Гемадсорбція 59
Диплоїдні культури клітин 47
Зараження 26
Знекровлювання тварин 24
Експрес-методи 15
Екзальтація 63
Електронна мікроскопія 63
Ізолятор 20
Індикація 18
Інтерференція 62
Ідентифікація 18
Імуноферментний аналіз 65, 113
Інтеграційна інфекція 56
Кольорова мітка 21
Кольорова проба 62
Курячий ембріон 32
Культури клітин 44
Культура тканин 44
Люмінесценція 133
Метод біркування 21
Метод бляшок 59
Метод Ріда 72
Метод Менча 72
Метод Кербера 74
Метод флуоресціюючих антитіл 136
Моношарові культури клітин 45
Одиниця інфекційної активності 67
Органна культура 44

Перещеплювані культури клітин 47
Продуктивна вірусна інфекція 57
Реакція гемаглютинації 77
Реакція непрямой гемаглютинації 82, 88
Реакція імунофлуоресценції 64
Реакція затримки гемадсорбції 83
Реакція нейтралізації 83, 92
Реакція дифузійної преципітації 101
Ретроспективної діагностика 17
Репродукція вірусів 55
Розвиненого курячого ембріону (РКЕ) 32
Розтин 25
Розчини Хенкса 48
Розчини Ерла 48
Субкультури 47
Сказ 101
Тільця-включення 61
Тільця Бабеша-Негрі 107
Титр вірусу 67
Цикл репродукції вірусів 54
Цитопатогенна дія (ЦПД) 57
Фарбування за Селером 109
Флуорохромовування 64, 134
Флуоресценція 133
Фосфоресценція 133

Робочі середовища та розчини

Середовище Лурія-Бертані

Триптон 10г

Дріжджовий екстракт 5г

NaCl 10г

H₂O 1л***Верхній агар***

Триптон 10г

Дріжджовий екстракт 5г

NaCl 10г

Агар 7г

H₂O 1л***Нижній агар***

Триптон 10г

Дріжджовий екстракт 5г

NaCl 10г

Агар 15г

H₂O 1л***Фосфатний буфер (PBS) 0,1М, рН 7,4***

NaCl 8,0г

KH₂PO₄ 0,2гNa₂HPO₄ х 12H₂O 2,8г

KCl 0,2г

Об'єм розчину доводять до 1л дистильованою водою

Цитратний буфер, 0,1М, рН 3,0 –6,2

Розчин А

0,1М розчин лимонної кислоти (М.м. 192,1) 19,21 г/л

(якщо використовують моногідрат лимонної кислоти (М.м 210,14), то 21,01 г/л)

Розчин В

0,1М розчин дигідрат тринатрієвої солі (М.м. 294,12) 29,41г/л

Змішати розчини А та В у співвідношенні згідно таблиці та довести дистильованою водою до 100мл.

Натрій-карбонат-бікарбонатний буфер, 0,05М, рН 9,6

0,015М Na₂CO₃ 1,59г

0,035М NaHCO₃ 2,93г

H₂O до 1л

Тріс-НСІ буфер, 0,05 М, рН 8,0

Тріс – 6,057 г розчиняють в дистильованій воді і доводять рН розчину до 8,0, додаючи 5М НСІ. Доводять об'єм розчину до 1 л дистильованою водою.

Сульфат амонія, насичений розчин

(NH₄)₂SO₄ 190г

H₂O до 250мл

Сольовий розчин Ерла

У 1000мл дистильованої H₂O послідовно розчиняють:

NaCl 6,8г

KCl 0,4г

CaCl₂ x 6H₂O 0,39г

MgSO₄ x 7H₂O 0,1г

Na₂HPO₄ x 12H₂O 0,125г

Глюкоза 1,0г

Феноловий червоний 0,4%-ний 5,0мл

Стерилізують в автоклаві 15 хвилин при 1300 С, величину рН регулюють додаванням NaHCO₃ перед використанням розчину

Середовище з гідролізатом на розчині Хенкса

Середовище складається з сольового розчину Хенкса, до якого додають гідролізат лактальбуміну або казеїну.

Сольовий розчин Хенкса:

NaCl 8,0г

KCl 0,4г

CaCl₂ x 6H₂O 0,276г

MgSO₄ x 7H₂O 0,2г

KH₂PO₄ 0,06г

Na₂HPO₄ x 12H₂O 0,153г

Глюкоза 1,0г

Феноловий червоний 0,012г

H₂O 1л

До сольового розчину додають 5г гідролізату лактальбуміну або казеїну, а

потім фільтрують через потрійний складчатий фільтр і стерилізують протягом

15 хвилин в автоклаві при 115°C.

Середовище Ігла

А) Амінокислоти, мг/л:

L – аргінін-HCl - 17,5

L -цистин- 12,0

L – гістидин-HCl - 8,0

L – ізолейцин 26,0

L -лейцин - 26,0

L – лізин-HCl – 29,0

L - метионін – 8,0

L - фенілаланін – 17.0

L - треонін - 24,0

L - триптафан - 4,0

L - тирозин - 18,0

L - валін - 23,0

Спочатку в 100 мл води з додаванням кількох краплин концентрованої соляної кислоти розчиняють L –цистин та L – тирозин, а потім додають інші амінокислоти

В) Вітаміни, мг/л:

біотин 1,0

холін 1,0

холін-хлориду 1,0

фолієва кислота 1,0

пантотенат кальція 1,8

піридоксин 1,0

піридоксаль 1,0

тіамін 1,0

нікотінамід 1,0

нікотінова кислота 1,0

рибофлавін 0,4

Біотин, фолієву кислоту і холінхлорид розчиняють в 50 мл води при додаванні

0,1мл 0,1М NaOH. В інших 50 мл води розчиняють решту речовин. Потім два

розчини зливають.

С) Солі та інші речовини, г/л

NaCl 6,8

KCl 0,4

CaCl₂ x 6H₂O 0,1

MgSO₄ x 7H₂O 0,1

KH₂PO₄ 0,4

Na₂HPO₄ x 12H₂O 0,4

MgCl₂ x 6H₂O 0,05

Fe(NO₃)₃ 0,001

Глюкоза 1,0

Феноловий червоний 0,005

L-глутамін 0,15

Солі розчиняють в заданій послідовності в 700мл дистильованої води.

Розчини А, В, С змішують і доводять водою до 1000мл і піддають стерильній фільтрації

ВІДОМОСТІ ПРО АВТОРКУ



СУПРОВИЧ Тетяна Михайлівна, докторка
сільськогосподарських наук, професорка,
завідувачка кафедри гігієни тварин та ветеринарного
забезпечення кінологічної служби
Національної поліції України
Закладу вищої освіти
«Подільський державний університет»

Навчальне видання

Тетяна СУПРОВИЧ

**ЛАБОРАТОРНИЙ ПРАКТИКУМ З ДИСЦИПЛІНИ
«ВЕТЕРИНАРНА ВІРУСОЛОГІЯ»**

Навчальний посібник

(для здобувачів освітнього ступеню «магістр» спеціальності

211 «Ветеринарна медицина»)

Підписано до друку _____ р. Формат 30 × 42/4. (60×90/ Папір
офсетний. Ризографія. Авт. арк. 12. Обл.–вид. арк. _____. У.д.а.____ Тираж 16
прим. Зам._____.

Підготовлено до друку та видруковано у Закладі вищої освіти «Подільський
державний університет». 32300, Кам'янець-Подільський, вул. Шевченка, 12.