

Київський національний університет імені Тараса Шевченка

ПОЛЩУК В.П., БУДЗАНІВСЬКА І.Г., ШЕВЧЕНКО Т.П.,
АНДРІЙЧУК О.М., КОМПАНЕЦЬ Т.А., КОНДРАТЮК О.А.,
КОРОТЄСВА Г.В., МОЛЧАНЕЦЬ О.В., ХАРИНА А.В., ШЕВЧЕНКО О.В.

ВІРУСОЛОГІЯ

**НАВЧАЛЬНИЙ ПОСІБНИК ДЛЯ ЛАБОРАТОРНИХ
ЗАНЯТЬ**

Навчальний посібник

Київ
ЦП “Компринт”
2017

УДК 578
ББК 28.3
П 50

*Рекомендовано до друку Вченою радою ННЦ
“Інститут біології та медицини”
Київського національного університету імені Тараса Шевченка
(протокол №2 від 16.06.2017 р.)*

Рецензенти:

Щербінська А.М. – д.мед.н., проф., засл. діяч науки і техніки України, зав. лабораторії вірусології ДУ «Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В. Громашевського НАМН України», м. Київ;

Загородня С.Д. – к.б.н., завідувач відділу репродукції вірусів Інституту мікробіології та вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, м. Київ.

П 50 Вірусологія. Навчальний посібник для лабораторних занять / В.П. Поліщук, І.Г. Будзанівська, Т.П. Шевченко, О.М. Андрійчук, Т.А. Компанець, О.А. Кондратюк, Г.В. Коротєєва, О.В. Молчанець, А.В. Харіна, О.В. Шевченко. – К.: ЦП «Компринт», 2017. – 242 с.

ISBN 978-966-929-671-9

Посібник складається з 12 розділів, у яких подано загальні відомості про методи роботи з вірусами людини і тварин, вірусами рослин і бактерій. Детально розглянуто сучасні методи діагностики, виділення, очищення та концентрування вірусів. Значну увагу приділено молекулярно-біологічним методам дослідження вірусів.

Посібник рекомендований для студентів біологічних факультетів університетів, може бути корисний як студентам-біологам, так і вірусологам загальнобіологічного, медичного, ветеринарного та аграрного профілів.

УДК 578
ББК 28.3

ISBN 978-966-929-671-9

© В.П. Поліщук, 2017

Зміст

Передмова (Поліщук В.П.)	7
Тема 1. Організація вірусологічних лабораторій (Андрійчук О.М., Компанець Т.А.)	8
Класифікація вірусів за ступенем біологічної небезпеки	9
Типи вірусологічних лабораторій	11
Принципи організації та завдання вірусологічних лабораторій	14
Обладнання вірусологічних лабораторій	16
Дезінфекція та стерилізація у вірусологічних лабораторіях	22
Джерела, причини та шляхи зараження персоналу вірусологічних лабораторій	26
Правила роботи в базових вірусологічних лабораторіях	28
Особливості роботи в режимних лабораторіях	29
Правила роботи в лабораторіях особливого режиму	30
Практична робота	31
Контрольні запитання та завдання	31
Література	32
Тема 2. Використання лабораторних тварин у вірусологічних дослідженнях (Коротєєва Г.В., Молчанець О.В., Шевченко О.В.)	33
Цілі використання лабораторних тварин у вірусології	33
Переваги та недоліки застосування лабораторних тварин	36
Види лабораторних тварин	37
Загальні етичні вимоги до використання хребетних тварин (концепція 3R)	42
Основні правила утримання тварин та догляду за ними	43
Етапи роботи з тваринами при виконанні вірусологічного експерименту	45
Застережні заходи при роботі з інфікованими лабораторними тваринами	72
Практична робота №1	74
Практична робота №2	74
Контрольні завдання	75
Контрольні запитання	76
Література	77
Тема 3. Курячі ембріони та їх використання у вірусології (Коротєєва Г.В., Молчанець О.В.)	78
Будова курячого ембріону	79
Методи зараження курячих ембріонів	80
Ознаки розмноження вірусу в курячому ембріоні	87
Розтин курячого ембріону та отримання вірусовмісного препарату	87
Практична робота	90
Контрольні завдання	90

Контрольні запитання	90
Література	91
Тема 4. Клітинні культури у вірусології (Коротєєва Г.В., Компанець Т.А.)	92
Умови культивування клітин <i>in vitro</i>	92
Поживні середовища	95
Класифікація тваринних культур клітин	97
Одношарові культури клітин	98
Суспензійні культури клітин	107
Морфологічні категорії клітин в культурі	107
Зберігання культур клітин	108
Контамінація культур клітин	109
Взаємодія вірусів із клітинами	110
Цитопатична дія	114
Практична робота	122
Контрольні завдання	122
Контрольні запитання	122
Література	123
Тема 5. Титрування вірусів людини та тварин (Коротєєва Г.В., Молчанець О.В.)	124
Титрування вірусів за інфекційною дією зі статистично оцінюваним ефектом	124
Визначення титру вірусу за інфекційною дією, що оцінюється за одиничним ефектом	126
Реакція гемаглютинації	127
Практична робота	132
Контрольні завдання	132
Контрольні запитання	132
Література	133
Тема 6. Віруси рослин (Кондратюк О.А., Шевченко Т.П.)	134
Особливості взаємодії вірусів рослин з рослинною клітиною	134
Транспорт та шляхи передачі вірусів рослин	135
Вплив вірусної інфекції на ріст та розвиток рослинного організму	137
Рослини-індикатори	140
Практична робота	143
Контрольні завдання	143
Контрольні запитання	143
Література	144
Тема 7. Виділення, очистка та концентрування вірусів рослин (Кондратюк О.А., Шевченко Т.П.)	145
Виділення та освітлення вірусів рослин	145
Методи концентрування та очистки вірусів рослин	147

Практична робота	148
Контрольні завдання	148
Контрольні запитання	148
Література	149
Тема 8. Віруси бактерій (Харіна А.В.)	150
Виділення бактеріофагів з довкілля	151
Методи титрування бактеріофагів	153
Життєвий цикл бактеріофагів	155
Життєвий цикл вірулентних бактеріофагів	156
Життєвий цикл лізогенних бактеріофагів	160
Практична робота №1	164
Практична робота №2	165
Практична робота №3	166
Практична робота №4	168
Контрольні завдання	169
Контрольні запитання	169
Література	170
Тема 9. Використання електронної мікроскопії у вірусологічних дослідженнях (Будзанівська І.Г.)	171
Методи контрастування препаратів вірусів	176
Метод ультратонких зрізів	179
Кріо-електронна мікроскопія	180
Практична робота №1	183
Практична робота №2	184
Контрольні завдання	184
Контрольні запитання	184
Література	185
Тема 10. Ідентифікація вірусів та діагностика вірусних інфекцій (Молчанець О.В.)	186
Серологічні методи дослідження	189
Практична робота	204
Контрольні завдання	205
Контрольні запитання	205
Література	205
Тема 11. Молекулярні методи дослідження вірусів (Будзанівська І.Г., Поліщук В.П.)	207
Рестрикційний аналіз	208
ДНК-чіпи	212
Контрольні завдання	213
Контрольні запитання	214
Література	214

Тема 12. Застосування полімеразної ланцюгової реакції для індикації та ідентифікації вірусів (Будзанівська І.Г., Поліщук В.П.)	215
Обладнання для ПЛР	220
Параметри температурних циклів	222
Аналіз ДНК, ампліфікованої за допомогою ПЛР	223
ПЛР у реальному часі (Real-time PCR) та її застосування у вірусологічних дослідженнях	224
Шпилько-опосередкована ізотермічна ампліфікація	225
Ампліфікація на основі послідовності нуклеїнової кислоти	226
Практична робота	228
Контрольні завдання	229
Контрольні запитання	230
Література	230
Словник використаних термінів	231
Додаток 1	237
Додаток 2	241

Передмова

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. Такі вузьковідомчі підходи не давали змоги в повному обсязі уявити роль царства *Vira* в еволюції життя на Землі, у горизонтальній передачі генетичної інформації, його участі у формуванні та підтриманні сталості біогеоценозів, а тому значно звужували розуміння природи вірусів, причин їхньої патогенності, закономірностей поширення. Цілком логічною була поява вірусології серед біологічних наук. І тепер, в ранзі біологічної науки, вірусологія базується на величезній кількості фактів, експериментів, гіпотез і теорій, які розроблялися в минулому в її прикладних напрямках.

«Вірусологія. Навчальний посібник для лабораторних занять», який пропонується студентам ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка, задумувався авторами як путівник для студентів у проходженні практичних занять, що повинен органічно доповнити їхнє розуміння вірусології як біологічної науки, основи якої закладаються теоретичним курсом «Вірусологія». Оскільки вірусологія, як і інші біологічні дисципліни, є наукою експериментальною, а теорія без практики є мертвою, завдання цього навчального посібника – дати студентам уявлення про основні навички роботи у вірусологічних лабораторіях, допомогти опанувати ази вірусологічних експериментів, показати експериментальну вірусологію фундаментом вірусології теоретичної.

Посібник складається з 12 розділів, у яких подано загальні відомості про методи роботи з вірусами людини і тварин, вірусами рослин і бактерій. Тут детально розглянуто сучасні методи діагностики, виділення, очищення та концентрування вірусів. Значну увагу приділено молекулярно-біологічним методам дослідження вірусів. Усі практичні роботи, описані в посібнику, входять до щорічного курсу практичних занять і пройшли тривалу апробацію часом.

Посібник рекомендований для студентів біологічних факультетів університетів, може бути корисний як студентам-біологам, так і вірусологам загальнобіологічного, медичного, ветеринарного та аграрного профілів.

Тема 1. ОРГАНІЗАЦІЯ ВІРУСОЛОГІЧНИХ ЛАБОРАТОРІЙ

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 у вірусологічній лабораторії, потрібно строго дотримуватися правил асептики та антисептики.

Асептика – система профілактичних заходів і прийомів, які запобігають потраплянню мікроорганізмів та вірусів із навколишнього середовища в організм людини і досліджуваній матеріал та спрямовані на створення безмікробних умов для запобігання зараженню. Асептика передбачає використання стерильних інструментів і матеріалів, обробку рук, дотримання особливих санітарно-гігієнічних правил і прийомів роботи.

Антисептика – комплекс заходів, спрямованих на хімічне і біологічне знешкодження хвороботворних та інших мікроорганізмів і вірусів, щоб запобігти зараженню при їхньому потрапленні на ушкоджені й неушкоджені ділянки шкіри та слизових оболонок.

Працюючи з вірусомісним 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 багатопрофільні 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.

Таким чином, за ступенем небезпеки для людини збудників вірусних інфекцій розподіляють на чотири групи (ДСП 9.9.5.035.99 «Безпека роботи з мікроорганізмами I-II груп патогенності», «Положення про порядок обліку, зберігання, обігу, відпускання, вивозу та пересилання культур бактерій, вірусів, рикетсій, грибів, найпростіших, мікоплазм, бактерійних токсинів, отрут біологічного походження»):

I група – віруси геморагічних гарячок Ебола та Марбург (родина *Filoviridae*), Ласса, Хунін, Мачупо, Себіа, Гуанаріто (родина *Arenaviridae*), натуральної віспи та віспи мавп (родина *Poxviridae*), вірус В (вірус мавп 1-го типу, родина *Herpesviridae*), вірус Кримсько-Конголезької гарячки (родина *Bunyaviridae*). Це збудники надзвичайно небезпечних інфекцій. Вони мають високий рівень ризику для індивідуума та суспільства, небезпечні для працівників вірусологічних лабораторій. Викликають тяжкі та летальні захворювання з ризиком епідемічного розповсюдження, тому що передаються прямим і непрямим шляхами.

II група – арбовіруси: віруси енцефаломієлітів коней, лісу Семліки, Чикунгунья, О'ньонг-ньонг та ін. (родина *Togaviridae*), віруси комплексу кліщового енцефаліту, японського енцефаліту, жовтої гарячки, Зіка, гепатиту С та ін. (родина *Flaviviridae*), віруси комплексу Каліфорнійського енцефаліту,

москітних гарячок, геморагічних гарячок з нирковим синдромом та ін. (родина *Bunyaviridae*); віруси лімфоцитарного хоріоменінгіту, Такарібе, Пічінде (родина *Arenaviridae*), віруси сказу (дикий штам) та ін. (родина *Rhabdoviridae*), віруси гепатиту В (родина *Hepadnaviridae*), гепатитут D (під *Deltavirus*), ВІЛ, віруси Т-клітинного лейкозу людини (родина *Retroviridae*), вірус ящуру (родина *Picornaviridae*), пріони (збудники повільних нейроінфекцій – підгострих губчатих енцефалопатій). Це – збудники висококонтагіозних епідемічних захворювань з високим рівнем ризику для індивідуума та низьким для суспільства. Вони викликають тяжкі захворювання, але передача збудника від однієї людини до іншої незначна або навіть відсутня.

III група – віруси грипу А, В та С (родина *Orthomyxoviridae*), поліомієліту (вуличні штами), вірус гепатиту А (родина *Picornaviridae*), вірус гепатиту Е (родина *Hepeviridae*), герпесу людини 1-го та 2-го типу, вітряної віспи / оперізуючого лишая, цитомегалії людини, герпесу людини 6-го та 7-го типів (родина *Herpesviridae*). Це – збудники інфекцій з середнім рівнем ризику для індивідуума та обмеженим рівнем ризику для суспільства. Вони можуть викликати захворювання у людей і тварин. У працівників лабораторій можуть виникати серйозні захворювання, але існують ефективні засоби профілактики та лікування. Тому ці віруси серйозної загрози для життя як працівників лабораторій, так і населення взагалі, а також для свійських тварин не мають. Ризик розповсюдження цих збудників інфекцій невеликий.

IV група – збудники вірусних септицемій, менінгітів, ентеритів, пневмоній. Це – аденовіруси, реовіруси, ентеровіруси, пікорнавіруси, коронавіруси, каліцівіруси, віруси парагрипу, епідемічного паротиту, кору, червоної висипки, везикулярного стоматиту, віспи корів, контагіозного молюска та ін. Ці віруси мають низький рівень ризику для індивідуума та суспільства. Цей поділ певною мірою умовний, оскільки внаслідок генетичної мінливості можуть з'являтися штами вірусів з підвищеною вірулентністю.

Обліку у вірусологічних лабораторіях СЕС підлягають такі вірусні захворювання, як вірусні гепатити, поліомієліт, кір, червона висипка, вітряна віспа, епідемічний паротит, сказ, ящур, інфекційний мононуклеоз, лімфоцитарний хоріоменінгіт, кримська та омська геморагічні гарячки, японський комариний енцефаліт, кліщовий весняно-літній енцефаліт та інші. Окрім того, розроблені Правила санітарної охорони території України, що регламентують порядок здійснення загальнодержавних медико-санітарних заходів (організаційних, санітарно-гігієнічних, лікувально-профілактичних та протиепідемічних), спрямованих на запобігання занесенню і розповсюдженню на території України небезпечних вірусних інфекційних хвороб людини, таких, як жовта гарячка, контагіозні вірусні геморагічні гарячки (Ласса, Ебола, хвороба Марбург), малярія та інші небезпечні для людини інфекційні хвороби, які передаються комарами (гарячка денге, Чикунгунья, долини Рифт, Західного Нілу, енцефаломієліти кінські (західний американський і венесуельський), енцефаліти (японський, каліфорнійський, Сент-Луїс, долини Муррея), а також на локалізацію та ліквідацію осередків цих хвороб.

Треба мати на увазі, що нумерація груп вірусів, прийнята в Україні, відрізняється від прийнятої в класифікаціях ВООЗ, США та Японії зворотним

порядком розташування. До I групи в цих класифікаціях відносять віруси найнижчої патогенності.

Згідно з класифікацією груп ризиків патогенів ВООЗ, існує чотири типи чинників інфекцій:

- група ризику 1 (відсутня або низька індивідуальна та суспільна небезпека) включає агенти, що потенційно не є збудниками хвороб людини та тварин;
- група ризику 2 (помірна індивідуальна небезпека та низька суспільна небезпека) включає патогенні збудники, не схильні до швидкого поширення, що здатні зумовлювати захворювання у людини або тварин, які легко лікуються або проти яких існують профілактичні заходи;
- група ризику 3 (високий індивідуальний та низький суспільний ризику зараження) включає патогенні агенти, що зумовлюють серйозні захворювання, однак для них існують ефективні профілактичні та лікувальні заходи;
- група ризику 4 (високі індивідуальний та суспільний ризику зараження) включає патогенні агенти, що зумовлюють масові серйозні захворювання; ефективних профілактичних та лікувальних заходів не існує.

Типи вірусологічних лабораторій

В Україні вірусологічні лабораторії прийнято поділяти на 3 категорії (“Руководство по биологической безопасности в лабораторных условиях”, 1985):

1) Базові лабораторії (основні або загального типу); у зв’язку з конкретними особливостями роботи вони можуть бути обладнані різними захисними засобами та устаткуванням. Це – лабораторії навчальні, служби охорони здоров’я, лікарень, діагностичні лабораторії, університетські лабораторії. В них працюють зі збудниками інфекції III, вірусами рослин та бактерій.

2) Режимні лабораторії (ізолювані) або лабораторії утримання. Це – спеціальні діагностичні лабораторії, де працюють зі збудниками інфекцій II групи.

3) Лабораторії особливого режиму (максимально ізолювані), або лабораторії максимального утримання. Це – лабораторії для роботи з особливо небезпечними патогенними вірусами I групи.

Для різних груп / категорій лабораторних інфекцій Центром з контролю й профілактики захворювань (*The Center for Disease Control and Prevention – CDC*) розроблені практичні керівництва, в яких описане відповідне устаткування для безпечного зберігання біологічного матеріалу, необхідне оснащення й заходи, які повинен виконувати персонал лабораторій. Ці керівництва називаються рівнями біологічної безпеки (*Biosafety level – BSL*). Виділяють чотири рівні, кожний з яких складається з первинних і вторинних бар’єрів і особливостей процедур.

Фактори, які враховують при визначенні груп ризиків збудників, включають оцінку їхньої патогенності та вірулентності, стабільності в довкіллі, коло хазяїв, наявність переносників, стійкість до лікарських та деззасобів, а також способи передачі та контагіозність зумовлюваних ними хвороб. Цій класифікації патогенів за групами ризиків відповідає класифікація

лабораторних приміщень за рівнем біобезпеки. При цьому типи приміщень, як і групи ризиків патогенів, з якими проводиться в них робота за вимогами Міжнародного епізоотичного бюро (МЕБ) та Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ) мають деякі відмінності. Так, вірус ящуру та збудники ряду інших везикулярних хвороб є патогенами групи 3 за ВООЗ, а за систематикою МЕБ вони належать до групи 4. Робота з такими збудниками проводиться в приміщеннях перехідного класу – BSL-3+ за вимогами ВООЗ та 4 – за МЕБ. Відповідно до обох класифікацій приміщень вони підрозділяються на чотири основні класи: BSL-1 – BSL-4.

Лабораторії класу BSL-1 – це стандартні мікробіологічні або вірусологічні лабораторії, які повинні бути забезпечені загально-лабораторним обладнанням та допоміжними пристроями. Робота в приміщеннях такого плану проводиться в спецодезії (халати, костюми), але без залучення засобів додаткового захисту. Дезінфекцію в цих приміщеннях проводять за допомогою стандартних хімічних засобів.

Лабораторії BSL-2, на відміну від BSL-1, мають попереджувальні написи, персонал у них користується засобами індивідуального захисту. Вони також мають бути обладнані шафами біозахисту 1-2 рівнів. Відходи з цих приміщень автоклавуються поза межами лабораторій, дезінфекція проводиться хімічними засобами. Бажано, щоб приміщення цього класу мали контрольовану систему вентиляції. Доступ є обмеженим, а робота і відвідання їх мають документуватися.

Лабораторії BSL-3 – це комплекси приміщень, що мають три основні сегменти, які забезпечують їхнє функціонування: власне лабораторні приміщення та два технічні поверхи. На цокольному поверсі проводять деконтамінацію рідких і щільних відходів лабораторних приміщень, а горище – для вхідної та вихідної деконтамінації і стерилізації повітря. Лабораторні приміщення займають проміжне розташування між технічними поверхами та мають з ними комунікаційні зв'язки. Крім запобіжних особливостей, описаних для BSL-2-приміщень, **BSL-3** мають спецпропускники з кодовим доступом, обов'язковою реєстрацією персоналу при вході, душові кабінки та зони переодягнення з повною зміною одягу на вході до робочої зони. Двері в приміщенні мають цифрові замки та побудовані за шлюзовою системою, яка запобігає викидам з лабораторій та одночасно слугує для розділення різних зон пониженого тиску. Стічні води та тверді відходи підлягають фізичному, а потім хімічному знешкодженню, а повітря – подвійній HEPA-фільтрації. Знезараження відпрацьованих матеріалів автоклавуванням проводять безпосередньо в зоні. Для забезпечення цієї роботи також можуть бути застосовані проточні системи автоклавування. Також у приміщеннях BSL-3 бажано застосовувати систему індивідуальних засобів контролю безпеки (оглядові вікна, камери централізованого спостереження тощо). Лабораторії BSL-3 обладнують також автономними системами життєзабезпечення (насамперед – електрогенераторами).

Лабораторії BSL-4 (максимально ізольовані лабораторії) розташовують у зонах BSL-3 або в окремо розміщених будівлях. Зазначена система передбачає всі вимоги до BSL-3-лабораторії з наявністю окремих засобів підтримання та

систем життєзабезпечення. Приміщення мають також систему комунікацій для використання спеціальних костюмів біозахисту, більш досконалі системи відеоспостереження та автоклавування. Вони відрізняються наявністю двох душових кімнат: звичайної – для миття після повного перевдягання та хімічної – для дезінфекції безпосередньо перед зняттям костюму біозахисту. Система душових обладнана пневматичними та шлюзовими дверима.

Вимоги біобезпеки та біозахисту поширюються і на віварії спеціалізованих лабораторій. Роботи з інтактними та інфікованими тваринами також проводяться у віваріях, що за ступенями біозахисту мають градації від BSL-1 до BSL-4. Ці об'єкти повинні відповідати критеріям патогенності збудників, з якими в них проводять роботи. Віварії залежно від напрямку застосування поділяють на «чисті» (для утримання інтактних тварин) та «брудні» (для інфікованих ссавців, птиці та інших тест-об'єктів). У приміщеннях першого класу захисту утримують умовно інтактних тварини. Ізолятори з високим та максимальним ступенем біозахисту облаштовують у разі необхідності проведення експериментів на великих тваринах (BSL-3-4). Робота на дрібних тваринах, за відсутності приміщень з характерними ознаками BSL-3, може проводитись у мобільних боксах для утримання тварин, де забезпечують ефективний контроль і захист, є системи фільтрації повітря та знезараження гною, а також регульований тиск усередині.

У лабораторіях рівнів BSL-1-4 застосовують хімічні та температурні способи знезараження, а також методи на основі їхніх комбінацій. У лабораторіях BSL-2-4 деконтамінації підлягають усі відходи, в лабораторіях BSL-1 – лише генетично модифіковані похідні. У приміщеннях BSL-1-2 застосовують хімічне та періодичне термічне знезараження, а у BSL-3-4 – здебільшого термічне знезараження (періодичне і постійне). Ефективність хімічної деконтамінації залежить від властивостей інактивуєчої речовини, однорідності суміші та режиму змішування, експозиції, температури. Ефективність термічної деконтамінації залежить від температури, однорідності знезаражуваного матеріалу й експозиції.

Незалежно від того, до якої категорії належить та чи інша лабораторія, проводиться зонування приміщень, тобто групування їх у самостійні зони з однаковими рівнями реально наявних або потенційно можливих професійних ризиків і для розмежування цих зон між собою та ізоляції їх від зовнішнього середовища необхідними бар'єрами. Розподіл приміщень за зонами дає змогу найбільш доцільно проводити їхнє знезараження, цільову санітарну обробку персоналу, обробку використаного спецодягу та інших засобів індивідуального захисту, матеріалів і предметів, що передаються між зонами.

Група приміщень, де проводиться робота з активними вірусами, можливо, у відкритому вигляді безпосередньо на лабораторних столах або в негерметичній апаратурі та приладах, що мають габарити, через які їх неможливо помістити в захисні бокси, розглядається як потенційно «брудна». Ця група формує III зону приміщень і становить ядро сучасних вірусологічних лабораторій.

Приміщення, для яких типова робота з інфекційним матеріалом у герметичній апаратурі, приладах та в захисних боксах, кваліфікують як “умовно брудні”. Вони належать до приміщень II зони.

Окрему групу робочих приміщень у вірусологічних лабораторіях становлять приміщення буферного призначення, які виконують функції препарататорських і обслуговують приміщення зазначених вище зон. У них проводять роботу тільки з неактивними вірусами, лабораторним посудом і реактивами загального користування. Тимчасове перебування в цих приміщеннях біологічно активних матеріалів дозволяється лише в герметичному пакуванні. Вказані приміщення вважаються “чистими” і належать до приміщень I зони.

Крім згаданих вище, у вірусологічних лабораторіях є приміщення звичайного призначення – вестибюлі, гардеробні, адміністративні кабінети, буфети, склади, майстерні, трансформаторні підстанції тощо. Ця група приміщень формує 0 зону лабораторії.

Диференціація приміщень за різними зонами потребує чіткого позначення меж між зонами і створення на цих межах, за винятком входу до 0 зони і виходу з неї, санітарних пропускників для людей, а також встановлення відповідних передавальних пристроїв для матеріалів та апаратури і приладів. Санпропускники призначені для виключення виносу на одязі та тілі людей вірусів при переході персоналу з більш “брудних” приміщень у менш “брудні”. Це досягається переодяганням персоналу, використанням засобів індивідуального захисту, цільовою санітарною обробкою персоналу тощо.

Зважаючи на вказану вище градацію приміщень, санпропускники доцільно розташовувати на межах 0 та I зон (санпропускник I зони), I та II зон (санпропускник II зони), II та III зон (санпропускник III зони).

Зональні санпропускники повинні забезпечувати такі моменти роботи:

- санпропускник I зони: при вході персоналу з 0 зони в I – переодягання в робочий одяг (не в спецодяг!), при виході з I зони – гігієнічний душ для персоналу, заміна робочого одягу на особистий;

- санпропускник II зони: при вході персоналу з I зони в II – заміна робочого одягу I зони на спецодяг, при виході з II зони – цільова санітарна обробка персоналу, заміна спецодягу на робочий, регламентована обробка знятого спецодягу;

- санпропускник III зони: при вході персоналу з II зони в III – доповнення спецодягу II зони пневмокостюмом, при виході з III зони – обробка пневмокостюму безпосередньо на людині під “хімічним душем”, зняття та подальша обробка пневмокостюму, переодягання в спецодяг II зони.

Принципи організації та завдання вірусологічних лабораторій

На початкових етапах становлення як науки вірусологія була частиною бактеріології і тому всі вірусологічні дослідження здійснювались у бактеріологічних лабораторіях. У подальші десятиріччя вірусологія стала самостійною галуззю науки з власними методами досліджень і спеціальними завданнями. Як наслідок цього виникла необхідність організовувати спеціальні

та самостійні вірусологічні лабораторії. Принципи їхньої організації базуються на таких правилах:

по-перше, найважливішою професійною особливістю праці у вірусологічних лабораторіях є ризик зараження працівників патогенними вірусами і захворювання на відповідні інфекційні хвороби;

по-друге, вірусологічна лабораторія, в якій проводиться робота з патогенними вірусами, є також потенційним джерелом зараження осіб, що контактують зі співробітниками лабораторії або перебувають у територіальній близькості до лабораторії;

по-третє, існує ризик виходу патогенного вірусу за межі лабораторії та зараження ним довкілля;

по-четверте, віруси є облігатними (обов'язковими) внутрішньоклітинними паразитами, які поза клітиною існувати не можуть. А це обумовлює роботу з ними в стерильних умовах.

Виходячи з цих правил, основними принципами організації вірусологічних лабораторій є такі:

1. Повна ізоляція вірусологічної лабораторії від інших структурних підрозділів для забезпечення необхідної чистоти та обов'язкової стерильності роботи. А це в свою чергу потрібне: а) для виключення можливості проникнення збудника інфекції в інші приміщення; б) для запобігання контамінації вірусів сторонніми агентами, зокрема бактеріями; в) для безпеки працівників лабораторії, які працюють з інфекційним матеріалом.

2. Оптимальне розташування приміщень, що забезпечує найбільш зручний доступ до апаратури та пристроїв у межах лабораторії; це запобігає зайвому ходінню співробітників і підвищує безпеку роботи.

3. Через певну небезпеку багатьох вірусних інфекцій для людини режим роботи у вірусологічній лабораторії санітарно-епідеміологічний з певними правилами, яких треба обов'язково дотримуватись.

Завдання вірусологічних лабораторій полягають у такому:

1. Встановлення етіології інфекційного захворювання.
2. Індикація та ідентифікація збудників інфекційного захворювання.
3. Лабораторна діагностика вірусних інфекцій.
4. З'ясування ступеню масовості захворювання, тобто встановлення наявності епідемії.

5. Організація та проведення профілактичних заходів для запобігання вірусним захворюванням.

6. Нагляд за результатами профілактичних заходів, тобто контроль стану та напруженості специфічного постінфекційного та поствакцинального противірусного імунітету.

7. Вивчення епідеміологічного взаємозв'язку захворювань з невизначеною вірусною етіологією (наприклад, розсіяний та прогресуючий склероз, атеросклероз, шизофренія, хвороба Паркінсона, червоний вівчак, виразковий коліт, ревматоїдний артрит, цукровий діабет тощо).

Обладнання вірусологічних лабораторій

Крім устаткування та посуду, який використовують у бактеріологічній та хімічній роботі, у вірусологічних лабораторіях обов'язкова наявність спеціального обладнання. Для тривалого зберігання в незмінному стані вірусомісного матеріалу, розчинів, сироваток, вакцин, антигенів тощо необхідно мати холодильні установки з інтервалом температури від $+4^{\circ}\text{C}$ до -170°C . Це камери глибокого та надглибокого заморожування (від -30°C до -170°C), холодильні камери (-20°C), холодильники ($+4^{\circ}\text{C}$), холодильні кімнати з внутрішньою температурою до $+4^{\circ}\text{C}$. Для інкубування курячих ембріонів та культур клітин необхідні термостати (сухоповітряні та водяні). Вірусологічній лабораторії необхідні центрифуги на 1500–3000 об/хв для осадження великих часток подрібненого вірусологічного патологічного матеріалу та трипсинізації тканин. Повна очистка вірусів від баластних речовин та їхня концентрація здійснюється за допомогою високошвидкісних центрифуг на 30 000 об/хв і більше з пристроями для охолодження та створення вакууму в робочій камері.

Для зараження та розтину лабораторних тварин і курячих ембріонів та для відбору вірусомісного матеріалу потрібний набір різних спеціальних інструментів. Це шприци різних розмірів (туберкулінові на 1 мл, Люера на 2, 5, 10, 20 мл), голки, шпатель, скальпелі, пінцети анатомічні та хірургічні, ножиці, корнцанги тощо.

Для подрібнення патологічного матеріалу використовують гомогенізатор тканин, фарфорові ступки з товкачками.

У вірусологічній лабораторії в достатній кількості повинні бути емальовані відра, тази, металеві бікси, бактеріальні фільтри, скляний посуд (бажано з боросилікатного скла); матраси, чашки Карреля, пробірки Лейтона та інший скляний і пластмасовий посуд для вирощування культур клітин, флакони, склянки, колби різного об'єму зі шліфами та без них, круглодонні та плоскодонні, конічні (Ерленмейєра), круглі (Кольрауша), з патрубками (Бунзена – для відсмоктування, Вюрца – для дистиляції), мензурки, бюретки, фарфорові тиглі, чашки Петрі, градуйовані піпетки різного об'єму (1, 2, 5, 10 мл), піпетки Мора, Пастера, мікропіпетки, флакони з пробками, що загвинчуються та притираються, пробірки хімічні, біологічні, серологічні, бактеріологічні, центрифужні, автоматичні (самплери), ампули різних розмірів, ексікатори, лійки, мірні циліндри.

Для постановки серологічних реакцій необхідні полістиролові планшети. У лабораторіях такого типу повинні бути різні терези: хімічні, аналітичні, торсіонні, центрифужні для урівноваження пробірок. Необхідним обладнанням є мікроскопи різних типів: біологічний світловий, біологічний інвертований, біологічний біокулярний, біологічний стереоскопічний, люмінесцентний, електронний.

У лабораторії в достатній кількості мають бути різні металеві та пластмасові штативи для пробірок, гумові пробки з силіконової та звичайної гуми різних розмірів (№№ 11, 12, 14), олівці або чорнило для скла, фільтрувальний папір, лейкопластир тощо.

Значна кількість усього описаного обладнання використовується в стерильному вигляді. Для цього згідно з різними методами обробки інструментарій та посуд піддають чистці, миттю, дезінфекції та стерилізації.

Сучасні вірусологічні лабораторії мають необхідні прилади та устаткування для проведення експрес-діагностики вірусних інфекцій, а саме: імуноферментного аналізу, імунофлуоресцентного аналізу, імуноелектроблотингу, електронної мікроскопії, імуноелектронної мікроскопії, полімеразної ланцюгової реакції.

Структура та обладнання базової вірусологічної лабораторії. Структура вірусологічної лабораторії визначається завданнями та особливостями її діяльності. Проте існує загальний для всіх лабораторій мінімум вимог, без яких неможливе проведення вірусологічних досліджень.

Вірусологічну лабораторію треба розташовувати в місцях, де відсутня вібрація будинку, яка може привести до неспроможності працювати з мікроскопами, оптичними та аналітичними приладами. Не можна розміщувати лабораторію поблизу димових труб, котелень, місць, де можливе забруднення повітря пилом або хімічно активними газами. Це може руйнувати точні прилади, утруднюючи при цьому проведення досліджень.

Вірусологічну лабораторію слід розташовувати у світлому ізольованому приміщенні з окремими входом і виходом.

Площа лабораторії повинна відповідати санітарній нормі – 14 м² всередньому на одного працівника. Приміщення повинні бути достатньо просторими для забезпечення безпечного проведення лабораторних досліджень з шириною проходів до робочих місць 1,5 м.

У структурі базової вірусологічної лабораторії обов'язковими є такі підрозділи: мийна, стерилізаційна та препаратозна кімнати, кімнати для вирощування культур клітин, для серологічних досліджень, віварій. Залежно від умов роботи вірусологічної лабораторії доцільно мати термальні та морозильні кімнати. Мийна кімната площею близько 10 м², з розрахунку 5 м² на одного працівника, повинна мати прилади для миття посуду та прання білизни, раковини з гарячою і холодною водою, столи, газові та електричні плити, сушильні шафи. Посуд та інструментарій, забруднені інфекційним матеріалом, мийуть після знезаражування дезінфекційними речовинами.

У стерилізаційній кімнаті розташовані дистильатор, автоклав, парові стерилізатори, сушильні шафи та інша апаратура для сушіння і стерилізації посуду, інструментарію, одягу, живильних середовищ, води, буферних розчинів. Для кожного парового стерилізатора за правилами техніки безпеки треба відводити площу 7,5 м².

Препаратозна кімната призначена для зберігання посуду, діагностичних препаратів, хімічних реактивів.

Віварій (приміщення для утримання тварин) повинен мати карантинний відділ, кімнати (ізольовані одна від одної з окремими виходами) для здорових та інфікованих тварин з витяжними шафами, для миття та дезінфекції кліток, інвентарю та спецодягу, приготування кормів, комору, кремаційну та інші.

Кімнати, призначені для роботи з вірусами, повинні мати добре природне і штучне освітлення. Вікна повинні виходити на північ або бути зробленими з

матового чи молочного скла через велику чутливість вірусів до сонячного світла. Ці кімнати повинні складатися з двох відділень – боксу площею не менше ніж 9 м^2 та передбокснику площею близько 4 м^2 , розділених скляною перегородкою з розсувними, а не на петлях, дверима, щоб зекономити площу, уникнути коливань повітря та запобігти зайвому потраплянню повітря в бокс. Крім того, використовують настільні бокси Моржицького різних модифікацій розмірами $100 \times 70 \times 80 \text{ см}$ (рис.1.1).

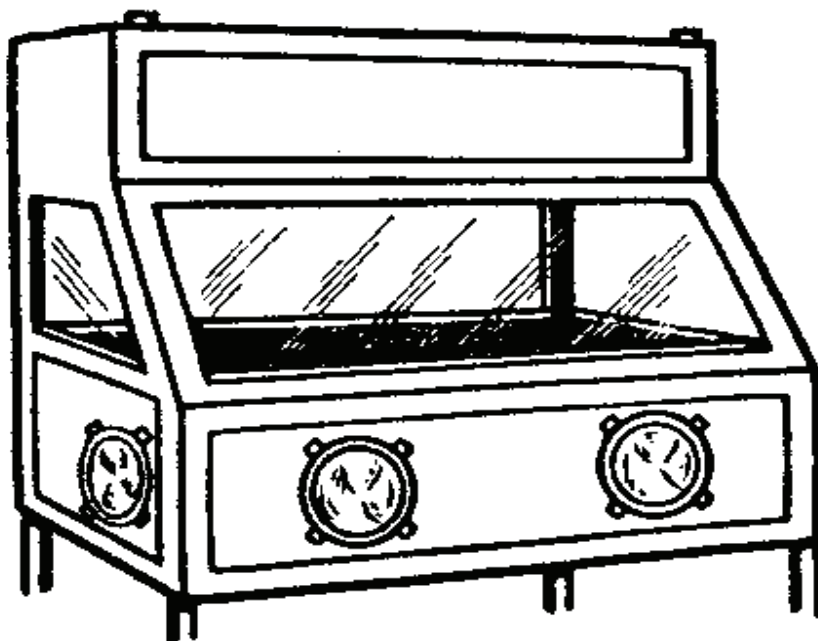


Рис. 1.1. Захисний настільний бокс Моржицького

Вони закриті з усіх боків, мають дверцята для подачі необхідних матеріалів та отвори для рук. Передня стінка боксу застелена. В середині боксу є лампа або кнопка електричного дзвінка для підтримання зв'язку з зовнішнім середовищем у разі створення аварійної ситуації. У верхній частині боксу розташовані бактерицидна та освітлювальна лампи. Для дотримання стерильності роботи в боксах на столах розташовані газові або спиртові пальники.

Сучасні захисні бокси являють собою жорсткі конструкції з нержавіючої сталі, твердих алюмінієвих сплавів, скла та пластиків, призначених для утримання і контрольованого видалення з робочої зони біологічно активних часток, в тому числі й вірусів.

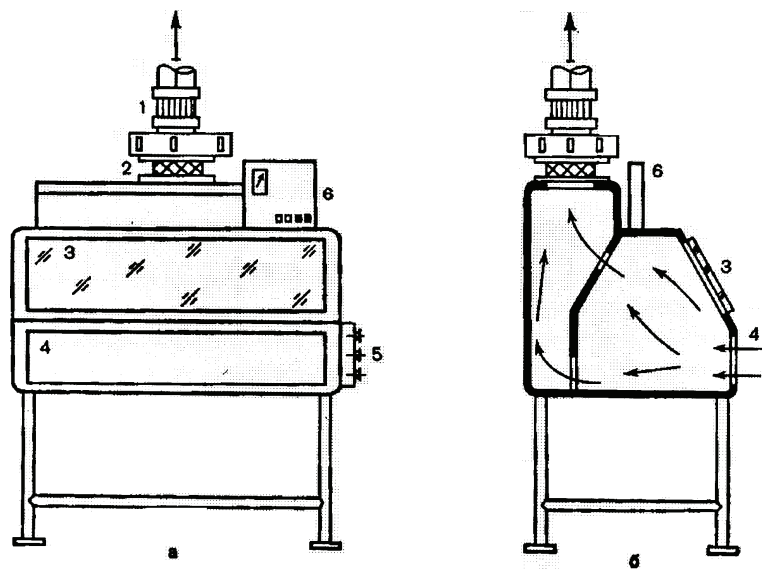


Рис. 1.2. Захисний бокс I класу (Дроздов та ін., 1987):

а – вигляд спереду, б – вигляд збоку; 1 – витяжний вентилятор; 2 – високоефективний повітряний фільтр; 3 – оглядова скляна панель; 4 – відкритий отвір для рук; 5 – штуцери для підведення води, повітря, вакууму тощо; 6 – панель контрольно-вимірювальних приладів. Напрямок руху повітря показаний стрілками.

Розрізняють захисні бокси з частковим утриманням вірусів (згідно з існуючою класифікацією – це бокси I та II класів) та повним утриманням або ізолюючі бокси (за тією ж класифікацією – бокси III класу).

У боксах I класу забруднене повітря всмоктується вентилятором, що встановлений на виході з боксу, і очищається від часток аерозолі, на яких адсорбується вірус, на спеціальному фільтрі. В подальшому очищене повітря виводиться в централізовану витяжну систему будинку. Ці бокси мають відкриті отвори для рук, і їх рекомендується використовувати для роботи з вірусами тільки помірного рівня небезпеки III та IV груп (рис. 1.2).

Бокси II класу являють собою захисні конструкції також з відкритим отвором для рук у передній панелі. Для захисту персоналу і середовища робочих приміщень в таких боксах створюється низхідний вертикальний потік очищеного фільтрацією повітря, струмені якого течуть паралельно, обтікаючи перешкоди рівномірними шарами і створюючи перепону між інфекційним матеріалом та експериментатором. Це – ламінарні бокси, або ламінари, в яких рекомендується працювати зі збудниками II групи (рис. 1.3, 1.4).

Захисні боксы III класу (ізолюючі) є газонепроникними конструкціями, що працюють під зниженим тиском. Забруднене повітря всмоктується вентилятором, фільтрується і виводиться через автономні повітряні системи. Робота здійснюється з використанням герметично закріплених гумових рукавичок. У боксах III класу можна працювати з вірусами будь-якого рівня небезпеки, насамперед I групи (рис. 1.5, 1.6).

У передбоксіках тримають стерильний одяг, у який переодягається дослідник, та розміщують матеріали й обладнання (термостат, холодильник, водяну баню, центрифугу тощо).

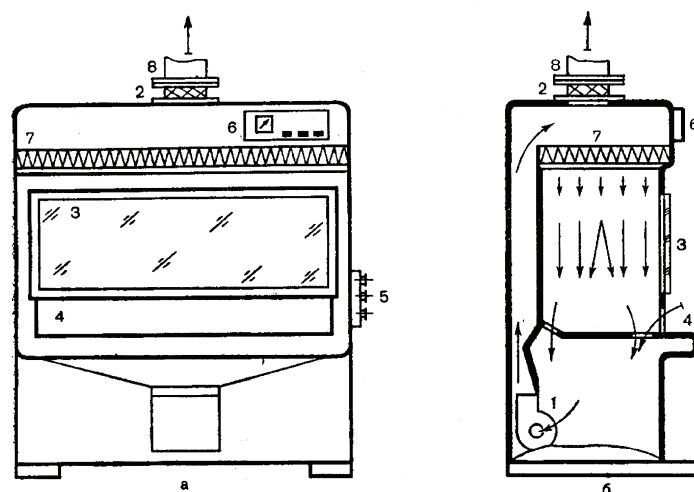


Рис. 1.3. Захисний бокс II класу (Дроздов та ін., 1987):

а – вигляд спереду, б – вигляд збоку; 1 – рециркуляційний вентилятор; 2 – вискоефективний повітряний фільтр; 3 – оглядова скляна рухома панель; 4 – відкритий отвір для рук; 5 – штуцери для підведення води, повітря, вакууму тощо; 6 – панель контрольно-вимірювальних приладів; 7 – розподільувач ламінарного потоку повітря; 8 – повітропровід витяжної вентиляції. Напрямок руху повітря показаний стрілками.

Приміщення вірусологічної лабораторії та меблі мають бути з гладкою поверхнею, такими, що легко миються, непроникні для рідин та оброблюються дезінфікуючими засобами. Стелю і стіни фарбують світлою олійною фарбою або облицьовують на висоту 1,6 м кахельною чи глазурованою плиткою. Підлогу, яка повинна бути неслизькою, вимощують метлахською плиткою, пластиком, лінолеумом або фарбують олійною фарбою. Труби (водопровід, газ, вакуум тощо) повинні бути віддаленні від стін. Робочі столи згідно з санітарною нормою повинні бути завдовжки 1,5 м і завширшки 60–90 см. Їхня поверхня має бути водонепроникною, стійкою до дезінфікуючих засобів, кислот, лугів, органічних розчинників і до помірного нагрівання. Для цього поверхню покривають склом, пластиком або нержавіючою сталлю.

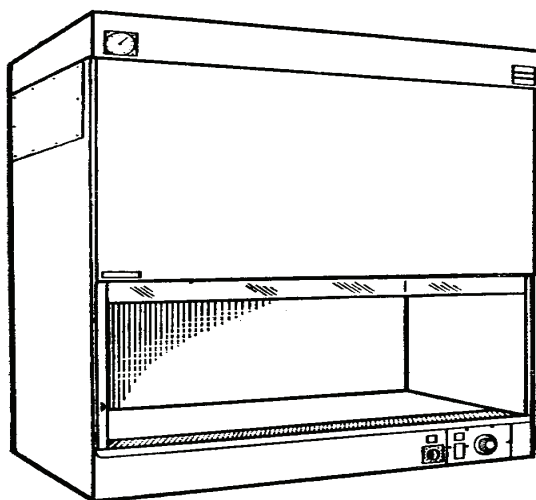


Рис. 1.4. Ламінарний бокс

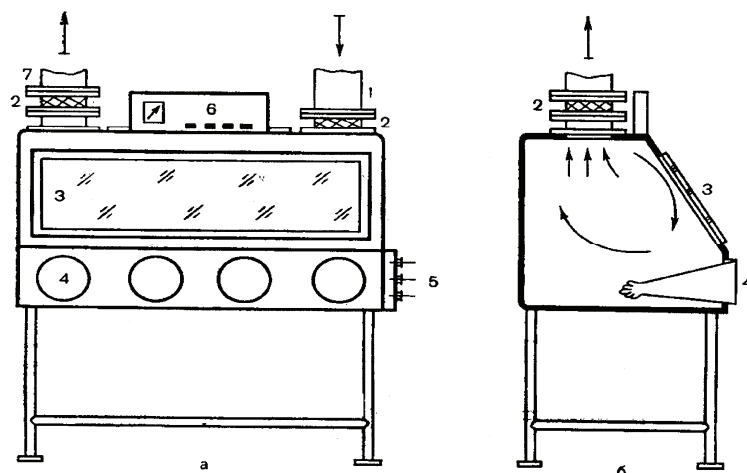


Рис. 1.5. Захисний бокс III класу (Дроздов та ін., 1987):

а – вигляд спереду, б – вигляд збоку; 1 – повітропровід проточної вентиляції; 2 – вискоефективний повітряний фільтр; 3 – оглядова скляна панель; 4 – отвір з рукавичками для рук; 5 – штуцери для підведення води, повітря, вакууму тощо; 6 – панель контрольно-вимірювальних приладів; 7 – повітропровід витяжної вентиляції; Напрямок руху повітря показаний стрілками.

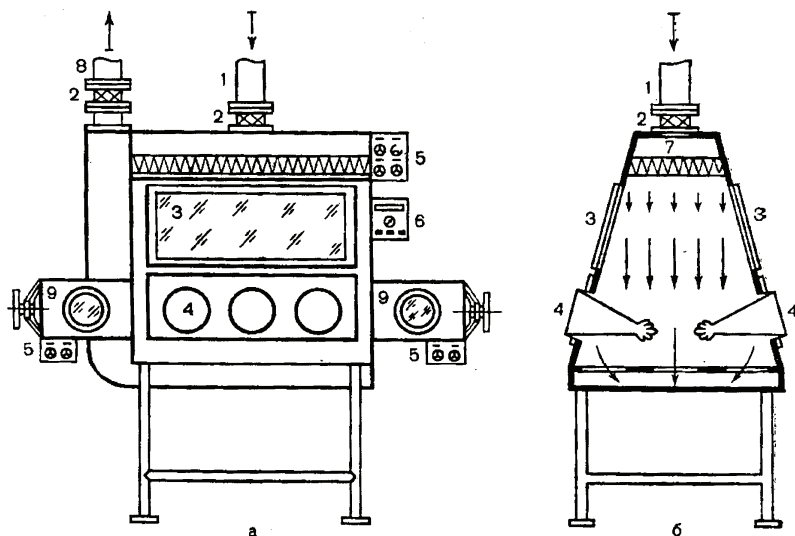


Рис. 1.6. Захисний бокс III класу підвищеної безпеки (Дроздов та ін., 1987):

а – вигляд спереду, б – вигляд збоку; 1 – повітропровід проточної вентиляції; 2 – вискоефективний повітряний фільтр; 3 – оглядові скляні панелі; 4 – отвори з рукавичками для рук; 5 – панелі підведення та регулювальних вентилів для води, повітря, вакууму, хімічних розчинів; 6 – панель контрольно-вимірювальних та електричних приладів, засобів сигналізації; 7 – розподілювач ламінарного потоку повітря; 8 – повітропровід витяжної вентиляції; 9 – передавальний шлюз з оглядовим вікном та герметичним люком. Напрямок руху повітря показаний стрілками.

Лабораторні меблі повинні бути простими за формою, міцними, мати гладку, велику і вільну робочу поверхню для легкої обробки мийними та дезінфікуючими засобами. Їх можна покривати суцільним шаром пластику або силіконовим лаком. Це запобігає проникненню інфекційного матеріалу в деревину або щілини. Меблі можуть бути металевими.

Дезінфекція та стерилізація у вірусологічних лабораторіях

Через те, що робота з вірусами проводиться з дотриманням повної стерильності, використовують різні засоби дезінфекції. Обробку всіх предметів у боксі проводять дезінфікуючими речовинами (дезінфектантами), які поділяються на декілька груп.

1 група – речовини, що містять активний хлор, який справляє окислювальну, а тому бактерицидну дію. Це 0,5-10% водні розчини хлораміну, 10% розчини гіпохлориту натрію та кальцію, пантоцид, 1% розчин дезаму, 0,1-10% хлорне вапно.

2 група – окисники; надкарбонові кислоти, перекис водню (2–6%), ізопропіловий (60%), етиловий (70-80%) та п-пропіловий (оптал 50%) спирти, йодоформ, оксид пропілену.

3 група – феноли, продукти перегонки кам'яновугільної смоли: 3-5% фенол (карболова кислота), 3-10% лізол, крезол (розчин неочищеної карболової кислоти шляхом випарювання), крезолове мило (розчин крезолу в калійному милі), креолін.

4 група – альдегіди: формальдегід (40% водний розчин формаліну), глютаральдегід (1%).

5 група – бетапропіолактон (0,05%). Має велику віруліцидну дію, яка притаманна також йодоформу, етанолу, хлораміну.

Працюючи у вірусологічній лабораторії, треба строго дотримуватися правил асептики та антисептики.

Як антисептики використовують різні хімічні речовини: 70% етиловий спирт, 5% спиртовий розчин йоду, 0,5-3% розчини хлораміну, 0,1% розчин перманганату калію, 0,5-1% розчин формаліну, 1-2% спиртові розчини метиленового синього або брильянтового зеленого.

У лабораторіях для дезінфекції боксів використовують речовини в газоподібному стані, а саме: пари формаліну (30-35 мл 40% водного розчину формальдегіду на 1 м³ повітря), бетапропіолактон (1,1 л на 100 м³ повітря), оксид етилену, оксид пропілену, бромистий метил або випарюють карболову кислоту. За силою антимікробної дії вони утворюють такий ряд: бетапропіолактон > формальдегід > оксид етилену > оксид пропілену > бромистий метил. Аналогічний ряд за проникаючою здатністю в глибину матеріалів має такий вигляд: оксид етилену > оксид пропілену > бетапропіолактон > формальдегід > бромистий метил. Треба мати на увазі, що бетапропіолактон – канцероген, а оксид етилену – мутаген. Переваги такої газової дезінфекції суттєві. Це – можливість обробляти термолабільні матеріали, прилади та обладнання, тому що вона проводиться при незначних підвищених температурах, гази краще проникають у пористі матеріали, ніж рідина;

ефективно знешкоджують мікроорганізми у висушеному стані і не призводять до корозії металоконструкцій. Проте є й недоліки газової дезінфекції, а саме: висока вартість, токсичність і вибухонебезпечність.

Усі вказані вище хімічні сполуки 5 груп порушують структуру амінокислот – найважливіших компонентів мікроорганізмів, а це в свою чергу викликає коагуляцію білків і призводить до загибелі мікроорганізмів.

Стерилізація повітря в боксі та передбокснику до і після роботи, а також поверхонь проводиться за допомогою бактерицидних і кварцових ламп, джерелом енергії в яких є ультрафіолетові промені. Менш придатні до використання клінічні кварцові лампи, які викликають озонізацію повітря. Вона не тільки шкідлива для людей, що будуть у подальшому працювати в цьому приміщенні, але й викликає швидке псування гумових шлангів та інших предметів, які під впливом озону стають крихкими і тріскаються. Крім цього, при ультрафіолетовому опроміненні повітря утворюються й оксиди азоту, які також можуть бути небайдужими для організму людини.

Для знезаражування використовують короткохвильові ультрафіолетові промені (УФ-промені) з довжиною хвилі від $3,28 \cdot 10^{-7}$ до $2,1 \cdot 10^{-7}$ м. Максимальний бактерицидний ефект проявляють промені з довжиною хвилі від $2,4 \cdot 10^{-7}$ до $2,8 \cdot 10^{-7}$ м.

Сучасні ртутно-вакуумні лампи понад 90% своєї енергії випромінюють у вигляді хвиль з довжиною $2,537 \cdot 10^{-7}$ м, які відповідають максимуму антимікробної активності. Вони викликають загибель не тільки вегетативних форм, але й спор бактерій, грибів, а також вірусів. Потужність УФ-опромінення, що оцінюється його бактерицидною дією, вимірюється в бактах – одиницях бактерицидного потоку.

Бакт – це бактерицидний потік опромінення з довжиною хвилі $2,537 \cdot 10^{-7}$ м, потужністю 1 вт.

Ефект знищення мікроорганізмів УФ-променями в повітрі та на поверхні залежить від різних факторів, а саме: від інтенсивності та тривалості опромінення, відносної вологості повітря, виду мікроорганізмів, рівнів забруднення ними повітря і поверхні, характеру поверхні тощо. Слід мати на увазі, що УФ-опромінення справляє на живі об'єкти і мутагенну дію.

Бактерицидні лампи являють собою газорозрядні ртутні світильники низького тиску з саморозжарювальними катодами, які розраховані на запалювання з попереднім підігріванням катода. Вітчизняна промисловість випускає 4 типи бактерицидних ламп з увіолевого скла, через яке проходять УФ-промені: БУВ-15 та БУВ-30 номінальної потужності 15 та 30 вт відповідно. Ці лампи призначені для роботи при температурі навколишнього середовища від 10 до 25°C. Лампи БУВ-30–П та БУВ-60–П номінальної потужності 30 та 60 вт та підвищеної щільності електричного струму призначені для роботи при температурі навколишнього середовища від 5 до 15°C відповідно, з розрахунку на 1 м^2 – 1вт. Лампи розташовують на відстані 50-70 см від поверхні, яка знезаражується. Час експозиції – 30-60 хв.

Ступінь бактеріального забруднення повітря боксу треба контролювати 1-2 рази на тиждень, вранці перед початком роботи. Для цього на стіл боксу на 30 хв кладуть відкриті чашки Петрі з живильним середовищем (м'ясопептонний

агар МПА або пептонний агар Сабуро). Потім чашки закривають, ставлять у термостат з температурою $+37^{\circ}\text{C}$ на 3–5 діб (з МПА), або залишають при кімнатній температурі на 7–10 діб (з Сабуро). Підраховують колонії, що вирости. У чистих боксах кількість колоній на чашці діаметром 10 см після часу експозиції 30 хв не повинна перевищувати 10.

Дезінфекція - комплекс заходів, спрямованих на знищення у середовищі життєдіяльності людини збудників інфекційних хвороб (власне дезінфекція) та їх переносників – комах (дезінсекція) і гризунів (дератизація) фізичними засобами та за допомогою хімічних речовин.

Стерилізація – знепліднення, тобто повне знищення мікроорганізмів та вірусів у різних матеріалах. При її проведенні треба враховувати два моменти роботи: по-перше, це може бути очистка від мікроорганізмів приладів та матеріалів, які контаміновані бактеріями, грибами, вірусами; по-друге, це може бути стерилізація приладів перед використанням.

Стерилізацію проводять фізичними та хімічними методами. Використовуючи фізичні методи, застосовують такі фізичні фактори, як висока температура, ультрафіолетове та інші види опромінення, проникаюча радіація, ультразвук, бактеріальні фільтри.

Фізичні методи стерилізації.

1. Прожарювання на вогні в полум'ї пальника. Цей метод застосовують обмежено для поверхневої стерилізації теплостійких та негорючих предметів безпосередньо перед їх використанням. Платинові петлі, препарувальні та шприцеві голки, предметні та накривні скельця, шпателі, скальпелі, пінцети, ножиці, піпетки декілька разів проводять через полум'я у верхній третині полум'я, де найбільша температура.

2. Кип'ятіння використовують для стерилізації голок, шприців, гумових рукавичок, хірургічного інструментарію, металевого та скляного посуду, предметних та накривних скелець. Час кип'ятіння – не менше 30 хв. Для підвищення стерилізуючої дії киплячої води та запобігання іржавінню металевих предметів у воду додають 1–2% розчин соди. Проте слід пам'ятати, що цей метод не забезпечує повної стерилізації, тому що деякі віруси і спори бактерій можуть залишатися життєздатними.

3. Стерилізація сухим жаром у печі Пастера, сухожаровій шафі та в повітряних стерилізаторах. Стерилізують перев'язочний матеріал (вату, марлю), папір, шприци, голки, скляний посуд, жири, мастила, порошки, мінеральне масло, віск. Метод заснований на дії нагрівання до $+160^{\circ}\text{C}$ – 170°C протягом 45-60 хв. Простерилізовані предмети виймають із шафи після їхнього остигання до $+50^{\circ}\text{C}$. Папір та ватно-марлеві пробки повинні пожовтіти (але не обвуглитися). Треба пам'ятати, що при температурі вищій за $+175^{\circ}\text{C}$ вата і папір спалюються. Термін стерилізації 45 хв – 1 год при $+160^{\circ}\text{C}$ – 170°C . Для контролю в сухожарову шафу можна класти сахарозу або звичайний цукор, які плавляться та окармелюються при $+170^{\circ}\text{C}$.

4. Тиндалізація (за прізвищем англійського фізика Дж. Тиндаля) – це дробна стерилізація вологим жаром (текучою парою), яка потребує спеціальних приладів, а саме апарата Коха або автоклава з відкритим краном. Режим стерилізації: тиск 1–1,5 атм, експозиція 15–60 хв протягом 3–5 днів підряд.

Суть методу полягає в повторному впливі на об'єкти струменя пари невисокої температури (+60–100°C) з добовими інтервалами, коли об'єкти перебувають у темному місці при +20–37°C для пророщування спор бактерій (одноразово спори не гинуть) у вегетативні форми, які гинуть на 2–4 день.

Варіанти тиндалізації:

- а) триразова, чотириразова – при +100°C протягом 20–30 хв;
- б) триразова – при +70–80°C протягом 1 год;
- в) п'ятиразова – при +60–65°C протягом 1 год.

Використовується цей метод у тих випадках, коли об'єкт не може бути проавтоклавованим або нагрітим вище +100°C, а саме для стерилізації термолабільних розчинів, живильних середовищ з вітамінами та вуглеводами.

5. Пастеризація (за прізвиськом французького мікробіолога Л. Пастера) – це часткова стерилізація, тому що спори не гинуть, а гинуть тільки вегетативні форми бактерій. Здійснюється вона шляхом нагрівання матеріалу до +60–90°C протягом 3 днів підряд по 10–30 хв з подальшим швидким охолодженням до +10–11°C.

Варіанти пастеризації:

- а) тривала – протягом 30 хв при +65°C;
- б) короткочасна – протягом 15–20 сек при +72–75°C;
- в) моментальна – без часової експозиції при +85–90°C.

Цим методом стерилізують молоко, вино, фрукти, соки, які треба зберігати в холодильнику у відкритому стані, щоб запобігти пророщуванню спор.

6. Стерилізація парою під тиском в автоклаві – це найбільш надійний та ефективний метод, тому що він забезпечує знищення спор бактерій. Режим стерилізації залежить від типу матеріалу:

- а) тиск 1–1,5 атм, температура +120–130°C, час 15–30 хв – умови для стерилізації гумових виробів, води, фізіологічних розчинів, інфікованих матеріалів, живильних середовищ без вуглеводів та білку;
- б) тиск 0,5 атм, температура +115°C, час 15 хв – стерилізація гумових, металевих та текстильних виробів (одягу), живильних середовищ.

Для контролю роботи автоклава серед предметів, які стерилізуються, закладають спеціальні тести – запаяні ампули з хімічними речовинами, що плавляться при певній температурі, до яких примішують декілька крупинок барвника (фуксину, метиленового синього тощо). Це – бензонафтол з температурою плавлення +110°C, антипирин – +113°C, резорцин – +119°C, сірка – +119°C, бензойна кислота – +120°C.

7. Стерилізація іонізуючим опроміненням здійснюється на спеціальних установках під дією гамма-променів та рентгенівських променів. Температура об'єктів при цьому значно не підвищується, тому цей метод має назву “холодна стерилізація”. Стерилізують перев'язний матеріал, порошки, сироватки, харчові продукти.

8. Стерилізація інфрачервоним опроміненням здійснюється за допомогою спеціальної апаратури, використовується рідко. Режим стерилізації: при +170°C протягом 1 год, при +140°C – протягом 3 год.

9. Стерилізація радіочастотним опроміненням застосовується в харчовій промисловості, проте рідко, тому що летальна дія його на різні мікроорганізми видоспецифічна, тобто для кожного виду мікроорганізмів треба підбирати різні частоти, а це – трудомісткий процес і економічно не вигідний. Крім того, він має головний недолік – створює перешкоди місцевим системам зв'язку.

10. Стерилізація ультразвуком здійснюється за допомогою спеціальних приладів акустичних коливань у діапазоні $2 \cdot 10^4$ - $2 \cdot 10^6$ Гц. Стерилізують медичні інструменти, аптечний та лабораторний посуд.

11. Стерилізація ультрафіолетовим опроміненням – це описаний вище метод, заснований на бактерицидній дії УФ-променів.

12. Стерилізація за допомогою фільтрування через бактеріальні фільтри.

Хімічні методи стерилізації. Ця категорія методів стерилізації розподіляється на 2 групи: рідинна та газова. Для рідинної стерилізації як стерилізуючі агенти використовують хімічні сполуки, які вміщують йод, хлор, окисники, кислоти, альдегіди. Багато з них застосовують і з метою дезінфекції, про що було сказано раніше. Для запобігання бактеріальному пророщуванню в рідину, яка стерилізується (вакцини, сироватка тощо), додають хлороформ, борну кислоту, гліцерин, толуол, ефіри, фенол, формалін у низьких концентраціях (0,05 – 0,5%) або мертиолат у кінцевій концентрації 1:5000-1:10000. Ці речовини діють (*виконують функцію*) як консерванти. Щоб у подальшому звільнитися від них, треба нагріти законсервовану стерильну речовину (певне живильне середовище) до $+56^\circ\text{C}$ на водяній бані протягом 30 хв.

Газовий метод хімічної стерилізації оснований на використанні газів оксиду етилену, формальдегіду, метилброміду в спеціальних газових стерилізаторах. Треба пам'ятати, що ці речовини на людину діють як отрута, а оксид етилену – мутаген. Цим методом стерилізують предмети з дзеркальною поверхнею, оптичне та радіоелектронне обладнання, ріжучі та колючі інструменти з мікронною заточкою (ножі мікротомів), предмети з термостійких пластмас. Перед використанням простерилізовані газовим методом предмети треба обов'язково провітрювати у витяжних шафах з вентиляцією: металеві та скляні предмети – 1 добу, гумові предмети та з полімерних матеріалів – 5 діб; об'єкти, які будуть мати тривалий контакт з відкритими ранами – 14 діб; вироби, що в подальшому будуть використовуватися для дітей – 21 добу. Це – надійний метод стерилізації, тому що простерилізовані предмети залишаються стерильними до 5 років.

Джерела, причини та шляхи зараження персоналу вірусологічних лабораторій

Швидкий розвиток теоретичних і прикладних досліджень у галузі біотехнології та генетичної інженерії, що спостерігається в останні роки, сприяє залученню до роботи з різними вірусами все більших контингентів спеціалістів різних категорій. А це вимагає вдосконалення заходів та засобів, що запобігають можливості інфікування персоналу вірусологічних лабораторій або зводять її до мінімуму. Теперішні правила і прийоми лабораторної роботи з патогенними вірусами, захисні пристрої, режимні та технічні засоби, певний

рівень автоматизації у вірусологічних лабораторіях значною мірою запобігають випадкам лабораторного зараження. Однак повністю виключити такий ризик вони не можуть, на що вказують випадки захворювання працівників внаслідок зараження, що періодично виникають через виконання дослідів.

Джерела інфекції в різних лабораторіях різні, що пов'язане з великою різноманітністю інфікованих матеріалів, які використовують у дослідах, а також з методами дослідження та апаратурою. Але всі вони можуть бути поділені на 2 основні групи – первинні та вторинні. Первинні джерела інфекції пов'язані безпосередньо з об'єктами досліджень, вторинні – утворюються в результаті неконтрольованого вносу інфекції в лабораторні приміщення і забруднення його поверхонь та повітря. Вторинними джерелами інфекції є несправне обладнання, поверхні приміщень та устаткування, персонал та його робочий одяг, відходи, сміття та стічні трапи, системи кондиціонування та вентиляції, аерозоль, що проникає з інших приміщень.

Джерела та причини випадків лабораторного інфікування різні (табл. 1.1). Аварійні ситуації, що призводять до лабораторного зараження, вказані в таблиці 1.2.

При лабораторному зараженні шлях проникнення інфекції в організм людини може бути подібним до природного, але можливе інфікування й іншими шляхами, що визначаються конкретними умовами роботи в лабораторії.

Таблиця 1.1.

Джерела та причини випадків лабораторного інфікування*

Джерело або причина	Абсолютна кількість випадків	Відносна кількість випадків (у % до загальної кількості)
Аварійна ситуація	703	17,9
Тварини або ектопаразити	659	16,8
Клінічні проби	287	7,3
Використаний скляний посуд	46	1,2
Розтин трупа	75	1,9
Навмисне зараження	19	0,5
Аерозоль	522	13,3
Робота з інфекційним агентом	827	21,1
Інші джерела або причини (чи відсутність відомостей)	783	20,0
ВСЬОГО	3921	

*(Дроздов та ін., 1987)

Зареєстровані випадки лабораторного зараження такими вірусними інфекціями: гепатити – 24%, венесуельський енцефаломієліт коней – 14%, арбовіруси – 35%, віспа та віспоподібні інфекції – 6%, парагрип та лімфоцитарний хориомеїнінгіт – по 5%, везикулярний стоматит – 4%, Коксаки –

3%, грип – 2%, поліомієліт та аденовіруси – по 1%, інші – 41% (простий герпес, епідемічний паротит, ящур, сказ, кір, червона висипка та інші). Летальні випадки зафіксовані при лабораторному зараженні персоналу такими вірусами, як вірус В (мавп) – 72%, гарячка Марбург – 30%, аренавіруси Ласса, Мачупо, Хунін – 26%, жовта гарячка – 23%, поліомієліт – 17%, лімфоцитарний хориоменінгіт – 13%, грип – 7%, арбовіруси та інші – 4%.

Таблиця 1.2.

Типи аварійних ситуацій, що призводять до лабораторного зараження *

Аварія	Абсолютна кількість випадків	Відносна кількість випадків (у % до загальної кількості)
Промивання, розливання та розбризкування інфекційної рідини	188	26,7
Аварії зі шприцами та голками	177	25,2
Поранення, уколи гострими предметами, розбитим склом	112	15,9
Укуси та подряпини від лабораторних тварин та ектопаразитів	95	13,5
Засмоктування матеріалу ротом через піпетку	92	13,1
Інші типи аварійних ситуацій (або відсутність відомостей)	39	5,5
УСЬОГО	703	

*(Дроздов та ін., 1987)

Накопичення і систематизація цих відомостей необхідна для оцінки ризику інфікування персоналу, для вдосконалення заходів і засобів, що дають гарантію безпеки роботи у вірусологічних лабораторіях, та для запобігання забрудненню довкілля вірусами.

Правила роботи в навчальних вірусологічних лабораторіях

1. Вхід до вірусологічної лабораторії дозволено лише особам, які пройшли інструктаж з техніки безпеки.
2. Працювати дозволяється лише у спецодязі.
3. Не дозволяється ходити і розмовляти під час роботи з вірусним матеріалом.
4. Категорично заборонено приносити особисті речі, палити, вживати їжу та зберігати продукти і воду, користуватися косметикою.
5. Категорично забороняється всмоктувати в піпетку досліджуваний матеріал ротом. Проводити відсмоктування інфекційного матеріалу слід тільки

за допомогою автоматичних та напіваавтоматичних піпеток або гумових балонів.

6. Для уникнення випадкових уколів уміло й обережно користуватися шприцами та голками під час зараження курячих ембріонів і лабораторних тварин.

7. Після закінчення роботи використані предмети (піпетки, шпателі, предметні та накривні скельця тощо) помістити в дезінфікуючий розчин на І добу, після чого промити та прокип'ятити.

8. Посуд з використаними живильними середовищами, кров'ю, мокротинням та іншим інфікованим матеріалом зібрати в банки і продезінфікувати в автоклаві (30 хв при 1,5 атм) або обробити дезінфікуючим розчином, прокип'ятити чи спалити.

9. Після заняття обов'язково помити руки та за необхідності продезінфікувати їх спиртом.

10. Заборонено викидати та виливати відходи у каналізаційну мережу.

11. Про аварію під час роботи з вірусомісним матеріалом обов'язково попередити викладача або лаборанта.

Особливості роботи в режимних лабораторіях

Принциповою відмінністю лабораторій цієї категорії від базових лабораторій є обладнання їх захисними боксами I та II, а іноді і III класів для роботи з вірусами II групи ризику. Правила роботи режимних лабораторій включають усі положення, обов'язкові для роботи в базових лабораторіях. Спеціальними правилами є такі:

- Робота здійснюється мінімум двома співробітниками. Працювати поодиноці з інфекційним матеріалом категорично заборонено.
- На всіх дверях повинен бути розміщений знак біологічної небезпеки, який забороняє вхід до лабораторії стороннім особам.
- Під час перебування в лабораторії обов'язково носити спеціальний одяг та інші засоби індивідуального захисту.
- Виходячи з лабораторії, проводити цільову санітарну обробку персоналу.
- У приміщенні віварію, де перебувають інфіковані тварини, треба працювати в респіраторах.
- Вхід до лабораторії повинен бути обладнаний шлюзом.
- Отвори та щілини в стінах, стелі, підлозі повинні бути загерметизовані.
- Прилади для миття рук повинні мати пристрої для відкривання води ніжною педаллю або ліктем.
- Вікна повинні бути зачиненими та заклеєними.

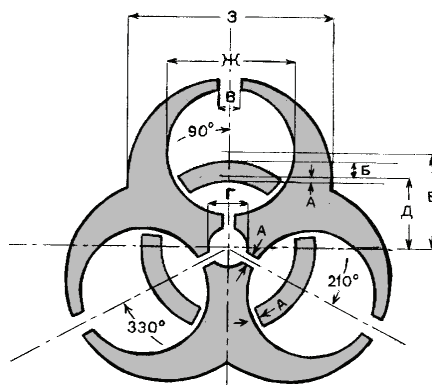


Рис. 1.7. Знак застереження про біонебезпеку для лабораторних дверей
(Дроздов та ін., 1987)

- Вхідні двері до лабораторних кімнат повинні самі зачинятися і замикатися на замок.
- Відпрацьоване повітря фільтрується через ефективні бактеріальні фільтри.
- У працівників лабораторії береться сироватка крові, яка зберігається в лабораторії.
- До роботи в лабораторії не допускаються особи, які підлягали терапії імунодепресантами, що мають гіперчутливість до антибіотиків і сироваткових препаратів.

Правила роботи в лабораторіях особливого режиму

У максимально ізольованих лабораторіях проводиться робота з інфекційними агентами I групи ризику, які надзвичайно небезпечні як для співробітників лабораторії, так і для населення. При порушенні правил роботи або при аварійній ситуації в такій лабораторії створюється потенційна можливість виходу інфекційних агентів високої небезпеки за межі лабораторії та інфікування населення. Тому в режимі роботи таких лабораторій існує ряд особливостей.

1. Вхід до лабораторії та вихід з неї здійснюється через санітарний пропускник з воєнізованою охороною.

2. Для входу обов'язкове повне переодягання в спеціальний одяг, для виходу перед переодяганням обов'язкова цільова санітарна обробка персоналу.

3. Автономна система вентиляції підтримує розрідження повітря у всіх робочих приміщеннях. Вихід повітря з системи витяжної вентиляції здійснюється через бактеріальні фільтри.

4. Усі відходи та відпрацьовані матеріали знезаражуються та стерилізуються в автоклавах, які розташовують між робочою та допоміжною зонами.

5. Ізоляція співробітників від інфекційного матеріалу здійснюється в захисних боксах III класу і пневмокостюмах та скафандрах з надлишковим тиском усередині та ізольованою системою дихання.

Практична робота

1. Ознайомитися з вірусологічною лабораторією та її основним обладнанням.
2. Вивчити санітарно-епідемічні правила роботи вірусологічної лабораторії.
3. Вивчити правила роботи з вірусомісним матеріалом.
4. Одержати інструктаж з техніки безпеки при роботі у вірусологічній лабораторії і розписатися в журналі.
5. Зафіксувати в навчальних альбомах основні типи посуду, інструментарію, приладів і обладнання, які використовують у вірусологічній лабораторії.

Контрольні запитання та завдання:

1. На яких основних правилах базуються принципи організації вірусологічних лабораторій?
2. Охарактеризувати основні принципи організації вірусологічних лабораторій.
3. Які завдання вирішуються у вірусологічній лабораторії?
4. Принципи класифікації вірусів за ступенем біологічної небезпеки.
5. Яка роль вірусів у інфекційній патології людини та тварин?
6. Які причини та джерела внутрішньолабораторного зараження персоналу вірусологічних лабораторій?
7. Проаналізувати типи аварійних ситуацій, що призводять до лабораторного зараження.
8. Які категорії вірусологічних лабораторій створені для роботи з вірусами різного ступеня біологічної небезпеки?
9. Як і для чого здійснюється зонування вірусологічних лабораторій?
10. Дати характеристику базовій вірусологічній лабораторії.
11. Що таке дезінфекція? Як і для чого вона здійснюється?
12. В чому різниця між асептикою та антисептикою?
13. Дати порівняльну характеристику різним методам стерилізації.
14. Охарактеризувати основні правила роботи в базових вірусологічних лабораторіях.
15. Які особливості роботи в режимних вірусологічних лабораторіях?
16. Чим відрізняються умови роботи в лабораторіях особливого режиму?
17. Які основні вимоги ставляться до приміщення вірусологічної лабораторії та її оснащення?
18. Які особливості має обладнання вірусологічної лабораторії?
19. Які існують засоби індивідуального захисту для роботи у вірусологічних лабораторіях?

Література:

1. Каришева А.С., Сюрин В.Н. Руководство по практической вирусологии (справочное пособие). – Кишинев: «Штиинца», 1980.
2. Посібник з медичної вірусології / під ред. В.М. Гиріна. – К.: Здоров'я, 1995. – 367 с.
3. Практикум із загальної вірусології / за ред. А.Л. Бойка. – К.: Видавничий центр „Київський університет”, 2000. – 269 с.
4. Топчий М.К., Корнюшенко Н.П. Руководство к практическим занятиям по вирусологии. – К., 1967.
5. Троценко Н.И., Белоусова Р.В., Преображенская Э.А. Практикум по ветеринарной вирусологии. – М.: Агропромиздат, 1989. – 287 с.

Тема 2. ВИКОРИСТАННЯ ЛАБОРАТОРНИХ ТВАРИН У ВІРУСОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕННЯХ

Культивування вірусів людини і тварин проводять з метою лабораторної діагностики вірусних інфекцій, для вивчення патогенної дії вірусів та захисних реакцій організму, отримання діагностичних сироваток, застосовують у науково-дослідній роботі. Як біологічні моделі для культивування вірусів використовують лабораторних тварин, курячі ембріони та культури клітин.

Моделними об'єктами (експериментальними, або тест-об'єктами) називаються макроорганізми або культури клітин (в тому числі мікроорганізмів), чії властивості достеменно відомі і постійні для представників одного виду (для культури клітин – це штам, популяція або лінія), що дає можливість використовувати їх у дослідженнях особливостей патогенів невідомої природи.

На початку 30-х років ХХ ст. розпочалася “золота епоха” у вірусології (1927-1935 рр.), пов'язана із введенням у вірусологічні дослідження такої експериментальної моделі, як лабораторні тварини.

Цілі використання лабораторних тварин у вірусології

Сьогодні лабораторних тварин використовують у вірусологічних дослідженнях з такою метою:

- для **безпосереднього виділення вірусів з навколишнього середовища.**

Для виділення вірусів придатні лише ті тварини, в яких зараження призвело до чітких клінічних проявів інфекції, патоморфологічних змін або загибелі. Таких тварин відбирають емпіричним шляхом у ході вивчення кожної вірусної інфекції. Отриманий від зараженої тварини вірусомісний матеріал вважають виділеним вірусом;

- для **виявлення (індикації) вірусу в патологічному матеріалі, тобто для проведення біологічної проби.**

Лабораторних тварин використовують для виявлення вірусів у біологічному матеріалі, отриманому від хворого, тобто для постановки **біопробу**. Цей метод діагностики часто застосовують для перевірки суперечливих випадків інфекційних хвороб. З цією метою суспензією досліджуваного матеріалу інфікують лабораторних тварин та враховують реакцію на зараження. У вірусологічній лабораторній практиці для діагностики сказу ставлять біопробу на мишах, інфекційний бронхіт курей діагностують на курчатах тощо (табл. 2.1).

Найчастіше ознаки наявності вірусу в організмі є малоспецифічними, і важко зробити висновок про те, який саме збудник викликав ці симптоми (не можна провести **ідентифікацію** збудника). Так, наприклад, симптоми ураження верхніх дихальних шляхів дослідних тварин можуть індукувати як аденовіруси, так і ортоміксо-, параміксо-, герпес-, риновіруси. Проте існують випадки, коли біопроба супроводжується типовими для конкретного захворювання клінічними проявами. В такому разі можна зробити висновок не

лише про наявність вірусу, але й про його видову належність. Прикладом може бути поява у кролів симптомів свербіння, розчухування, навіть до скушування шкіри й м'язових тканин та загибелі при внутрішньом'язовому введенні суспензії вірусу хвороби Ауескі. У цьому разі позитивна біопроба дає можливість встановити не лише наявність, але й вид вірусу.

Прикладом біопроби зі специфічними ознаками є характерні вісп'яні ураження у курей, заражених вірусом віспи курей або віспи голубів, у ягнят – вірусом віспи овець, тобто у природно сприятливих тварин;

- для накопичення значної кількості вірусів;

- для пасивування вірусів у лабораторних умовах з метою тривалого підтримання їх в активному стані.

У лабораторіях часто є потреба підтримувати віруси протягом багатьох років в активному стані. По суті підтримання вірусу – це чергування пасажів вірусу на живих системах, в тому числі на лабораторних тваринах. Лише так його можна зберегти в законсервованому стані, оскільки при будь-якому способі консервації віруси з тою чи іншою швидкістю втрачають свою активність. Новий пасаж дає змогу її відновити. *Пасаж* – це зараження чутливої тварини з метою отримання від неї нової популяції вірусу. Такий вірус у подальшому знову зберігають у консервуючих умовах;

- для титрування вірусів, тобто встановлення їхньої концентрації у патологічному матеріалі.

Працюючи з вірусом, потрібно також знати його *інфекційний титр*, тобто концентрацію інфекційних одиниць вірусу в одинці об'єму досліджуваного матеріалу. Титр можна визначити за допомогою ураження чутливих модельних об'єктів різними розведеннями вірусомісного матеріалу. Іншими способами кількісного вираження активності вірусу є інфекційна доза-50 (ІД₅₀), летальна доза-50 (ЛД₅₀) тощо. Відповідно до визначення титру, ІД₅₀ є такою дозою вірусу, яка викликає специфічні прояви інфекційного захворювання у 50% інфікованих дослідних тварин. Аналогічно ЛД₅₀ є такою дозою вірусу, що індукує загибель 50% інфікованих дослідних тварин.

- для застосування їх як індикатора інфекційного вірусу в постановці реакції біологічної нейтралізації.

Лабораторних тварин також застосовують як індикаторів інфекційного вірусу при постановці реакції *біологічної нейтралізації*;

- для одержання вакцин та гіперімунних сироваток;

- для оцінки ефективності профілактичних та лікувальних засобів;

- для вивчення прояву вірусної інфекції на всіх стадіях хвороби, тобто патогенезу захворювання;

- для дослідження імунної відповіді організму на ураження вірусом.

Таблиця 2.1.

Використання лабораторних тварин для постановки біопроби
на вірусні хвороби

Вид тварини	Сприйнятливість до вірусу	Метод зараження	Ознаки розмноження вірусу
Білі миші	Сказу	Інтрацеребрально, підшкірно	Параліч, загибель
	ящуру (новонароджені)	Інтрацеребрально	Спастична параплегія, параліч, загибель
	хвороби Ауескі	Підшкірно, інтрацеребрально	Параліч, загибель
	везикулярного стоматиту	Інтраперитоніально, інтрацеребрально	Симптоми енцефаліту, загибель
	грипу коней	Інтраназально	Кон'юнктивіт, симптоми пневмонії, загибель
	грипу свиней	Інтраназально	Те саме
Білі щури	африканської чуми однокопитних	Інтрацеребрально	Симптоми енцефаліту, загибель
	грипу свиней	Інтраназально	Симптоми ураження органів дихання, загибель
Мурчаки	хвороби Ауескі	Підшкірно, інтраназально	Параліч, загибель
	Сказу	Інтрацеребрально	Те саме
	ящуру (новонароджені)	Внутрішньошкірно	Афти на місці введення
	везикулярного стоматиту	Внутрішньошкірно	Везикули, ураження нирок, печінки
	ринопневмонії	Внутрішньобрюшинно	Аборти
чуми м'ясоїдних	Підшкірно, ректально	Підвищення температури	
Кролі	Сказу	Інтрацеребрально, внутрішньом'язово	Параліч, загибель
	ящуру (новонароджені)	Підшкірно	Те саме
	хвороби Ауескі	Внутрішньом'язово, підшкірно	Клінічні симптоми у формах: енцефалітичній, зудневій, менінгіальній, загибель
	контагіозної ектими овець	Скарифікація шкіри, слизових оболонок	Віспенні ураження на місці введення
	міксоми кролів	Внутрішньо шкірно, підшкірно	Набряк у ділянці голови, геніталій

Переваги та недоліки застосування лабораторних тварин

У проведенні багатьох видів лабораторних досліджень лабораторні тварини відіграють головну роль. Так, для деяких вірусів людини, наприклад, вірусу гепатиту В, використовують приматів, оскільки для цього вірусу невідомі приклади реплікації ні в організмі інших тварин, ні в культурі клітин. Для вивчення онкогенних вірусів широко використовують хом'яків, оскільки вони є високочутливими до тих вірусів, які легко викликають утворення пухлин у цих модельних об'єктів. Це дає змогу отримати відповідні антисироватки. Новонароджених мишей використовують для виділення вірусів Коксакі та дослідження арбовірусів. Крім цього, експерименти з вивчення механізмів патогенезу та ролі імунної відповіді можуть бути проведені лише на лабораторних тваринах. Також, зважаючи на надзвичайно широке застосування у вірусології серологічних методів дослідження, лабораторних тварин (особливо кролів, мишей, щурів та приматів) інтенсивно використовують для отримання діагностичних антисироваток.

Проте, працюючи з лабораторними тваринами, потрібно знати ряд особливостей їхнього використання. Порівнюючи їх з такими експериментальними модельними об'єктами вірусологічних досліджень, як курячі ембріони та культури клітин, слід зауважити, що утримання тварин протягом експерименту (закупівля, годування та ін.) є високовартісним.

Крім того, тварини більш трудомісткі в роботі, завдають багато клопоту з утриманням (прибирання, дезінфекція приміщень тощо), експерименти на тваринах не так швидко дають результати дослідів.

Також існує небезпека інфікування обслуговуючого персоналу та створення аварійних ситуацій (укуси, подряпини).

До негативних факторів у роботі з тваринами належить відсутність даних про епізоотичне минуле тварин, які залучаються до експерименту. Наявність безсимптомних інфекцій у таких тварин може спричинити зменшення або навіть зникнення чутливості до досліджуваних вірусів, тобто привести до резистентності внаслідок явища *інтерференції*, що ускладнює проведення експерименту. Можливий і протилежний ефект, а саме виникнення явища *синергізму* в дії двох вірусів (прихованого та досліджуваного), що іноді дає результати, які важко правильно інтерпретувати.

Латентні інфекції не лише спотворюють показники експериментальних досліджень, але й становлять серйозну загрозу через можливість спалаху інфекцій лабораторних тварин і персоналу лабораторій.

Так, тільки у 10 видів лабораторних тварин, яких найчастіше використовують у вірусологічних дослідженнях, можуть бути понад 30 природних інфекційних хвороб, небезпечних для людини, причому не тільки вірусної етіології (табл. 2.2).

Крім того, за умови прихованого вірусноносійства у досліджуваного може відбутися активація латентного вірусу. У цьому разі невідомо, наслідком дії якого вірусу є розвиток певних симптомів, що й призводить до діагностичних помилок.

Природні інфекційні хвороби деяких лабораторних тварин, збудники яких є патогенними для людини

Вид тварин	Назва хвороби
Білі миші	Сальмонельози, лістеріоз, псевдотуберкульоз, лімфоцитарний хориоменінгіт, ектромелія, енцефаліт
Білі щури	Сальмонельози, псевдотуберкульоз, лістеріоз, геморагічна гарячка з нирковим синдромом
Хом'яки	Чума
Мурчаки	Лістеріоз, туберкульоз, псевдотуберкульоз
Кролі	Сальмонельози, лістеріоз, туляремія, псевдотуберкульоз, міксома кролів
Собаки	Сказ, лептоспіроз, туберкульоз
Коти	Сказ, туберкульоз
Мавпи	Туберкульоз, дизентерія, віспа мавп, гарячка Марбург, герпес В, гепатит А, сальмонельози, меліоїдоз, лептоспіроз, туляремія, сказ, кір, псевдотуберкульоз
Ембріони птахів	Сальмонельози, віспа курей

Прикладом латентних інфекцій лабораторних тварин вірусної етіології є ектромелія (віспа) білих мишей, збудник якої належить до родини поксвірусів. Хвороба проявляється некротичним запаленням лап, а при генералізації інфекції – осередками некрозу в печінці та селезінці. Друга група латентних інфекцій лабораторних тварин – це вірусні пневмонії. У мишей, щурів та хомяків збудником респіраторних інфекцій є вірус Сендай, який належить до родини параміксовірусів. Третя група вірусних латентних інфекцій – нейроінфекції з такими симптомами, як судоми, парези, паралічі. До них належать лімфоцитарний хориоменінгіт білих мишей, енцефаломієліт білих мишей та латентні вірусні енцефаліти інших видів лабораторних тварин.

Через зазначені вище причини практично в усіх лабораторіях діагностики лабораторні тварини і курячі ембріони поступилися місцем культурам клітин, які набагато простіше утримувати та які надають дослідникам більші можливості.

Види лабораторних тварин

Головними критеріями вибору лабораторних тварин у вірусологічний експеримент є їхня сприйнятливість до досліджуваного вірусу та безпосередньо мета експерименту. Найчастіше використовуються білі миші, щури, мурчаки, кролі, барани, собаки, кури та гуси. Треба зазначити, що котів у вірусологічних дослідженнях використовують рідко.

Миші. Миші незамінні для широкого кола наукових досліджень у галузі біології, онкології, вірусології, мікробіології, фармакології, генетики. Мишей використовують для вивчення патогенезу та лабораторної діагностики вірусних інфекцій (герпесу, грипу, ентеровірусних інфекцій тощо).

Для вірусологічних досліджень дуже широко використовують білих мишей (альбіносів сірої домашньої миші) інбредних ліній. Останніх одержують в результаті схрещування близькоспоріднених особин протягом щонайменше 20 поколінь. У таких тварин досягається високий ступінь гомозиготності, вони мають генетичну одноманітність, менш мінливі, високочутливі до певних вірусів. Ці властивості частково закріплені у них генетично, тому на віруси вони реагують досить одноманітно.

Перевагами використання мишей у вірусологічних дослідженнях є відсутність агресії, висока плодючість, невелика вага (20-30 г), наявність високого спектру генетичних ліній, відносно просте утримання та догляд.

Вага дорослої тварин визначається умовами досліду і коливається в межах 8-18 г. Особливе значення мають новонароджені миші вагою 1-2 г, тільки на них культивують певні віруси (наприклад, ящур, Коксакі).

Найбільшого використання у лабораторній практиці набули лінії мишей C57BL/6 та BALB/c.

Миші лінії C57BL/6, які також позначаються як "C57 чорні 6" або "чорні 6", мають переваги стабільності та легкості у розведенні. До того ж це перша мишача лінія, чий геном був повністю сиквенований у 2005 році, відразу після генома людини. Ці модельні об'єкти широко використовуються як фізіологічні та патологічні моделі для дослідів *in vivo*. По-друге, вони часто застосовуються для створення тарсгенних моделей мишей. Крім того, C57BL/6 використовуються як основна лінія для генерації конгенних спонтанних та індукованих мутацій.

BALB/c є альбіносною імунодефіцитною інбредною лінією. Миші лінії BALB/c характеризуються легкістю в розведенні та мінімальними варіаціями маси тіла між самками й самцями. Випадки утворення пухлин молочної залози у BALB/c мишей рідкісні, проте ці миші дуже чутливі до канцерогенів. До того ж пухлини легень, ретикулярні утворення, пухлини нирок та інші часто трапляються у мишей лінії BALB/c. Ця лінія широко використовується для одержання гібридом та виробництва моноклональних антитіл, для досліджень у галузі інфекційних захворювань, терапії раку та в імунології.

Широкого використання набули лінії мишей із заздалегідь відомою частотою виникнення спонтанних пухлин молочної залози. Так, миші ліній А (альбіноси), С3Н (сірі), С3НА (темно-сірі), DBA (блідо-коричневі) характеризуються високою (60-95% випадків) частотою виникнення таких пухлин, а миші ліній СВА (сірі), BALB (білі, альбіноси), С57Br (коричневі), С57Bl (чорні), СС57 (білі) – низькою (менше 5%) частотою.

Щури. Для експериментальних досліджень найчастіше використовують білих щурів, які є нащадками-альбіносами сірих і чорних щурів. Перевагами використання саме цих тварин є: висока плодючість, невелика маса (до 300 г), відносно просте утримання і догляд. Використовують білого щура (альбіноса сірого щура), чорного тощо.

Лабораторні щури належать до виду *Rattus norvegicus*, тоді як лабораторні миші належать до кількох різних видів. Порівняно з мишами, щури більші за розміром, агресивніші та стійкіші до різних захворювань. Лінії Sprague-Dawley та Wistar – лінії щурів, що найчастіше використовуються у лабораторній

практиці. Обидві лінії – це альбіноси. До того ж обидві ці лінії щурів є аутбредними (на відміну від поширених ліній мишей, що є інбредними). Щури Wistar – перша лінія щурів, розроблена для використання як лабораторна модель. Щури лінії Sprague-Dawley були отримані з цієї лінії.

Щурів використовують для вивчення патогенезу вірусних інфекцій та їхньої лабораторної діагностики (сказу, герпесу, грипу тощо), для виробництва діагностичних тест-систем (імунних асцитних рідин, для отримання моноклональних антитіл).

У щурів теж створені інбредні лінії. Новонароджених тварин використовують у дослідженнях з онкогенними вірусами. Внаслідок сприйнятливості до багатьох вірусних інфекцій щури є універсальними тваринами, придатними практично для всіх цілей вірусологічних досліджень.

Хом'яки. У лабораторній практиці сирійських (золотистих) хом'яків використовують для моделювання інфекційних хвороб вірусної етіології (поліомієліту, Коксакі-вірусної інфекції, ящуру, сказу тощо). Для вивчення вірусів створена інбредна лінія сирійського золотистого хом'яка. Працюючи з онкогенними вірусами, використовують новонароджених тварин. Цінні лабораторні тварини для дослідження канцерогенезу, викликаного аденовірусною інфекцією.

Мурчак. Класичний об'єкт для дослідження алергічних реакцій та авітамінозів, моделювання широкого спектру інфекційних захворювань, дуже чутливі до мікобактерій туберкульозу. У вірусологічних дослідженнях найбільш цінними є гладкошерсті породи мурчаків: голландська, гімалайська, агуті тощо. Мурчакі використовуються з різноманітними цілями у вірусологічних дослідженнях. Сироватку крові мурчаків використовують для постановки реакції зв'язування комплементу (має найвищий вміст білків системи комплементу), а еритроцити – в лабораторній діагностиці грипу в РГА.

Тхори. Це перші лабораторні тварини, на яких був утілений та культивований вірус грипу людини (30-40 рр. ХХ ст.). Це зручна модель для дослідження вірусу червоної висипки. При зараженні підшкірно та інтрацеребрально вірус розмножується в паренхіматозних органах і може бути виявлений упродовж місяця. Як і в людини, вірус передається трансплацентарно і викликає загибель плоду. Сьогодні тхорів використовують у дослідах не дуже часто через їхню стійкість до багатьох вірусів людини і тварин.

Кролі. Кролів використовують для проведення фізіологічних, фармакологічних, імунологічних досліджень. Використовують для контролю імуногенності вакцин, приготування гемолітичної сироватки, в реакції зв'язування комплементу (РЗК), для лабораторної діагностики сказу, герпесу, для приготування антирабічних вакцин. Рекомендується працювати переважно з чистопородними тваринами з метою одержання стійких результатів. Кролі чистих порід більш чутливі до наркозу, серйозних операцій та інфекцій. Використовують кроликів різного віку та ваги залежно від цільового призначення.

Мавпи. Дуже цінні лабораторні тварини для з'ясування ряду фундаментальних і практичних питань вірусології. Об'єктами досліджень виступають віруси гепатиту А, кору, віспи, імунодефіциту людини та ін.

Найчастіше використовують індійських макак-резусів, філіппінських макак та африканських зелених мартишок, рідше – яванських макак, макак лапундер, павіанів, гамадрилів та шимпанзе.

Коні. Це єдина модель для роботи з вірусами інфекційної анемії коней та енцефаломієліту коней.

Свині. Проводячи біопробу на наявність вірусу трансмісивного гастроентериту свиней, використовують поросят 2-3-денного віку, яких заражають орально або інтраназально. Використовують підсвинків у віці 2,5-5 місяців для роботи з вірусами класичної чуми, африканської чуми та віспи свиней. Молодих свиней і поросят беруть для біопроби при хворобі Тешена та інфекційному гастроентериті свиней.

Велика рогата худоба (ВРХ). Для вивчення ряду вірусних хвороб корів, таких, як ентеровірусні інфекції, використовують тварин віком від декількох днів до декількох місяців. Слід сказати, що, вибираючи лабораторних тварин до вірусологічних експериментів, користуються правилом необхідного та достатнього, тобто намагаються виконувати поставлені завдання найбільш економічно виправданим шляхом.

Кури. Серед великої кількості порід курей слід назвати такі: італійська куріпкова (чисто несуча порода, придатна для щеплень, більш стійка і менш вибаглива, ніж леггорн), леггорн (несуча порода, придатна для щеплень), родлендер (чисто несуча порода), віандот (несуча порода), суссекс (несуча порода), світла брама (як донор крові). Для вірусологічних досліджень слід використовувати чистопородних птахів. Вік курей визначається метою досліджень. Курячі ембріони використовують для культивування вірусів грипу, парагрипу, віспи курей та ін., для одержання клітинних культур, а дорослих курей – як донорів крові для серологічних реакцій, з діагностичною метою, для випробування вакцин тощо.

Качки. Використовуються у віці 1-10 днів для постановки біопроби з вірусами, що викликають хвороби качок і каченят. Так, для проведення біопроби для вірусного гепатиту каченят використовують лише каченят віком 1-7 днів.

Гнотобіотичні тварини. Гнотобіоти (гнотобіонти) – це безмікробні тварини, які широко використовуються у вірусологічних дослідженнях за рахунок того, що, по-перше, вони, як правило, вільні від збудників латентних вірусних інфекцій, які перешкоджають результатам досліджень з причини інтерференції. По-друге, вони більш чутливі до вірусних інфекцій, ніж звичайні тварини. По-третє, вони найбільш стандартні. По-четверте, саме цих тварин доцільно використовувати для виділення вірусів з нез'ясованими хвороботворними властивостями.

Гнотобіоти – це макроорганізми, які не містять життєздатних мікроорганізмів одного або декількох видів, відомих досліднику.

Нині безмікробних птахів одержують шляхом інкубації яєць зі стерильною шкаралупою в стерильному інкубаторі. Стерильних ссавців отримують кесаревим розтином вагітних тварин або видаленням матки (гістеректомія) та вирощуванням “новонароджених” у стерильних ізоляторах. Утримують гнотобіотів у гнотобіологічних ізоляторах з мікрокліматом за

наявності двох шлюзів: повітряного (аерошлюзу) та рідинного (гідрошлюзу). Через шлюзи за допомогою контейнерів в ізолятор вводять посуд, харчі, повітря, воду, хірургічний інструментарій, клітки та всі інші простерилізовані матеріали. Одержаних стерильних тварин тримають на молочно-кислій дієті для наявності певної кишкової флори, яка зберігає їхню специфічну апатогенність. Приміщення гнотобіологічного ізолятора стерилізують газами. Таким чином, отримання та утримання гнотобіотів на всіх етапах роботи здійснюється повністю в стерильних умовах.

За зовнішнім виглядом гнотобіоти не відрізняються від звичайних тварин. Життєві процеси у безмікробних лабораторних тварин (морфологія, фізіологія, обмін речовин, резистентність, захисна реакція, патологія тощо) значно відрізняються від таких самих у звичайних тварин. Найбільш помітні зміни стосуються функцій шлунково-кишкового тракту, де відсутня нормальна мікрофлора, збільшена вага печінки, нирок, надниркової залози та недорозвинені імунно-захисні механізми (гіпоплазія та зменшення ваги лімфатичних вузлів і тимусу, відсутні глобулінпродукуючі клітини, майже восьмикратно зменшена кількість імуноглобулінів тощо). Утворення антитіл або відсутнє, або відбувається незначною мірою.

Розрізняють два види гнотобіотів: стерильні тварини та гнотофори. **Стерильні тварини** – це макроорганізми, які не мають ніяких життєздатних мікроорганізмів, які можна виявити. **Гнотофори** – це макроорганізми, які є носіями тільки одного виду життєздатних мікроорганізмів (моногнотофори в дибіотичній системі), двох (дигнотофори в трибіотичній системі) або декількох (полігнотофори в полібіотичній системі).

Особливе місце серед гнотобіотів займають SPF-тварини (від нім. *Spezifisch pathogenfrei*), які вільні тільки від *патогенних* мікроорганізмів. У їхньому організмі є всі необхідні для нормальної життєдіяльності бактерії та віруси, які в сукупності створюють групу так званої *резистентної (корисної) мікрофлори*. На сьогодні одержані SPF (СПФ-тварини): щури, мурчаки, кролики, поросята, птахи та інші. На відміну від гнотобіотів, які є експериментальною моделлю, СПФ-птахи і свині в ряді країн стали основою для створення племінних і товарних ферм, вільних від інфекційних хвороб.

Індикаторні тварини. Для виявлення вірусів у певному середовищі використовують “сторожових” тварин (*sentinel animals*), тобто таких, що залишаються у приміщеннях з метою визначення інфекційного агенту. Цілі використання “сторожових” тварин різні. Наприклад, їх вселяють у приміщення (свинарники, скотні двори, пташники) для перевірки відсутності вірусів після ліквідації інфекції та проведеної там дезінфекції. У лабораторіях “сторожові” тварини можуть служити для виявлення втрати (витоку) вірусу. Цей метод виявлення вірусу з використанням “індикаторних” або “детекторних” “сторожових” тварин відіграє велику роль в епізоотологічних та епідемічних дослідженнях. Для цього сприйнятливих тварин на певний час розміщують у їхньому середовищі існування для природного зараження (через укуси комах тощо) і спостерігають за ними. У подальшому їх переводять у лабораторні умови і досліджують. Поза межами вірусологічних експериментів „сторожових” тварин (найчастіше щурів та кролів) можуть використовувати на

хімічних підприємствах з виробництва речовин, небезпечних для життя людини, а також у місцях зберігання хімічної і біологічної зброї масового знищення для виявлення можливого витoku токсичних речовин чи організмів.

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

Експериментальні дослідження на тваринах є важливим, а часом і єдиним методом дослідження у вірусологічній практиці. І хоча для реалізації цих завдань в експериментах на тваринах часто доводиться застосовувати методичні прийоми, недоступні для проведення досліджень на людині, існує загальноприйнята необхідність суворо дотримуватися принципів гуманного ставлення до тварин як до об'єктів досліджень.

У 1959 році Расселом і Берчем у праці «Принципи гуманної методики експерименту» в так званій „**концепції 3R**” (англ. *reduction, refinement and replacement* – скорочення, удосконалення і заміна) було сформульовано основні біоетичні правила проведення експериментальних досліджень на лабораторних тваринах. Нині принципи трьох R є загальноприйнятим світовим стандартом, що дає можливість одержати новий науковий досвід у галузі створення альтернатив і значною мірою скоротити кількість дослідних лабораторних тварин.

Концепцію 3R слід трактувати так:

Refinement – удосконалення, тобто гуманізація при підготовці і проведенні експерименту (у широкому сенсі з моменту народження і до моменту смерті тварини) за рахунок використання знеболювальних і нетравматичних методів.

Reduction – скорочення кількості тварин, що використовуються, без компромісу з науковим результатом і якістю біомедичного дослідження і тестування, а також без компромісу з благополуччям тварин. Натепер запропоновано три основні шляхи зменшення використання тварин: удосконалення дослідницької стратегії; удосконалення контролю варіації; удосконалення статистичного аналізу.

Replacement – заміна високоорганізованих тварин низькоорганізованими та/або використання альтернативних методів.

У цілому загальні етичні вимоги до використання хребетних тварин в біологічних і медичних експериментах формулюються так:

1. Експерименти на тваринах допустимі тільки тоді, коли вони спрямовані на отримання нових наукових знань, поліпшення здоров'я людини і тварин, збереження живої природи, є украй необхідними для якісного навчання і підготовки фахівців, проведення тестування, судово-медичної і криміналістської експертизи, не становлять загрози для здоров'я людини.

2. Експерименти на тваринах виправдані тоді, коли є достатні підстави сподіватися на отримання таких результатів, які істотно сприятимуть досягненню хоча б однієї з перерахованих вище цілей. Неприпустимо використовувати тварин в експерименті, якщо такі цілі можуть бути досягнуті іншим шляхом.

3. Слід уникати буквального дублювання вже проведених досліджень на тваринах, якщо воно не диктується необхідністю експериментальної перевірки результатів.

4. Вибір тварин, їхня кількість, методика дослідження повинні бути ретельно обгрунтовані до початку експериментів і дістати схвалення уповноваженої особи або органу біоетичної експертизи.

5. Тварини для експериментів повинні надходити з сертифікованого розплідника. Використання бродячих тварин суперечить принципам біоетики.

6. Під час проведення дослідів на тваринах слід проявляти гуманність, уникати дистресу, болю, не завдавати тривалої шкоди їхньому здоров'ю і полегшувати страждання. Необхідно прагнути максимального скорочення кількості тварин і там, де можливо, використовувати альтернативні методи, що не вимагають участі тварин.

7. Досліди на тваринах повинен проводити кваліфікований дослідник, який ознайомлений з правилами біоетики і дотримується їх. Використання тварин у навчальному процесі проводиться під наглядом фахівця-викладача.

8. Лабораторії, наукові й навчальні заклади, організації, в яких проводяться досліди на тваринах, підлягають атестації повноважними органами.

Саме тому до більшості дослідів залучають мишей, щурів, кролів, рідше хом'яків, мурчаків та собак. Водночас трапляється, що для дослідження конкретного вірусу треба залучити інших лабораторних тварин, оскільки названі вище можуть не бути сприйнятливими до цього вірусного захворювання або ж не відповідати поставленим цілям експерименту.

Для вивчення перебігу захворювання використовують лінійних тварин, найбільш чутливих до певного вірусу (наприклад, мишей – для дослідження патогенезу грипу). Для отримання специфічних антитіл доцільніше використовувати кролів, для вивченні дії онкогенних вірусів – „високоракові” та “низькораків” лінії мишей або хом'яків. Досліджуючи дію лікарських речовин на організм людини, найчастіше використовують собак, свиней і мавп, зважаючи на високу подібність фізіології цих організмів до організму людини.

Основні правила утримання тварин та догляду за ними

Головними вимогами до утримання лабораторних тварин є забезпечення дотримання всіх фізіологічних норм тварин, а також запобігання пере-зараженню тварин і розповсюдженню інфекції в межах віварію.

До фізіологічних вимог у роботі з лабораторними тваринами відносять фізичні параметри мікроклімату приміщень віварію, де утримуються тварини (температура, вологість, повітрообмін, рівень шуму та ін.), розміщення тварин у клітках віварію і годування тварин. Крім того, особлива увага приділяється карантину тварин та профілактиці канібалізму.

Мікроклімат у приміщеннях, де утримуються лабораторні тварини, повинен бути в межах існуючих норм протягом доби незалежно від сезону. Висока температура та мала рухливість повітря в поєднанні з високою вологістю гальмують тепловіддачу і викликають перегрівання організму. При

цьому тварини стають мляві, у них зменшується апетит, знижується стійкість до інфекційних та неінфекційних захворювань, гальмується обмін речовин.

У приміщеннях для утримання тварин не повинно бути шуму від приладів, засобів механізації, голосів, недбалого поводження з інвентарем (допустимий рівень – не більше 70-85 Дб). Як періодичний, так і повсякденний шум негативно позначається на стані здоров'я тварин, впливає на серцево-судинну, нервову та імунну системи, дихання, теплообмін.

У віваріях розповсюджена переважно кліткова система розміщення лабораторних тварин. Для їхнього утримання використовують клітки різних конструкцій, виготовлені з дерева, скла, алюмінію, жерсті, тонких металевих листів, міцних сортів фанери, плексигласу, пластмас.

Важливо зберігати чистоту приміщень, кліток і посуду. Не можна переставляти годівниці, поїлки. Двічі на рік треба проводити повну дезінфекцію приміщення. У разі епізоотії хворих тварин ізолюють від здорових і віварій переводять на карантин. Трупні померлих тварин у секційній кімнаті розтинають, вивчаючи патологічний матеріал, а потім разом з підстилкою спалюють у кремаційній печі.

Поняття “карантин” (від італ. “каранта” – “сорок”) було введено з 14 століття для боротьби з чумою, коли на віддалений острів висаджували на 40 днів екіпажі кораблів, а вже потім доставляли на острів Сицилію.

Експериментальних тварин розводять у спеціальних розплідниках. Лише невелика їхня кількість перебуває у віваріях при вірусологічних лабораторіях. Тих тварин, що наново надходять у віварій, спочатку витримують у карантинному відділенні. Під час карантину у тварин можуть проявитися різні захворювання: чи латентні, чи ті, що були в інкубаційному періоді, чи ті, що тварина здобула під час транспортування через переохолодження.

Згідно з “Ветеринарним законодавством України”, для тварин встановлюються такі строки перебування в карантині: для собак – 30 днів, білих мишей та щурів – 10 днів, для всіх інших тварин – 21 день. Для мавп і тварин, які проживають у зовсім інших природних умовах, строки карантину та адаптації збільшують до 2-3 місяців. У ці проміжки часу вкладається тривалість інкубаційного періоду тих захворювань, на які частіше хворіють тварини.

Тварини повинні бути забезпечені регулярним годуванням та питною водою. Годування повинно бути повноцінним за хімічним складом і достатнім за кількістю. Корм тварин повинен містити всі речовини, необхідні для нормального перебігу процесів життєдіяльності, тобто білки, жири, вуглеводи, мінеральні солі та вітаміни. Для різних видів тварин існують певні кормові норми, раціони і режим годування. При нестачі води порушуються фізіологічні та біохімічні процеси в організмі, затримується ріст, знижується резистентність до інфекцій, виникають патологічні зміни.

Правильна організація повноцінного годування в поєднанні з оптимальними умовами утримання забезпечує добрий загальний стан, ріст, розвиток і розмноження тварин. Вона підвищує стійкість тварин до захворювань, зміцнює їхню імунну систему і, як наслідок, грає значну роль у високоякісному проведенні вірусологічних досліджень.

Нерідко у лабораторних тварин (мишей, щурів, кролів тощо) спостерігається *канібалізм*. Причини його можуть бути різноманітними (табл. 2.3).

Таблиця 2.3.

Причини канібалізму та заходи його профілактики

Причини канібалізму	Заходи профілактики
Поїдання самицями новонароджених при перевантаженні приплодом (або при малій кількості молока)	Частину приплоду пересаджують до іншої самиці з малим приплодом
Поїдання приплоду старими самицями або тими, які народили вперше	- “ -
Поїдання приплоду іншими тваринами виду при голодуванні чи дефіциті води (навіть протягом 4-6 год)	- “ -, вчасне постачання їжі та води
Поїдання самицями мертвонароджених	Своєчасне видалення мертвонароджених з гнізда
Поїдання собі подібних після заміни підстилки в гнізді (зникає природний запах і з'являється незнайомий)	Частину підстилки потрібно залишати для підтримання запаху
Канібалізм при перенаселенні клітки	Розселення тварин у декілька кліток
Канібалізм може ставатися через появу на тваринах сторонніх запахів (особистий запах людини, гумових рукавичок, ефіру, йоду, спирту тощо) внаслідок проведення експерименту	Тварин потрібно брати стерильними інструментами (пінцетом, корнцангом). Для знищення запаху спинку дитинчат змащують камфорою, сечею, вагінальними виділеннями матері. Перед взяттям новонародженого з клітки руки можна обтерти пухом з гнізда, а перед поверненням змастити його та ніс матері етанолом.

Тварин, які схильні до канібалізму, обов'язково вибраковуюють з експерименту.

Етапи роботи з тваринами при виконанні вірусологічного експерименту

Залучення будь-яких тварин до вірусологічного експерименту вимагає обов'язкового виконання конкретних кроків. Необхідні етапи роботи з лабораторними тваринами такі:

- 1) добирання лабораторних тварин;
- 2) обстеження та підготовка тварин до досліду (визначення основних параметрів нормальної життєдіяльності);

- 3) маркування;
- 4) наркотизація;
- 5) депіляція;
- 6) фіксація;
- 7) зараження;
- 8) контроль за зараженими тваринами;
- 9) одержання патологічного матеріалу від лабораторних тварин;
- 10) евтаназія;
- 11) розтин лабораторних тварин.

Добір лабораторних тварин. Для вірусологічних досліджень добирають тварин, які повинні відповідати таким вимогам:

1) тварини повинні бути сприйнятливими до досліджуваного захворювання чи патогену в умовах експерименту та безпосередньо відповідати поставленим цілям;

2) тварини повинні бути вільними від інфекційних та інвазійних хвороб для забезпечення чистоти експерименту;

3) тварини мають бути безумовно здоровими, в доброму стані та мати спокійний норів;

4) тварини повинні бути потрібної ваги, віку, статі та достатньої вгодованості;

Для вибору віку тварини потрібно мати уявлення про поняття “статева зрілість” та “зрілість тіла”. Статева зрілість – це досягнення твариною віку, коли з’являються і проявляються статеві цикли. Зрілість тіла – це стан тварини, коли скінчився ріст кісток її скелету і формування внутрішніх органів.

В експерименті повинна бути задіяна певна кількість тварин для проведення статистичної обробки результатів (мінімум п’ять).

У конкретному експерименті потрібно використовувати тварин одного визначеного виду і навіть певної породи. Для стандартизації умов проведення експерименту бажано використовувати тварин однакового віку, ваги і статі.

Обстеження та підготовка тварин до дослідження. Більшість вірусів різних таксономічних груп можуть бути розмежовані на основі їхнього спектру патогенності для різних видів тварин або для різних вікових категорій того самого виду тварин, їхньої статі, ваги тощо. Саме тому, добираючи тварин у вірусологічний дослід, проводять обстеження їхніх анатомічних та фізіологічних особливостей для контролю стану тварин.

Спочатку проводять спостереження за поведінкою тварини. Вік тварин визначають найчастіше за станом зубів, шерсті та кігтів (пазурів).

Наступним етапом обстеження є огляд зовнішніх ознак тварини. Насамперед звертають увагу на стан волосяного покриву. У здорових тварин шерсть гладка, блискуча, щільно прилягає до тіла. У хворої тварини шерсть неблискуча, ламка, скуйовджена, іноді набуває жовтуватого відтінку та неприємного запаху. Шкіра здорової тварини гладка, еластична; зібрана в складку, вона швидко й легко розправляється.

У дрібних гризунів без патології маса щоденно збільшується. У великих тварин вона залежить від віку, годування, умов утримання та стану здоров’я. Тварину перед початком експерименту зважують 2-3 рази з інтервалом у 3-5

днів. Тварин, у яких маса тіла не збільшується, в експеримент не беруть. Встановити масу тіла тварин необхідно також для обчислення дози зараження, тому що вона вимірюється кількістю вірусу на одиницю ваги тіла. Крім того, є віруси, продуктивна інфекція яких приводить до зміни ваги тіла тварин. Тварин, які перебувають в умовах тривалого експерименту, зважують 1 раз на 7-10 днів в ту саму пору доби до прийняття їжі.

Наступним етапом підготовки тварин до експерименту є вимірювання температури тіла, яке здійснюється методом *ректальної термометрії*. Цей показник змінюється протягом доби (вранці температура нижча), тому треба міряти температуру в той самий час. На температуру впливають пора року та вік тварини. У дрібних лабораторних тварин у віці до 1 місяця температура тіла відповідає температурі зовнішнього середовища, коливання якої змінює температуру тіла. Не можна вимірювати температуру тварин зразу ж після їхнього транспортування, тому що в них після цього розвивається так звана “транспортна хвороба”, яка супроводжується підвищенням температури тіла, слабкістю, адинамією. Через декілька годин ознаки її зникають і показники температури повертаються до норми. Для проведення термометрії медичний, ветеринарний або дитячий термометр зберігається в дезінфекційному розчині (10%-й розчин лізолу або денатурований спирт).

Закінчивши огляд тварини та обстеження її поведінки, потрібно перевірити функціонування окремих систем життєдіяльності організму тварини.

Для цього підраховують частоту і тип дихання, його ритмічність. Частоту дихання у тварин встановлюють шляхом підрахунку числа вдихів та видихів протягом 1 хв. На неї впливають вік, темперамент, вагітність, температура та вологість повітря, ступінь наповнення шлунково-кишкового тракту, збудження тощо. У всіх тварин дихання змішаного грудочеревного типу. Патологічні процеси можуть змінювати тип дихання на грудний або на черевний.

Серцево-судинну систему обстежують, аналізуючи характер пульсу, серцевий поштовх, межі та тони серця, ритм серцевих скорочень. Пульс підраховують шляхом пальпації протягом 1 хв.

Маркування лабораторних тварин. У процесі вірусологічних досліджень виникає необхідність мітити тварин, щоб надалі впізнавати їх протягом експерименту. Запропоновано цілий ряд методичних прийомів мічення, а саме: татуювання, використання радіопередавачів, мічених атомів, різнокольорових фарб тощо.

1) Татуювання вух у злегка наркотизованих тварин, що мають достатньо великі непігментовані вушні раковини (кролі, собаки, тхори) голландською сажею чи китайською тушшю за допомогою спеціальних татуювальних щипців або голок. Для мічення мавп татуювання використовують на внутрішньому боці верхньої третини стегна.

2) Нанесенн надрізів та насічока на достатньо великих вушних раковинах з допомогою ножиць і проколів компостерними щипцями (кролі, мурчаки, свині)

3) Вистригання шерсті на спині та стегнах у мавп, кроликів, тхорів, хом'яків, кішок. Цей спосіб непрактичний, тому що може використовуватись тільки при короткочасному досліді (шерсть через тиждень відростає).

4) Мітка описом характерних природних плям на поверхні тіла, коли за забарвленням шерсті одна тварина відрізняється від іншої того ж виду (мурчаки).

5) Клеймування тварин з використанням металевих жетонів, бляшок, кільць з м'якої білої жерсті зі штампованими номерами, які наносяться штампом, чи спеціальним чорнилом (до 10 мл насиченого розчину мідного купоросу додається 2 мл концентрованої сірчаної кислоти). Бляшки надягають кроликам на корінь вуха, а мурчакам вставляють, як сережку, у вушну раковину. Куркам прикріплюють кільце на лапу або бирку на крило. Великим тваринам одягають нашійник з номерами на металевих жетонах. Використовуючи цей метод клеймування, потрібно слідкувати за поведінкою тварин. Якщо предмет, застосований для мітки, дратує тварину, і протягом тривалого часу вона намагається його зняти, то це необхідно зробити експериментатору, а надалі використовувати інший спосіб маркування. В іншому разі ці тварини відгризають лапку разом з бляшкою чи кільцем.

6) Для маркування ембріонів багатоплідних тварин (мишей, щурів) використовують введення під шкіру спеціальної забарвленої маркувальної маси (до 10 г безводного ланоліну додається 3 г чорної туші та 0,5 мл розчину антибіотика (пеніцилін або інший 5000 ОД)). Цю масу шприцом з гострою голкою та жорстким мандреном (для штовхання маси через голку) вводять ембріону під шкіру на спині. Мітка після народження дитинчати добре помітна як пляма чи смуга.

7) Кольорове маркування здійснюють наносячи різнокольорові плями на ділянки тіла тварин (альбіносів мишей, щурів та кролів) за певними схемами (рис.2.1.). Використовують анілінові барвники: 0,5% розчин карболового фуксину (червоний колір означає одиниці), насичений розчин пікринової кислоти (жовтий колір означає десятки), 0,5% розчин малахітового зеленого (зелений колір означає сотні), 0,5% розчин генціану фіолетового (фіолетовий колір означає тисячі). Однією фарбою можна помітити 9 тварин, двома – до 100, трьома – до 1 000, чотирма – до 10 000. Фарби наносять на непігментовану шерсть у вигляді крапель, кружечків чи смуг на спину та по боках тварини.

Для кольорового маркування *за методом Тойффеля* потрібний тільки один барвник для позначки 1 000 тварин. Подумки треба уявити спину тварини, розділену на 9 рівних частин, утворених трьома поздовжніми та трьома поперечними смугами. Ліва смуга використовується для позначення сотень, середня для позначки десятків, а права – одиниць. Позначки у вигляді плям і смуг наносять за певною схемою.

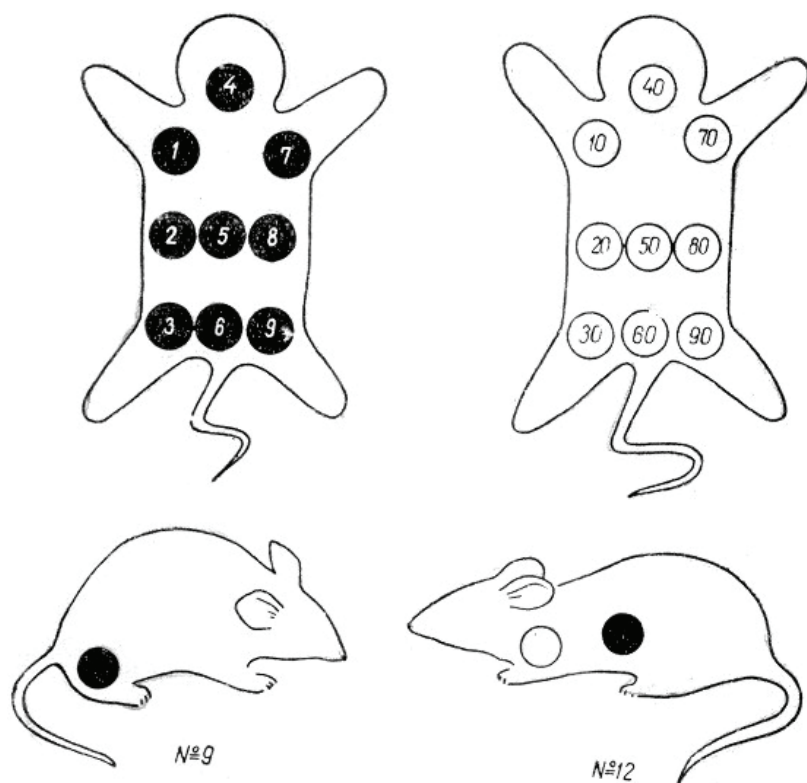


Рис. 2.1. Схема нанесення барвників для кольорового маркування тварин за Тойффелем

Загальним недоліком методів кольорового позначення є нестійкість барвників під час тривалих дослідів – вони знебарвлюються. Найкращою є пікринова кислота, що тримається на шерсті тварин протягом 2-3 місяців.

Наркоз тварин. Перед зараженням тварин застосовують загальний наркоз або місцеве знеболювання. Для наркозу мишей, хом'яків, мурчаків, тхорів, курей, кроликів та собак використовують ефір і хлороформ, для щурів та котів – ефір (тому що вони погано переносять хлороформ). Техніка введення наркотизуючих речовин полягає в інгаляції в замкненому просторі, або ж у безпосередньому використанні змоченого ватно-марлевого тампона поблизу носової чи ротової порожнини.

Місцеву анестезію проводять 5% розчином новокаїну. Для збільшення тривалості анестезії до розчину новокаїну додають 2-5 крапель розчину адреналіну у концентрації 1:1000. Анестезію слизових проводять 5% розчином новокаїну. Для збільшення тривалості анестезії до розчину новокаїну додають 2-5 крапель розчину адреналіну у концентрації 1:1000.

Перед ефірним наркозом собакам та іншим великим тваринам необхідно заздалегідь ввести анальгетик для зняття переднаркотичного збудження, наприклад, 1% розчин пропафеніну в дозі 0,2 мл на 1 кг живої ваги інтрамускулярно. Через 30 хв інтравенозно вводять тіопентал з розрахунку 20 мг на 1 кг живої ваги.

Потрібно пам'ятати, що щури погано переносять хлороформ; тхори – надто чутливі до ефіру, і незначне передозування веде до їхньої загибелі.

Використовуючи наркотизуючі речовини, треба бути обережними: у дрібних лабораторних тварин після наркозу часто спостерігається набряк легень і загибель.

Депіляція. Тварини, призначені у дослід, повинні бути підготовлені до нього за день. Одним з етапів підготовки тварин є **депіляція** (епіляція) – видалення волосся зі шкіри, коли це необхідно за умовами експерименту. Депіляцію не можна робити бритвою, тому що після гоління залишаються дрібні ураження шкіри, в які можуть потрапити збудники ранових інфекцій.

Для видалення волосся існують різні депіляційні засоби: 30-36% водний розчин односірчастого натрію, суміш сірчастого барію та оксиду цинку у співвідношенні 1:2; 10% мазь сульфату кальцію на ланоліні; сульфгідрат кальцію; сульфід стронцію, сірчастий барій та пшеничне борошно у співвідношенні 1:1 з невеликою кількістю води до пастоподібного стану та інші. Фіксація тварин. Для уникнення травм (подряпин чи укусів) при проведенні дослідів лабораторних тварин потрібно фіксувати у певному положенні. Для цього використовують спеціальні станки, циліндри з металу або плексигласу, утримувачі, ящики, де можна закріпити мордочки, лапки або саму тварину, фіксування руками, обгортання рушником тощо (рис. 2.5). Тварину можна фіксувати на спині або на животі.

За відсутності спеціальних пристроїв використовують підручні засоби – корнцанги, пінцети, рушники, рукавички та ін. Мишу беруть рукою, анатомічним пінцетом чи корнцангом за хвіст, а великим та вказівним пальцями другої руки захоплюють складку шкіри біля потилиці. Щура фіксують з допомогою двох корнцангів, захоплюючи шкіру на потилиці одним, а шкіру хвоста другим, притиснувши його щільно до столу. Хом'яка ловлять ззаду так, щоб він не бачив руки, охоплюючи його за грудну клітину. Не слід брати його в гнізді – він може укусити. Кроликів беруть за верхню частину шкіри на спині, піднімаючи догори і підтримуючи другою рукою задню частину тіла. У собак при проведенні досліджень необхідно фіксувати морду міцною вузькою стрічкою, яка зав'язується вузлом на потилиці.

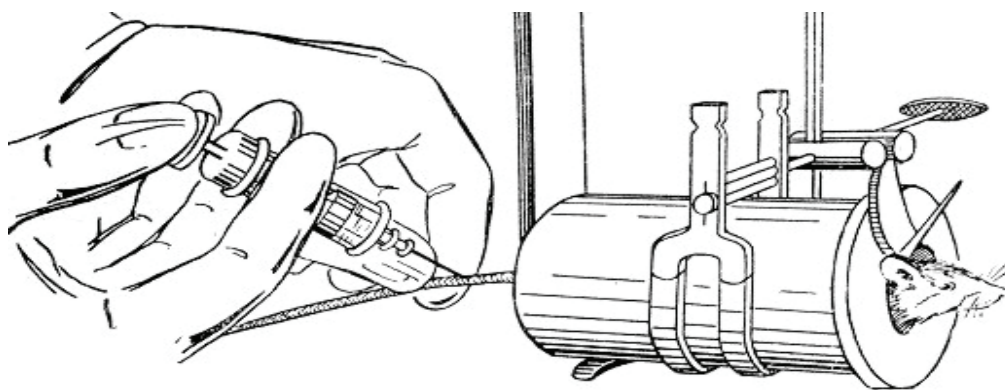


Рис. 2.2. Фіксація дрібних лабораторних тварин за допомогою циліндра

Курей фіксують руками, однією тримають ноги, а другою – крила. Мавп із клітки ловлять сітками. Передні кінцівки зв'язують за спиною. Для захисту від сильних укусів використовують товсті шкіряні рукавички. Потрібно мати на

увазі, що мавпи макаки-резуси з Південно-Східної Азії є носіями вірусу В, смертельного для людини, який належить до II групи висококонтагіозних небезпечних вірусів.

Зараження лабораторних тварин. Вибір методу ураження визначається тропізмом вірусу. Тропізм - це здатність вірусу реплікуватися в певних типах клітин організму. Віруси, що репродукуються в нервових клітинах, називають нейротропними (наприклад, вірус сказу), у клітинах шкіри – дерматропними (вірус віспи), у клітинах легень та дихальних шляхів – пневмотропними (вірус грипу), в клітинах шлунково-кишкового тракту – ентеротропними (вірус гепатиту А). Віруси, які здатні реплікуватися в декількох типах клітин, називають політропними (вірус інфекційного ринотрахеїту великої рогатої худоби – клітини органів дихання та розмноження), а в усіх типах клітин – пантропними (вірус чуми собак). Така класифікація вірусів за тропізмом називається класифікацією вірусів людини та тварин за Хюбнером.

Знаючи тропізм вірусу, матеріал вводять в органи, які містять чутливі до цього вірусу клітини (табл. 2.4). Наприклад, вірус грипу вводять у дихальні шляхи інтраназально (через ніс), вірус віспи у шкіру – субкутанно, кутанно або перкутанно (підшкірно, внутрішньошкірно та нашкірно, відповідно), вірус сказу у мозок – інтрацеребрально. Пантропні віруси швидше поширюються по організму, коли їх вводять внутрішньовенно або внутрішньочеревинно. Якщо тропізм вірусу невідомий, то використовують декілька груп тварин для ураження різними методами.

При цьому залежно від способу зараження тварини одним і тим самим вірусом використовується різний об'єм вірусомісної суспензії (табл. 2.5).

Для зниження природної резистентності тварин перед зараженням можна опромінювати рентгенівськими променями (мишей – 300 Р, мурчаків – 250-300 Р, білих щурів – 120 Р, кроликів – 600 Р) або обробляти кортизоном (5-10 мг/кг). Ці прийоми прискорюють репродукцію вірусів в організмі тварин та полегшують їхнє виділення та типування.

Потрібно зауважити, що ураження тварин може здійснюватися з різними цілями (накопичення вірусів, пасивування, титрування, одержання вакцин тощо). У всіх цих випадках введення вірусомісного матеріалу називається *ураженням лабораторних тварин*, при цьому найчастіше вірусний матеріал вводиться тварині *одноразово*.

Якщо ж метою експерименту є отримання специфічних антитіл до відповідного вірусу, то в цьому разі введення вірусомісного матеріалу називають *імунізацією лабораторних тварин*, при цьому вірус вводиться багаторазово (для отримання кращої імунної відповіді тварини) і обов'язково за певною схемою. Найчастіше, незалежно від тропізму вірусу, перше введення вірусного матеріалу проводиться внутрішньом'язово або ж підшкірно у декілька ділянок (наприклад, з внутрішнього боку всіх кінцівок тварини), а надалі – внутрішньовенно. Перше введення матеріалу робиться внутрішньом'язово та багатоточково, тому що це приводить до тривалішого депонування вірусу у місці введення, яке активно стимулює периферичні лімфатичні вузли для вироблення первинної імунної відповіді.

Таблиця 2.4.

Зв'язок тропізму вірусу зі способом ураження чутливого організму та видом патологічного матеріалу

Група вірусів за тропізмом (класифікація за Хюбнером)	Приклад вірусу	Метод ураження	Вид патологічного матеріалу
Пневмотропні	Віруси грипу, парагрипу, аденовіруси, риновіруси	Інтраназальний (аспіраційний)	Носоглоткові змиви Шматочки легенів та бронхів*
Нейротропні	Вірус сказу, віруси герпесу	Інтраспінальний Інтрацеребральний Субокципітальний	Кров Спинномозкова рідина Шматочки головного та спинного мозку і периферичних нервів*
Дерматропні	Віруси віспи, вісповакцини, герпесу	Перкутанний Кутанний Інтракутанний Субкутанний Інтравенозний Інтрамускулярний	Ділянки шкіри та слизової оболонки Кров Вміст пустул та везикул
Ентеротропні	Ентеровіруси, вірус гепатиту А	Оральний Ректальний Безпосередньо в шлунок Інтраперитонеальний	Фекалії Сеча Блювотні маси Шлунково-кишковий тракт з печінкою, селезінкою, жовчним міхуром та підшлунковою залозою*
Пантропні	Вірус чуми собак, вірус поліомієліту	Інтравенозний Інтракардіальний Інтрамускулярний Оральний Інтраназальний Інтраперитонеальний Субкутанний	Кров Лімфа Змиви носоглотки Спинномозкова рідина Екскрети Секрети Всі органи*

* - при летальних випадках (секційний матеріал)

Таблиця 2.5.

Допустимі дози досліджуваного матеріалу, що вводиться лабораторним тваринам, мл

Методи зараження	Види тварин				
	Кролі	Мурчаки	Білі щури	Білі миші	Собаки
Субкутанний	2,0-5,0	1,0-3,0	1,0-3,0	0,1-0,5	2,0-5,0
Інтракутанний	0,1	0,1	0,05	0,02	0,5
Інтрамускулярний	1,0-8,0	1,0-4,0	0,5-5,0	0,25-0,5	3,0-5,0
Інтраперитонеальний	5,0-40,0	1,0-15,0	0,5-5,0	0,5-1,0	10,0-20,0
Інтравенозний	3,0-10,0	0,5-2,0	0,5-2,0	0,5-1,0	0,5-10,0
Інтраназальний	1,0-2,0	0,3-2,0	0,05-1,0	0,03-0,05	2,0-5,0
Інтрацеребральний	0,1-0,4	0,05-0,2	0,03-0,2	0,02-0,05	0,5-0,8
Інтраспінальний	0,02-0,03	0,02-0,03	0,02-0,03	0,02-0,03	0,02-0,03
Субокципітальний	0,5-0,8	0,3-0,5	0,03-0,5	0,3-0,5	0,5-0,8

Крім цього, імунізація тварин вірусомісним матеріалом часто здійснюється з додаванням до суспензії вірусу так званих **ад'ювантів** – речовин (або їх сумішей), які додатково стимулюють імунну відповідь тварини. У вірусологічній практиці найбільш широко використовуються **ад'юванти Фрейнда** – повний і неповний. Повний ад'ювант Фрейнда містить різні мінеральні олії та завис інактивованих клітин бактерій *Mycobacterium bovis*. Його можна вводити лише один раз при першому внутрішньом'язовому введенні вірусомісного матеріалу (при так званій *першій імунізації*).

Головна вимога – експериментальне інфікування лабораторних тварин проводять з дотриманням умов повної асептики. Для цього використовують стерильний інструментарій, а місце введення інфекційного матеріалу звільняють від волосяного покриву (піддають депіляції) і знезаражують 3% розчином йоду. Винятком є два природних методи зараження, а саме інтраназальний та оральний. При кожному методі інфікування з порушенням цілісності шкіри рекомендується після зараження повторно дезінфікувати місце ін'єкції.

Інтраназальне (аспіраційне) зараження. Цей метод зараження в ніс здійснюється різними шляхами. Найчастіше використовують методику закапування інфекційного матеріалу шприцом чи піпеткою Пастера в кожную ніздрю сонній тварині, яка перебуває під наркозом (рис. 2.4). При правильно розрахованій дозі наркотичної речовини тварина глибоко втягує (аспірує) матеріал, який потрапляє в легені. При слабкому наркозі у тварини виникає чхальний рефлекс, тварина поштовхами намагається вивести матеріал з дихальних шляхів, він розбризкується і може інфікувати експериментатора та зовнішнє середовище. При надто глибокому наркозі дихання тварини стає поверховим, і матеріал погано втягується в ніздрі. У таких тварин може швидко розвинути набряк легенів, що призведе до їхньої загибелі в першу добу після зараження. Матеріал слід використовувати в малих концентраціях для запобігання виникненню токсичних явищ у тварин.

Друга методика здійснення інтраназального зараження – це введення спеціального зонду з вірусовмісним матеріалом у дихальні шляхи, трахею, бронхи.

Інша різновидність методу зараження через ніс – це інгаляція матеріалу. Дрібних тварин інфікують у спеціальних герметичних камерах, де створюють у повітрі певну концентрацію вірусу. Великих тварин заражають інгаляційно, використовуючи спеціальні герметичні маски. Розмір часток інфекційного матеріалу не перевищує 2 мкм, через це вони проникають у нижні дихальні шляхи, аж до самих альвеол. Остання методика не дуже зручна, оскільки потрібно багато вірусовмісного матеріалу.

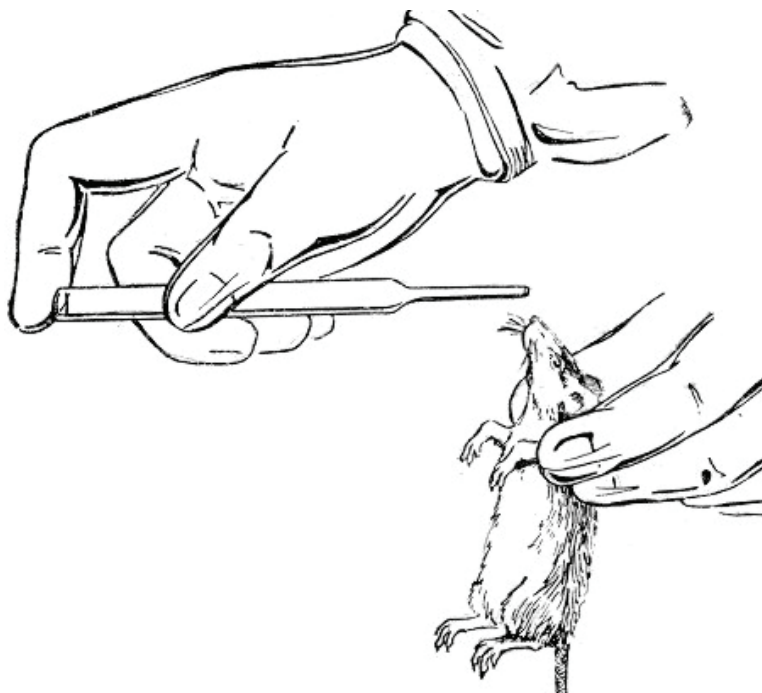


Рис. 2.3. Інтраназальне зараження мишей та шурів

Методи зараження через травний тракт. Зараження лабораторних тварин через травний тракт здійснюється трьома шляхами:

- 1) Оральний спосіб. Досліджуваний матеріал додають до сухого корму чи розчиняють у питній воді, або дають тварині у вигляді пігулок чи желатинових капсул, до складу яких вводять вірусовмісний матеріал і харчові продукти. При цьому методі тварин утримують в окремих клітках чи банках і за добу до введення не дають їжі (рис. 2.4).
- 2) Матеріал у вигляді водних сумішей можна вводити безпосередньо в шлунок з допомогою різних засобів. Це може бути канюля – скляна трубка з відтягнутим кінцем – або шприц з голкою, на якій напаяна на кінці голівка з олова, т.зв. “олива”. Так інфікують переважно мишей та шурів. Для зараження мурчаків і кроликів використовують катетери, а для інфікування мишей, хом’яків, тхорів, шурів, курей – тонкі гумові або металеві зонди діаметром 2-3 мм. Перед введенням гумовий зонд змочують гліцерином або рідким вазеліном. Металевий зонд виготовляють з трохи зігнутої голки для шприца з оливою на кінці. Зонд

повинен проходити над язиком ближче до щік по задній стінці глотки по ходу стравоходу.

- 3) Ректальне зараження лабораторних тварин вірусомісним матеріалом здійснюють через пряму кишку шляхом введення клізми, яка повинна мати температуру тіла тварини. Анальний отвір заклеюють лейкопластиром, що прискорює проникнення матеріалу в організм.

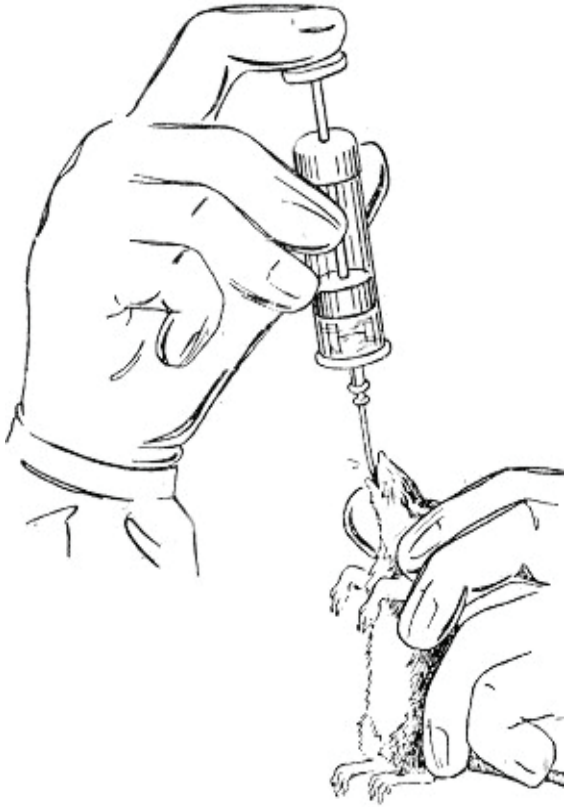


Рис. 2.4. Оральний спосіб зараження лабораторних тварин через травний тракт

Крім цих методів інфікування лабораторних тварин вірусомісним матеріалом існує значна група методів експериментального зараження, коли введення матеріалу в організм здійснюють, обминаючи шлунково-кишковий тракт. У вірусологічній практиці існує декілька методів зараження лабораторних тварин, при здійсненні яких об'єктом інфікування є шкіра тварин:

Кутанне (шкірне) зараження.

Це – так зване шкірне зараження лабораторних тварин на ушкоджену шкіру, яке здійснюється методом скарифікації. Для цього вибирають ділянку шкіри, до якої тварина не може дістати лапами чи кігтями. Для різних тварин вона різна: спина (миші, мурчаки, щури, собаки), плантарна поверхня ступні (миші, хом'яки, мурчаки), бік (кролики), живіт (кролики), груди (кури) та сім'яники (кролики).

На вибраній ділянці шкіри роблять депіляцію та оброблюють її

3% розчином йоду. Потім роблять подряпини пером Дженнера чи хірургічною голкою до появи крапель лімфи, але щоб вони не кровоточили. На ушкоджену таким чином ділянку шкіри наносять матеріал краплями і втирають скляною паличкою, лопаткою, шпателем або обстриженою зубною щіткою.

Субкутанне (підшкірне) зараження. Це метод підшкірного інфікування лабораторних тварин. Вибір місця зараження залежить від можливості сформувати складку шкіри на тілі тварини: спина (миші, щури, мурчаки, хом'яки, тхори, кролики), бік (щури, хом'яки, мурчаки, кролики), шия (кури), живіт (щури, мурчаки, кролики, мавпи), плече (мурчаки, кролики), колінна складка (мурчаки), колінний згин (мурчаки).

Вибрану ділянку шкіри депілюють, оброблюють 3% розчином йоду і трохи піднімають пінцетом або двома пальцями. В основу утвореної складки вколюють голку шприца й повільно вводять матеріал. Щоб уведений матеріал

не вилився назад, потрібно відхилити голку від первинного напрямку трохи вбік під кутом 45°.

Інтракутанне (внутрішньошкірне) зараження. Для інтракутанного (внутрішньошкірного) інфікування місце для ін'єкції готують так само, як і при субкутанному. Дуже тонку гостру голку вводять у товщу депільованої шкіри майже паралельно до її поверхні так, щоб голка просвічувалася крізь епідерміс. При введенні матеріалу поверхневий шар епідермісу трохи піднімається, утворюючи пухирець, так звану “лимонну кірку”.

Інтравенозне (внутрішньовенне) та інтракардіальне (внутрішньосерцеве) зараження. Залежно від виду та розміру тварини існують різні способи інтравенозного інфікування. Матеріал вводять у такі вени: хвостову бічну (миші, щури), гомілкову внутрішню (мурчаки), вушну крайову (кролики, мурчаки), стегнову, ліктьову, яремну (собаки, поросята, вівці, телята, лошаки), підкрильцеву (птахи). Остання знаходиться на внутрішній поверхні крила птахів, і вона рельєфно виступає при вискубуванні пір'я. Для наповнення кров'ю ці судини затискають рукою, джгутом або затискачем.

Мишам і щурам матеріал найчастіше вводять у бічні вени хвоста, розташовані по обидва боки хвоста, використовуючи для цього голки з гострим кінцем. Для розширення вен хвіст занурюють на кілька хвилин у гарячу воду (+50-55°C) або протирають ксилолом чи бензолом. Голку шприца скосом назовні вводять під гострим кутом у вену нижньої третини хвоста, де шкіра тонша, у напрямку кореня хвоста (рис. 2.5). При попаданні голки у вену матеріал легко, без опору виходить із шприца, в місці знаходження кінчика голки під шкірою не з'являється здуття, і вена біліє.

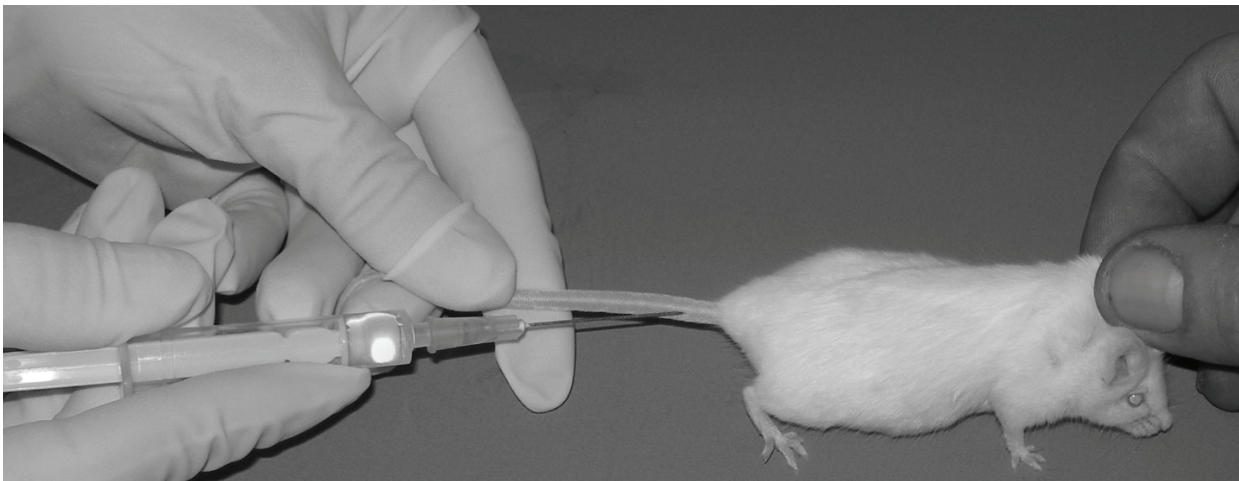


Рис. 2.5. Інтравенозне зараження миші в хвостову вену

Для проведення інтравенозного зараження мурчаків у гомілкову внутрішню вену тварину фіксують спиною догори, ножицями зрізають шкіру за ходом вени вище суглоба і відпрепаровують її від навколишньої тканини. Вище відпрепарованої ділянки вену здавлюють джгутом, вона стає чітко помітною. У білих мурчаків вену добре видно і без зрізання шкіри.

Кроликів заражають інтравенозно в крайову вушну вену, яка проходить по тонкому краю вуха на зовнішній поверхні (рис. 2.6). Шерсть уздовж краю

вуха за ходом вени вищипують, шкіру дезінфікують. Для набухання вени вухо масажують чи натирають ксилолом і передавлюють біля основи. Голку шприца вводять у вену майже паралельно до поверхні вуха. Після закінчення ін'єкції вену придавлюють нижче від місця уколу і витягають з неї голку. Місце уколу притискають сухою ватою. Зараження проводиться якнайдалі від кореня вуха, тому що при повторних уведеннях можлива облітерація судини в місці уколу.



Рис. 2.6. Інтравенозне зараження кроля у вушну крайову вену

Інтракардіальне зараження

Голку вводять перпендикулярно до поверхні тіла крізь шкіру, проколюючи грудну стінку та серцевий м'яз. На цьому етапі повинна відчуватися пульсація серця, а в голці з'явиться кров. Матеріал повільно вводять голкою безпосередньо в серце. Показником проколу серцевого м'яза є поява крові в шприці при легкому відтягуванні поршня.

Матеріал для інтравенозного та інтракардіального заражень не повинен містити значних за розміром часток та пухирчиків повітря, які можуть викликати емболію судин та раптову загибель тварини.

Матеріал для інтрамускулярного заражень не повинен містити значних за розміром часток та пухирчиків повітря, які можуть викликати емболію судин та раптову загибель тварини.

Інтрамускулярне (внутрішньом'язове) зараження. При цьому методі зараження матеріал вводять голкою майже перпендикулярно до поверхні тіла, проколюючи шкіру, підшкірну клітковину та товщу м'язів (мускулатуру) в області ший, грудей, сідниць або стегна. Легким натиском на поршень інюкують необхідну кількість матеріалу. Місцем ін'єкції у курей є великий грудний м'яз.

Інтраперитонеальне (внутрішньочеревинне) зараження. Це метод впорскування матеріалу в черевну порожнину. Спочатку тварину спеціально фіксують (тримають або підвішують) головою вниз для того, щоб внутрішні органи та кишечник опустилися до діафрагми. Місце ін'єкції визначають у нижній третині живота вище симфізу, трохи відступаючи від серединної лінії живота. Рукою злегка відтягують лапу тварини, створюючи натяг шкіри та м'язів черевної стінки. В місці проколу стінку живота захоплюють у складку, в основу якої вводять голку на глибину не більше 0,3-0,5 см. Щоб уникнути поранення кишківника та внутрішніх органів, кінець голки повинен бути тупим (сточеним). Спочатку проколюють шкіру та м'язи живота, а потім, натискаючи на голку шприца, очеревину. Проникнення у черевну порожнину відчувається за характерним тріскучим звуком та за зникненням опору черевної стінки. Після витягування голки шкіра зсовується на старе місце, закриваючи отвір у

черевну порожнину (рис.2.7). У великих тварин при інтраперитонеальному зараженні роблять невеликий (1-1,5 см) розріз шкіри, в який вводять голку шприца і проколюють очеревину.

Застосовуючи цей метод зараження тварин, треба пам'ятати, що протягом доби до інфікування їх не годують.



Рис. 2.7. Інтраперитонеальне зараження миші

Інтрацеребральне (внутрішньомозкове) зараження. При цьому методі зараження тварин матеріал вводять або під тверду мозкову оболонку, або безпосередньо в головний мозок, найчастіше в тім'яну область, яка вирізняється тонким кістковим покривом, невеликою кількістю м'язів та відсутністю значних судин.

Великим тваринам (мавпам, собакам, вівцям, свиням, лошакам тощо) зараження у мозок роблять під наркозом через трепанаційний отвір або проколом кістки черепа, фіксуючи тварину спиною догори.

Через утворений отвір (у мурчаків та кроликів близько 2 мм, а у великих тварин трохи більший) під тверду мозкову оболонку вводять голку на глибину від 2 мм (мишам) до 10 мм (мавпам) і, злегка натискуючи на поршень, впорскують матеріал малими порціями, щоб запобігти підвищенню мозкового тиску. Отвір у кістці після ін'єкції закривається зсунутою на місце шкірою, а на розрізи надкісничі та шкіри над трепанаційним отвором накладають шви, стягуючи декількома стібками шовкових ниток.

Кроликам, мурчакам і великим щурам при інтрацеребральному зараженні трепанацію черепа можна не робити. Після розсікання шкіри та надкісничі їх розсувають в обидва боки і стерильною канцелярською кнопкою проколюють черепну стінку. В утворений отвір голкою шприца вводять матеріал безпосередньо в мозок або під тверду мозкову оболонку (рис.2.8.).

Мишам та невеликим щурам черепну коробку проколюють голкою шприца. Більшості тварин ін'єкцію роблять збоку від середньої лінії на половині між верхнім краєм западини ока та зовнішнім слуховим проходом,

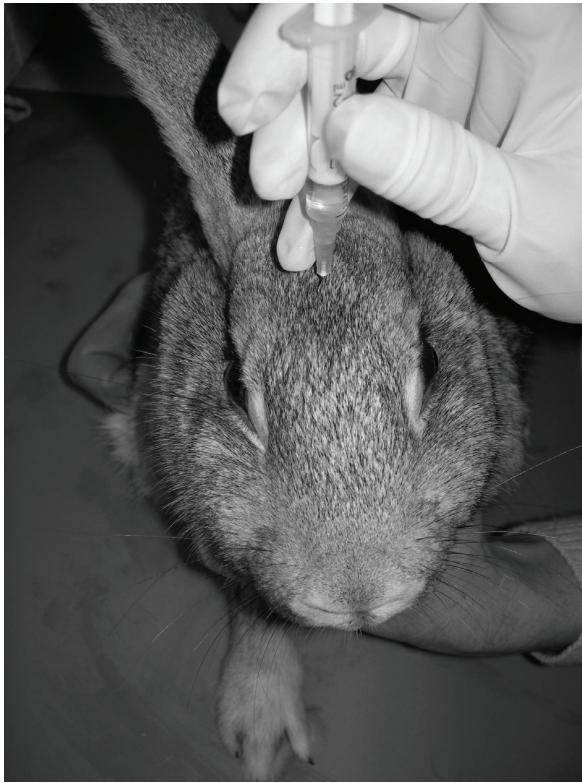


Рис. 2.8. Интрацеребральне зараження кроля

тримають косо по відношенню до середньої лінії, щоб не потрапити в орбіту. Такий спосіб менше травмує тварину, і вона переносить цю операцію без наркозу.

Корнеальне зараження. Анестезію ока проводять як і при зараженні в передню камеру ока. Очне яблуко фіксують великим та вказівним пальцями, виводячи його назовні. Обережно скарифікують рогівку гострою голкою, роблячи вертикальні та горизонтальні насічки. Матеріал наносять на рогівку і втирають його спочатку стерильним тампоном, а потім повіками.

Интракорнеальне зараження. Зараження в рогівку проводиться на тваринах, яких готують так само, як до корнеального зараження. Матеріал для інфікування вводять обережно, дуже тонкою голкою в 2-3 ділянки рогівки.

Кон'юнктивальне зараження. Цей метод інфікування тварин у сполучну оболонку ока здійснюється шляхом закапування матеріалу на неушкоджену рогівку.

Контроль за зараженими лабораторними тваринами. Інфікованих тварин розміщують в ізольованому приміщенні віварію. Після зараження тварини мають бути розміщені в клітках, на які навішують етикетки із зазначенням вірусу або номера експертизи дослідного матеріалу, кількості та номерів заражених тварин, дати зараження. У робочому журналі записують назву вірусу або номер експертизи дослідного матеріалу, кількість та характеристику заражених тварин, їхнє маркування, метод введення та дозу вірусу.

щоб не пошкодити поздовжній венозний синус. У курей прокол роблять на лінії, яка з'єднує передні краї вушних отворів, на 1-2 мм вбік від середньої лінії. Зразу ж після ін'єкції у тварин можуть з'явитися шоківі явища, які через деякий час зникають.

Кролів можна заражати без трепанації черепа через орбіту ока, де тонка кістка. Голка повинна бути тонкою, завдовжки 4-5 см із заточеним гострим кінцем. При цьому способі зараження потрібно зафіксувати тулуб кролика і притискувати голову тварини до столу. При проколі шкіру біля місця ін'єкції зсувають, щоб після неї отвір у черепі закритися шкірою, яка повертається на місце. Голку

За твариною встановлюють спостереження, звертаючи увагу на їхній зовнішній вигляд, рухливість, вживання їжі тощо. Слід зазначити, що загибель тварин у перші дні після ураження може бути пов'язана з травмою або токсичною дією дослідного матеріалу.

Ознаки розмноження вірусу в організмі лабораторної тварини. У наступні після ураження дні ведеться інтенсивне спостереження за тваринами для контролю їхнього клінічного стану. У разі розмноження вірусу чутливі до нього клітини зазвичай ушкоджуються або гинуть. При значній кількості ушкоджених вірусом клітин порушується функціонування частини або усього відповідного органу, що супроводжується змінами у стані та поведінці тварини. Так, при розмноженні вірусу в клітинах респіраторного тракту спостерігається кашель, хрипи, ускладнення дихання, при реплікації вірусу в клітинах мозку – судоми, парези та параліч.

Постійно спостерігаючи за тваринами, враховують відхилення від норми в їхній поведінці, появу специфічних ознак захворювання, відповідно до інкубаційного періоду, зважують тварин та вимірюють температуру тіла. Час спостереження за інфікованими тваринами повинен у 2-3 рази перевищувати максимальну тривалість інкубаційного періоду.

Видимі ознаки розмноження вірусу в організмі лабораторних тварин називають клінічними проявами хвороби, а їхню появу після експериментального ураження вірусом вважають непрямим доказом розмноження вірусу (табл. 2.6). При цьому враховують не лише характер викликаних вірусом змін, але й тривалість інкубаційного періоду, яка є характерною для перебігу певного захворювання. Інкубаційний період залежить не лише від властивостей збудника, але і від дози вірусу, яку ввели в організм тварини, і від способу ураження, і від стану самого організму.

Клінічні ознаки, що проявилися у лабораторних тварин, заражених з метою біопроб (виявлення вірусу), вказують на те, що в досліджуваному матеріалі міститься вірус. Ці ознаки переважно мають неспецифічний характер (наприклад, пригнічення, зниження апетиту, задишка тощо), і на цьому етапі досліджень ще немає можливості зробити висновок, який саме вид вірусу викликав захворювання. Для цього необхідно ідентифікувати виявлений вірус за допомогою серологічної реакції. При цьому невідомим антигеном є виділений вірус, що міститься в матеріалі, отриманий при розтині піддослідної тварини.

Нерідко захворювання, спричинене експериментальним ураженням тварини, завершується її загибеллю, що слугує однією з ознак розмноження вірусу. На розмноження вірусу в організмі, окрім клінічних ознак та загибелі тварини, вказують також і видимі зміни самих органів та тканин. Патологоанатомічні ознаки проявляються у зміні кольору, розміру, форми та консистенції органів, а також через появу новоутворень, які не трапляються в нормі. Отже, загалом *три головні ознаки говорять про наявність вірусу в матеріалі, яким інокулювали лабораторних тварин: симптоми, патологоанатомічні зміни та загибель*. Однак при цьому не завжди ці ознаки супроводжують розмноження вірусу в організмі. Наприклад, вірус, виділений з патологічного матеріалу коней, не може легко з клінічними проявами розмножуватися в організмі білих мишей. Протягом першого пасажу лише

окремі вірусні частки зможуть знайти для себе чутливі клітини, але їх буде настільки замало по відношенню до цілого органу, що видимих змін усього організму не виникне. Такий пасаж отримав назву *сліпого*.

Таблиця 2.6.

Розвиток патологічних симптомів у лабораторних тварин

Вірус	Тварина	Метод зараження	Симптоми
ВПГ	миші-сисунці	у мозок, черевну порожнину	судоми, спастична хода, скуйовджена шерсть, смерть
	дорослі білі миші	у мозок	
	Хом'яки	інтраназально	смерть
	кроль	на скарифіковану рогівку, в мозок	кератокон'юнктиві-ти, помутніння, виразки та рубці на рогівці, енцефаліт, що завершується смертю
Поліовірус	мавпи	зараження в мозок	розвиток паралічів
Віруси Коксакі А	новонароджені миші (оптимально одноденні миші-сисунці)		Клінічні прояви з'являються на 2-5-ий день, розвиток млявих паралічів м'язів таза, спини й кінцівок, загибель.
Віруси Коксакі В	-		Клінічні прояви з'являються на 4-9-й день, розвиток спастичних паралічів, загибель.
Альфа віруси	новонароджені миші		смерть
Вірус сказу	миші та новонароджені сирійські хом'яки		смерть

Ураженій тварині, яка не виявила ознак захворювань, проводять евтаназію (умертвіння) через інтервал часу, що відповідає тривалості двох інкубаційних періодів. При цьому відбирається відповідний патологічний матеріал, який імовірно містить накопичений вірус. Відібраним гомогенізованим матеріалом першого пасажу уражують інших тварин того ж виду. При цьому в організм потрапляє вже більше вірусних часток, здатних викликати продуктивну інфекцію (відбулася часткова адаптація вірусу до нового експериментального господаря). Однак при цьому і при другому пасажі вірус може не накопичитися до рівня інфекційної дози і не викликати видимих

змін; тоді і другий пасаж називається *сліпим*. За тим самим принципом здійснюють і третій пасаж, і у випадку появи клінічних ознак хвороби роблять висновок про наявність вірусу в досліджуваному матеріалі. Отриманий від “реагуючої” тварини матеріал вважають виділеним вірусом.

Аналогічно до цієї схеми проводив дослідження Луї Пастер з вірусом сказу, виділеним від собак. Вірус у нормі викликав швидку загибель собак, оскільки був адаптований до даного господаря. При експериментальному ураженні групи кроликів лише дуже невеликий їх процент гинув після першого пасажу, який таким чином вважався сліпим. Після другого і третього пасажів вірус набував здатності ефективно розмножуватися в організмі кроликів, про що свідчив високий відсоток їхньої загибелі протягом все меншого часу після ураження. При цьому, навпаки, вірус втрачав здатність ефективно реплікуватися в клітинах собак.

Біопробу з метою виявлення вірусу на інших лабораторних системах проводять за цим же принципом.

Віруси, для виявлення та виділення яких використовують природно сприйнятливих тварин, не потребують попередньої адаптації та проявляють себе у біопробах певними ознаками вже на першому пасажі.

Одержання патологічного матеріалу від заражених лабораторних тварин. Правильний відбір та обробка патологічного матеріалу мають дуже велике значення для успішного виявлення вірусу.

Матеріалом для виділення вірусів з інфікованого організму людей і тварин є ті біологічні рідини та тканини органів, де віруси містяться у найбільшій кількості, тобто при цьому треба керуватися тропізмом вірусів. Таким чином, простежується логічний взаємозв'язок між тропізмом вірусу (типом клітин, де він успішно реплікується), методом ураження тварини (введенням вірусомісного матеріалу саме туди, де є клітини необхідного типу) та патологічним матеріалом, який відбирають від тварини (органами, рідинами тощо, де накопичився введений вірус).

Патологічний матеріал може бути *прижиттєвим* – одержаним від живої тварини (протягом незавершеного експерименту) та *секційним* – одержаним після розтину лабораторної тварини (після завершення експерименту або ж за передчасної загибелі тварини).

До прижиттєвих матеріалів відносять такі:

Секрети – це специфічні біологічні рідини, що виділяються залозами людини і тварин. Віруси, що уражують шкіру, кон'юнктиву або слизові оболонки, звичайно елімінують з ексудатами або секретами з місць ураження.

Екскрети – це кінцеві продукти обміну речовин, які виділяються організмом назовні за участю нирок, легенів, шкіри, кишечника. Екскретами є: сеча, фекалії, піт, надлишок води, солі, вміст трахей та бронхів (при кашлі), чужорідні речовини та біологічно активні речовини, що утворилися в організмі.

Шлях виділення вірусу з організму реалізується залежно від його тропізму. Так, дерматропні віруси виділяються з ексудатами й секретами, пневмотропні віруси – з респіраторними секретами, енеротропні – з фекаліями та з мозку загиблих, а пантропні віруси – з фекаліями, сечею, носовими та іншими ексудатами.

Мазок із глотки беруть стерильним ватним тампоном, торкаючись ним до задньої стінки глотки й шпателем натискуючи на корінь язика. Тампон вміщують у 2-3 мл фізіологічного розчину, споліскують і віджимають. Одержану суспензію центрифугують при 3000 об/хв протягом 10 хв. Матеріал зберігають замороженим.

Серозну рідину з пухли не треба додатково обробляти й деконтамінувати. Для виділення вірусів її використовують одразу або зберігають замороженою.

Перед відбором матеріалу з везикул їх поверхню обробляють ефіром або ацетоном. Вміст везикул відсмоктують шприцом з тонкою голкою та переносять у фізіологічний розчин. Іноді везикули розтинають і збирають їхній вміст ватним тампоном, який потім вміщують у фізіологічний розчин.

Сеча та кал. Збирання сечі та калу у тварин здійснюють, коли проводять балансові дослідження протягом експерименту, застосовуючи або катетер, або спеціальний прилад, який дає можливість роздільного збирання екскрементів. Сечу катетером збирають у стерильну закриту посудину. За необхідності сечу освітлюють центрифугуванням при 3000 об/хв протягом 20 хв і деконтамінують, тобто звільняють від домішок супровідної мікрофлори. Для цього додають антибіотики з розрахунку 1000 ОД пеніциліну та 1000 мг стрептоміцину на 1 мл. Зберігають проби сечі замороженими. Кал після відбору поміщають у стерильні флакони з гумовими пробками для щільного закупорювання. Готують 10% суспензію на фізіологічному розчині чи розчині Хенкса. Флакон з пробкою калу старанно струшують протягом 3-5 хв, загорнувши його серветкою, змоченою 70% етиловим спиртом. Далі матеріал центрифугують (3000 об/хв протягом 20 хв) для звільнення від великих часток. Відбирають надосадову рідину і деконтамінують її. Якщо неможливо одержати проби калу, роблять мазки з прямої кишки. Ректальні тампони змочують фізіологічним розчином і вводять у пряму кишку обертальним рухом, після чого вміщують їх у флакони з фізіологічним розчином. Тампони віджимають, а з одержаної суспензії роблять 10%, як описано вище. Проби калу зберігають замороженими.

Кістковий мозок. Прижиттєве одержання кісткового мозку методом пункції можливе у всіх видів тварин і птахів. Кістковий мозок у коней одержують з грудини чи клубової кістки шляхом проколу спеціальною голкою, у кроликів – з грудини чи стегнової кістки, у птахів – з колінного суглоба чи верхньої третини плюснової кістки.

Спинномозкову рідину одержують шляхом люмбальної (спинномозкової) пункції. Відбирають певну кількість рідини у стерильний скляний посуд. Якщо немає бактеріальної контамінації, спинномозкову рідину можна використовувати для виділення вірусів без додаткової обробки. Домішки еритроцитів та інших клітинних елементів видаляють центрифугуванням при 1500 об/хв протягом 10 хв.

Відбір крові. Кров у лабораторних тварин беруть з різних вен, пункцією серця та з сонної шийної артерії шляхом кровопускання.

Невелику кількість крові відбирають із зовнішньої крайової вушної та з хвостової бічної вен у кролів, щурів і мурчаків; з кінчиків пальців передньої кінцівки у мишей, щурів, хом'яків та мурчаків; з гребня та підкрильцевої вени у птахів.

У кролів, мурчаків, тхорів кров із зовнішньої крайової вушної вени беруть після фіксації тварини. Місце розташування вени змочують спиртом, потім ксилолом, щоб викликати приплив крові у вену. Проте треба слідкувати за тим, щоб залишки ксилолу не потрапили в кров, яка від цієї речовини гемолізується. Судину здавлюють біля основи вуха і роблять надріз або пункцію залежно від розміру тварини. Голку вводять під гострим кутом майже паралельно до вени і обережно просувають у порожнину судини. Якщо кров не витікає, то голку слід повернути навколо поздовжньої осі і знову просунути вперед чи назад. Місце взяття крові сильно стискати не рекомендується, щоб запобігти потраплянню у витікаючу кров тканинної рідини, це може змінити результати досліджень. Також не рекомендується брати повторно кров з тієї самої судини.

У мишей, щурів невелику кількість крові беруть з хвостової бічної вени, як було описано раніше.

У мавп невелику кількість крові беруть з кінчиків пальців передньої кінцівки шляхом уколу пером Дженнера, скальпелем чи голкою Франка. Скарифікатори для цього не використовують через їх ускладнену очистку.

У курей кров у незначній кількості беруть з підкрильцевої вени. Для цього птаха фіксують на спині, розпрямляють крило і здавлюють вену. Після обробки шкіри спиртом вену проколюють скальпелем (голку в цю вену важко вводити) і збирають кров. Крім того, кров можна брати також з гребеня, проколюючи його або відрізаючи зубець. Щоб запобігти кровотечі, рану після взяття крові припікають або обробляють хлоридом заліза.

Одержання великої кількості крові здійснюють пункцією серця або із зовнішньої яремної, стегнової, ліктьової, підкрильцевої вен.

Пункцію серця роблять під наркозом на мишах, щурах, хом'яках, тхорах, мурчаках, кроликах, собаках, мавпах і курях після відповідної підготовки місця пункції як при інтракардіальній ін'єкції.

У мурчаків та кроликів кров беруть із серця у другому та третьому міжребер'ї, відповідно за 1,5 см та 3 см від лівого краю грудини, де відчувається серцевий поштовх. У мишей та щурів він чутний з лівого краю грудини. Ділянку на грудях депілюють та дезінфікують. Кінчиком пальця знаходять серцевий поштовх. У це місце з лівого краю грудини вколюють голку і спрямовують її перпендикулярно до серця до середньої лінії на глибину 1,5-2 см. Голка повинна подолати опір плеври, перикарда та серцевого м'яза. Якщо голка потрапила в лівий шлуночок, кров почне надходити в шприц поштовхами. Без загрози для життя тварини у мурчаків можна брати 10-15 мл крові, у кроликів – 25-40 мл, у миші – до 0,5 мл, у щура – 2-3 мл. Зразу ж після взяття крові для поповнення кровообігу необхідно ввести інтрамускулярно стерильний підігрітий до +36-38°C фізіологічний розчин (0,85% хлорид натрію) кролику – 20-25 мл, мурчаку – 10-15 мл, миші – 0,5-1 мл, щуру – 3-5 мл.

Потрібно мати на увазі, що при використанні цього методу відбору крові бувають летальні випадки, особливо у мишей, щурів, хом'яків та мурчаків.

Із зовнішньої яремної вени кров беруть у мурчаків, тхорів, хом'яків, кроликів, овець, собак, кішок та курей. Тварини повинні перебувати під наркозом (крім курей), вену треба перед взяттям крові оголити. У великих тварин (баран, вівця, кінь, корова) вену не оголюють, а використовують для зупинки кровообігу джгут, над яким і роблять пункцію. Для цього в ділянці нижньої третини шиї в яремному жолобі вистригають шерсть, шкіру дезінфікують. Вище від місця уколу накладають гумовий джгут, вводять голку по ходу добре видимої вени. Потім джгут знімають, і кров стікає у підставлену стерильну посудину.

Кровопускання через шийну артерію можна здійснити у великих наркотизованих тварин: кроликів, кіз, баранів тощо. В області шийного судинного пучка вистригають шерсть, дезінфікують шкіру. Збоку від гортані розрізують шкіру, остерігаючись пошкодити яремну вену. Обережно відводять убік грудинно-ключично-сосковий м'яз, під ним знаходять нервово-судинний пучок, який розділяють, і піднімають пінцетом шийну артерію. Стискають її зажимом, надрізають ножицями і вставляють канюлю.

У дослідженнях використовують нерозведену кров, плазму, сироватку, еритроцити, лейкоцити. За необхідності, щоб запобігти зсіданню крові, в абсолютно суху посудину наливають 1/4 частину об'єму 25% розчину сульфату магнію чи 1/2 частину об'єму напівнасиченого розчину сульфату натрію і додають свіжоотриману кров кількістю 3/4 та 1/2 частини відповідно. Використовуються також водні розчини: 20% розчин цитрату натрію чи калію, 10% розчин фториду чи оксалату натрію. З цією ж метою використовують речовини тваринного походження: гепарин, пептон, гірудин, синантрин тощо. В пробірки, градуйовані на 10 мл, наливають 0,3-0,5 мл одного з вказаних вище антикоагулянтів (консервантів) і доливають свіжу кров до мітки. Їх закривають і ретельно перемішують. Треба пам'ятати, що кров з консервантами необхідно досліджувати якнайшвидше.

Одержання сироватки крові. Для одержання *сироватки* кров збирають у пробірку, не допускаючи її спінювання. Для цього струмок крові, що витікає з судини, слід спрямовувати по стінці пробірки. Зібрану кров залишають на 1 год при кімнатній температурі або в термостаті при +37°C на 20-30 хв. Утворений згусток крові відділяють від стінки пробірки тонкою скляною або металеву паличкою, піпеткою Пастера чи металевим дротиком, обережно обводячи ними по стінці пробірки навколо згустка, і залишають на ніч в холодильнику. Одержану сироватку відсмоктують піпеткою чи шприцом з голкою в стерильний флакон, центрифугують 10-15 хв при 2000 об/хв, фільтрують через бактеріальні фільтри чи додають антибіотики (по 100-200 ОД пеніциліну та стрептоміцину на 1 мл).

Термін зберігання сироватки визначають умовами досліду. Зазвичай сироватку зберігають на холоді або при температурі від 0 до +4°C в холодильнику чи заморожуючи (-10-20°C). Щоб запобігти розвитку мікрофлори при тривалому зберіганні сироватки, її слід законсервувати, додаючи фторид

натрію, тимол (на 10 мл сироватки 5 мг чи 3 мг відповідно), мертиолят натрію, азид натрію тощо.

Одержання еритроцитів. Для одержання еритроцитів необхідно запобігти зсіданню крові, що досягається використанням антикоагулянтів або дефібринуванням за допомогою гладких скляних бус.

Свіжоотриману кров зливають в стерильну колбу з притертою пробкою та скляними бусами, що вкривають дно посудини в два шари. Кількість крові не повинна перебільшувати 1/4 об'єму колби. При взятті крові флакон з бусами необхідно безперервно струшувати з моменту заповнення посудини до повного остигання крові. Приблизно через 20 хв нитки фібрину (білка, що утворюється з білка плазми крові фібриногену під дією ферменту тромбіну) осаджуються на бусинах, а вільну від нього кров переливають в іншу посудину. Остигла дефібринована кров втрачає здатність зсідатися. Її фільтрують через стерильну марлю, і еритроцити 3-4 рази відмивають центрифугуванням в ізотонічному розчині хлориду натрію, щоразу осаджуючи еритроцити по 10-15 хв при 2000-3000 об/хв. Після останнього відмивання надосадова рідина повинна бути безбарвною і прозорою. З осаду еритроцитів, який приймають за 100% суспензію, готують суспензію відповідної концентрації на 0,85% розчині хлориду натрію чи фосфатно-буферному розчині. В такому вигляді еритроцити зберігаються протягом 3-4 днів при +4°C.

Кров у тієї самої тварини можна брати не частіше двох разів на місяць. Кількість крові, необхідну для приготування 1% суспензії еритроцитів, можна обчислити за формулою:

$$V_4 = \frac{(V_1 \cdot 1)}{100} \cdot 2^x$$

де V_4 – об'єм крові, мл; V_1 – об'єм потрібної кількості 1% суспензії еритроцитів, мл; 2^x – середній показник вмісту еритроцитів у крові (коефіцієнт); 1 – відсоток потрібної суспензії.

Приклад. Необхідно одержати 250 мл 1% суспензії еритроцитів. За формулою обчислюємо:

$$V_4 = \frac{250 \cdot 1}{100} \cdot 2 = 5(\text{мл})$$

Отже, для приготування 250 мл 1% суспензії еритроцитів треба взяти від тварини приблизно 5 мл крові. А для одержання 1% суспензії змішується 1 частина осаду еритроцитів з 99 частинами ізотонічного 0,85% розчину хлориду натрію.

Одержання плазми. За звичайних умов рідка частина крові – *плазма* – швидко зсідается, що обумовлено наявністю в ній білка фібриногену. Запобігти зсіданню крові для одержання плазми можна за допомогою додавання до неї антикоагулянтів. З цією ж метою поверхню пробірки, в яку в подальшому збиратимуть плазму, покривають шаром парафіну. Для цього в чисті центрифужні пробірки наливають по 0,5 мл розплавленого парафіну, закривають ватними пробками і автоклавують у вертикальному положенні (0,5 атм 20 хв). Перед використанням пробірки підігрівають і охолоджують при

уповільненому обертанні так, щоб парафін не потрапляв на пробки, а рівномірно розподілявся по внутрішній поверхні пробірок.

Для одержання плазми кров у тварин беруть натщесерце під наркозом і поміщають у парафіновані центрифужні пробірки, які центрифугують протягом 15 хв при 2500 об/хв. Надосадова рідина і є плазмою крові.

Одержання лейкоцитів. Суспензію лейкоцитів можна одержати двома способами. Один із них – за методом Робіно. До 30 мл крові додають гепарин з розрахунку 0,0001 мг на 1 мл крові. Суміш інкубують у похилому положенні під кутом 45° при +37°C до повного осадження еритроцитів. Для підсилення цього процесу додають 3% суспензію полівінілпірролідону з розрахунку 20-40% від об'єму крові. Повністю еритроцити осаджуються протягом 30-40 хв. Надосадову рідину центрифугують при 1500 об/хв протягом 2 хв, при цьому лейкоцити випадають в осад. Після видалення надосадової рідини осад розводять 5 мл фізіологічного розчину (рН 7.0), який додають краплями. Лейкоцити осаджують протягом 30 хв. Осад двічі відмивають фізіологічним розчином. Одержують гомогенну масу лейкоцитів.

Метод одержання лейкоцитів за Ванцетті та Каудіаном полягає в такому: до 6 мл крові в градуйованій пробірці додають 1,5 мл 3% суспензії гуміарабіку та 1,5 мл 3% цитрату натрію нейтральної реакції. Суміш збовтують і залишають на 30-40 хв для осадження еритроцитів. Поверхневий шар знімають і центрифугують при 1000 об/хв протягом 3 хв. Осад одержаних лейкоцитів суспендують у фізіологічному розчині.

Евтаназія. Після закінчення досліду тварин, що залишилися живими, піддають евтаназії, або умертвляють. *Евтаназія* – це гуманне безболісне умертвіння тварин, що вийшли з експерименту.

Умертвіння тварин здійснюється в спеціальній секційній кімнаті за відсутності інших тварин. Проводити евтаназію потрібно з максимально можливою швидкістю. Тварину умертвляють своєчасно до настання хворобливого стану і до припинення дії наркозу.

Оптимальним методом умертвіння є введення наркотичної речовини в летальній дозі. Так, собак можна умертвити, вводячи їм інтравенозно хлоралгідрат у дозі не меншій ніж 0,5 г на 1 кг живої ваги тварини або сульфат магнію 20-40 мл насиченого розчину. Треба пам'ятати, що останній може викликати збудження. Мавпам для умертвіння роблять наркоз 5% розчином тіопенталу, вводячи його або інтрамускулярно кількістю 1-2 мл на тварину (залежно від її розміру), або інтравенозно в стегнову вену дозою 1,5-2 мл на тварину (залежно від ваги тіла). Потім тварину знекровлюють через шийні кровоносні судини.

Найпоширеніший метод евтаназії таких тварин з допомогою інгаляційного наркозу ефіром, хлороформом, який здійснюють або в скляній посудині, або в спеціальній камері з кімнатною температурою. Курям відрізають голову або оглушають ударом по голові та перерізають шийні судини. Кроликів слід забивати шляхом повітряної емболії, великих тварин (дорослих собак, свиней тощо) – за допомогою електричного струму, вводячи електроди в довгастих мозок та крижі. Якщо необхідно вивчати мозок, тварину піддають миттєвому заморожуванню шляхом занурення тварини в рідкий азот.

Розтин лабораторних тварин – порядок і техніка. Перед початком розтину визначають головні зміни в організмі тварини для встановлення особливостей перебігу хвороби та відбору необхідного секційного матеріалу.

Труп тварини, призначений для розтину, спочатку оглядають, визначаючи вік, масу, будову тіла, угодваність, трупні зміни, стан шкіри та видимих слизових оболонок, поверхневих лімфатичних вузлів, скелетних м'язів, кісток, суглобів. Після цього роблять внутрішній огляд – розтин грудної та черевної порожнин, дослідження вилучених органів, розтин носової та придаткової порожнин, шиї, розтин черепа та хребта, вилучення та дослідження головного і спинного мозку.

Розтинати тварин треба якнайшвидше після їхньої загибелі, тому що в трупному матеріалі віруси швидко гинуть через протеоліз.

Для вірусологічних досліджень лабораторних тварин розтинають відповідно до методики патологоанатомічного розтину з суворим дотриманням правил *асептики*, *антисептики* та техніки безпеки.

Для того, щоб більш точно визначити забарвлення тканин і органів тварин, трупи розтинають при денному світлі.

У приміщенні для розтину (секційний зал чи спеціальна кімната) необхідно мати дезінфікуючі засоби: для обробки місця розтину – хлорне вапно чи 10% розчин їдкового натрію, а для дезінфекції трупів дрібних тварин і рук дослідника – 2-3% розчин фенолу та хлораміну, відповідно, чи 70% етиловий спирт.

Набір інструментів для розтину буває мінімальним (секційний ніж, ножі для кісток, прямі та зігнуті ножиці, скальпель, хірургічний і анатомічний пінцети, пилка і молоток-сокирка) та повним. Розтин виконують стерильними інструментами.

Перед розтином труп дезінфікують: дрібних тварин занурюють у 2-3% розчин фенолу, тримаючи за хвіст, великих – змочують шерсть по лінії розрізу 70% етиловим спиртом чи дезінфікуючим розчином. Курей на 20-30 сек. занурюють у 2% розчин карболової кислоти.

Трупи великих лабораторних тварин фіксують на спеціальних секційних столах, кюветах, пластинах чи дошках, де є пристосування для перешкоджання витоку рідини та фіксації кінцівок і голови.

Трупи дрібних тварин фіксують животом догори, приколюючи кінцівки ін'єкційними чи однострижневими (кравецькими) голками до дошки (дерева чи з пенопласту) або до кювети з парафіном. Можна використовувати спеціальну дошку з прибитими по кутах цвяхами, до яких прив'язують кінцівки тварини. Робочі поверхні всіх секційних приладів повинні бути покритими папером, насиченим дезінфікуючим розчином.

Основне правило розтину: до трупа можна доторкатися тільки інструментами чи руками в гумових рукавичках.

Розтин середніх і дрібних тварин здійснюють за певними схемами, одна з яких – *схема Вагенера* (рис. 2.9). Розріз шкіри роблять по білій лінії живота від лобкової кістки (симфізу) до шиї. Щоб при цьому не перерізати черевну стінку, пінцетом підіймають шкіру і роблять спочатку поперечний надріз складки шкіри поблизу симфіза, а потім, встроївши одну браншу ножиць в утворений

отвір, розрізують шкіру до шиї тварини. Потім лінію розрізу продовжують у напрямку всіх чотирьох кінцівок до пахвової ямки та колінної складки, які треба оголити для досліджень лімфатичних вузлів. Тупим інструментом відпрепаровують шкіру від підшкірної клітковини та мускулатури, відкриваючи клапті шкіри праворуч та ліворуч і приколуючи їх голками за верхні та нижні кути. Щоб уникнути *контамінації* секційного матеріалу вмістом травного каналу, спочатку роблять розтин грудної порожнини і беруть секційний матеріал перед розтином черевної порожнини.

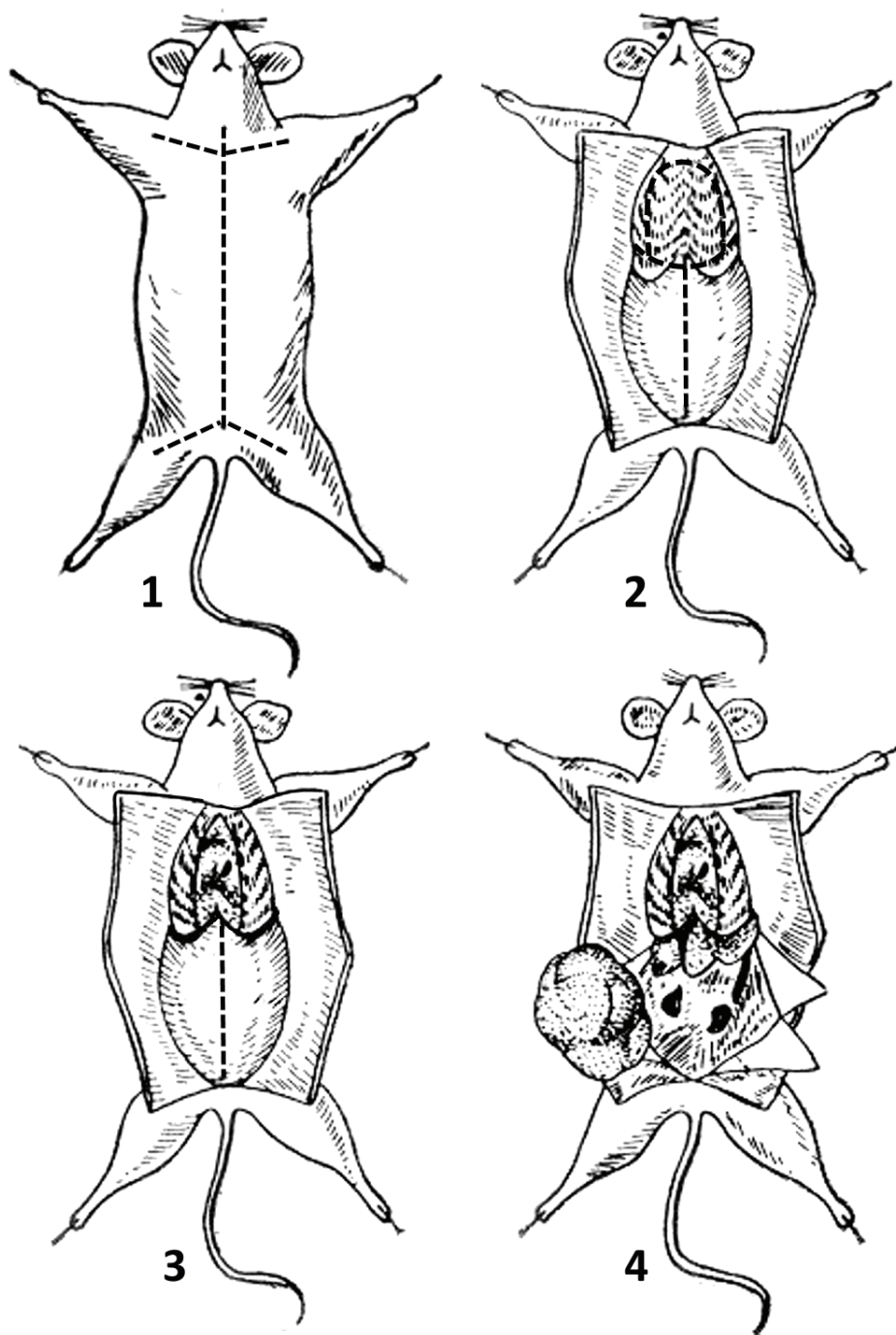


Рис. 2.9. Розтин грудної та черевної порожнин трупa лабораторної тварини за Вагенером

При розтині грудної порожнини в наддіафрагмальній області роблять поперечний розріз м'язів, пінцетом підхоплюють мечовидний відросток, а ножицями вздовж грудної кістки з двох сторін від неї перерізують ребра. Вирізану грудину разом з ребрами підіймають догори, при цьому утворюється отвір для огляду грудної порожнини. Спочатку досліджують об'єм та консистенцію легень, стан плеври (колір, блиск, тьмяність), наявність крововиливів, вузлів, еластичність тощо. Далі відзначають форму серця, стан передсердь, шлуночків, епікарду, жирової клітковини, наявність крововиливів. Розрізаючи порожнину серця, досліджують ендокард, міокард, клапани, кількість крові, її колір та ступінь зсідання. Органи і тканини грудної порожнини беруть перед розтином черевної порожнини і поміщають у стерильні флакони.

Розтин черевної порожнини роблять після заміни інструментів на стерильні. Ножицями роблять розріз від мечоподібного відростка під лінією діафрагми по білій лінії живота до лобкової кістки, відкриваючи піддіафрагмальну область і відділяючи стінку живота з обох боків від реберної дуги. Утворені трикутники черевної стінки відводять у боки і фіксують. Кишечник відтягують пінцетом вліво доти, поки не відкриються селезінка, печінка та нирки. Змінивши інструмент, видаляють органи. Огляд починають із селезінки. Визначають її розміри, краї (гострі чи округлі), колір, форму, консистенцію (щільна, м'яка, пухка), встановлюють наявність некрозів, інфарктів, крововиливів тощо. При огляді печінки визначають розміри, вид її країв (гострі, тупі), консистенцію (щільна, пухка), колір (коричневий, жовтий, сіруватий), характер поверхні (гладка, зерниста, вузлувата). При обстеженні нирок звертають увагу на їхні розміри, форму, консистенцію, стан капсули, колір. У сечового міхура визначають об'єм, стан серозної оболонки, кількість та колір сечі.

За необхідності видаляють шлунок та кишечник і досліджують їхні відділи, колір, кількість та запах вмісту.

Для дослідження центральної нервової системи, а саме головного та спинного мозку, спочатку розтинають черепну коробку, закріпивши тварину в черевному положенні шляхом фіксації передніх кінцівок і голови, шкіру голови та шиї обробляють дезінфікуючим розчином. Розріз шкіри роблять перпендикулярно до осі тіла за вухами, на потилиці і продовжують ліворуч та праворуч уперед до орбіт (рис. 2.10).



Рис. 2.10. Послідовність розтину черепної порожнини тварини (Белоусова, Троценко, Преображенская, 2006)

Шкіру разом з вухами відпрепаровують і відкидають уперед, оголюючи черепну коробку. Одну браншу ножиць вставляють у великий черепний отвір (чи у вушний отвір) і розрізають кістки черепа зліва та справа в напрямку до орбіт. Потім розрізають кістки черепа між орбітами і видаляють всю вирізану ділянку. Якщо кістки черепа товсті, їх розпилюють у тих же напрямках. Можна розрізи черепа вести від орбіт назад. Головний мозок тварин, який має м'яку консистенцію, видаляють з основи черепа, піднявши його злегка розкритими браншами ножиць і підрізавши черепно-мозкові нерви. Його досліджують з поверхні, потім поздовжнім розрізом розсікають на дві частини. Розтинають і оглядають бокові шлуночки, довгастий мозок, мозочок, амонові роги, смугасте тіло, епіфіз.

Враховуючи, що специфічні для деяких вірусів зміни можуть бути локалізовані в різних відділах головного мозку, роблять його відбитки таким чином. Мозок тварини з розтятої черепної коробки, не ушкоджуючи структури, переносять на аркуш фільтрувального паперу розміром 10×10 см, де він достатньо міцно фіксується. Браншами ножиць відрізають по вертикальній площині невеликий шматочок його і кладуть поряд на папір. Потім відрізають наступний шар мозку, який також кладуть поруч і т.д. Взявши в одну руку аркуш паперу з фіксованими на ньому шматочками мозку, другою рукою прикладають зверху до кожного по черзі предметне знежирене скельце і отримують відбитки.

Для відбору шматочків спинного мозку випилюють окремі ділянки хребта і стерильним металевим стрижнем з ватним тампоном виштовхують ділянки спинного мозку в стерильний посуд. Забирати спинний мозок необхідно з шийного, грудного та поперекового відділів. Після зняття твердої мозкової оболонки вивчають спинний мозок з поверхні і на поперечному зрізі. Відзначають чіткість меж сірої та білої речовин, колір, вологість, кровонаповнення, консистенцію, стан міжхребцевих вузлів.

Досліджуючи скелетну мускулатуру, відзначають ступінь її розвитку (атрофія, гіпертрофія), колір, консистенцію, малюнок волокон на поздовжньому розрізі, стан міжм'язової сполучної тканини.

Оглядаючи кістки, відзначають їхню цілісність, розмір, консистенцію (тверда, м'яка), вигляд надкисниці, кісткової тканини, кісткового мозку, форму суглобів, характер вмісту суглобової сумки.

Шматочки органів попередньо подрібнюють в гомогенізаторах, у банках зі скляними бусами, в фарфорових чи скляних ступках, потім емульгують, а в ряді випадків і екстрагують. Із розтертих органів готують 10% (чи іншої концентрації) суспензію на фізіологічному розчині з додаванням 10% нормальної сироватки (або без неї), бульйону чи буферного розчину. Приготовану суспензію тканин центрифугують протягом 10-15 хв при 3000-4000 об/хв, і надосадову рідину використовують для зараження лабораторних тварин. Якщо досліджуваний матеріал забруднений бактеріальною мікрофлорою, його фільтрують через бактеріальні фільтри, що затримують бактерії, чи додають антибіотики: пеніцилін та стрептоміцин у співвідношенні 1000 ОД на 1 мл інфекційної рідини. Можна додавати і антисептичні речовини (0,25-0,3%-й розчин фенолу, мертиолят натрію 1:10 000 тощо). Слід мати на

увазі, що фільтрація матеріалу через бактеріальні фільтри знижує кількість вірусів внаслідок сорбційних властивостей фільтрів, фільтрацію здійснюють тільки за достатньої кількості вірусомісного матеріалу.

Шматочки відібраного секційного матеріалу та органи зберігаються або в законсервованому вигляді у стерильному 50% гліцерині на ізотонічному розчині хлориду натрію (рН 7.4-7.6), або в замороженому при $-20-70^{\circ}\text{C}$ стані.

Досліджуваний матеріал, який не контамінується сторонньою флорою (кров, плазма, сироватка, спинномозкова рідина), може бути безпосередньо використаний для зараження модельних систем. Допустимим є розведення його фосфатно-буферним розчином рН 7,6. Якщо досліджуються шматочки тканин, вони спочатку подрібнюються в стерильних умовах до гомогенного стану, потім додається фосфатний буферний розчин, одержана суспензія центрифугується протягом 10 хв при 1500-2000 об/хв. З метою зараження використовують надосадову рідину.

Однак у багатьох випадках досліджуваний матеріал (фекалії, змиви з ротоглотки, носових ходів тощо) може містити бактеріальну флору, яка при подальшому зараженні модельних систем спотворюватиме результати досліджень, включаючи їх загибель. Тому в лабораторіях використовують методи знищення бактерій у доставлених зразках. Надійним методом є обробка матеріалу антибіотиками пеніциліном і стрептоміцином у концентрації 500-1000 ОД/мл, у разі простих вірусів – ефіром. Допустимим вважається використання спеціальних антибактеріальних фільтрів або центрифугування матеріалу при невисоких швидкостях. У цьому випадку бактерії опускаються з осадом на дно. Супернатант підлягає подальшому ультрацентрифугуванню, і його потім використовують для зараження.

Після розтину тварин і відбору патологічного матеріалу всі інструменти дезінфікують та стерилізують. Труп тварин, залишки корму та води, підстилку знищують у спеціальних лабораторних крематоріях чи кремаційних печах або піддають автоклавуванню. Металеві клітки та кормушки знезаражують вогнем паяльної лампи чи обливають бензином та обпалюють. Дерев'яні предмети оброблюють гарячими дезінфікуючими розчинами.

Застережні заходи при роботі з інфікованими лабораторними тваринами

Для догляду за лабораторними тваринами допускаються особи, що мають необхідну кваліфікацію і одержали спеціальний інструктаж з техніки безпеки роботи з інфекційним матеріалом. Осіб віком менше 18 років не слід допускати до роботи з інфікованими лабораторними тваринами. Особи, що мають захворювання шкіри чи відкриті рани, можуть бути допущені до роботи з лабораторними тваринами тільки з дозволу лікаря і за умови дотримання санітарно-гігієнічних заходів (щільні захисні пов'язки, гумове взуття тощо).

Особливу увагу слід приділяти заходам особистого захисту від небезпеки зараження. Під час роботи з лабораторними тваринами обслуговуючий персонал повинен бути одягнений згідно з існуючими вимогами в спеціальний одяг та непроникне взуття, що легко дезінфікуються. Спецодяг та взуття

повинні бути чистими, їх необхідно міняти не рідше одного разу на тиждень. Після використання гумовий одяг і взуття (фартухи, чоботи, рукавички) необхідно зразу ж вимити водою і продезінфікувати. Спецодяг слід використовувати тільки на час догляду за тваринами та їхнього обстеження, зберігати в спеціальних шафах у роздягальні окремо від повсякденного одягу.

Для осіб, що доглядають лабораторних тварин, необхідно створити умови для додержання особистої гігієни. В усіх душових кімнатах, а також у боксах, де утримуються тварини, необхідно мати посудини з дезінфікуючими засобами, гарячу та холодну воду, мило, рушник.

Під час роботи з лабораторними тваринами, особливо з птахами, необхідно стежити, щоб в приміщенні не було пилу.

Витягати тварин з кліток, брати їх у руки, проводити фіксацію, зараження, обстеження та умертвіння можуть тільки працівники, що мають досвід роботи в цій галузі. Залежно від виду тварин необхідно застосовувати відповідні допоміжні засоби (пінцети, корнцанги, зажими тощо) і використовувати певні захисні пристосування (гумові, шкіряні, металеві рукавички тощо).

До дрібних тварин по можливості не слід доторкатися незахищеними руками.

Під час досліджень з лабораторними тваринами, інфікованими патогенними для людини вірусами, роботу проводять під захисним ковпаком, за захисним екраном, у масці, захисних окулярах, рукавичках, використовуючи дихальні апарати з подачею повітря.

Інструменти, обладнання та прилади, що є в приміщенні для тварин і можуть бути заражені інфекційними збудниками, небезпечними для людини, слід дезінфікувати, якщо їх з якихось причин виносять з приміщень для тварин.

Особливу увагу слід приділяти техніці безпеки при розтині трупів інфікованих лабораторних тварин. Щоб застерегти себе та оточуючих від зараження, трупи розтинають у спецодязі. Це халат темного кольору, прогумований, гумовий чи синтетичний фартух та нарукавники, гумові чоботи чи калоші, гумові рукавички, полотняна шапочка чи марлева косинка.

Перед розтином руки миють з милом, а за наявності на шкірі рук подряпин, тріщин чи задирок їх дезінфікують спиртовим розчином йоду і закривають колодієм чи пластиром. Після закінчення розтину руки миють водою та дезінфікують 3% розчином фенолу чи хлораміну. Для знищення трупного запаху їх можна обробити 5% розчином хлоралгідрату або марганцевокислим калієм в розведенні 1:1000, а потім насиченим розчином щавлевої кислоти.

Спецодяг та інструменти обмивають водою і дезінфікують 3% розчином фенолу, хлораміну або креоліну. Приміщення чи робочий стіл після розтину трупів очищують водою і дезінфікують 3-4% розчином їдкового натрію. Трупи складають у спеціальну непроникну для рідини тару і проводять біотермічну утилізацію.

Практична робота №1

Експериментальне зараження лабораторних тварин

Завдання:

Відпрацювати прийоми маркування, наркотизації, фіксації та експериментального ураження тварин інтраназальним, інтравенозним, інтрамускулярним та інтраперитонеальним методами.

Матеріальне забезпечення:

Лабораторні тварини (білі щури або миші), разові гумові рукавички, барвники для кольорового маркування тварин (водні розчини пікринової кислоти та фуксину), ефір, вата, ексикатори, 2% спиртовий розчин йоду, скляні палички, 75% етанол, стерильні шприци на 2 мл з голками, фізрозчин, вата, піпетки Пастера, стерильні інструменти (пінцети, корнцанги), склянки для інструментів з дезрозчином, мило, рушник.

Хід роботи:

1. Демонстрація викладачем: а) огляду тварини перед експериментом; б) прийомів роботи зі стерильними інструментами, підготовки шприца та його наповнення інфекційним матеріалом; в) маркування.

2. Самостійна робота студентів: а) відпрацювання прийомів маркування, наркотизації, фіксації, депіляції та експериментального ураження тварин (фізрозчин).

Провести маркування лабораторних тварин водними розчинами фуксину та пікринової кислоти.

Наркотизувати тварину шляхом інгаляції парами ефіру в ексикаторі.

Зафіксувати тварину.

Підготувати стерильний шприц та наповнити його дослідним матеріалом для відпрацювання експериментального інфікування лабораторних тварин.

Здійснити експериментальне зараження лабораторних тварин інтраназальним, інтрамускулярним, інтравенозним та інтраперитонеальним методами.

Практична робота №2

Отримання вірусомісного матеріалу від зараженої тварини

Завдання:

1. Встановити у заражених лабораторних тварин симптоми захворювання.

2. Відпрацювати техніку розтину лабораторних тварин за Вагеном з метою визначення патологоанатомічних змін внутрішніх органів та отримання вірусомісного матеріалу.

Матеріальне забезпечення:

Лабораторні тварини (білі щури або миші), разові гумові рукавички, ефір, вата, ексикатори, пінопластові або парафінові дошки та голки для фіксації

тварин, 2% спиртовий розчин йоду, скляні палички, 75% етанол, стерильні шприци на 2 мл з голками, фізрозчин, вата, піпетки Пастера, стерильні інструменти (ножиці, пінцети, корнцанги, скальпелі), склянки для інструментів з дезрозчином, стерильні чашки Петрі для секційного патологічного матеріалу, пакети для сміття (бажано такі, що герметично закриваються), мило, рушник.

Хід роботи:

1. Демонстрація викладачем: а) огляду тварини; б) прийомів роботи зі стерильними інструментами; в) наркотизації, фіксації, г) евтаназії лабораторних тварин та розтину за Вагеном; д) відбору секційного патологічного матеріалу (мозку, легень, серця, печінки, селезінки та нирок).

2. Самостійна робота студентів: а) відпрацювання евтаназії тварин інгаляцією у замкненому просторі та подальшого розтину за Вагеном; б) відбір секційного патологічного матеріалу від лабораторних тварин та отримання вірусомісного матеріалу.

Встановити у заражених лабораторних тварин наявність чи відсутність візуальних симптомів хвороби.

Відпрацювати метод евтаназії заражених лабораторних тварин шляхом інгаляції парами ефіру в ексикаторі.

Провести розтин трупа експериментально інфікованої лабораторної тварини за Вагеном з метою виявлення патологоанатомічних змін в органах і вилучити їх (мозок, легені, серце, печінка, селезінка, нирки) у стерильні чашки Петрі.

Гомогенізація відібраних органів у фізіологічному розчині з додаванням антибіотиків (пеніцилін і стрептоміцин у концентрації 500-1000 ОД/мл).

Центрифугування 6000 об/хв впродовж 20 хв. Відбір надосаду для подальших досліджень.

Контрольні завдання:

1. Занотувати в робочі журнали:

- результати огляду лабораторної тварини перед експериментом;
- застосований спосіб маркування тварини та безпосередньо номер мітки;
- використані методи зараження тварини, тип та кількість уведеного вірусного матеріалу;
- протокол розтину трупа інфікованої лабораторної тварини з результатами огляду патологічних змін внутрішніх органів (мозку, легень, серця, печінки, селезінки та нирок), враховуючи їхню форму, колір, консистенцію, стан поверхні, наявність чи відсутність крововиливів;
- висновки про тропізм вірусу, ураженість органів.

2. Замалювати в альбоми:

- схему кольорового маркування лабораторних тварин (за методом Тойффеля; з допомогою розчинів фуксину та пікринової кислоти);
- методи ураження лабораторних тварин (інтраназальний, інтравенозний, інтрамускулярний, інтраперітонеальний);
- схему розтину лабораторних тварин за Вагеном.

Контрольні запитання:

1. З якими цілями використовують лабораторних тварин у вірусологічних дослідженнях?
2. Які недоліки застосування лабораторних тварин порівняно з іншими модельними об'єктами вам відомі?
3. Чому в конкретному вірусологічному експерименті використовується не одна лабораторна тварина, а не менше трьох?
4. Що таке модельні об'єкти? Які модельні об'єкти ви можете назвати?
5. Чим індикація вірусу в патологічному матеріалі відрізняється від ідентифікації збудника?
6. Чим пояснюється різноманіття видів лабораторних тварин?
7. Яким вимогам повинні відповідати тварини, яких відбирають для вірусологічних досліджень?
8. Дати характеристику умовам утримання лабораторних тварин.
9. Що таке канібалізм і які існують заходи його профілактики?
10. Етапи роботи з тваринами при проведенні вірусологічного експерименту.
11. Які прийоми маркування лабораторних тварин знайшли використання у вірусологічних дослідженнях?
12. Що таке тропізм вірусу? На які категорії віруси поділяються за тропізмом?
13. Який існує зв'язок між тропізмом вірусу, методом ураження тварини та досліджуваним патологічним матеріалом?
14. Які методи експериментального зараження лабораторних тварин вам відомі?
15. Як і для чого здійснюється контроль за зараженими тваринами?
16. Охарактеризувати види патологічного матеріалу, який одержують від заражених лабораторних тварин.
17. Що таке сліпий пасаж?
18. Які ознаки розмноження вірусу в організмі заражених лабораторних тварин відомі?
19. Які існують способи одержання крові у лабораторних тварин?
20. Охарактеризувати етапи одержання еритроцитів крові лабораторних тварин.
21. Техніка розтину трупа лабораторної тварини та одержання секційного матеріалу.
22. Які види патологічного матеріалу можуть бути відібрані від лабораторної тварини (у ході експерименту, а також після евтаназії тварини)?
23. Охарактеризувати застережні заходи, що застосовуються в роботі з інфікованими лабораторними тваринами.
24. Неінфікована тварина у віварії демонструє ознаки хвороби невстановленого походження. Ваші дії?
25. До вірусологічного експерименту були відібрані десять щурів. Перед їхнім зараженням було помічено, що три щури поведуться нетипово і відмовляються від їжі. Ваші дії?

26. Що є необхідною умовою вдалого інтраназального ураження лабораторних тварин вірусом грипу типу А?

27. Який спосіб зараження може бути використаний при інфікуванні лабораторних тварин вірусом простого герпесу і чому?

28. При імунізації тварини був внутрішньовенно введений повний ад'ювант Фрейнда. Як це може вплинути на швидкість вироблення імунітету та його стійкість?

29. Необхідно отримати 150 мл специфічної поліклональної антисироватки до вірусу тютюнової мозаїки. Яку лабораторну тварину доцільніше використати у даному випадку?

30. Хворіє поголів'я свиней. Ознаки хвороби: втрата орієнтації у просторі, відмова від їжі, швидка втома. Який патологічний матеріал має бути зібраний від забитої тварини для аналізу і чому?

31. При розтині тварини було помічено, що внутрішні органи грудної порожнини мають численні крововиливи. Який висновок можна зробити про тропізм та природний спосіб передачі невідомого збудника?

Література:

1. Белоусова Р.В., Троценко Н.И., Преображенская Э.А. Практикум по ветеринарной вирусологии. – 3-е. изд., переаб.и доп. – М.: Колос, 2006. –248 с. Ил.

2. Дроздов С.Г., Гарин Н.С., Джиндоян Л.С., Тарасенко В.М. Основы техники безопасности в микробиологических и вирусологических лабораториях. – М., 1987.

3. Западнюк И.П., Западнюк В.И., Захария В.А. Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте. – К., 1974.

4. Каришева А.С., Сюрин В.Н. Руководство по практической вирусологии (справочное пособие). – Кишинев: «Штиинца», 1980.

5. Лоскутова З.Ф. Виварий. – М.: Медицина, 1980.

6. Любина А.Я., Неменова Ю.М., Полеес М.Э., Чернобельская Г.М. Руководство к практическим занятиям по технике лабораторных работ. – М., 1988.

7. Патологоанатомическая диагностика вирусных болезней животных. Справочное издание / под ред. Н.И. Архипова. – М., 1984.

8. Посібник з медичної вірусології / під ред. В.М. Гиріна. – К.: Здоров'я, 1995. – 367 с.

9. Практикум із загальної вірусології / за ред. А.Л. Бойка. – К.: Видавничий центр „Київський університет”, 2000. – 269 с.

10. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования / под ред. М.О. Биргера. – М., 1973.

11. Сюрин В.Н., Белоусова Р.В., Соловьев Б.В., Фомина Н.В. Методы лабораторной диагностики вирусных болезней животных: Справочник. – М., 1986.

12. Топчий М.К., Корнюшенко Н.П. Руководство к практическим занятиям по вирусологии. – К., 1967.

13. Феннер Ф., Мак-Ослен Б., Мимс С., Сэмбрук Дж., Уайт Д. „Биология вирусов животных”. т.1. – М.: Мир, 1977. – 447 с.

14. Luckey T.D. Introduction to gnotobiology // Proceedings of the IX International Congress for Microbiology, Moscow, 1967.

Тема 3. КУРЯЧІ ЕМБРІОНИ ТА ЇХНЄ ВИКОРИСТАННЯ У ВІРУСОЛОГІЇ

Метод культивування вірусів на курячих ембріонах почали широко застосовувати після того, як Вудруфф та Гудпасчур у 1931р. описали зараження хоріоалантоїсної оболонки вірусом курячої віспи. Використання курячих ембріонів розширило спектр вірусів, що культивуються в лабораторних умовах, і дало можливість вирішувати ряд завдань вірусології, оскільки курячі ембріони мають деякі переваги порівняно з лабораторними тваринами.

Так, шкаралупа та підшкаралупна оболонка надійно захищають ембріон від бактеріального зараження з боку зовнішнього середовища. Важливою перевагою ембріонів є також їхня висока чутливість до спектру вірусів, що пояснюється недостатнім розвитком захисних механізмів і активною проліферацією клітин організму. Курячі ембріони – широко доступні об'єкти завдяки розвитку мережі птахофабрик та інкубаторів. Крім того, курячі ембріони високо економічні, оскільки не потребують догляду і годування. Недоліком цієї модельної системи є те, що неможливо повністю гарантувати її стерильність, оскільки ембріони можуть бути уражені вірусами та іншими патогенними агентами (наприклад, віруси інфекційного бронхіту курей, хвороби Ньюкасла, грипу, лейкозу, хламідії та мікоплазми).

У 40-х роках минулого століття з'явилося багато досліджень з культивування різноманітних вірусів – віспи, вісповакцини, простого герпесу, гарячки долини Ріфт, весняно-літнього енцефаліту, Омської геморагічної гарячки та інших. Було відзначено, що існує деяка вибірковість у вірусів до тієї чи іншої тканини. Віруси віспи добре розмножувались на хоріоалантоїсній оболонці, вірус паротиту – в амніоні, вірус грипу – в амніоні та в алантоїсній порожнині. І сьогодні в багатьох вірусологічних лабораторіях проводять роботу на курячих ембріонах. Ці моделі використовують майже для тих самих цілей, що й лабораторних тварин:

- виявлення вірусу в патологічному матеріалі;
- первинне виділення вірусу;
- культивування, зберігання та накопичення вірусу в лабораторних умовах;
- одержання вакцин;
- титрування вірусів;
- як тест-об'єкт для реакції нейтралізації;
- визначення ефективності противірусних препаратів.

Курячі ембріони різних строків інкубації отримують на птахофермах. Якщо такої можливості немає, то запліднені яйця можна інкубувати в лабораторії в інкубаторах або термостатах при температурі 38-39⁰С та 40-70% відносної вологості повітря.

При відборі курячих ембріонів для дослідження до них ставиться ряд вимог, зокрема такі:

- ембріони отримують із господарств благополучних по інфекційних хворобах;

- шкаралупа яєць має бути не пігментованою, чистою (мити не можна);
- вік ембріона має відповідати вибраному вірусу і методу зараження;
- інкубація при різній температурі й протягом різного часу залежно від виду вірусу (вірус грипу типу А і вірус Сендай культивують при 37⁰С, а віруси грипу типу В і С – при 35⁰С).

Зараження та розтин курячих ембріонів проводять в асептичних умовах, тобто в боксах. Весь інструментарій перед роботою стерилізують. Якщо необхідно працювати з різними видами вірусів або декількома штамми одного вірусу, треба користуватись окремими інструментами.

Будова курячого ембріона

Куряче яйце міститься в шкаралупі, через пори якої відбувається газообмін. Під шкаралупою лежить підшкаралупна оболонка. У результаті запліднення в ході дроблення яйцеклітини утворюється три зародкових шари: ектодерма, мезодерма та ентодерма, з яких розвиваються тканини й органи ембріона. Разом з розвитком плоду утворюються екстраембріональні оболонки амніон та хоріон (або серозна оболонка). Амніон розташовується безпосередньо біля зародка. Це мішок з рідиною, в якому розвивається тіло ембріона. Амніотична рідина на початку розвитку являє собою фізіологічний розчин солей, який надалі збагачується білком. Кількість амніотичної рідини на 10-11 день розвитку ембріона становить приблизно 1 мл.

Хоріон розташований безпосередньо під підшкаралупною оболонкою. На ранній стадії розвитку ембріона з нього утворюється виріст – алантоїс, що є порожнинним органом. У процесі розвитку алантоїс проходить між амніоном та хоріоном і оточує зародок разом з жовтком. Алантоїс розвивається дуже швидко, його максимальний ріст відбувається з 4-го по 13-ий день розвитку. Оболонка алантоїса частково зрощується з хоріоном, утворюючи хоріоалантоїсну оболонку (ХАО) (рис. 3.1). Це орган дихання зародка, тут розміщені кровоносні та лімфатичні судини. В останні дні розвитку ембріона хоріоалантоїсна оболонка атрофується, повітря надходить через пори шкаралупи, і курча починає дихати легеньми.

Алантоїсна порожнина – це орган виділення. На початку розвитку він заповнений прозорим фізіологічним розчином, а надалі збагачується уратами та речовинами, які містять азот і фосфор. З 12-13 дня розвитку рідина стає каламутною, а при охолодженні з неї випадає осад сечової кислоти. Кількість алантоїсної рідини досягає 6-8 мл на 11-13 день розвитку і поступово зменшується.

Ембріональні тканини з великою кількістю клітин, що швидко діляться, з високим обміном речовин є дуже сприятливим середовищем для культивування вірусів. Особливо це стосується оболонок ембріона, які багаті на клітини зародкового епітелію. Суттєву роль для розмноження вірусів відіграє жовткова оболонка, що оточує жовток. Він є органом живлення і під час розвитку поступово зменшується.

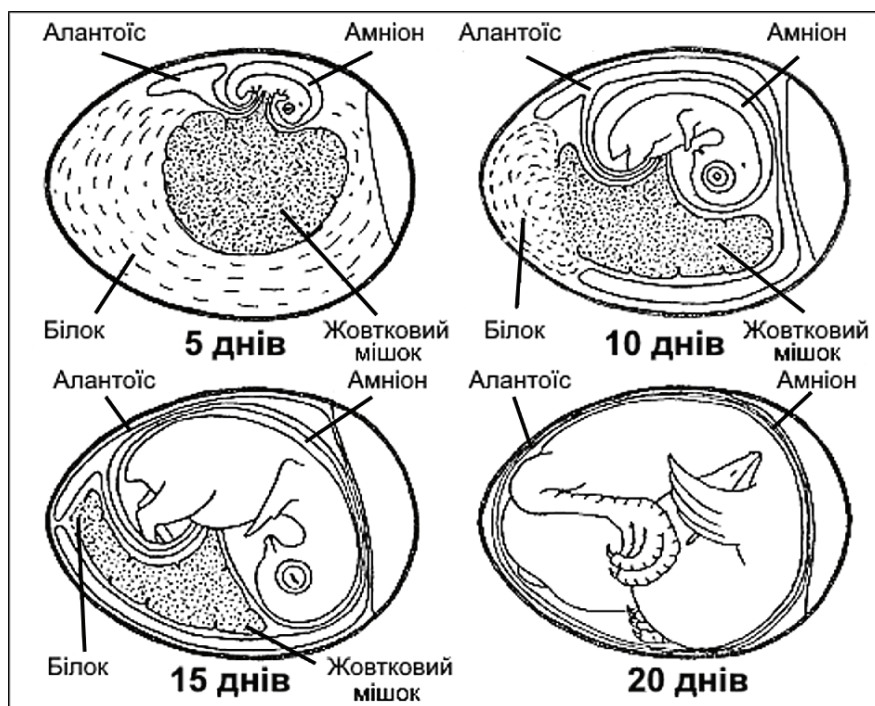


Рис. 3.1. Етапи розвитку курячого ембріона (Romanoff, 1939)

Методи зараження курячих ембріонів

У період з 5-го по 12-ий день інкубації курячі ембріони можуть бути використані для ураження вірусами. Ураження в ту чи іншу частину ембріона проводяться в період її максимального розвитку, коли кількість чутливих клітин найбільша (рис. 3.2).

Підготовка курячих ембріонів до ураження. Ембріони постачають із інкубатора. У лабораторії ембріони інкубуються в термостаті при температурі 38⁰С і вологості 60-70%. Ембріони розміщують у штативі повітряними камерами догори. Підготовка курячих ембріонів до ураження включає овоскопування та дезінфекцію шкаралупи, а також відповідну підготовку робочого місця. При овоскопуванні на шкаралупі олівцем позначають таку інформацію: межі повітряної камери, місце розміщення зародка та ділянку безсудинної зони розміром 0,5x0,5 см. Ці позначки служать орієнтиром для вибору місця введення вірусомісного матеріалу. Місця ін'єкції обробляють йодованим спиртом.

Методи експериментального ураження курячих ембріонів. Існує кілька методів ураження ембріонів. Найчастіше використовують ураження в алантаїсну порожнину та в хоріоалантаїсну оболонку, рідше – в амніотичну порожнину та жовтковий мішок і зовсім рідко – в тіло зародка та кровоносні судини хоріоалантаїсної оболонки. Вибір методу залежить від тропізму вірусу, а також мети роботи. При будь-якому методі ураження вводять 0,1-0,2 мл інфекційного матеріалу.

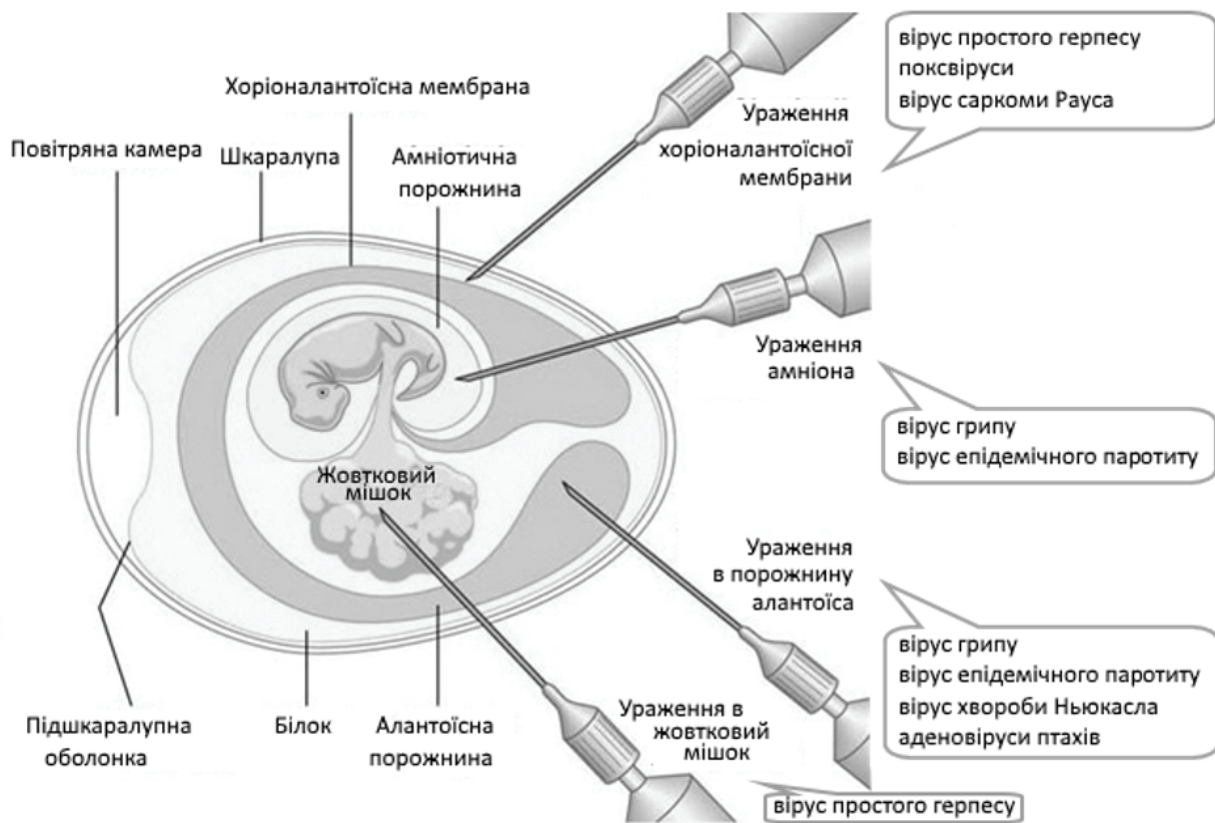


Рис. 3.2. Будова курячого ембріона та способи його ураження (Fenner, 1974)

Ураження в алантоїсну порожнину. При ураженні цим методом добре розмножуються віруси грипу, хвороби Ньюкасла, ринопневмонії коней, везикулярного стоматиту та інші. Існує кілька варіантів методу (рис.3.3).

Ембріон фіксують вертикально тупим кінцем догори. У шкаралупі на боці зародка (рис. 3.3.б) або з протилежного від зародка боку (рис. 3.3. а) роблять отвір діаметром 1 мм на 5-6 мм вище за межу повітряної камери. Голку вводять паралельно до повздовжньої осі на глибину 10-12 мм. Після ін'єкції вірусомісного матеріалу голку виймають, а отвір у шкаралупі закривають краплею розплавленого стерильного парафіну.

Інший варіант методу полягає в тому, що зроблений у шкаралупі отвір над повітряною камерою використовують лише для виходу частини повітря. Отвір для самого ураження роблять на ділянці безсудинної зони хоріоалантоїсної оболонки з боку зародка (рис. 3.3.в). Голку вводять на глибину 2-3 мм. Вводять вірусомісну рідину об'ємом 0,1-0,2 мл і закривають отвір парафіном.

Ураження в хоріоалантоїсну оболонку. Цей метод ураження курячих ембріонів використовують частіше для культивування епітеліотропних та пантропних вірусів: віспи, інфекційного ларинготрахеїту птахів, катаральної гарячки вівці та ін. Ураження може бути виконане через природну (рис. 3.4.в) або через штучну (рис. 3.3.а, рис. 3.4.б) повітряну камеру.

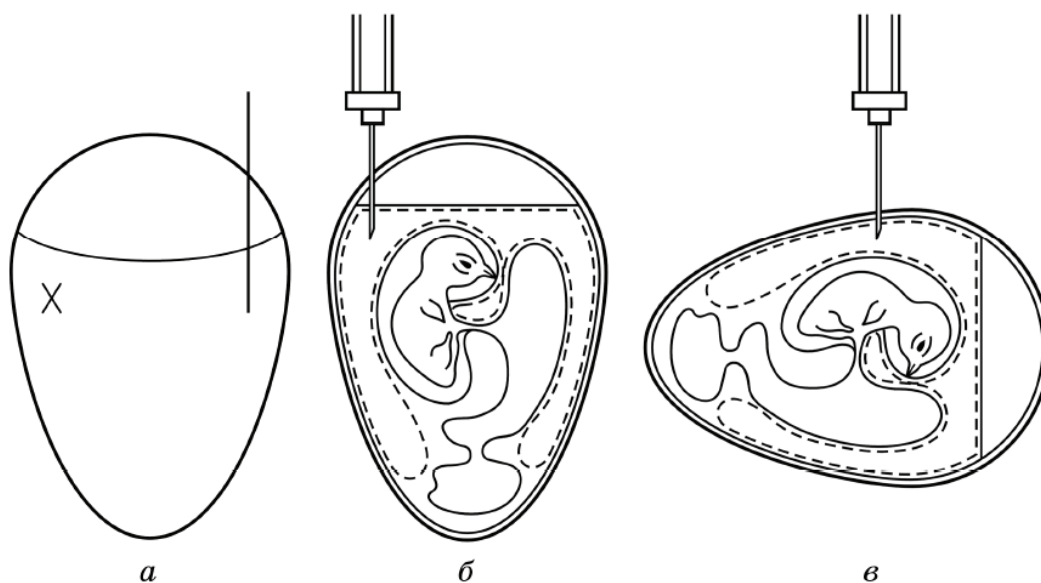


Рис. 3.3. Зараження курячого ембріона в алантоїсну порожнину
(Белоусова, Троценко, Преображенская, 2006)

Для ураження через природну повітряну камеру ембріон розміщують у штативі догори повітряною камерою і в шкаралупі проти неї вирізають віконце діаметром 15-20 мм. Через нього пінцетом знімають підшкаралупну оболонку, а на оголену ділянку хоріоалантоїсної оболонки (ХАО) наносять 0,2 мл вірусомісної суспензії, отвір закривають лейкопластиром або покривним склом, закріплюючи його парафіном.

Ураження через штучну повітряну камеру застосовують частіше, ніж через природну, тому що таке ураження забезпечує контакт вірусомісного матеріалу з більшою поверхнею ХАО і як наслідок веде до утворення більшої кількості вірусу. Для ураження ембріона цим методом його поміщають у штатив горизонтально зародком догори. У шкаралупі роблять два отвори: один невеликий над центром повітряної камери (необхідний для відсмоктування повітря), а другий діаметром 0,2-0,5 см збоку, зі сторони зародка. Складність методу полягає в тому, що, роблячи другий отвір, необхідно спочатку зняти шматочок шкаралупи, потім, не ушкоджуючи ХАО, зсунути підшкаралупну оболонку в сторону так, щоб через утворений отвір могло пройти повітря. Після цього гумовою грушею через перший отвір відсмоктують повітря з природної повітряної камери. У результаті через боковий отвір повітря заходить всередину, утворюючи штучну повітряну камеру, дном якої є ХАО.

Через боковий отвір на поверхню ХАО наносять інфекційну рідину і отвір закривають лейкопластиром. Перший отвір немає необхідності закривати, оскільки внутрішній листок підшкаралупової оболонки при цьому методі ураження не порушується і продовжує виконувати роль бар'єра для мікрофлори навколишнього середовища.

Подальша інкубація ембріонів, уражених цим методом, проводиться в горизонтальному положенні боковим отвором догори.

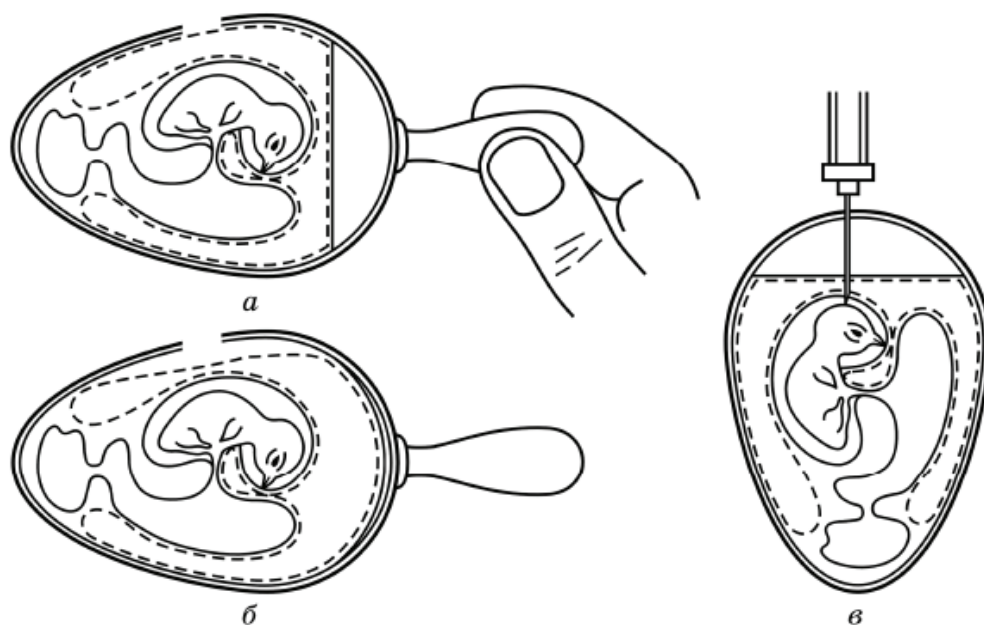


Рис. 3.4. Зараження курячого ембріона на ХОА через повітряну камеру:
а, б – штучну; в – природну (Белоусова, Троценко, Преображенская, 2006)

Ураження в жовтковий мішок. Цим методом користуються найчастіше, працюючи з вірусами хвороби Марека, ринопневмонії коней, катаральної гарячки вівці. Уражують ембріони 5-7-денного, а інколи і 2-3-денного віку (вірус гарячки долини Рифт). Використовують два варіанти ураження (рис. 3.5).

Перший варіант. Ембріони поміщають у штатив догори повітряною камерою, в шкаралупі над нею роблять розріз і вводять голку на глибину 3,5–4 см під кутом 45° до вертикальної осі в напрямку, протилежному від місця розташування зародка.

Другий варіант. Ураження здійснюють на горизонтально закріпленому ембріоні, при цьому зародок знаходиться внизу, а жовток над ним. Отвір у шкаралупі закривають краплею розплавленого парафіну.

Ураження в амніотичну порожнину. Для цього методу ураження використовують ембріони 6-10-денного віку. Метод використовується, коли культивують віруси грипу, хвороби Ньюкасла, ринопневмонії коней та ін. Є два способи ураження.

Закритий спосіб. Яйце поміщають на овоскоп у горизонтальному положенні зародком догори (рис. 3.6.а). Через отвір у шкаралупі над повітряною камерою вводять голку з тупим кінцем у напрямку до зародка. Доказом того, що голка проникла в амніон, є рух тіла зародка в напрямку руху голки.

Відкритий спосіб. Шкаралупу над повітряною камерою зрізують так, щоб утворився отвір діаметром 1,5-2,5 см (рис. 3.6.б). Через нього пінцетом знімають підшкаралупну оболонку. Потім анатомічним пінцетом захоплюють ХАО і підтягують до отвору. Притримуючи лівою рукою пінцет з фіксованою в ньому оболонкою амніона, вводять вірусомісний матеріал. Потім оболонки відпускають, отвір закривають лейкопластиром і ембріон інкубують у вертикальному положенні.

Описані методи найбільш часто використовують у лабораторній практиці. Ураження в тіло зародка та в судини ХАО застосовують рідко.

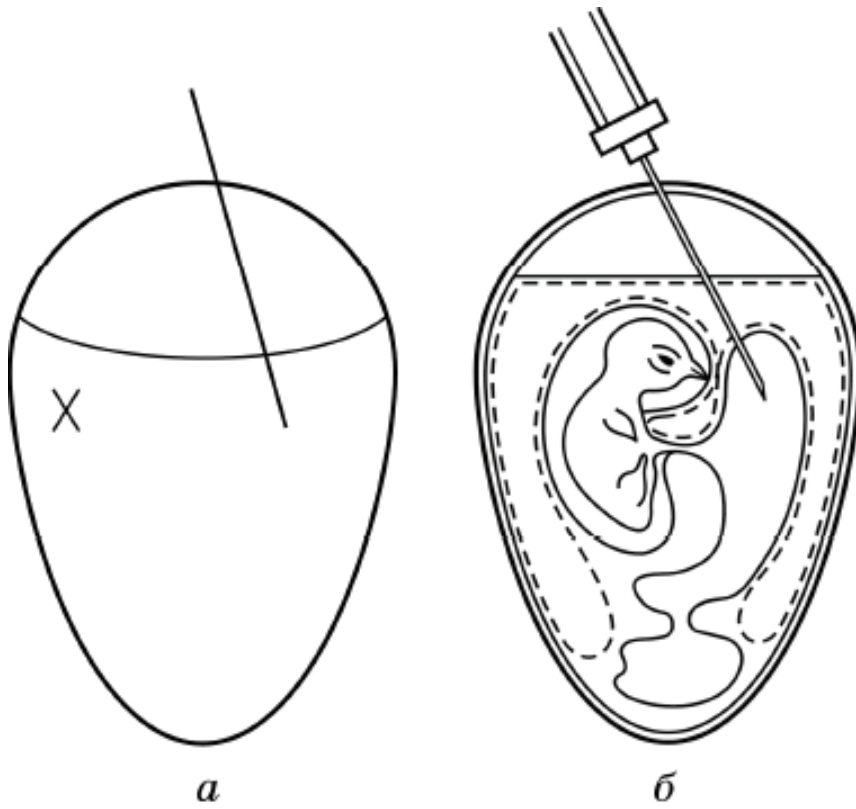


Рис. 3.5. Зараження курячого ембріона в жовтковий мішок
(Белоусова, Троценко, Преображенская, 2006)

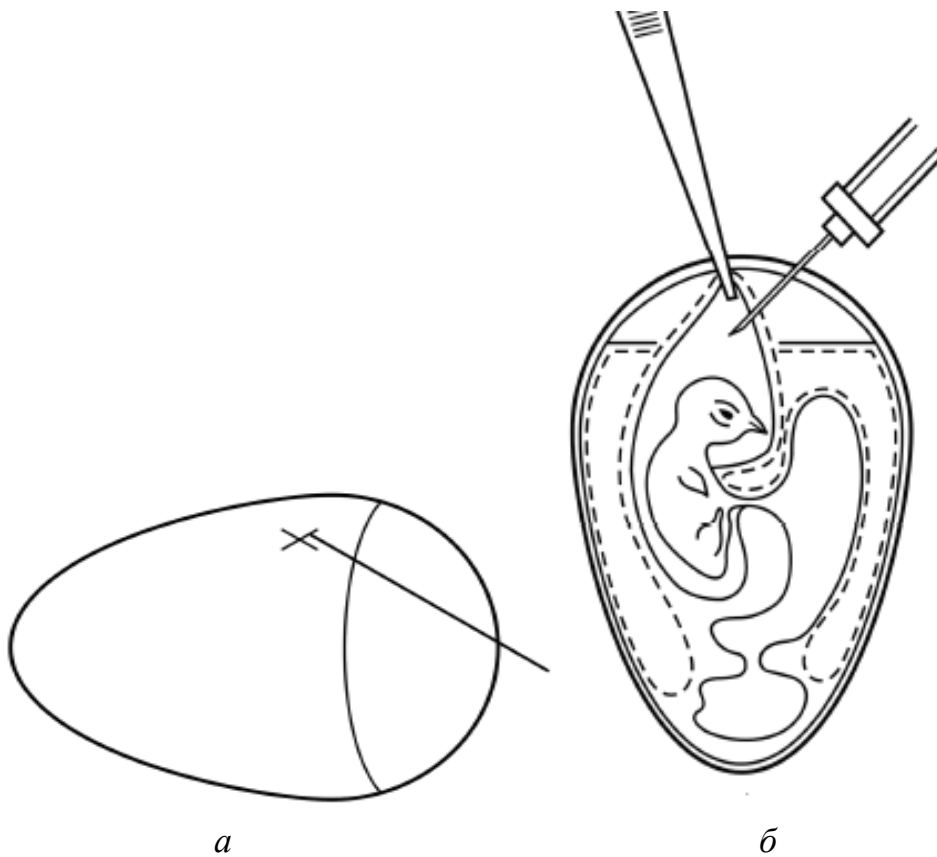


Рис. 3.6. Зараження курячого ембріона в амніотичну порожнину: *а* – закритим;
б - відкритим способом (Белоусова, Троценко, Преображенская, 2006)

Ураження в тіло зародка. Для ураження використовують ембріони 7-12-денного віку. Відомо два варіанти.

Перший варіант. Уражують так само, як і в амніон закритим способом, з тією різницею, що беруть гостру голку і на овоскопі показником потрапляння голки в тіло вважають підпорядкування зародка руху голки.

Другий варіант. Уражують так, як і в амніон відкритим способом: через отвір в шкаралупі підтягують пінцетом тіло зародка. Матеріал вводять у головний мозок чи певні частини тіла. При таких методах ураження буває значний процент загибелі ембріонів.

Описані технічні прийоми експериментального ураження курячих ембріонів мають різні варіанти (табл. 3.1.).

Таблиця 3.1.

Використання курячих ембріонів різного віку для культивування вірусів
(Белоусова, Троценко, Преображенская, 2006)

Вірус	Ембріони				Застосування цього способу ураження для					
	Вік, дні	Місце ін'єкції	Інкубація		Виділення	Пассажів	Визначення титру	Отримання АГ		Проведення реакції нейтралізації
			Год.	°С				Діагностики	Отримання вакцин	
Венесуельського енцефаломієліту коней	5-6 9-11	ЖМ, АМН та алантоїсну порожнину	До смерті	35-37	+	+	+		+	
Західного та Східного енцефаломієліту коней	9-11	АМН	До смерті	35-37	+	+	+		+	
простого герпесу	12	ХАО	72	41	+	+	+	+		+
грипу А	10	А, АМН, ЖМ	48	36	-	+	+	+	+	+
грипу В	10	А, АМН, ЖМ	72-96	35	+	+	+	+	+	+
паротиту	7	АМН, А, ЖМ	144	35	+	+	+	+		+
сказу	6-7	ЖМ	240	36	-	+	+	+	-	+
парагрипу 1	8	АМН	120-168	35	+	+	+	+	+	+
парагрипу 2	8-10	АМН, А	120-186	35	+	-	-	-	-	-
віспи та вісповакцини	12	ХАО	72	37	+	+	+	+		+
Хвороби Ньюкасла	10-11	АМН та алантоїсну порожнину			+	+	+	+		+

А - алантоїс, АМН – амніон, ЖМ – жовтковий мішок, ХАО – хоріоналантоїсна оболонка.

Деємбріоновані яйця. Вперше цей спосіб був застосований у 1949 р. Бернкопфом для культивування вірусів грипу. Пізніше цей спосіб використовували для культивування багатьох вірусів. Для деємбріонування можна використовувати яйця 11-15-добової інкубації. При овоскопуванні позначають границі повітряної камери. Видаляють ділянку шкарлупи над повітряною камерою на 5 мм вище від позначеної границі. Виявлену підшкірну оболонку та прилеглу до неї ділянку хоріоалантоїса підрізають, і ембріон разом з жовточним мішком видаляють. У шкаралупі яйця залишається хоріоалантоїсна оболонка з підшкарлупною оболонкою. Залишки жовтка, білка, крові ретельно видаляють, а порожнину, що утворилася, тричі промивають фізіологічним розчином. Потім яйце наповнюють 10-40 мл вірусомісного матеріалу (у сольовому розчині або поживному середовищі). Отвір закривають скляним ковпачком, приклеюючи його розплавленим парафіном, та інкубують яйця при певній температурі протягом визначеного часу (так, для вірусу грипу температура має бути 35-37°C). Рідину для дослідження можна відбирати через задані проміжки часу за допомогою голки шприца, знімаючи ковпачок.

Культивування вірусів у деємбріонованих яйцях проводять і з попереднім зараженням, наприклад, за 48 годин до видалення вмісту яйця, інфікуючи курячий ембріон у амніотичну або алантоїсну порожнину. Після цього строку вміст яйця видаляють, як описано вище, та деємбріоновані яйця інкубують протягом необхідного часу. При цьому спостерігається збільшення кількості вірусу.

Уражені курячі ембріони поміщають до термостату, розміщуючи їх тупим кінцем догори, для подальшої інкубації, в процесі якої проходить репродукція внесених вірусів та їхнє накопичення у відповідних структурах. Температура інкубації ембріонів варіюється від 33 до 38°C залежно від властивостей вірусу, яким було проведено ураження. За ембріонами ведуть постійне спостереження, переглядають на овоскопі.

Загибель ембріонів у перші 24 год. після ураження частіше обумовлена розмноженням грибів, бактеріальної мікрофлори, внесених в ембріон разом з інокулятом, або травмованих при ураженні. Ця загибель вважається неспецифічною. У більш пізні строки ембріони гинуть, як правило, через розмноження вірусів.

Працюючи з вірусом грипу, слід пам'ятати, що найбільше накопичення досягається при зараженні розведеним вірусом. Масовані дози дають малий вихід вірусу за рахунок утворення дефектних інтерферуючих часток (*феномен фон Магнуса*) та іноді призводять до загибелі ембріона. Тому при серійних пасажах вірусу грипу, щоб отримати культуру з високим титром, використовують його розведення в межах 10^{-3} - 10^{-4} .

Ембріони інкубують до моменту максимального накопичення вірусу. Для кожного вірусу і навіть для штаму цей термін є визначеним і варіюється в межах від 2 до 7-8 діб. Потім ембріони охолоджують при 4°C протягом 3-4 годин і розтинають.

Ознаки розмноження вірусу в курячому ембріоні

Показником ураження ембріона вірусом є його *загибель* у характерний для цього вірусу строк. Наприклад, вірус віспи спричиняє загибель заражених 10-12-денних курячих ембріонів на 3-6 добу, деякі штами вірусу інфекційного ларинготрахеїту – на 4-6 добу, вірус хвороби Марека при зараженні ХАО – на 3 добу, а при зараженні у жовточний мішок – на 8-9 добу; вірус інфекційного бронхіту курей залежно від штаму зумовлює загибель ембріонів на 2-8 добу, а вірус хвороби Гамборо – на 3-7 добу, різні штами вірусу хвороби Ньюкасла спричиняють загибель курячих ембріонів при зараженні в алантоїсну порожнину: везогенні штами (високопатогенні) – на 2-3 добу, мезогенні (штами середнього ступеня патогенності) – на 3-4 добу, а лентогенні (низькопатогенні) – на 5 добу і пізніше.

Інша ознака розмноження вірусу – *патологоанатомічні зміни*, що з'являються у різних структурах ембріона. Наприклад, на ХАО спостерігають набряк, крововиливи, вузли. Такі зміни проявляються при ураженні курячих ембріонів вірусами віспи птахів, інфекційного ларинготрахеїту птахів, хвороби Ауескі та іншими (кольорова вклейка рис. 1). Сам зародок при цьому може відставати у рості і розвитку, тобто з'являється феномен карликовості (характерно при ураженні вірусом бронхіту курей, кольорова вклейка рис. 2). Шкіра ембріона може бути гіперемійована з крововиливами (вірус вісповакцини). Внутрішні органи також можуть мати ознаки розмноження вірусу. Наприклад, набрякла жовто-зеленого або темно-зеленого кольору печінка курячого ембріона є ознакою розмноження в ньому вірусу гепатиту гусей.

Трапляються такі віруси (наприклад, лентогенний штам В1 вірусу хвороби Ньюкасла), які, розмножуючись у курячих ембріонах, не викликають ні їхньої загибелі, ні патологоанатомічних змін. Виявити такий вірус можна реакцією гемаглютинації або імуноферментним аналізом.

Інколи при розтині ембріона не вдається виявити ознак розмноження вірусу, хоча він і міститься в досліджуваному матеріалі. Такий пасаж називають “сліпим”.

Розтин курячого ембріона та отримання вірусовмісного препарату

Після закінчення інкубації ембріони охолоджують при температурі +4°C протягом 16-18 годин, досягаючи максимального звуження кровоносних судин. Для виявлення ознак розмноження вірусів у курячих ембріонів та отримання вірусовмісного матеріалу проводять їхній розтин. Розтин курячих ембріонів здійснюють із дотриманням правил асептики.

Залежно від тропізму вірусу, яким проводили ураження, вірусовмісним матеріалом можуть бути ХАО, тканини зародка, жовтковий мішок, а також алантоїсна та амніотична рідини. Екстраембріональні (алантоїсна, амніотична) рідини є готовою суспензією вірусів.

Перед розтином шкаралупу ембріона обробляють спиртовим розчином йоду. Розтин роблять стерильними інструментами в боксі. Шкаралупу зрізають над повітряною камерою (природною чи штучною), при цьому яйце тримають

під нахилом, щоб шкаралупа не впала всередину. Ножиці не повинні торкатись і пошкоджувати оболонку, що знаходиться під повітряною камерою, для цього зріз повинен проходити вище межі повітряної камери.

Алантаїсну рідину відбирають пастерівською піпеткою об'ємом до 10 мл, якою проколюють підшкаралупну оболонку і ХАО над тілом зародка (рис. 3.7.а). Амніотичну рідину об'ємом до 1 мл відбирають, вводячи піпетку в амніон між головою та тілом зародка під його шиєю (рис. 3.7.б).

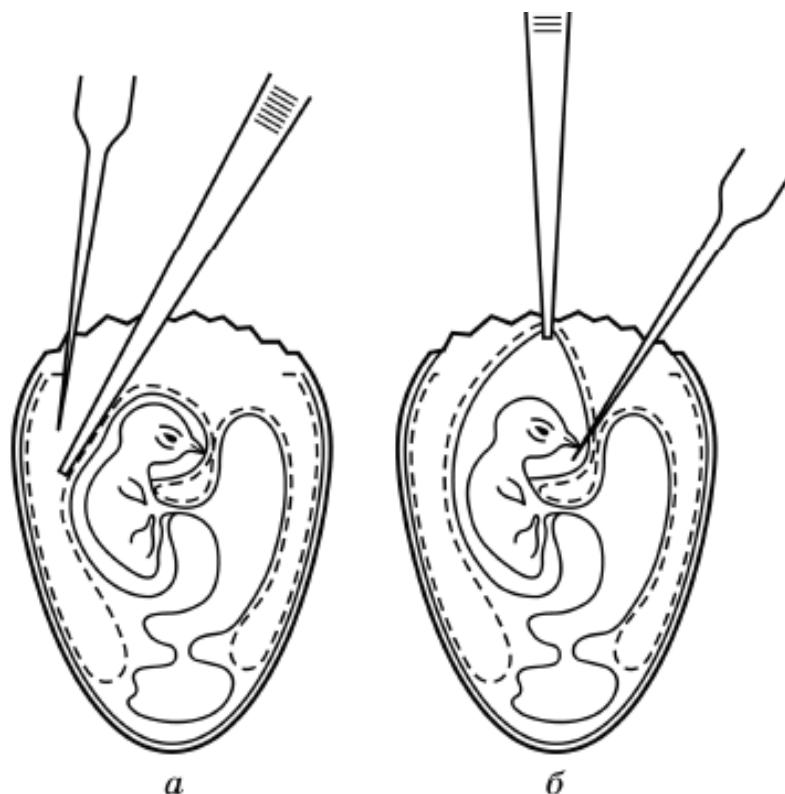


Рис. 3.7. Відбір алантаїсної (а) та амніотичної (б) рідини
(Белоусова, Троценко, Преображенская, 2006)

Хоріоалантаїсну оболонку вилучають так. Спочатку ножицями підрізують оболонку і обережно виймають ембріон разом із жовтковим міхуром та білком у чашку Петрі, отримуючи таким чином деембріоноване яйце. Саму оболонку відокремлюють від шкаралупи і кладуть в стерильну чашку. Проводять макроскопічні дослідження.

Найбільш характерні зміни, що мають вигляд невеликих, округлої форми непрозорих вогнищ запалення, білуватих, перламутрових бляшок з некротичним центром, спостерігають на оболонці. Так, зокрема індикація вірусу натуральної віспи ґрунтується на утворенні на ХАО специфічних елементів ураження – віспяних бляшок (рис. 3.8). Вони мають круглясту форму, сіро-білого кольору, з гладенькою блискучою опуклою поверхнею, діаметр – 0,5-1 мм. Після інкубації протягом трьох днів діаметр бляшок не перевищує 1 мм, вони сплюснені, з нерівними краями, що різко відрізняє їх від бляшок, утворених іншими вірусами.

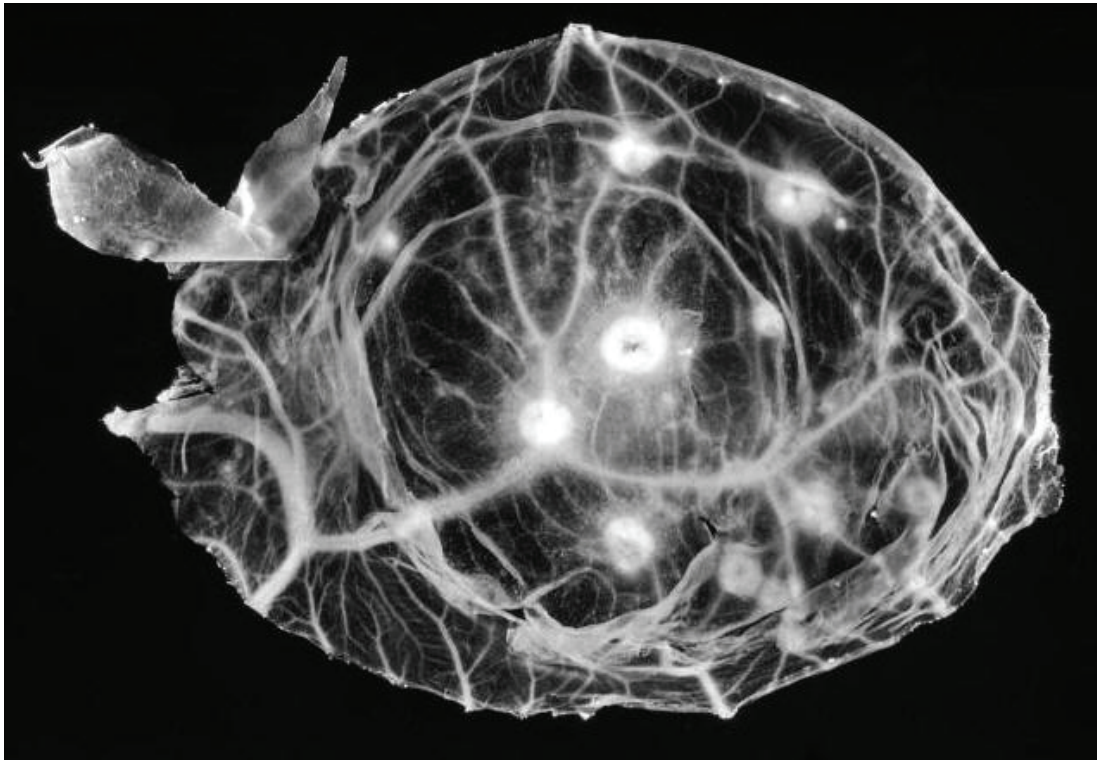


Рис. 3.8. Специфічні елементи (віспяні бляшки) ураження на ХАО після зараження вірусом натуральної віспи (за матеріалами сайту [tps://pixnio.com/science/microscopy-images](https://pixnio.com/science/microscopy-images))

Жовткову оболонку розрізають і звільняють жовток, а потім промивають ізотонічним розчином натрію хлориду.

Оболонки курячого ембріона можна зберігати у 50% розчині гліцерину на ізотонічному розчині (рН 7,2-7,4) при температурі 4°C або в морозильній камері без додавання консерванту.

Індикацію вірусів у амніотичній та алантоїсній рідині здійснюють найчастіше реакцією гемаглютинації.

Якщо за допомогою РГА або серологічними методами визначають наявність вірусів в оболонках ембріона, то ці оболонки старанно розтирають у стерильних умовах у фарфоровій ступці (зі стерильним піском) і готують 10% суспензію на ізотонічному розчині натрію хлориду. Суспензію центрифугують (2000 об/хв протягом 10-15 хв) для осадження тканинного детриту і піску. Надосадову рідину досліджують у РГА та серологічними методами.

Таким чином у вірусологічній практиці курячі ембріони використовують здебільшого для виділення вірусів з клінічного та секційного матеріалу, для культивування лабораторних штамів збудників, приготування діагностичних препаратів і первинно-трипсинізованої культури клітин, а також для одержання вакцин.

Практична робота

Культивування вірусів на курячих ембріонах

Завдання. Відпрацювати методики ураження курячих ембріонів та культивування вірусів на них. Відпрацювати техніку відбору вірусовмісного матеріалу з курячих ембріонів.

Мета: Ознайомитися з різними методами культивування вірусів на курячих ембріонах, практично оволодіти технікою інокуляції рідини, що містить вірус, та отримати вірус.

Матеріальне забезпечення: 9- та 11-денні курячі ембріони, овоскоп, непатогенний для людини вірус грипу, штативи для фіксації ембріонів, спиртовий розчин йоду, пробірки, чашки Петрі, піпетки на 2-5 мл, стерилізатори зі стерильними інструментами (шприци на 1мл, пінцети анатомічні, голки ін'єкційні, ножиці), фізіологічний розчин, дезінфікуючий розчин, маркери, таблиці зі схемою курячого ембріона та методами його ураження.

Хід роботи:

1. Ознайомитися з будовою курячого ембріона за таблицями.
2. Підготувати курячий ембріон до ураження (овоскопування, визначення місця розміщення повітряної камери, великих кровеносних судин, тіла ембріона, обробити шкаралупу йодом).
3. Підготувати шприци з вірусовмісним препаратом для ін'єкцій.
4. Уразити курячий ембріон непатогенним для людини вірусом грипу відкритим та закритим методами в хоріоналантаїсну оболонку, в алантаїсну порожнину, амніотичну порожнину, в жовтковий мішок та тіло ембріона.
5. Провести розтин уражених курячих ембріонів.
6. Отримати вірусовмісний матеріал з органів інфікованих курячих ембріонів і отримати деембріоноване яйце.

Контрольні завдання:

1. Замалювати в альбом будову курячого ембріона та основні методи ураження.
2. Скласти схему індикації вірусу вісповакцини та вірусу грипу за допомогою курячих ембріонів із зазначенням віку ембріона, методу ураження та методу відбору вірусовмісного матеріалу.

Контрольні запитання:

1. З якою метою використовують у вірусології курячі ембріони?
2. Опишіть особливості анатомії та фізіології курячого ембріона.
3. Назвіть методи зараження курячих ембріонів.
4. Від чого залежить вибраний метод зараження курячого ембріона?
5. Чим пояснюється той факт, що у вірусологічних експериментах використовуються ембріони різного віку?
6. Що таке деембріоноване яйце і з якою метою його використовують?

7. У чому полягає методика отримання вірусомісного матеріалу із органів і тканин інфікованих курячих ембріонів?
8. Які ви знаєте типи патологічних змін в органах і тканинах курячих ембріонів при вірусних інфекціях? Приклади вірусів.
9. Що таке феномен фон Магнусу?
10. Якими методами можна ідентифікувати вірус у вірусомісному матеріалі, що був отриманий на курячих ембріонах?
11. Дати характеристику вірусів, що викликають захворювання птахів.

Література:

1. Romanoff, A. L. The Avian Embryo. The Macmillan Co New York, 1960.
2. Riedel, S. Smallpox and biological warfare: a disease revisited. Baylor University Medical Center Proceedings, 2005,-18: 13-20.
3. Fenner F., McAuslan B. R., Mims C. A. The Biology of Animal Viruses. 2nd Edition, Academic Press New York, 1974, - 850p.
4. Белоусова Р.В., Троценко Н.И., Преображенская Э.А. Практикум по ветеринарной вирусологии. – М.: Колос, 2006. – 248 с., ил.
5. Гірин В.М., Порохицький О.О. Посібник з медичної вірусології. – К., 1995.
6. Каришева А.С., Сюрин В.Н. Руководство по практической вирусологии (справочное пособие). – Кишинев: «Штиинца», 1980.
7. Посібник з медичної вірусології / під ред. В.М. Гіріна. – К.: Здоров'я, 1995. – 367 с.
8. Практикум із загальної вірусології / за ред. А.Л. Бойка. – К.: Видавничий центр „Київський університет”, 2000. – 269 с.
9. Скибіцький В.Г., Панікар І.І., Ткаченко О.А. та ін. Практикум з ветеринарної вірусології К.: Вища освіта, 2005. – 208 с.: іл.
10. Топчий М.К., Корнюшенко Н.П. Руководство к практическим занятиям по вирусологии. – К., 1967. – 247с.

Тема 4. КЛІТИННІ КУЛЬТУРИ У ВІРУСОЛОГІЇ

Методи культивування клітин і тканин тварин *in vitro* набули поширення в різних галузях біології – від клітинної й молекулярної біології до сучасних біотехнологій. Нині вірусологічну лабораторію не можна уявити без такої модельної системи, як культура клітин.

Культура клітин – це збірне поняття, що визначає систему, в якій клітини багатоклітинного організму зберігають життєздатність та здатність розмножуватись *in vitro* протягом певного часу, не менше доби.

Теоретичне обґрунтування можливості культивування тканин поза організмом зробив російський дослідник Голубєв у 1874 році, а в 1885 професор Харківського університету Скворцов поставив практичні досліди по культивуванню клітин крові жаб, птахів і людини. Подібні досліди в цей час проводили й зарубіжні дослідники Ру, Борн, Лебу та інші.

Клітинні культури у вірусології використовують для первинного виділення вірусів із навколишнього середовища або з патологічного матеріалу; накопичення вірусів (наприклад, у виготовленні вакцин та діагностикумів); для підтримання штамів вірусів у лабораторних умовах; визначення інфекційного титру вірусів; вивчення динаміки взаємодії вірусів і клітин; ідентифікації вірусів; як тест-об'єкт у реакції нейтралізації; для вивчення дії антивірусних речовин.

Список типів клітин, які натеper можливо культивувати, досить великий. Це елементи сполучної тканини (фібробласти), скелетні тканини (кістки та хрящі), скелетні, серцеві та гладенькі м'язи, епітеліальні тканини (печінка, легені, молочна залоза, шкіра, сечовий міхур, нирки), клітини нервової системи (гліальні клітини та нейрони, хоча останні не мають здатності до проліферації), ендокринні клітини (наднирники, гіпофіз, клітини островків Лангерганса), меланоцити і багато різних типів клітин пухлин.

Умови культивування клітин *in vitro*

Перенесення клітин цілісного організму в штучні умови життя припиняє їхнє існування як одного з численних елементів тканини або органу, до складу яких вони раніше входили. При цьому клітини виходять із-під контролю нейрогуморальних факторів організму і набувають таких особливостей, які залежать від самого факту їхнього існування в штучних умовах. Це проявляється насамперед через пришвидшення розмноження клітин у культурі порівняно з їхнім розмноженням в організмі тварини.

Успішне культивування клітин і тканин *in vitro* залежить від багатьох чинників, зокрема таких, як:

1. *Дотримання стерильності*, яка необхідна для забезпечення захисту культур від контамінації їх бактеріями, грибами, вірусами та клітинами інших культур. Стерильними повинні бути приміщення, де відбувається маніпуляція з культурами клітин, посуд, інструменти, поживні середовища, вихідна тканина та ін.

Перш за все необхідно забезпечити захист культури від контамінації мікроорганізмами, вірусами або клітинами іншої культури. Дотримання повної стерильності є однією з головних умов у роботі з культурою клітин та тканин. Стерильними повинні бути: приміщення – бокс (операційна), де проводять маніпуляції з культурою, посуд, інструменти, поживне середовище, а також сама тканина.

У боксі (операційній) не рекомендується здійснювати роботу з інфекційним матеріалом. Необхідно проводити щоденне вологе прибирання боксу. Це приміщення обов'язково має бути оснащене бактерицидними лампами; ідеальними є пристрої, що забезпечують надходження до боксу стерильного повітря. У вірусологічній практиці роботу з культурами клітин часто проводять в операційній у спеціальних герметичних настільних боксах або камерах з ламінарною подачею повітря.

Посуд також має важливе значення для успішного культивування клітин і тканин поза організмом. Він не повинен справляти токсичної дії на культуру; форма і розміри посуду можуть варіюватися у дуже широких межах: флакони, матраци, пробірки, колби, чашки Петрі (переважно для рослинних культур) тощо. Бажано, щоб посуд було виготовлено з жаровитривалого, кислотостійкого боросилікатного скла марки “ТУ” чи “Пайрекс”.

Крім стерильності посуду, необхідно забезпечити його чистоту. Найбільш поширеним і надійним методом підготовки скляного посуду, особливо нового, є замочування протягом 3-6 годин у хромпіку (розчині біхромату калію у концентрованій сірчаній кислоті), після чого посуд багаторазово промивають водопровідною водою і ретельно споліскують дистильованою водою. Новий посуд рекомендується простерилізувати з дистильованою водою у автоклаві під тиском 1,5-2 атм. протягом 20-30 хв.

Посуд, що вже використовувався, механічно очищають від залишків середовища, ретельно миють із застосуванням звичайних мийних засобів і обов'язково споліскують дистильованою водою. Сильно забруднений посуд можна прокип'ятити у 0,5 % розчині прального порошку чи мила, добре промити і виполоскати.

Стерильні металеві інструменти для роботи в боксі занурюють у склянку з 70% етанолом і обпалюють у полум'ї пальника. Застосовують їх лише для однієї маніпуляції, після чого знову стерилізують спиртом і обпалюють. Дуже тонкі інструменти: голки, скалки леза – можуть втратити свої властивості за обпалювання, тому їх лише занурюють у спирт.

3. *Щільність популяції клітин.* Після досягнення певної межі щільності популяції клітин у певному об'ємі подальше розмноження клітин припиняється. Це стосується як клітин, що схильні до контактного гальмування, так і гетероплоїдних клітин, що формують багат шарові пласти на склі. Щільність популяції клітин у постійних культурах у суспензії не повинна перевищувати 5×10^6 кл/мл. Для перфузійних клітин у хеостатах, де періодично здійснюється подача поживного середовища й видалення продуктів метаболізму, диплоїдні, псевдодиплоїдні та гетеродиплоїдні клітинні лінії утворюють щільні популяції (2×10^9 кл/мл) та багат шарові культури.

На культивування клітин *in vitro* впливає ціла низка фізико-хімічних факторів. Хімічні фактори – це вміст поживного середовища: різні неорганічні речовини, газове середовище, вуглеводи, білки та амінокислоти, гормони, вітаміни та інші біологічно активні речовини. До фізичних факторів належать: температура, осмотичний тиск, рН середовища та освітленість (лише для рослинних культур).

4. *Вміст поживного середовища.* Успішне культивування клітин і тканин *in vitro* залежить від неорганічних речовин, вуглеводів, білків, амінокислот, гормонів, вітамінів та інших біологічно-активних речовин, газового середовища.

Окрім речовин, що регулюють осмотичний тиск та концентрацію водневих іонів, для усіх клітин необхідна наявність інших неорганічних речовин: іонів калію, кальцію, магнію, заліза, карбонатів, фосфатів, сульфатів. Іон калію необхідний для підтримки осмотичного тиску середовища. Іони кальцію та магнію потрібні для функціонування деяких внутрішньоклітинних ферментів, до того ж іон кальцію впливає на стан клітин у вигляді золю та гелю. Обидва цих іони необхідні для росту клітин на поверхні скла. Залізо необхідне для деяких дихальних пігментів, особливо цитохромів. Більша частина енергії клітини підтримується у формі макроергічних зв'язків, та для обміну енергії необхідний фосфор, він же відіграє роль буфера. Для клітин, які синтезують сірковмісний мукополісахарид, обов'язкова наявність у середовищі сульфату.

Двоокис вуглецю є продуктом обміну, який одразу зв'язується з катіонами середовища. Іон двоокису вуглецю виконує функцію буфера в більшості поживних середовищ. Для підтримання певного тиску двоокису в атмосфері його додатково вводять у посудини для культивування чи закривають їх герметично, і той двоокис, що утворився в процесі культивування, зберігається.

5. *рН середовища.* Для найкращого росту більшості клітин *in vitro* оптимальним вважається рН біологічних рідин між 7,2-7,6. Небажаним є відхилення рН від меж 6,8-7,8. Якщо рН нижчий за 6,8 та вищий за 7,8, багато типів клітин гине впродовж 24 годин, проте іноді відзначається ріст і диференціація клітин при вищому від 8,0, а також підтримання життєдіяльності клітин при рН нижчому ніж 6,6.

6. *Температури культивування.* Для більшості клітин ссавців і птахів оптимальною є температура 37-38,5 °С. Якщо температура підвищується, це згубно діє на клітини, і при температурі 50 °С клітини гинуть протягом однієї години (відбувається денатурація білкових молекул). Епітеліальні клітини шкіри та інших тканин ембріона людини краще ростуть при температурі 35-36 °С. Більшість клітин риб культивують при температурі не вищій за 20°C. Тканини амфібій також краще виживають при низькій температурі.

За умови зниження температури (нижче 0°C) зменшується проліферативна активність клітин, тобто зменшується їхній ріст; а за температури -70°C клітини впадають у стан анабіозу і можуть зберігатися протягом тривалого часу. Швидкість зниження температури не повинна перевищувати 1° за 1 хв.

7. *Осмотичний тиск.* Для клітин ссавців оптимальним при 37-38 °С є тиск 7,6 атм, хоча клітини можуть переносити значні коливання тиску, якщо ці коливання відбуваються не дуже швидко. Осмотичний тиск визначається переважно іонами хлористого натрію, інші іони також суттєво впливають на осмотичний тиск, оскільки він значно збільшується при підвищенні концентрації глюкози.

Поживні середовища

Після видалення клітин з тканин або організму та перенесення їх у культуру середовище має підтримувати всі зовнішні умови, які клітини мали *in vivo* й забезпечувати виживання клітин, їхню проліферацію та диференціювання. Позаклітинне середовище має надавати усі необхідні речовини для росту і виживання клітин, зокрема забезпечувати клітини поживними та гормональними факторами.

Культури клітин ставлять певні вимоги до рідкої (поживне середовище), газоподібної (концентрація газів) та твердої (поверхня субстрату) фаз. Поживне середовище є розчином певного складу, до якого додають компоненти біологічного походження (плазму, сироватку крові, тканинні екстракти тощо). Основу поживних середовищ становлять сольові розчини. Мінеральні компоненти у цих розчинах дібрані так, що розчин виконує буферні функції, підтримуючи постійний кислотно-лужний баланс середовища в процесі культивування. Постійність рН середовища є однією з головних вимог до умов культивування.

Для приготування поживних середовищ найчастіше використовують сольові розчини Ерла та Хенкса. Розчини можуть мати малий вміст бікарбонатного буфера (розчин Хенкса), вони призначені для підтримання рН в щільно закритих посудинах. У інших (розчин Ерла) бікарбонату більше, вони використовуються у системі з підвищеним парціальним тиском CO₂. Якщо культури утримуються поза CO₂-інкубатором, де важко підтримувати рН, виникає необхідність у альтернативних буферних системах. Добрим буфером є HEPES 4-(2-оксиетил) піперизинетансульфонова кислота. HEPES легко розчиняється у воді, не зв'язує двовалентні катіони, не цитотоксичний у концентрації 0,05 Моль. Використовується у концентрації 0,01-0,03М.

Розрізняють природні та штучні (синтетичні і напівсинтетичні) поживні середовища. Природні середовища складаються із суміші сольового розчину, сироватки крові, тканинного (ембріонального) екстракту, коров'ячої амніотичної рідини та інших компонентів. Кількісний вміст кожного з компонентів у різних сумішах середовищ значно варіюється. Цей тип середовищ використовують рідко.

Натепер переважно використовують штучні поживні середовища. До *напівсинтетичних* поживних середовищ належать гідролізати різних білкових продуктів (гідролізат лактальбуміну, гемогідролізат, м'язовий ферментативний гідролізат, амінопептид та ін.). Серед *синтетичних* поживних середовищ найбільш широко застосовують середовище 199, середовища Ігла (MEM – minimal essential medium та BME – basal medium Eagle), середовище Дульбекко

(DMEM – Dulbecco's modified Eagle's medium) та середовище RPMI (розроблене у Roswell Park Memorial Institute, звідси і назва). До їхнього складу входить більш ніж 60 компонентів (амінокислоти, вітаміни, компоненти нуклеїнових кислот, джерела ліпідів та вуглеводів, мінеральні солі та ін.).

У всі поживні середовища та деякі сольові розчини для визначення рН додають індикатор – *феноловий червоний* (в концентрації 0,002%, яка не має токсичного впливу на клітини і віруси). Додавання індикатора дає можливість визначити момент закислення поживного середовища продуктами метаболізму клітин до рівня, який потребує заміни поживного середовища на нове (рН<7; середовище забарвлюється в жовтий колір). При підвищенні рН розчин набуває червоно-малинового кольору. При нейтральному рН (7,2-7,4) колір середовища жовтогарячий. Для регулювання рН сольових розчинів та поживних середовищ використовують 7,5% розчин бікарбонату натрію та 3% розчин оцтової кислоти.

Нормальні клітини, що зберігають специфічні функції, на стандартних середовищах не розмножуються (якщо вони не трансформовані). Для оптимального росту клітин як правило додають 5-20% фетальної (ембріональної) сироватки крові.

Сироватка є надзвичайно складною сумішшю, яка здатна не лише стимулювати, але й гальмувати ріст клітин. До головних функцій сироватки відносять: забезпечення гормональними факторами, що стимулюють ріст клітин та їхні функції; забезпечення факторами прикріплення та розпластування клітин (створення біоматриксу); забезпечення транспортними білками, що переносять гормони, мінеральні речовини, ліпіди та ін. Білки сироватки, які безпосередньо або специфічно беруть участь у стимуляції клітинного поділу, називають факторами росту (фактор росту фібробластів, фактор росту епідермісу, інсулін тощо). Щоб переносити низькомолекулярні фактори (вітаміни, амінокислоти, ліпіди тощо), необхідні транспортні білки, наприклад, альбумін. Транспортування заліза забезпечує трансферин. До факторів прикріплення та розпластування належать колаген і фібронектин та більш спеціалізовані хондронектин (адгезія хондроцитів) і ламінін (адгезія епітеліальних клітин).

Незважаючи на широке застосування сироваткових поживних середовищ, розроблені й безсироваткові поживні середовища. Ці середовища є вузько специфічними, тобто призначені для певного типу клітин. Безсироваткові середовища мають ряд переваг: покращення відтворення результатів дослідів на культурах, що пасивуються, внаслідок більшої стабільності складу середовища (властивості сироватки можуть змінюватися від партії до партії); зниження ризику зараження культури вірусами, грибами, мікоплазмами; зниження вартості (особливо щодо ембріональної сироватки ВРХ); полегшення очищення продуктів клітинного метаболізму; зниження впливу додаткових білків на результати біологічних досліджень; відсутність цитотоксичності сироватки; відсутність багаточисельності росту фібробластів у первинній культурі; селективне культивування диференційованих клітин та клітин, що відрізняються функціонально, з гетерогенних популяцій первинної культури без переважної стимуляції окремих субпопуляцій.

Усі поживні середовища за функціональним призначенням можна поділити на **ростові** та **підтримуючі**. Ростові поживні середовища забезпечують існування та розмноження клітин і містять сироватку крові. Ці поживні середовища застосовують, як правило, в перші дні культивування клітин. Підтримуючі поживні середовища забезпечують життєдіяльність клітин, але не їхнє розмноження. Вони не містять сироватки крові. Їх використовують для культивування клітин після зараження їх вірусами.

Класифікація тваринних культур клітин

Класифікація клітин, що культивуються *in vitro*, пов'язана з певними труднощами. Спочатку тканинними культурами називали експланти цілих фрагментів тканин, вважаючи, що в цих фрагментах хоча б частково підтримується гістологічна цілісність.

Пізніше термін “культура тканини” розширив своє значення. Ним почали позначати як органну культуру, в якій найбільші фрагменти тканини чи цілі ембріональні органи експлантуються зі збереженням тканинної архітектури, так і культури клітин, для яких тканини диспергують механічно, ферментативно чи шляхом спонтанної міграції клітин з експланта. Такі клітини розмножуються у вигляді суспензії чи моношару клітин, що приєдналися до субстрату.

Органна культура (культура тканин) зберігає міжклітинні взаємодії, протягом тривалого періоду зберігає гістологічне та біохімічне диференціювання і після початкової травми залишається, як правило, в незростаючому рівноважному стані протягом декількох діб чи навіть тижнів. Ці культури не завжди здатні до розмноження.

Культури клітин, навпаки, позбавлені структурної організації, втрачають характерну гістотипічну архітектуру та пов'язані з нею біохімічні ознаки і, як правило, не досягають рівноважного стану за відсутності специфічних умов. Клітини в культурах розмножуються, що забезпечує отримання великої маси клітин та їхнє розділення на ідентичні паралелі. Ті клітини, які культивуються, можна охарактеризувати, визначити клітинну популяцію для зберігання шляхом заморожування. Ідентифікують клітини за фенотиповими ознаками, шляхом вирощування в селективному середовищі, фізичним відбором, клонуванням чи генетипово для отримання великої кількості відносно однорідних клітин.

Усі клітинні культури можна поділити на два типи: переживаючі (органні культури, проліферація яких в умовах *in vitro* досить обмежена або відсутня) та зростаючі (здатні розмножуватися в умовах *in vitro*). Ці типи, у свою чергу, теж мають поділ. Переживаючі органні культури поділяють на ті, що культивуються в рідкому середовищі (можуть існувати до 30 діб і навіть здатні до обмеженої проліферації), і ті, що культивуються на твердому середовищі.

Зростаючі культури поділяють на культури фіксованих шматочків тканин, одношарові та суспензійні культури клітин (рис.4.1).

Культури фіксованих шматочків клітин включають у себе такі: крапельно-плазмені культури, культури, вирощувані у флаконах Карреля, культури в

нерухомих пробірок та культури в пробірках, що обертаються. У вірусологічній практиці найчастіше використовують два останніх типи культур клітин.

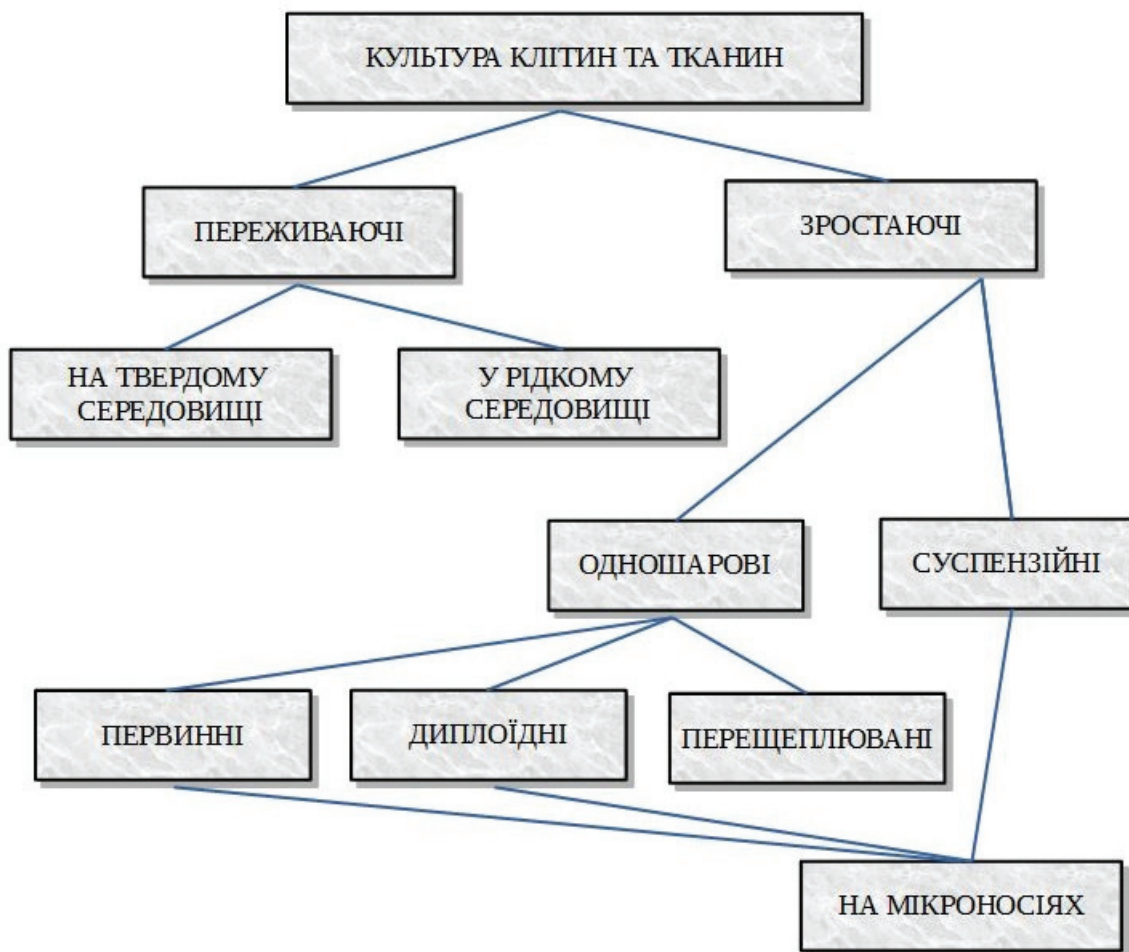


Рис. 4.1 Основні типи тканинних культур

Одношарові культури клітин

Одношарові культури клітин дуже широко використовують у вірусологічній практиці. Принцип методу одношарових культур клітин полягає у вирощуванні клітин, отриманих як правило шляхом ферментативної дезинтеграції на скляній поверхні у вигляді моношару. Цей метод базується на явищі адгезії – здатності клітин прикріплюватися до скляної поверхні. До одношарових культур належать первинні, або первинно-трипсинізовані, диплоїдні, гетероплоїдні та постійні (перещеплювані) культури клітин (рис. 4.2).

Первинна культура клітин (первинно-трипсинізована культура) – культура, яка походить від клітин та органів, узятих безпосередньо з організму. Для отримання первинних культур клітин використовують різноманітні тканини та органи людини і тварин. Після відповідної обробки їх подрібнюють на фрагменти 1-2 мм та оброблюють протеолітичними ферментами, які руйнують міжклітинні зв'язки, внаслідок чого отримують зависть окремих клітин, які легко підрахувати.

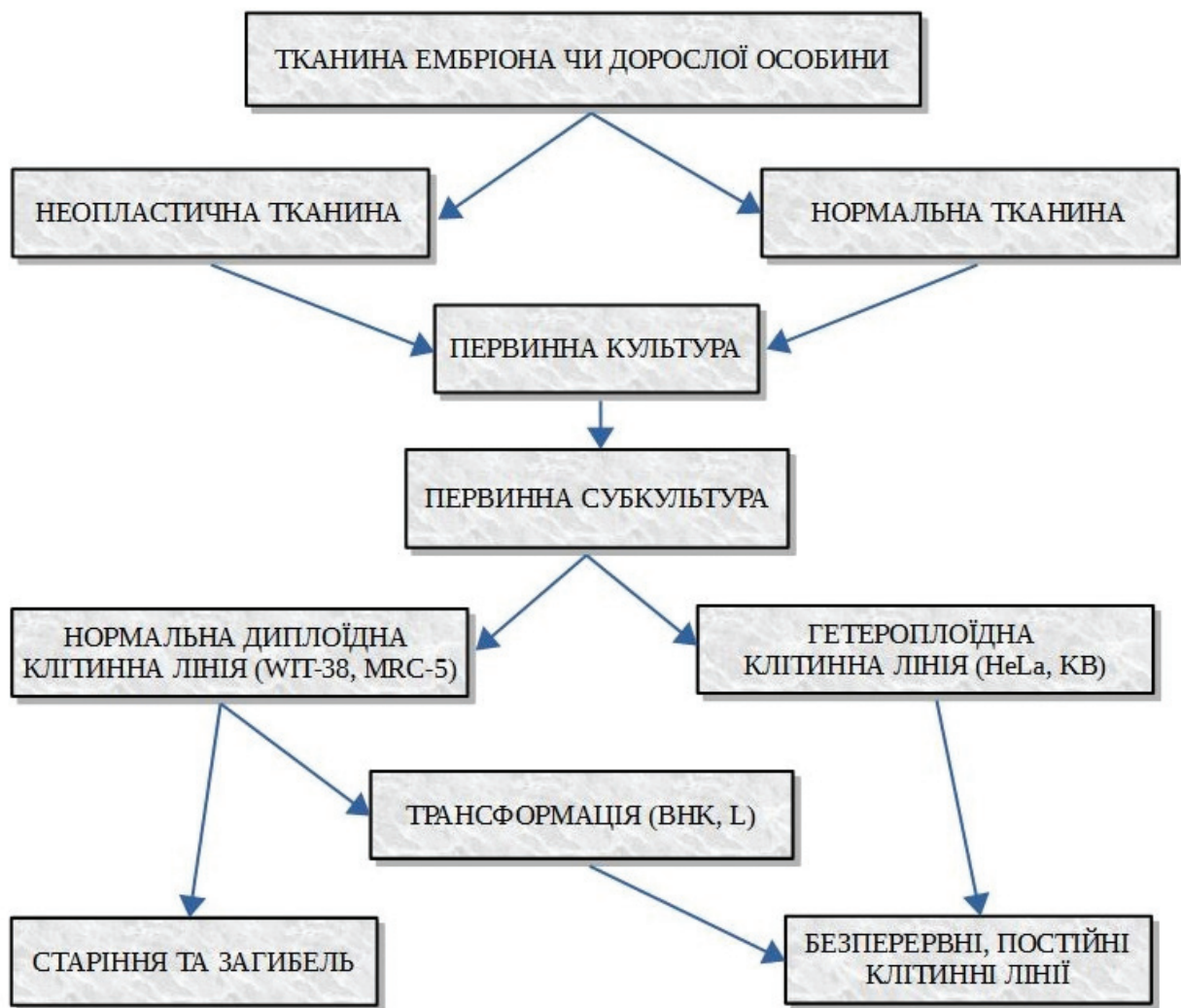


Рис. 4.2. Схематичне зображення «розгалуження» клітин, що культивуються, від соматичної тканини (Сергеев, Собко, 1990)

Для отримання первинних культур використовують такі ферменти: трипсин, панкреатин, колагеназа тощо; найчастіше – трипсин (теплий або холодний), тому ці культури називають первинно-трипсинізованими. Шматочки тканини вміщують у 0,25% розчин трипсину при температурі 37°C і піпетують або перемішують на магнітній мішалці, вибираючи таку швидкість перемішування, щоб над магнітом з'являлося невелике лійкоподібне заглиблення, але без піноутворення. Періодично відбирають порції клітин, центрифугують, трипсин зливають, а клітини суспендують у поживному середовищі.

Метод холодної трипсинізації полягає в тому, що тканину витримують протягом 16-20 год. у 0,25% розчині трипсину при температурі +4 °C, після чого суміш, перемішуючи, підігрівають до +37 °C, витримують протягом кількох хвилин, видаляють трипсин і суспендують клітини у поживному середовищі, як і в попередньому випадку.

Після отримання первинної культури обов'язково визначають кількість клітин у камері Горяєва.

Враховуючи результати підрахунку, клітинну суспензію розводять поживним середовищем до необхідної концентрації і розливають у пробірки чи

матраци для культивування. Клітини прикріплюються до скла і починають ділитися.

Розмножуючись, клітини розташовуються на скляній поверхні, вкриваючи її суцільним шаром завтовшки в одну клітину. Після того, як уся поверхня виявляється вкритою моношаром клітин, їхній поділ припиняється. Це явище має назву контактного інгібування. Моношар клітин формується через 3-7 діб, залежно від виду тканини, віку тварини, об'єму та складу поживного середовища, вихідної концентрації клітин тощо.

Культури називають первинними до початку пасування чи субкультивування.

Як правило, культури, отримані з ембріональних тканин, характеризуються кращим виживанням та більш активним ростом порівнюючи з культурами з відповідних тканин дорослих особин. Це відображає більш низький рівень спеціалізації та наявність стовбурових клітин в ембріонах. Отримання первинних культур клітин тканин дорослих особин (переважно з нирок) та їхнє розмноження є більш складним завданням, і тривалість життя таких культур, як правило, невелика (максимум 20 генерацій при культивуванні *in vitro* порівняно з 50 генераціями первинних клітин, отриманих із ембріональних тканин). Первинні культури клітин мають різну чутливість до вірусів (табл. 4.1). Така чутливість визначається типом тканини, з якої була отримана первинна культура, та тропізмом вірусу.

Приклади первинних культур клітин – нирка ембріона людини (рис. 4.3), нирка макаки-резус, нирка африканської зеленої мавпи, нирка ембріона свині, фібробласти курячих ембріонів та ін.

З часу отримання субкультури первинна культура отримує назву клітинна лінія. Клітинні лінії можуть мати обмежений час існування *in vitro* (наприклад, диплоїдні фібробласти людини та тварин), а можуть розмножуватися *in vitro* необмежено довго (постійні, безперервні або перещеплювані клітинні лінії).

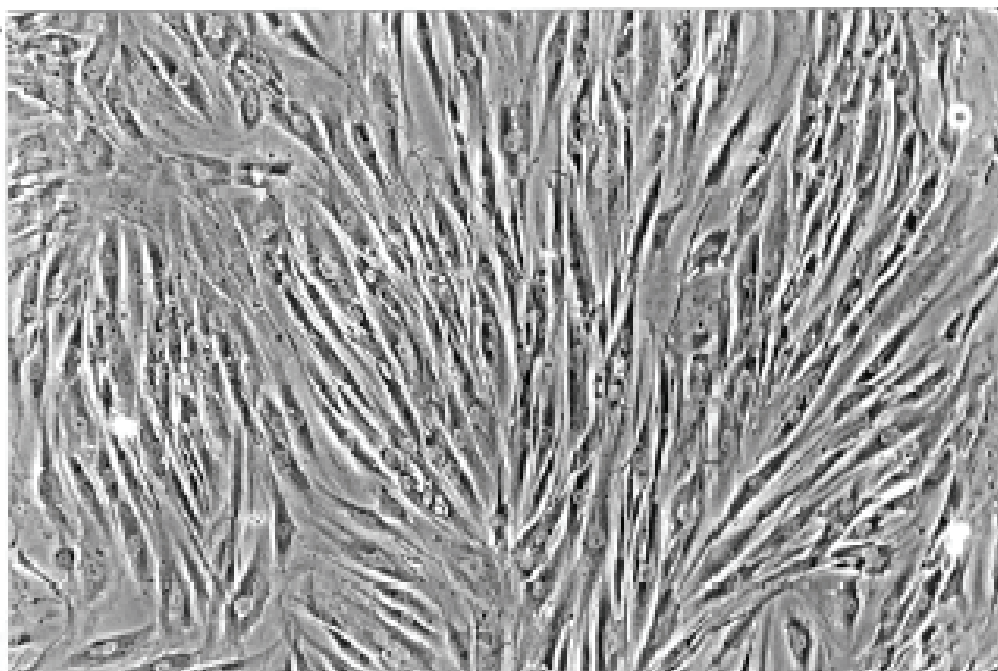


Рис. 4.3. Первинна культура фібробластів людини

Штам клітин – це популяція однорідних (за одним чи декількома маркерами) клітин, які зберігають специфічні властивості протягом обмеженого періоду культивування. Штам клітин може походити з первинної культури чи від лінії клітин шляхом селекції або клонування клітин зі специфічними властивостями. Штами клітин еукаріотів як правило трансформовані. Проте вони зберігають деякі або навіть багато рис тієї тканини, з яких вони були виділені. Клонами називають культури, вирощені з однієї ізольованої клітини.

Після висіву клітин на поживне середовище вони входять у фазу адаптації, або лаг-період, тривалістю 2-24 години, після якого починається період експоненційного росту (логарифмічна фаза) – кількість клітин збільшується удвічі через правильні проміжки часу (рис. 4.4). У кінці цього періоду клітини досягають правильного моношару і входять у період уповільненого росту чи спокою (стаціонарна фаза чи фаза плато). Якщо на цьому етапі культивування не відбудеться перенесення клітин на свіже поживне середовище, то настає фаза старіння і загибелі клітин. Розмножуючись, клітини розміщуються на поверхні скла і при повному його покритті в один шар контактують одна з одною і перестають ділитися (спостерігається явище контактного гальмування). На склі формується шар завтовшки в одну клітинну, тому такі культури клітин називають *одношаровими* чи *моношаровими*.

Як правило, моношар формується через 3-5 діб. Швидкість його формування залежить від виду тканин, віку донора, якості поживного середовища, посівної концентрації клітин та інших факторів.

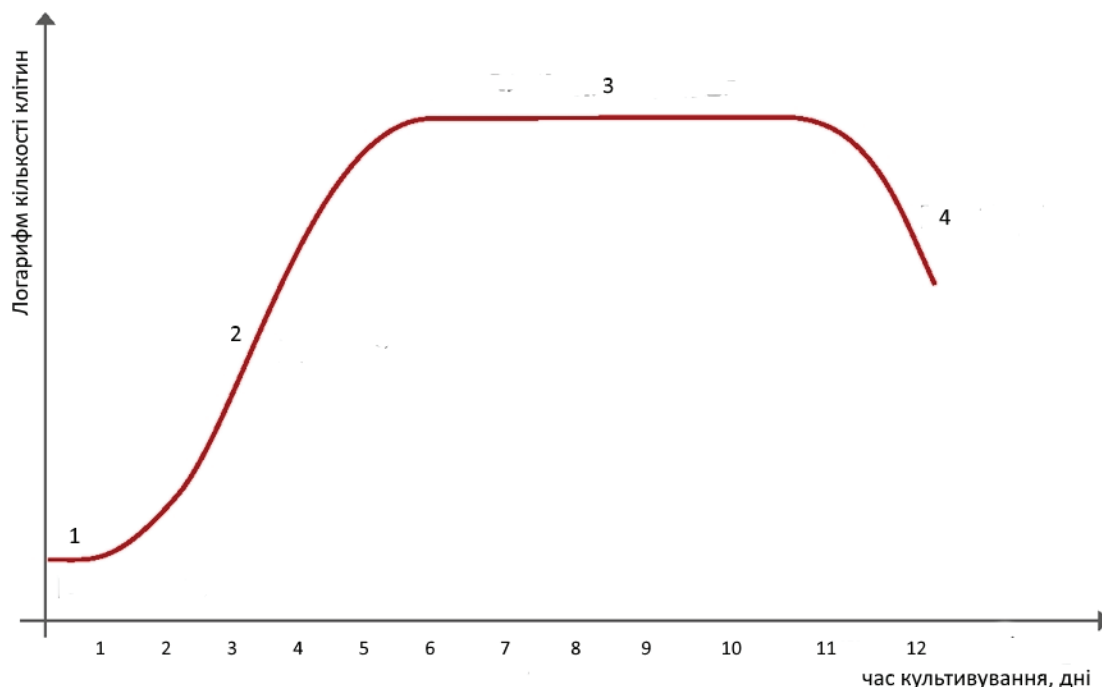


Рис. 4.4. Крива росту клітин у культурі:

1 – лаг-фаза; 2 – фаза експоненційного росту (логарифмічна фаза); 3 – стаціонарна фаза; 4 – фаза відмирання клітин.

Поживне середовище замінюють у міру його забруднення продуктами життєдіяльності клітин. Моношар зберігає свою життєздатність впродовж 7-21 діб (залежно від виду клітин та поживного середовища).

Таблиця 4.1.

Чутливість первинних культур клітин до вірусів людини *

Походження культури клітин	Віруси
Нирка ембріона людини	Аденовіруси (1-33), риновіруси (1-55), вірус кору
Нирка макаки-резус	Поліовіруси (1-3), ЕСНО (1-9, 11-27, 29-33), Коксакі А (2-4,7-11,13-18,20-24) і В (1-6), грипу А і В, парагрипу (1,2,4), кору, паротиту, реовіруси (1-3), аденовіруси (1-18, 20, 25-33), ротавіруси, цитомегаловірус, вірус гепатиту А.
Нирка африканської зеленої мавпи	Вірус вісповакцини, поліовіруси (1-3), ротавіруси, арбовіруси (група кліщового енцефаліту), тогавіруси
Фібробласти курячих ембріонів	Віруси східного, західного та венесуельського кінського енцефаломієліту, вірус лісу Семлікі, Синдбіс, Охотський, віруси вісни, хвороби Ньюкасла
Нирка ембріона свині	Аденовіруси (1-33), реовіруси, поліовіруси (1-3), вірус грипу А та В, вісповакцини

*(Гирін,1995)

Лінії *диплоїдних* клітин (напівперещеплювані лінії клітин) – це клітинні лінії, в яких щонайменше 75% клітин мають каріотип нормальних клітин вихідного типу; такі культури клітин, трансплантовані хом'ячкам, не проявляють онкогенної активності. Диплоїдний набір хромосом не завжди еквівалентний до диплоїдного каріотипу, оскільки існують умови, за яких клітина може втрачати один тип хромосом і набувати іншого. Це означає, що каріотип клітини змінився, а диплоїдний набір хромосом зберігся. Такі клітини слід вважати “псевдодиплоїдними”. Диплоїдні культури можуть пасивуватися багаторазово (диплоїдні штами), витримуючи до 80 популяційних поділів. Слід зазначити, що культури диплоїдних клітин дуже вибагливі до умов культивування, тому їх рідко використовують у вірусологічній практиці. Часто диплоїдні клітинні культури називають напівперещеплюваними культурами клітин. Приклади диплоїдних культур клітин – WIT-38 (фібробласти легень людини), MRC-5 (диплоїдні фібробласти людини), ТМ 4 (лінія клітин тестикулярного епітелію миші) та ін.

Якщо клітинна лінія має менше ніж 75% клітин із диплоїдним набором хромосом, говорять про лінію *гетеродиплоїдних* клітин. Цей термін не означає, що клітини злоякісні чи здатні до необмеженого росту.

Постійна (безперервна, перещеплювана) клітинна лінія складається з клітин одного типу, що здатні субкультивуватися поза організмом протягом необмеженого числа пасажів. Постійні клітинні лінії отримують із пухлинних або нормальних тканин людини чи тварин, які мають змінений (трансформований) каріотип (табл. 4.2).

Таблиця 4.2.

Характеристика деяких із відомих клітинних ліній

Позначення	Походження		Ознаки			
	Вид	Тканина	Морфологія	Ріст у суспензії	Ефективність висіву, %	Плоїдність
3T3	Миша, n=20	Ендотелій	Фібробласти	-	50	Анеуплоїдні
L	-"-	Сполучна тканина	-"-	+	90	-"-
CHO	Китайський хом'ячок, n=11	Яечник	Епітелій	-	95	Псевдо-диплоїдні
BHK 21	Золотистий хом'ячок	Нирка	Фібробласти	+	20	Диплоїдні
BSC	Макака-резус. n=21	-"-	Епітелій	-	Незначна (< 20)	-"-
MPS	Миша, n=20	Міелома	Лімфоїдна тканина	+	0	Анеуплоїдні
RPH	Жаба, n=13	Яйцеклітини	Епітелій	-	0	Гаплоїдні
HeLa	Людина, n=13	Пухлина шийки матки	Епітелій	+	95	Анеуплоїдні

Використання постійних культур клітин у вірусологічній практиці має певні переваги порівняно з первинними та диплоїдними культурами клітин (табл. 4.3).

На рівні сучасних знань про поведінку клітин, що культивуються *in vitro*, неможливо визначити точку, коли культура стає стабільною, тобто набуває здатності рости необмежено довго. На основі дослідів з фібробластоподібними клітинами людини встановлено, що культура повинна субкультивуватися не менш ніж 70 разів, з інтервалом у три доби, перш ніж її можна вважати безперервною лінією клітин.

Таблиця 4.3.

Переваги та недоліки використання постійних культур клітин

Переваги постійних КК	Недоліки постійних КК
Здатність до необмеженого розмноження	Схильність до злякисного перетворення (малігнізації)
Простота отримання → економія праці та матеріальних затрат	Швидке зниження чутливості до вірусів, порівнюючи з первинними КК
Можливість попередньої перевірки на наявність латентної вірусної інфекції та сторонньої мікрофлори	
Забезпечення стандартних умов для розмноження вірусів порівняно з первинними КК, що являють собою популяцію змішаних типів клітин	
Широкий спектр чутливості до вірусів, порівнюючи з відповідними первинними КК	

У постійних культурах клітин клітини трансформовані. Трансформація клітин – це незворотні клітинні зміни, які характеризуються зміною ростових властивостей клітин, що культивуються. Трансформація робить клітини „безсмертними” і менш залежними від поживних та “геометричних” факторів росту. Зміни ростових властивостей пов’язані з порушенням транспорту через клітинну мембрану і є однією з адаптивних властивостей, які дають можливість клітинам розмножуватися в умовах, несприятливих для нетрансформованих батьківських клітин. При цьому клітинні мембрани втрачають поверхневий білок (250 кДа) і дещо змінюють антигенні властивості.

Спонтанна трансформація культур клітин нормальних тканин є відносно рідкісним явищем. Частоту таких трансформацій можна збільшити, оброблюючи клітини мутагенами чи деякими вірусами (наприклад, SV-40, вірус Епштейна–Барр та ін.).

Трансформовані клітини можуть утворювати пухлини в імунологічно толерантних тварин. За цією ознакою трансформація інколи неправомірно прирівнюється до злоякісних змін.

На ранніх стадіях культивування клітини залишаються еуплоїдними, тобто мають „правильний” диплоїдний набір хромосом, а пізніше вони стають анеуплоїдними. Іноді деякі з цих анеуплоїдних клітин виживають і продовжують розмножуватися, що приводить до встановлення клітинного штаму. Всі постійні клітинні лінії, на відміну від культур нормальних клітин з обмеженим терміном життя, є зміненими за рядом ознак, головною з яких є “безсмертя”. Здатність до необмежено тривалого розмноження в культурі, як правило, пов’язана з анеуплоїдним каріотипом. Для деяких клітинних ліній (наприклад, ВНК-21), які хоч і мають диплоїдний набір хромосом, каріотип змінений. Інші критерії трансформації (онкогенність, контактне гальмування, вимоги до середовища) проявляються у різних ліній неоднаково. Лінії клітин, які отримані з пухлинних тканин (тобто трансформовані в організмі), часто зберігають спеціалізовані функції (наприклад, здатність продукувати деякі ферменти) протягом більш тривалого часу, ніж клітини, трансформовані в культурі різними методами. Частота отримання постійних ліній у різних видів ссавців неоднакова. Так, наприклад, клітини мишей піддаються спонтанній мутації частіше, ніж клітини людини чи інших ссавців. Указана різниця, можливо, пов’язана з неоднаковою стабільністю каріотипу різних видів тварин.

Коли віруси взаємодіють з клітинами культури тканин, спостерігаються різні зміни, обумовлені рядом факторів. Серед них велике значення має ступінь чутливості клітин культури до вірусу та умови середовища. Постійні культури різняться за ступенем своєї чутливості до вірусів. Як правило, для культивування певних вірусів добирають такі культури, в яких зміни під впливом вірусної інфекції є найбільш виразними (табл. 4.4).

Приклади постійних культур клітин: SV-28 – постійна культура нирки новонародженого хом’яка, трансформована вірусом SV-40; MCF-7 – карцинома молочної залози людини; HeLa – карцинома шийки матки людини (рис. 4.5.б); Нер-2 – карцинома гортані людини; KB – карцинома ротової порожнини людини; RH – нирка ембріона людини; Vero – нирка зеленої мавпи; L₉₂₉ – мишачі фібробласти (рис. 4.5.а.); C-1300 – нейрабласти миші; MDCK – нирка

собаки (рис. 4.5.в); СНЕВ – нирка ембіона свині, НІН 3Т3 – фіброласти ембіона миші (рис. 4.5.д) та ін.

Вирощують перещеплювані культури клітин у вигляді суспензій, чи у вигляді моношару на скляній поверхні, перещеплюють їх, відокремлюючи від скла фізичними або хімічними методами.

Фізичні методи: збовтування і зішкрібання. Клітини, які не дуже щільно прикріплені до поверхні, можна відокремити, збовтуючи середовище або перемішуючи його на магнітній мішалці.

Хімічні методи: дія протеолітичними ферментами або поверхнево активними речовинами. Для відокремлення клітин від скла використовують трипсин, неочищені препарати панкреатину чи поверхнево-активні речовини, здатні зв'язувати катіони Mg^{++} та Ca^{++} , що сприяють прикріпленню клітин, найчастіше – версен.

Таблиця 4.4.

Чутливість постійних клітинних культур до вірусів *

Назва культури клітин	Походження культури клітин	Віруси
HeLa	Карцинома шийки матки жінки	Аденовіруси (1-33), респіраторно-синцитіальний вірус, поліовірус (1-3), ЕСНО (1-9, 11-27, 29,33), Коксакі А (2,3, 7, 18, 21)
Нер-2	Карцинома гортані людини	-,,-
КВ	Карцинома ротової порожнини людини	Аденовіруси, поліовіруси (1), арбовіруси
RH	Нирка ембіона людини	Аденовіруси (1-33), респіраторно-синцитіальний вірус, віруси парагрипу
L ₁₃₂	Легеня ембіона людини	Аденовіруси, респіраторно-синцитіальний вірус, коронавіруси, поліовіруси (1-3), ЕСНО
Vero	Нирка зеленої мавпи	Коксакі В (1-6), поліовіруси (1-3), арбовіруси, реовіруси, віруси везикулярного стоматиту (ВВС), вісповакцини, простого герпесу (1-2)
L ₉₂₉	Фіброласти миші	Арбовіруси, ВВС
ВНК-21	Нирка сірійського хом'яка	Вірус сказу, простого герпесу, аденовіруси (25), реовіруси (3), ВВС
СНЕВ	Нирка ембіона свині	Арбовіруси (група кліщового енцефаліту)
MDCK	Нирка собаки	Віруси грипу типу а і В, ВВС, вісповакцини, Коксакі В (5), реовіруси (2,3), аденовіруси (4,5)

* (Гирін,1995)

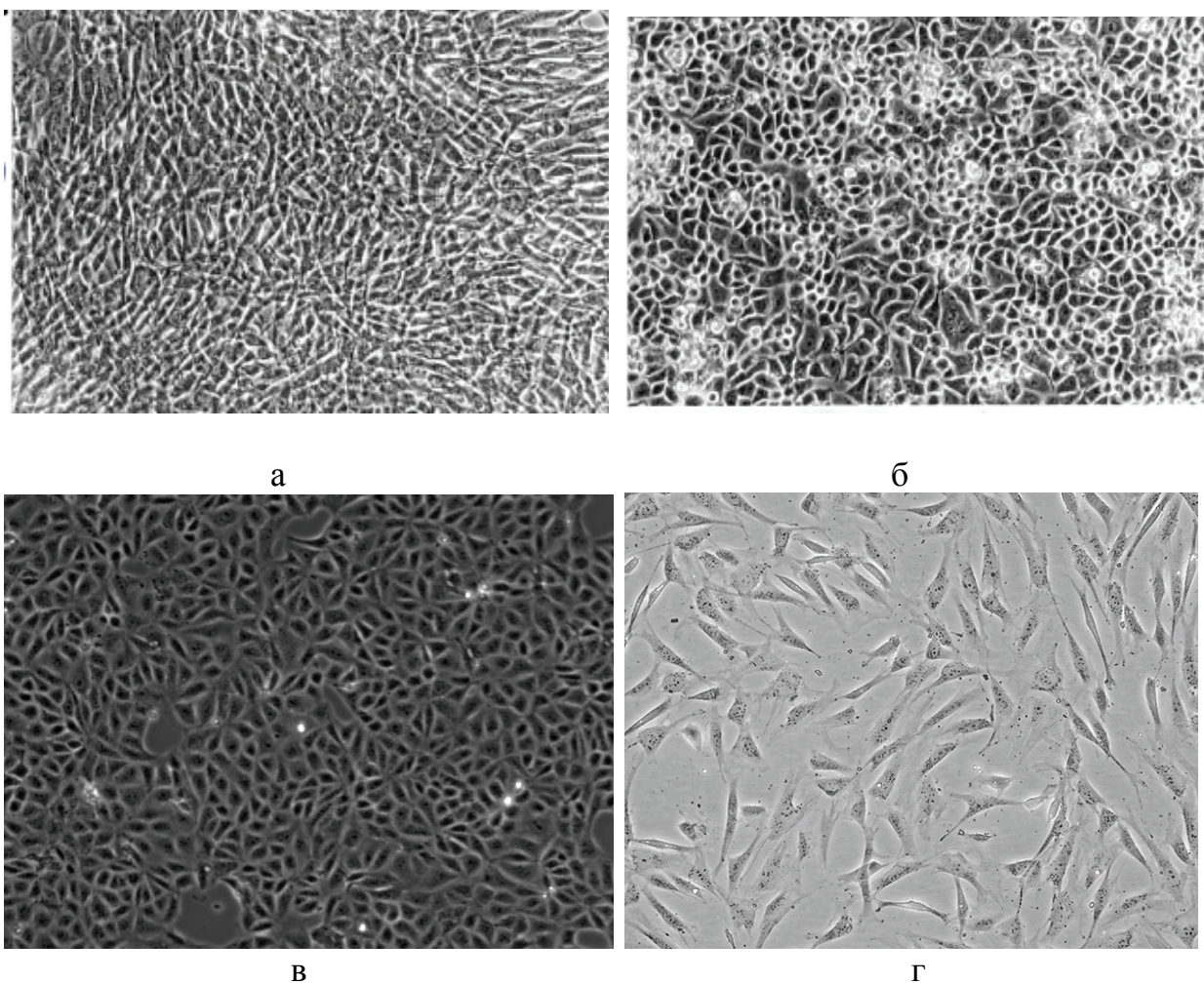


Рис. 4.5. Постійні культури клітин:
 а – фібробласти миші; б – HeLa; в – MDCK (за матеріалами сайту <http://knowledge.lonza.com>); д – NIH 3T3 (Todaro, 1969)

Методика обробки версеном така: 1) видалити поживне середовище; 2) промити клітини сольовим розчином (який не містить Mg^{++} та Ca^{++}); 3) додати версен (підігрітий до $+37^{\circ}C$); проінкубувати у термостаті при $+37^{\circ}C$ протягом 10-15 хв; 5) обережно перемішати і утворену суспензію клітин перенести в центрифужні пробірки; 6) відцентрифугувати протягом 5 хв – 1000 об/хв; 7) видалити надосадову рідину і замінити поживне середовище на свіже; 8) суспендувати клітини обережним піпетуванням; 9) визначити кількість клітин у камері Горяєва і розвести до необхідної концентрації поживним середовищем (80-200 тис. клітин в 1 мл); 10) перенести суспензію клітин у нові посудини для подальшого культивування.

Склад поживного середовища залежить від виду клітин, найчастіше використовуються середовища Ігла та 199 або суміш цих середовищ з гідролізатом лактальбуміну.

Суспензійні культури клітин

Метод культивування клітин у суспензії широко ввійшов у вірусологічну практику завдяки його перспективності для накопичення великої кількості клітин. Цей метод затвердив себе у виробництві ферментів та інших продуктів життєдіяльності бактеріальних клітин, проте адаптація клітин ссавців до суспензійних умов має певні труднощі, оскільки клітини тварин порівняно з бактеріальними більш чутливі до фізичних факторів, легше осаджуються, досить вимогливі до складу поживних середовищ і повільніше розмножуються.

Культивування клітин у суспензійному стані дає змогу отримувати більш однорідну клітинну популяцію. Цей метод потребує спеціального обладнання, що забезпечує аерацію та перемішування суспензії.

Розповсюдженню методу суспензійного культивування сприяло введення ферментативного диспергування тканин тварин і особливо виведення постійних клітинних ліній, які виявилися здатними до необмежено тривалого пасування у суспензійному стані.

Переваги методу культивування клітин у суспензіях:

3. висока однорідність суспензій;
4. можливість підтримання клітин у логарифмічній фазі росту;
5. перспективи математичного моделювання процесів клітинного росту залежно від впливу факторів зовнішнього середовища;
6. зручність багатократного дослідження фізіологічного стану культури клітин у суспензії;
7. висока економічність методу.

У зв'язку з цим великого значення набули дослідження штамів клітин, які здатні до тривалого розмноження в суспензійних умовах культивування. Так, багато постійних культур клітин були адаптовані до розмноження в цих умовах (ВНК-21, Нер-2 та ін.). Крім того, потрібно зазначити, що кровотворні клітини краще ростуть у суспензійній культурі.

Запропоновано декілька підходів, які дають змогу культивувати клітини у стані завису: *batch-культури* (розмноження в суспензії забезпечується безперервним перемішуванням завису в умовах постійності середовища), проточні системи (хемостати, турбідостати), застосування мікроносіїв (сефадекс, силікагель, цитолар та ін.). Культивування на мікроносіях на тепер є досить популярним методом, оскільки дає можливість вирощувати залежні від прикріплення до твердого субстрату клітини (первинні, субкультури, диплоїдні) в умовах суспензії.

Вирощування вірусів у суспензійних культурах є основою для промислового виробництва вакцин та діагностикумів.

Морфологічні категорії клітин у культурі

Виділяють три основні морфологічні категорії клітин у культурі, базуючись на їхньому зовнішньому вигляді.

Фібробласти, або фібробластоподібні клітини, є біполярними чи мультиполярними, мають витягнуту або веретеноподібну форму і ростуть залежно від субстрату (рис. 4.3).

Епітеліоцити (епітеліоподібні клітини) – клітини кубічної або багатокуткової форми постійного розміру, культивуються залежно від субстрату (рис. 4.5.б).

Лімфобластоїдні (лімфобластоподібні) клітини сферичної форми культивуються у суспензії без прикріплення до субстрату.

Зберігання культур клітин

У роботі з культурою часто виникає потреба консервування клітин, наприклад, для тривалого зберігання диплоїдних культур – після кожного пасажу можна консервувати частину клітин. До того ж необхідність консервації клітин виникає для запобігання забрудненню клітинних культур клітинами інших типів (міжвидове перехресне забруднення), патогенними бактеріями й грибами, а також, щоб запобігти виникненню неконтрольованих генетичних змін клітин.

Консервуючи клітини, їх переважно зберігають в умовах знижених температур від 4°C до -78°C (за зберігання в умовах сухого льоду) та -196°C (за зберігання в умовах рідкого азоту).

За зниження температури знижується швидкість внутрішньоклітинних біохімічних процесів. Найбільш простим методом консервування клітин є зберігання їх при температурі +4°C протягом 1 – 6 тижнів.

Для більш тривалого зберігання можна застосовувати глибинне заморожування клітин. Проте, коли клітини зберігають в умовах низьких температур, може відбуватися їхнє ушкодження під час заморожування та відтавання. Ці ушкодження клітин обумовлені появою внутрішньоклітинних кристалів льоду та осмотичними ефектами. Додавання кріопротекторів (диметилсульфоксид, етиленгліколь, гліцерин та ін.), а також вибір оптимальних швидкостей заморожування та відтавання зводять ушкодження клітин до мінімуму.

Для цього клітини суспендують (в концентрації близько 10^6 на 1 мл середовища) у середовищі, яке містить захисні речовини: 10-40% сироватки та 10% очищений гліцерин. Суспензію розливають в ампули, заповнюючи їх не більше ніж на третину, і витримують 1-3 години при температурі +4°C. Потім починають повільно знижувати температуру, наприклад, сумішшю сухого льоду і спирту, до температури -25°C, швидкість охолодження при цьому не повинна перевищувати 1°C за одну хвилину. Після цього ампулу можна перенести для зберігання у сухий лід (-78°C), або, охолодивши до -70°C, у рідкий азот (-196°C).

При глибинному заморожуванні проліферативна активність клітин і їхня чутливість до вірусів роками не змінюється.

Розконсервування клітин проводять методом швидкого розморожування на водяній бані при температурі +37°C з додаванням відповідної кількості ростового середовища. Кріопротектори видаляють шляхом заміни поживного середовища наступного дня.

Контамінація культур клітин

Вірусологічні дослідження, які проводяться з використанням клітинних культур, потребують постійного контролю наявності сторонніх мікроорганізмів (контамінантів) – бактерій, грибів та мікоплазм. Окрім того, суттєвим недоліком, що ускладнює застосування клітинних культур, є небезпека їхнього забруднення вірусами. Джерелом контамінації бактеріями та мікоплазмами можуть бути дослідники, сироватка і повітря. Віруси можуть потрапляти в культуру з клітинами, якщо вони відібрані з інфікованого організму, а також з трипсином або сироватковою. Найважче виявити контамінацію латентними вірусами, які тривалий час можуть залишатися непомітними в культурі. Крім того, культури клітин також можуть бути забрудненими клітинами інших культур. На відміну від організму людини, імунна система якого володіє багатьма різноманітними механізмами захисту від інфекцій, клітини *in vitro* захищені лише обережністю роботи дослідника.

Інфекції, викликані контамінантами, можуть змінювати метаболізм клітин, викликати хромосомні порушення, впливати на сприйнятливість клітин до вірусів, що досліджуються. Особливо це стосується латентних інфекцій.

Мікоплазми є найпоширенішими контамінантами клітинних культур. Джерелом мікоплазм можуть бути сироватка тварин, яка найчастіше буває забруднена *Acholeplasma laidlawii* та *Microplasma arginini*, а також власне дослідники, оскільки *M. hominis*, *M. pharyngis* та *M. salivarium* легко виділяються з порожнини рота і глотки людини. Забруднення культур клітин мікоплазмами не є таким очевидним, як забруднення бактеріями. У зв'язку з цим їхнє своєчасне виявлення – важлива умова підтримання високої якості культури клітин.

Запобігти розмноженню та знищити бактерії, мікоплазми і гриби вдається за допомогою протимікробних препаратів (антибіотики та ін.), які додають у ростові середовища безпосередньо перед їхнім використанням. Однак при тривалому культивуванні клітинних культур застосування антибіотиків не бажане. Саме тому в роботі з клітинами необхідно дотримуватися стерильних умов для запобігання забрудненню мікроорганізмами та вірусами, а також проводити адекватні тести для оцінки їхньої ефективності.

Проблема контамінації клітинних культур різноманітними вірусами виникла з моменту застосування клітин для виробництва вірусних вакцин. Джерелом випадкових вірусних агентів у вірусних вакцинах можуть бути інфіковані донори тканин, а також матеріали та умови культивування (сироватка, трипсин, забруднення в процесі виробництва). З метою зменшення ризику ендogenous забруднення вихідного клітинного матеріалу різноманітними вірусами та іншими патогенними збудниками для приготування первинних культур часто використовують тканини тварин, вирощених в умовах, що контролюються. В основі системи контролю постійної лінії клітин, що виключає спонтанну контамінацію у виготовленні вірусних вакцин, важливим є створення банку клітинних ліній, що добре контролюються.

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 ендцитозу 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 відносно, 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 **абортивної**, 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.

Умови виникнення абортивної інфекції. Абортивна вірусна інфекція виникає за таких умов:

1. *Зараження чутливих клітин дефектним вірусом.* Дефектним називається вірус, не здатний проявити всі генетичні функції, необхідні для утворення інфекційного потомства. Слід, однак, розрізняти терміни дефектні віруси та дефектні вірусні частки. Дефектні віруси – це віруси, що репродукуються лише в присутності вірусу-помічника. Наприклад, вірусом-помічником для аденоасоційованого вірусу (парвовірусу) є адено- або герпесвірус, для вірусу гепатиту Д – вірус гепатиту В. Дефектні вірусні частки

накопичуються в популяціях багатьох вірусів, особливо при пасивуванні їх із високою множинністю інфекції. Дефектні вірусні частки інтерферують при репродукції вірусу з інфекційними вірусними частками і тому мають назву дефектні інтерферуючі частки (ДІ-частки, або ДІЧ).

2. *Зараження чутливих клітин у непермісивних умовах.* В організмі непермісивними є такі умови: підвищення температури, зміна рН у вогнищі запалення та концентрація іонів, наявність антиметаболітів, інгібіторів тощо; в експерименті – зміна температури інкубації, складу поживного середовища, внесення антиметаболітів та інгібіторів тощо. У підсумку або вірус гине без утворення інфекційних нащадків, або переривається на певному рівні. При зміні непермісивних умов на пермісивні абортівна інфекція перетворюється на продуктивну. Заміна абортівної інфекції на продуктивну може відбутися й за допомогою вірусу-помічника.

3. *Зараження нечутливих клітин стандартним вірусом.* Це найбільш розповсюджена форма абортівної вірусної інфекції.

Гостра вірусна інфекція – така форма інфекції, при якій після утворення вірусного потомства клітина або гине, або видужує і не містить вірусних компонентів. При хронічній вірусній інфекції клітини продовжують продукувати вірусні частки або їхні компоненти протягом тривалого часу й передають цю здатність спадково. Частіше хронічної форми набуває абортівна інфекція, оскільки вірусний генетичний матеріал зазвичай не входить до складу вірусного потомства, а накопичується в клітинах і передається дочірнім клітинам. Одним із факторів, що викликають хронічну інфекцію, є ДІЧ. Такі частки, потрапляючи в клітину разом з інфекційними вірусними частками, конкурують із ними за фактори продукування й перешкоджають утворенню інфекційного вірусного потомства. У результаті загибель клітин не відбувається. Якщо в системі з'являються нові чутливі клітини, у них знову виникає продуктивна вірусна інфекція з утворенням ДІЧ, і цикл повторюється.

Гостра інфекція, яка завершується загибеллю клітини (лізисом), називається цитолітичною, а гостра вірусна інфекція, яка безпосередньо не приводить до лізису клітини і за якої клітина ще може функціонувати впродовж деякого часу, продукуючи вірусні частки, називається нецитолітичною. Віруси, що викликають загибель клітини, називають цитопатогенними, а ураження клітини – цитопатичним ефектом.

Характер цитопатичних змін при вірусних інфекціях може бути різноманітним: дегенерація клітин (вакуалізація цитоплазми, пікноз ядер, хромосомні аберації), утворення внутрішньоклітинних тілець-включень, виникнення гігантських клітин (полікаріюцити, симпласти). Лізис клітини – кінцева стадія дії цитопатогенних вірусів. Для вияву цитопатогенності вірусу не потрібні відтворення генома та реалізація всієї генетичної інформації.

Нелітична автономна інфекція характерна для вірусів, що містять зовнішню ліпопротеїнову оболонку та вивільняються з клітини шляхом брунькування. Ретро-, ортоміксо-, параміксо-, аренавіруси здатні викликати продуктивну нелітичну інфекцію клітин. Проте в найтипівішому випадку нелітичний характер властивий абортівним інфекціям, коли відсутні або не

виявляються генетичні властивості вірусів, необхідні для здійснення цитопатогенних функцій.

Коли віруси взаємодіють із клітинами, в культурі спостерігаються різні патологічні зміни, які зумовлені рядом факторів:

- особливістю реплікації віріонів;
- чутливістю клітин до вірусів;
- умовами культивування клітин (складом поживного середовища, рН середовища, температурою культивування).

Патологічні зміни уражених вірусами клітин зумовлені специфічними й неспецифічними процесами. До неспецифічних належать процеси, обумовлені змінами деяких ланок обміну речовин, проникності цитоплазматичної мембрани; маргинація хроматину, вакуолізація цитоплазми, пікноз ядер, хромосомні аберації, а саме:

- дезінтегративне набрякання ядер клітин – феномен збільшення розмірів ядра клітини в результаті стимуляції обміну речовин при вірусній інфекції;
- цитотоксична дія вірусів – вплив вірусів на клітину ще до стимуляції обміну речовин.

Усі ці зміни відносять до неспецифічної взаємодії вірусів із клітинами, тому що вони не залежать від дози вірусу, розмірів віріонів, типу клітин, характеру утворення включень, тривалості вірусної інфекції.

Специфічні процеси взаємодії вірусу з клітиною включають:

1) різноманітні зміни, що проявляються в пригніченні синтетичних процесів, порушенні функціональної активності, пошкодженні структур клітини та її загибелі (ЦПД, утворення включень);

2) цитопроліферативний ефект, який зазвичай приводить до трансформації клітин;

3) резистентність клітин до вірусів;

4) вірусопатичну дію;

5) синтез неповноцінних віріонів і вірусних специфічних антигенів (за абортивної інфекції);

6) індуктивний вплив (синтез інтерферонів).

Рівні взаємодії вірусів і клітин. Виділяють п'ять основних рівнів взаємодії клітин і вірусів: внутрішньоклітинний (молекулярний), клітинний, популяційно-клітинний, взаємодію на рівні багатоклітинного організму та взаємодію на рівні популяцій макроорганізмів.

Молекулярний (внутрішньоклітинний) рівень взаємодії вірусів і клітин. На цьому рівні внутрішньоклітинний вірус взаємодіє зі структурними елементами клітини. Ця взаємодія залежить від локалізації вірусу.

Чужорідна для клітини генетична інформація вірусів залежно від їхньої природи може перебувати у цитоплазмі клітини або локалізуватися в ядрі у формі епісоми чи в інтегрованому вигляді з хромосомним апаратом клітини. В останньому випадку геном одного чи кількох ДНК-вмісних вірусів (чи ДНК-транскриптів) може інтегруватися в одну чи кілька ділянок однієї чи кількох хромосом клітини, а також у позахромосомний генетичний апарат клітини (ДНК мітохондрій і центріолей). За такої взаємодії виникає комплекс вірус-

клітина, де відбувається одночасна репродукція двох інтегрованих геномів, що підкоряється загальній регуляції. Наприклад, у дослідженні лімфобластоїдних клітин Raji було встановлено, що вони містять близько 50–60 геномів вірусу Епштейна-Барр (ВЕБ) на клітину. Плазмідна ДНК перебуває під клітинним контролем (синхронна реплікація, відсутність більшості вірусоспецифічних функцій).

Клітинний рівень взаємодії визначається властивостями вірусу та клітини. У пермісивних (підготовлених до початку реплікації) для репродукції вірусу системах вірус адсорбується та взаємодіє з інтерфазною клітиною (G_0), клітиною, що ділиться (S), одно- чи багатоядерною клітиною, симпластом чи гетерокаріоном (внутрішньо- чи міжвидовим клітинним гібридом).

Популяційно-клітинний рівень взаємодії вірусів і клітин. Визначається взаємодією вірусу з популяцією диплоїдних, клональних чи гетерологічних клітин *in vitro*, популяцією гетерологічних клітин в органій культурі чи органі багатоклітинного організму.

За таких формах взаємодії можливе пасивування та формування багатьох поколінь вірусів. Основною особливістю вірусної інфекції в клітинній популяції є гетерогенність системи *in vitro*, яка складається з неоднорідних популяцій вірусу та клітин. Вірусна популяція може складатися зі зрілих, неповноцінних, вегетативних форм, окремих компонентів вірусу, асоціацією вірусів із різних родин. Клітини в кожній клітинній популяції широко варіюються за чутливістю до вірусу. Наприклад, при ураженні вірусом, що викликає в клітині продуктивну інфекцію, чутливі клітини популяції можуть загинути, і в популяції за рахунок деякої кількості нечутливих клітин може встановитися хронічна інфекція.

Рівень багатоклітинного організму. Репродукція вірусу перебуває під контролем імунологічних механізмів гуморального та клітинного імунітету макроорганізму. Значну роль у формуванні резистентності організму до вірусу відіграють генетичні фактори – спадковість.

Рівень популяції макроорганізмів. Визначається взаємодією популяції вірусів з популяцією організмів ссавців, птахів, комах тощо. Значна роль у формуванні вірусної патології людей належить зоонозам, змінам навколишнього середовища та соціальним умовам життя.

Таким чином, при переході від найпростішого (внутрішньоклітинного) рівня до найскладнішого значно збільшується кількість форм, варіантів і наслідків взаємодії вірусу з господарем. Проблема взаємодії популяцій вірусів і клітин може ускладнюватися за рахунок гетерогенності популяції вірусів і наявності в ній зрілих, неповноцінних форм вірусів та окремих їхніх компонентів, а також асоціацією неспоріднених вірусів (коінфекція, яка може призводити до інтерференції, посиленої репродукції обох вірусів).

Цитопатична дія

Найчастіше про розмноження вірусу в культурі клітин роблять висновок за цитопатичною дією чи цитопатичним ефектом (ЦПД, ЦПЕ), що призводить до руйнування структури клітин під впливом вірусів. ЦПД –деструктивні зміни

окремих клітин та клітинного моношару, що виникають внаслідок продуктивної вірусної інфекції та цитотоксичної дії віріонів.

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.

При цитопатичній формі спостерігається зазвичай літична інфекція. Деструкція клітин відбувається в деяких випадках після однієї лише адсорбції віріонів або навіть окремих компонентів на поверхні клітини (цитотоксична дія вірусу).

За терміном виникнення ЦПД поділяють на ранню і пізню. Рання ЦПД виявляється в перші години після інфікування (від трьох год), спричиняється дією структурних елементів вірусів. У цей період ще не відбулося проникнення вірусу в клітину. Цей тип ЦПД морфологічно виявляється в порушенні клітинного моношару, заокругленні клітин, відокремленні їх від скла (рис.4.6.а).

Пізня ЦПД виявляється на кінцевих стадіях репродукції вірусів у клітині. Пізня ЦПД полягає в утворенні полікаріоцитів і включень (рис. 4.6.б). Вирішальну роль у розвитку деструктивних процесів у клітині на пізніх стадіях можуть відігравати також клітинні білки, у тому числі гідролази лізосом. У результаті пошкодження лізосомальної мембрани в цитоплазму виходять різноманітні клітинні ферменти (ДНКаза, РНКаза, фосфатаза, протеаза та ін.), що й призводить до швидкого та повного руйнування інфікованої клітини.

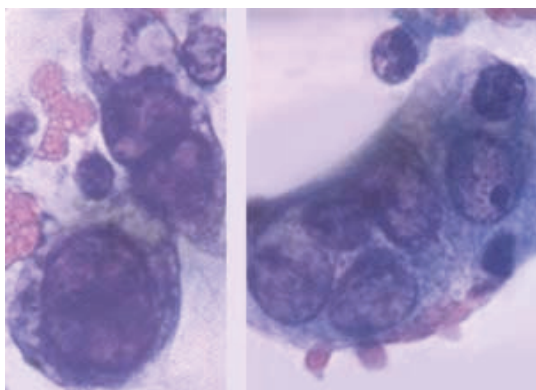
Саме тому в лабораторній практиці ЦПД часто використовують для індикації та ідентифікації вірусів. Тривалий час була популярною класифікація ЦПД за групами Дж. Ф. Ендерса (1954) та робоча класифікація ЦПД (О.Г. Анджапарідзе, 1962). Проте, незважаючи на існування багатьох спроб групування подібних форм ЦПД, найбільш суттєво відрізняються між собою три форми ЦПД: фрагментація клітин, заокруглення клітин та симпластоутворення.

Фрагментація – руйнування клітин на окремі фрагменти, які відділяються від скла і переходять у культуральне середовище як клітинний детрит (вірус везикулярного стоматиту).

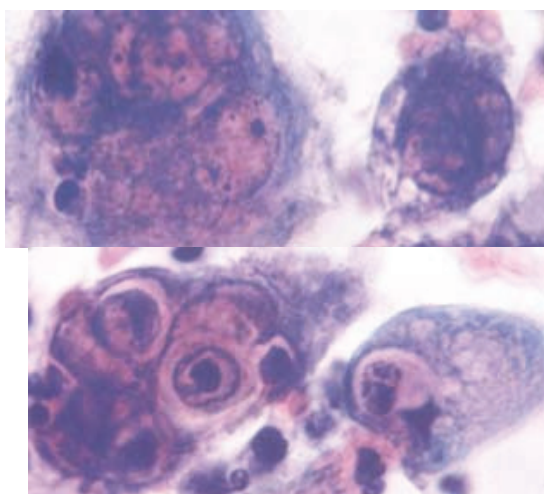
Округлення – втрата клітинами здатності прикріплюватися до скла, внаслідок чого клітини, як правило, розпластані по скла, набувають шароподібної форми, відділяються від скла і вільно плавають у культуральній рідині (ентеровіруси, аденовіруси тощо; кольорова вклейка рис. 3).

Симпластоутворення – розчинення клітинних оболонок, внаслідок чого цитоплазма сусідніх клітин зливається, утворюючи одне ціле, в якому розташовуються (переважно по периферії) ядра клітин (кольорова вклейка рис.

4). Злиття плазматичних мембран сусідніх клітин відбувається за рахунок специфічних вірусних білків злиття. Так, у представників родини *Paramyxoviridae* у процесі злиття задіяні специфічні білки злиття – F (fusion protein), у вірусів з родини *Retroviridae* – це білок gp 41. Злиття може відбуватися ззовні та зсередини. Злиття ззовні відбувається швидко і спостерігається на перших етапах взаємодії вірусу та клітини, при множинності зараження 100-1000 вірусних часток на клітину. Злиття зсередини відзначають на пізніх етапах процесу розмноження вірусу, що обумовлене синтезом вірусоспецифічних антигенів. Злиття може відбуватися між зараженими та незараженими клітинами.



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. 4.6. Рання та пізня ЦПД при герпесвірусній інфекції

Також утворення багатоядерних клітин можна пояснити порушенням процесу поділу клітин під впливом вірусів та розчиненням клітинних оболонок під дією вірусних ферментів, в результаті чого цитоплазма розташованих поряд клітин зливається.

Кожному вірусу властивий визначений діапазон симпластоутворення. Серед вірусів з такою активністю є віруси, що викликають деструкцію і руйнування клітин (віруси з родини *Poxviridae*), цитоплазматичні та ядерні включення (віруси чуми ВРХ та інфекційного ринотрахеїту). Симпластоутворення можна спостерігати в різних первинних і перещеплюваних культурах

клітин. У деяких вірусів симпластоутворення – єдина ознака ураження клітин, що має важливе діагностичне значення для ідентифікації.

Потрібно розрізнити терміни *симпласт* і *синцитій*. Різниця між цими поняттями полягає в тому, що синцитії виникають внаслідок часткового злиття цитоплазматичної мембрани клітин, на відміну від повного злиття мембрани при утворенні симпластів. Таким чином, синцитій – це група клітин, які з'єднані між собою протоплазматичними відростками, а симпласти мають спільну масу протоплазми, в якій міститься багато ядер.

Слід пам'ятати, що вірус може не викликати появу типової для своєї таксономічної групи ЦПД. Крім того, в різних типах клітинних культур цитопатичні зміни під впливом того самого вірусу можуть бути різними. Найкраще охарактеризувати ЦПД можна при щоденному огляді культур, які були інфіковані вірусом при низькій множинності інфекції ($<0,1$; тобто 10 вірусних часток на 100 кл).

Швидкість виникнення ЦПД також є характеристикою, яка може бути використана для ідентифікації вірусів. Як правило, при повільній швидкості появи ЦПД вона з'являється через 4-5 днів після ураження культур вірусом з низькою множинністю інфікування. Швидка ЦПД з'являється через 1-2 дні після зараження культури вірусом з низькою множинністю інфекції. Важливо відзначити, що при високій множинності інфекції всі типи ЦПД розвиваються швидко. Таким чином, визначення типу і терміну виникнення ЦПД повинно відбуватися при низькій множинності інфікування культури вірусом.

Натепер для характеристики деструктивних змін одношарових культур клітин, що заражені різними вірусами, використовується така класифікація ЦПД:

1. *Тотальна круглоклітинна дегенерація клітин моношару*. Найбільш сувора форма ЦПД. Усі клітини моношару швидко стають зморшкуватими, зменшуються у розмірі та заокруглюються, у ядрах спостерігається пікноз. Протягом 72 годин клітини повністю руйнуються та відокремлюються від поверхні. Цей тип ЦПД характерний для більшості ентеровірусів (рис.4.6.а).

2. *Субтотальна деструкція* полягає у відділенні від стінок флакона (загибелі) деяких, але не всіх, клітин моношару. Цей тип ЦПД виникає при ураженні клітин тогавірусами (*Alphavirus*), деякими пікорнавірусами, а також параміксовірусами і рабдовірусами (рис. 4.6. б).

3. *Вогнищева дегенерація*. Цей тип характерний для герпесвірусів та поксвірусів. При цьому типі ЦПД не спостерігається тотальне руйнування клітин моношару, ушкодження мають локальний характер (фокуси ураження). Такий осередковий характер цитопатичних змін скоріше за все пов'язаний з прямою передачею вірусів від клітини до клітини, а не з їхньою дифузиею у поживному середовищі. На початкових етапах інфекції клітини збільшуються, заокруглюються й починають інтенсивніше заломлювати світло (що дає можливість їх легко виявити). Надалі клітини відриваються від поверхні, залишаючи безклітинні ділянки, оточені округлими клітинами. Таким чином, ураження моношару поширюється концентрично. Зрештою весь моношар може бути охоплений деструктивними змінами. Пізніше можуть спостерігатися значні зміни структури цитоплазми та спостерігатися злиття клітин. Цей тип

ЦПД найкраще проявляється при низькій дозі вірусів (низька множинність інфекції) (рис. 4.6. г).

4. *Осередкові скупчення заокруглених клітин*, що нагадують грона винограду. Виникають при ураженні клітин аденовірусами (рис. 4.6. д).

5. *Пінна дегенерація (вакуолізація)*. Пов'язана з формуванням великих або численних цитоплазматичних вакуолей. Цей тип ЦПД викликають представники кількох родин вірусів, в тому числі деякі ретровіруси, параміксовіруси й флавівіруси (*Pestivirus*) (рис. 4.6. в). Вакуолізацію важко виявити без забарвлення клітин моношару.

6. *Злиття клітин і утворення багатоядерних клітин* (синцитіїв та полікаріоцитів). При цьому типі ЦПД відбувається розчинення клітинних оболонок, внаслідок чого цитоплазма сусідніх клітин (чотирьох і більше) зливається, утворюючи єдине ціле, в якому (в основному по периферії) розташовані ядра. Виникає при ураженні клітин вірусами кору, вісповакцини, герпесу та ін. Малі синцитії добре видно лише після фарбування. Формування синцитій – це єдина ЦПД деяких параміксовірусів, проте герпесвіруси можуть призводити до формування також і інших форм ЦПД.

7. *Формування включень*. За багатьох вірусних інфекцій у клітинах (в ядрі чи цитоплазмі) різних органів і тканин з'являються особливі утворення, які називають *включеннями* або *тільцями-включеннями*. Їх класифікують за локалізацією в клітині, вмістом нуклеїнової кислоти, тинкторіальними властивостями (здатністю взаємодіяти з барвниками) та гомогенністю (гомогенні чи зернисті). За своєю природою включення можуть бути скупченням віріонів, що залишаються в клітині, клітинним матеріалом, зміненим під впливом репродукції вірусів, надлишком вірусних білків, що не увійшли до складу вірусів, або комбінацією цих елементів (найчастіше). Розмір включень дуже варіюється: від ледве помітних до розмірів клітинного ядра, а кількісно – від одиночних до 10-12 на одну клітину.

Включення, що утворюються в клітинах під впливом деяких вірусів, мають спеціальні назви. Так, включення, що утворюються вірусом сказу у цитоплазмі нервових клітин, називаються тільця Бабеша-Негрі, включення в цитоплазмі епітеліальних клітин, утворені вірусом віспи птахів, – тільця Боллінгера, а віспи ссавців – тільця Гварнієрі, утворені вірусом чуми м'ясоїдних – тільцями Ленца, вірусом інфекційного ларинготрахеїту курей – тільцями Зейфреда, вірусом жовтої гарячки – тільця Торреса (ацидофільні включення у ядрах гепатоцитів), вірусом простого герпесу – тільця Каудрі, вірусом хвороби Борна – тільця Дегена та Оста, вірусом чуми собак – тільця Лектура, вірусом інфекційного гепатиту собак – тільця Рубарта тощо.

Включення можуть локалізуватись у клітині в ядрі або в цитоплазмі.

Цитоплазматичні включення характерні при віспі (тільця Гварнієрі), сказі (тільця Бабеша-Негрі) (рис. 4.7.б), грипі, парагрипі, чумі великої рогатої худоби та ін.

Включення в ядрі розвиваються при ринотрахеїті великої рогатої худоби, ринопневмонії коней, ларинготрахеїті птахів, аденовірусній інфекції, герпесвірусній інфекції (тільця Каудрі) (рис. 4.7.а), хворобі Ауескі, ящури, гепатиті собак, жовтій гарячці.

По відношенню до барвників включення поділяють на базofilні (фарбуються основними барвниками – азур, піроксин) та ацидофільні або оксифільні включення (фарбуються кислими барвниками – еозин, кислий фуксин).

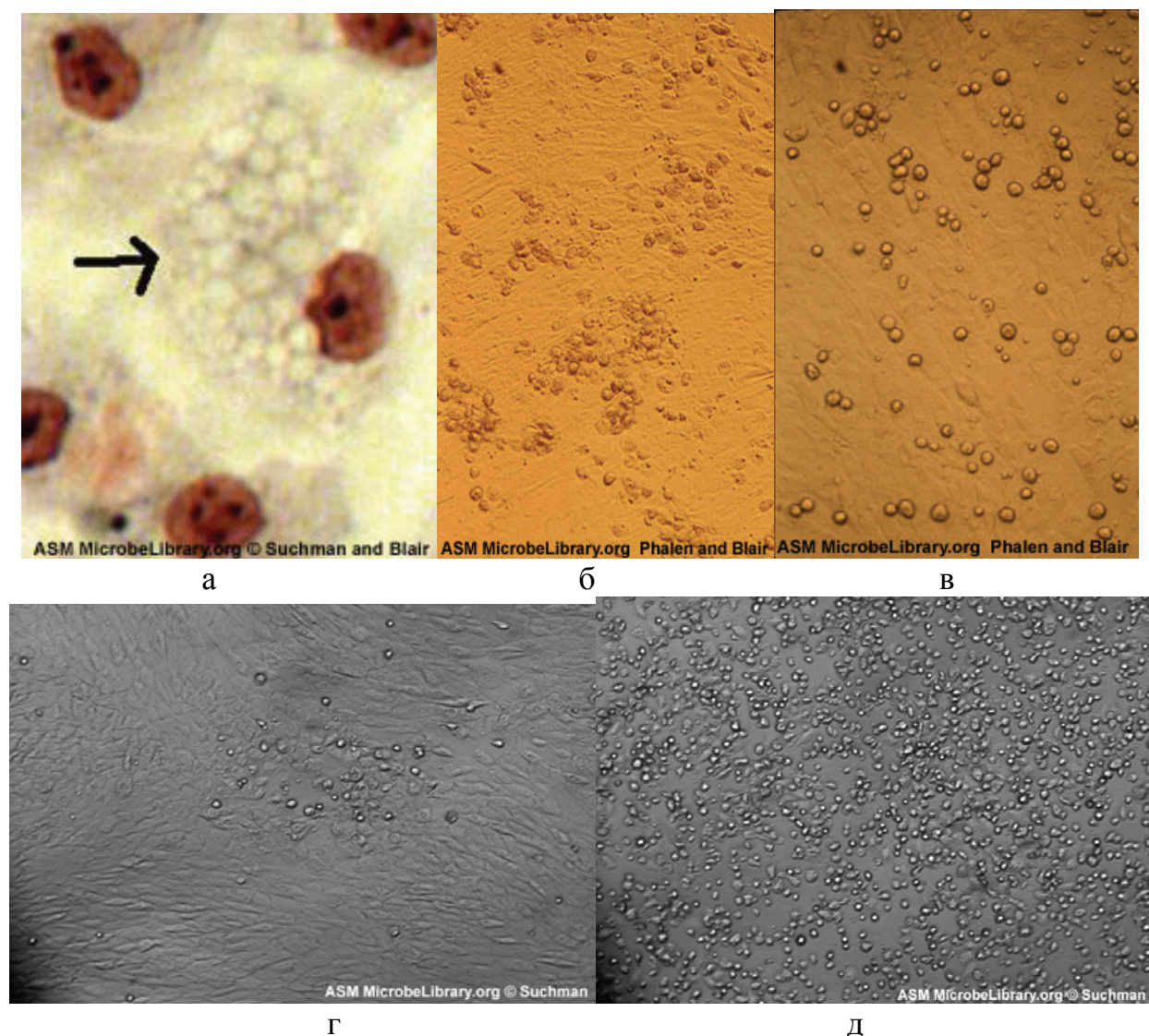


Рис. 4.6. ЦПД: а – заокруглення клітин у випадку зараження культури клітин ентеровірусом великої рогатої худоби (ВРХ) та б – везикулярного стоматиту з високою множинністю інфекції (збільшення $\times 200$), в – вірус вірусної діареї ВРХ, забарвлення за Гімза (збільшення $\times 400$); г – ЦПД при ураженні вірусом Орф (низька множинність інфекції) (збільшення $\times 100$), д – аденовірусний тип ЦПД (збільшення $\times 100$) (Suchman, Erica, Blair, Carol, 2014)

За своєю природою включення можуть бути місцями утворення вірусних часток (фабрики віріонів – тільця Гварнієрі), скупченням вірусів (тільця Бабеша–Негрі, поліедри), глибокими хроматину (тільця Каудрі).

Здатність до забарвлення барвниками, розміри, форма, структура та розташування в клітині включень, що утворюються різними вірусами, неоднакові, але специфічні для кожного вірусу. Тому в деяких випадках виявлення в патологічному матеріалі внутрішньоклітинних включень з певними

характеристиками може свідчити про те, яким вірусом вони утворені, а значить, і про наявність цього вірусу в досліджуваному матеріалі. Для деяких вірусних хвороб (сказ, віспа, ринопневмонія коней, аденовірусна інфекція, інфекційний ринотрахеїт ВРХ) виявлення тілець-включень є настільки специфічним (патогномічним), що стало основою експрес-діагностики цих захворювань. Проте в інших випадках (наприклад, грипу тварин, хвороби Ауескі, ларинготрахеїту птахів та інших) виявлення тілець-включень – лише допоміжний метод діагностики. На частоту виявлення включень, окрім штамових відмінностей вірусів, впливає і вік тварини (у молодих вони з'являються частіше), і фізіологічний стан організму.

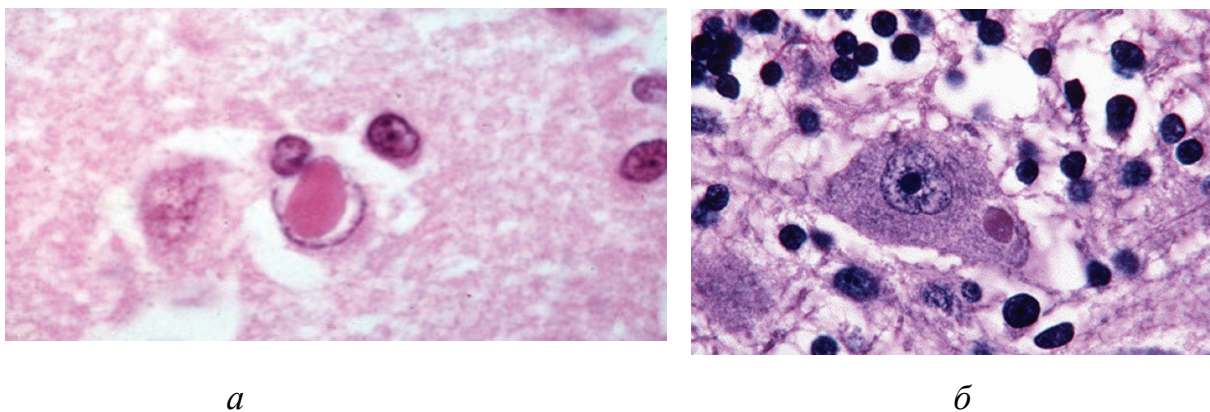


Рис. 4.7. Вірусні включення: типові внутрішні ядерні включення при герпесвірусній інфекції в гліальних клітинах (а) (за матеріалами сайту <http://peir.path.uab.edu>), цитоплазматичні включення Бабеша-Негрі при сказі (б) (за матеріалами сайту <https://www.reddit.com>)

Ступінь вираження дегенеративних змін оцінюють за чотири-плюсовою системою: (4+) – означає, що відбувається деструкція всіх клітин, (3+) – у 75% від усіх, (2+) – у 50%, (+) – до 25% клітин, (0) – ЦПД проявляється в окремих клітинах. Цю систему оцінювання ЦПД використовують для титрування вірусів у одношарових культурах клітин.

Окрім того, титрування вірусів та антитіл до них в одношарових культурах клітин може проводитися й іншими методами: методом кольорової реакції (відбувається зміна забарвлення на жовтий колір середовища під впливом продуктів метаболізму неуражених клітин, тоді як у тканинній рідині заражених вірусами клітин зберігається вихідний колір середовища – червоний), методом бляшок (рис. 5.1), у реакції гемадсорбції (РГАд, здатність культур клітин, інфікованих вірусами, адсорбувати на своїй поверхні еритроцити).

Таким чином, існують такі основні методи виявлення та ідентифікації вірусів у клітинних культурах:

1. за цитопатичною дією;
2. за виявленням внутрішньоклітинних включень (кольорова вклейка рис.7) ;
3. електронною мікроскопією;
4. у реакціях імуноферментного та радіоімунного аналізу (ІФА, РІА);

5. у реакції гемадсорбції (кольорова вклейка рис. 6);
6. у реакції імунофлюоресценції (кольорова вклейка рис. 8);
7. за пригніченням метаболізму клітин (кольорова проба);
8. за утворенням бляшок (див. тему 5).

Отже, культури клітин знаходять широке застосування у вірусології для діагностичних, наукових і виробничих цілей. Окрім того, що використання культур клітин позбавляє від страждань велику кількість тварин, використання культур клітин людини дає змогу оцінювати пошкоджуючий вплив вірусів на вид, недоступний для таких експериментів, тобто на людину. До того ж результати таких тестів є більш відтворюваними, оскільки вони проводяться *in vitro*.

Практична робота

Виявлення розмноження вірусів у культурі клітин за цитопатичною дією

Завдання: розглянути препарати культури клітин тварин *in vitro*, ознайомитися з їхніми морфологічними особливостями та класифікацією. Навчитися визначати тип ЦПД вірусів у культурі клітин.

Матеріальне забезпечення: світловий мікроскоп, забарвлені мікропрепарати первинних, постійних та диплоїдних клітинних культур, забарвлені мікропрепарати клітинних культур з різними типами ЦПД та включень, таблиці, слайди.

Хід роботи:

1) Розглянути під світловим мікроскопом неінфіковані вірусом культури клітин, які належать до первинних, диплоїдних та постійних. Визначити їхню морфологію, тип клітин, вказати ступінь щільності популяції клітинного моношару.

2) Дослідити фіксовані забарвлені препарати інфікованих вірусами культур клітин для виявлення ознак цитопатичної дії, описати їх.

3) Знайти внутрішньоклітинні включення при інфекціях, що викликані різними вірусами.

4) Замалювати препарати здорових та вірусінфікованих клітинних культур.

5) Порівняти морфологію неінфікованих та інфікованих вірусами клітинних культур.

Контрольні завдання:

1. Занотувати в робочі журнали:

1. Типи культур клітин та приклади вірусів, що культивують у цих культурах.

2. Приклади вірусів та ЦПД, що вони викликають

2. Замалювати в альбоми:

1. Препарати здорових та інфікованих вірусами клітинних культур, внутрішньоклітинні включення.

Контрольні запитання:

1. Для чого використовують клітинні культури у вірусології?

2. Назвіть типи клітинних культур. Охарактеризуйте кожен із них.

3. Які розчини і поживні середовища використовують для культивування клітин?

4. Який компонент додають у сольові розчини як індикатор зміни їхнього рН?

5. Що таке CO₂ інкубатор?

6. Які основні методи виявлення та індикації вірусів у культурі клітин ви знаєте?

7. Які причини виникнення та розвитку ЦПД вірусів?

8. Класифікація ЦПД.
9. Віруси, що не викликають ЦПД.
10. Поясніть різницю між поняттями “багатоядерна клітина”, “симпласт” та “синцитій”.
11. Що таке внутрішньоклітинні включення? Яка їхня природа?
12. Методи виявлення вірусоспецифічних включень.
13. Яка природа вірусоспецифічних включень та їхня локалізація в клітині за наявності таких інфекцій:
 - аденовірусна інфекція;
 - реовірусна інфекція;
 - грипозна інфекція;
 - герпетична інфекція?
14. Від чого залежать перебіг та ступінь завершеності циклу репродукції в культурі клітин?

Література:

1. Адамс Р. Методы культуры клеток для биохимиков. – М.: Мир., 1983. – 263 с., ил.
2. Белоусова Р.В., Троценко Н.И., Преображенская Э.А. Практикум по ветеринарной вирусологии. – 3-е. изд., перераб.и доп. – М.: Колос, 2006. –248 с. Ил.
3. Букринская А.Г. Вирусология. – М.: Медицина, 1986. – 336 с., ил.
4. Посібник з медичної вірусології / Гирін В.М. , Порихницький В.Г., Вороненко С.Г., Дзюблик І.В., Ковалишин Г.Г., Кіцак В.Я., Букринський А.Г., Бойко І.І. ; за ред. Гирін В.М. – К.: Здоров’я, 1995. – 368 с.: іл.
5. Голубев Д.Б., Сомина А.А., Медведева М.Н. Руководство по применению клеточных культур в вирусологии. – Л.: Медицина., 1976. – 224 с.
6. Культура животных клеток. Методы: пер.с англ./ Под ред. Р. Фрешни. – М.: Мир., 1989. – 333 с., ил.
7. Новые методы культуры животных тканей/ Под ред. Оленова Ю.М. – М.: Мир, 1976. – 255 с., ил.
8. Сергеев В.А., Собко Ю.А. Культуры клеток в ветеринарии и биотехнологии. – К.: Урожай., 1990. – 152 с.
9. Топчий М.К., Корнюшенко Н.П. Руководство к практическим занятиям по вирусологии. – К., 1967. – 247с.
10. Троценко Н.И., Белоусова Р.В., Преображенская Э.А. Практикум по ветеринарной вирусологии. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: Колос, 2000. – 272 с, ил.
11. Animal cell culture. Third edition. A Practical Approach. J.R.W. Masyers. Oxford University Press. – 2000. – p.315
12. Animal cell techniques. M. Clynes (ed.). – Berlin, Heideberg, New York: Springer. – 1998. – p.634.
13. Suchman, Erica, Blair, Carol. "Cytopathic Effects of Viruses Protocols". ASM Microbe Library. American Society for Microbiology. Retrieved 20 November 2014.

Тема 5. ТИТРУВАННЯ ВІРУСІВ ЛЮДИНИ ТА ТВАРИН

У лабораторних роботах з вірусами, в біофармвиробництві та у медичній і ветеринарній практиці постійно виникає необхідність визначення кількості вірусів у тому чи іншому матеріалі. Без такого визначення неможливе контрольоване експериментальне ураження вірусами лабораторних тварин, виробництво живих та інактивованих противірусних вакцин і діагностичних препаратів, оцінка активності живих противірусних вакцин, отримання імунних сироваток та багатьох інших завдань.

Кількість вірусу в будь-якому матеріалі визначають за титром вірусу в цьому матеріалі. Титром вірусу називають вираження його концентрації у матеріалі. **Титр вірусу** – це кількість вірусу, яка міститься в одиниці об'єму матеріалу. Оскільки кількість вірусу неможливо виразити в звичайно прийнятих одиницях (об'єм, маса тощо), застосовують вимір у одиницях активності або одиницях дії. Віруси проявляють інфекційну і гемаглютинуючу дії. Звідси й одиниці кількості вірусів – інфекційні та гемаглютинуючі.

Титрування вірусів за інфекційною дією зі статистично оцінюваним ефектом

У лабораторній практиці чутливими до вірусів живими системами є тварини, курячі ембріони та культура клітин. Ступінь чутливості цих об'єктів до вірусів різний. Вірулентність вірусів оцінюють за величиною летальної або інфікуючої доз, які виражають в умовно прийнятих одиницях. Якщо заразити навіть високовірулентним штамом вірусу багато живих систем, стовідсотковий ефект зумовити не вдається. Тому інфекційний титр вірусів може бути визначений як статистична величина.

За одиницю інфекційного титру вірусів прийнято 50% ефективну дозу – ED_{50} . Це доза вірусу, що спричинює інфекційний ефект у 50% заражених живих систем. Найбільш статистично достовірною дозою. Встановлюється на основі статистичної обробки отриманих результатів за Рідом і Менчем.

ED_{50} – це збірне поняття. Залежно від виду тест-об'єкта та форми прояву інфекційного ефекту ED_{50} називають по-різному в кожному окремому випадку (див. Тема 2.).

ED_{50} найбільш статистично достовірною дозою. Одним з найпростіших методів обчислення середньооефективної дози є метод Ріда і Менча. Цей метод виходить з припущення, що якщо якийсь тест-об'єкт дав позитивний ефект при будь-якій дозі, то він дав би такий самий ефект і при більш високих дозах, і навпаки, якщо тест об'єкт дав негативний ефект при певній дозі, то він дав би також негативний ефект і при всіх менших дозах. Для правильного використання методу Ріда і Менча або методу Кербера необхідно, щоб інтервал між випробовуваними дозами був постійний (у звичайному або логарифмічному масштабі). Для встановлення летальної дози слід брати до уваги спосіб введення збудника, а також масу й вік піддослідних тварин. Так само визначають інфекційну дозу. Високовірулентні віруси здатні викликати хворобу людини або тварин у найменших дозах.

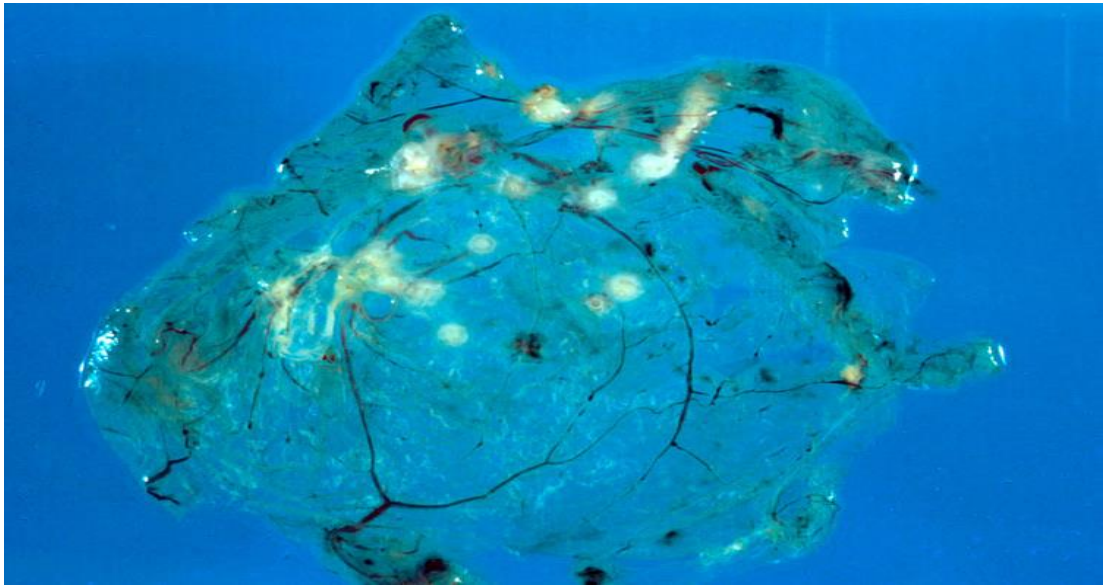
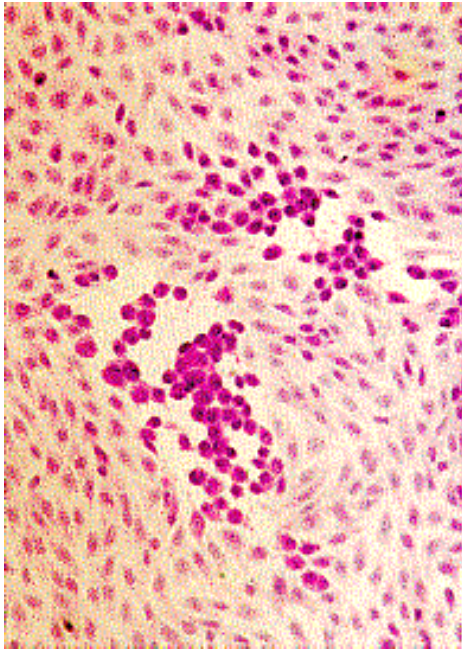


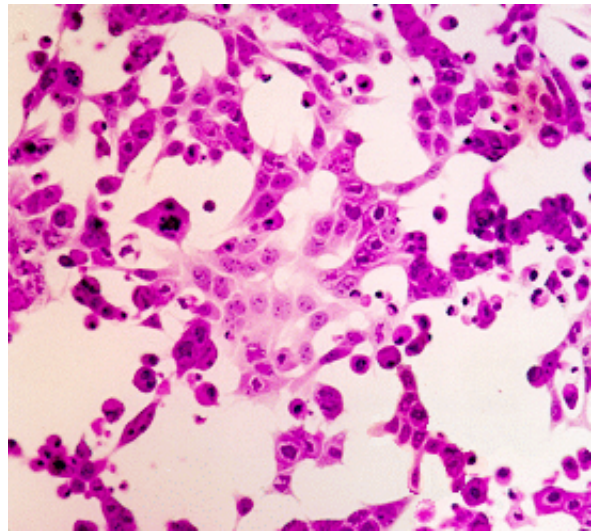
Рис. 1. Симптоми ураження ХАО під дією вірусу віспи птахів через 6 днів після інфікування



Рис. 2. Інфекційний бронхит. Порівняння нормального 18 денного ембріону (праворуч) та двох інфікованих ембріонів з симптомами карликовості того ж віку



а



б

Рис. 3. Заокруглення клітин у випадку зараження культури клітин герпесвірусом (а) та скупчення заокруглених клітин у випадку зараження культури клітин аденовірусом (б)

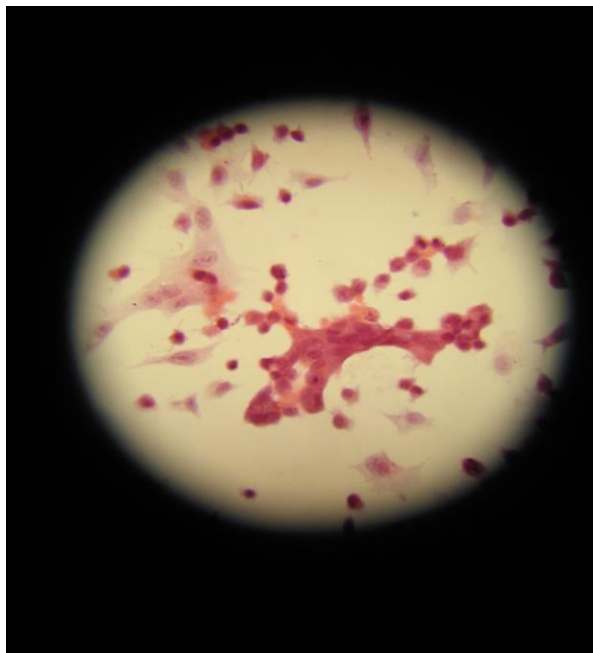


Рис. 4. Формування симпласту у культурі клітин, інфікованій вірусом кору

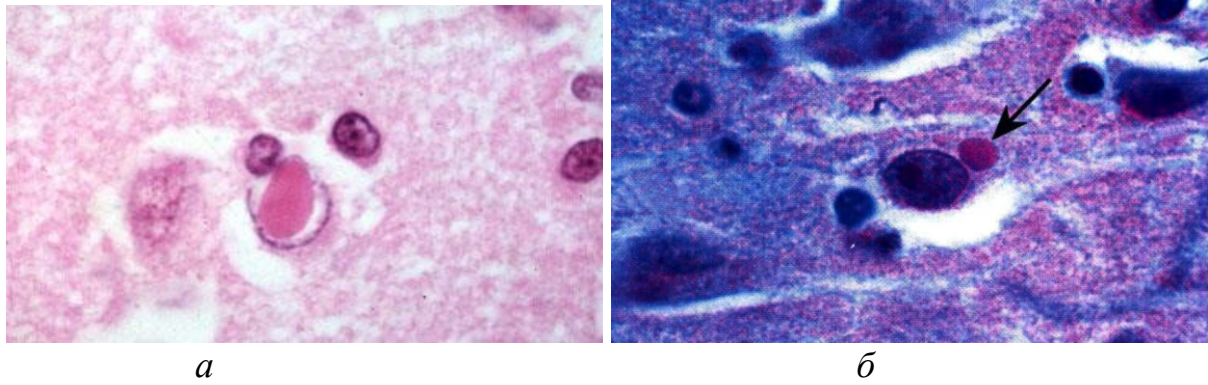


Рис.5. Вірусні включення: типові внутрішні ядерні включення при герпесвірусній інфекції в гліальних клітинах (а), цитоплазматичні включення Бабеша-Негрі при сказі (б)

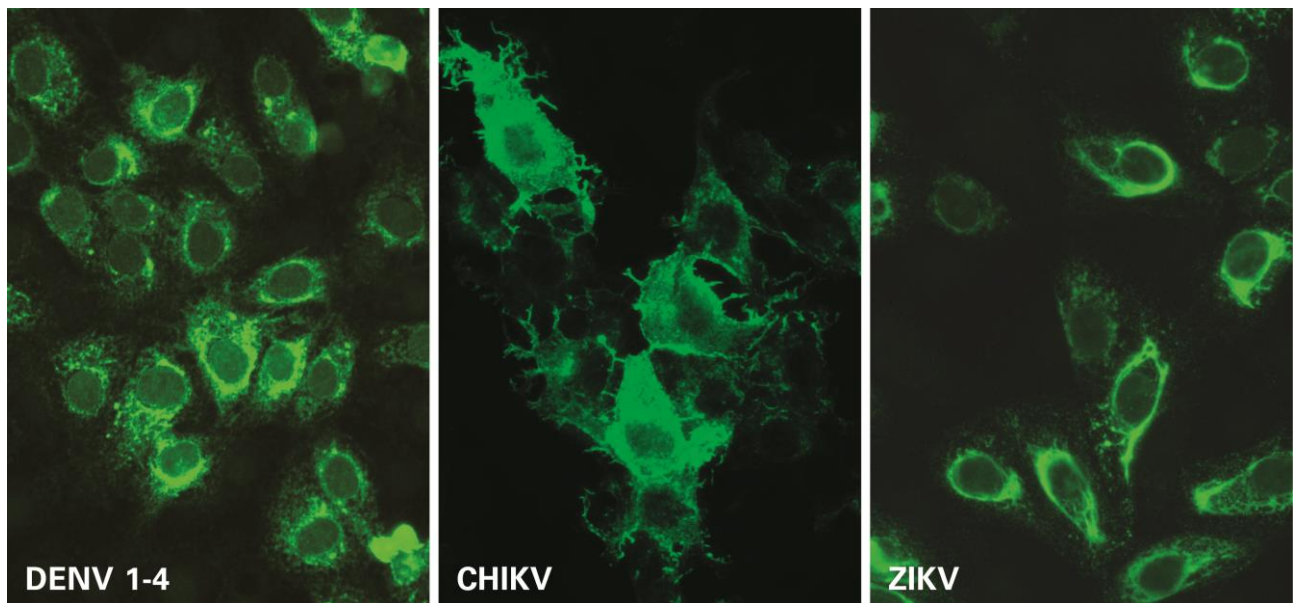


Рис.6. Результати непрямого імуофлюоресцентного аналізу з метою виявлення антитіл до вірусів денге (DENV 1-4), Чікунгунья (СНІКV) та Зіка (ZIKV)

СИМПТОМИ ВІРУСНОГО УРАЖЕННЯ РОСЛИН



Рис. 7. Симптоми жовто-зеленої мозаїки на листках тютюну



Рис.8. Симптоми темно-зеленої прижилкової мозаїки на листку кабачка



Рис.9. Симптоми жовто-зеленої мозаїки та деформациї на листках кабачка



Рис. 10. Симптоми енацій на листках тютюну



Рис.11. Симптоми нитковидності на листках кабачків



Рис.12. Некрози на листку *N. rustica*



Рис.13. Симптоми деформації плоду кабачка



Рис.14. Симптоми плямистості на плоді томата

Значення ефективної дози

Тест-об'єкт	Інфекційна дія вірусів	Назва ЕД ₅₀
Лабораторні тварини	Загибель	ЛД ₅₀ – 50% летальна доза
	Клінічні ознаки або патолого-анатомічні зміни	ІД ₅₀ – 50% інфекційна доза
Курячі ембріони	Загибель	ЕЛД ₅₀ – 50% ембріональна летальна доза
	Клінічні ознаки або патолого-анатомічні зміни	ЕІД ₅₀ – 50% ембріональна інфекційна доза
Культура клітин	Цитопатична дія	ЦД ₅₀ (ТЦД ₅₀) – 50% цитопатична доза (або 50% тканинна цитопатична доза)

Методика визначення ЕД₅₀.

1. Готують ряд послідовних 10-разових розведень вірусу на фізрозчині чи розчині Хенкса, або на середовищі для культури клітин (залежно від виду тест-об'єкта). Для цього в кілька пробірок вносять 9 частин фізрозчину, в першу додають 1 частину вірусу, перемішують триразовим піпетуванням і переносять 1 частину в наступну пробірку і т. д. Кожне розведення вірусу готують новою піпеткою. Ступінь розбавлення вірусу залежить від його передбаченої вихідної концентрації. В останніх розбавленнях інфекційна дія вірусу не повинна виявлятися. Готують 10-кратні розведення, оскільки існує пряма залежність між 10-кратними розведеннями вірусу та його інфекційною дією. Крім того, при 10-кратних розведеннях зручніше проводити подальші розрахунки.

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

3. За зараженими тест-об'єктами спостерігають протягом певного часу (5–12 діб), враховують результати дії вірусу (загибель, клінічні ознаки, патологоанатомічні зміни чи ЦПД).

4. Розведення вірусу, яке спричинює 50% інфекційний ефект, розраховують статистичними методами, найчастіше за методом Ріда і Менча або методом Кербера:

а) за Рідом і Менчем

$$\lg \text{ЕД}_{50} = \lg \text{В} - [(b - 50) / (b - a)] \times \lg d,$$

де ЕД₅₀ – розрахункове розведення вірусу; В – розведення, яке дає ефект понад 50 %; b – відсоток, який відповідає розведенню В; a – відсоток, який відповідає розведенню, що дає ефект менший від 50 %; d – коефіцієнт розведення.

b) за Кербером

$$\lg E_{D_{50}} = \lg D + \lg d/2 - \lg d \Sigma (r/n),$$

де D – найбільше розведення вірусу, яке ще дає 100% ефект; d – коефіцієнт розведення; $\Sigma (r/n)$ – сума відношень позитивно реагуючих тест-об'єктів до заражених для усіх розведень, що дають ефект від 0 до 100%; r – кількість позитивно реагуючих тест-об'єктів на кожне розведення; n – кількість заражених тест-об'єктів на кожне розведення.

5. Після того, як визначили розведення вірусу, що містить одну $E_{D_{50}}$, визначають, скільки $E_{D_{50}}$ містить такий самий об'єм нерозведеного вірусу. Потім перераховують кількість $E_{D_{50}}$ на 1 мл вірусомісного матеріалу, що й буде показником титру вірусу.

Визначення титру вірусу за інфекційною дією, що оцінюється за одиничним ефектом

Інфекційна дія вірусів може бути оцінена за одиничним ефектом – появою у тест-об'єктів локальних уражень. До них належать два вияви: утворення бляшок у культурі клітин та віспин на ХАО курячого ембріона.

Відповідно інфекційний титр вірусу визначають у бляшкоутворювальних одиницях (БУО) та віспоутворювальних одиницях (ВУО).

1 БУО – те найбільше розведення вірусу, яке в культурі клітин здатне утворити 1 бляшку (рис.5.1). 1 ВУО – це доза вірусу, здатна спричинити утворення однієї віспини на ХАО курячого ембріона.

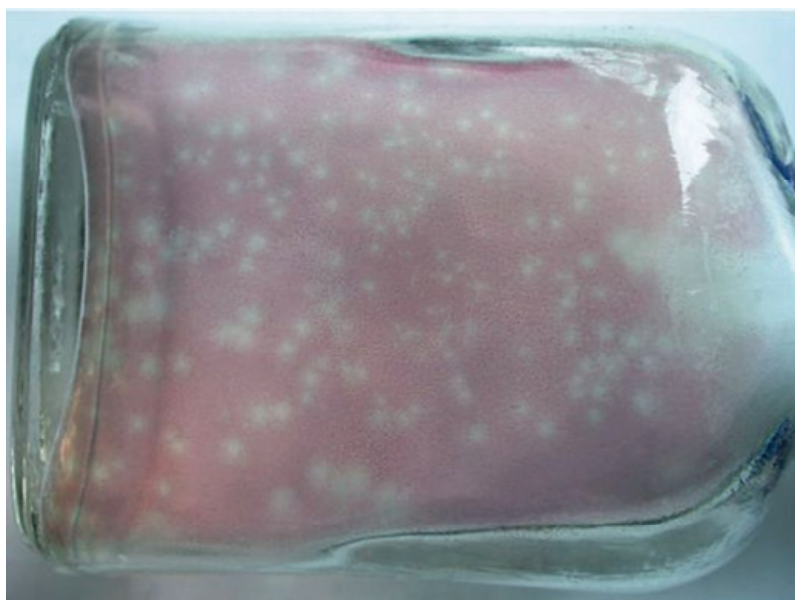


Рис. 5.1. Утворення бляшок у культурі клітин, уражених вірусом

Титрування вірусу в культурах клітин передбачає визначення 50% інфекційної дії (за одиницю кількості вірусу приймається така його доза, яка здатна викликати ефект у 50% заражених тест-об'єктів, $E_{D_{50}}$). Прикладом $E_{D_{50}}$

може бути ЦПД₅₀ (доза вірусу, яка викликає появу цитопатичного ефекту у 50% заражених клітин у культурі).

Аналогічно проводять розрахунки для визначення 1 ВУО на ХАО курячих ембріонів.

Для визначення титру вірусу в ВУО декілька культур клітин у матрасах заражують точно відміряними однаковими об'ємами дослідного вірусомісного матеріалу. Потім вираховують, скільки бляшок утворилося в кожному з них і розраховують середнє арифметичне цієї кількості. Воно дорівнює кількості ВУО, що міститься в дозі вірусомісного матеріалу, який вносили в культуру.

$$T = n / (V \times a),$$

де n – середнє арифметичне кількості бляшок на один матрас; V – об'єм вірусомісного матеріалу, який вносили в культуру; a – розведення вірусомісного матеріалу, яке використовували для зараження.

Цей приклад титрування вірусу – спрощений, оскільки він не враховує випадків високої концентрації вірусу в матеріалі, за якої бляшки в культурі клітин можуть зливатися між собою і їх буде важко порахувати. Вважається, що на підрахування піддаються бляшки, якщо їхня кількість не перевищує 50 на матрас. Тому готують декілька розведень досліджуваного матеріалу (звичайно з коефіцієнтом 10) і кожним розведенням в однакових дозах заражують рівні групи культур клітин. Після цього розраховують середнє арифметичне кількості бляшок для кожного розведення, відкидаючи ті, де підрахунок виявився неможливим. Титр вірусу тоді розраховують за формулою

$$T = (n_1 + n_2 + n_3 + \dots + n_n) / (V \times (a_1 + a_2 + a_3 + \dots + a_n)),$$

де n – середнє арифметичне кількості бляшок на один матрас; V – об'єм вірусомісного матеріалу, який вносили в культуру; a – розведення вірусомісного матеріалу, яке використовували для зараження.

Реакція гемаглютинації

Можливість використовувати еритроцити різноманітних тварин як індикатори, що дають змогу виявляти різні антигени або антитіла, була продемонстрована давно. У 1902 р. Краус Р. та Людвіг Д. вперше показали можливість стафілококів аглютинувати еритроцити.

У 1941 р. Херст та незалежно від нього Мак Клиленд і Хайр відзначили, що вірус грипу склеює (аглютинує) еритроцити курей. Надалі це явище було підтверджено в багатьох лабораторіях світу. У СРСР вперше цей феномен детально вивчали А.К. Шубладзе та В.Д. Соловйов (1943 р.) Було виявлено, що вірус грипу аглютинує не тільки еритроцити курей, але й інших видів птахів та ссавців (курчат, качок, голубів, чайок, мурчаків, собак, людини).

Встановлено також, що гемаглютинуючі властивості мають багато вірусів: ортоміксовіруси, параміксовіруси, рабдовіруси, поксвіруси, реовіруси, аденовіруси та інші.

Ця властивість зумовлена взаємодією поверхневих вірусних білків (у простих вірусів це білки капсиду, у складних – білки суперкапсиду гліко- та ліпопротеїни) з рецепторами еритроцитів без участі специфічної антисироватки. Ці вірусні білки мають назву гемаглютининів.

Механізм гемаглютинації полягає в тому, що гемаглютиніни вірусу грипу взаємодіють з поверхневими білками еритроцита (глікопротеїнами) після чого відбувається адсорбція вірусу на еритроциті (рис. 5.2). Це приводить до утворення агрегату, який осідає на дно пробірки чи лунки планшета тонкою плівкою, що має вигляд «перевернутої парасольки» (повна аглютинація). Якщо ж реакція не відбулася, тобто в розчині відсутні гемаглютинуючі віруси, то еритроцити осідають на дно щільним осадом «п'ятчком». Зв'язок між вірусом та еритроцитами є зворотним, і може наступити фаза елюції (звільнення) вірусу за допомогою ферменту вірусу нейрамінідази, що дисоціює утворені зв'язки.

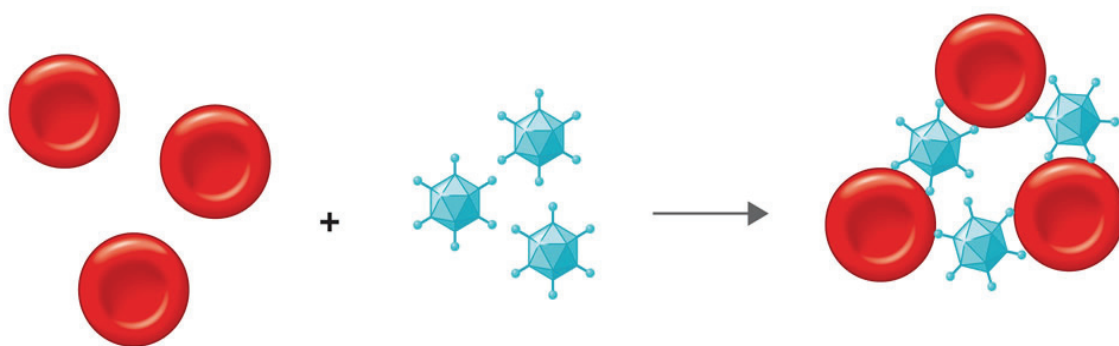


Рис. 5.2. Схематичне зображення реакції гемаглютинації

Швидкість елюції залежить від ряду факторів: концентрації солей в розчині, температури, рН середовища. Здатність елюювати з еритроцитів часто використовують у роботі з вірусом грипу для очистки та концентрації.

Реакція гемаглютинації широко застосовується у вірусологічній практиці як швидкий, технічно простий, дешевий та достатньо надійний метод виявлення гемаглютинуючих вірусів у досліджуваному матеріалі, для титрування вірусів.

Умови постановки реакції гемаглютинації. Реакція гемаглютинації (РГА) залежить від багатьох чинників. Різні типи вірусу, а іноді й штами того самого вірусу різняться чутливістю до спектру еритроцитів (гемаглютинуючих видів) (табл. 5.2). Наприклад, до вірусу грипу найбільш чутливі еритроцити курей, людини (0-групи), мурчаків; до вірусів кліщового енцефаліту – еритроцити гусей; до вірусу кору – еритроцити мавп; фітовіруси активно аглютинують баранячі еритроцити. Таку видову належність еритроцитів часто застосовують для індикації вірусів. У лабораторній діагностиці найчастіше використовують еритроцити птахів, а не ссавців, бо вони більші за розміром та швидше осідають, дають чіткий результат. Як правило, віруси, що становлять одну таксономічну одиницю, аглютинують еритроцити одних і тих самих видів тварин. Однак вірус вісповакцини, наприклад, вибірково аглютинує лише окремих особин курей.

Таблиця 5.2.

Гемаглютинуючі властивості еритроцитів тварин і птиці

Вірус	Еритроцити	Температура, ° С	pH
Сказ	Гуски, курки, мавпи, мурчака, щура, вівці, людини (0 група крові)	0 – 4	6,2 – 6,4
Везикулярного стоматиту	Гуски	4	5,8
Грипу свиней	Курки, качки, галки, тхора, мурчака, щура, собаки, їжака, людини (0 група крові)	18-22	7,2
Грипу коней	Курки, качки, гуски, голуба, мурчака, щура, миші, собаки, людини (0 група крові)	18-22	7,2
Грипу птиці	Курки, мурчака, кроля, коня, вівці, людини (0 група крові)	18-22	7,2
Віспи корів	Курки	37	7,2
Парагрипу-3 ВРХ	Мурчака, кроля, миші, корови, вівці, кози, свині, буйвола, мавпи, голуба	4, 18 – 22, 37	6,8 – 7,2
Лейкозу ВРХ	Миші	4	6.0
Трансмисивного гастроентериту свиней	Курки, мурчака, корови	4	7,2
Хвороби Ньюкасла	Курки, голуба, індика, мурчака, миші, людини (0 група крові)	18-22	7,2
Чуми м'ясоїдних	Курки, мурчака	18-22	7,0
Вірус кору	Мавп	37	7,2
Червоної висипки	Курки	37	7,2

Гемаглютинація залежить від віку донора еритроцитів. Наприклад, вірус червоної висипки аглютинує еритроцити одноденних курчат, а вірус вісповакцини – дорослих курей.

Для реакції використовують завис еритроцитів від 0,25 до 3%. Але найбільш оптимальним є 0,5–1,5% завис еритроцитів. Для його приготування свіжоотриману кров дефібринують механічно (за допомогою стерильних намистин) або використовуючи антикоагулянти (2,5–5% розчин цитрату натрію, Альсевера, гепарину). Дефібриновану кров тричі відмивають центрифугуванням у фізіологічному розчині при 1000–1500об/хв, а з осаду готують необхідну концентрацію еритроцитів. Зберігаються вони в холодильнику

приблизно тиждень. У разі потреби можна використати формалінізовані еритроцити (обробка формаліном еритроцитарної маси).

Інтенсивність реакції залежить від температури, рН середовища та виду вірусу. Наприклад, для вірусів грипу та паротиту інтенсивність РГА найбільша при $+4-22^{\circ}\text{C}$, для вірусу поліоми $+4^{\circ}\text{C}$.

РГА, як правило, проводять в ізотонічних розчинах з рН у межах 6,0 – 9,0 (наприклад, 0,85% NaCl). У кислому та лужному середовищах відбувається швидка інактивація гемаглютинуючих властивостей вірусу.

Постановка реакції складається з приготування двократних розведень вірусу на фізіологічному розчині і додавання до кожного розведення рівного об'єму завису еритроцитів. Усі компоненти реакції використовують у рівних пропорціях 1:1. Оскільки гемаглютинацію можуть викликати деякі субстрати, що не містять вірусів (слина, сироватка), деякі бактерії, то РГА повинна супроводжуватись постановкою контролів. У деяких випадках тварина, від якої беруть кров, може бути латентно інфіковано вірусами, саме тому в лунки вносять фізіологічний розчин та еритроцити. Планшет струшують і залишають при певній температурі (для вірусу грипу $+22-37^{\circ}\text{C}$). Після певного часу експозиції вираховують результати. Позитивну реакцію оцінюють плюсами від одного до трьох відповідно, за інтенсивністю аглютинації (рис. 5.3.).



Рис. 5.3. Обчислення результатів реакції гемаглютинації (Т= 1:64)

Результати реакції оцінюють у плюсах після повного осідання еритроцитів у контрольній лунці:

- +++ – усі еритроцити аглютинували й утворили суцільний шар («парасольку»);
- ++ – більшість еритроцитів аглютинувала й утворила «парасольку», по краях якої помітне тонке кільце з неаглютинованих еритроцитів;
- + – більшість еритроцитів не аглютинували й утворили осад, що має вигляд «п'ятачка», по краях якого є незначна «парасолька»;
- – усі еритроцити не аглютинували й осіли у вигляді «п'ятачка» з рівними краями.

Титром вірусу називають те найбільше його розведення, при якому спостерігається аглютинація не менша, як на два плюси (тобто одна гемаглютинуюча одиниця – 1 ГАО).

Показником гемаглютинуючого титру вірусу є число, обернено пропорційне його розведенню. Наприклад, якщо 1 ГАО міститься у розведенні вірусу 1:64, то його титр становить 64 ГАО. При позначенні гемаглютинуючого

титру об'єм вірусовмісного матеріалу, як правило, не зазначають, оскільки від об'єму титрування результати РГА не залежать (завжди змішують однакові об'єми вірусу і 1% суспензії еритроцитів).

Реакція гемаглютинації – важливий і необхідний попередній етап перед проведенням серологічної ідентифікації гемаглютинуючих вірусів або перед виявленням протівірусних антитіл.

Практична робота

Визначення титру вірусу в реакції гемаглютинації

Завдання: визначити титр вірусу в реакції гемаглютинації.

Матеріальне забезпечення: вірусомісний матеріал, 1,0-2% завис еритроцитів, фізіологічний розчин, планшети з округлими лунками, піпетки, гумові груші, дезрозчин, маркер.

Хід роботи

1. Приготувати 2% завис еритроцитів на фізіологічному розчині.
2. Приготувати в планшеті двократні розведення матеріалу, що містить вірус, на фізіологічному розчині. Для цього до ряду лунок внести, наприклад, по 0,02 мл фізіологічного розчину. В першу лунку рядка додати 0,02 мл досліджуваного матеріалу (отримали розведення 1:2), перенести з неї 0,02 мл до другої (розведення 1:4), з неї стільки ж до наступної і т.д. З останньої лунки 0,02 мл розведеного матеріалу відібрати та перенести в дезинфікуючий розчин.
3. Для контролю до 4-5 лунок поруч з дослідним рядком внести по 0,02 мл фізіологічного розчину.
4. До кожного розведення вірусу і до контролю додати по 0,02 мл розчину еритроцитів.
5. Струснути планшет і залишити при 22-37⁰С приблизно на півгодини.
6. Обрахувати результати реакції.

Контрольні завдання:

Занотувати в робочі журнали:

- Схему постановки реакції гемаглютинації.
- Визначити титр вірусу за результатами проведеної реакції.
- Сформулювати висновки за отриманими результатами.

Замалювати в альбомі:

- Результати постановки реакції гемаглютинації.

Контрольні запитання:

1. Які способи визначення титру вірусу ви знаєте?
2. В яких одиницях виражається інфекційний титр вірусу при титруванні на лабораторних тваринах та курячих ембріонах?
3. Як оцінюють ЦПД в культурі клітин?
4. Як розшифрувати титр вірусу, виражений у ВУО та БУО?
5. Визначте титр вірусу методом кольорової реакції, якщо при її постановці шоста пробірка ще має жовте забарвлення. Розведення вірусу в першій пробірці 10^{-1} , а в кожній наступній – зменшується в 10 раз.
6. Необхідно визначити титр вірусу в суспензії. Для достовірного виявлення концентрації вірусу в дослід узяли декілька розведень вірусної суспензії: 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000. По 0,2 мл розведеної суспензії внесли в рівні об'єми культур клітин у матрацах. Кожне розведення вірусу досліджували на 3 матрацах. Через 5 днів інкубації отримали такі результати: в матрацах, в які вносили вірусну суспензію в концентрації 1:10, неможливо було провести

розрахунок бляшок, оскільки відбувалося їхнє злиття; в матрацах з концентрацією вірусної суспензії 1:100 спостерігали утворення 135, 128 та 140 бляшок; в матрацах з концентрацією вірусної суспензії 1:1000 – 35, 40, 37 бляшок; в матрацах із концентрацією вірусної суспензії 1:10000 – 5, 7, 8 бляшок.

7. Який механізм РГА?
8. Що таке 1 ГАО?
9. Який принцип визначення титру вірусу в ГАО?
10. Назвіть фактори, що впливають на ефективність РГА.
11. Чим РГА відрізняється від інших методів титрування вірусів?
12. Як можна за допомогою РГА очистити та сконцентрувати вірус грипу?
13. Які переваги і недоліки різних методів титрування вірусів?

Література:

1. Адамс Р. Методы культуры клеток для биохимиков. – М.: Мир., 1983. – 263 с., ил.
2. Белоусова Р.В., Троценко Н.И., Преображенская Э.А. Практикум по ветеринарной вирусологии. – 3-е. изд., переаб.и доп. – М.: Колос, 2006. –248 с. Ил.
3. Букринская А.Г. Вирусология. – М.: Медицина, 1986. – 336 с., ил.
4. Голубев Д.Б., Сомина А.А., Медведева М.Н. Руководство по применению клеточных культур в вирусологии. – Л.: Медицина., 1976. – 224 с.
5. Культура животных клеток. Методы: пер.с англ./ Под ред. Р. Фрешни. – М.: Мир., 1989. – 333 с., ил.
6. Новые методы культуры животных тканей / Под ред. Оленова Ю.М. – М.: Мир, 1976. – 255 с., ил.
7. Сергеев В.А., Собко Ю.А. Культуры клеток в ветеринарии и биотехнологии. – К.: Урожай., 1990. – 152 с.
8. Троценко Н.И., Белоусова Р.В., Преображенская Э.А. Практикум по ветеринарной вирусологии. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: Колос, 2000. – 272 с, ил.
9. Animal cell culture. Third edition. A Practical Approach. J.R.W. Masyers. Oxford University Press. – 2000. – p.315.
10. Animal cell techniques. M. Clynes (ed.).- Berlin, Heideberg, New York: Springer. – 1998. – p.634.

Тема 6. ВІРУСИ РОСЛИН

Багато захворювань рослин, які тепер називають вірусними, існували давно, проте до ХХ століття лише деякі з них привертали до себе увагу. Найбільш ранні згадування стосуються строкатості тюльпанів, симптоми захворювання яких можна спостерігати на картинах давніх голландських майстрів. У ботанічній літературі згадування про строкатість листків трапляється вже в 1576 році. Після тюльпанів жертвою вірусних захворювань стала картопля. У 1775 році в деяких регіонах Європи мусили припинити її вирощування внаслідок розповсюдження захворювання, яке називали «виродження» або «виснаження» картоплі. Жовтуха персика має теж довгу історію, вона була описана ще в 1791 році. Оскільки в ті роки широко досліджувались бактерії як збудники захворювань, відкриття вірусів було наслідком невдалого застосування одного з прийомів бактеріальної техніки – нездатності бактеріального фільтра забезпечити стерильність фільтрату. Таким чином у 1892 році Д.І. Івановський зробив відкриття, яке започаткувало нову науку – вірусологію. Відкриття Д.І. Івановського отримали підтвердження в роботах М.В. Беєринка, який незалежно від Івановського Д.І. також довів, що фільтрати хворих на мозаїчність листків тютюну залишаються інфекційними, хоча мікроскопічні та культуральні дослідження не виявляють у них бактерій. Беєринк М.В. назвав агента *contagium fluidum vivum*. Стало очевидним існування в природі нових інфекційних агентів, які не детектуються мікроскопічним методом, не культивуються на штучних середовищах і здатні до активного розмноження в чутливому організмі.

Особливості взаємодії вірусів рослин з рослинною клітиною

Для інфікування рослинного організму віруси, які є облигатними внутрішньоклітинними паразитами, повинні потрапити до рослинної клітини.

Зовнішня поверхня рослин має захисні шари кутикули та пектину, крім того кожна клітина рослини оточена клітинною оболонкою (рис. 6.1). На сьогодні не відомо, щоб віруси рослин використовували специфічні клітинні рецептори, як це роблять віруси тварин і бактерій.

Клітинні мембрани рослини непроникні для багатьох навіть низькомолекулярних сполук. Після нанесення вірусного інокулюму на непошкоджену поверхню листка сприятливої рослини інфікування не відбудеться. Віруси рослин не мають власних ферментативних систем і тому не здатні долати клітинні стінки рослин. Віруси рослин використовують порушення механічної цілісності клітинної оболонки, це досягається шляхом передачі вірусу механічно, або за допомогою вектора. Передача вірусів рослин здійснюється за допомогою насіння, вегетативно, переносниками (грибами, нематодами, членистоногими).

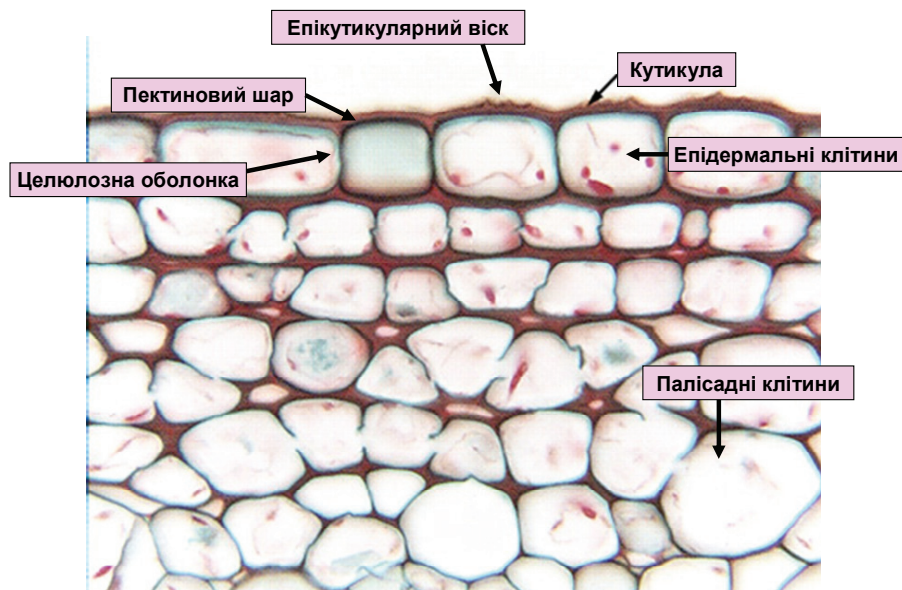


Рис. 6.1. Поперечний розріз листкової пластинки

Під час механічного ураження вірус потрапляє спочатку в клітини епідермісу, потім преміщується в мезофіл та інші тканини по плазмодесмах – цитоплазматичних тяжах. Встановлена кореляція між кількістю ектодесм та чутливістю рослин до вірусів: чим менша їхня кількість на одиницю площі листкової пластинки, тим більш стійкі рослини до ураження вірусом.

Подальше проникнення вірусу в клітину пов'язане з функціями плазмалеми, на якій вірусні частки можуть адсорбуватись.

Отже, не описана стадія специфічної адсорбції на поверхні чутливих рослинних клітин, тому первинне інфікування можливе лише при порушенні цілісності целюлозної оболонки та цитоплазматичної мембрани, від клітини до клітини вірус передається через плазмодесми, більшість вірусів рослин передаються векторами, при взаємодії з комахами-векторами деякі віруси рослин здатні розмножуватися в тканинах переносників.

Транспорт та шляхи передавання вірусів рослин

У 1934 році Г.Семюель висловив думку, що віруси можуть пересуватися організмом рослини двома шляхами – міжклітинно крізь плазмодесми рослинних клітин та системно флоемою. Гіббс А. та Харрісон Б. показали, що комбінація цих двох шляхів транспорту призводить до генералізації вірусної інфекції у рослині, причому при інокуляції інтактного листка чутливої рослини відбувається спочатку рух вірусів до кореневої системи, звідки віруси переносяться знову до надземної частини рослини, інфікуючи нижні листки, а потім розташовані вище (рис. 6.2).

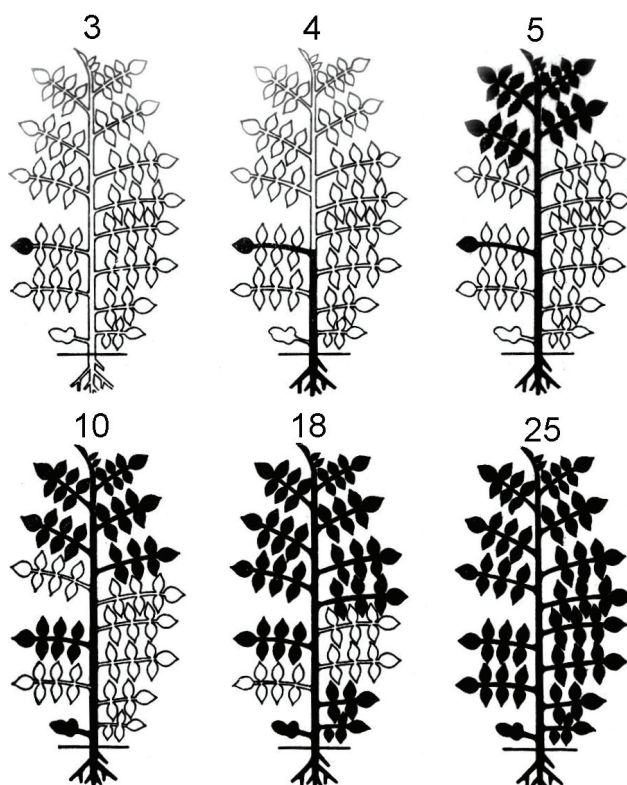


Рис. 6.2. Схема системного транспорту вірусу по рослині з часом. Цифрами позначені дні після інфікування (Гиббс, Харрисон, 1978)

На сьогодні чітко визначено, що фітовіруси переносяться від клітини до клітини та системно по рослині, використовуючи, а також необхідно модифікуючи наявні у рослинному організмі шляхи транспорту макромолекулярних речовин у межах клітини, між клітинами та між органами.

Оскільки віруси є облігатними паразитами, а термін життя окремої рослини обмежений, то необхідною умовою виживання вірусу є його перехід від однієї рослини до іншої. Враховуючи відсутність у вірусів активного транспорту та масивну кутикулу листка, віруси не можуть проникати через непошкоджену кутикулу. Для вирішення цієї проблеми їм необхідно або уникнути проникнення через непошкоджену кутикулу (наприклад, коли передача вірусів стається за допомогою пилку, насіння, вегетативним розмноженням), або використавувати певні способи передачі, пов'язані з пошкодженням кутикули, що трапляється при механічній інокуляції рослин та передачі вірусів за допомогою переносників.

Передача за допомогою насіння може відбуватися кількома способами, а саме: вірус може міститися всередині насіння (наприклад, вірус кільцевої плямистості тютюну, вірус штрихуватої мозаїки ячменю, вірус мозаїки квасолі, вірус кільцевої плямистості сливи та інші) або вірус може бути на поверхні насінневої шкірки (наприклад ВОР, ВТМ). Передача вірусів у процесі вегетативного розмноження рослин може здійснюватись за допомогою бульб (наприклад, Х-вірус картоплі), цибулин, черенків та ін.

В іншому разі віруси можуть потрапляти в рослину за допомогою переносників, таких, як членистоногі, нематоди та гриби. Членистоногих переносників поділяються на рівнокрилих (цикадки, білокрилки, попелиці),

напівжорсткокрилих (клопи), жорсткокрилих (жуки), трипсів та кліщів. Тип трансмісії вірусів за допомогою переносників може характеризуватися станом переносника за персистентністю. Це стан, при якому переносник залишається інфекційним після того, як залишить джерело інфекції (неперсистентний, напівперсистентний, персистентний). Тип трансмісії вірусів може також базуватися на поведінці вірусу в переноснику (циркулятивні та нециркулятивні віруси). Циркулятивні у свою чергу поділяються на пропaгaтивні (віруси, здатні до розмноження як у клітинах рослини-господаря, так і в клітинах переносника) та непропaгaтивні (віруси, що циркулюють, але не здатні репродукуватися у векторі, розмножуються тільки в клітинах рослини-господаря). Прикладом нециркулятивних вірусів є вірус гравірування тютюну, вірус огіркової мозаїки, прикладом циркулятивних вірусів є вірус слабкої плямистості томату, вірус жовтої карликовості ячменю, У-вірус картоплі. Крім того, віруси можуть передаватися через ґрунт за допомогою таких переносників, як нематоди (вірус кільцевої плямистості тютюну, вірус кільцевої плямистості малини, вірус чорної кільцевої плямистості томату) та гриби (вірус некрозу огірка, вірус некрозу тютюну, вірус некротичного пожовтіння жилок буряка, моп-топ вірус картоплі, вірус жовтої мозаїки ячменю, вірус мозаїки вівса).

Отже, існують такі основні шляхи передачі вірусів рослин:

- механічним контактом (пряма передача);
- у процесі вегетативного розмноження;
- за допомогою насіння;
- за допомогою пилку;
- за допомогою переносників:
 - комах;
 - нематод;
 - грибів;
- за допомогою повитиці.

Вплив вірусної інфекції на ріст і розвиток рослинного організму

Фітовіруси викликають у рослин різні патологічні зміни, тому що вірусна інфекція може зачіпати практично всі сторони життя рослини. Найбільш часто спостерігається зміна забарвлення (пожовтіння, хлороз), відмирання тканин (некроз) або деформація вегетативних органів рослин.

Одним з найбільш звичайних видимих ефектів вірусної інфекції є розвиток певного візерунка, що складається зі світло-зелених і темно-зелених ділянок, ззовні нагадує мозаїку. Природа цієї мозаїки широко різниться для різних рослин та вірусів. У дводольних ділянки, що становлять мозаїку, можуть бути неправильної форми. У них трапляються тільки два відтінки зеленого кольору – темно-зелені та світло-зелені або жовто-зелені, іноді можуть бути різні відтінки зеленого і жовтого кольору.

Мозаїки виникають на різних стадіях розвитку листка і можуть залишатися без змін, за винятком збільшення розміру, протягом усього життя листка. Для багатьох мозаїчних хвороб темно-зелені ділянки асоційовані певним чином з жилками. Для листків, що пройшли стадію клітинного поділу в

своєму рості (близько 4-6 см завдовжки для листків тютюну або китайської капусти), мозаїка не виникає. В цьому разі спостерігається загальне збліднення забарвлення листка.

Зазвичай разом з мозаїчними симптомами спостерігається зміна кольору або знебарвлення пелюсток. Змінені ділянки можуть мати вигляд смуг, плям або секторів. Зміни кольору пелюсток часто є наслідком втрати антоціанів. Такі симптоми є надійним показником того, що рослина інфікована вірусом. Плоди інфікованих рослин можуть виявляти плямистість або бути значно деформованими, наприклад, огірки, інфіковані вірусом огіркової мозаїки.

Як наслідок вірусної інфекції можуть виникати жовтухи. Віруси, що викликають генералізоване пожовтіння листків, не такі численні, як ті, що викликають мозаїки, але деякі, такі, як вірус жовтухи цукрових буряків, мають велике економічне значення.

Загибель тканин, органів або цілої рослини спостерігається при деяких вірусних хворобах. Некрози можуть розвиватися навколо жилок, по яких рухається вірус. При багатьох хворобах внаслідок цього гине цілий листок. Некроз може досить швидко розповсюджуватися по рослині.

Крім того, що інфіковані вірусом рослини менші за розміром, ніж нормальні, у них може виникати широкий спектр аномалій розвитку. Ці зміни можуть бути головними симптомами хвороби або можуть супроводжувати інші прояви інфекції. Наприклад, нерівномірний ріст листової пластинки часто спостерігається при мозаїчних хворобах. Темно-зелені ділянки листка можуть розростатись, в результаті чого краї листка стають нерівними та покрученими.

Гістологічні зміни, що виникають у чутливих до вірусу рослинах, поділяють на три головних типи:

- некроз, або загибель клітин, тканин, органів (штам N X вірусу картоплі може викликати загибель клітин флоєми);
- гіпоплазія (пригнічення росту та диференціації; наприклад, клітини мезофілу в жовтих зонах при листовій мозаїці часто менш диференційовані, ніж нормальні);
- гіперплазія (навіть повністю диференційовані клітини можуть ділитися, або виникає аномальний поділ у камбіальній тканині).

Існує два типи цитологічних ефектів: зміни нормальних клітинних структур під впливом вірусної інфекції та індукована вірусом поява нових клітинних структур.

Багато вірусів викликають також аномалії в розвитку клітинних стінок. Їх поділяють на три типи:

1. Аномальне потовщення через відкладення калози може спостерігатися в клітинах біля краю уражень, викликаних вірусом.
2. Випини клітинної стінки, до складу яких входять плазмодесми, викликаються декількома систематично віддаленими один від одного вірусами.
3. Відкладення електронщільного матеріалу між клітинною стінкою та плазматичною мембраною.

Деяка кількість вірусних часток може накопичуватися в інфікованих клітинах та існувати там, поки не настануть сприятливі умови для формування

тримірних кристалічних включень. Такі включення можуть рости, утворюючи досить великі за розміром кристали, які можна побачити в світловому мікроскопі, або вони можуть залишатись у вигляді невеликих гранул, які можна визначити тільки за допомогою електронної мікроскопії. Здатність формувати кристали в клітині залежить від властивостей самого вірусу, і не пов'язана з загальною концентрацією його в тканині або зі здатністю очищеного препарату вірусу формувати кристали.

У листках тютюну з типовими мозаїчними симптомами, що викликані ВТМ, листові волоски та епідермальні клітини, що лежать над жовто-зеленими ділянками мезофілу, можуть майже всі містити кристалічні включення. Це можна легко побачити під світловим мікроскопом на препараті свіжої тканини з країв листка. Кристали вміщують близько 60% води, а крім того, складаються переважно з послідовних шарів щільно упакованих паралельних паличкоподібних часток, орієнтованих майже перпендикулярно до площини шарів. Паличкоподібні частки в послідовних шарах повернуті по відношенню одна до одної.

Багато факторів впливають на зміну біохімічних та фізіологічних процесів в інфікованій вірусом рослині. Серед цих факторів: тип вірусу та рослини; тип тканини; вік тканини; час після інокуляції; добові та сезонні зміни; відмінності між окремими листками, особливо, між листками, ураженими мозаїчними хворобами. Але незважаючи на те, що було проведено багато досліджень з вивчення впливу вірусної інфекції на метаболічні процеси, досить складно узагальнити результати або пов'язати зміни в головних біохімічних шляхах з процесами реплікації вірусу.

Найчастіше в інфікованих вірусом рослинах спостерігають такі біохімічні та фізіологічні зміни: зменшення інтенсивності фотосинтезу, часто пов'язане зі зменшенням кількості фотосинтетичних пігментів, хлоропластних рибосом та рибулозобіфосфаткарбоксілази; підвищення інтенсивності дихання; підвищення активності деяких ферментів, особливо, поліфенолоксидаз; зниження чи підвищення активності ростових регуляторів рослин. При багатьох вірусних хворобах загальні метаболічні зміни прискорюють процеси старіння рослини. Метаболічні зміни, викликані вірусною інфекцією, часто неспецифічні. Схожі зміни можуть виникати при хворобах, викликаних клітинними патогенами або механічним чи хімічним пошкодженням.

Розрізняють чотири основні типи реакцій рослин на ураження їх вірусом:

- **імунність** – коли рослини не уражуються вірусом (синонім – стійкість);
- **надчутливість** – коли рослини уражуються з утворенням місцевих некрозів, які з'являються внаслідок відмирання клітин біля точки зараження;
- **толерантність** – коли вірус транспортується по тканинах рослини, але симптоми захворювання слабо виражені або не виражені зовсім (замасковані);
- **системне ураження** – коли вірус транспортується по всіх тканинах рослини і репродукується з чітким проявом симптомів захворювання.

Вірусне ураження рослини може проявлятися як системно, так і локально (кольорова вклейка рис. 10–17).

Локальні ураження проявляються на листку поряд із місцем ураження, це хлоротичні місцеві ураження, ураження некротичного типу та кільцева плямистість. Симптоми системного ураження поширюються по рослині; серед них затримка росту (карликовість), наприклад, викликана вірусом жовтої карликовості ячменю. Крім карликовості рослини, інфіковані вірусом, можуть мати й інші типи аномального росту, такі як енації, деформації листкової пластинки, пухлинні нарости у вигляді бородавок. Порівняно з листковими пластинками корені і стебла рідше змінюються під впливом вірусної інфекції, проте при зараженні вірусом коротковузля винограду часто спостерігаються фасціації стебел, а вірус деформації пагонів какао викликає здуття на стеблах і коренях цих рослин.

Одним з найбільш розповсюджених симптомів на листках є поява світло- і темно-зелених ділянок, що утворюють мозаїчний візерунок. Границі між темними і світлими ділянками можуть бути або чіткими, або розпливчатыми. Залежно від розміщення мозаїчних плям розрізняють прижилкову, міжжилкову, жовту мозаїку.

Для деяких вірусних захворювань (жовтуха цукрового буряка) характерним є хлоротичне забарвлення листкової пластинки, що зумовлено змінами у хлоропластах. У темно-зелених ділянках листка хлоропласти рівномірно розміщуються, у більш світлих ділянках агрегують, а в найбільш світлих зливаються і руйнуються. Про деякі групи вірусів відомо, що в темно-зелених ділянках міститься значно менше вірусу, ніж у світло-зелених.

Віруси різняться здатністю інфікувати різні рослини: кількість сприятливих рослин варіює у різних вірусів. Коло господарів вірусу і симптоми, які вони викликають, є характерними ознаками для кожного вірусу і використовуються разом з іншими для його ідентифікації. Вірусна інфекція проявляється на зовнішньому вигляді рослини, хоча це є відображенням внутрішніх змін, викликаних вірусом. Симптоми ураження можуть бути різними і залежать від рослини-господаря, тривалості інфекції, штаму вірусу та умов зовнішнього середовища. Наприклад, симптоми захворювання найбільш чітко виражені у рослин, які вирощені при яскравому світлі при помірній температурі. Для ідентифікації вірусів за візуальними симптомами використовують так звані рослини-індикатори.

Рослини-індикатори

Рослини-індикатори – це рослини, які дають чітку специфічну реакцію на певний вірус, що легко відрізняється від реакції цієї рослини на інший вірус.

За допомогою рослин-індикаторів можна розв'язати такі завдання:

- визначити інфекційну природу збудника;
- визначити коло рослин-хазяїв;
- виокремити вірус із суміші при змішаних вірусних інфекціях;
- визначити концентрацію вірусів у рослинах;
- накопичити вірус з метою подальших фізико-хімічних досліджень;
- встановити видову належність патогена.

Як індикатори в фітовірусології найчастіше використовують рослини таких родин (табл. 6.1):

Пасльонові (Solanaceae) – *Nicotiana tabacum*, *N. clevelandii*, *N. glutinosa*, *N. debneyi*, *Petunia hybrida*, *Lycopersicon esculentum*, *Datura stramonium*, *Physalis floredana*.

Лободові (Chenopodiaceae) – *Chenopodium amaranticolor*, *Ch. quinoa*.

Бобові (Fabaceae) – *Phaseolus vulgaris*, *Vicia faba*, *Vigna sinensis*, *Melilotus officinalis*.

Злакові (Poaceae) – *Zea mays*.

Гарбузові (Cucurbiaceae) – *Cucurbita maxima*, *Cucumis sativus*.

Щирицеві (Amaranthaceae) – *Gomphrena globosa*.

Таблиця 6.1.

Реакція рослин-індикаторів на віруси

Вірус	Рослини-індикатори	Реакція рослин
Вірус тютюнової мозаїки (ВТМ)	Тютюн клейкий – <i>Nicotiana glutinosa</i> L. Тютюн звичайний – <i>Nicotiana tabacum</i> L. Дурман звичайний – <i>Datura stramonium</i>	Локальна реакція, некрози Локальна реакція, некрози Локальна реакція, некрози
Вірус огіркової мозаїки (ВОМ)	Лобода рожева - <i>Chenopodium amaranticolor</i> L	Локальна реакція, некрози
Х-вірус картоплі (ХВК)	Гомфрена головчаста – <i>Gomphrena globosa</i> L. Дурман звичайний – <i>Datura stramonium</i> L.	Локальна реакція, некрози Залежно від штаму вірусу – системна реакція, мозаїка Локальна реакція, некрози Комплексна локальна та системна реакції
У-вірус картоплі (УВК)	Тютюн звичайний – <i>Nicotiana tabacum</i> L. Дурман – <i>Datura metel</i>	Локальна реакція, просвітлення жилок Локальна реакція, смугастість жилок, закручення листків, епінастії
S-вірус картоплі (SBK)	Тютюн Дебни – <i>Nicotiana debneyi</i> L. Лобода біла – <i>Chenopodium album</i>	Локальна реакція, некрози Локальна реакція, некрози
М-вірус картоплі (МВК)	Дурман – <i>Datura metel</i> Тютюн Дебни – <i>Nicotiana debneyi</i> L.	Локальна реакція, хлоротичні плями на листках. Локальна реакція, коричневі, кільцеподібні некрози
Вірус кільцевої плямистості томатів (ВКПТ)	Лобода рожева - <i>Chenopodium amaranticolor</i> L	Локальні хлорози або некрози; системний апікальний некроз

Продовження табл. 6.1

Госповірус плямистого в'янення (вілту) томату	Петунія гібридна - <i>Petunia hybrida</i> L Тютюн клейкий – <i>Nicotiana glutinosa</i> L.	Локальна реакція, некрози Локальна реакція, некрози
Вірус некротичного пожовтіння жилок цукрового буряка (різоманія)	Лобода рожева - <i>Chenopodium amaranticolor</i> L	Локальні хлоротичні або некротичні ураження.
Вірус шарки (віспи) сливи	Лобода смердюча - <i>Chenopodium foetidum</i> Schrad	Хлорози та некрози
Вірус мозаїки яблуні (ВМЯ)	Огірок посівний – <i>Cucumis sativus</i> L. Квасоля звичайна – <i>Phaseolus vulgaris</i> L.	Локальна реакція, некрози Системна реакція, мозаїка Локальна реакція, некрози

Чутливість до вірусів підвищується, якщо перед зараженням рослини-індикатори на 36-48 год поміщають у темноту. Для отримання достовірних результатів потрібно заразити мінімум по 3 індикаторні рослини для кожного варіанту досліду.

Відомо, що для більш швидкого одержання результатів (3-4 дні) використовують рослини-індикатори з місцевою реакцією. У випадку, коли рослина-індикатор з місцевою реакцією не відома, для вірусу використовують рослини-індикатори із системною реакцією, яка розвивається на 7-10 день після зараження.

Успіх застосування методу рослин-індикаторів залежить як від вірусного препарату (його стабільності, концентрації, наявності інгібуючих речовин в інокуляті), так і від рослини – її віку та сприйнятливості.

Практична робота №1

Експериментальне ураження лабораторних рослин

Завдання (мета заняття): Опанувати методику механічного ураження вірусом рослин-індикаторів різними способами.

Матеріальне забезпечення: здорові рослини тютюну *Nicotiana tabacum* сорт Імунний 580, дурману *Datura stramonium* L, лободи *Chenopodium amaranticolor*, квасолі зичайної *Phaseolus vulgaris* L. у стадії 4-х справжніх листків; віруси – вірус тютюнової мозаїки, Х-вірус картоплі; абразив – карборунд; скляні палички; 0,5-літрові колби з дистильованою водою; фосфатний буферний розчин рН 7,4; 0,5-, 1,0-літрові склянки з дезрозчином; етикетки для рослин; маркери.

Хід роботи:

Провести маркування дослідних та контрольних рослин із зазначенням вірусу, яким проводиться інокуляція, способу механічного ураження і дати ураження. (Наприклад: ВТМ, укол в центральну жилку листка, 23.01.03). При механічному ураженні рослин методом втирання інокулюму у листову пластинку умовно поділити її на дві половини, одна з яких буде контрольною, друга – дослідною.

Посипати листову пластинку карборундом, втерти скляною паличкою в контрольну половинку буферний розчин, у дослідну – вірусний препарат.

Після 10 хв інкубації карборунд та надлишок вірусного матеріалу змити дистильованою водою у склянки з дезрозчином.

Іншу рослину уразити уколом в центральну жилку.

Помістити рослини у теплицю без світла на одну добу, а потім спостерігати за рослинами при стандартному освітленні.

Через тиждень провести облік результатів та зробити висновки.

Контрольні завдання:

1. Замалювати до альбому морфологію двох вірусів рослин та симптоми їх ураження на трьох видах рослин.
2. Скласти схему способів передачі для трьох вірусів рослин (ВТМ, ХВК, ВОМ, ВЖКЯ).
3. Запропонуйте спектр рослин-індикаторів для розділення суміші ВТМ та ХВК.

Контрольні запитання:

1. Які типи реакцій рослин на ураження їх вірусом ви знаєте?
2. Що таке рослини-індикатори?
3. Дайте визначення терміну “рослина-хазяїн”.
4. Яке значення має метод рослин-індикаторів?
5. Назвіть рослини, що використовуються як індикатори при біологічному тестуванні.
6. Які шляхи передачі вірусів рослин Вам відомі?

7. Охарактеризуйте типи взаємодії в системі вектор – рослина та наведіть приклади вірусів.
8. Охарактеризуйте методи ураження рослин у лабораторних умовах.
9. Які способи передачі вірусів рослин через ґрунт Ви знаєте?
10. Особливості розповсюдження вірусів по рослині.
11. Яким чином віруси рослин потрапляють до рослинної клітини?
12. Характеристика пропaгaтивної передачі вірусів рослин (приклади).
13. Характеристика вірусу тютюнової мозаїки.

Література:

1. Бойко А.Л. Экология вирусов растений. – К.: Вища школа, 1990. – 167 с.
2. Гиббс А., Харрисон Б. Основы вирусологии растений. – М.: Мир, 1978. – С.429.
3. Гнутова Р.В. Серология и иммунохимия вирусов растений. – М.: Наука, 1993. – 301с.
4. Френкель-Конрат Х. Химия и биология вирусов. – М.: Мир, 1972. – С.74-82.
5. Cann A.J. Principles of molecular virology /Academic Press Inc. San Diego, 1993. – 234 p.
6. Matthews R.E.F. Fundamentals of plant virology. Academic Press, San Diego., 1992. – 403 p.
7. Origin and evolution of viruses / eds. Domingo E., Webster R., Holland J. - Academic Press Inc. London, 1999. – 620 p.
8. Virus taxonomy. Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses / eds. Van Regenmortel M.H.V. – San Diego, San Francisco, New York: Academic Press, 2000. – 1162 p.

Тема 7. ВИДІЛЕННЯ, ОЧИЩЕННЯ ТА КОНЦЕНТРУВАННЯ ВІРУСІВ РОСЛИН

Виділення та очищення вірусів з інфікованих тварин чи рослин є невід'ємною частиною будь-яких вірусологічних експериментів. Вперше очищений вірусний препарат ВТМ, який мав вигляд паракристалів, отримав У.Стенлі в 1935 році, за що йому було вручено Нобелівську премію.

Чистий вірусний препарат повинен містити віріони відповідного вірусу, ідентичні за розміром, морфологією, хімічним складом, біологічними та фізичними властивостями. Безпосередньо сам процес очищення включає цілий комплекс заходів, спрямованих на виділення віріонів з екстракту тканин організму-господаря. Оскільки віруси відрізняються за своєю будовою, місцем локалізації в організмі та стійкістю до певних хімічних сполук, які використовуються при виділенні, то алгоритми виділення зазвичай різні для різних вірусів. Отримати 100% чистий вірус дуже важко, тому необхідна чистота препарату визначається метою подальших досліджень.

Виділення та очищення вірусів проводиться з такою метою:

- для пасирування (накопичення та підтримання вірусу);
- для електронномікроскопічних досліджень (визначення структури та морфології). Тут найважливіше – зберегти віріони цілими;
- для вивчення серологічних та антигенних властивостей вірусів (в т.ч. отримання антивірусних сироваток). Для цього найважливіше – добре очистити від антигенів хазяїна;
- для встановлення хімічної та субмолекулярної будови віріонів. Тут необхідний максимальний ступінь чистоти вірусного препарату.

Зазвичай перед виділенням вірус накопичують на сприйнятливому хазяїні.

Виділення та освітлення вірусів рослин

Екстракція вірусів з рослини. Екстракція вірусу з рослини – це механічне руйнування тканин рослин (клітинних стінок тощо) для того, щоб вірус з клітин вийшов у отриманий рослинний сік. Механічне подрібнення тканини може відбуватися кількома шляхами, головними серед яких є перетирання у ступці та подрібнення у гомогенізаторі. Вибір методу гомогенізації залежить від морфології досліджуваного вірусу. Якщо віріони ниткоподібні і великої довжини, то гомогенізатори не можна використовувати, оскільки це може призвести до руйнування віріонів. Перетирання проводиться з додаванням буферного розчину для підтримання постійного значення рН, оскільки при перетиранні вивільняються рослинні ферменти і рН зменшується у кислоту сторону. Вибір буфера знову ж таки регламентується досліджуваним вірусом. Для кожного вірусу властиве своє значення ізоелектричної точки – таке рН розчину, при якому урівноважуються позитивні та негативні заряди поверхні віріонів і вони випадають в осад. Отже, потрібно добирати такий буфер для екстракції вірусів, щоб його рН не співпадало зі значенням ізоелектричної точки вірусу. Ізоелектрична точка більшості вірусів рослин міститься в кислотній зоні, тому для їхньої екстракції використовують буфери з

нейтральною або помірно-лужною реакцією. Найчастіше використовують фосфатний буфер (рН 7.4), тріс-боратний (рН 8.4), цитратний, карбонатний (рН 9.6), гліциновий, трісовий та ін. Як вже було сказано, при перетиранні рослинних тканин вивільняються рослинні ферменти (поліфенолоксидази, каталази, пероксидази та ін.), які сприяють зниженню рН і безпосередньо руйнують віріони. Тому у буферні розчини рекомендується додавати хелатуючі речовини (наприклад, ЕДТА), які інактивують рослинні ферменти. Це дає змогу утримати рН на потрібному рівні (тобто, вірус не випаде в осад при досягненні його ізоелектричної точки) і збільшити загальний вихід вірусу з тканини.

Виділяючи віруси рослин, зазвичай відважену кількість рослини розтирають у подвійному об'ємі відповідного буфера. Тобто, наприклад, 50 грамів рослинної тканини перетирають у 100 мл буфера.

Слід також зазначити, що гомогенізація тканини, як і всі наступні операції з виділення та очищення вірусів, повинні проводитися на холоді при 0-4°C. Для цього використовують охолоджений інструментарій, а тканини бажано гомогенізувати в рідкому азоті.

Освітлення екстракту органічними розчинниками. В результаті механічного руйнування уражених тканин отримують суспензію, що містить дуже розбавлений вірус, рештки клітин (мембрани, органели, уламки клітинної стінки тощо) та пігменти. Тому наступним етапом є очистка первинної суспензії від цих сторонніх компонентів. Більшість із них містить ліпіди, тому використовують органічні розчинники, які дають можливість розчинити ці ліпідомісні компоненти, не пошкоджуючи вірус. Після застосування цих розчинників зелені пігменти розчиняються і надалі видаляються, тому вторинна суспензія буде вже не зеленого, а солом'яного кольору і прозора, а сам етап називається освітленням екстракту.

Слід зазначити, що деякі віруси рослин та багато вірусів тварин є складними і містять у своєму складі суперкапсидну оболонку, яка також складається з ліпідів. Тому, якщо досліджуваний вірус є складним, то для очищення первинної суспензії не можна використовувати органічні розчинники, оскільки це призведе до деструкції віріонів.

Зазвичай для освітлення використовують хлороформ або суміш хлороформу з бутанолом з розрахунку 1 об'єм розчинника на 7 об'ємів первинної суспензії. Наприклад, якщо після гомогенізації було отримано 140 мл суспензії, то для її освітлення потрібно додати 20 мл органічного розчинника.

Після додавання розчинника отриману суміш інтенсивно струшують протягом 15-20 хв у герметичному посуді для кращого розчинення клітинних компонентів. Надалі суміші дають відстоятися на холоді протягом 10-15 хв. У результаті в суспензії утворюється 2 фази: верхня водна, де міститься шуканий вірус (оскільки вірус не розчиняється в розчиннику), та нижня фаза, що містить органічний розчинник з усіма розчиненими в ньому клітинними компонентами. Відбирається верхня водна фаза з вірусом, а нижня видаляється. Надалі ця фаза центрифугується на низькошвидкісній центрифугі (5-10 тис. об/хв) протягом 15-20 хв для остаточного видалення органічних компонентів. Центрифуга також повинна мати рефрижератор для охолодження. У результаті центрифугування отримується вторинна освітлена суспензія, що містить розбавлений вірус.

Методи концентрування та очищення вірусів рослин

Концентрування вірусної суспензії. На наступному етапі отримання вірусного препарату потрібно сконцентрувати освітлений вірусомісний матеріал. Це можна зробити кількома методами, серед яких:

- осадження вірусу в ізоелектричній точці;
- висолювання;
- діаліз;
- хроматографія (іонообмінна, афінна);
- гель-фільтрація;
- диференційне центрифугування (з етапом ультрацентрифугування).

Осадження вірусу в ізоелектричній точці. рН отриманої суспензії доводять до ізоелектричної точки вірусу, коли вірус починає випадати в осад. Витримавши суспензію 1-2 год при такому рН, її центрифугують на невеликих швидкостях протягом 15-30 хв, вірус утворює осад на дні пробірки. Недоліком методу є порівняно малий вихід вірусу (не всі віріони випадвають в осад), а також те, що деякі віруси є чутливими до зміни рН, а це може призвести до руйнування віріонів.

Висолювання. Білкова оболонка вірусу має зовні гідрофобні зони. Їх наявність зумовлена амінокислотним складом капсидних білків. Гідрофобні зони впорядковують навколо себе молекули води у розчині буфера. Внесення у суспензію солей у дуже високих концентраціях приводить до того, що іони солі сольватуються (тобто, відтягують на себе вільні молекули води), і гідрофобні зони капсидних білків вірусу втрачають молекули води. Наслідком цього є агрегація віріонів та їхнє випадання в осад. Для висолювання найчастіше використовують сульфати та фосфати, наприклад, сульфат амонію. Недоліком методу може бути відсутність у зовнішніх ділянках капсиду гідрофобних амінокислот, і тоді навіть при дуже високих концентраціях солі вірус не випадатиме в осад.

Диференційне центрифугування. На сьогодні цей метод разом з численними модифікаціями є найбільш уживаним у вірусології. Суть методу полягає в чергуванні циклів низькошвидкісного та високошвидкісного центрифугування. Перший цикл – низькошвидкісний – є по суті етапом освітлення первинної суспензії від важких клітинних компонентів (5-10 тис. об/хв, 15-30 хв). Надалі на другому етапі здійснюють високошвидкісне центрифугування (30 тис. об/хв або 100 тис. г, 1-24 год). При цьому все, що є в суспензії (а після першого циклу там має бути мало клітинних компонентів і порівняно багато вірусу), осідає на дно пробірки. Після цього отриманий осад, що містить концентрований вірус, розчиняють (ресуспендують) у мінімальному об'ємі буфера, який надалі знову центрифугують на малих швидкостях для видалення не очищених раніше клітинних компонентів. Таким чином, отримується кінцева суспензія вірусу у високій концентрації (вірус з усієї рослини, розтертий, наприклад, у 100 мл буфера, буде сконцентрований до 0.5мл об'єму кінцевої суспензії).

При високошвидкісному центрифугуванні вірусний препарат можна наносити на подушку сахарози для кращого очищення суспензії або ж на градієнт сахарози для розділення суспензії на фази.

Практична робота

Отримання вірусомісного матеріалу з інфікованих рослин

Завдання. Оволодіти методикою отримання вірусомісного матеріалу із хворих рослин.

Матеріальне забезпечення: рослини тютюну *Nicotiana tabacum*, *Datura stramonium* L сорт Імунний 580, *Datura stramonium* L, *Chenopodium amaranticolor*, *Phaseolus vulgaris* L. із симптомами вірусного захворювання, фосфатний буферний розчин рН 7,4, штатив з пробірками, лійки, марля, центрифужні пробірки, піпетки на 1-5 мл, ступки з товкачиком, дезинфікуючий розчин, терези з різноважками, низькошвидкісна центрифуга, еппендорфи.

Хід роботи:

Замалювати в альбом симптоми на рослинах, з яких буде отримано вірусомісний матеріал.

Відібрати і зважити 500 мг листя ураженої рослини, перенести в ступку та додати 3 мл фосфатного буферного розчину (рН 7,4); розтерти рослинний матеріал.

Через марлю відфільтрувати рослинний сік у пробірку.

Перенести матеріал у центрифужну пробірку, урівноважити з пробірками інших студентів для центрифугування.

Відцентрифугувати сік ураженої рослини у режимі 4 000 об/хв протягом 20 хв.

Після центрифугування відібрати та перенести надосад у еппендорф, підписати його та помістити у холодильник для подальших досліджень.

Контрольні завдання:

1. Скласти схему виділення ліпідвмісних вірусів.
2. Скласти схему виділення вірусів з різною ізоелектричною точкою.
3. Порівняти методи виділення вірусів для електронної мікроскопії та для пасування на рослинах.
4. Порівняти схеми виділення вірусів рослин для отримання антивірусної сироватки та для накопичення вірусу.
5. Зазначити методи, які використовують тільки для очистки вірусних препаратів, а які можна використовувати як для очищення, так і для концентрації фітовірусів.

Контрольні запитання:

1. З якою метою проводять виділення та очищення вірусів рослин?
2. Як отримують інокулюм?
3. Чим відрізняється екстракція вірусів рослин від освітлення вірусного екстракту?
4. При виділенні яких вірусів не використовують освітлення соку органічними розчинниками і чому?
5. Для чого використовують рідкий азот при виділенні вірусів рослин?

6. Чому для виділення вірусів з рослин використовують різні буферні розчини?

7. Які чинники можуть впливати на інфекційність вірусу при виділенні та очищенні?

8. Охарактеризуйте диференційне центрифугування як метод отримання вірусного препарату.

9. Який принцип лежить в основі очищення вірусів методом висолювання?

10. Який принцип лежить в основі очищення та концентрації вірусів методом осадження вірусу в ізоелектричній точці?

11. Що таке діаліз і які приклади його застосування у фітовірусології ?

12. Вказати принцип іоннообмінної хроматографії.

13. Вказати принцип гель-фільтрації та навести приклади її застосування у фітовірусології.

Література:

1. Бойко А.Л. Экология вирусом растений. – К.: Вища школа. – 1990. – 167 с.

2. Гиббс А., Харрисон Б. Основы вирусологии растений. – М.: Мир. – 1978. – С. 429.

3. Гнутава Р.В. Серология и иммунохимия вирусом растений. – М.: Наука. –1993. – 301 с.

4. Френкель-Конрат Х. Химия и биология вирусом. – М.: Мир. – 1972. – С. 74-82.

5. Cann A.J. Principles of molecular virology /Academic Press Inc. San Diego. –1993. – 234 p.

6. Matthews R.E.F. Fundamentals of plant virology. Academic Press, San Diego., 1992. – 403 p.

7. Origin and evolution of viruses / eds. Domingo E., Webster R., Holland J. – Academic Press Inc. London. – 1999. – 620 p.

8. Virus taxonomy. Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses / eds. Van Regenmortel M.H.V. – San Diego, San Francisco, New York: Academic Press, 2000. – 1162 p.

Тема 8. ВІРУСИ БАКТЕРІЙ

Бактеріофаги – віруси, які здатні уражувати виключно бактеріальні клітини. Кожна фагова частка (віріон) містить нуклеїнову кислоту (РНК або ДНК) і білкову оболонку. На рис. 8.1. наведено електронно-мікроскопічні зображення бактеріофагів, які складаються з головки і хвостового відростка. За морфологією, хімічними і біологічними властивості віруси бактерій є досить різноманітними, проте всіх їх об'єднують деякі загальні закономірності, пов'язані зі структурною організацією і взаємодією з бактеріальною культурою.

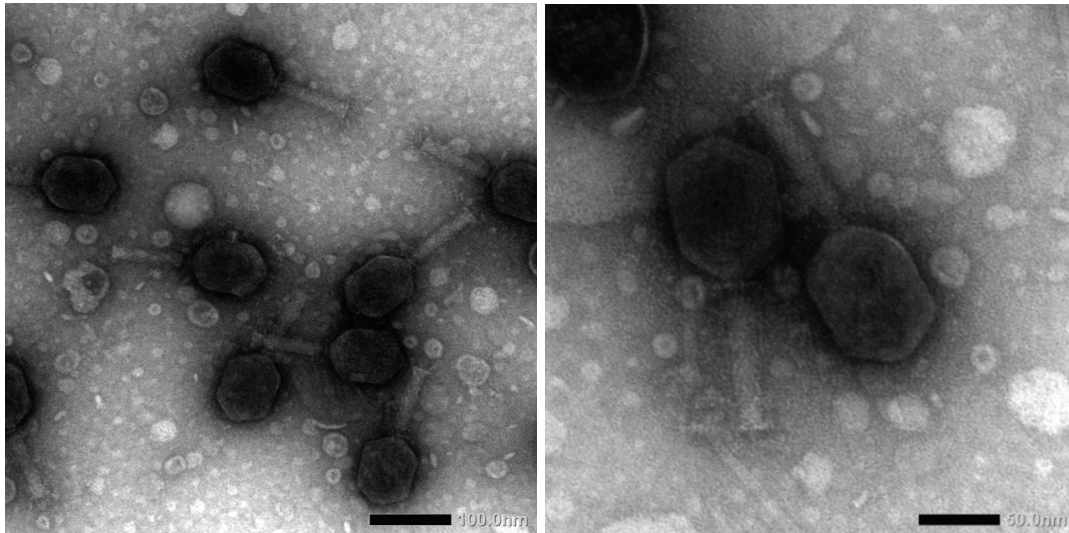


Рис. 8.1. Електронно-мікроскопічні зображення бактеріофагів бактерії *Serratia marcescens*

За здатністю репродукуватися лише всередині чутливої клітини бактеріофаги нагадують інші віруси, проте їм притаманні деякі специфічні риси:

- Серед бактеріофагів переважають віруси, віріони яких поєднують два типи симетрії. Змішаний тип симетрії нехарактерний для інших вірусів.
- Невідомі бактеріофаги з “-” РНК геномом.
- Геноми деяких вірусів бактерій містять аномальні азотисті основи (пр. 5-оксиметилцитозин у бактеріофага Т4).
- Для бактеріофагів характерне активне проникнення через бактеріальну стінку.

Бактеріальні віруси являють собою відносно просту біологічну систему і є зручною моделлю для вивчення основних проблем молекулярної біології, молекулярної генетики тощо. Значні успіхи у вивченні механізмів реплікації нуклеїнових кислот, дослідженні тонкої структури генетичного матеріалу, молекулярного механізму мутацій, регуляції білкового синтезу та багато інших досягнень сучасної біології пов'язані із застосуванням бактеріофагів як зручних модельних об'єктів. Ця зручність полягає в такому:

- бактеріофаги мають просту, але диференційовану структурну організацію, яка на сьогодні добре вивчена;
- вони швидко розмножуються;
- відомі досить надійні методи накопичення, виділення та очищення бактеріофагів;
- завдяки простоті організації бактеріальних клітин накопичено багато інформації щодо їхніх молекулярно-біологічних і генетичних характеристик, тому модель фаг-бактерія широко застосовується у сучасній молекулярній біології.

Виділення бактеріофагів з довкілля

Бактеріофаги – найбільш розповсюджені форми життя на Землі. Віруси виявлені майже у всіх груп прокаріотичних організмів: від крихітних бделловібріонів, які самі паразитують на інших бактеріях, до порівняно великих ціанобактерій.

Виділити бактеріофаг можна з різних матеріалів, де могли на той момент міститись бактерії, на яких цей фаг розмножується. Так, наприклад, дизентерійні та фаги кишкової палички виявляють у стічних водах, ґрунті, організмах комах та ін. Стафілококові фаги знаходять у слизу з носа, на шкірі та виділеннях із ран. Фаги, що уражують фітопатогенні бактерії, виділяють із рослинного матеріалу і ґрунту. Джерелом ціанофагів часто є морська вода.

Для первинного виділення бактеріофагів досліджуваний матеріал гомогенізують, звільняють від великих частинок і фільтрують через бактеріальні фільтри. Часто застосовують обробку хлороформом для усунення бактеріального забруднення. Для підвищення концентрації вірусних частинок застосовують методику «збагачення». Для цього отриманий фільтрат засівають разом з відомими бактеріями в рідке поживне середовище. Умови інкубації добирають оптимальні для бактерії, як правило це 37⁰С протягом 14-18 годин. Для видалення залишків бактерій після інкубації проводять низькошвидкісне центрифугування та фільтрування через бактеріальний фільтр. Після цього фільтрат, як правило, висівають на агаризоване середовище. Для виділення фагів з лізогенної культури часто необхідно застосовувати індукцію виходу профага, як описано нижче.

Бактеріофаги, як і інші віруси, є облігатними внутрішньоклітинними паразитами і розмножуються виключно в клітинах бактерій. Їх розмноження в рідкому середовищі приводить до того, що культура, яка була мутною перед додаванням вірусу, через кілька годин інкубації стає прозорою. На твердих середовищах бактеріофаги зумовлюють або формування окремих негативних колоній (бляшок), або – утворення стерильних плям, залежно від кількості вірусу в досліджуваному зразку та методу титрування.

Дуже часто виявлені в досліджуваних зразках бактеріофаги являють собою суміш фагів, що відрізняються між собою за біологічними властивостями. Тому після виявлення фага в досліджуваному зразку проводять виділення його “чистої лінії” з подальшим пасируванням цього фага на

чутливій бактерії. У подальшій роботі з цим фагом керуються принципами Д'Ерелля – засновника бактеріофагії. Ці принципи полягають у такому:

- 1) Як правило, дія бактеріофагів на бактерії є специфічною – певний бактеріофаг викликає лізис тільки відповідного виду бактерій. Слід зазначити, що серед фагів, які виділяють із хворих на бактеріози рослин, також існує чітка родова та видова специфічність. Проте існують винятки, коли той чи інший бактеріофаг здатен лізувати бактерії кількох, зазвичай близьких видів. Фаги цієї групи мають назву **полівалентних**. Разом з тим, існують типоспецифічні або моновалентні фаги, що здатні лізувати далеко не всіх представників відповідного виду бактерій, а уражують лише певні типи чи навіть штами.
- 2) Бактеріофаги діють тільки на молоді активно вегетуючі бактерії (виняток – ціанобактерії), що здатні забезпечити в процесі розвитку культури розмноження цього фага.
- 3) Літична дія бактеріофагів на бактерії приводить до просвітлення мутної бульйонної культури, а на агарових газонах викликає утворення чистих "стерильних" зон, пляшок різних розмірів, обумовлених ізольованим розвитком потомства кожної початково внесеної на газон фагової частинки. Останні, за аналогією з утворенням бактеріальних колоній при розмноженні бактерій, що вирости на агарі, мають назву негативних колоній фага. Кількість цих негативних колоній вказує на кількість фагових часток, що міститься в 1 мл середовища.
- 4) При лізисі бактеріальної культури фагом серед великої кількості фагочутливих клітин може трапитися якась кількість стійких особин, що при дальшому розмноженні можуть спотворювати картину дії фага. Від таких клітин обов'язково звільняються шляхом фільтрації, прогріванням або ж обробкою хлороформом.

Різні бактеріофаги формують різні негативні колонії на бактеріальному газоні (рис. 8.2-8.3), таким чином, характер негативних колоній виділених бактеріофагів може попередньо вказувати на деякі властивості фагів. Так, чисті, прозорі негативні колонії вказують на належність фагів до **вірулентної** групи, а мутні, з ореолом по периферії можуть свідчити про виділення **лізогенних** фагів, які здатні переходити у форму **профага** і лізогенізувати бактеріальні культури. Крім того, розмір негативної колонії, незалежно від її характеру, може свідчити про розмір вірусних часток, які достовірно вивчають за допомогою методу електронної мікроскопії.

Оскільки фаги маленьких розмірів порівняно швидко дифундують в агарі, то в результаті їхньої діяльності утворюються негативні колонії великого розміру (1,5-10 мм). До фагів цієї групи належать бактеріофаги C_{Δ} та T1. На противагу цьому, невеликі негативні колонії розміром 1-2 мм утворюються порівняно великими бактеріофагами типу T2 і T4.

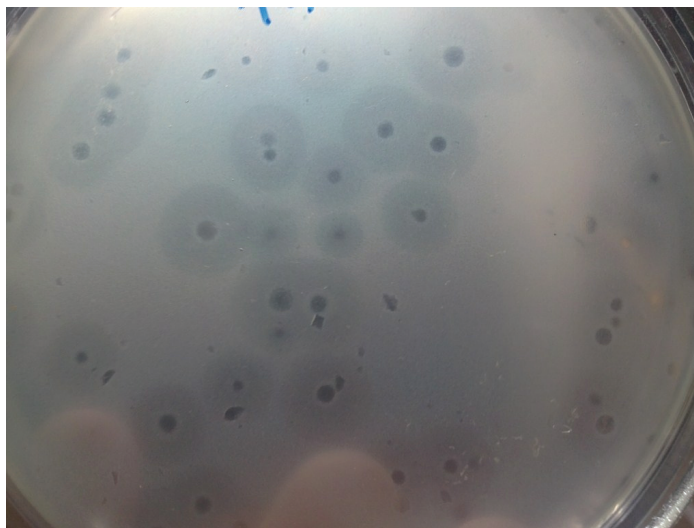


Рис. 8.2. Негативні колонії з чітким центром і мутним ореолом на газоні *Erwinia carotovora*

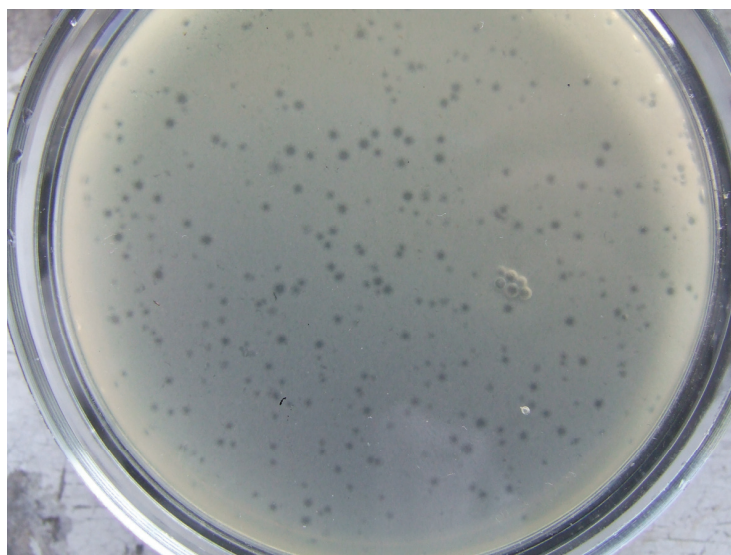


Рис. 8.3. Дрібні негативні колонії без ореолу на газоні *Escherichia coli*

Методи титрування бактеріофагів

Активність бактеріофага визначають за його властивістю викликати лізис бактеріальної культури в рідких або твердих середовищах і чисельно виражають ступенем максимального розведення, в якому досліджуваний фаг проявив свою літичну дію.

При дослідженні в *рідкому середовищі* (за *Апельманом*) **титр фага** – це найбільше його розведення (або найменша його кількість), що повністю стримує (пригнічує) ріст тест-культури в умовах конкретного дослідження.

Досить точним методом оцінки активності бактеріофага є визначення кількості інфекційно активних одиниць бактеріофага в одиниці об'єму (титр бактеріофага). Для цієї мети, як правило, користуються **методом агарових шарів**, запропонованим Грація (1936 р.). Суть методу полягає в тому, що культуру індикаторних бактерій у “м'якому” (0.7%) агарі при 46⁰С заражають фагом у відповідному розведенні (рис. 8.4). Цю суміш виливають на поверхню

захоллого 1.4% поживного агару, дають захолонуту верхньому шару агару і ставлять на інкубацію у термостат.

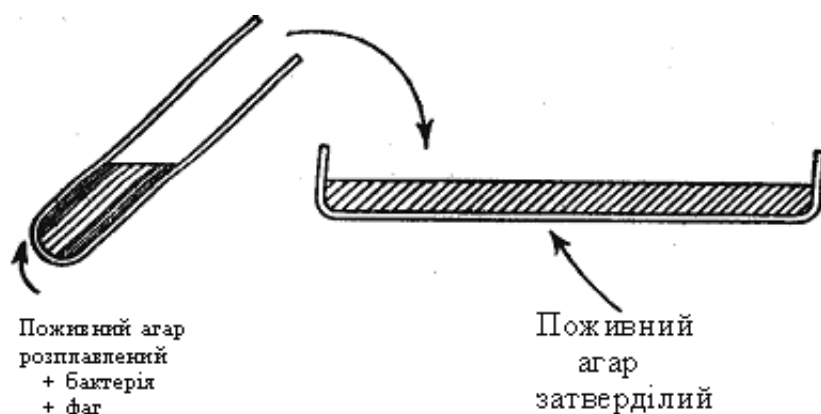


Рис. 8.4. Техніка виконання дослідів за методом агарових шарів.

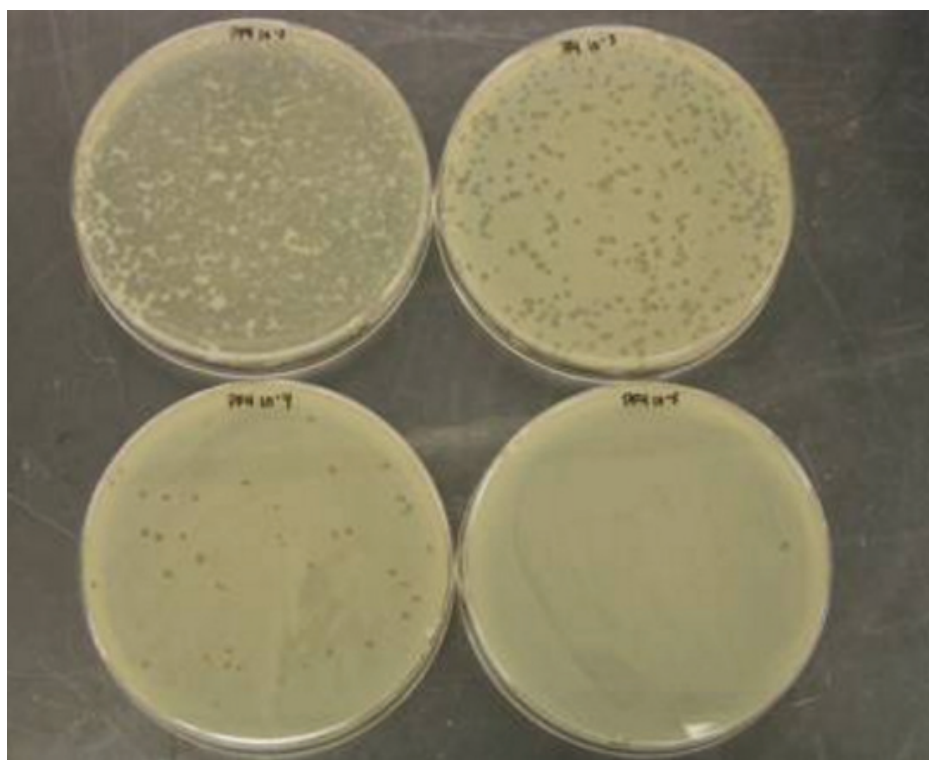


Рис. 8.5. Типовий результат титрування бактеріофагів методом подвійних агарових шарів.

Впродовж 6-12 годин бактерії розмножуються всередині м'якого шару агару. Низька концентрація верхнього шару сприяє дифузії фагових частинок. У результаті фагові частинки заражають бактеріальні клітини, які є по сусідству з ними, розмножуються та лізують їх. Фагове потомство інфікує надалі сусідні бактерії, які, в свою чергу, піддаються лізису в результаті появи другого покоління фага, і так далі. В результаті на бактеріальному газоні утворюються прозорі зони відсутності росту бактерій – негативні колонії або пляшки.

Утворення кожної бляшки викликається однією бляшкоутворюючою одиницею (БУО). Отже, число негативних колоній може слугувати кількісним показником вмісту інфекційних фагових частинок у досліджуваному розчині. **На твердому середовищі (титрування за Граціа) титр фага** – кількість БУО в 1 мл досліджуваного матеріалу.

Для приблизної оцінки титру бактеріофага і подальшої постановки серії більш складних експериментів без використання великої кількості чашок застосовують краплинні тести (**спот-тест**). Для проведення спот-тесту готують чашку Петрі, котра містить нижній твердий агар і верхній м'який шар агару, в який було додано індикаторну бактеріальну культуру. Чашка ділиться на сектори і на відповідний сектор наноситься краплина досліджуваного розведення бактеріофага.

Застосовуючи спот-тест, за титр бактеріофага приймають те найбільше його розведення, при якому ще спостерігається формування зон лізису. На рис. 8.6. наведено результати титрування бактеріофага до 10^{-9} ступеню.

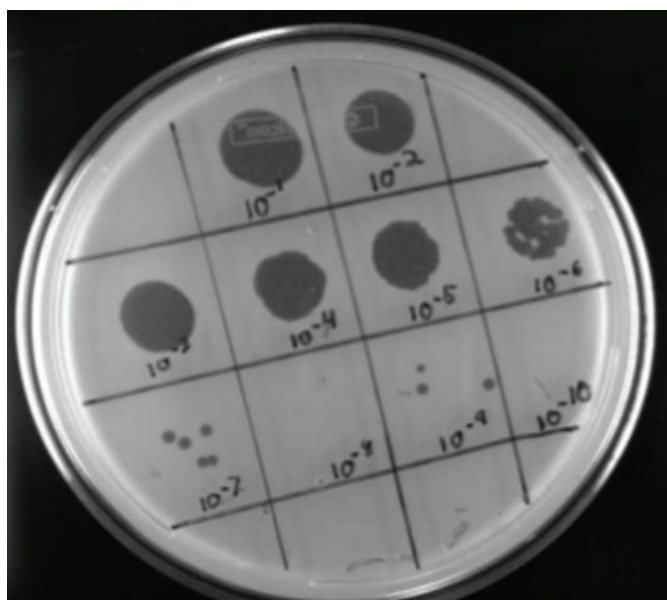


Рис. 8.6. Результат титрування бактеріофагів методом спот-тесту

За даних умов постановки експерименту титр вірусу становить 10^9 ступені.

Життєвий цикл бактеріофагів

Загальні властивості фагів зазвичай слугують відображенням властивостей клітини-хазяя. Наявність жорсткої клітинної стінки у більшості бактерій потребує особливих механізмів проникнення або виходу вірусів.

Прикріплення фага до бактеріальної клітини відбувається на клітинній поверхні. Оскільки клітинна поверхня відрізняється у різних бактерій, то існують різні способи взаємодії фага з бактеріальною клітиною. Так, деякі фаги приєднуються до особливих виростів, так званих L- та F-ворсинок, які беруть участь у процесі кон'югації. Віріони інших фагів зворотно прикріплюються до

джгутиків бактерії і потім ковзають уздовж них, при чому цьому процесу, швидше за все, сприяють рухи самих джгутиків. На поверхні бактеріальної клітини є специфічні рецептори для бактеріофагів, проте дані про їхню природу досить обмежені. Проникнення генома бактеріофага в клітину супроводжується фізичним відокремленням нуклеїнової кислоти від капсидних білків, які залишаються ззовні клітини. Крім нуклеїнової кислоти фага, всередину клітини потрапляє невелика кількість білка та деякі інші речовини, в тому числі олігопептиди та поліаміни.

Оскільки бактеріальні клітини здатні поглинати з середовища вільну ДНК, то і геном фага може проникнути таким чином у клітину. Це явище має назву трансфекція. Здатність бактерій поглинати молекули ДНК може виникнути як нормальне явище на певних етапах росту, наприклад у *B. subtilis*. У деяких випадках це явище викликається штучно, як, наприклад, у *E. coli*.

Проникнення генома бактеріофага в чутливу бактерію приводить до розвитку або літичної, або лізогенної інфекції, залежно від природи фага (іноді бактерії) та умов довкілля.

При **лізогенному** типі взаємодії геном фага в неінфекційній формі передається бактеріальними клітинами з покоління в покоління, причому час від часу в деяких клітинах синтезуються віріони, які лізують ці клітини та виходять у довкілля. Лізогенні клітини стають імунними до повторного зараження спорідненим бактеріофагом і продовжують нормально рости. Наявність вільних віріонів можна виявити шляхом інфікування індикаторної культури. Бактеріофаги, що здатні переходити в лізогенний стан, називають **помірними**, фаги, у яких така властивість відсутня – **вірулентними**. Слід відзначити, що навіть помірні фаги при першій інфекції чутливих до них бактерій викликають продуктивну інфекцію у багатьох або навіть усіх клітин. Виникнення лізогенії вимагає серії певних подій. Ймовірність появи лізогенії та продуктивної інфекції варіює у різних фагів та залежить від умов культивування.

З явищами лізогенії тісно пов'язані поняття **трансдукції** і **лізогенної конверсії** бактерій. **Трансдукція** – це процес передачі ДНК від клітини-донора до клітини реципієнта за участі бактеріофагів, який приводить до зміни спадкових властивостей бактерій. Слід відзначити, що явище трансдукції описано також і для вірулентних фагів. Розрізняють специфічну і неспецифічну трансдукцію. У деяких бактерій наявність профага викликає фенотипові зміни бактеріальної клітини. Наприклад, ряд штамів дифтерійної палички набуває здатності синтезувати дифтерійний токсин. Це явище отримало назву **лізогенна конверсія**.

Життєвий цикл вірулентних бактеріофагів

Найкраще вивченим серед вірулентних фагів є бактеріофаг Т4, будова якого наведена на рис. 8.7. Основні компоненти бактеріофага Т4: голівка, що містить нуклеїнову кислоту (ДНК); відросток – виконує функцію введення генетичного матеріалу в клітину *E.coli*; конектор, який поєднує головку бактеріофага з відростком; базальна пластинка з фібрилами – апарат пошуку, фіксації та подачі сигналу для введення нуклеїнової кислоти в клітину.

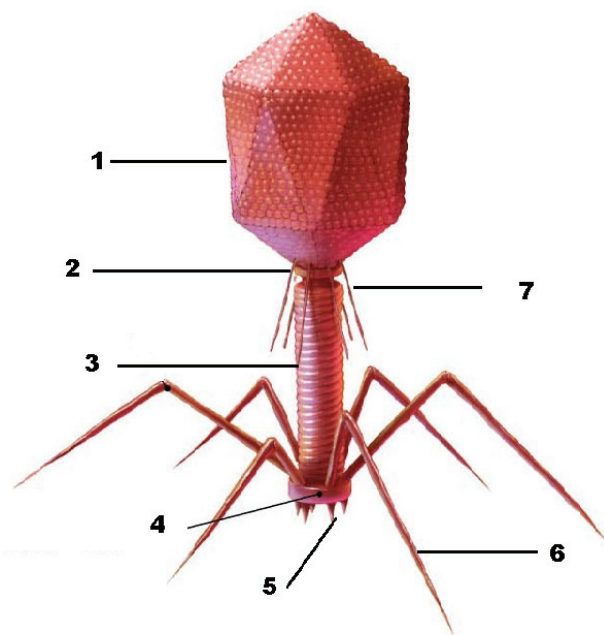


Рис. 8.7. Будова бактеріофага Т4:

1. голівка; 2. конектор; 3. чохол хвостового відростка; 4. базальна пластинка; 5. зубець базальної пластинки; 6. довга фібрила; 7. коротка фібрила.

Життєвий цикл бактеріофага Т4 став класичним прикладом онтогенезу вірусів. Експеримент, вперше проведений Еморі Елліс та Максом Дельбрюком, дав змогу встановити загальну послідовність подій. Клітини *E. coli*, що активно ростуть, заражали бактеріофагом так, щоб в середньому на одну клітину припадало по одній фаговій частинці. Протягом двох-трьох хвилин інкубації більшість фагів адсорбувались на клітинах. Всі неадсорбовані фаги потім інактивували, додаючи антифагову сироватку. Через декілька хвилин після цього культуру розбавляли в більше ніж сто разів, щоб зменшити концентрацію антитіл та запобігти інактивації фагового потомства. Через певні проміжки часу в пробах інфікованої культури визначали концентрацію інфекційних одиниць шляхом висіву проб на чашки з індикаторними бактеріями та підрахунку числа негативних колоній на бактеріальному газоні. Результати цього експерименту графічно представлені на рис. 8.8. Протягом 24 хв після адсорбції бактеріофага на клітині число інфекційних одиниць в культурі залишалось стабільним. Через 24 хв кількість інфекційних одиниць починала зростати, оскільки інфіковані клітини лізуються та вивільняють бактеріофаги. На 30-ій хвилині всі інфіковані клітини були вже зруйновані. Число інфекційних одиниць до кінця досліду приблизно в сто разів перевищувало число інфікованих клітин. З кожної клітини виходило приблизно сто фагових потомків.

Першим етапом взаємодії бактеріофага Т4 з клітиною є адсорбція (рис. 8.9). В інтактному стані бактеріофага довгі фібрили обвиваються навколо відростка так, що їхня середня частина підтримується короткими фібрилами, прикріпленими до того місця, де голівка з'єднується з відростком. Можливо, при контакті кінців фібрил з рецепторами клітини нитки розправляються і випрямляються. Для цього необхідний L-триптофан як кофактор. Для

наступного етапу взаємодії фага з бактерією необхідне правильне просторове положення базальної пластинки, що забезпечується, очевидно, контактом усіх шести ниток з рецепторами клітини. Слід зауважити, що необернене прикріплення бактеріофага до клітини і проникнення в неї ДНК відбувається лише на окремих ділянках оболонки (всього їх приблизно 300), де цитоплазма і зовнішні мембрани утворюють міцні контакти, стійкі до м'якого осмотичного шоку.

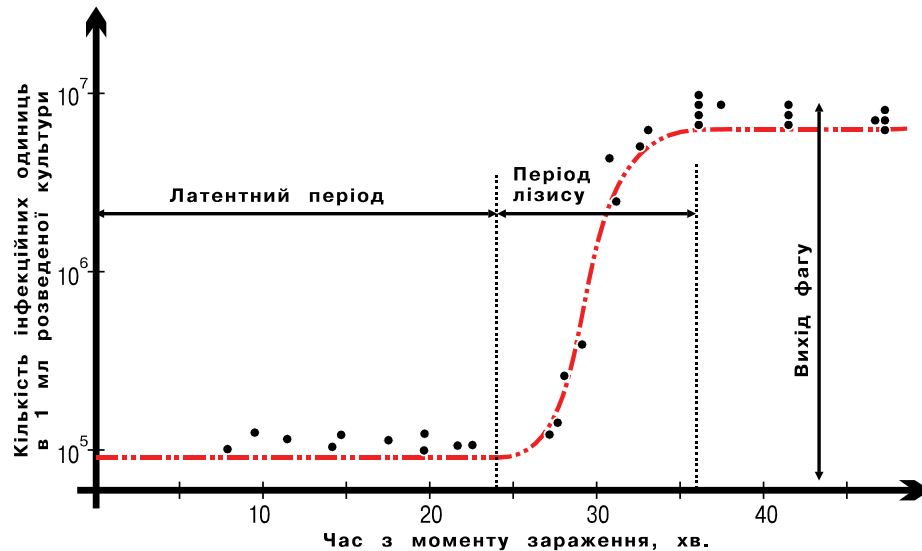


Рис. 8.8. Одиничний цикл розвитку бактеріофага Т4

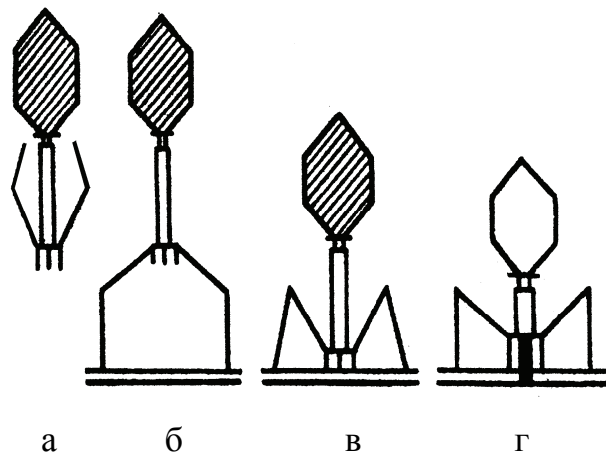


Рис. 8.9. Схема основних етапів адсорбції фага Т4 на бактерії *E.coli*
 а – вільна фагова частка; б – приєднання довгих фібрил до оболонки бактерії; в – фіксація зубців базальної пластинки; г – скорочення хвостового чохла та ін'єкція фагової ДНК в клітину

Після адсорбції бактеріофага на клітині відбувається скорочення чохла, яке стимулюється базальною пластинкою, що змінює свою конфігурацію. В процесі скорочення беруть участь усі 144 субодиниці чохла, і їхнє суцільне переміщення приводить до зменшення довжини чохла у 2 рази та збільшення діаметру на 30%. Дистальна частина стрижня щільно підходить до цитоплазматичної мембрани і кінець стрижня проколює рихлі шари клітинної

оболонки, що були зруйновані лізоцимом. На наступному етапі відбувається ін'єкція ДНК всередину бактеріальної клітини.

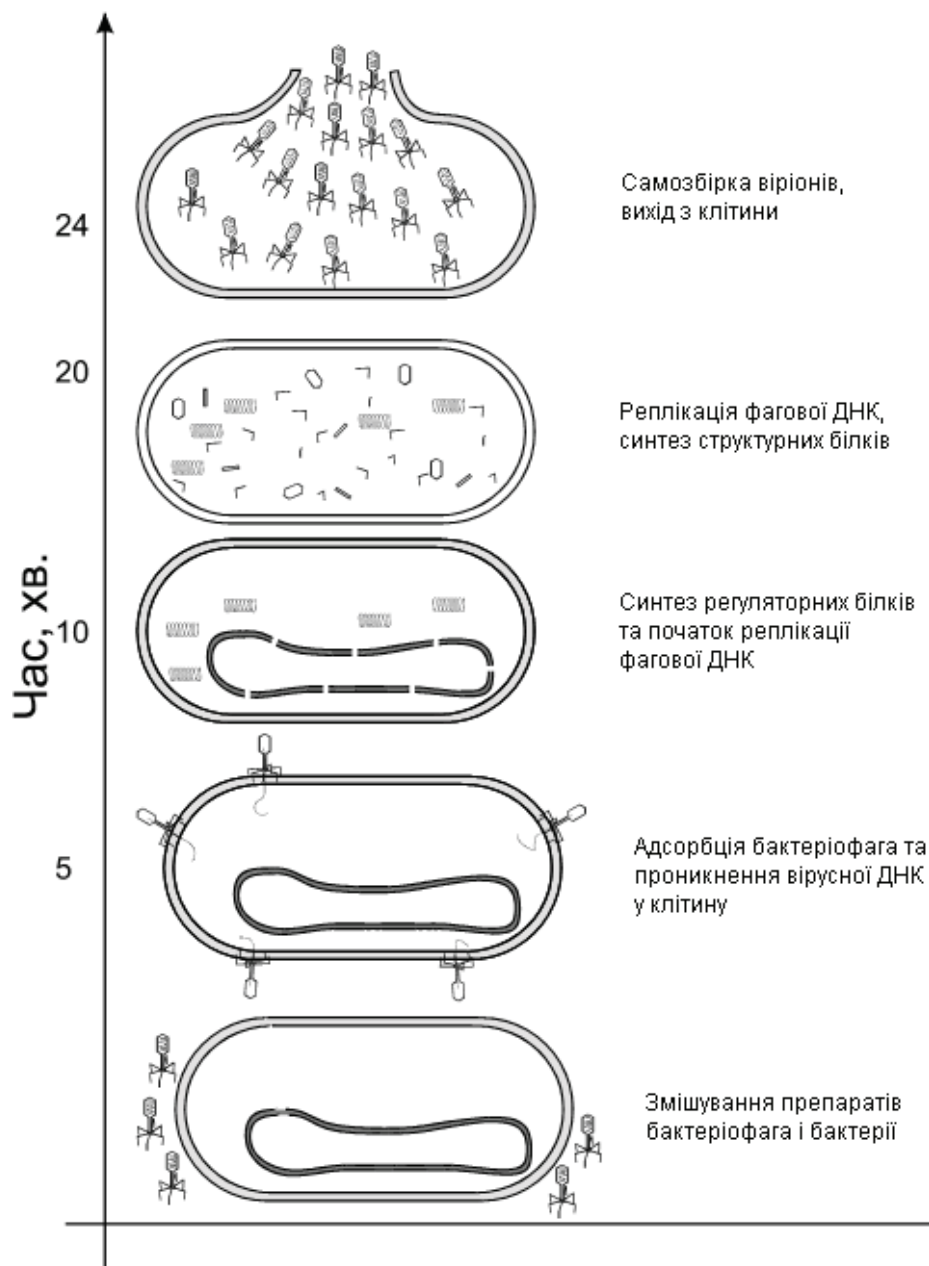


Рис. 8.10. Схема розвитку процесу інфікування *E.coli* бактеріофагом T4

Латентний період (період часу між зараженням і лізисом клітини) в стандартних умовах для бактеріофага T4 становить 24 хвилини (рис.8.10). Потрапивши всередину бактеріальної клітини, фагова ДНК викликає перебудову обміну речовин зараженої клітини (припиняється синтез бактеріальних РНК, ДНК, білків). Рибосоми клітини-хазяїна модифікуються так, що починають функціонувати на мРНК фагу ефективніше, ніж на мРНК хазяїна. В клітині спочатку синтезуються “ранні” білки. Синтезуються такі ферменти: ДНК-полімераза; ДНК-дезоксирибонуклеаза, що руйнує ДНК клітини-хазяїна; ферменти, які необхідні для утворення 5-оксиметилцитозину та його фосфорилування. Синтезована ДНК-дезоксирибонуклеаза не діє на ДНК фага,

очевидно тому, що в ній міститься 5-оксиметилцитозин. Ці ферменти забезпечують синтез ДНК бактеріофага. На наступному етапі починається синтез білків. Усі білки віріона та інші пізні білки (наприклад, лізоцим) синтезуються більш-менш одночасно і, накопичуючись, утворюють фонд “попередників”. Потім вони прямо та специфічно взаємодіють з іншими молекулами, в результаті чого виникають субструктури, які потім збираються вже в цілі віріони. Збирання віріонів складається з чотирьох основних етапів, що приводять до утворення проміжних структур, які взаємодіють між собою лише у визначених критичних точках.

На останньому етапі взаємодії фага та клітини накопичений лізоцим (продукт гена *e*) діє зсередини на пептидоглікановий шар клітини. Лізоцим утворюється в зараженій клітині задовго до початку лізису, але лізис настає тільки в тому разі, коли лізоцим отримує доступ до шару пептидоглікану. Для цього необхідна реакція, що ініціюється фагом (продукт гена *t*). В результаті розщеплення пептидогліканів клітинна стінка бактерії стає дуже тонкою і розривається під дією осмотичного тиску. Відбувається вихід бактеріофага з клітини.

Життєвий цикл лізогенних бактеріофагів

Типовим прикладом помірних фагів є бактеріофаг λ . Цей вірус – модельний об’єкт молекулярної біології, генетики, вірусології тощо. У своєму життєвому циклі бактеріофаг λ робить вибір, яким шляхом йому розвиватися: літичним, при якому клітина-хазяїн програмується на виробництво нових вірусних частинок, а потім гине, чи лізогенним, при якому відбувається вбудовування генетичного апарату вірусу в геном бактерії. В останньому випадку латентний геном фага називається **профагом**, а клітини, які несуть профаг – лізогенними. Природним хазяїном цього бактеріофага служить штам *E. coli* K12, генетика якого добре вивчена. Саме тому бактеріофаг λ був вибраний як об’єкт досліджень, спрямованих на з’ясування природи лізогенії і вивчення регуляції генної експресії.

Віріон бактеріофага λ складається з ікосаедричної голівки діаметром близько 60 нм. і хвостового відростка завдовжки близько 150 нм, на кінці якого розміщені бокові фібрили. Геном бактеріофага λ представлений дволанцюговою ДНК зі взаємокомплементарними «липкими» кінцями. У процесі реалізації свого життєвого циклу фагова частинка за допомогою хвостового відростка приєднується до клітини, проколуює її оболонку та вводить свою ДНК, залишаючи оболонку ззовні.

Подальші події можуть розвиватись двома напрямками (рис. 8.11). Для одних клітин спостерігається літичний шлях розвитку: різні групи фагових генів включаються та виключаються відповідно до певної програми. ДНК фага λ інтенсивно реплікується, синтезуються нові білки голівки та хвостового відростка, в бактеріальній клітині утворюються нові інфекційні віріони. Врешті-решт клітина лізується та вивільняє приблизно 100 фагових частинок.

В інших клітинах фагова ДНК лізогенізує клітину-господаря: всі фагові гени, крім одного, виключаються, і фагова ДНК, яка отримала назву профаг,

стає частиною бактеріальної хромосоми. При поділі бактерії профаг пасивно реплікується та передається дочірнім клітинам. Цей процес може повторюватися безмежну кількість разів. Проте, при УФ-опроміненні майже всі лізогенні клітини лізуються та дають потомство фагу λ .

Як було сказано вище, в лізогенній клітині працює один єдиний фаговий ген, що кодує білок-репресор фага λ . Репресор є позитивним та негативним регулятором експресії генів. Приєднуючись до двох операторних ділянок фага λ , він вимикає всі інші гени бактеріофага та експресує свій власний ген.

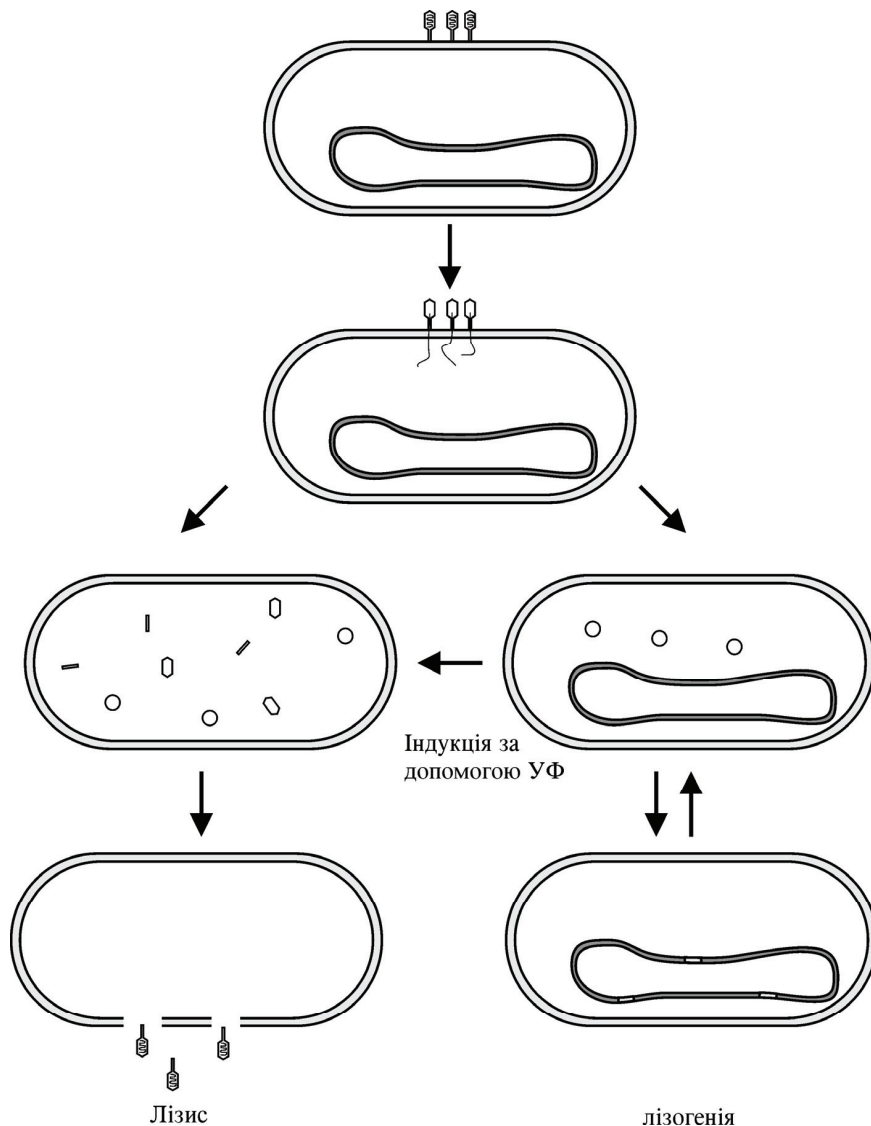


Рис. 8.11. Шляхи розвитку бактеріофага λ

Слід зауважити, що одразу після інфікування перші етапи регуляції експресії генів однакові незалежно від способу подальшого розвитку подій. На критичному етапі фаговий регуляторний білок “відчуває” стан клітини-господаря і подальші події спрямовуються по одному з двох шляхів.

На рис.8.12 подана спрощена генетична карта фага λ . Бактеріальна хромосома у складі віріона є лінійною, але одразу після потрапляння в бактеріальну клітину замикається в кільце. У результаті з’єднання кінців ДНК

(*cos*-сайтів) групи генів лізису та хвостового відростка зближуються. Гени, які кодують білок репресор (*CI*) та білок, який запускає літичний шлях (*Cro*), розміщені поруч на хромосомі фага. Ці гени транскрибуються у протилежних напрямках (рис. 8.12). Точки початку транскрипції цих генів розділені ділянкою 80 пар основ. У цій ділянці розміщені промотори та оператори, з якими з'єднуються білки-регулятори. На рис. 8.13 видно, що кожен із генів (*cI* та *cro*) має свій власний промотор. Ці промотори не перекриваються між собою. O_{R1} , O_{R2} та O_{R3} – це операторні ділянки, до яких приєднуються *cI* та *cro*, регулюючи таким чином активність обох промоторів. Слід відзначити, що кожна з операторних ділянок перекривається з одним з промоторів, а O_{R2} перекривається з обома промоторами.

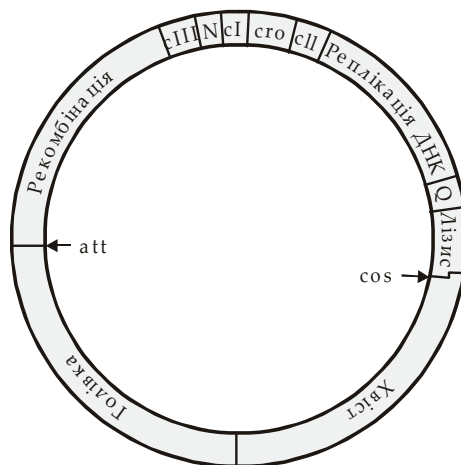


Рис.8.12. Генетична карта бактеріофага λ

РНК-полімераза – це фермент, що транскрибує фагову ДНК з утворенням РНК. При зв'язуванні з P_R (промотор гена *cro*), полімераза налаштовується на транскрипцію цього гена (праворуч), а при зв'язуванні з P_{RM} (промотор гена *cI*) транскрибується ген *cI* в іншу сторону. В клітині ці два промотори ніколи не бувають зайняті одночасно: залежно від стану апарату регуляції експресії полімераза зв'язується тільки з одним із них. У присутності репресора полімераза може зв'язатись із P_{RM} , а в присутності *Cro* – з P_R .

Отже, репресор, приєднаний до O_{R2} , виключає ген *cro*, перешкоджаючи зв'язуванню РНК-полімерази з P_R . У цьому разі репресор здійснює негативну регуляцію. З іншого боку, репресор, приєднавшись до O_{R2} , допомагає РНК-полімеразі зв'язатись і почати транскрипцію з P_{RM} . Ефективність транскрипції збільшується приблизно в 10 разів. Таким чином, білком-репресором здійснюється позитивна регуляція власного гена.

У лізогенізованій клітині репресор завжди зв'язаний з O_{R1} та O_{R2} , тоді як O_{R3} зазвичай вільний від репресора. Таким чином, у цій клітині відбувається активний синтез білка репресора. Якщо в клітині дуже висока концентрація білка репресора, то останній приєднується до O_{R3} і блокує власний промотор. Коли клітина ділиться, концентрація згаданого білка дещо падає. В результаті цього білок-репресор від'єднується з ділянки O_{R3} і процес транскрипції гена *cI* відновлюється. За відсутності зовнішніх впливів ці процеси можуть відбуватись

необмежено довго, однак можуть бути призупинені будь-яким індуктивним впливом. Найкращим індуктором у цьому випадку є ультрафіолетове опромінення.

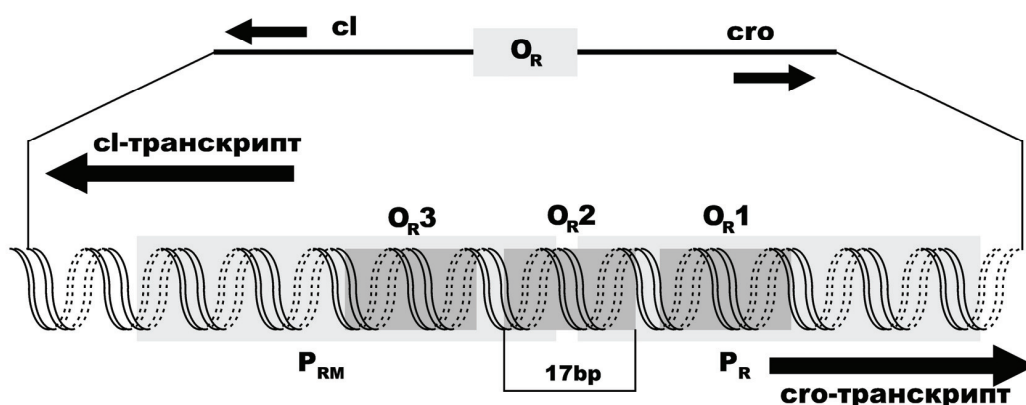


Рис. 8.13. Схематичне зображення апарату перемикання генів у бактеріофага лямбда

Мішенню дії УФ-випромінення та інших індукуючих факторів є ДНК. Пошкодження ДНК під впливом опромінення викликає зміну в поведінці бактеріального білка Rec A. Останній стає високоспецифічною протеазою, що розщеплює мономери репресора λ та інших репресорів. Це приводить до двох наслідків. По-перше, в міру того, як репресор звільняє O_{R1} та O_{R2} , швидкість його синтезу падає. По-друге, полімераза зв'язується з P_R та починає транскрипцію гена *cro*. Тепер саме білок Cro визначає подальший розвиток подій. Перша синтезована молекула Cro зв'язується з O_{R3} . Це пригнічує подальший синтез білка репресора. Поки ген P_R продовжує працювати і ген *cro* транскрибується, транскрибуються також гени, розмішені праворуч від *cro*. Продукти цих генів необхідні на ранніх етапах літичного циклу. Синтезується все більше білка Cro, поки його концентрація не досягне рівня, при якому заблоковуються ділянки O_{R1} та O_{R2} . Таким чином білок Cro вимикає синтез репресора і запускає каскад експресії генів, відповідальних за літичний шлях розвитку фага λ .

Для бактеріофага λ характерне явище специфічної трансдукції, і ця його властивість дала можливість використовувати його для конструювання одних з перших векторних молекул. Їхні удосконалені версії використовують і тепер.

Практична робота №1

Титрування фага за методом Апельмана

Завдання: опанувати методику титрування бактеріофагів у рідкому поживному середовищі, визначити титр бактеріофага Т4.

Матеріальне забезпечення: Пробірки з ватно-марлевими пробками, штатив, груші та піпетки (сAMPLери і носики), маркери, поживне середовище (LB), нічна бактеріальна культура, бактеріофаг, термостат.

Хід роботи:

У 8 стерильних пробірок вносять по 4,5 мл поживного середовища. Пробірки ставлять у штатив і нумерують від 1 до 6, на 7 пробірці ставлять позначку КК (контроль культури), на 8 – КФ (контроль фага). Всі дослідні пробірки повинні бути підписані.

У пробірках під номерами від 1 до 6 готують послідовні десятикратні розведення фага від 10^1 до 10^6 . У першу пробірку вносять 0,5 мл фага. Таку ж його кількість вносять у пробірку контролю фага за №8. Замінивши піпетку новою, ретельно перемішують уміст 1-ї пробірки і переносять 0,5 мл його в 2-гу пробірку, 0,5 мл вмісту 2-ї пробірки переносять до 3-ї і так далі, до 6-ї пробірки. Щоразу необхідно брати нові піпетки (або носики). Перемішавши вміст 6-ї пробірки, 0,5 мл розведення із неї виливають у дезрозчин. Так само чинять із вмістом пробірки №8 – контролем фага (рис. 8.14).

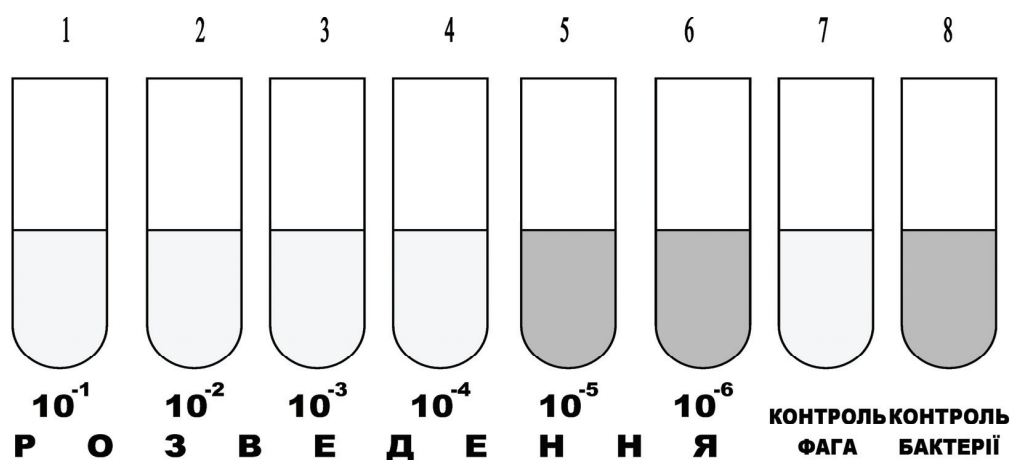


Рис. 8.14. Результати титрування бактеріофагів за Апельманом

- 1) У всі пробірки досліду, крім пробірки №7, вносять по 1 краплині (0,05 мл) суспензії тест-культури. Внесення культури проводять однією піпеткою з пробірки № 8 до №1. Пробірки разом із штативом струшують. У всіх пробірках досліду, крім пробірки на контроль фага, повинна з'явитись ледь помітна мутність.
- 2) Пробірки ставлять у термостат на 18-20 годин, після чого проводять облік результатів титрування, розпочинаючи з контролів.

При титруванні фага ставлять такі контролі: контроль фага і середовища на стерильність, контроль тест-культури на її життєву активність.

При правильній постановці досліду в контролі культури відбулося інтенсивне розмноження бактерій і вона стала мутною, що добре видно візуально. Цей контроль дає можливість зробити висновок, що тест-культура, на якій титрували фаг, життєздатна, поживне середовище забезпечує їй оптимальний розвиток в умовах досліду. Виходячи із результатів росту тест-культури в контролі, можна зробити висновок: якщо в пробірках із фагом культура не виросла, то на неї подіяв фаг. Рідина в пробірці з контролем на фаг повинна лишатись прозорою. Це дає змогу зробити висновок, що посуд, середовище і фаг стерильні.

Враховують характер змін у титраційному ряду пробірок від №1 до №7. Ріст культури в пробірках титраційного (дослідного) ряду свідчить про відсутність у них фага. Визначають титр фага, тобто його найбільше розведення, яке здатне викликати лізис культури (вміст пробірки порівняно з контролем на ріст культури прозорий). Позначається титр фага ступенем розведення фага з від'ємним знаком, що відповідає порядковому номеру пробірки. Наприклад, якщо в перших чотирьох пробірках титраційного ряду відсутній ріст культури, а в наступних пробірках культура росте, то титр фага буде 10^{-4} ступені.

Методичні рекомендації:

Найголовніша вимога в роботі з бактеріями – це стерильність роботи. Всі операції слід виконувати біля полум'я пальника або в стерильному боксі. Лабораторний посуд, інструментарій та поживні середовища попередньо стерилізуються в автоклаві. До початку роботи необхідно обробити робоче місце ультрафіолетом і спиртом. Роботу бажано проводити в гумових рукавичках, оскільки *E.coli* є умовно патогенною бактерією.

Розводячи бактеріофаг, необхідно щоразу брати нову піпетку (носик для самплера). Після додавання фага в поживне середовище слід ретельно перемішати вміст пробірки. При титруванні фага об'єм і склад середовища, температура, аерація, кількість бактерій повинні бути однакові. Змінною є тільки кількість внесеного фага.

Практична робота №2

Спот-тест

Завдання: опанувати методику титрування бактеріофагів спот-тесту, визначити титр бактеріофага Т4.

Матеріальне забезпечення: Пробірки з ватно-марлевими пробками, чашки Петрі, штатив, груші та піпетки (самплери і носици), маркери, агаризоване середовище (0,7% та 1,4%), нічна бактеріальна культура, бактеріофаг, термостат, водяна баня.

Хід роботи:

1. 1,4% агар заливають у чашки по 2,5-3,0 мл, підсушують.

2. Потім у пробірку вносять 2,5 мл верхнього агару та 0,2 мл бактеріальної культури і нашаровують на поверхню агару в чашці Петрі.

3. Готують послідовні десятикратні розведення фаговмісного препарату до -9 степеня.

4. Ділять чашку Петрі на сектори і в кожний сектор вносять по 5 мкл. фаговмісного матеріалу.

5. Залишають чашку на 30 хв. при кімнатній температурі для забезпечення дифузії фаговмісного матеріалу у агар.

6. Чашки Петрі ставлять на інкубацію (у термостат на 18-20 годин при 37°C). Для статистичної достовірності кожен дослід повторюють тричі.

Методичні рекомендації:

Як і в попередньому разі, працювати потрібно в стерильних умовах. Для розведення бактеріофага необхідно щоразу брати нову піпетку (кінцівку для самплера). Після додавання бактерії у верхній агар слід ретельно перемішати вміст пробірки та обережно нашарувати на поверхню нижнього, підсушеного агару. Температура верхнього агару має бути близько 45°C . Якщо температура верхнього агару буде нижчою, існує ймовірність, що він при нашаруванні на твердий агар візьметься грудочками.

Після 30-хвилинної інкубації чашки Петрі ставлять у термостат. Оскільки на кришках чашок збирається конденсат, який при скапуванні на бактеріальний газон може спотворювати результати титрування, то чашки Петрі ставлять кришками до низу.

Практична робота №3

Титрування фага методом подвійних агарових шарів за Грація

Завдання: опанувати методику титрування бактеріофагів методом подвійних агарових шарів, визначити титр бактеріофага T4.

Матеріальне забезпечення: Пробірки з ватно-марлевими пробками, чашки Петрі, штатив, груші та піпетки (самплери і носики), маркери, агаризоване середовище (0,7% та 1,4%) нічна бактеріальна культура, бактеріофаг, термостат, водяна баня.

Хід роботи:

- 1) 1,4% агар заливають в чашки Петрі по 2,5-3,0 мл, підсушують.
- 2) Досліджуваний фаг титрують методом 10-кратних розведень (як і в методі Аппельмана). Контроль (пробірка №8) ставлять на ріст бактеріальної культури, №9 – на стерильність фага та середовища.
- 3) У пробірку наливають 2,5 мл розплавленого 0,7%-го агару та охолоджують до 45°C , потім додають 1мл бактеріофага в певному розведенні і 0,2 мл бактеріальної культури. Вміст пробірки ретельно перемішують та виливають у чашки Петрі на нижній агар. Нумерація чашок Петрі з нижнім і пробірок з верхнім агаром відповідає нумерації

розведень фага. Ті ж самі висіви проводять із контрольних пробірок, які позначають як контроль на ріст бактерій (№8) та стерильність фагу (№9).

- 4) Після того, як верхній шар захолонув, чашки Петрі ставлять на інкубацію (у термостат на 18-20 годин при 37⁰С). Для статистичної достовірності кожен дослід проводять тричі.

Облік результатів титрування показує, що при великій концентрації фага (перші 4 чашки) спостерігається суцільний лізис культур – чашки прозорі. В тих розведеннях фага, де спостерігається зменшення кількості фага, з'являються окремі ізольовані негативні колонії, які можна підрахувати. Кількість негативних колоній перебуває в оберненій залежності від розведення фага. Щоб вирахувати кількість фагових часток в 1 мл фаголізату, користуються формулою:

$$T = n / (V \times a),$$

де: T – кількість фагових часток у 1 мл; де n – середнє арифметичне кількості пляшок на одну чашку Петрі; V – об'єм вірусомісного матеріалу, який вносили в культуру; а – розведення вірусомісного матеріалу, яке використовували для зараження.

Наприклад, якщо при внесенні 1 мл. вірусомісного матеріалу на ч. Петрі №7 (розведення фага 10⁷) утворилося 15 негативних колоній, то титр даного фага буде дорівнювати кількості негативних колоній, помноженій на розведення фага, тобто 15 · 10⁷. Отриманий результат прийнято виражати у пляшкоутворюючих одиницях (БУО). У нашому прикладі отримуємо 1,5 · 10⁸ БУО/мл.

Методичні рекомендації:

Найголовніша вимога в роботі з бактеріями – це стерильність роботи. Усі операції слід виконувати біля полум'я пальника або в стерильному боксі. Лабораторний посуд, інструментарій та поживні середовища попередньо стерилізуються в автоклаві. До початку роботи необхідно обробити робоче місце ультрафіолетом і спиртом. Роботу бажано проводити в гумових рукавичках, оскільки *E.coli* є умовно патогенною бактерією.

Розводячи бактеріофаг, необхідно щоразу брати нову піпетку (носик для самплера). Після додавання фага в верхній агар, слід ретельно перемішати вміст пробірки та обережно вилити на поверхню нижнього застиглого та підсушеного агару. Після того, як верхній агар застигає, чашки Петрі ставлять у термостат. Оскільки на кришках чашок збирається конденсат, який при скапуванні на бактеріальний газон може спотворювати результати титрування, то чашки Петрі ставлять кришками донизу. При титруванні фагів об'єм і склад середовища, температура, кількість бактерій повинні бути однакові. Змінною є тільки кількість внесеного фага.

Більш точні результати титрування фага цим методом отримують тоді, коли визначають кількість частинок фага у вихідній рідині по декількох розведеннях і визначають їхнє середнє арифметичне.

Слід зазначити, що підраховувати негативні колонії краще на чашках Петрі, де виросло не менше 5, але не більше 50 негативних колоній, тому що більша і менша кількість негативних колоній дасть неточні результати. Якщо ж на чашках Петрі утворилась велика кількість негативних колоній, то її розділяють на 2, 4, 6 і більше секторів, а потім отримане число множать на кількість секторів.

Практична робота №4

Виділення фагів із лізогенних культур

У деяких випадках для виділення фагів із лізогенних культур доводиться застосовувати методи індукції профага (ультрафіолетовим опроміненням або температурою).

Завдання: відпрацювати методику виділення бактеріофага λ з лізогенної культури *E. coli*.

Матеріальне забезпечення: груші та піпетки, чашки Петрі, бактеріальні петлі, маркери, агаризоване середовище (1,4%), бактеріальні культури (*E. coli* BE та *E. coli* K12), ультрафіолетова лампа, термостат.

Хід роботи:

- 1) Заливають у чашки Петрі 1,4% поживний агар по 2,5-3,0 мл, підсушують. Ділять чашку на 4 сектори та підписують.
- 2) Стерильною петлею набирають бактеріальні культури (*E. coli* K12 та *E. coli* BE) зі “скошеного” агару та розсівають методом “штриха” на поверхню поживного агару в два сектори (рис.8.15.). Обробляють чашки з висіяною культурою ультрафіолетовим випроміненням протягом 10 хвилин.
- 3) Ті ж культури висівають у третій та четвертий сектори і підписують як контроль K12 та контроль BE. Ставлять на інкубацію (12 год. при 37⁰C).

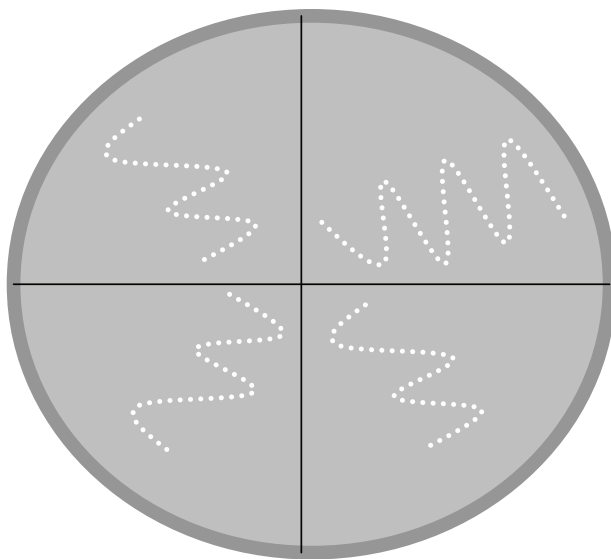


Рис. 8.15. Розсів бактеріальної культури методом штрихів

При правильних контролях, коли у третьому та четвертому секторі спостерігається ріст бактеріальних колоній, проводять облік результатів. Після опромінення помірною дозою ультрафіолету бактерії, що несуть профаг, лізуються та вивільняють в оточуюче середовище велику кількість фагових частинок. У тому секторі, на який висівалась лізогенна культура, будуть відсутні колонії бактеріальних клітин. Нелізогенна культура буде формувати нормальні колонії.

Методичні рекомендації:

Найголовніша вимога в роботі з бактеріями – це стерильність роботи. Всі операції слід виконувати біля полум'я пальника або в стерильному боксі. Лабораторний посуд, інструментарій та поживні середовища попередньо стерилізуються в автоклаві. До початку роботи необхідно обробити робоче місце ультрафіолетом і спиртом. Роботу бажано проводити в гумових рукавичках, оскільки *E.coli* є умовно патогенною бактерією. Перед нанесенням бактерії на поверхню агару, слід ретельно прожарити мікробіологічну петлю.

Оскільки на кришках чашок збирається конденсат, який при скапуванні на бактеріальний газон може спотворювати результати титрування, то чашки Петрі ставлять кришками донизу.

Контрольні завдання:

1. Визначити титр фага, коли на ч. Петрі №6 утворилося 16 негативних колоній.
2. Який буде титр фага, коли на ч. Петрі №7 спостерігається суцільний лізис і в контролі бактерії також відсутній ріст тест-культури?
3. Пояснити, чому з часом негативна колонія перестає збільшуватись у розмірі.
4. Порівняти методи титрування бактеріофагів за Апельманом та за Граціа.
5. Скласти схему виділення бактеріофагів, які уражують фітопатогенні бактерії.

Контрольні питання:

1. Які властивості фагів лежать в основі їхнього отримання та використання?
2. Чому титрувати фаги потрібно в стерильних умовах?
3. З яких пробірок починають враховувати результати титрування фага за методом Апельмана? Чому не більше ніж 24 години для обліку реакції?
4. Чому метод Граціа більш вживаний, ніж інші методи?
5. Яким чином розмір негативної колонії залежить від розміру фага?
6. Які переваги мають бактеріальні віруси над іншими в аспекті використання їх як модельних об'єктів?
7. Що таке негативна колонія і як вона утворюється?
8. Розвиток процесу при лізогенізації фагом λ бактеріальної культури.
9. Яка роль білка-репресора бактеріофага λ в підтриманні лізогенного стану бактеріальної клітини?
10. Що таке індукція?

11. Яким чином у лізогенній культурі можна виявити профаг?
12. Чи можна інфікувати лізогенну культуру цим же бактеріофагом?
13. У чому відмінність між вірулентними та помірними фагами?

Література:

1. Лурия С., Дарнелл Дж., Балтимор Д., Кемпбелл. Общая вирусология: Пер. с англ. Э. – М.: Мир., 1981. – 680с. с ил.
2. Мекшенков М.И., Серегина Т.М. Генетический контроль развития бактериофага Т4. – М.: “Наука”, 1977. – 198с.
3. Михайлов А.М., Кафтанова А.С., Корнев А.Н. О строении бактериальных вирусов. – Пущино, 1987. – 152с., ил.
4. Практикум по общей вирусологии. Под ред. И.Г.Атабекова. – М.: Издательство Московского университета, 1981. – 192с.
5. Тихоненко А.С. Ультрасруктура вирусов бактерий. – М., «Наука», 1968, 170 с., ил.
6. Mudy M.F. Sheath of bacteriophage T4 // J. Mol. Biol. – 1973.-v. 80. – p. 613-636.
7. Simon L.D., Anderson T.F. The infection of Esherichia coli by T2 and T4 bacteriophages as seen in the electron microscope // I, II, Virology.- 1967.- v. 32. – p.279-305.
8. Crowther R.A., Lennk E.V., Kikushi Y. Ultrastructure of baseplate of T-even bacteriophage// J. mol. Biol. – 1977.- v. 166. – p.489-523.

Тема 9. ВИКОРИСТАННЯ ЕЛЕКТРОННОЇ МІКРОСКОПІЇ У ВІРУСОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕННЯХ

Оскільки однією з особливостей представників царства *Vira* є те, що вони мають субмікроскопічні розміри, їх неможливо досліджувати за допомогою світлового мікроскопа. Тільки найбільший із вірусів – вірус натуральної віспи – можна побачити під світловим мікроскопом, але навіть цей вірус неможливо розглянути детально. Лише завдяки використанню електронного мікроскопа можна детально розглядати морфологію вірусів.

Виявлення вірусів за допомогою електронної мікроскопії (ЕМ) базується на ідентифікації вірусів за їхньою характерною морфологією. Головна перевага діагностики за допомогою ЕМ – можливість візуалізувати вірус. Можна ідентифікувати вірус безпосередньо, без попереднього вивчення вірусного агента. Інша перевага методу ЕМ – це швидкість діагностики, коли препарат може бути розглянутий протягом декількох хвилин після його приготування з вірусомісної рідини. Є і головний недолік – неможливість дослідити одночасно багато матеріалу. Для виявлення вірусів повинна бути певна концентрація вірусних часточок (приблизно 10^6 часточок у мл). Деякі віруси, наприклад, вірус саркоми Рауса, мають нечітку морфологію, що робить їхню детекцію дуже складною. Наприкінці, утримання та обслуговування ЕМ дуже складне і потребує висококваліфікованого персоналу.

Поява електронної оптики, зокрема електронної мікроскопії, базується на трьох основних дослідженнях у галузі фізики, здійснених у 1897-1926 роках: відкриття електрону, встановлення хвильової природи рухомих матеріальних часточок та винайдення відхиляючої дії електричних і магнітних полів на заряджені часточки. Ці відкриття дали можливість Е. Руска та М. Кнолю в 1931 році розробити перший трансмісійний електронний мікроскоп (ЕМ, ТЕМ).

У сучасних ЕМ успішно використовується ряд конструктивних особливостей, які значно полегшують їхню експлуатацію: зйомка проводиться на фотоплівку, яка розташована поза вакуумною системою; в колонку ТЕМ вбудовується телекамера, що дає змогу збільшити контрастність зображення та зменшити інтенсивність електронного пучка; використовуються турбомолекулярні насоси, щоб уникнути забруднення випарами мастила; запроваджені пристосування, які дають можливість фокусувати пучок електронів на невеликому полі об'єкта; прилади обладнані мікропроцесорами, які фокусують зображення, оптимізують контрастність та експозицію, зберігають зображення в пам'яті та ін.

Із сучасними серійними електронними мікроскопами можна отримувати мікрофотографії з роздільною здатністю досліджуваних структур до 4,5 А, а в окремих випадках роздільна здатність 2,35 А і навіть 1,43 А. Відстань між окремими нуклеотидами в полінуклеотидному ланцюгу становить приблизно 6 А, а період повторення в подвійній спіралі ДНК – 34 А. Здавалося б, первинна та вторинна структури ДНК могли б бути досліджені електронномікроскопічно. Однак експериментатори, які працюють у цьому напрямі, стикаються з великими труднощами, і відчутних результатів поки що не досягли. Електронна

мікроскопія окремих порівняно великих білкових молекул в ряді випадків дала змогу отримати точні відомості про четвертинну структуру молекул.

Усі труднощі, з якими стикаються дослідники, пов'язані з тим, що щільність біологічних об'єктів у декілька разів менша, ніж тих, при дослідженні яких отримують максимальну якість зображення. Для того, щоб отримати зображення макромолекул, їх доводиться контрастувати, вишукуючи для цього різні прийоми. Якість зображення біологічних структур, яка досягається таким способом, поки що нижча, ніж на мікрофотографіях кристалів або напилених у вакуумі часток металу.

Незважаючи на великі експериментальні труднощі, електронна мікроскопія біологічних макромолекул продовжує успішно розвиватися. Завдяки можливості використовувати для досліджень звичайні суспензії та розчини препаратів, електронна мікроскопія значно розширила коло можливих досліджень. У дослідженні вірусів, наприклад, застосування удосконалених методів контрастування дає можливість безпосередньо спостерігати форму білкових капсул, розташування та конфігурацію білкових субодиниць, з яких вони складені. Електронна мікроскопія дає змогу досліджувати процес ресинтезу вірусів *in vitro*.

Застосування методу електронної мікроскопії для вивчення будови біологічних макромолекул має велике майбутнє. Запорука цього – швидке вдосконалення приладів і методів досліджень, зростаючий інтерес до розвитку цього напрямку вчених найрізноманітніших спеціальностей – біологів, фізиків, хіміків.

Найважливіша характеристика мікроскопа – здатність давати роздільне зображення точок об'єкта, розташованих безпосередньо близько, називається роздільною здатністю. Чим менша відстань між двома точками, коли ці точки ще видно окремо, тим вища роздільна здатність приладу.

Зображення точки, яка світиться, отримане за допомогою круглої лінзи, завдяки дифракції світла на отворі лінзи являє собою не точку, а дифракційну картину. Якщо дві точки об'єкта розташовані близько, то кожна з них дає свою дифракційну картину і розподіл інтенсивності є результатом їхнього додавання. Спостерігати окремо ці дві точки можна, якщо максимум дифракційної картини зображення однієї з них по відношенню до максимуму дифракційної картини сусідньої точки розташований не ближче, ніж перший мінімум дифракційної картини. Можна показати, що відстань (d) між центральним максимумом та першим мінімумом у масштабах об'єкта дорівнює:

$$d = \frac{0,61 \cdot \lambda}{n \cdot \sin \alpha} \quad (1)$$

де λ – довжина хвилі, n – показник заломлення середовища, в якому перебуває об'єкт, α – апертурний кут лінзи.

З рівняння (1) випливає, що найбільшої роздільної здатності (найменше значення d) можна досягнути при мінімальній довжині хвилі, тоді як n та α повинні бути якомога більші. У повітрі або у вакуумі $n = 1$. В умовах використання імерсійного об'єктива ($n = 1,4$) і α , близького до 90° , єдиним ресурсом для збільшення роздільної здатності залишається довжина хвилі.

Оскільки людське око найбільш чутливе до жовто-зеленої частини спектру, в світловій мікроскопії користуються світлом з довжиною хвилі 5200-5800 А. В цих умовах (при $n=1$) теоретична границя розподілу становить близько 2000 А (приблизно 1/5 розміру бактеріальної клітини). Використовуючи ультрафіолетову оптику, коли безпосереднє спостереження вже неможливе, можна досягнути розподілу 1200 А. Таким чином, за межами можливості світлової мікроскопії залишаються дослідження тонкої структури клітин, вірусів, макромолекул.

Застосування електронів дало змогу збільшити роздільну здатність мікроскопів. Як відомо, довжина хвилі (λ) рухомої частки може бути підрахована з рівняння:

$$\lambda = \frac{h}{m \cdot v}, \quad (2)$$

де h – стала Планка, m – маса частки, v – швидкість частки.

Якщо замінити у формулі (2) h і m їхніми числовими значеннями та виразити швидкість v через прискорюючий потенціал V , отримаємо:

$$\lambda = \frac{12,25}{\sqrt{V}} \text{ А} . \quad (2'')$$

За прискорюючої напруги в електронному мікроскопі 50 кв, λ відповідає 0,0536 А (становить 1/100 000 довжини хвилі звичайного зеленого світла), при 80 кв – 0,0418 А та при 100 кв – 0,0370 А. Таким чином, довжина хвилі електронів значно коротша, ніж у видимого світла. Отже, і коло розсіювання завдяки дифракції в цьому випадку буде значно меншим. Це причина ефективності електронного мікроскопа. Теоретично (див. рівняння 1) при $\sin \alpha=1$ електрони з довжиною хвилі 0,04 А змогли б забезпечити подільну здатність 0,025 А. Однак магнітним лінзам, за допомогою яких в електронному мікроскопі створюється збільшене зображення, властиві різноманітні аберації, які, як це буде показано далі, при великих апертурних кутах дуже великі. Найкраща роздільна здатність відповідає $\alpha=10^{-2}$ - 10^{-3} радіан. У цих умовах сучасні електронні мікроскопи здатні забезпечити розподіл до 1,43А. Треба сказати, що розподіл залежить не тільки від приладу, але й від фізичних властивостей досліджуваного об'єкта. Найбільшу роздільну здатність вдається отримати для кристалічних препаратів.

Висока роздільна здатність електронних мікроскопів відкрила для досліджень велику галузь, у якій знаходять відповіді на багато проблем біохімії та біофізики. Межа цієї галузі завдяки удосконаленню мікроскопів та розробці нових методів препарування в останні роки розширилась до молекулярного рівня, де раніше дослідження проводили переважно за допомогою рентгеноструктурного аналізу.

Спрощені схеми шляху електронів та розташування магнітних лінз у мікроскопах трансмісійного типу показані на рис.9.1. У цих приладах пучок електронів проходить крізь предмет, який досліджують, і ніби “просвічує” його. Зазвичай лінзи розташовують одна над одною, формуючи вертикальну колонку, в горішній частині якої є джерело електронів – електронна гармата. Всередині колони підтримується вакуум 10^{-4} - 5×10^{-5} мм рт.ст. Джерело

електронів та осі різних лінз мають розташовуватися на одній лінії, тому передбачається можливість юстирування приладу.

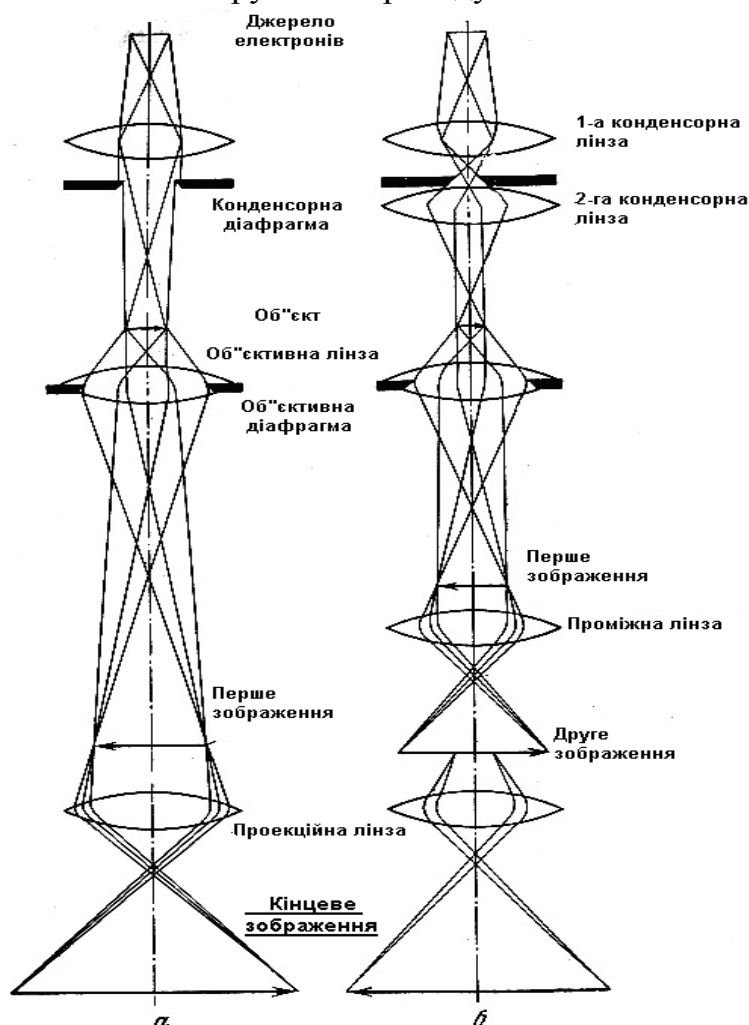


Рис.9.1. Спрощена схема електронного мікроскопа трансмісійного типу.

Магнітні лінзи умовно позначені, як скляні:

а – мікроскоп з однією конденсорною лінзою та двоступеневим (за допомогою об'єктивної і проекційної лінз) збільшенням; б – мікроскоп з подвійною конденсорною лінзою та треступеневим збільшенням

Електрони, які проходять через речовину об'єкта, змінюють свої траєкторії – розсіюються. Приблизно співвідношення між кількістю електронів, які падають на ділянку зразка – N , та кількістю тих електронів, що відбиваються і розташовуються на кут, більший за θ , – ΔN , можна виразити так:

$$\frac{\Delta N}{N} = \frac{\rho \cdot N_A}{A} \cdot \frac{Z^2 e^2}{V^2 \theta^2} \left(1 + \frac{1}{Z}\right) \cdot t$$

де ρ – густина досліджуваної речовини, N_A – число Авогадро, A – атомна вага, Z – атомний номер, V – прискорююча напруга, e – заряд електрону, t – товщина зразка.

Таким чином, число розсіяних електронів збільшується зі збільшенням густини досліджуваної речовини, її атомного номера, товщини зразка та зменшенням енергії електронів.

Практика доводить, що в сучасних методах контрастування біологічних макромолекул оптимальна прискорююча напруга для їхніх досліджень перебуває в діапазоні 70-100 кВ. Якщо напруга нижча ніж 70 кВ, зразок швидше руйнується під впливом електронів, через втрату енергії частиною електронів, коли вони проходять крізь об'єкт, збільшується хроматична аберация, зменшується роздільна здатність. Якщо напруга вища за 100 кВ, деталі досліджуваних структур також виявляти гірше через зменшення розсіювання електронів.

Біологічні об'єкти складаються з речовин із малими атомними номерами – водню, вуглецю, азоту, фосфору та ін. Густина ρ для різних біологічних об'єктів становить від 1 до 2 г/см³. Мінімальна товщина біологічного об'єкта такої щільності, яка виявляється за прискорюючої напруги в електронному мікроскопі 50 кВ, дорівнює приблизно 50 А. Практично не контрастовані частки невеликих вірусів, розташовані на підтримуючій плівці, спостерігаються в електронному мікроскопі як безструктурні плями, а окремі неконтрастовані молекули нуклеїнових кислот взагалі неможливо спостерігати. Але завдання сучасної електронної мікроскопії в біології – якомога глибше вникнути в будову клітини та її структурних компонентів, у будову вірусних часточок, тому біологічні об'єкти необхідно так чи інакше контрастувати.

Крім контрастування за рахунок відтінення металами і використання широко розповсюдженого методу реплік, розроблені специфічні методи контрастування, які застосовують переважно в біології. Тут широко використовують метод вибіркового “фарбування” тканин, тонких зрізів і окремих часток та молекул солями важких металів, а також метод так званого негативного контрастування.

До специфічних особливостей електронної мікроскопії в біології належить також велика ймовірність виникнення артефактів, тобто внесених до структури об'єкта викривлень його реальної форми. Це пов'язано з одного боку – з процесом фіксації та висушування, з другого – з процесом контрастування. Для виявлення артефактів та запобігання їм необхідні ретельний аналіз отриманого зображення і порівняння отриманих даних з результатами інших досліджень.

Плівки-підкладинки для препаратів. Біологічні макромолекули для того, щоб їх можна було досліджувати в електронному мікроскопі, розміщують на тонесеньких плівках-підкладинках. Опорою для цих плівок слугують спеціальні сітки, виготовлені з міді електролітичним способом або сплетені з тонкого дроту. Ті ж електрони, які формують зображення досліджуваних об'єктів, взаємодіють з плівкою-підкладинкою. Тому, якщо товщина плівки відносно велика або матеріал, з якого вона зроблена, сильно розсіює електрони, контрастність зображення розміщеного об'єкта різко погіршується. Матеріал плівки повинен бути механічно міцний, мати значну теплопровідність і стійкість до бомбардування електронами (табл. 9.1). Іноді препарати, розташовані на плівці-підкладинці, піддають спеціальній обробці, тоді до плівки ставлять додаткові вимоги хімічної стійкості. Слід відзначити ще одну важливу особливість плівок-підкладинок. У дослідженні молекул біополімерів підтримуюча плівка в силу властивостей своєї поверхні (гідрофільність або

гідрофобність, наявність заряду) може суттєво впливати на їхню конфігурацію. Це необхідно враховувати, вибираючи підкладинки чи трактуючи результати.

Таблиця 9.1.

Деякі властивості плівок-підкладінок (Атабеков, 1980)

Плівка	Прозорість по відношенню до електронів	Механічна міцність	Стійкість до бомбардування електронами	Хімічна стійкість
Колодієва	Велика	Низька	Низька	Низька
Формварова	Велика	Низька	Низька	Низька
Вуглецева	Середня	Висока	Висока	Дуже висока
Кварцева	Мала	Середня	Середня	Висока

Якість зображення об'єкта залежить від товщини плівки-підкладинки. Зменшення товщини плівки зменшує її механічну міцність. Дуже тонка плівка буде розриватися в процесі препарування або під впливом пучка електронів. Тонкими плівками можна користуватися, якщо застосовувати їх як додаткові опори для дірчастої плівки, виготовлені з колодію та укріплені шаром вуглецю.

Для приготування плівок використовується 0.1-0.2%-ий розчин формвару (поліфінілформальдегіду). Розчинниками можуть бути діоксан, діхлоретан, хлороформ. Розчин слід готувати за одну добу до використання, зберігати в посуді з притертою кришкою в темному місці, термін придатності до 6 місяців.

Методи контрастування препаратів вірусів

Віруси є електронно-оптично прозорими. Контрастність зображення в трансмісійному ЕМ можна підвищити шляхом зниження прискорюючої напруги, зменшення апертурної діафрагми, збільшення фокусної відстані об'єктивної лінзи. Найбільш ефективним підходом є хімічне контрастування – штучне збільшення електронної щільності ультраструктур. За рахунок осадження електронно-щільних речовин контрастування може бути позитивним – підсилення електронної щільності досліджуваних структур порівняно з фоном, який оточує об'єкт, та негативним – збільшення електронної щільності фону. В першому випадку електронно-щільні речовини осаджуються на вірусах, в другому вони вводяться в середовище, яке оточує досліджувані об'єкти (вірусні частки, білки тощо).

Позитивне контрастування. Для контрастування найчастіше використовуються уранілацетат і цитрат свинцю.

Уранілацетат (УА) реагує переважно з фосфатними, карбоксильними та аміногрупами і має велику спорідненість з нуклеїновими кислотами. Для позитивного контрастування за допомогою УА використовують 2% або насичений розчини у 50, 70 або 100% етанолі чи метанолі. УА добре проникає в тканини, тому він частіше використовується для контрастування зрізів тканин, уражених вірусами. Робота зі спиртовими розчинами УА має ряд труднощів. Через велику летючість спиртів при тривалому контрастуванні на зрізах

нерідко випадає осад. Окрім того, спиртові розчини УА досить агресивні: вони руйнують деякі плівки-підкладки. Це особливо небезпечно при монтуванні зрізів на бленди.

З іонів свинцю для контрастування біологічних об'єктів найчастіше використовується цитрат свинцю (ЦС), рідше гідроксид свинцю, ацетат та інші солі. ЦС зв'язується з негативно зарядженими компонентами, такими, як гідроксильні групи та частини, що реагують з осмієм. У цей процес залучені також фосфатні групи.

Фосфорно-вольфрамова кислота (ФВК) залежно від рН (більше чи менше від 3) забарвлює полісахариди та глікопротеїни, а також нуклеопроїди та білки.

Метод негативного контрастування. Негативне контрастування дає високий розподіл для дослідження біологічних макромолекул та ізольованих ультраструктур. При цьому навкруги вірусу утворюється гомогенний фон речовини високої електронної щільності. Негативний контрастер збільшує контрастність біологічних часточок шляхом інфільтрації пор і нерівностей на поверхні зразка та оточення електронно-прозорого об'єкта електронно-щільним матеріалом: біологічний об'єкт має вигляд як електронно-прозора ділянка на фоні електронно-щільного оточення. Методика проста і не вимагає багато часу. Цей метод рідко використовується для тканинних зрізів.

Роздільна здатність при негативному контрастуванні вища, ніж при позитивному. Границя розподілу визначається розміром часточок висушеного барвника. При використанні фосфорно-вольфрамової кислоти (ФВК) границя становить приблизно 1,2 нм.

Речовини, які використовують для негативного контрастування, мають відповідати деяким вимогам (табл. 9.2). По-перше, вони не повинні вступати в реакцію з об'єктом. По-друге, вони повинні бути добре розчинними і мати високу електронну щільність. По-третє, мати високу точку плавлення і бути термічно стабільними, щоб запобігти сублімації та плавленню під електронним пучком. Речовини, які використовують для негативного контрастування, наведено в таблиці.

Таблиця 9.2.

Речовини, які використовують для негативного контрастування

Сіль	Концентрація, %	Для контрастування яких структур використовується
Молібденацетат	1-3	Мембрани, субодиниці ферментів, клітинні фракції
ФВК	1-2	Віруси, бактерії, клітинні фракції, зрізи, макромолекули
УА	0,5-2	Віруси, бактерії, клітинні фракції, зрізи, макромолекули
Ураніл-магnezіумацетат	1	Віруси, бактерії, клітинні фракції, зрізи, макромолекули
Уранілоксалат	0,012 М	Невеликі макромолекули
Уранілформат	0,5-2	Невеликі макромолекули

Суть методу полягає в тому, що біологічний об'єкт занурюють у речовину високої електронної щільності, після чого мало контрастний зразок стає більш чітким порівняно з навколишнім темним фоном. У цьому випадку отримується негативний ефект (рис.9.2.). Частіше використовують 1-2%-ий розчини фосфорно-вольфрамової кислоти (ФВК) або ураніацетату (2-5%) на дистильованій воді. Роздільна здатність цього методу вища, ніж методу відтінення, і досягає 12 А.

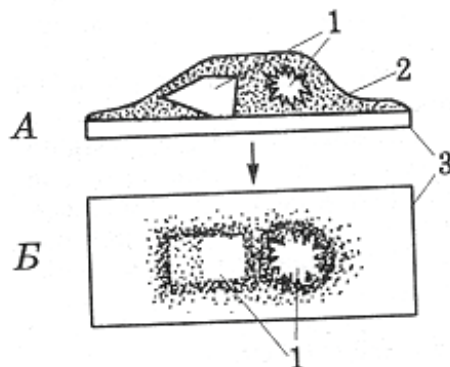


Рис. 9.2. Схема формування зображення об'єкта при негативному контрастуванні (Атабеков, 1980):

А – вигляд збоку; Б – вигляд згори.

1 – об'єкти; 2 – розчин солі важкого металу; 3 – підкладинка.

Загальна схема негативного контрастування. Успіх негативного контрастування залежить від того, чи будуть частки агрегувати та наскільки випадково вони розподілені по підкладинці. Барвник може змішуватися з розчином об'єкта до нанесення на підкладинку, або наноситися на підкладинку після адгезії до неї об'єкта. Суспендування зразків у розчині контрастера дає змогу отримувати різну орієнтацію часточок, які вивчають, на підкладинці. При звичайній процедурі негативного контрастування концентрація часточок повинна бути порядком $10^{-6} - 10^{-7}$ на 1 мл. Добираючи оптимальну концентрацію, важливо досягти стану, щоб не було накладання часточок одна на одну.

Існують різні способи нанесення зразків на підкладинку.

Метод краплі. На взятую пінцетом сіточку з підкладинкою наносять краплю завису об'єкта. Через 1 хв після адсорбції об'єктів на сіточку наносять краплю розчину для негативного контрастування. Надлишок рідини видаляють фільтрувальним папером. Вміщують сіточку в контейнер. Після 15-30 хв зразок може бути досліджений в ЕМ. Можна змішати завис зразка з барвником (1:1, по краплі) на плівці парафільму, а потім краплю суміші перенести на сіточку з підкладинкою.

Метод флоатції. Сіточку з підкладинкою вміщують на поверхню краплі вірусвмісного матеріалу об'єкта. За 1 хв об'єкт встигає адсорбуватися на поверхні підкладинки. Потім сіточку з об'єктом переносять на розташовану поруч краплю розчину негативного контрастера на 30 с і висушують.

Метод наплення. Розчин барвника змішують із суспензією об'єкта та напиляють на підкладинку. Але в роботі з патогенними об'єктами (вірусами) така процедура становить велику небезпеку для здоров'я працівників. Завис

матеріалу зазвичай готують в 1%-му водному розчині контрастера і за допомогою пульверизатора або за допомогою піпетки наносять на поверхню сіточки з підкладкою. Сіточки висихають майже миттєво, й утворюється тонка плівка барвника, яка містить у собі об'єкт.

Контрастування відтіненням. Для контрастування за методом відтінення проводять випаровування металу в вакуумі. Атоми металу розлітаються від місця випаровування по прямолінійних траєкторіях. Якщо під деяким кутом у напрямку до пучка часток, що розпилюються, розташувати дослідний об'єкт, то на його поверхні буде осідати шар металу різної товщини. На ділянках, розташованих перпендикулярно до напрямку руху часток, утворюється більш товстий шар. У тих місцях, де об'єкт буде екранувати пучок часток, утворюються "тіні". Розсіювання електронів для різних ділянок об'єкта є різним, в результаті чого контрастність зображення підвищується. В зв'язку зі специфічним явищем утворення тіні кут між напрямком розпилюваних часток і об'єктом називається "кутом відтінення", а сам метод – "методом відтінення".

Артефакти, які виникають при контрастуванні. Артефакти утворюються переважно за недостатнього або надлишкового забарвлення структур, через використання старих реактивів та ін. Артефакти часто обумовлені наявністю температури повітря і вологості. Своєрідним артефактом є псевдонегативна контрастність, що іноді виникає при надлишковій обробці зрізів насиченим розчином уранілацетату.

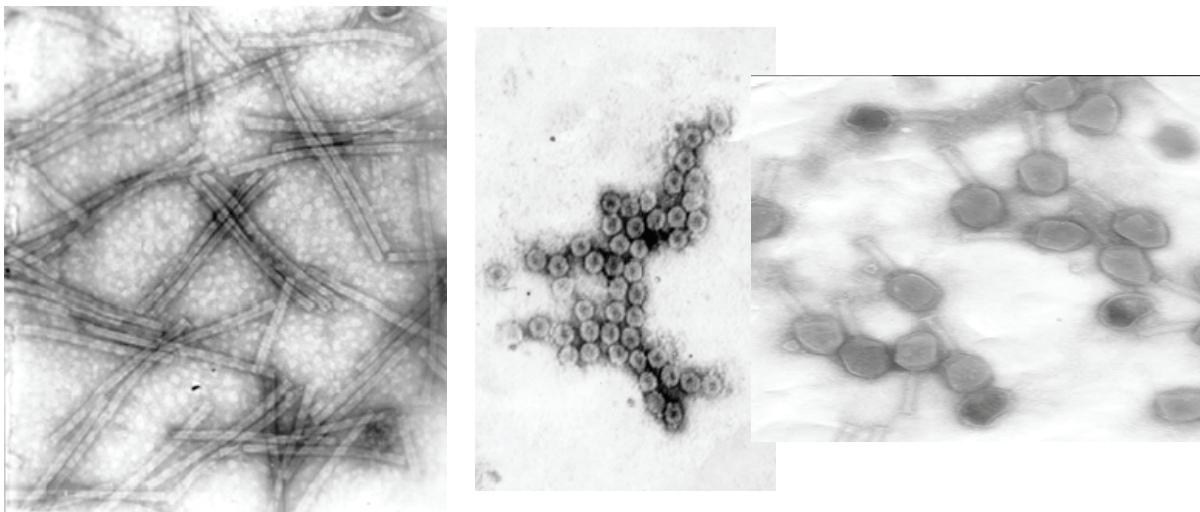


Рис. 9.3. Електронномікроскопічні зображення вірусів, отримані за допомогою негативного контрастування зліва направо: вірус тютюнової мозаїки, вірус мозаїки бромусу, бактерофаг Т4

Метод ультратонких зрізів

Це метод приготування за допомогою ультрамікротомів зрізів тканини завтовшки менше ніж 0,1 мкм для електронної мікроскопії; включає ряд специфічних етапів (заморожування-висушування та ін.), якщо порівнювати з методом приготування "звичайних" зрізів для світлової мікроскопії.

Внутрішню будова вірусів і бактерій, а також інших більших біологічних об'єктів можна вивчати тільки після розсічення їх за допомогою ультрамікроскопа та приготування найтонших зрізів завтовшки 100-300 Å. Завдяки поліпшенню методів фіксації, заливки і полімеризації біологічних об'єктів, застосуванню алмазних і скляних ножів у приготуванні ультратонких зрізів, а також використанню висококонтрастивних речовин для фарбування серійних зрізів, вдалося отримати зрізи не тільки великих, а й найдрібніших вірусів людини, тварин, рослин і бактерій.

Кріоелектронна мікроскопія

Кріоелектронна мікроскопія сьогодні – один з провідних методів дослідження клітинної та молекулярної біології. Нобелівську премію з хімії в 2009 році було вручено Тому Стайц, Венкатраману Рамакрішнану й Аде Йонат за визначення структур рибосоми саме за допомогою кріоелектронної мікроскопії. Мембранний транспорт, за дослідження якого було присуджено Нобелівську премію з фізіології і медицини 2013 року Ренді Шекману, Джеймсу Ротману і Томасу Зюдофу, в наші дні також досліджується за допомогою методів, про які йде мова.

Кріоелектронна мікроскопія спеціалізується на візуалізації біологічних комплексів, таких, як віруси, невеликі органели і високомолекулярні біологічні комплекси з 200 кДа або більше, що збереглися в некристалізованому вигляді в льоді. Цей різновид ЕМ дає змогу в наближених до нативних умовах візуалізувати об'єкт і провести його тривимірну реконструкцію. Використання сучасного комп'ютерного обладнання, автоматизованих мікроскопів, програмного забезпечення для реконструкції зображення і засобів візуалізації дає можливість досліджувати великі біологічні комплекси та субнанометрові структури з великим розподілом.

На першому етапі потрібно підготувати зразок для вивчення за допомогою електронного мікроскопа. Якщо нам треба дослідити вірус, ми повинні спочатку накопичити його у високій концентрації (або з високим титром), виділити й очистити. Потім, коли у нас є хороший зразок, ми поміщаємо краплю, що містить тисячі віріонів, на тонку плівку, яку потім швидко заморожуємо до температури рідкого азоту, щоб захистити і зберегти зразок під час спостереження.

Коли зразок буде готовий, ми можемо почати бомбардування зразка електронами. Кріо-ЕМ використовує дуже низьку дозу електронів (приблизно 1-10 електронів на квадратний ангстрем), так що біологічний зразок не пошкоджується під час дослідження. Електрони проходять через порожні ділянки і відбиваються або заломлюються у щільних (рис. 9.4).

На завершення візуалізації отримують двовимірний образ, схожий на той, який ви бачите на рис. 9.4. Щоб перевести ці плоскі зображення в тривимірні моделі, використовують комп'ютеризовану програму 3-D злиття даних.

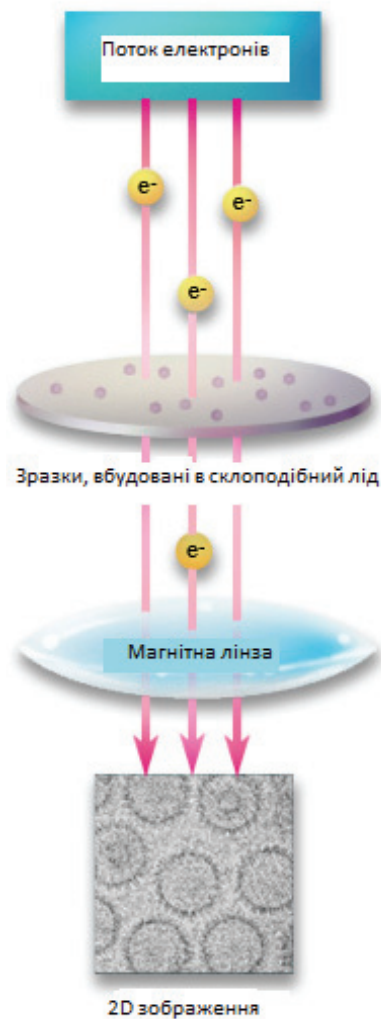


Рис 9.4. Схема отримання зображення в криоелектронному мікроскопі

Хоча лінзи виглядають подібно до збільшувального скла, електронні мікроскопи фактично використовують магнітні котушки, щоб "збільшити" і зосередити електрони.

Досліджуючи тканину, яка пройшла обробку, для виготовлення мікроскопічних зрізів застосовують метод Токуясу. Цей спосіб дослідження отримав таку назву від імені Кіотеру Токуясу, його творця. Перевага методу Токуясу в тому, що досліджувана тканина після обробки та виготовлення найтонших зрізів зберігає свою імуногенність, тобто здатність чужорідного антигена викликати імунну відповідь організму. Біомолекули, які цікавлять дослідника, можна позначити антитілами з наночастками золота і потім під мікроскопом побачити розподіл мічених молекул.

Проводячи експерименти на такому глибокому рівні, дуже важливо не завдати об'єкту пошкодження. Звичайно, є традиційні методи обробки з використанням фіксуєчих (контрастуючих) речовин. Але тоді можливі деякі негативні моменти – поява артефактів і зменшення міжклітинної відстані. Щоб уникнути таких особливостей, активно застосовується метод заморожування об'єктів. Існують кілька типів заморожки, які не дають утворюватися кристалам льоду, що ушкоджує зразки. Наприклад, у методі Токуясу застосовується

сахароза. А ще можна знижувати температуру з великою швидкістю або в умовах високого тиску. Для отриманого аморфного льоду характерний "вітрифікований" стан клітини. **Вітрифікація** – «склування», від лат. *vitrum* «скло» та лат. *facio* «роблю, перетворюю» – перехід рідини при зниженні температури в склоподібний стан). З таких умов лід не утворюється, а зразок залишається цілим. Кристалічна решітка льоду не встигає сформуватися, і зразок з усіма процесами, що проходили в ньому, виявляється одномоментно зафіксований. При кріоумовах з отриманого зразка можна зробити зрізи, можна замінити воду на органічний розчинник. При цьому максимально зберігається як структура зразка, так і його імуногенність.

Якщо необхідно досліджувати окремі білкові комплекси, фаги, віруси і навіть дрібні бактерії, можна їх заморозити цілком на спеціальній сіточці, не виготовляючи зрізів. Це може бути важливо, наприклад, при визначенні механізму проникнення вірусу в клітину і залежності конформації поверхневих білків від таких факторів, як рН.

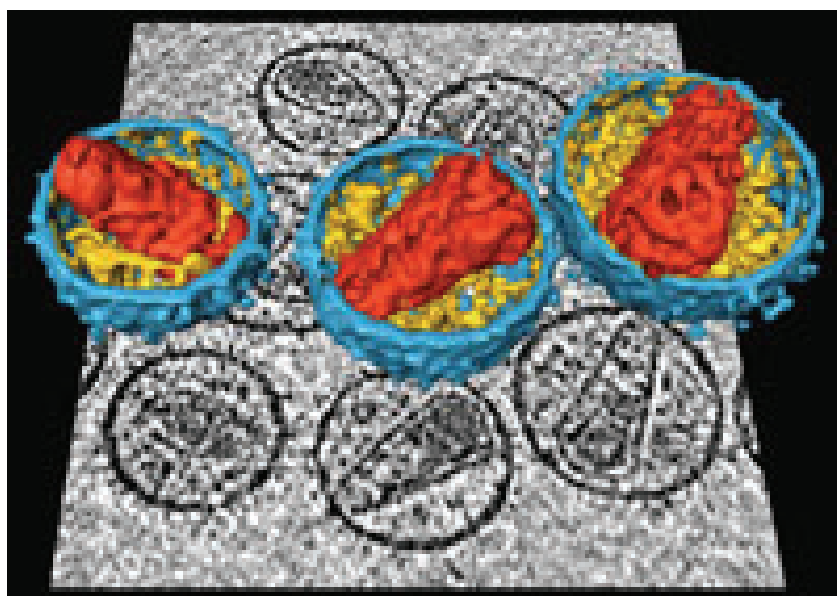


Рис. 9.5. 3-D реконструкція віріонів HIV-1 з використанням кріоелектронної мікроскопії (Briggs *et al.* 2006)

Крім вивчення вірусної структури (рис. 9.5), кріо-ЕМ може бути використана для візуалізації взаємодії білків з ДНК у клітинах людини. Одна зі захопливих перспектив полягає у використанні цього підходу для візуалізації відмінностей ракових та неракових клітин. Ця нова процедура кріо-ЕМ робить раніше невидимі білки видимими і, таким чином, забезпечить нове розуміння клітинної біології.

Практична робота № 1

Приготування препаратів для електронної мікроскопії

Завдання: ознайомитися з основними методами приготування препаратів для трансмісійної електронної мікроскопії та роботи з електронним мікроскопом у вірусологічній лабораторії.

Матеріальне забезпечення: предметні скельця, леза, ступки, вата, склянка (об'єм 50 мл), дистильована вода, 2% розчин формвару на хлороформі, спирт, мідні сіточки для електронної мікроскопії, пінцети, фільтрувальний папір, самплери (об'ємом 20-200 мкл), кінцівки для самплерів, препарати вірусів, 2% розчин ураніл-ацетату, парафільм.

Хід роботи:

1. Чисте предметне скельце швидко занурити в розчин формвару, через 5-10 с скло витягти та підсушити (сушити слід 40-60 с до зникнення запаху розчинника). Плівку, що утворилася на склі, можна виявити, якщо подихати на скло (рис. 5.4.).

2. Отриману плівку підрізати лезом бритви, потім зняти плівку на воду (скло повільно занурити у воду під кутом 45°). На плівку викласти сітки і зняти їх за допомогою фільтрувального паперу. Сітки з плівкою висушуються та зберігаються в чашках Петрі.

3. На сітку з плівкою нанести краплю суспензії вірусних часток. Рідину відбирають фільтрувальним папером через 30-60 с, сітку висушують.

4. На сіточку нанести краплю контрастуючої речовини і через 1 хв відібрати рідину; після просушування препарат готовий для дослідження.

5. Дослідити препарат в електронному мікроскопі.

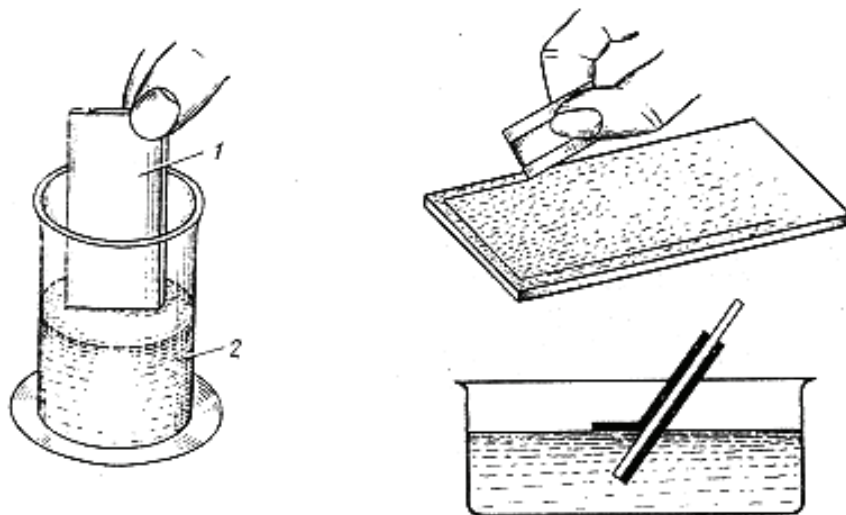


Рис. 9.4. Приготування плівок-підкладинок з формвару: 1 – предметне скельце; 2 – склянка з розчином формвару.

Практична робота № 2

Підрахунок розмірів вірусних часток за електронномікроскопічними зображеннями

Завдання: отримати навички підрахунку розмірів вірусних часточок за електронномікроскопічними зображеннями.

Матеріальне забезпечення: лінійка, міліметровий папір, мікрофотографії вірусів.

Хід роботи:

1. За допомогою лінійки виміряти довжину та діаметр вірусних часточок на електронній мікрофотографії.
2. Визначити середнє значення. Порівняти отримане число з лінійкою в кутку фотографії (в 1 см кількість нанометрів). Визначити розміри часточок у нанометрах.
3. Побудувати графік залежності розмірів вірусів (нм) від кількості вірусних часточок. Визначити статистично достовірні розміри вірусів.

Контрольні завдання:

1. Приготування плівок-підкладинок з формвару.
2. Негативне контрастування препарату вірусу.
3. Приготування препаратів для електронної мікроскопії.
4. Розрахунок розмірів вірусних часточок (за фото).
5. Будова електронного мікроскопа.
6. Схема приготування плівок-підкладинок з формвару.
7. Занотувати в робочі журнали: як статистично достовірно вираховувати розміри вірусів. Похибка в дослідженнях.

Контрольні запитання:

1. Мета використання електронної мікроскопії у вірусології.
2. Порівняти роздільну здатність світлових мікроскопів зі здатністю електронних мікроскопів.
3. Що дає змогу отримувати більшу роздільну здатність в електронній мікроскопії?
4. Формування зображення в трансмісійному електронному мікроскопі.
5. Чим зумовлена необхідність контрастування вірусів для дослідженні в ЕМ?
6. Як вираховують розміри вірусів за електронно-мікроскопічними зображеннями?
7. Роздільна здатність електронного мікроскопа.
8. Методи приготування препаратів.

Література:

1. Вирусология. Методы. Под ред. Меихи Б.М. М. : Мир, 1988. – 344 с.
2. Миронов А.А., Комиссарчик Я.Ю., Миронов В.А. Методы электронной микроскопии в биологии и медицине. С-П., Наука, 1994г. – 398 с.
3. Практикум із загальної вірусології / за ред. А.Л. Бойка. –К.: Видавничий центр „Київський університет”, 2000. – 269 с.
4. Практикум по общей вирусологии. Под ред. Атабекова И.Г. – М.: Университет, 1980. – 191с.
5. Троценко Н.И., Белоусова Р.В., Преображенская Э.А. Практикум по ветеринарной вирусологии. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: Колос, 2000. – 272 с., ил.
6. S.J. Flint et al. Principles of Virology. N-Y, ASM Press, 2000. – 579 pp.
7. A.J. Cann. Molecular Virology. London, Academic Press, 2001. – 395 pp.

ТЕМА 10. ІДЕНТИФІКАЦІЯ ВІРУСІВ ТА ДІАГНОСТИКА ВІРУСНИХ ІНФЕКЦІЙ

Сучасна діагностика інфекційних хвороб, попри свої традиційні риси, характеризується безперервним удосконаленням уже відомих прийомів і методів їхнього розпізнання та пошуком нових, ефективніших, у тому числі швидких (експресних). Необхідність подальшої розробки методів діагностики інфекційних хвороб зумовлена рядом причин. Насамперед, з плином часу помітно змінюється патогенез і клінічна картина інфекційних хвороб. Відзначається тенденція до збільшення кількості як стертих, так і тяжких, а також атипових форм інфекційних хвороб із затяжним перебігом. Збільшується кількість змішаних захворювань, спричинених одночасно декількома видами бактерій, вірусів, найпростіших чи грибів. Виявлено нові, раніше невідомі інфекційні хвороби, такі як ВІЛ-інфекція/СНІД, синдром хронічної втоми, пріонові хвороби.

Визначення збудника (при тяжких формах захворювання) важливе для прогнозу подальшого перебігу хвороби, вибору правильного способу лікування, особливо для найбільш поширених та соціально значущих вірусних інфекцій. Тому першочерговим кроком для проведення цих заходів є постановка діагнозу. **Діагноз** (лат. *Diagnosis* – розпізнавання) – висновок про причини та особливості виникнення хвороби. Значення діагностики як процесу розпізнання інфекційної хвороби полягає в такому:

- ▶ є основою для проведення раціонального та ефективного лікування хворого;
- ▶ дає змогу в більшості випадків передбачити можливі варіанти подальшого перебігу захворювання та його наслідків;
- ▶ дає можливість провести своєчасні та адекватні протиепідемічні й профілактичні заходи (карантин, госпіталізацію, вакцинацію тощо) і виявити джерело вірусної інфекції.

Існує три основних підходи до лабораторної діагностики вірусних інфекцій:

1) безпосереднє дослідження матеріалу на наявність вірусного антигену або нуклеїнових кислот.

Вірусологічний метод, суть якого полягає у виділенні вірусу в культурах чутливих клітин (наприклад, фібробластів або курячих ембріонів), залишається “золотим стандартом” діагностики вірусних інфекцій людини, бо характеризується високою чутливістю (85-100 %) та специфічністю (100 %), дає можливість отримати чисту культуру вірусу для подальшого вивчення. Результати вірусологічного методу отримують протягом 2 –14 діб, особливо для використання при невідкладних станах (наприклад, при вірусному енцефаліті або сепсисі).

Виявлення вірусів. Щоб виділити віруси, необхідні для подальшого їхнього дослідження з метою ідентифікації, дуже важливо провести правильний забір, швидке транспортування матеріалу до лабораторії, раціональний вибір тест-системи (курячі ембріони, культури клітин, лабораторні тварини).

Для вірусологічного дослідження матеріал краще збирати у перші дні захворювання. Від правильного його забору залежить хід подальшого вірусологічного дослідження. Залежно від проявів хвороби досліджуваним матеріалом може бути кров, змиви з носо- і ротоглотки, харкотиння, рідина з пухирців, спинномозкова рідина, сеча, фекалії, шматочки органів і тканин, отриманих при дослідженні трупів, матеріал від лабораторних тварин тощо. Одержаний матеріал необхідно зберігати за умов збереження активності вірусів, тому його слід тримати, заморозивши, при температурі -20°C . Для транспортування вірусів можна використати термоси, які заповнюють сухим льодом.

Досліджуваний матеріал, який не контамінується сторонньою флорою (кров, плазма, сироватка, спинномозкова рідина), може бути безпосередньо використаний для зараження тест-систем. Допустимим є розведення його фосфатно-буферним розчином рН 7,6. Якщо досліджуються шматочки тканин, вони спочатку подрібнюються в стерильних умовах до гомогенного стану, потім додається фосфатний буферний розчин, одержана суспензія центрифугується протягом 10 хв при 1500-2000 об/хв. З метою зараження використовують надосадову рідину.

Однак у багатьох випадках досліджуваний матеріал (фекалії, змиви з ротоглотки, носових ходів тощо) може містити бактеріальну флору, яка при подальшому зараженні тест-систем спотворюватиме результати досліджень, включаючи їх загибель. Тому в лабораторіях використовують методи знищення бактерій у доставлених зразках. Надійним методом є обробка матеріалу антибіотиками пеніциліном і стрептоміцином у концентрації 500-1000 ОД/мл, у разі простих вірусів – ефіром. Допустимим вважається використання спеціальних антибактеріальних фільтрів або центрифугування матеріалу при невисоких швидкостях. У цьому випадку бактерії опускаються з осадом на дно. Супернатант підлягає подальшому ультрацентрифугуванню, і його потім використовують для зараження;

2) ізоляція та індикація вірусу з патологічного (клінічного) матеріалу.

Електронна мікроскопія дає можливість виявляти вірусні частки в досліджуваному зразку та визначати видову належність віріонів за їхніми морфологічними ознаками, однак цей метод малодоступний для клінічної практики та використовується здебільшого в наукових цілях.

3) серологічна діагностика, що базується на виявленні специфічних противірусних антитіл у сироватці крові. Оскільки антитіла з'являються не відразу після проникнення вірусів в організм, і їхня концентрація протягом деякого часу зростає, діагностичну цінність має визначення приросту титру антитіл. Саме тому всі серологічні реакції проводяться з парними сироватками, перша з яких береться у хворого на початку захворювання, а друга – через 2-3 тижні. Результати реакції вважаються позитивними, якщо в досліді виявлено чотирикратний і більший приріст титру антитіл. Оскільки застосування цього методу практично підтверджує перенесення захворювання, його ще називають ретроспективною діагностикою.

У будь-якому обраному підході до діагностики вірусної інфекції найважливішим фактором є якість досліджуваного матеріалу. Так, наприклад, для

прямого аналізу зразка або для ізоляції вірусу досліджуваний матеріал необхідно отримувати на початку захворювання, коли збудник ще виводиться у відносно великій кількості та не пов'язаний ще з антитілами, а об'єму зразка достатньо для проведення прямого дослідження. Також необхідно враховувати вибір матеріалу, в якому, виходячи з патогенезу інфекції, наявність вірусу найвища (табл.10.1).

Таблиця 10.1.

Порівняння різних підходів до діагностики вірусних інфекцій

Методи	Час	Переваги	Недоліки
Культура клітин	Дні - тижні	Висока специфічність та чутливість; можливість подальшої роботи із виділеним вірусом	Необхідність у спеціальному обладнанні, тривалість
Прямі методи діагностики	Години - 1 день	Швидкість; застосування для вірусів, які важко культивувати	Ризик отримання хибно-позитивних та хибнонегативних результатів; складність одночасного проведення великої кількості аналізів
Серологічна діагностика	Тижні	Визначення імунної відповіді на вірус; застосування для вірусів, які важко культивувати	Можливість перехресних реакцій; у багатьох випадках необхідні парні сироватки крові

Алгоритм діагностики базується на застосуванні різних методів, до яких входять як класичні вірусологічні, так і сучасні молекулярно-біологічні.

Так, використання експрес-методів діагностики (**імунохроматографічний тест**) не вимагає для виконання спеціально навченого персоналу і може бути використаний для діагностики в польових умовах і «біля ліжка хворого». Чутливість і специфічність цього простого методу становлять 90-95%, а терміни ідентифікації вірусу можуть бути скорочені до 10-15 хвилин. У той же час за чутливістю експрес-тести поступаються молекулярно-біологічним методам.

Молекулярно-біологічні методи є надзвичайно чутливими і високо-специфічними. Найчастіше застосовують *полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР)*, яка полягає в тому, що в досліджуваному матеріалі шукають генетичний матеріал збудника – нуклеїнові кислоти: ДНК чи РНК; це дає змогу не лише констатувати наявність збудника в мізерній кількості, але й встановити його концентрацію.

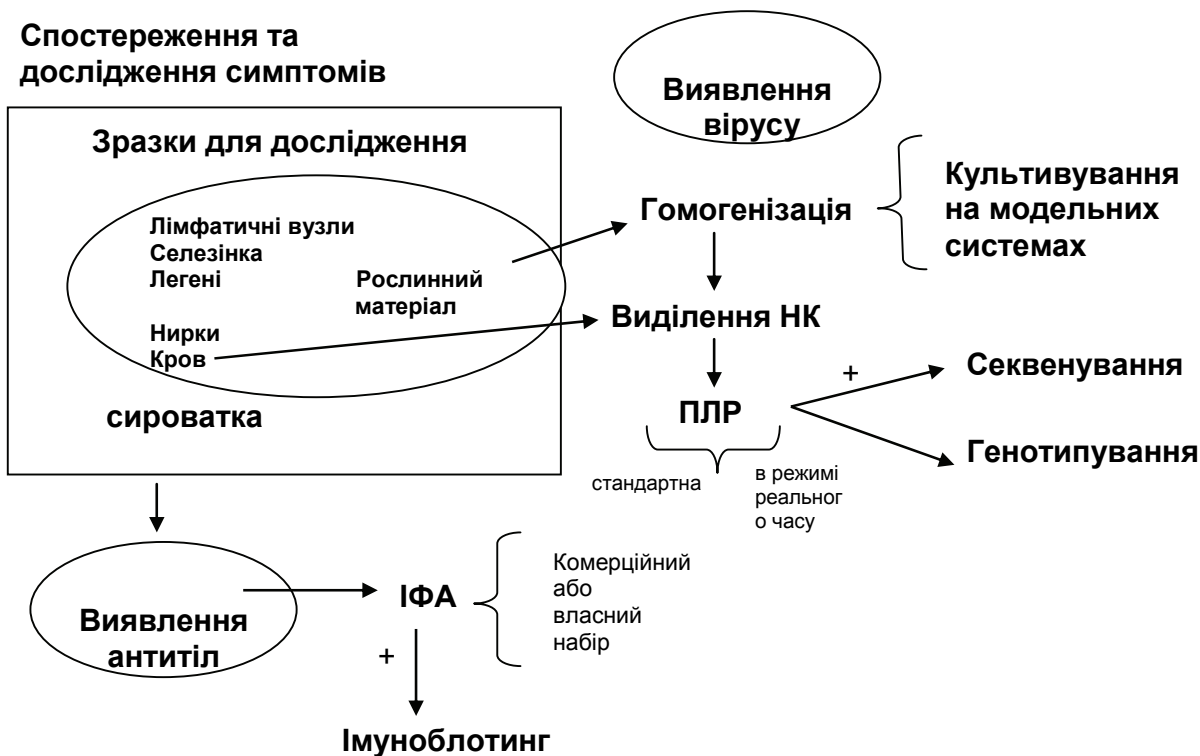


Рис. 10.1. Найбільш поширені лабораторні протоколи діагностики вірусних інфекцій

Для ідентифікації індивідуальних антигенів вірусів та антитіл до них у складних сумішах без попереднього очищення білків використовують імуноблотинг (ІБ). Метод включає фракціонування білків за допомогою електрофорезу в поліакриламідному гелі з подальшою імуноіндикацією білків імуноферментним аналізом (ІФА). Розділення білків знижує вимоги до хімічної чистоти антигена та дає можливість виявляти індивідуальні пари антиген антитіло. Ідентифікація антитіл в сироватках хворих до внутрішніх та поверхневих вірусних антигенів дає можливість визначити стадію захворювання, а при аналізі популяцій – мінливість вірусних білків.

Таким чином, вибір методу лабораторної діагностики визначається характером біологічних властивостей збудника та обирається в кожному конкретному випадку окремо. Загальні принципи лабораторної діагностики вірусних інфекцій наведені на рисунку 10.1.

Серологічні методи дослідження

Серологічна діагностика може використовуватися для визначення як досліджуваних вірусів, так і антитіл до них. Вона відіграє роль у визначенні етіології (природи) вірусної інфекції навіть при негативних результатах виділення вірусу. Так, для грипу та інших ГРВІ основне значення серологічних методів – це ретроспективна їхня діагностика, що дає змогу побічно визначити спектр циркулюючих у людській популяції вірусів. Так само широко застосовуються серологічні методи і для оцінки поствакцинальної імунної відповіді. Це маркери інфікування, антигени, антитіла і нуклеїнові кислоти,

виявлення яких дає змогу встановити етіологію вірусного гепатиту і/або наявність вірусу, характеризувати перебіг інфекції, прогнозувати її наслідки, оцінити ефективність лікування, поствакцинальний імунітет.

Усі серологічні реакції базуються на специфічній взаємодії антигена з антитілом.

Антиген – речовина, зазвичай органічного походження, що має ознаки генетичної відмінності і при введенні в організм викликає специфічний імунний ефект. З антигенами пов'язують три властивості:

1. Здатність індукувати утворення антитіл при введенні тваринам або викликати імунологічну реакцію.

2. Здатність виявляти специфічність утворених антитіл.

3. Здатність специфічно з'єднуватись із утвореними антитілами.

Антитіла – білки, що циркулюють в імунних сироватках, тому сироватка завжди є компонентом серологічних реакцій (lat. serum – сироватка, звідси походить назва реакцій – серологічні).

Серологічні реакції широко застосовують у лабораторній діагностиці вірусних захворювань, особливо за умов, коли:

- виділення вірусу неможливе або ускладнене і потребує багато часу;
- віруси не викликають змін у культурі клітин і не розмножуються в ній;

- не здатні викликати експериментальну інфекцію у лабораторних тварин;

- різні віруси можуть викликати схожі клінічні прояви хвороби, а також тривалий час персистувати в організмі хазяїна (вірус герпесу, ентеровіруси);

- дослідження здорових осіб дає можливість проводити сероепідеміологічне вивчення імунологічних структур населення, які проживають у різних кліматичних зонах, з метою виявлення поширеності вірусних інфекцій, визначення найбільш уражених контингентів населення та виявлення сприйнятливих осіб різного віку;

- сприяють оперативному епідеміологічному аналізу і формуванню цілеспрямованих протиепідемічних заходів (вакцинація, діагностика, лікування) у вогнищах вірусної інфекції;

- для оцінки ефективності противірусних вакцин та хіміотерапевтичних препаратів, для виявлення природних резервуарів вірусу і т.д. Рівною мірою все це стосується і діагностики фітовірусних інфекцій.

Серологічні реакції використовують у двох напрямках:

- Ідентифікація – визначення місця нового ізоляту в існуючій системі класифікації вірусів, тобто визначення родини, роду, антигенної групи та взаємовідносини цього ізоляту з іншими представниками цієї групи.

- Серодіагностика – виявлення з діагностичною метою антитіл у сироватці крові обстежуваного.

Залежно від мети дослідження в серологічних реакціях завжди використовують референс-компоненти. Якщо необхідно виявити збудника інфекції, то застосовують набір імунних референс антисироваток до відомих вірусів. У разі виявлення антитіл – стандарні антигени.

Для постановки серологічних реакцій необхідні такі компоненти:

Антигени (АГ) У серологічних реакціях антигенами можуть виступати як очищені віруси, так і просто матеріал, що містить вірус: культуральна, алантоїсна чи амніотична рідини, гомогенати органів лабораторних тварин, сік інфікованої рослини або клінічний матеріал – ротоглоточні, носові змиви, пункції. Крім того, можуть бути використані й окремі компоненти вірусів – структурні поверхневі білки.

Антитіла (АТ) Антитіла отримують за кілька етапів: 1) приготування високоочищеного концентрованого антигену (вірусу); 2) імунізація лабораторних тварин; 3) тестування отриманої антисироватки.

Антисироватки характеризуються трьома важливими властивостями: 1–авідність, 2 – специфічність, 3 – титр.

1. Авідність – характеристика міцності зв'язку між АГ та АТ.

2. Специфічність – ступінь здатності антитіла відрізнити імуноген від споріднених антигенів, вона забезпечує вибірковість стеричного та хімічного впізнавання.

3. Титр – кінцеве розведення антисироватки, яке забезпечує оптимальну взаємодію з АГ. Титр залежить від концентрації в імунній сироватці антитіл.

У сироватці крові містяться антитіла до багатьох білків вірусу, і ці АТ належать до різних класів, тому такі сироватки називають **полівалентним**. Для збільшення чутливості методів ідентифікації вірусів сьогодні широко використовують або виділені імуноглобуліни класу IgG, або **моноклональні антитіла**. Такі АТ здатні розпізнавати певні вірусні білки, окремі антигенні детермінанти і продукуються клітинним клоном, який має походження з одного лімфоцита за допомогою гібридомної техніки.

Реакції між АТ та АГ, які відбуваються *in vitro*, мають типові характеристики:

- необхідність електролітів (оптимальним є ізотонічний розчин з рН близьким до нейтрального);

- зворотність (можлива дисоціація комплексу АГ – АТ при зміні умов постановки реакції);

- двофазність (фаза взаємодії АГ з АТ і фаза проявлення – візуалізація – утвореного комплексу).

Реакція між АГ та АТ *in vitro* супроводжується виникненням декількох феноменів: аглютинації, преципітації та лізису (рис.10.2).

Аглютинація та преципітація відбуваються при безпосередній взаємодії АГ з АТ з утворенням у середовищі агрегатів внаслідок з'єднання чисельних комплексів АГ + АТ. Видимі візуальні агрегати між АГ та АТ виникають відповідно до теорії сітчастих структур, тобто, коли до одного комплексу АГ + АТ послідовно приєднуються, реагуючи з вільними антигенними детермінантами та активними центрами антитіл, інші молекули антигенів та антитіл. І в результаті чисельних зв'язків з первинним комплексом формується подібна структура, яка поступово перетворюється на агрегати і випадає в осад.

Ефект лізису досягається додаванням у середовище білків системи комплементу, які лізують цей комплекс.

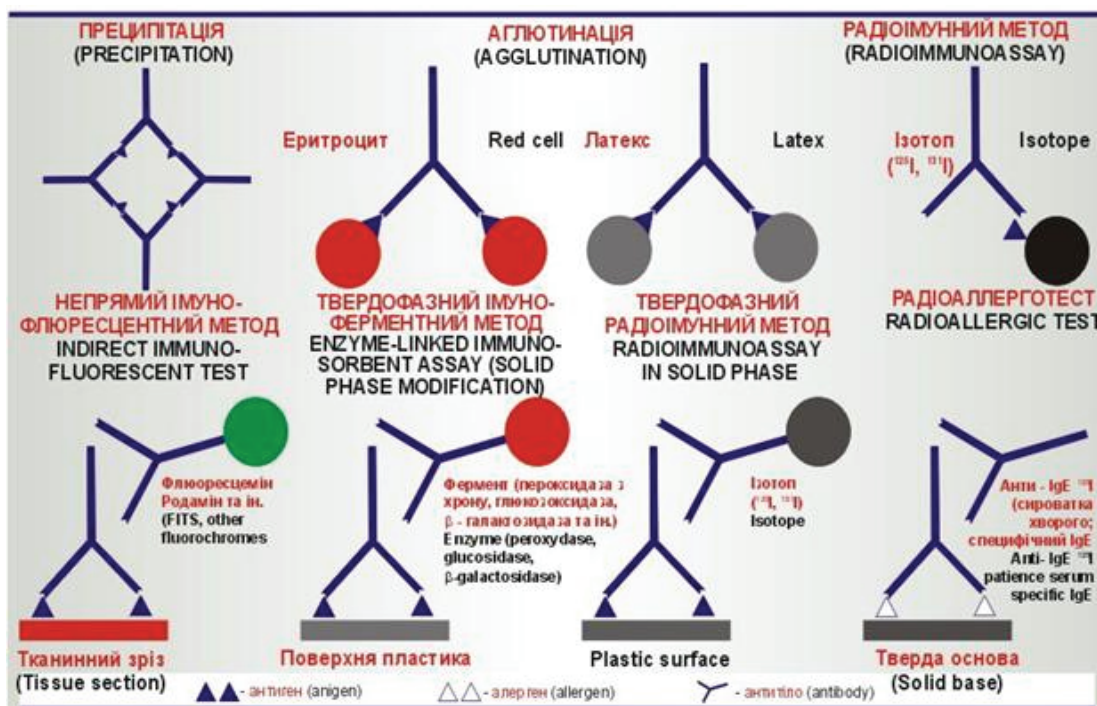


Рис. 10.2. Принципи взаємодії антигена та антитіла в різних реакціях

У цьому розділі розглянуто ряд традиційних методів імунодіагностики, використання яких накопичено великий досвід.

Реакція гальмування (затримки) гемаглютинації (РГГА або РЗГА). РГГА використовується для діагностики захворювань, викликаних гемаглютинуючими вірусами. Вона заснована на зв'язуванні стандартного вірусу антитілами сироватки хворого. Індикатором реакції слугують еритроцити, при позитивному результаті антитіла взаємодіють із вірусним антигеном і вільні (не зв'язані) еритроцити осідають на дно лунки як щільний осад. У разі, коли в реакції відсутні досліджувані антитіла, вірус взаємодіє з еритроцитами та формує ефект аглютинації.

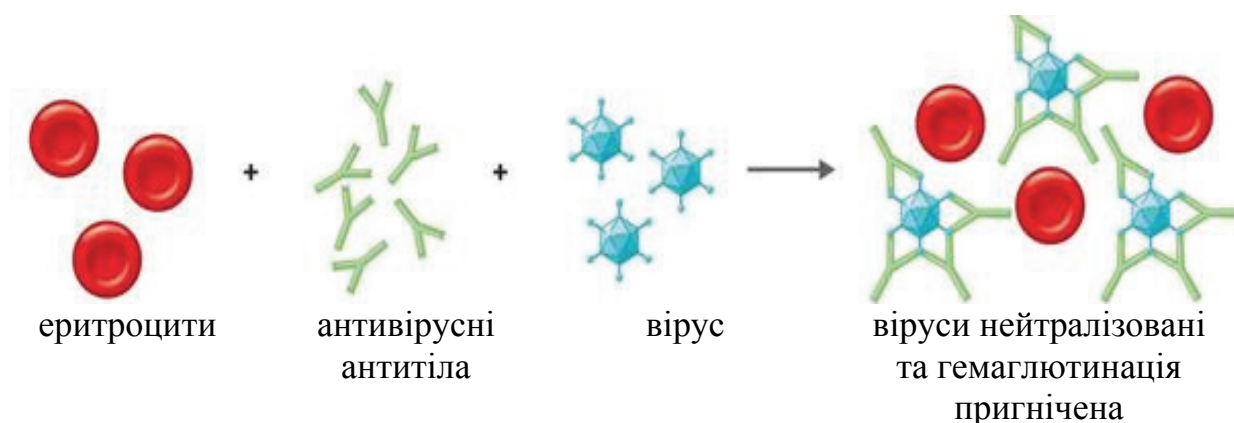


Рис. 10.3. Формування мережевої структури при гемаглютинації РГГА

РГГА – допоміжний лабораторний метод для серодіагностики кору, червоної висипки, грипу, кліщового енцефаліту, поліомієліту та інших вірусних інфекцій, збудники яких мають гемаглютинуючі властивості. Ця реакція набула широкого розповсюдження в діагностиці вірусних захворювань для виявлення

антитіл у сироватках хворих та перехворілих. Вона також застосовується для типування виділеного вірусу, для вивчення антигенної структури варіантів вірусів.

З діагностичною метою використовують парні сироватки хворих людей (першу беруть при появі симптомів захворювання, а другу – через 12–20 днів) для виявлення приросту титру антитіл. Відомо, що діагностичні специфічні антитіла належать до імуноглобулінів класу IgM та IgG, які синтезуються в різний час інфекційного процесу. При цьому IgM антитіла з'являються в сироватці першими, тому їх можна використовувати для ранньої діагностики (достатньо досліджувати одну сироватку). Антитіла класу IgG синтезуються пізніше і зберігаються в організмі довше, тобто їх можна виявити в період реконвалесценції (одужання).

Для ідентифікації нових виділених штамів вірусів у РГГА використовують імунні та нормальні сироватки експериментальних тварин. Вивчаючи імунну структуру населення, досліджують сироватки здорових людей.

Усі сироватки, досліджувані в РГГА, перед роботою прогрівають при 56–60°C протягом 30 хв для видалення неспецифічних інгібіторів. Для РГГА використовують еритроцити тих видів тварин, що і для РГА.

Діагностичним критерієм гострої вірусної інфекції зазвичай слугує приріст титру антитіл у чотири й більше разів та зміна класу специфічних імуноглобулінів у парних сироватках, взятих у гострій стадії захворювання та під час одужання.

Титром антитіл вважають те найбільше розведення сироватки, яке дає повну затримку гемаглютинації.

Переваги РГГА – простота техніки, швидкість, не потребує стерильності, специфічність. Недоліки – реакція можлива тільки з гемаглютинуючими вірусами.

Реакція непрямой гемаглютинації (РНГА). Ця реакція застосовується для виявлення та титрування вірусів, що погано або взагалі не аглютинують еритроцити. Суть реакції непрямой аглютинації в тому, що еритроцити з попередньо адсорбованими антигенами здатні аглютинуватись за наявності гомологічних сироваток (АТ). Еритроцити виконують роль носія зі специфічними детермінантами, і їхнє склеювання відбувається як результат взаємодії антиген– антитіло та реєструється візуально за характером утвореного осаду. РНГА – дуже чутлива реакція, за її допомогою можна виявити 0,01 мг/мл АГ, а за специфічністю вона наближується до імуноферментного аналізу.

Існує дві модифікації РНГА: 1) адсорбція антигена на поверхні еритроцитів; 2) адсорбція антитіл на поверхні еритроцитів з подальшою аглютинацією за наявності гомологічного вірусу.

Облік результатів проводять після осадження еритроцитів у контрольних лунках. За позитивний результат приймають аглютинацію еритроцитів (вони вільно розміщені по дну лунки); за негативний – компактне осідання еритроцитів у формі диска на дно лунки.

За титр антитіл у сироватці приймають найбільше її розведення, що викликає аглютинацію сенсibiliзованих еритроцитів.

Реакція зв'язування комплементу (РЗК). РЗК є однією з традиційних серологічних реакцій, що використовується для діагностики багатьох вірусних інфекцій і базується на феномені лізису клітин. В РЗК задіяні 2 системи: специфічна (антиген – антитіло) та індикаторна (еритроцити барана – гемолізін тобто антитіла до еритроцитів барана, які здатні взаємодіяти із системою комплементу). При взаємодії досліджуваного АГ зі специфічним АТ утворюється комплекс, який зв'язує (фіксує) комплемент. Утворення цього комплексу не супроводжується візуальними змінами, тому в реакцію вводять гемолітичну систему, яка складається з еритроцитів барана та гемолізину. Останні лізують еритроцити лише з участю комплементу.

Як і всі серологічні реакції, РЗК дає оптимальний результат за використання певних співвідношень компонентів, тому перед постановкою основного дослідження необхідно визначити робочі дози основних компонентів реакції, які встановлюються за фактом гемолізу в розведеннях кожного компоненту за наявності індикаторної системи.

Недоліком методу є недостатньо висока чутливість та складність стандартизації реагентів РЗК.

Реакція біологічної нейтралізації (РН). Реакція нейтралізації базується на здатності специфічних антитіл вступати у взаємодію з антигенними детермінантами білків оболонки віріона та нейтралізовувати **інфекційну активність вірусу**. РН є найбільш специфічною серологічною реакцією, що використовується у вірусології.

За її допомогою можна виявити наростання титру антитіл у сироватці крові перехворілих або імунних організмів, можна ідентифікувати віруси та виявляти їхню антигенну структуру.

Реакція нейтралізації високоспецифічна, тобто імунна сироватка нейтралізує тільки гомологічні штами вірусу.

У РН беруть участь такі компоненти: вірус, антисироватки (віруснейтралізуючі антитіла) та чутлива біологічна модель. Це можуть бути лабораторні тварини – новонароджені білі миші, чутливі до реплікації багатьох вірусів; курячі ембріони та культури клітин – чутливі види клітин, у яких вірус викликає виражену цитопатичну дію або формування бляшок під агаровим покриттям.

Принцип реакції нейтралізації полягає в тому, що в пробірці поєднують рівні об'єми імунної сироватки крові та суспензії вірусу і після інкубації визначають, чи зберігся в суміші активний інфекційний вірус. Проводять це шляхом зараження сумішшю чутливої до цього вірусу живої системи (біопроба на тест-об'єктах). Відсутність дії вірусу на тест-об'єкт при позитивному контролі розцінюють як свідчення нейтралізації біологічної активності вірусу антитілами сироватки і, відповідно, гомологічності антитіл сироватки і антигенів вірусу. При цьому чим більше в сироватці антитіл до взятого вірусу, тим в більш високому розведенні вона ще здатна нейтралізувати певну (стандартну) дозу вірусу. Якщо біопроба позитивна, вважають, що нейтралізація вірусу не відбулась, оскільки сироватка не містить антитіл до взятого вірусу. РН ставлять у двох варіантах: 1) змішують рівні об'єми різних розведень сироватки з постійною дозою вірусу; 2) з'єднують рівні об'єми того

самого розведення сироватки (або нерозведену сироватку) із зростаючими дозами вірусу.

Імунодифузійні тести. Термін „преципітація” як правило використовується для визначення реакції взаємодії між розчиненими антигенами і специфічними антитілами. Результат цієї взаємодії – преципітат, помітний неозброєним оком. Цю реакцію відкрив Р. Крауз у 1897 р., вивчаючи бактеріальні захворювання. З того часу вона широко застосовується у діагностиці бактеріальних і вірусних захворювань, особливо фітовірусних інфекцій. Реакція характеризується високою чутливістю (можна виявити 0,3 - 0,5мкг білка), простотою, її можна виконувати в лабораторії і у польових умовах.

Принцип реакції преципітації полягає в утворенні комплексів антиген-антитіло у вигляді решітки. Один з варіантів з'єднання: молекули антигена є вузлами решітки, а молекули антитіл – зв'язуючими ланцюгами. Оскільки антигени полівалентні, кожна вірусна частка здатна зв'язуватися з антитілами, що несуть два активних центри ідентичної специфічності, утворюючи структуру решітки. З'єднання відбувається за рахунок взаємодії полярних груп антигенних детермінант і активного центру антитіла. Протяжність утвореної решітки залежить від відносних концентрацій реагентів. Видимий преципітат утворюється лише тоді, коли в розчині міститься багато антигена. Мінімальна кількість вірусу, необхідна для утворення видимого преципітата – 0,1-1,0 мкг. Утворення специфічного осаду може гальмуватися надлишком антигена (вірусу) або антисироватки, тому необхідно проводити їхнє серійне розведення. Співвідношення реагентів, яке дає швидку преципітацію, називається оптимальним співвідношенням. Для кожного вірусу та антисироватки існує межове розведення, далі якого преципітація не спостерігається.

Подальший розвиток методів преципітації став можливий завдяки використанню гелевих носіїв. Перенесення реакції преципітації між антигеном і антитілом із рідкого середовища (кільцепреципітація, преципітація в пробірках) у гель дало змогу досліджувати індивідуально кожну пару антиген-антитіло, оскільки антиген дифундує назустріч гомологічним антитілам з певною швидкістю. Отже, реакції засновані на здатності до дифузії в гелях антитіл та розчинених антигенів за відсутності такої здатності у комплексу антиген+антитіло, який утворюється при контакті дифундуючих назустріч один одному гомологічних антигена та антитіла. Комплекс антиген+антитіло осаджується в тій ділянці, де співвідношення компонентів є оптимальним, у результаті утворюються смуги преципітації, що мають вигляд мутно-білих ліній у гелі.

Тести, які базуються на імунодифузії, пов'язані з розподілом суміші антиген – антитіло за розмірами часток, коефіцієнтом дифузії та концентрацією. Ці методи дають можливість одночасно визначати специфічність антисироваток, ступінь серологічної спорідненості між досліджуваними вірусами та їхніми штамами, проводити контроль за чистотою моноспецифічних сироваток та антигенів.

Подвійна дифузія за Ухтерлоні. У чашки Петрі заливають 1%-1,5% агаровий гель і роблять лунки, в які розміщують розведення антигена та антитіл. Вони дифундують назустріч і утворюють преципітат (молочно-мутно-

білу лінію) в тій ділянці гелю, де їхнє співвідношення є оптимальним. Якщо препарат складається з декількох антигенів, то утворюється декілька ліній.

Імунологічну спорідненість між двома антигенами можна оцінити, якщо провести реакцію преципітації в сусідніх лунках. Лінії, які утворюються кожним антигеном, можуть повністю зливатись – це вказує на їхню імунологічну ідентичність, або зливатись частково, утворюючи так звану “шпору” – свідчить про часткову спорідненість антигенів. Якщо ж лінії перетинаються, антигени не є спорідненими. Слід підкреслити, що навіть повністю злиті лінії свідчать лише про імунологічну ідентичність для певної сироватки, а не про ідентичність самих молекул антигенів (рис.10.4).

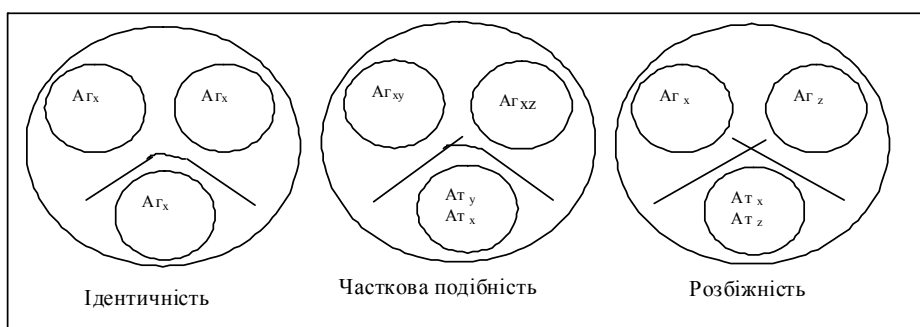


Рис. 10.4. Схема подвійної дифузії за Ухтерлоні (за А.Рост)

Там, де реагенти є в збалансованому співвідношенні, випуклість утвореної лінії преципітації буде спрямована в бік того реагента (АГ чи АТ), чия молекулярна маса менша. Це є наслідком меншої швидкості дифузії, яку мають молекули з більшим розміром.

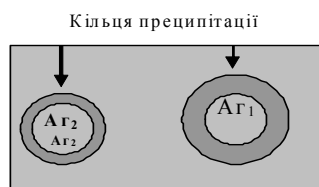


Рис.10.5. Схема простої радіальної імунодифузії за Манчіні (за А.Рост)

Чутливість методу преципітації в гелі можна підвищити, якщо в агар додати антисироватку (агар може містити до 90% сироватки), при цьому в гель дифундує тільки антиген. Цей метод отримав назву **простої радіальної імунодифузії** за Манчіні і використовується для кількісного визначення антигена (рис. 10.5), де за діаметром утвореної лінії преципітації можна вирахувати кількість досліджуваного білка. Чутливість реакцій досягає 50-100 мг/мл.

Імунофлуоресцентний аналіз (ІФ). Імунофлуоресцентний аналіз, або метод флуоресціюючих антитіл, запропонував А. Кунс на початку 40-х років ХХ ст. Флуоресціюючі антитіла – це гаммаглобуліни, виділені з імунних сироваток, мічені (кон’юговані) флюорохромами. Для мітки застосовують різні речовини: ізотіоціанат флюоресцеїну (ФІТЦ), 1-диметил-амінонафталін-5-сульфохлорид, ізотіоціанат родамін В тощо.

Особливість цього методу полягає в тому, що імунний комплекс (антиген+антитіло) стає видимим у люмінесцентному мікроскопі внаслідок ковалентного зв'язку антитіла з флюоресціюючим барвником. При цьому антитіла зберігають свою основну властивість – специфічність, а флюорохром – здатність до випромінювання світла (рис. 10.6).

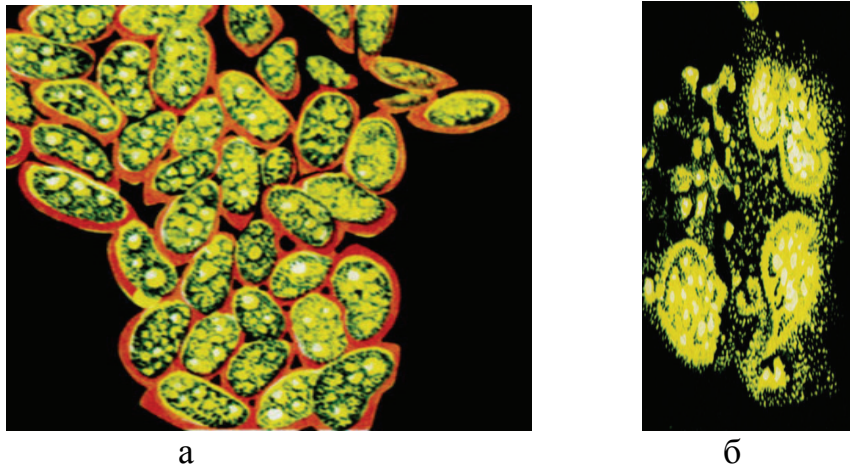


Рис.10.6. Зображення інфікованих аденовірусом клітин, оброблених антитілами, мічених акридиновим оранжевим (а) та ФІТЦ (б)

Розроблені декілька варіантів реакції імунофлюоресценції: прямий, непрямий, сендвіч-метод, модифікація непрямого методу з використанням комплементу та інші (рис. 10.7).

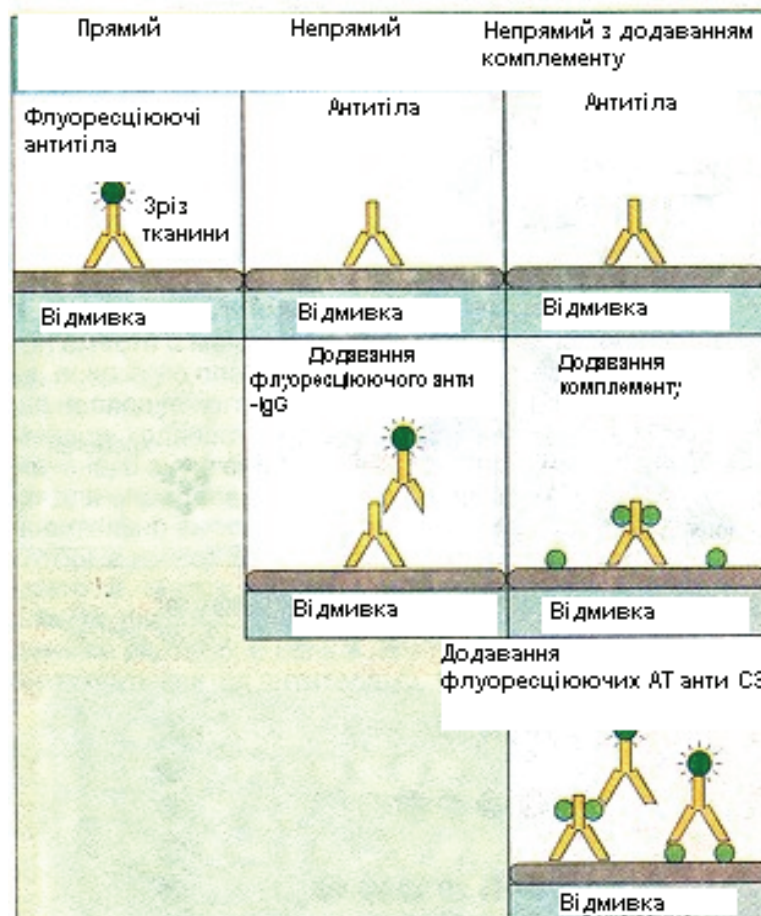


Рис. 10.7. Порівняння різних модифікацій імунофлюоресцентного аналізу

Прямий метод – виявлення флюоресціюючими антитілами антигенів (мають вигляд гістологічних зрізів, фіксованих на склі препаратів культур тканин, мазків-відбитків з патологічних матеріалів) полягає в нанесенні імунної флюоресціюючої сироватки безпосередньо на антиген, після певного часу контакту та неодноразового відмиванням буферним розчином, препарати продивляються під люмінесцентним мікроскопом. Цей метод не зовсім зручний, тому що скільки антигенів, стільки ж потрібно флюоресціюючих сироваток.

Непрямий метод – на препарат з антигеном спочатку наноситься імунна нефлюоресціююча сироватка, антитіла якої зв'язуються з антигенами препарату. Преципітовані на антигенах антитіла виявляють шляхом додаткової обробки препарату флюоресціюючою антивидовою сироваткою, яка є імунною до γ -глобуліну сироватки того виду тварини, від якої була отримана імунна сироватка для первинної обробки препарату.

У наш час імунофлюоресцентний метод широко застосовується у вірусології для експрес-діагностики вірусних інфекцій (зрізи та відбитки тканин, мазки слизових), ідентифікації збудників, у вивченні захворювань невідомої етіології, з'ясуванні особливостей взаємодії вірусу з клітиною та ін. В імунології ІФ використовують для оцінки В-клітинної системи імунітету, тобто наявності у В-лімфоцитів рецепторів до Fc-фрагменту імуноглобулінів, проведення диференційованого підрахунку клітин, що несуть IgM, IgG, IgA–детермінанти тощо. Також ІФ застосовується в отриманні моноклональних антитіл з метою оцінки їхньої специфічності.

Імуноферментний аналіз (ІФА). Початком використання імуноферментних методик у вірусологічних дослідженнях вважають появу перших повідомлень про можливість приєднання ферментів до білків, в тому числі і до імуноглобулінів. В основі цього методу лежать принципи, застосовувані раніше у радіоімунному аналізі (RIA), де використовували радіоактивні мітки. В ІФА замість радіоактивної використовують ферментну мітку.

Зусилля дослідників сконцентрувались на розробці методів кількісного імунохімічного аналізу, оснований на використанні антигенів та антитіл, мічених ферментами. На початку 1970-х років був запропонований метод, який поєднує ферментативний та імунохімічний підходи, що привело до створення імуноферментного аналізу (ІФА), в якому антитіло виступає як специфічний детектор речовини, що визначається, а фермент – як маркер імунохімічної реакції, за допомогою якого візуалізується утворення комплексів.

Основним напрямом застосування ІФА є рання діагностика інфекційних, онкологічних захворювань, проведення масових епідеміологічних обстежень, контроль якості продукції та дотримання санітарних норм на підприємствах медичної, мікробіологічної та харчової промисловості. За допомогою цього методу верифікують вірусні гепатити, визначають характер перебігу таких захворювань, як ВІЛ-інфекція, токсоплазмоз, герпетична інфекція, цитомегалія, хламідіоз, мікоплазмоз.

За допомогою ІФА виявляють імунні комплекси та диференціюють класи, підкласи імуноглобулінів, використовуючи ізотипоспецифічні реагенти. На цьому підході базується діагностично значуще виявлення антиген-специфічних

антитіл певних класів (IgM при вірусних захворюваннях, IgE при гіперчутливості негайного типу та інші).

Імуноферментний аналіз може бути якісним (показує наявність або відсутність антигенів чи антитіл) і кількісним (визначення кількості антигенів або антитіл).

Перевагою ІФА є простота та експресність аналізу, можливість автоматизації процесу, висока специфічність і чутливість (10^{-10} – 10^{-12} г/мл), можливість візуальної оцінки та інші.

Методи ІФА поділяють на дві великі групи: твердофазний і гомогенний аналіз. У світовій літературі перший скорочено позначають “ELISA” (від англ. *enzyme-linked immunosorbent assay*). Гомогенні методи аналізу (“ЕМІ”, *enzyme multiply immunotechnic*) були розроблені для визначення низькомолекулярних сполук – гаптенів, гормонів, фізіологічно активних сполук. Суть цих методів полягає в тому, що гаптен пришивається ковалентно поблизу активного центру ферменту так, що після його взаємодії з антитілом молекула ферменту втрачає свою каталітичну активність. Додавання в цю систему вільного гаптену приводить до пропорційного збільшення активності ферменту внаслідок витіснення антитіл з комплексу. Як ферменти в таких системах використовують лізоцим, малатдегідрогеназу та ін. Це високочутливий тест, який дає змогу виявляти білки, що містяться в кількості декількох нанограм в 1 мл.

Широко ввійшов у практику ІФА – метод фізичної адсорбції антигенів та антитіл на поверхні мікроплат із непористого полістиролу.

Тверда фаза. Як тверду фазу в ІФА використовують лунки мікропланшет, пробірки, кульки з різних синтетичних матеріалів, гранули целюлози, сефарози, нітроцелюлозні фільтри. Перший компонент ІФА неспецифічно зв'язується з носієм внаслідок або фізичної адсорбції, або ковалентного зв'язування молекул білка (антигенів, антитіл) з твердою фазою. Для ковалентного зв'язування використовують сефадекс, сефарозу, магнітні поліакриламідні намистини та ін. Для фізичної адсорбції антигена або антитіла з поверхнею пробірок або мікроплат з непористих полімерів (полістиролу, полівінілхлориду, акрилексу та ін.) необхідний контакт протягом декількох годин. Зв'язок білків з матрицею в цьому випадку здійснюється переважно за рахунок гідрофобних та електростатичних взаємодій, цей зв'язок більш лабільний ніж ковалентний. Ефективність сорбції залежить від багатьох факторів: якості полімеру, рН буферу, температури, тривалості інкубації; вона також пов'язана з природою білкових молекул.

Антигени. Антигени використовують у вигляді природних цільно-віріонних препаратів, клінічних проб, інфекційного соку рослин, окремих структурних білків, культури клітин, інфікованих вірусом. Застосовуються пептиди синтезовані хімічним шляхом, а також отримані мікробіологічним синтезом вірусспецифічні білки. Неочищені антигени можна використовувати лише тоді, коли їх вносять до лунок, сенсibiliзованих противірусними антитілами. Чим чистіший препарат, тим вища специфічність та чутливість ІФА.

Антитіла. Антитіла в ІФА використовують у вигляді високоактивних гіперімумних поліклональних сироваток, асцитних імунних рідин, моноспецифічних сироваток, моноклональних антитіл та ін. Для сорбції на твердій фазі

найчастіше використовують імуноглобулінову фракцію сироватки крові, а також Fab – фрагменти антитіл.

Ферменти. Один з основних біологічних феноменів, на якому базується ІФА, – висока каталітична активність ферментів, які використовуються в ІФА як індикатори. До ферментів, що застосовуються для мічення, висувається ряд загальних вимог. Ці ферменти повинні:

а) мати значну питому каталітичну активність, що дає змогу виявляти ферментативну мітку в низьких концентраціях;

б) бути доступними у достатньо очищеній формі та зберігати високу ферментативну активність після хімічної модифікації при отриманні кон'югату з антитілами або антигенами;

в) бути стабільними за оптимальних умов взаємодії антигена з антитілом;

г) кількісно визначатися за допомогою простих і чутливих методів.

Як ферменти в ІФА використовують пероксидазу хрому, лужну фосфатазу, β -галактозидазу, каталазу, цитохром С, кислу фосфатазу та інші. Вибір ферментів залежить від багатьох факторів: питомої активності, доступності, наявності методів визначення ферментативної активності та інструментів для визначення оптичної густини хромогену тощо. Активність ферменту визначається за допомогою відповідного субстрату за зміною інтенсивності кольору забарвлення інструментально, наприклад, на спектрофотометрі за оптичним поглинанням або візуально.

Оскільки фермент взаємодіє з субстратом специфічно, вибір субстрату та хромогену залежить від ферменту-мітки.

Основні вимоги до субстрату – забезпечення чутливості методу при виявленні ферменту, що входить до складу кон'югату; використаний хромоген має формувати яскраво забарвлені продукти реакції фермент-субстрат. Проявник (суміш субстрату з хромогеном) у роботі на планшетах має давати повністю розчинні продукти з високим коефіцієнтом поглинання (екстинкції), тобто високу інтенсивність забарвлення на одиницю використаного субстрату.

Субстратом для пероксидази слугує перекис водню. Фермент містить легкоокислювані перйодатом вуглеводні залишки, через які фермент пришивається до антитіл (або антигенів).

Реєструвати активність ферменту в аналізі можна фотометричним, флуориметричним (індикаторна система – п-оксифенілпропіонова кислота), хемілюмінесцентним (індикаторна система – H_2O_2 , люмінол, п-йодфенол) та електрохімічним методом. При кількісному фотометричному визначенні продукту, який утворюється під дією пероксидази, до складу проявника вносять речовини (хромогени), що утворюють кольорові сполуки під впливом атомарного кисню, вивільненого ферментом з перекису водню. Серед таких речовин слід назвати ортофенілендіамін (ОФД), тетраметилбензидин (ТМБ), діамонійну сіль цієї сполуки та інші. Продукт окислення ОФД максимально поглинає світло при 435 нм. Але при додаванні в реакційну суміш сірчаної кислоти для зупинки реакції максимум спектру поглинання зсувається на 50 нм в довгохвильову область, тому реєстрацію ОГ проводять при 492 нм.

Аналіз проводиться за 4 основних етапи:

1) фізична сорбція досліджуваного матеріалу (антитіл або антигена);

2) імунологічна реакція: внесення для специфічної реакції комплексу кон'югат-фермент, (для антигену - антитіла) в ті ж лунки;

3) ензиматична реакція: внесення субстрату на фермент, що сприяє появі забарвленого комплексу; інтенсивність забарвлення пропорційна кількості антигену (або антитіла) в лунках;

4) вирахування результатів за допомогою приладів – абсорбціометрів, які дають можливість вимірювати оптичну густину продукту ферментативної реакції безпосередньо в лунках імунологічного планшета.

Існує декілька модифікацій імуоферментного аналізу: прямий ІФА; непрямий ІФА; сендвіч-метод, послідовний або неконкурентний та конкурентний аналіз(рис.10.8-10.10).

Прямий метод. При прямому варіанті ІФА лунки мікроплат покривають тестуючим антигеном, інкубують, потім надлишок антигена видаляють і додають вірусспецифічні антитіла, кон'юговані ферментом (пероксидазою хрому). Після інкубації надлишок кон'югату видаляють і додають субстрат (хромоген H_2O_2 , 5-аміносаліцилову кислоту). Інтенсивність забарвлення пропорційна кількості антигена. Метод потребує мінімальної кількості операцій, незначної витрати реагентів і легко може бути автоматизований

Непрямий метод. При непрямому варіанті імунний комплекс АГ-АТ, іммобілізований на твердому носії інкубують з антивидовими антитілами – антитіла, одержані до імуноглобулінів, які мають ферментну мітку АТ₂-Ф. Головна перевага методу – простота підготовки реагентів. Виключається складна процедура підготовки сироватки – очищення, виділення IgG і зв'язування їх із ферментом; можливе використання неочищеного вірусного препарату.

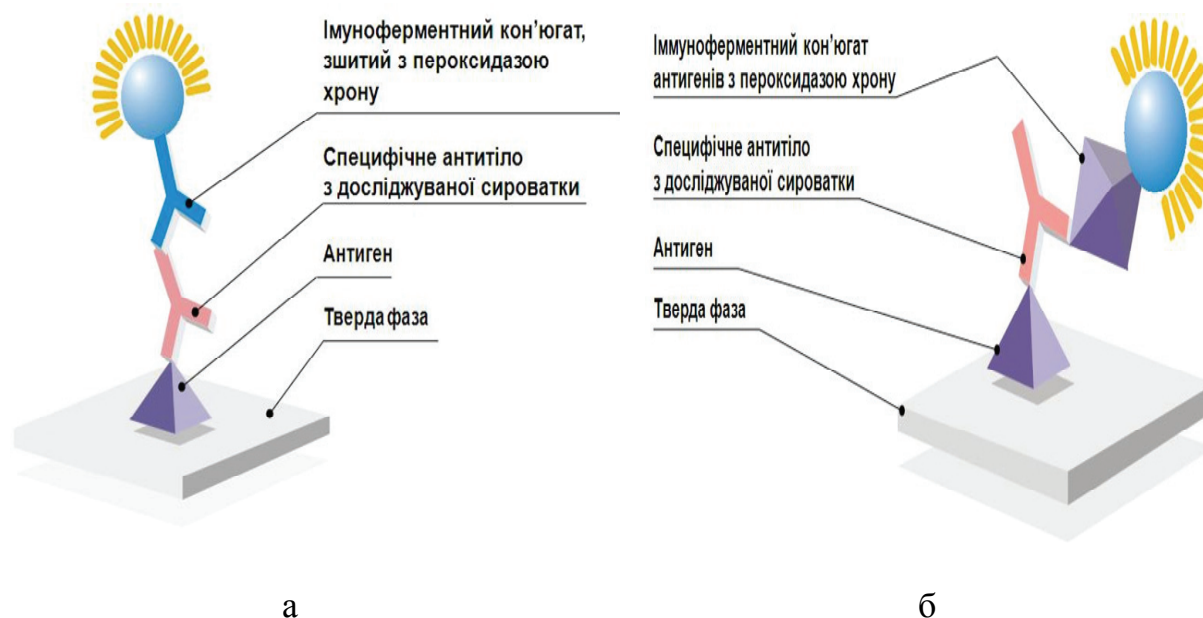


Рис. 10.8. Варіанти непрямого ІФА: аналіз досліджуваного АГ (а) та досліджуваного АТ (б)

Сандвіч–ІФА. Найбільшого розповсюдження сьогодні набув сандвіч-ІФА. Відомо два варіанти методу: прямий і непрямий. У прямому варіанті або double antibody sandwich (DAS) – подвійних антитіл сандвіч – досліджуваний антиген спочатку реагує з надлишком антитіл твердої фази, потім зв'язаний антиген виявляється за допомогою надлишку другого антитіла, міченого ферментом. У непрямому варіанті, або triple antibody sandwich (TAS) – потрійних антитіл сандвіч – досліджуваний антиген реагує з надлишком антитіл твердої фази, потім з другим антитілом проти антигена. Ці антитіла отримують на тваринах іншого біологічного виду. З другим антитілом, яке приєдналося до антигена, реагує мічене анти – Ig – антитіло.

Для усунення неспецифічних реакцій як перше антитіло слід використовувати (Fab)₂-фрагменти для того, щоб усунути більшість епітопів імуноглобуліну, які могли б реагувати з третім міченим антитілом.

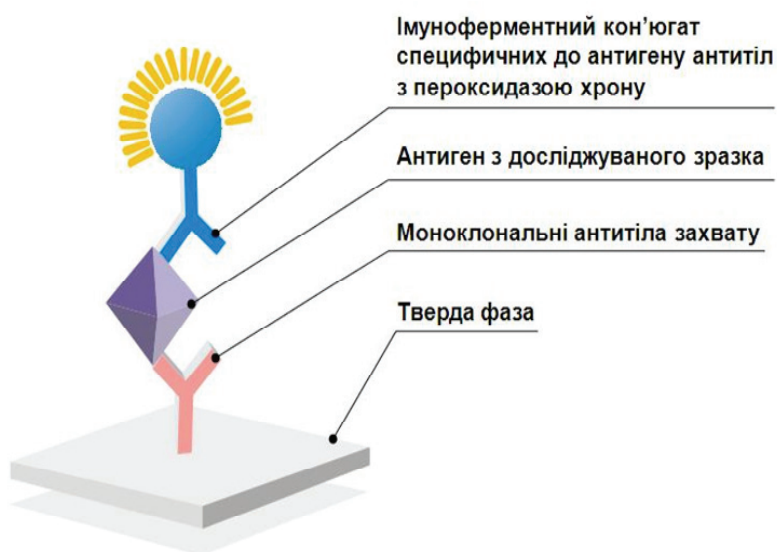


Рис. 10.9. Сандвіч варіант ІФА

Крім того, серед методів ІФА можна виділити два типи – це так званий послідовний, або неконкурентний, та конкурентний аналіз.

При конкурентному гетерогенному аналізі наявні в реакційному середовищі зв'язані і не зв'язані з ферментом антигени одночасно вступають у конкурентну взаємодію з іммобілізованими на твердому носії моноклональними антитілами. Для інкубації надлишок незв'язаних компонентів відмивають, і в систему додають відповідний субстрат.

Одна з важливих переваг ІФА – висока чутливість, яка досягається, як правило, за рахунок ферментного кон'югату, збільшення періоду інкубації, особливо на стадії ферментативної реакції, і здійснення такої послідовності етапів, коли антиген зв'язується з іммобілізованими на носії антитілами, а потім взаємодіє з доданими на останній стадії кон'югованими антитілами. Слід відзначити, що збільшення часу інкубації далеко не завжди приводить до підвищення чутливості реакції. В кожному випадку необхідно перевіряти, чи відбувається при більш довготривалій інкубації подальший розвиток

забарвлення, чи він послаблюється, особливо у разі проведення реакції при підвищенній температурі.

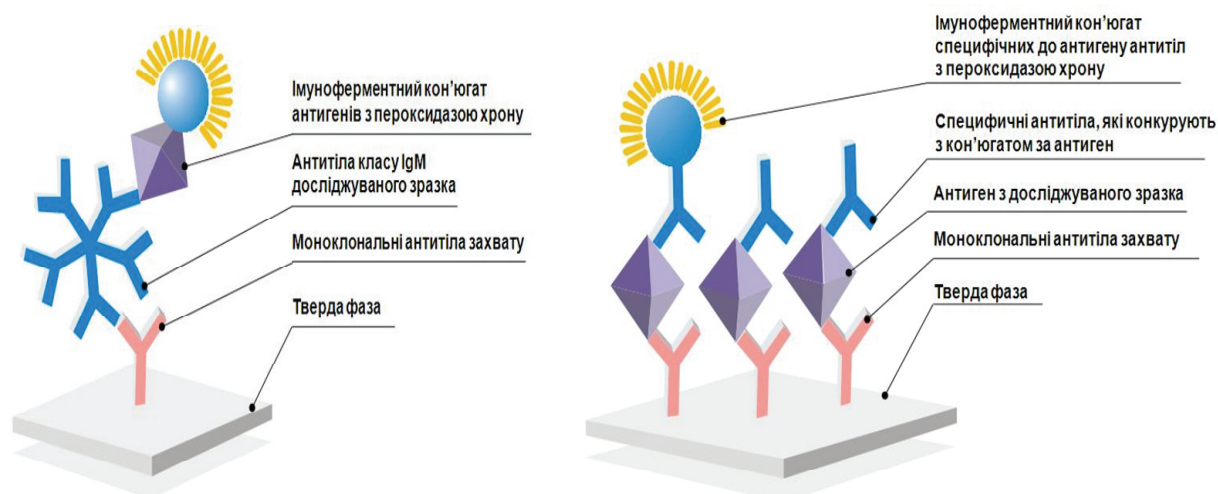


Рис. 10.10. Варіанти конкурентного ІФА

Чутливість імуноаналізу залежить від констант зв'язування специфічних антитіл: чим більша константа зв'язування, тим чутливіша система. За чутливість методу ІФА приймається та концентрація антигена (або розведення екстракту рослин, що аналізується), при якому величина оптичної густини продукту ферментативної реакції на 0,2 оптичні одиниці перевищує величину оптичної густини в контрольних лунках.

Переваги

- висока чутливість (дає можливість виявити концентрації до 0,05 нг/мл) і специфічність
- відтворюваність результатів
- простота виконання
- доступність та стабільність реагентів
- гнучкість і можливість модифікації конструкцій
- експресивність і можливість автоматизації для проведення масових аналізів
- дає змогу проводити ранню діагностику (завдяки можливості визначення класів імуноглобулінів при аналізі)
- дає змогу відстежувати динаміку інфекційного процесу (завдяки можливості визначення класів імуноглобулінів).

Недоліки

Іноді імуноферментний аналіз дає хибно позитивні або помилково негативні результати.

Практична робота

Непрямий імуноферментний аналіз

Завдання: опанувати методику постановки непрямого імуноферментного аналізу для ідентифікації вірусів рослин.

Матеріальне забезпечення: рослинний матеріал – здорові рослини тютюну *Nicotiana tabacum* сорт Імунний 580, рослини тютюну *Nicotiana tabacum* із симптомами ВТМ, специфічна сироватка до ВТМ, антивидові (антикролячі) антитіла, мічені ферментом лужна фосфатаза, блокуючий буфер - 3% розчин БСА на карбонатному буфері рН 9,6, буфер для відмивки, фосфатний буфер рН 7,4, Tween 20, субстрат Sigma 104, субстратний буфер, рН 9,8, 2М NaOH, 96-лункові полістеролові планшети, самплери, маркери.

Хід роботи:

1. Приготувати антиген шляхом гомогенізації рослин, уражених ВТМ, та здорових рослин (негативний контроль) з карбонатним буфером рН 9,6, у співвідношенні 1:10 (m/v).

2. Провести низькошвидкісне центрифугування в режимі 3 000 об/хв протягом 20 хв; відібрати надосад.

3. Внести в лунки рослинний матеріал по 100 мкл/лунку.

4. Інкубація протягом ночі при 4⁰С.

5. 3-кратна відмивка фосфатним буферним розчином рН 7,4 з додаванням 0,2% Tween 20 протягом 5 хв.

6. Внести по 100 мкл/лунку блокуючий буфер із 3% БСА для блокування вільних від антигена ділянок лунки, інкубація протягом 2 год при 37⁰С.

7. Відмивка від буферу так, як описано вище.

8. Додавання специфічних антитіл у робочому розведенні в 1% розчині БСА з додаванням 0,05% Tween 20.

9. Інкубація в термостаті протягом 1,5 год при 37⁰С.

10. Відмивка так, як описано вище.

11. Додавання антикролячих антитіл, мічених лужною фосфатазою у робочому розведенні в 1% розчині БСА з додаванням 0,05% Tween 20.

12. Інкубація в термостаті протягом 1,5 год при 37⁰С.

13. Відмивка 2 рази фосфатним буферним розчином рН 7,4 з додаванням 0,2% Tween 20 протягом 5 хв та один раз фосфатним буферним розчином рН 7,4 без детергенту протягом 5 хв.

14. Внесення субстрату Sigma 104 на субстратному буфері (1 мкл/мл) по 100 мкл в лунку. Розвиток реакції та забарвлення триває до 1 год.

15. Зупинка реакції 2М NaOH.

16. Фіксація результатів за допомогою рідера для ІФА при довжині хвилі 405 нм або візуально.

Контрольні завдання:

1. Порівнюючи оптичне поглинання досліджуваних зразків з поглинанням негативного контролю, визначити наявність антигенів ВТМ у досліджуваних рослин.
2. Порівняти показники результатів позитивного та негативного контролів.
3. Записати результати та написати висновки.

Контрольні запитання:

1. Що означає комплементарна взаємодія АГ та АТ?
2. Назвіть базові засади лабораторної діагностики вірусних інфекцій.
3. Що таке парні сироватки і з якою метою їх досліджують.
4. Дайте порівняльну характеристику імунофлюоресцентного та імуноферментного аналізу.
5. Порівняльна характеристика прямого та непрямого варіанту ІФА.
6. Що таке антивидові антитіла і з якою метою вони застосовуються?
7. Чи можливе кількісне визначення антигена за допомогою ІФА?
8. Які ферменти використовують в ІФА та які до них висувають вимоги?
9. Порівняти ефекти аглютинації, преципітації та лізису.
10. З якою метою застосовують реакцію Ухтерлоні?

Література:

1. Антитела. Методы: Кн. 1: Пер. с англ. /Под ред. Д. Кэтти. – М.: Мир, 1991. – 287 с.
2. Антитела. Методы: Кн. 2: Пер. с англ. /Под ред. Д. Кэтти. – М.: Мир, 1991. – 384 с.
3. Гиббс А., Харрисон Б. Основы вирусологии растений. - М.: Мир, 1978. – 429 с.
4. Гнутова Р.В. Иммунологические исследования в фитовирусологии. – М: Наука, 1985. – 183с.
5. Гнутова Р.В. Серология и иммунохимия вирусов растений. – М: Наука, 1993. – 301 с.
6. Гнутова Р.В. Вирусология с основами иммунохимии. – Владивосток: Дальнаука, 1999. – 163с.
7. Иммунологическая диагностика вирусных инфекций. /Под ред. Т.В. Перадзе, П. Халомена. – М. – 1985.
8. Имуноферментный анализ. /Под ред. Т.Нго, Г. Ленхоффа. М.: Мир, 1988.
9. Меклер Л.Б. Методы вирусологии и молекулярной биологии. – М.: Мир, 1972. – 444 с.
10. Метьюз Р. Вирусы растений. – М.: Мир, 1973. – 600 с.
11. Практикум із загальної вірусології. /За ред. А.Л. Бойка. – К.: Видавничий центр «Київський університет», 2000. – 269 с.
12. Практичний посібник з імуноферментного аналізу. – Іванська Н.В., Кислих О.М., Максименко О.В. – К., 2005. – с.63

13. Ройт А., Бростофф Дж., Мейл Д. Иммунология. – М.: Мир, 2000. – 582 с.
14. Троценко Н.И., Белоусова Р.В., Преображенская Э.А. Практикум по ветеринарной вирусологии. – М.: Колос, 2000. – 272 с.
15. Bernard R. Glick and Jack J. Pasternak. Molecular Biotechnology: principles and applications of recombinant DNA. – 1998. - ASM Press, Washington. – 683 p.
16. Flint S. J., Enquist L.W., Krug R.M., Racaniello V.R., Skalka A.M. Principles of Virology: Molecular biology, Pathogenesis, and Control. – 2000. – ASM Press, Washington. – 804 p.

Тема 11. МОЛЕКУЛЯРНІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ ВІРУСІВ

Один із пріоритетних напрямів сучасної лабораторної діагностики – це молекулярна діагностика. Її перевагами є універсальність, можливість використовувати для аналізу як загальну ДНК та РНК з клітин, так і клітинні тканинні зрізи, а також висока специфічність аналізу, його точність. Головне завдання молекулярної клінічної діагностики полягає в тому, щоб якомога точніше встановити причини захворювання і механізми його розвитку.

Молекулярна клінічна діагностика в тому сенсі, який ми вкладаємо в це поняття зараз, стала по-справжньому розвиватися тільки від початку 70-х років минулого століття. Цьому сприяли дві великих наукових події, що сталися в 1975 р.: відкриття моноклональних антитіл і розробка методу гібридизації на фільтрах. Перше відкриття дало можливість отримувати у великих кількостях антитіла, які взаємодіють з певними епітопами (антигенними детермінантами). Друге мало не менш важливі наслідки, оскільки наявні до того методи електрофоретичного розділення нуклеїнових кислот не були достатньо чутливими – замість чіткої смуги в гелі виявлялася розмита пляма. Склад цієї плями не вдавалося визначити доти, поки Саузерн не запропонував метод перенесення ДНК після електрофорезу з гелю на фільтри з подальшою гібридизацією іммобілізованих молекул зі специфічними ізотопно-міченими зондами, які зв'язуються тільки з певними молекулами ДНК. Потім були розроблені методи Норзерн- і Вестерн-блотингу, що дають змогу виявляти індивідуальні РНК і білки відповідно за тим же принципом. Дещо пізніше відразу дві групи вчених описали методи визначення первинної структури нуклеїнових кислот, і нарешті, ще однією важливою подією в молекулярній біології та її використанні в молекулярній клінічній діагностиці стало відкриття в 1983 р. полімеразної ланцюгової реакції. Це досягнення разом з усіма попередніми повністю змінило суть молекулярної клінічної діагностики. Молекулярні діагностичні дослідження можна проводити або на інтактних специфічних клітинах, або на тканинних і клітинних екстрактах.

Застосування молекулярних методів незамінне в разі: 1) негативних результатів діагностики класичними методами; 2) використання для діагностики зразків, узятих після антивірусної терапії або на пізніх стадіях хвороби; 3) необхідності отримання термінового діагностичного результату; 4) діагностики інфекцій, викликаних вірусами, які вбудовуються в геном, або мають низьку концентрацію в організмі.

До класичних методів молекулярної діагностики можна віднести різноманітні гібридизаційні методи, рестрикційний аналіз, аналіз поліморфізму довжини рестрикційних фрагментів, так званий ПДРФ-аналіз (Restriction Fragment Length Polymorphism – RFLP analysis) та метод ДНК-зондів. Сучасні молекулярні методи базуються на полімеразній ланцюговій реакції.

Рестрикційний аналіз

Метод заснований на застосуванні ферментів, що мають назву *рестриктаз*. Рестриктази – це ендонуклеази, які розщеплюють молекули ДНК, розриваючи фосфатні зв'язки не в довільних місцях, а в певних послідовностях нуклеотидів. Особливе значення для методів молекулярної генетики мають рестриктази, які розпізнають послідовності, що мають центральну симетрію і зчитуються однаково в обидві сторони від осі симетрії. Точка розриву ДНК може або збігатися з віссю симетрії, або бути зсунута відносно неї.

Натепер з різних бактерій виділено та очищено більш як 180 різних рестриктаз, для яких відомі сайти (ділянки) впізнавання (рестрикції). Виявлено понад 80 різних типів сайтів, у яких може відбуватися розрив подвійної спіралі ДНК.

У геномі конкретної таксономічної одиниці є певне (генетично детерміноване) число ділянок впізнавання для певної рестриктази.

Якщо виділену з конкретного вірусу чи мікроорганізму ДНК обробити певною рестриктазою, то це приведе до утворення певної кількості фрагментів ДНК фіксованого розміру.

Розмір кожного типу фрагментів можна визначити за допомогою електрофорезу в агарозному гелі: дрібні фрагменти переміщуються в гелі швидше, ніж більші фрагменти, і довжина їхнього пробігу більша. Гель забарвлюють бромистим етидієм і фотографують в УФ-випромінюванні. Таким чином, можна отримати рестрикційну карту певного виду мікроорганізму.

Зіставляючи карти рестрикції ДНК, виділених з різних штамів, можна визначити їхню генетичну спорідненість, виявити належність до певного виду або роду, а також виявити ділянки, які піддалися на мутації.

Цей метод використовується також як початковий етап методу визначення нуклеотидних послідовностей (сиквенування) і методів молекулярної гібридизації.

Аналіз поліморфізму довжини рестрикційних фрагментів (Restriction Fragment Length Polymorphism) – ПДРФ (RFLP) аналіз. Як було вже сказано вище, наявність сайтів рестрикції в геномній ДНК різних організмів і їхнє взаємне розташування однозначно визначаються послідовністю нуклеотидів досліджуваної ДНК, оскільки сам сайт рестрикції – не що інше, як строго певна послідовність нуклеотидів ДНК, яка впізнається і розщеплюється рестриктазами. Отже, будь яка мутація, яка змінює послідовність нуклеотидів сайту рестрикції, знищує цей сайт. Повне розщеплення аналізованої геномної ДНК окремими рестриктазами приводить до утворення певного набору фрагментів ДНК, число і розміри яких відповідають розташуванню сайтів рестрикції. Гібридизація за Саузерном дає можливість визначати розміри і взаємне розташування рестрикційних фрагментів ДНК після їхнього електрофоретичного розділення. Мутаційна мінливість у сайтах рестрикції може бути легко виявлена за зміною довжини рестрикційних фрагментів ДНК, яка гібридизується зі специфічними ДНК-зондами. За наявності мутації в одному з сайтів рестрикції цей сайт залишається нерозщепленим після завершення рестрикції, що приводить до злиття сусідніх рестрикційних фрагментів ДНК,

які розділялися мутантним сайтом, і утворення фрагмента ДНК більшого розміру. У результаті довжина рестрикційних фрагментів ДНК, що містять мутантні сайти, стає поліморфною. Це виявляють, порівнюючи ДНК з різних джерел за методом ПДРФ.

Аналіз поліморфізму довжини рестрикційних фрагментів, так званий ПДРФ-аналіз (Restriction Fragment Length Polymorphism – RFL Panalysis) включає такі етапи: виділення геномної ДНК, її рестрикцію специфічною ендонуклеазою, електрофоретичне розділення утворених фрагментів ДНК та ідентифікацію фрагментів ДНК, що містять поліморфний сайт рестрикції, шляхом блот-гібридизації за Саузерном.

За відсутності рестрикції в поліморфному сайті на електрофореграмах або радіоавтографах (залежно від типу мічення ДНК-зонда) буде виявлятися один великий фрагмент, який за довжиною відповідатиме послідовності ДНК між двома сусідніми константними сайтами рестрикції для тієї самої ендонуклеази. За наявності рестрикції в поліморфному локусі на електрофореграмі можна буде виявити менший за розмірами фрагмент, що дорівнює відстані між поліморфним сайтом рестрикції і одним з найближчих константних сайтів рестрикції.

З яким саме з двох фрагментів, прилеглих до поліморфного локусу, відбуватиметься гібридизація, залежить від локалізації ДНК-зонда, який використовують для аналізу. В окремому випадку можлива гібридизація одночасно з двома сусідніми рестрикційними фрагментами, якщо обраний ДНК-зонд комплементарний послідовності, що містить поліморфний сайт рестрикції. Однак такі зонди дуже рідко використовують на практиці, оскільки довжина рестрикційних фрагментів зазвичай у десятки разів більша ніж довжина ДНК-зондів, і далеко не завжди вдається виділити і клонувати фрагмент ДНК, що містить поліморфний сайт рестрикції. Найчастіше за відсутності рестрикції в поліморфному сайті ДНК-зонд гібридизується з одним довгим фрагментом, а за наявності рестрикції гібридизуючого фрагмента має меншу довжину.

ПДРФ-аналіз може бути значно спрощений за умови, що можлива специфічна ампліфікація ділянки ДНК, яка містить поліморфний сайт рестрикції. Тестування стану цього локусу можливе шляхом проведення ПЛР і рестрикції ампліфікованого фрагмента. За відсутності сайту впізнавання в досліджуваній ділянці ДНК розміри ампліфікованого фрагмента не зміняться після його обробки відповідною ендонуклеазою, тоді як при повній відповідності поліморфної ділянки сайту рестрикції утворюються два фрагменти меншої довжини.

Метод ПДРФ широко використовується в генетичних дослідженнях популяцій, оскільки наявність рестрикційного фрагмента ДНК певної довжини в геномі досліджуваного організму є прекрасним генетичним маркером і одночасно фенотиповою ознакою, тісно пов'язаною з генотипом організму. Це дає змогу стежити за поширенням такого маркера в популяціях, за передачею його від батьків до потомства і використовувати для побудови генетичних карт досліджуваних організмів класичні генетичні методи. ПДРФ-маркери завдяки їхній чіткій належності до певних генетичних локусів не поступаються за

інформативністю поширеним біохімічним маркерами і в багатьох випадках виявляються зручнішими, ніж складні фенотипові ознаки, що визначаються багатьма генними локусами.

Метод молекулярної гібридизації дає можливість виявити ступінь подібності різних ДНК. Застосовується при ідентифікації вірусів та мікроорганізмів для визначення їхнього точного таксономічного розташування.

Метод оснований на здатності дволанцюгової ДНК при підвищеній температурі (90°C) в лужному середовищі денатурувати, тобто розплітатися на дві нитки, а при зниженні температури на 10°C знову відновлювати вихідну дволанцюгову структуру. Метод вимагає наявності молекулярного зонда.

Зондом називається одноланцюгова молекула нуклеїнової кислоти, мічена радіоактивними елементами, з якою порівнюють (гібридизують) досліджувану ДНК.

Для проведення молекулярної гібридизації досліджувану ДНК розплітають зазначеним вище способом, одну нитку фіксують на спеціальному фільтрі, який потім поміщають у розчин, що містить радіоактивний зонд. Створюються умови, сприятливі для утворення подвійних спіралей. У разі наявності комплементарності між зондом і досліджуваною ДНК, вони утворюють між собою подвійну спіраль.

Встановлено, що при нагріванні до 100°C водневі зв'язки між комплементарними парами основ руйнуються і ДНК дисоціює на два самостійні ланцюги (рис. 11.1). Цей процес названий денатурацією ДНК («плавленням»). Витримання комплементарних ланцюгів при температурі 65°C приводить до їхнього комплементарного з'єднання і відновлення структури подвійної спіралі (гібридизація, або «відпалювання»).

Гібридизація – це здатність одиночних ланцюгів нуклеїнових кислот (ДНК, РНК) комплементарно з'єднуватися між собою з відновленням дволанцюгової структури. При цьому можуть утворюватися як комплекси ДНК-ДНК, так і комплекси ДНК-РНК. Метод гібридизації нуклеїнових кислот може бути використаний з такою метою:

- для знаходження числа певних нуклеотидних послідовностей (генів) у ДНК, з високим ступенем точності; можна виявити навіть один-єдиний ген у клітині;
- для виявлення локалізації певних видів матричної чи вірусної РНК в клітинах, що дає можливість визначати диференційну активність генів в ембріогенезі і процесі диференціювання в клітинах ембріона (популярною біологічною моделлю в таких дослідженнях є ембріони плодової мушки дрозофіли) або ж з'ясувати локалізацію інфекційного процесу при вірусній інфекції;
- для виявлення транскрибованих і нетранскрибованих послідовностей у ДНК (схожий аналіз результатів гібридизації ДНК–РНК дав змогу У. Гілберту виявити мозаїчну будову генів у еукаріот, що стало одним з найбільших відкриттів у молекулярній біології).

Аналіз проводять за такою схемою (рис. 11.1): досліджувану ДНК гідролізують рестриктазами, фракціонують електрофорезом, переносять розділені фрагменти на нітроцелюлозний фільтр і проводять реакцію гібридизації з

міченими олігонуклеотидами. Цей метод був розроблений Саузерном у 1975 році. У літературі його називають «Саузерн блотинг». «Блотинг» (англ.) означає «промокатка», «саузерн» (англ.) – «південний», тут гра слів: прізвище вченого перекладається як назва географічного напрямку.

Молекули ДНК розганяють в агарозному гелі електрофорезом. ДНК в гелі денатурують лугом. Луг нейтралізують і пластину гелю покривають листом нітроцелюлози. Зверху на нітроцелюлозу поміщають стопку аркушів фільтрувального паперу, забезпечуючи повільне протікання буферного розчину через гель в напрямку, перпендикулярному до напрямку електрофорезу. ДНК дифундує з гелю і зв'язується з нітроцелюлозним фільтром. Після прогрівання фільтра при 80°C у вакуумі ДНК незворотно зв'язується з нітроцелюлозою. Розташування смуг іммобілізованої ДНК точно відповідає їхньому розташуванню в гелі.

ДНК, зв'язану з нітроцелюлозним фільтром, можна гібридизувати з радіоактивно міченою ДНК (зондом). Блотинг за Саузерном є виключно корисним також і для локалізації досліджуваних генів у певних фрагментах, отриманих після гідролізу різними рестриктазами гібридних молекул ДНК, хромосомної ДНК, вірусної ДНК тощо.

урація 90-100С

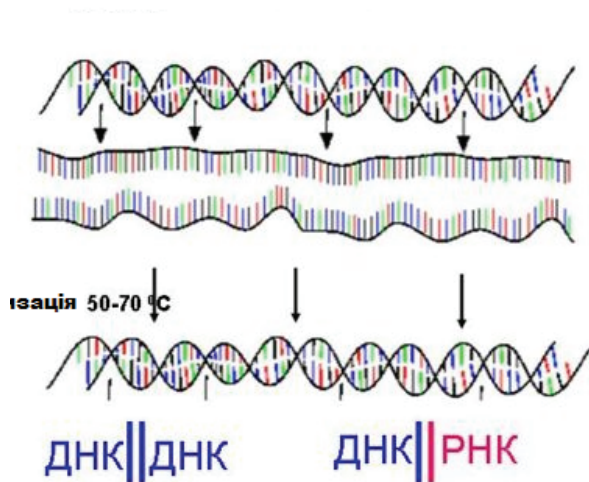


Рис.11.1. Схема блотингу ДНК за Саузерном

Аналогічним методом на нітроцелюлозу переносять молекули РНК (нозерн блотинг) і білка (вестерн блотинг). З частин світу залишилася вільною тільки західна, хоча вакантними залишилися 2 класи макромолекул – вуглеводи і ліпіди. Також розроблені модифікації гібридизації, щоб визначати локалізацію вірусних ДНК та (або) РНК в клітині – гібридизація *insitu*. Флюоресцентна гібридизація *in situ* (англ. Fluorescence *in situ* hybridization, FISH) – це цитогенетичний метод, який використовують для визначення і локалізації певної послідовності ДНК на хромосомі (рис. 11.2.).

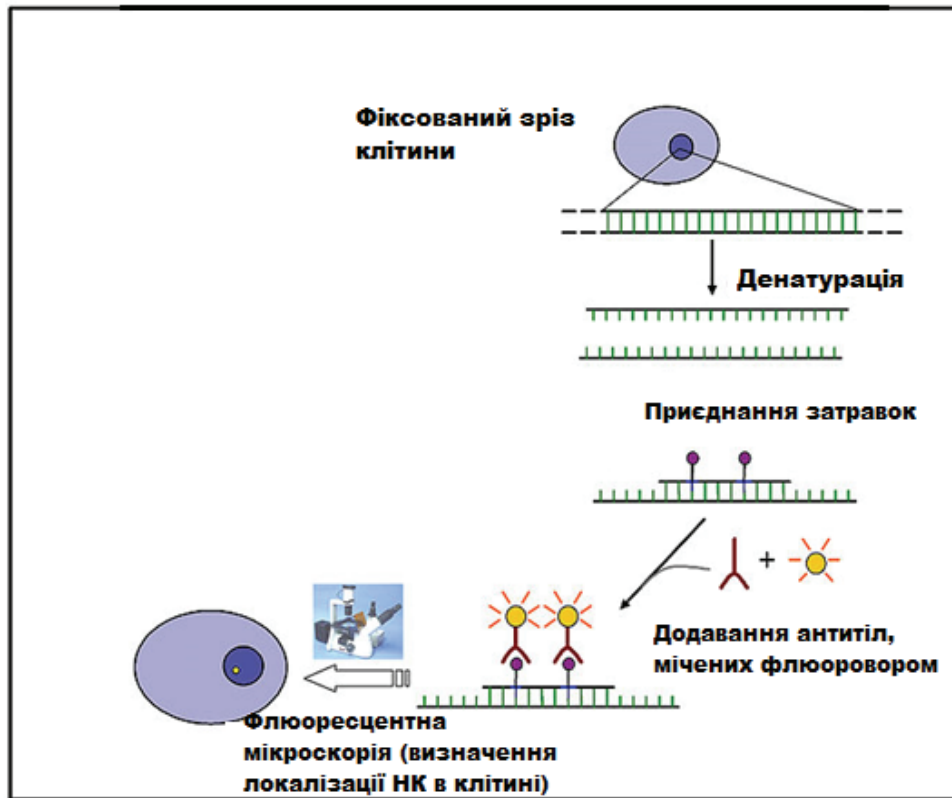


Рис. 11.2. Схема методу флюоресцентна гібридизація *in situ* (англ. Fluorescence *in situ* hybridization, FISH)

Для досягнення цієї мети використовують спеціальні гібридизаційні ДНК-зонди з флюоресцентними властивостями та комплементарні до певної ділянки ДНК. Використання FISH дає змогу визначати різноманітні хромосомні аномалії: делеції, транслокації, ампліфікації тощо.

ДНК-чіпи

Метод ДНК-чіпів (DNAmicroarray) є одним з найбільш точних і сучасних методів аналізу. Чіпи – це пластинки з іммобілізованими міченими ДНК-зондами. Кожна така платівка може містити кілька десятків тисяч зондів, розташованих у певній послідовності. Мітка виявляється тільки в спарених дволанцюгових фрагментах (рис.11.3.). Якщо в досліджуваному зразку є послідовності, комплементарні послідовностям зонда, то гібридизацію можна визначити візуально або за допомогою спеціальних приладів. Як правило, детектори з'єднані з комп'ютером, тобто процедура зчитування й обробки інформації автоматизована. Такі ДНК-чіпи можна застосовувати для комплексної діагностики інфекційних захворювань, спадкових дефектів, встановлення експресії тих чи інших генів (в цьому разі йде гібридизація з мРНК), тобто відстеження порушень обміну речовин. Вони дешеві, дуже надійні, прості в обігу і можуть багаторазово використовуватися. Недолік – дорога апаратура для детекції.

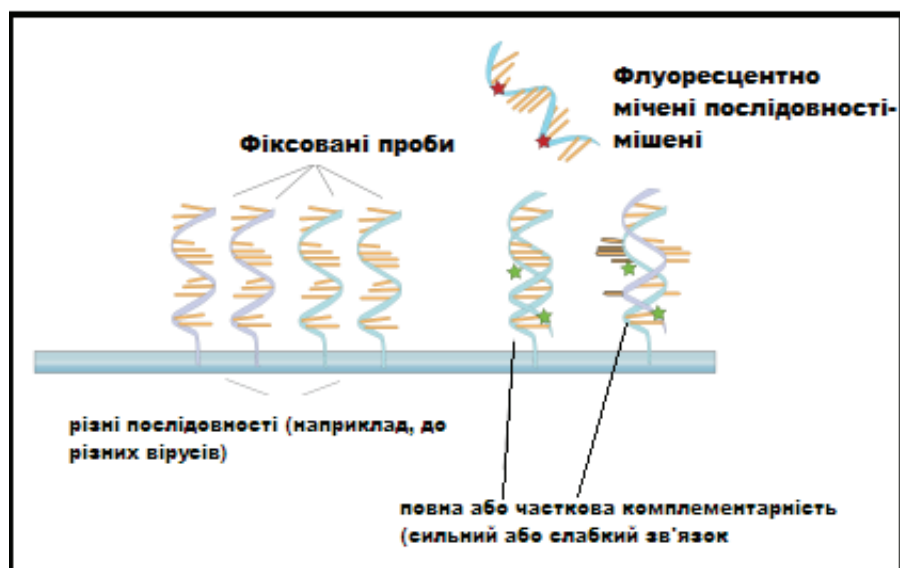


Рис.11.3. Схема гібридизації мішені з ДНК-зондом.

Однак класичні методи молекулярної детекції, перераховані вище, мають один великий недолік – чутливість (табл. 11.1). Специфічність реакції залежить від умов, використовуваних для гібридизації. Проте, чутливість цих методів не краща, ніж у інших діагностичних методів. Ці методи рідко використовують для діагностики вірусів.

Таблиця 11.1 .

Порівняння молекулярних методів детекції вірусів

	ПЛР	Блот-гібридизація за Саузерном	Гібридизація <i>in situ</i>
Чутливість	1/100 000*	1/100	10 мішеней на клітину
Специфічність	Висока	Висока	Висока
Тривалість аналізу	1 доба	1 тиждень	1 доба
Можливість клітинної локалізації	ні	ні	так

*1 копія на 100 000 клітин

Найбільш перспективним для діагностичних лабораторій, які проводять рутинні аналізи, є методи, що базуються на ПЛР.

Контрольні завдання:

1. Порівняти специфічність та чутливість класичних і новітніх молекулярних методів дослідження.
2. Визначити основні відкриття, які необхідні були для розробки молекулярно-біологічних методів детекції вірусів.
3. Обґрунтувати випадки, коли необхідно проводити детекцію вірусів одним або кількома молекулярно-біологічним методом.

Контрольні запитання:

1. З якою метою використовують молекулярну діагностику у вірусологічних дослідженнях?
2. Що можна виявити за допомогою гібридизації?
3. Температурні режими при постановці гібридизації.
4. Основні компоненти методу ДНК-зондів.
5. Теоретичне обґрунтування можливості розробки молекулярних методів детекції.
6. Модифікації методу гібридизації.
7. Переваги і недоліки гібридизаційних методів.
8. Чи можна виявити за допомогою методу ДНК-зондів пріони?
9. Переваги та недоліки використання методу ДНК-зондів.
10. Порівняння ПЛР з іншими методами детекції ДНК.

Література:

1. Анализ генома. Методы. Под ред Дейвиса К. – М. : Мир. – 1990. – С. 176-191.
2. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. – М.: Мир. – 2002. – С.181-204.
3. Churchill, GA. Fundamentals of experimental design for cDNA microarrays// *Nature Genetics*. – V.32. – 2002. – P. 490–495.
4. Molecular methods for virusdetection/ Ed. By Danny L. Wiedbrauk. – Academic Press. – 1995. – 350p.
5. Molecular biology of plant viruses/ Ed. by C.L.Mandahar. – Kluwer Academic Rublisher, USA. – 281p.

Тема 12. ЗАСТОСУВАННЯ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ ДЛЯ ІНДИКАЦІЇ ТА ІДЕНТИФІКАЦІЇ ВІРУСІВ

Одним з важливих завдань, що стоять перед сучасною вірусологічною наукою, є своєчасне виявлення та ідентифікація вірусів – збудників інфекційних захворювань. Останнім часом усе більшого розповсюдження набувають найновіші методи діагностики, які базуються на виявленні в досліджуваних клінічних та рослинних зразках специфічних послідовностей вірусного генома. Найбільшого поширення набула полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) (PCR- polymerasechainreaction).

Більш ніж за 30 років, які минули з часу відкриття ПЛР (1983 рік, Кері Мюлліс, Cetus, California) ПЛР набула застосування у всіх галузях біології, опубліковано тисячі робіт, у яких використовувалася ця реакція.

ПЛР значно полегшила роботу молекулярних біологів, вірусологів – з її допомогою можливе отримання якої завгодно кількості фрагментів специфічної ДНК.

Зараз жодне молекулярно-біологічне дослідження генів, в тому числі і вірусних, не обходиться без її застосування. ПЛР використовується не тільки для детекції аномальних генів та вірусів, але і для фундаментальних досліджень у галузі молекулярної біології. Завдяки ПЛР стало можливим досліджувати віруси, вбудовані в геном клітини-господаря, а також віроїди та вірусоїди. ПЛР дає можливість протягом дня з одієї молекули ДНК отримати 100 млрд. подібних за структурою молекул. Ця реакція дуже проста у виконанні, необхідні лише пробірка, декілька відносно простих реагентів, джерело тепла та охолодження. Препарат ДНК, який необхідно копіювати, може бути очищеним, а може становити складну суміш біологічних речовин. Як джерело ДНК підходить і біоптат з тканини пацієнта, і тотальна НК з рослин, і одна волосина, і крапля крові, знайдена на місці злочину, і мозок мумії, і навіть тіло мамонта, який пролежав 40 000 років у вічній мерзлоті.

Застосування молекулярних методів для діагностики ДНК обмежується їхньою невисокою чутливістю та необхідним для аналізу часом. Так, щоб визначити нуклеїнову кислоту-мішень методом гібридизації *in situ*, застосовуючи радіактивний мічений зонд, необхідно, щоб у препараті було декілька тисяч копій мішені. Нерідко число аномальних (або вірусних) послідовностей у клінічному препараті діагностично значуще, але менше від цієї величини, тоді гібридизація може дати псевдонегативний результат. На відміну від цього, ПЛР виявляє унікальну нуклеотидну послідовність навіть в одній копії ДНК.

Труднощі, з якими стикаються дослідники у роботі з ДНК, обумовлені самою її природою.

З курсу загальної біохімії та біохімії вірусів відомо, що ДНК – це "тендітні" ланцюги, в будові яких є 4 типи дезоксирибонуклеотидів: дезоксиаденінтрифосфат (А-аденін), дезокситимидинтрифосфат (Т-тимін), дезоксигуанінтрифосфат (Г-гуанін), дезоксицитидинтрифосфат (Ц-цитозин). У послідовності цих основ закодована генетична інформація: триплет нуклеотидів кодує одну амінокислоту. Одиночні ланцюги ДНК трапляються рідко, зазвичай

пари ланцюгів з комплементарними послідовностями утворюють подвійні спіралі, в яких залишки А зв'язані з залишками Т, а залишки Г – із залишками Ц (рис.12.1). Кожний ланцюг складається з цукро-фосфатного остова, вздовж якого перпендикулярно до довгої осі подвійної спіралі розташовані основи, зв'язані водневими зв'язками. Кінці ДНК хімічно відрізняються, один підписують як 5' (залишок фосфорної кислоти), другий 3' (цукор). У подвійній спіралі ДНК комплементарні ланцюги антипаралельні, як наслідок – 3' кінець одного ланцюга зв'язаний з 5' кінцем іншого.

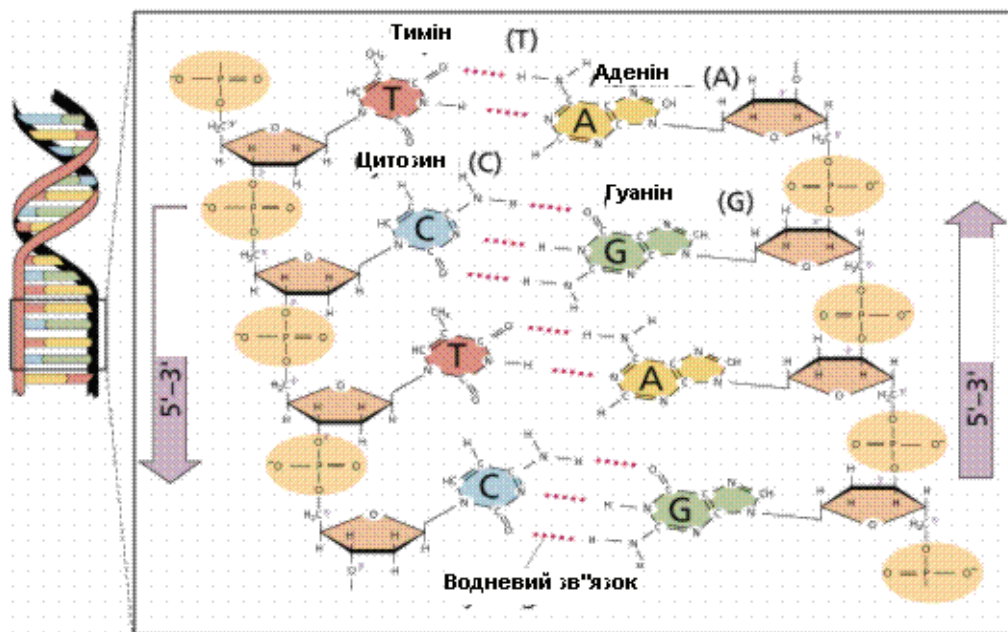


Рис. 12.1. Схематичне зображення молекули ДНК

Молекули ДНК у клітинах оточені білками, які забезпечують їхнє більш щільне скручування. Як правило, не вдається виділити ДНК непошкодженою – нитка найчастіше розірвана у випадкових місцях, а це дуже обтяжує подальші дослідження.

За нормальних умов ДНК являє собою складно побудовану молекулу з 4-вимірною структурою. В клітині реплікація відбувається завдяки ферменту ДНК-полімеразі (рис. 12.2). Вивчені молекули ДНК-полімераз, які виділені з різних вірусів. Вони незначно різняться своєю будовою, але активні центри в них побудовані однаково.

ДНК-полімерази були відкриті в 1955 році Корнбергом зі Станфордського університету, США. ДНК-полімераза виконує ряд функцій, в тому числі забезпечує репарацію та реплікацію ДНК. Ці ферменти здатні подовжувати короткі олігонуклеотидні затравки, приєднуючи до 3' кінця наступний нуклеотид, але для цього необхідно, щоб затравки були гібридизовані (зв'язані) з комплементарним ланцюгом ДНК, який називається матрицею. Розчин, у якому відбувається ця реакція, повинен містити нуклеозидтрифосфати (вони використовуються як будівельні блоки). Нуклеотид, який приєднує ДНК-полімераза, комплементарний основі у відповідному положенні матричного

ланцюга. Наприклад, якщо це А, полімераза приєднує Т, якщо матричний нуклеотид Г, то фермент приєднує Ц. Багаторазово повторюючи цю реакцію, полімераза може подовжувати 3' кінець праймера, поки не дійде до 5' кінця матриці. В ході репарації та реплікації кожен ланцюг виступає матрицею для синтезу іншого.

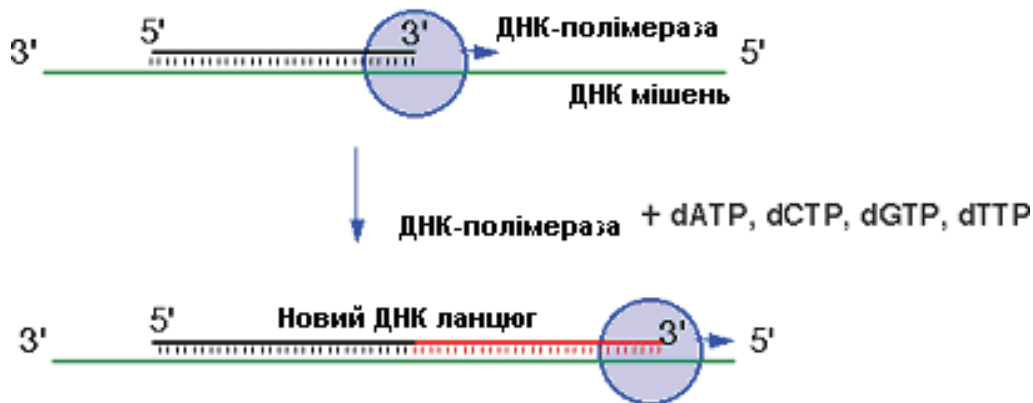


Рис. 12.2. Схема добудови подвійного ланцюга ДНК за допомогою фермента ДНК-полімерази

Для розуміння механізмів ПЛР необхідно відзначити властивість ДНК, яка є основою ПЛР, – це можливість ДНК денатуруватися (при плавленні) та ренатуруватися (при відпалюванні). Тобто, при нагріванні дволанцюгові молекули ДНК розплітаються та утворюють 2 окремі ланцюги, а при охолодженні відбувається їхня ренатурація – знову з'єднуються 2 ланцюги за принципом комплементарності (рис. 12.3).

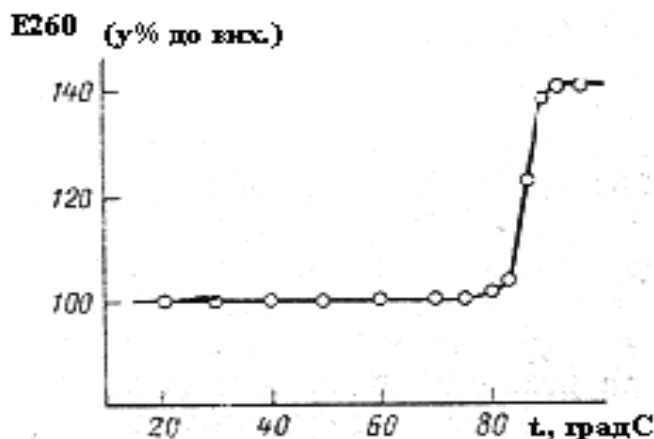


Рис. 12.3. Крива плавлення ДНК бактеріофага Сд (ДНК бактеріофага Сд в 0,15М NaCl + 0,015М трицитрат Na (рН 7,0))

При денатурації ДНК *invitro*, якщо в суміші є олігонуклеотидні мішені (вони зазвичай менші за матричну ДНК, тому більш мобільні і скоріше будуть приєднуватися до олДНК), буде відбуватися їхнє комплементарне з'єднання з матричною ДНК, а ДНК-полімераза миттєво починає синтез (добудову) ланцюга на вільному 3' кінці.

У 70-ті роки вчені почали вивчати молекули ДНК за допомогою олігонуклеотидних зондів. **Олігонуклеотид** – це коротка ділянка нуклеотидів,

розташованих у специфічній послідовності. У визначених умовах олігонуклеотид специфічно з'єднується з комплементарною послідовністю нуклеотидів на олДНК, тому штучно синтезовані радіоактивні олігонуклеотиди можуть слугувати зондами для визначення наявності специфічної послідовності нуклеотидів (радіоізотопний метод). З 1983 року синтез олігонуклеотидів (праймерів) став легким і доступним завдяки автоматичним синтезаторам, які є зараз у всіх великих молекулярно-біологічних центрах.

Олігонуклеотидні праймери виконують 2 функції:

З одного боку, вони комплементарні визначеній ділянці ДНК, за їхньою допомогою можна знайти специфічну ділянку на молекулі, до якої вони приєднуються за принципом комплементарності, а з другого боку – вони виступають затравками для початку виконання своїх обов'язків ДНК-полімеразою, тобто для побудови ділянки ДНК (що вона успішно робить, використовуючи для цього вільні нуклеотиди).

Зараз найчастіше використовується термостабільна ДНК-полімераза, яка попередньо була виділена з бактерії *Thermus aquaticus* (*Taq*). Ця бактерія була виділена з гарячих джерел і витримувала температури до 98С. Полімераза, яку використовували в перших експериментах (фрагмент Кленова ДНК-полімерази *E. coli*), легко інактивувалася при нагріванні, тому її потрібно було додавати після кожного циклу (раунду реплікації). Полімераза *Taq* стабільна й активна при високих температурах, тому її можна додавати один раз на початку ампліфікації. Ще одна перевага ***Taq-полімерази*** – більш високий оптимум температурного режиму детермінованої реакції (побудова відбувається при 70-75С), що значно підвищує специфічність, кількісний вихід та можливу довжину синтезованих копій.

Таким чином, до 1983 року були виведені усі передумови для успішного синтезу великої кількості специфічних ділянок ДНК. Для першого досліду з застосуванням ПЛР Кері Мюлліс вибрав ділянку плазмідної ДНК завдовжки 25 нуклеотидів та праймери 11 і 13 нуклеотидів. Цей дослід довів, що ампліфікація ділянки ДНК можлива.

Для проведення ПЛР використовують у надлишку олігонуклеотидні праймери, досліджувану ДНК. Ампліфікацію проводять *in vitro*. Оскільки праймери гібридизуються з обома ланцюгами ДНК, то і нативна послідовність, і синтезовані ПЛР-продукти можуть виступати матрицями для подальших раундів реплікації, в результаті чого кількість копій унікальної послідовності експоненційно збільшується (приблизно за формулою 2^n , де n – кількість раундів реплікації, які відбулися). Завдяки цій послідовності копії, які є в досліджуваному матеріалі в мінімальній кількості (одна чи декілька) і не виявляються ніякими іншими методами, легко виявити за допомогою ПЛР. Якщо говорити образно, то ПЛР дає можливість знайти "голку в скирді сіна" – всього одну послідовність ДНК, яка є в досліджуваному зразку (рис. 12.4.).

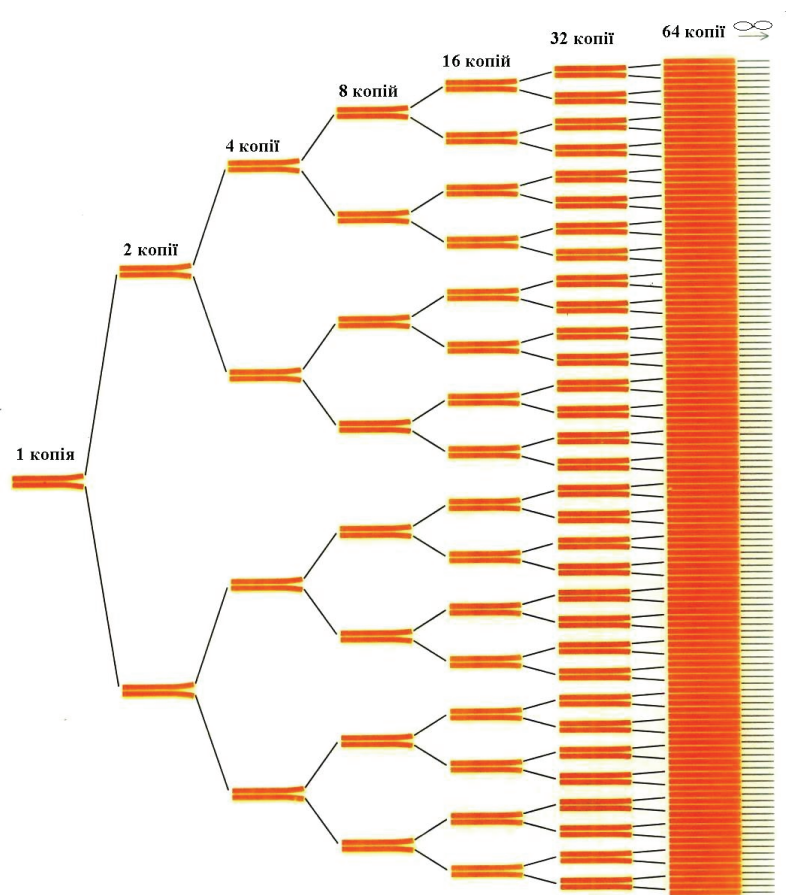


Рис. 12.4. Експоненційне збільшення ділянок ДНК, які утворюються за допомогою ПЛР

Експоненційне збільшення числа копій послідовності-мішені не тільки забезпечує високу чутливість методу, але й полегшує саме їхнє виявлення.

Процес ампліфікації складається з повторюваних циклів температурної денатурації ДНК, відпалу праймерів з комплементарними послідовностями та подальшою добудовою полінуклеотидних ланцюгів за допомогою ДНК-полімерази. Праймери орієнтовані так, що синтез за допомогою полімерази відбувається тільки між ними, подвоюючи кількість копій цієї ділянки ДНК (рис. 12.5.).

Після декількох циклів нарощування праймерів, відділення продуктів полімеризації, зв'язування нових праймерів та їхнього нарощування, довжина ланцюгів ДНК, що експоненційно збільшуються (накопичуються) є фіксованою, тому що їхні кінці будуть чітко визначатися 5'кінцями олігонуклеотидних праймерів. Якщо синтезувати праймери, які зв'язуються з більш віддаленими одна від одної ділянками, можна реплікувати молекули більшої довжини.

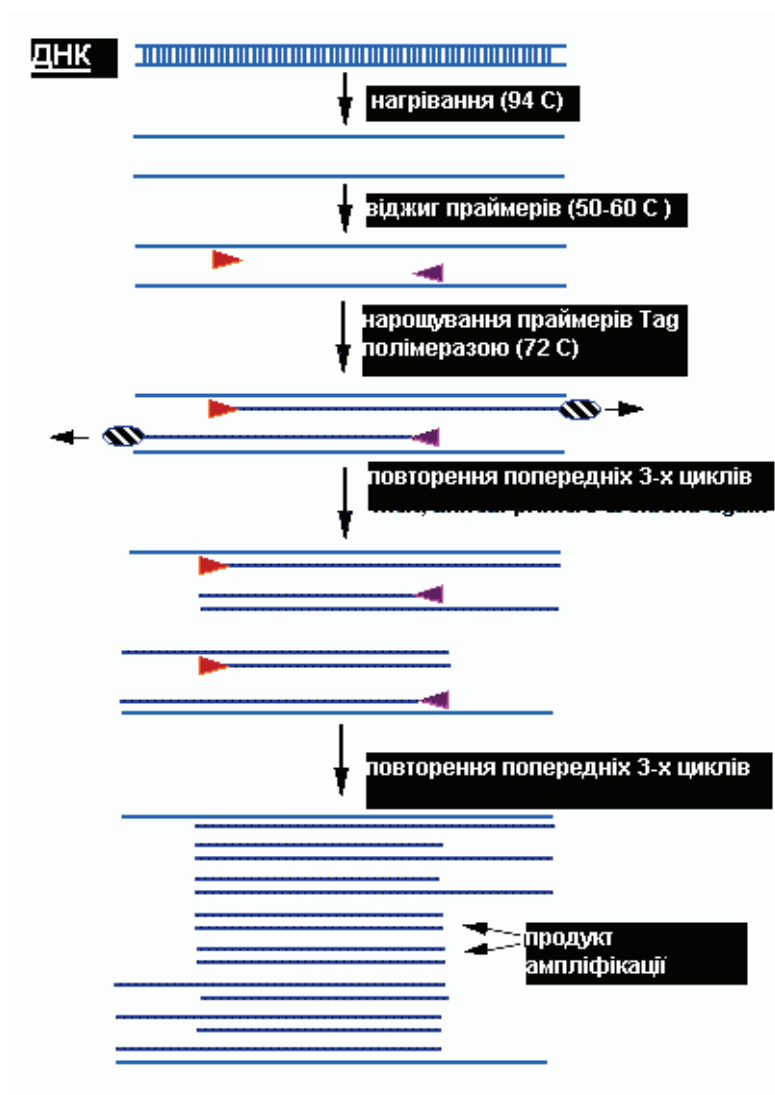


Рис. 12.5.Процес проведення ПЛР (перші декілька циклів ампліфікації)

Обладнання для ПЛР

Реакції зазвичай проводять у 0,2 чи 0,5 мл мікропробірках Еппендорф. Обладнання для нагрівання та охолодження може бути зовсім простим, як наприклад, набір водяних бань з різною температурою води, якими користувався Кері Мюлліс, або складним і включати нагрівальний блок, який керується мікропроцесором (рис. 12.6). Такий блок використовують для автоматичної ампліфікації. Він називається термоциклер, ампліфікатор або просто ПЛР-машина. Контрольований комп'ютером блок, розроблений виключно для ПЛР, сьогодні можна придбати у багатьох молекулярно-біологічних фірм.



Рис.12.6. Ампліфікатор на 48 реакцій

Компоненти реакції

Для проведення ПЛР необхідні такі складові частини:

- послідовність ДНК, що досліджується;
- буфер;
- дезоксирибонуклеозидтрифосфати (dNTP);
- два праймери, специфічних для зв'язування з дослідним зразком;
- *Tag-полімераза*.

Послідовність ДНК, що досліджується, має бути попередньо підготовлена для аналізу (повинно бути проведено виділення нуклеїнової кислоти з дослідного матеріалу.)

Буферна система має забезпечити оптимальні умови для проведення реакції.

Буфер для ПЛР, при використанні *Tag-полімерази*, вміщує 50мМ КСІ, 10мМТрис-НСІ, рН 8,4, 2,5 мМMgCl₂ та 100 мкг/мл желатини. Для використання комерційних ферментів цей буфер надається разом з ДНК-полімеразою.

Нейтральні розчини dNTP. Найкраще використовувати ліофілізовані порошки і робити з них водні розчини. Обов'язково робити аліквоти в декількох пробірках для можливості часткового використання, зберігати їх при -20°C.

Праймери (штучно синтезовані олігонуклеотиди) для ПЛР частіше мають довжину 18-25 нуклеотидів. Можливий синтез і більш довгих затравок, але вони рідко бувають необхідні. Їх можна синтезувати за допомогою автоматичних синтезаторів ДНК. Кількості олігонуклеотидів, які отримують таким чином (0,2-1 мкмолів), достатні для проведення декількох сотень або тисяч реакцій.

Підбір праймерів – ключова ланка ПЛР, оскільки ними визначається можливість ампліфікації та виявлення необхідної послідовності. ПЛР-

ампліфіковані фрагменти ДНК мають різний розмір. Він переважно визначається сумою розмірів праймерів та відстанями між їхніми 3' кінцями.

Їхній розмір лежить в діапазоні 200-800 нуклеотидів.

Підбір праймерів – процес емпіричний, але відповідність до визначених вимог збільшує ймовірність отримання працюючих праймерів.

Існують загальні вимоги підбору праймерів:

1. Добирати праймери необхідно з вмістом ГЦ пар приблизно 50% та випадковим розташуванням основ. (Чим більше ГЦ пар, тим вища температура денатурації).

2. Потрібно уникати послідовностей зі стійкими вторинними структурами, оскільки можлива неповна денатурація стійких ділянок. Для вивчення вторинної структури існують спеціальні комп'ютерні програми.

3. Необхідно перевіряти затравки на комплементарність одна одній – очевидно, якщо праймери комплементарно зв'язуються один з одним при відпалюванні, вони не зможуть брати участі в ампліфікації.

Дизайн праймерів може базуватися як на нуклеотидному, так і на амінокислотному сиквенсі (вироджених праймерах).

Залежно від мети експерименту потрібно або відбирати консервативні ділянки (для дослідження вірусів однієї групи), або уникати їх (для дослідження різних штамів – наприклад, якщо праймери розроблені для одного штаму з родини лютеовірусів, то вони не повинні "помічати" інші штами цієї групи, забезпечуючи при цьому ампліфікацію усіх досліджуваних ізолятів).

Для підвищення чутливості та специфічності можна використовувати так звані "гніздові" праймери (Nested-PCR). При цьому в ролі матриці виступає ділянка ДНК, ампліфікована в першому раунді реплікації, а в другій реакції застосовуються праймери, які ампліфікують ділянку меншу за попередню і розташовану всередині попередньої. Однак такий метод непридатний для рутинної діагностики, він використовується тільки з дослідницькими цілями.

Параметри температурних циклів

ПЛР передбачає інкубацію зразків при трьох температурах, які відповідають трьом етапам циклу ампліфікації – денатурації, відпалу, добудові.

Звичайно длДНК денатурують шляхом короткочасного нагрівання зразка до 90-95°C, потім проводять відпалювання, охолоджуючи зразок до 40-60°C (залежно від довжини праймера та вмісту ГЦ пар). Цю температуру можна оцінити за формулою:

$$4^{\circ}\text{C} \times (\text{Г}+\text{С}) + 2^{\circ}\text{C} \times (\text{А}+\text{Т})-3.$$

За рахунок великого надлишку затравок у реакційній суміші гібридизація відбувається майже миттєво та не вимагає довгої інкубації при температурі відпалювання.

Далі суміш нагрівають до 70-75°C для синтезу (добудови) затравок. Оптимальна температура для роботи *Tag-полімерази* – 72°C. Час інкубації при цій температурі залежить від довжини ділянки, що ампліфікується (вважається, що *Tag* -полімераза синтезує послідовність з 1000 нуклеотидів за 1 хв).

Аналіз ДНК, ампліфікованої за допомогою ПЛР

Для аналізу продукту, отриманого в ПЛР, використовують різні методи, такі як: гель-електрофорез, дот-блот-гібридацію та блот-гібридацію за Саузерном. За їхньою допомогою можна аналізувати більшість ПЛР-продуктів, але абсолютно достовірні результати можна отримати тільки сиквенуванням.

Частіше за все для швидкої візуалізації результатів ПЛР використовують гель-електрофорез в агарозному гелі за загальноприйнятими методиками.

Більшість вірусів рослин, а також віруси тварин є РНК-вмісними. Чи можливе вивчення НК таких вірусів та ампліфікація ділянок НК?

Так, можливе з використанням попередньо отриманої її кДНК копії (за допомогою ферменту зворотної транскриптази – РНК-залежної-ДНК-полімерази). Але це набагато складніший процес, оскільки РНК менш стабільна, ніж ДНК. Для діагностики та вивчення РНК-вмісних вірусів користуються методом ЗТ-ПЛР (RT-PCR). Модифікації можуть бути найрізноманітніші – від попереднього синтезу кДНК з подальшим ампліфікуванням у різних пробірках до RT-PCR в одній пробірці, що значно спрощує дослідження та підвищує їхню чутливість.

Виявлення та детекція віроїдів і вірусоїдів відбувається за допомогою ПЛР, оскільки це – єдина реакція, за допомогою якої можливе швидке та специфічне їхнє визначення.

Найбільш перспективним для діагностичних лабораторій, які проводять рутинні аналізи, є методи ПЛР у форматі FLASH (FLuorescentAmplification-basedSpecificHybridization) (Лаптінов, 2004) або в форматі реального часу (Normanetal., 2002). Обидва формати засновані на флуоресцентній детекції продуктів ампліфікації. Обидва формати дають змогу реєструвати результати ПЛР безпосередньо під час реакції (ПЛР у форматі реального часу) або після її проведення (ПЛР у форматі FLASH), без відкривання пробірок, завдяки чому вирішується проблема контамінації приміщення продуктами ПЛР, спрощуються вимоги до організації ПЛР-лабораторії, значно знижується трудомісткість і час проведення стадії детекції. Методи забезпечують також можливість простої і ефективної документації та зберігання результатів ПЛР у комп'ютерній базі даних. Слід зазначити, що ПЛР у форматі реального часу вимагає досить дорогого обладнання, тоді як вартість обладнання для ПЛР у форматі FLASH можна порівняти з обладнанням для гель-електрофорезу і це в 5-8 разів дешевше від обладнання для ПЛР у реальному часі.

Зараз існує величезна кількість модифікацій класичної ПЛР, які розширюють її діагностичні можливості. А саме:

а) Класична ПЛР.

б) ПЛР зі зворотною транскрипцією. Використовують для вивчення РНК вірусів. За допомогою зворотної транскриптази на РНК синтезується копія ДНК – кДНК, яку ампліфікують у стандартній ПЛР.

в) Гніздова ПЛР (NestedPCR). Розроблена для збільшення чутливості та специфічності реакції. Дає змогу визначати нуклеїнові кислоти, наявні в дуже низькій концентрації. ПЛР проводять послідовно з двома різними парами

праймерів. ДНК продукти, утворені в першому раунді ПЛР, здатні взаємодіяти з другою парою праймерів.

г) Мультипраймерна ПЛР (MultiplexPCR). Одночасне використання декількох пар праймерів дає можливість проводити ампліфікацію декількох генетичних детермінант, що скорочує час і витрату реактивів.

д) ПЛР у реальному часі (Real-timePCR). Використовують для визначення точкових мутацій в ДНК та кількісного вмісту ДНК/РНК в пробі, а також визначення експресії генів. Існує два підходи:

- *Taq - man методологія*. Основана на реєстрації флуоресцентного сигналу, що надходить у процесі проведення ПЛР внаслідок вивільнення флуоресціюючої речовини. Особливістю цієї реакції є використання олігонуклеотидних проб з приєднаними до різних кінців молекулами сигналізатора (reporter) і стабілізатора сигналу (quencher). Така проба, зв'язавшись з комплементарною ділянкою ДНК, руйнується ДНК-полімеразою, яка проявляє екзонуклеазну активність; це приводить до вивільнення сигналізатора з-під дії стабілізатора сигналу, що супроводжується вивільненням флуоресценції.

- *SYBRgreen методологія*. Реєструє збільшення флуоресценції в результаті приєднання флуорофора SYBR green до утвореного дуплексу ДНК з подальшою його емісією.

ж) Широкодіапазонна ПЛР. Використовується для визначення наявності мікроорганізмів, в тому числі невідомих і некультивованих, у клінічному матеріалі від хворого. Для цього застосовують універсальні праймери, які взаємодіють з висококонсервативними ділянками ДНК, що трапляються у багатьох мікроорганізмів (гени 16S рРНК).

з) Асиметрична ПЛР. Один з праймерів беруть у концентрації в 10 разів більшій, ніж інший та домагаються переважання серед продуктів реакції одноланцюгових ДНК над дуплексами (важливо для сиквенування).

ПЛР у реальному часі (Real-time PCR) та її застосування у вірусологічних дослідженнях

ПЛР у молекулярній діагностиці широко використовують для детекції нуклеїнової кислоти з будь-яких організмів. Вона займає найважливіше місце в інструментарії дослідницьких лабораторій. ПЛР у реальному часі (Real-time PCR) походить зі звичайної ПЛР, використовуючи її швидкість, чутливість, повторюваність, при цьому зменшуючи ризик зовнішньої контамінації. Сьогодні використовують різні хімічні речовини для детекції ПЛР-продуктів протягом real-time PCR. Ці речовини: ДНК-зв'язуючі флуорофори, 5'ендонуклеази, суміжні лінійні та у вигляді шпильок (hairpinoligoprobes) олігопроби, флуоресціюючі амплікони, які вивчені детально.

Моніторинг акумуляції ампліконів у реальному часі став можливим завдяки міченню праймерів, проб або ампліконів з флуорогенними молекулами. Цей підхід має переваги над радіоізотопними олігопробами, які обов'язково включають радіактивне випромінення.

Швидкість Realtime PCR підвищується за рахунок зменшення часу циклів, відміни пост-ПЛР детекції та використання флуоресцентних міток і

чутливих методів детекції їхнього випромінення. Редукція в розмірі ампліконів може також впливати на швидкість реакції, але зменшення розміру продукту не є необхідним для поліпшення точності ПЛР .

Недоліки вживання Realtime PCR порівняно з конвенційним ПЛР – це неможливість моніторингу розміру амплікону без входу в систему, несумісність деяких матриць (детектованих ДНК) з деякими хімічними флюорогенами та висока собівартість аналізу.

Шпилькоопосередкована ізотермічна ампліфікація (LAMP)

Шпилькоопосередкована ізотермічна ампліфікація (LAMP-Loop) є простим, швидким, специфічним і економічно ефективним способом ампліфікації нуклеїнових кислот, розроблена EikenChemicalCo., Ltd. Вона характеризується використанням 4 різних праймерів спеціально призначених для розпізнавання 6 різних регіонів гена-мішені і тим, що реакційний процес проходить за постійної температури з використанням реакції заміщення ланцюга.

Ампліфікацію і виявлення гена можна завершити за одну стадію шляхом інкубування суміші зразків, праймерів, ДНК-полімерази з активністю зміщення нитки і субстрату при постійній температурі (близько 65°C).

Це забезпечує високу ефективність ампліфікації, з ампліфікацією ДНК до 10^9 - 10^{10} копій за 15-60 хвилин.

Через свою високу специфічність, наявність ампліфікованого продукту може вказувати на присутність гена-мішені.

Відміни від ПЛР:

- Немає необхідності в етапі денатурації дволанцюгової в одноланцюгову форму.
- Усі реакції ампліфікації відбуваються безперервно в ізотермічних умовах.
- Ефективність ампліфікації надзвичайно висока.
- При дизайні 4 праймерів, які комплементарні 6 різним регіонам, LAMP-метод здатний приводити до ампліфікації гена-мішені.
- Загальна вартість може бути зменшена, оскільки LAMP-ампліфікація не вимагає спеціальних реагентів або складного обладнання.
- Ампліфіковані продукти мають структуру, що складається з поперемінно інвертованих повторів послідовності-мішені в одному ланцюзі.

Ампліфікація може бути зроблена на РНК-матрицях так само, як і з ДНК-матриць шляхом додавання зворотної транскриптази.

<http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/principle.html>

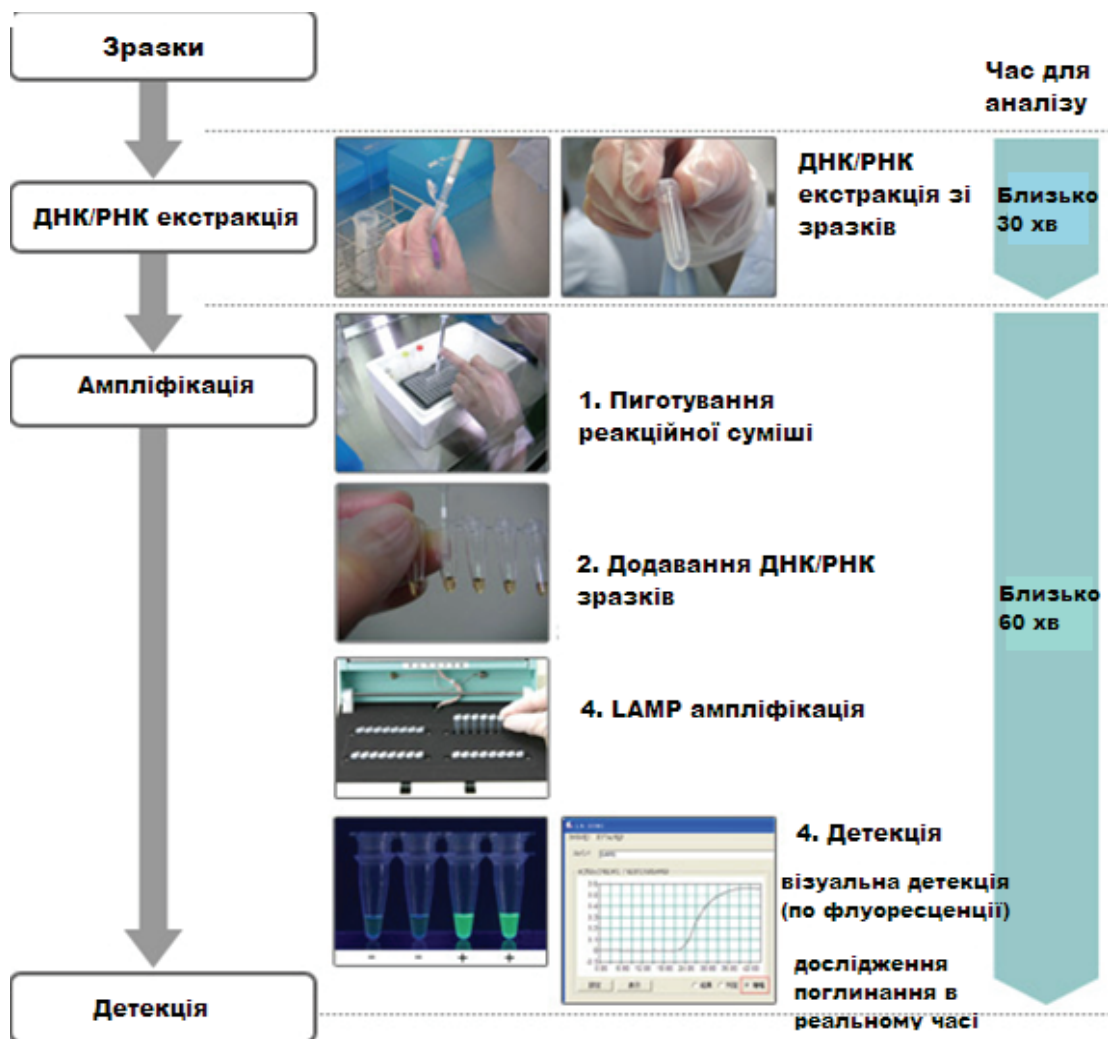


Рис. 12.7. Схема Loop (шпилько)-опосередкованої ізотермічної ампліфікації

Ампліфікація на основі послідовності нуклеїнової кислоти

Детекція РНК зазвичай відбувається за допомогою ЗТ-ПЛР. Це трудомісткий процес, що часто призводить до помилкових результатів через перехресне забруднення. Крім того, ампліфікація на основі послідовності нуклеїнової кислоти (NASBA - Nucleic acid sequence based amplification) являє собою ізотермічний процес ампліфікації РНК (один крок замість трьох при ПЛР). Метод NASBA виявився успішним для детекції як вірусних, так і бактеріальних РНК в клінічних зразках.

Реакційна суміш NASBA складається зі зворотної транскриптази (RT) вірусу пташиного мієлобластозу (AMV), РНК-полімерази T7 і РНКазі H, а також з двох олігонуклеотидних праймерів, РНК та буферного розчину.

Ампліфікація більш ніж 10^{12} разів за 90-120 хвилин. В ПЛР ампліфікація оцРНК можлива тільки при денатурації дДНК, що не відбувається при використанні цього методу. NASBA є ізотермічним процесом, таким чином можлива ампліфікація тільки РНК. Реакція NASBA не отримує помилкових спрацьовувань, викликаних геномною дДНК, як і у випадку RT-PCR.

Переваги NASBA над ЗТ-ПЛР:

1. Ампліфікацію нуклеїнової кислоти кількістю понад 10^9 копій може бути зроблено всього за 90 хвилин за допомогою трьох ферментів.

2. Не потрібне дороге обладнання для термоцилювання, оскільки реакція проходить ізотермічно при 41°C .

3. Забезпечує більш швидко кінетику ампліфікації.

4. Може використовуватися для кількісного виявлення генома РНК ретровірусів, а не ампліфікації копій провірусної ДНК.

5. Метод дає можливість виявити рівень реплікації ДНК вірусів, виявляючи експресію їхніх пізніх мРНК.

6. Метод дає змогу виявлення послідовностей мРНК людини без ризику ДНК забруднення.

7. Дослідження експресії генів може бути зроблено без інтронів фланкуючих праймерів або ДНКаз.

Розглянуті вище методи мають ряд переваг, зокрема таких, як висока специфічність і чутливість, можливість проводити аналіз у форматі мультиплекс, аналізувати зразки будь-якого типу, мінімально контактувати з інфекційним матеріалом, швидко отримувати результат і працювати з великою кількістю зразків. У цілому ПЛР і його модифікації є основним методом для виявлення вірусів, незважаючи на вдосконалення методів молекулярної діагностики. Наприклад, ЗТ-ПЛР в режимі реального часу найбільш популярний, оскільки інтерпретація результатів не вимагає особливих умінь, а також через короткі терміни отримання результатів і відносно недорогу собівартість аналізу. Вибір методу для ідентифікації вірусу залежить від завантаженості лабораторії та її оснащення. Основним недоліком усіх цих методів є висока вартість обладнання. Іншим недоліком перерахованих вище методів є те, що всі методи були валідовані тільки з чистою культурою вірусу. Для забезпечення ефективності та надійності всі нові діагностичні методи повинні бути ретельно апробовані на польових зразках. Проте, позитивний результат, отриманий за допомогою молекулярно-біологічних методів, хоч і відіграє важливу роль для вживання екстрених заходів, повинен бути завжди підтверджений виділенням вірусу.

Практична робота

Постановка зворотньоотранскрипційної ПЛР для діагностики ВТМ-інфекції

Завдання: Опанувати методику постановки зворотньоотранскрипційної ПЛР (RT-PCR) для діагностики ВТМ.

Матеріальне забезпечення: рослини тютюну *Nicotiana tabacum*, з симптомами ВТМ, кіт для виділення тотальної РНК, специфічні праймери до ВТМ, зворотня транскриптаза та буфер для неї, розчин нуклеотидів, стерильна вода, ДНК-полімераза та буфер до неї, агароза, електрофорезний буфер (0,089 М TBE), пробірки „Еппендорф” 0,5 мл, маркери для електрофорезу, прилад для електрофорезу, ампліфікатор, саплери, маркери.

Хід роботи

УСІ МАНІПУЛЯЦІЇ ПРОВОДЯТЬ, ВИКОРИСТОВУЮЧИ СТЕРИЛЬНИЙ ПОСУД і ГУМОВІ РУКАВИЧКИ!!!

(Для всіх маніпуляцій обов'язково слід використовувати стерильний посуд і гумові рукавички!)

I. Виділення тотальної РНК (High Pure RNA Isolation Kit (Roshe)).

1. Ресуспендувати листя (200мкг) в 200 мкл фосфатно-сольового буферу, рН 7,4.

2. Додати 400 мкл лізуючого буферу (green cap) та ретельно перемішати.

3. Перенести зразок у приготовлений фільтр.

4. Центрифугувати 15 сек при 10000об/хв. Вилити фільтрат.

5. Змішати в стерильній пробірці 90 мкл Dnase incubation buffer (white cap) та 10 мкл DNase 1. Перемішати та перенести у фільтр. Інкубувати 15 хвилин при 15-25С.

6. Додати 500 мкл буферу відмивки (wash buffer I (black cap)). Ц/ф 10 000 15 сек. Вилити фільтрат.

7. Додати 500 мкл буферу відмивки (wash buffer II (blue cap)). Ц/ф 10 000 15 сек. Вилити фільтрат.

8. Додати 200 мкл буферу відмивки (wash buffer II (blue cap)). Ц/ф 10 000 об/хв 3 хв.

9. Перенести фільтр у стерильну пробірку.

10. Для елюції РНК додати 50 мкл стерильної води та центрифугувати 1 хв при 10 000об/хв.

II. Синтез кДНК

1. Додати в пробірку:

5 мкл зразка (тотальної РНК або контролю);

1 мкл змістового праймеру;

4 мкл води;

загальний об'єм 10 мкл.

Інкубувати 10 хв при 70С в термоциклері та швидко перенести на лід.

2. Додати інші компоненти реакції:
2 мкл 10-кратного буферу для зворотної транскриптази;
1 мкл розчину суміші нуклеотидів;
1 мкл ферменту зворотна транскриптаза;
1 мкл інгібітору РНК-аз;
5 мкл води.
Загальний об'єм реакції 20 мкл.
Інкубувати в термоциклері 50 хв при 45С та 3 хв при 94С.

3. Ампліфікація ДНК

1. В кожну пробірку додати:
5 мкл 10-кратного буферу для ДНК-полімерази;
1 мкл розчину суміші нуклеотидів;
5 мкл кДНК;
1 мкл змістового праймеру;
1 мкл антизмістового праймеру;
0,5 мкл ДНК-полімерази;
36,5 води.
Загальний об'єм 50 мкл

Додати одну краплину мінеральної олії, осадити та перенести в ампліфікатор. Ампліфікувати в режимі:

94 С – 1хв	} 30 циклів
55С - 2хв	
72С - 3хв	
72С - 10хв	

4. Електрофорез нуклеїнових кислот

Електрофорез проводять у 1,2% агарозному гелі (на 0,089 М TBE).

1. До 20 мл електрофорезного буферу додати 240 мг агарози. Розплавити на водяній бані або у мікрохвильовій пічці протягом 1-2 хв. Остудити розчин до 50С.

2. Додати 15 мкл розчину бромистого етидію (в концентрації 0,5 мг/мл).

3. Залити гель, попередньо помістивши гребінку так, щоб між дном лунки та низом шару гелю лишився шар агарози 0,5-1 мм.

4. Зразки та маркери розвести буфером зразка.

5. Гель перенести у прилад для електрофорезу та залити електрофорезним буфером так, щоб він був вкритий шаром буфера 1 см.

6. Внести спочатку маркери, а потім зразки у лунки по 12 мк.

7. Електрофорез проводять у режимі 15В/см протягом 30 хв.

8. Результати спостерігають при опроміненні гелю ультрафіолетом.

Контрольні завдання:

1. Встановити наявність ВТМ у зразках шляхом визначення молекулярної маси отриманих продуктів ампліфікації.

2. Замалювати результати в робочий зошит.

Контрольні запитання:

1. З якою метою використовують ПЛР у вірусологічних дослідженнях?
2. Що можна виявити за допомогою ПЛР?
3. Температурні режими у постановці ПЛР.
4. Основні компоненти полімеразної ланцюгової реакції.
5. Теоретичне обґрунтування можливості постановки ПЛР.
6. Модифікації ПЛР.
7. Виявлення ділянок вірусної РНК за допомогою ПЛР.
8. Чи можна виявити пріони за допомогою ПЛР?
9. Переваги та недоліки використання ПЛР у реальному часі.
10. Порівняння ПЛР з іншими методами детекції ДНК.

Література:

1. Анализ генома. Методы. Под ред Дейвиса К. – М. : Мир. – 1990. –С. 176-191.
2. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. – М.: Мир. – 2002. – С.181-204.
3. Мюллис К. Необычайная история о том, как родилась полимеразная цепная реакция // В мире науки. – №6. – 1990. – С.26-34.
4. Molecular methods for virus detection/ Ed. By Danny L. Wiedbrauk. – Academic Press. – 1995. – 350p.
5. Molecular biology of plant viruses/ Ed. by C.L.Mandahar. – Kluwer Academic Rublisher, USA. – 281p.
6. Електронний ресурс: <http://www.labome.ru/method/Avian-Influenza-Virus-Detection-Methods.html>

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.

***3'*-кінцева послідовність** – послідовність на *3'*-кінці мРНК, яка не транслюється, наступна за термінуючим кодоном.

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.

Ампліфікація – утворення додаткових копій хромосомних послідовностей, які містяться в хромосомній або позахромосомній ДНК.

Анамнез – відомості про попередній стан хворого.

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.

Блотинг ДНК за Саузерном – процедура перенесення денатурованої ДНК з агарозного гелю на нітроцелюлозний фільтр для гібридизації з комплементарними нуклеотидами. (Синонім – саузерн-блотинг).

Бляшка – результат руйнування клітин у місці взаємодії вірусної частинки (в тому числі бактеріофага) з моношаром клітинної культури.

Вакцина – препарат, який містить інактивованій вірус або його компоненти. Вакцини вводять в організми людей і тварин (тобто, проводять вакцинацію або імунізацію) для вироблення у них імунітету (нечутливості) до відповідного вірусу.

Гібридизація – процес утворення гетеродуплексів; інколи мають на увазі утворення комплементарних комплексів між ДНК та РНК.

Гнотобіоти – макроорганізми, які не містять життєздатних мікроорганізмів (вірусів) одного або декількох видів, відомих досліднику.

Гнотофори – це макроорганізми, які є носіями тільки одного виду життєздатних мікроорганізмів (моногнотофори в дибіотичній системі), двох (дигнотофори в трибіотичній системі) або декількох (полігнотофори в полібіотичній системі).

Гостра вірусна інфекція – така форма інфекції, за якої після утворення вірусного постомства клітина або гине, або видужує і не містить вірусних компонентів.

Декапітація – відрізання тварині голови.

Денатурація нуклеїнової кислоти – руйнування дволанцюгових молекул ДНК з утворенням двох комплементарних одноланцюгових полінуклеотидів.

Денатурація – втрата нативної структури біомолекул.

Депіляція (епіляція) – видалення волосся зі шкіри тварини, коли це необхідно за умовами експерименту.

Диплоїдні клітинні лінії – клітинні лінії, в яких щонайменше 75% клітин мають каріотип нормальних клітин вихідного типу; трансплантовані хом'ячкам не проявляють онкогенної активності.

ДНК-полімераза – фермент, що каталізує утворення дволанцюгової ДНК на основі одноланцюгової шляхом синтезу комплементарного ланцюга. Вихідний ланцюг має назву матричного.

Евтаназія – це гуманне безболісне умертвіння тварин, що вийшли з експерименту.

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 введеного повітря.

Затравка – коротка послідовність (часто це РНК), що комплементарно взаємодіє з одним із ланцюгів ДНК; утворює вільний 3'-ОН-кінець, використовуючи який ДНК-полімераза починає синтез ДНК-ланцюга.

Зв'язування комплементу реакція – встановлення взаємодії антигена з антитілом за наявності комплементу.

Зворотня транскрипція – синтез ДНК на матриці РНК; здійснюється ферментом зворотньою транскриптазою. (Синонім – РНК-залежна ДНК-полімераза, ревертаза).

Ідентифікація вірусу – встановлення таксономічного розташування вірусу.

Ізоелектрична точка – це рН розчину, при якому врівноважуються позитивні та негативні заряди поверхні віріонів і вони випадають в осад.

Імунізація лабораторних тварин – введення вірусомісного матеріалу тварині (обов'язково за певною схемою з урахуванням методу та часу введення) з метою отримання специфічної антисироватки до відповідного вірусу.

Імунність рослин – здатність рослин не підпадати на ураження вірусом (синонім – стійкість).

Індикація вірусу – визначення наявності чи відсутності вірусу в досліджуваному матеріалі.

Інокулят – інфекційний вірусмісний 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.

Канібалізм – поїдання тваринами особин свого виду, прояв внутрішньовидової конкуренції.

Карантин – сукупність адміністративних та медико-санітарних заходів, спрямованих на перешкоджання поширенню інфекційних хвороб людини, в тому числі вірусних. У вірусологічній практиці полягає в ізоляції тварин з невідомим епідеміологічним минулим або з ознаками захворювання на термін, який удвічі перевищує інкубаційний термін відповідної хвороби.

Карликовість та пригнічення росту – розмір рослини зменшується внаслідок вкорочення міжвузлів, зменшення листків, плодів та інших частин рослини.

кДНК – одноланцюгова ДНК, синтезована *in vitro* шляхом зворотньої транскрипції; комплементарна РНК.

Кільцева плямистість – поява хлоротичних або некротичних круглих плям на листках, а іноді на плодах та пагонах.

Комплемент – компонент сироватки крові, який бере участь в імунній відповіді.

Контамінація – забруднення.

Лізис – розпад клітини, викликаний руйнуванням її оболонки.

Літична інфекція – інфекція, в результаті якої відбувається лізис у клітині.

Матриця – ДНК або РНК, які використовуються полімеризуючим ферментом (ДНК- або РНК-полімерази) для синтезу комплементарного ланцюга.

Модельні об'єкти (експериментальні або тест-об'єкти) - макроорганізми або культури клітин (в тому числі мікроорганізмів), чиї властивості є достеменно відомими і постійними для представників одного виду (якщо це культури клітин – штаму, популяції або лінії). Відомі властивості модельного об'єкта дають можливість використовувати їх для детекції або дослідження особливостей патогенів невідомої природи.

Мозаїка – характеризується чергуванням зон із зеленим та світло-зеленим, жовтим забарвленням, що може траплятись як на листках, так і на плодах.

Надчутливість рослин – рослини уражуються з утворенням місцевих некротів, які з'являються внаслідок відмирання клітин біля точки зараження.

Некроз – загибель клітин – гіперчутлива відповідь.

Олігонуклеотид – декілька нуклеозидів, з'єднаних фосфодієфірними зв'язками, короткий фрагмент полінуклеотидного ланцюга, одержаний після розщеплення ферментами або хімічними реагентами. Олігонуклеотиди отримують також шляхом хімічного синтезу.

Оператор – ділянка ДНК, що впізнається специфічними білками-репресорами та негативно регулює транскрипцію структурних генів.

Пасаж – зараження чутливої тварини з метою отримання від неї нової популяції вірусу. Проводиться з метою підтримання інфекційності вірусу.

Пасаж сліпий – явище нездатності вірусу викликати видимі симптоми захворювання після перенесення його з типового господаря до іншого протягом першого пасажу.

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.

Плавлення ДНК – втрата двоспиральної структури ДНК під дією температури.

Помірні бактеріофаги – бактеріофаги, здатні лізогенізувати клітину та у вигляді профага перебувати всередині бактеріальної хромосоми або в стані плазміди.

Постійна (безперервна, перещеплювана) клітинна лінія – клітини одного типу, що здатні субкультивуватися поза організмом протягом необмеженого числа пасажів.

Праймер – оліго- або полінуклеотид, 3'кінцева ланка якого використовується ДНК- полімеразою як затравка для приєднання наступної ланки при синтезі ДНК.

Праймери - штучно синтезовані олігонуклеотиди.

Прижиттєвий патологічний матеріал – патологічний матеріал, одержаний від живої тварини (протягом експерименту).

Продуктивна вірусна інфекція – інфекція, що завершується утворенням інфекційного потомства.

Промотор – послідовність нуклеотидів ДНК, що розпізнається РНК-полімеразою як ділянка, з якої починається транскрипція.

Профаг – внутрішньоклітинний стан фага в умовах, за яких його літичні функції пригнічуються.

Репресор – білок або антисмислова РНК, що пригнічують активність генів.

Рослини-індикатори – це рослини, які дають чітку специфічну реакцію на певний вірус, що легко відрізняється від реакції цієї рослини на інший вірус.

Ростові поживні середовища – середовища, що забезпечують існування та розмноження клітин і містять 2-10 % сироватки корві.

Ростучі клітинні культури – культури клітин, здатні розмножуватися в умовах *in vitro*.

Секційний патологічний матеріал – патологічний матеріал, одержаний після розтину лабораторної тварини.

Системне ураження рослин – вірус транспортується по всіх тканинах рослини і вони репродукуються з чітким проявом симптомів захворювання.

Сіквенс – визначення послідовностей амінокислот (сіквенс білка) або нуклеотидів (сіквенс НК).

Стерильні тварини – макроорганізми, що не мають ніяких життєздатних мікроорганізмів, які можна виявити.

Титр вірусу – кількість вірусу, яка міститься в одиниці об'єму матеріалу.

Толерантність рослин – вірус транспортується по тканинах рослини, але симптоми захворювання слабо виражені або не виражені зовсім (замасковані).

Трансфекція – введення в бактеріальні клітини ізольованих молекул фагової ДНК, що приводить до утворення зрілого фагового потомства.

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).

Хлороз – пожовтіння зелених тканин внаслідок деградації хлорофілу.

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.

Робочі середовища та розчини

Середовище Лурія-Бертані

Триптон	10г
Дріжджовий екстракт	5г
NaCl	10г
H ₂ O	1л

Верхній агар

Триптон	10г
Дріжджовий екстракт	5г
NaCl	10г
Агар	7г
H ₂ O	1л

Нижній агар

Триптон	10г
Дріжджовий екстракт	5г
NaCl	10г
Агар	15г
H ₂ O	1л

Фосфатний буфер (PBS) 0,1М, рН 7,4

NaCl	8,0г
KH ₂ PO ₄	0,2г
Na ₂ HPO ₄ x 12H ₂ O	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.

рН	3,0	3,4	3,8	4,2	4,6	5,0	5,4	5,8	6,2
Розчин А, мл	46,5	40,0	35,0	31,5	25,5	20,5	16,0	11,8	7,2
Розчин В, мл	3,5	10,0	15,0	18,5	24,5	29,5	34,0	38,2	42,8

Ацетатний буфер, 0,1М, рН 3.6-5,6**Розчин А****0,1М оцтова кислота**

Концентравана оцтова кислота

5,8 мл

H₂O

довести до 1000 мл

Розчин В**0,1М ацетат натрія**

тригідрат ацетата нарія (М.м 136,09)

13,6 г/л

Змішати розчини А та В у співвідношенні та довести дистильованою водою до 100мл.

рН	3,6	4,0	4,4	4,8	5,0	5,2	5,6
Розчин А, мл	46,3	41,0	30,5	20,0	14,8	10,5	4,8
Розчин В, мл	3,7	9,0	19,5	30,0	35,2	39,5	45,2

Гліцин-НСІ буфер, 0,1М, рН 2,2-3,6

0,1М гліцин (М.м 75)

7,5 г/л

0,1М НСІ

Для приготування розчину змішати 50 мл 0,1М гліцину і згідно таблиці певну кількість 0,1М НСІ в залежності від бажаної рН та довести об'єм до 100 дистильованою водою

рН	2,2	2,4	2,6	2,8	3,0	3,2	3,4	3,6
0,1М НСІ, мл	44	32,4	24,2	16,8	11,4	8,2	6,4	5,0

Натрій-карбонат-бікарбонатний буфер, 0,05М, рН 9,60,015М 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 ЕрлаУ 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
CaCl ₂ x 6H ₂ O	0,276г
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,2г
KH ₂ PO ₄	0,06г
Na ₂ HPO ₄ x 12H ₂ O	0,153г
Глюкоза	1,0г
Феноловий червоний	0,012г
H ₂ O	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 115⁰ С.

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

пiрiдоксаль	1,0
тiамiн	1,0
нiкотiнамiд	1,0
нiкотiнова кислота	1,0
рибофлавiн	0,4

Бiотин, фолiєву кислоту i холiнхлорид розчиняють в 50 мл води при додаваннi 0,1мл 0,1М NaOH. В iнших 50 мл води розчиняють решту речовин. Потiм два розчини зливають.

С) Солi та iншi речовини, г/л

NaCl	6,8
KCl	0,4
CaCl ₂ x 6H ₂ O	0,1
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,1
KH ₂ PO ₄	0,4
Na ₂ HPO ₄ x 12H ₂ O	0,4
MgCl ₂ x 6H ₂ O	0,05
Fe(NO ₃) ₃	0,001
Глюкоза	1,0
Феноловий червоний	0,005
L-глутамiн	0,15

Солi розчиняють в заданiй послiдовностi в 700мл дистильованої води.

Розчини А, В, С змiшують i доводять водою до 1000мл i пiддають стерильнiй фiльтрацiї

П Е Р Е Л І К
регульованих шкідливих організмів

A-1

Карантинні організми, відсутні в Україні

Вірусні хвороби

- | | | |
|-----|---|---|
| 1. | Cherry little cherry closterovirus (non-European) | - кластеровірус дрібноплідності вишні (черешні) |
| 2. | Cherry rasp leaf nepovirus | - неповірус рашпілеподібності листя черешні |
| 3. | Chrysanthemum stem necrosis tospovirus | - тосповірус некрозу стовбура хризантем |
| 4. | Chrysanthemum stunt pospoviroid | - віроїд уповільнення росту хризантем |
| 5. | Impatiens necrotic spot tospovirus | - тосповірус некротичної плямистості |
| 6. | Peach rosette mosaic nepovirus | - мозаїка розеток персика |
| 7. | Potato Andean mottle comovirus | - комовірус андійської плямистості картоплі |
| 8. | Potato black ringspot nepovirus | - вірусна чорна кільцева плямистість картоплі |
| 9. | Potato yellow dwarf nucleorhabdovirus | - рабдовірус жовтої карликовості картоплі |
| 10. | Potato yellow vein crinivirus | - вірус пожовтіння жилок листя картоплі |
| 11. | Raspberry ringspot nepovirus | - неповірус кільцевої плямистості малини |
| 12. | Strawberry latent C virus | - латентна С-вірусна хвороба суниці |
| 13. | Tobacco ringspot nepovirus | - неповірус кільцевої плямистості тютюну |
| 14. | Tomato ringspot nepovirus | - неповірус кільцевої плямистості томатів. |

A-2

Карантинні організми, обмежено поширені в Україні

Вірусні хвороби

- | | | |
|----|-------------------------------------|--|
| 1. | Beet necrotic yellow vein furovirus | · вірусне некротичне пожовтіння жилок цукрового буряку (ризоманія) |
| 2. | Plum pox potyvirus | · потівірус шарки сливи (віспа). |

Регульовані некарантинні шкідливі організми

Вірусні хвороби

- | | | |
|----|----------------------------------|--|
| 1. | Potato spindle tuber pospiviroid | - віроїд веретеноподібності бульб картоплі |
| 2. | Tomato spotted wilt tospovirus | - вірус плямистості томату (вілт). |

Наукове видання

ПОЛЩУК Валерій Петрович,
БУДЗАНІВСЬКА Ірина Геннадіївна,
ШЕВЧЕНКО Тетяна Петрівна,
АНДРІЙЧУК Олена Миколаївна,
КОМПАНЕЦЬ Тарас Анатолійович,
КОНДРАТЮК Олена Архипівна,
КОРОТЄЄВА Ганна Володимирівна,
МОЛЧАНЕЦЬ Оксана Віталіївна,
ХАРІНА Алла Володимирівна,
ШЕВЧЕНКО Олексій Володимирович

ВІРУСОЛОГІЯ.

НАВЧАЛЬНИЙ ПОСІБНИК ДЛЯ ЛАБОРАТОРНИХ ЗАНЯТЬ

Навчальний посібник

Формат 60×84/16. Тираж 300 пр. Ум. друк. арк. 18,4. Зам. № 1715

Виготовлювач ТОВ «ЦП «КОМПРИНТ»

03150, Київ, вул. Предславинська, 28

Свідоцтво про внесення до Державного реєстру
суб'єкта видавничої справи ДК № 4131 від 04.08.2011 р.