

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ «ЧЕРНІГІВСЬКИЙ КОЛЕГІУМ»  
імені Т.Г. Шевченка

Н.Р. Демченко

# ВІРУСОЛОГІЯ

*Навчально-методичний посібник  
до лабораторних занять та самостійної роботи студентів  
спеціальності 091 Біологія  
природничо-математичного факультету*

Чернігів  
2019

УДК 578:378.147.091.33 – 027.22(072)

Укладач

к.б.н., доцент кафедри біології Національного університету  
«Чернігівський колегіум» імені Т.Г. Шевченка Н.Р. Демченко

**Демченко Н.Р.**

Д 31 **Вірусологія:** навчально-методичний посібник до лабораторних занять та самостійної роботи студентів спеціальності 091 Біологія природничо-математичного факультету. – Чернігів: Національний університет «Чернігівський колегіум» імені Т.Г. Шевченка, 2019. – 147 с.

Затверджено вченою радою природничо-математичного факультету Національного університету «Чернігівський колегіум» імені Т.Г. Шевченка, протокол № 3 від 23.10. 2019 р.

**Рецензенти:**

к.б.н., старший науковий співробітник лабораторії вірусології Інституту сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН Деревянко С.В.

д.б.н., головний науковий співробітник відділу медичної хімії ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМНУ Ядловський О.С.

Навчально-методичний посібник складено для студентів, які навчаються за освітньо-професійною програмою підготовки бакалаврів спеціальності 091 Біологія. Він містить методичні рекомендації щодо виконання лабораторних робіт з вірусології, а також матеріали для основних видів самостійної роботи, а саме: тестові завдання, ситуативні задачі, контрольні питання та літературу. Посібник містить короткий словник термінів.

© Демченко Н.Р., 2019 р.

## ЗМІСТ

	Стор.
Вступ.....	5
1 Програма навчальної дисципліни.....	6
2 ЗМІСТОВИЙ МОДУЛЬ 1 ПРЕДМЕТ І ЗАДАЧІ ВІРУСОЛОГІЇ....	9
3 <i>Лабораторне заняття №1.</i> Організація вірусологічних лабораторій. Електронна мікроскопія.....	9
4 ЗМІСТОВИЙ МОДУЛЬ 2 ОСОБЛИВОСТІ БУДОВИ, КЛАСИФІКАЦІЇ ТА ХІМІЧНОГО СКЛАДУ ВІРУСІВ.....	17
5 <i>Лабораторне заняття №2.</i> Морфологія та ультраструктура вірусів.....	17
6 <i>Лабораторне заняття №3.</i> Методи виділення, культивування та ідентифікації вірусів.....	28
7 <i>Лабораторне заняття №4.</i> Методи діагностики вірусних інфекцій та ідентифікації вірусів.....	40
8 ЗМІСТОВИЙ МОДУЛЬ 3 ВЗАЄМОДІЯ ВІРУСІВ З КЛІТИНАМИ ХАЗЯЇВ.....	64
9 <i>Лабораторне заняття № 5.</i> Вірулентні та помірні фаги. Виділення та індикація бактеріофагів.....	64
10 ЗМІСТОВИЙ МОДУЛЬ 4 РОЗПОВСЮДЖЕННЯ ВІРУСІВ, ЇХ РОЛЬ У БІОСФЕРНИХ ПРОЦЕСАХ. ВІРУСНІ ХВОРОБИ. ЗНАЧЕННЯ ВІРУСІВ ДЛЯ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ПРОЦЕСІВ...	77
11 <i>Лабораторне заняття №6.</i> Віруси рослин. Рослини-індикатори. Виділення, очистка та концентрування вірусів рослин.....	77
12 <i>Лабораторне заняття №7.</i> Віруси грипу, парагрипу, кору. біологічні властивості. Методи лабораторної діагностики.....	93
13 <i>Лабораторне заняття №8.</i> Віруси поліомієліту, ЕСНО, коксакі. Біологічні властивості. Методи лабораторної діагностики захворювань.....	100
14 <i>Лабораторне заняття №9.</i> Віруси родин <i>Reoviridae</i> , <i>Retroviridae</i> , <i>Togaviridae</i> . Біологічні властивості. Методи лабораторної діагностики захворювань.....	110
15 <i>Лабораторне заняття №10.</i> Віруси сказу й енцефалітів. Біологічні властивості. Методи лабораторної діагностики захворювань..	123

<b>16</b>	<i>Лабораторне заняття №11. Пріони. Біологічні властивості.</i>	
	Методи лабораторної діагностики захворювань.....	<b>132</b>
<b>17</b>	Проблемні завдання.....	<b>138</b>
<b>18</b>	Перелік питань до підсумкового модульного контролю з відповідних модулів та дисципліни в цілому.....	<b>140</b>
<b>19</b>	Словник використаних термінів.....	<b>142</b>
<b>20</b>	Література.....	<b>147</b>

## ВСТУП

Вірусологія вивчає морфологію, будову, екологію, генетику, молекулярну біологію вірусів, процеси їх реплікації; напрямок і механізми еволюції; епідеміологію, методи лабораторної діагностики, профілактики і лікування спричинених ними захворювань.

Вірусологія займає одне з центральних місць серед медико-біологічних наук. Її бурхливий розвиток обумовлений наступними факторами. По-перше, вірусні хвороби мають провідне значення в інфекційній патології людини. По-друге, на сучасному етапі одержала визнання вірусна теорія етіології раку, лейкозів і інших злоякісних новоутворень. По-третє, на основі вивчення природи вірусів і взаємодії їх з клітинами хазяїв в даний час вирішуються фундаментальні проблеми біології: розкриття природи генетичного коду, механізму синтезу нуклеїнових кислот і білків, хімічного мутагенезу. По-четверте, віруси є особливою категорією органічної матерії, що відрізняється від тваринного і рослинного царств. Тому на сьогоднішній день вивчення різних форм органічного світу неможливо без вивчення вірусів.

Віруси є одними з найбільш розповсюджених у світі істот, загальна кількість яких перевищує сукупність усіх інших організмів. Водночас віруси мають цілий ряд властивостей, що суттєво різнять їх від інших. Так, вони є неклітинними формами життя, що за характером є облігатними паразитами, залежними від білоксинтезуючого та енергетичного апарату клітин-хазяїв. Вони мають ультрамікроскопічні розміри, містять нуклеїнову кислоту тільки одного типу – чи ДНК, чи РНК. Геном у більшості вірусів гаплоїдний. Віруси нездатні до росту і бінарного поділу. Вони розмножуються шляхом відтворення себе із власної геномної нуклеїнової кислоти. На теперішній час відомі віруси бактерій (бактеріофаги), актиноміцетів, грибів, рослин і тварин.

Активність вірусів за певних умов виявляється у вигляді цитопатогенної дії на клітини своїх хазяїнів, що виявляється у руйнації клітин, їх трансформації або як індуктивний вплив.

Водночас, віруси завдають не лише шкоду, але й можуть бути використані як діагностичні, лікувальні і профілактичні препарати проти бактерійних збудників захворювань у медицині. Неоціненна також їх роль як моделей генетичних і біохімічних досліджень, розпочатих ще в 30-ті роки минулого сторіччя: більшість положень молекулярної біології доведено на вірусах. Крім того, у генетичній інженерії віруси використовуються як векторні системи для створення організмів з новими ознаками.

Лабораторні роботи з курсу «Вірусологія» допоможуть студентам оволодіти рядом методів дослідження, що застосовуються у вірусологічній практиці.

Студенти мають засвоїти основи стерильної роботи з вірусами та методи вивчення взаємодії «вірус – клітина». Набуті навички можуть стати в нагоді під час роботи в наукових та дослідних лабораторіях медичного, промислового та сільськогосподарського профілів.

## **ПРОГРАМА НАВЧАЛЬНОЇ ДИСЦИПЛІНИ**

### **Змістовий модуль 1. Предмет і завдання вірусології**

**Тема 1. Предмет та завдання вірусології, історія розвитку вірусології, її роль у розвитку сучасної біології та медицини.**

Предмет і завдання вірусології, її місце та роль у розвитку сучасної біології та медицини. Зв'язок вірусології з іншими природничими науками. Історія розвитку вірусології. Положення вірусів у загальній системі живого світу. Зв'язок вірусології з мікробіологією, біотехнологією, фізіологією рослин, фізикою, хімією та іншими науками. Значення вірусології в розвитку та становленні основних законів і концепцій молекулярної біології.

**Змістовий модуль 2. Особливості будови, класифікації та хімічного складу вірусів.**

### **Тема 2. Загальна характеристика вірусів**

Означення вірусів, їх загальні та специфічні властивості. Місце вірусів у живому світі. Походження та еволюція вірусів. Особливості таксономії та класифікації вірусів. Критерії, які використовують для класифікації вірусів. Основні групи вірусів, що визначаються природою хазяїна: віруси тварин, рослин, бактеріофаги. Сучасна номенклатура вірусів, записи в виді криптограм.

### **Тема 3. Особливості морфології та структури вірусних часток**

Дві фази життєвого циклу вірусів – позаклітинна (віріон, віроспора) та внутрішньоклітинна (система вірус-клітина). Особливості будови віріона як системи, яка складається з білкового капсида та нуклеїнової кислоти. Основні типи будови капсида: спіральний, поліедричний, складний. Особливості будови спірального капсида на прикладі віруса тютюнової мозаїки (ВТМ). Характеристика поліедричного (ізометричного, квазісферичного) типу капсида. Характер організації і прикріплення нуклеїнової кислоти на прикладі аденовірусів. Складні капсиди вірусів на прикладі бактеріофага. Призначення основних компонентів капсида бактеріофага. Наявність зовнішніх оболонок у капсида. Особливості їхньої будови і хімічного складу. Функціональне призначення зовнішніх оболонок. Будова неповністю сформованих вірусних часток, особливості їх появи у популяції вірусів. Віроїди – безкапсидні РНК, здатні до самопроцесування. Характеристика морфологічних структур, пов'язаних з реплікацією вірусів всередині клітини – елементарних тілець та вірусних включень. Тільця оклюзії – надвіріона форма організації вірусних часток. Програми для дослідження вірусних часток, моделювання та аналізу їх геномних та білкових послідовностей.

### **Тема 4. Хімічний склад вірусів**

Характеристика вірусних білків та нуклеїнових кислот як основних компонентів вірусних часток. Структурні та ферментні білки, їх склад та класифікація, функції. Типи нуклеїнових кислот та утворюваних ними геномів, особливості хімічного складу нуклеїнових кислот. Геномні ланцюги з позитивною та негативною полярністю. Амбісенсові геноми. Мінорні

омпоненти вірусних частинок та їх функціональне навантаження: вуглеводи, поліаміни, ліпіди, зольні елементи.

### **Змістовий модуль 3. Взаємодія вірусів з клітинами хазяїв**

#### **Тема 5. Загальне уявлення про форми та механізми взаємодії вірусів різних груп з клітиною хазяїном**

Основні форми взаємодії вірусу з клітиною: літична (продуктивна), помірна (інтегративна), абортивна інфекція. Особливості протікання трьох форм взаємодії вірусу з клітиною у різних груп вірусів. Особливості літичного типу взаємодії вірусу з клітиною. Поняття продуктивного циклу. Послідовність процесів, які відбуваються при вірусній інфекції. Основні етапи інфекційного процесу: період екліпсу, реплікація та дозрівання вірусних часток. Шляхи проникнення вірусів тварин, рослин, бактерій в клітину. Загальна характеристика синтезу вірусоспецифічних білків. Основні етапи формування зрілих часток. Вихід вірусів з клітини. Характеристика явища вірогенії.

#### **Тема 6. Взаємодія бактеріофагів з клітиною хазяїном**

Літичний та лізогенний тип взаємодії фага і бактерії. Загальна картина літичної інфекції. Основні фази взаємодії фагу з бактерією: адсорбція (механізми розпізнавання грампозитивних та грамнегативних бактерій, обернена та необернена адсорбція), проникнення фагової ДНК (участь фага та клітинних ферментних систем), латентний період (особливості транскрипції, трансляції та реплікації фагового геному та збирання віріонів), вихід фагових нащадків.

Лізогенія. Механізм взаємодії профага з клітиною-хазяїном. Основні риси лізогенного стану бактерій. Помірні бактеріофаги і специфічний імунітет лізогенних бактерій. Характеристика стану профага. Частота лізогенізації. Переключення між циклами лізису та лізогенії. Індукція лізогенних бактерій. Перехід профага в стан вегетативного фага, лізис бактерій. Явище лізогенної конверсії.

#### **Тема 7. Взаємодія вірусів тварин і тваринних клітин**

Початкові етапи взаємодії вірусів тварин з клітиною. Роль клітинних рецепторів у специфічній взаємодії вірусної оболонки з клітинами. Проникнення за механізмами злиття мембран та у мембранних везикулах. Процес вивільнення вірусного геному всередині клітини та його транспортування до місця реплікації й транскрипції. Особливості розмноження ДНК- та РНК-геномних вірусів різних класів: прості та складні цикли реплікації. Закономірності біосинтезу білка у різних вірусів: відкриті рамки зчитування та фреймшифтинг, особливості генетичного коду. Збирання потомства та вивільнення з клітин. Набуття зовнішньої оболонки. Цикл реплікації вірусу імунодефіциту людини.

#### **Тема 8. Віруси рослин**

Особливості структури та хімічного складу вірусів рослин. Проникнення вірусів у клітину рослини: участь переносників. Особливості реплікації, транскрипції і трансляції у вірусів рослин. Особливі ферменти рослинних клітин, що використовуються вірусами для розмноження.

#### **Тема 9. Субвірусні агенти**

Віроїди – особлива група патогенів рослин. Безбілкові РНК здатні до автокаталізу. Сателіти – віруси з неповним геномом. Пріони – білки з інфекційною активністю.

**Змістовий модуль 4. Розповсюдження вірусів, їх роль у біосферних процесах. Вірусні хвороби. Значення вірусів для біотехнологічних процесів**

**Тема 10. Роль вірусів у біосферних процесах.**

Поширення вірусів у біосфері. Вірусні хвороби та механізми їх поширення. Переносники. Імунітет при вірусних інфекціях.

**Тема 11. Віруси у біотехнології**

Використання вірусів у якості векторів для здійснення генно-інженерних маніпуляцій. Використання бактеріофагів як діагностичних, профілактичних та лікувальних препаратів.

Препарати для сільського господарства на основі вірусів: захист рослин від шкідників. Розробка противірусних вакцин та вакцини з використанням вірусів.



# ЗМІСТОВИЙ МОДУЛЬ 1 ПРЕДМЕТ І ЗАВДАННЯ ВІРУСОЛОГІЇ

*Лабораторне заняття №1*

## ОРГАНІЗАЦІЯ ВІРУСОЛОГІЧНИХ ЛАБОРАТОРІЙ. ЕЛЕКТРОННА МІКРОСКОПІЯ.

**Мета роботи:** ознайомитися з принципами організації вірусологічних лабораторій, принципами класифікації вірусів за ступенем біологічної небезпеки, основними правилами роботи в базових вірусологічних лабораторіях, з'ясувати особливості електронної мікроскопії та застосування останньої у вірусологічних дослідженнях.

**Матеріали та обладнання:** методичні рекомендації до лабораторної роботи.

### 1. Основні теоретичні відомості.

Основні правила організації вірусологічної лабораторії базуються на загальних біологічних властивостях вірусів як неклітинної форми життя.

**Віруси** є автономними генетичними структурами, які можуть функціонувати та репродукуватися в сприйнятливих до них клітинах. Мають субмікроскопічні розміри, облігатні внутрішньоклітинні паразити.

Ці визначення відображають дві суттєві властивості вірусів: *по-перше*, наявність у вірусу свого генетичного матеріалу, який використовує біохімічний апарат клітини-господаря, та, *по-друге*, існування у вірусів позаклітинної інфекційної фази, яка представлена спеціалізованими частками, або **віріонами**, які репродукуються під генетичним контролем даного вірусу і слугують для введення геному вірусу в інші клітини. Перша властивість наголошує на внутрішньоклітинний паразитизм вірусу, однак він властивий не лише вірусам. У визначенні вірусів підкреслюється особлива природа паразитизму, який можна назвати паразитизмом на генетичному рівні. Виходячи з цього, *по-перше*, робота з вірусами має проводитись у стерильних умовах, а *по-друге*, улаштування сучасної вірусологічної лабораторії має максимально забезпечувати ефективні заходи щодо запобігання виходу вірусів в оточуюче середовище і зараження персоналу та населення вірусними інфекціями.

При роботі у вірусологічній лабораторії необхідно суворо дотримуватися правил асептики та антисептики.

**Асептика** – система профілактичних заходів та прийомів, які попереджають потрапляння мікроорганізмів та вірусів з оточуючого середовища в організм людини і досліджуваний матеріал, і спрямовані на створення безмікробних умов для запобігання зараженню. Вона передбачає використання стерильних інструментів та матеріалів, обробку рук, дотримання особливих санітарно-гігієнічних правил та прийомів роботи.

**Антисептика** – комплекс заходів, спрямованих на хімічне та біологічне знешкодження хвороботворних та інших мікроорганізмів та вірусів, щоб

запобігти зараженню при попаданні на ушкоджені і неушкоджені ділянки шкіри та слизових оболонок.

При роботі з вірусомісним матеріалом необхідно забезпечити виконання таких вимог:

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

Розподіл вірусів на групи за ступенем їхньої небезпеки для людини дозволяє розділити лабораторії на категорії в залежності 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.

Всесвітня Організація Охорони Здоров'я ("Руководство по биологической безопасности в лабораторных условиях", 1985) запропонувала розділити вірусологічні лабораторії на 3 категорії:

**1) базові лабораторії** (основні або загального типу); в зв'язку з конкретними особливостями роботи вони можуть бути обладнані різними захисними засобами та устаткуванням. Це – лабораторії учбові, служби охорони здоров'я, лікарень, діагностичні лабораторії, університетські лабораторії. В них працюють зі **збудниками інфекції III** (віруси лімфоцитарного хориомеїнігіту, грипу, поліомієліту, вісповакцини, енцефаломіокардиту) та **IV груп** (ентеровіруси, риновіруси, аденовіруси, коронавіруси, реовіруси, віруси парагрипу, епідемічного паротиту, кору, червоної висипки, везикулярного стоматиту, герпесу, вітряної віспи, цитомегалії людини), вірусами рослин та бактерій. **2) Режимні лабораторії** (ізольовані) або лабораторії утримання. Це – спеціальні діагностичні лабораторії, де працюють зі **збудниками інфекцій II групи**, а саме арбовірусами, аренавірусами, які не увійшли в I групу, вірусами сказу (дикий штам) та натуральної віспи, вірусами гепатитів B та C, ВІЛ. **3) Лабораторії особливого режиму** (максимально ізольовані) або лабораторії максимального утримання. Це – лабораторії для роботи з особливо небезпечними **патогенними вірусами I групи**, такими як: віруси геморагічних гарячок Ебола та Марбург (родина філовірусів), Ласса, Хунін та Мачупо (родина аренавірусів).

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

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 призвести до неспроможності працювати з мікроскопами, оптичними та аналітичними приладами. Не можна розмішувати 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 та виходом.

Площа лабораторії повинна відповідати санітарній нормі – 14 м<sup>2</sup> в середньому на одного працівника. Приміщення повинні бути достатньо просторими для безпечного проведення лабораторних досліджень з шириною проходів до робочих місць 1,5 м.

В структурі базової вірусологічної лабораторії обов'язковими є такі підрозділи: мийна, стерилізаційна та препаратозна кімнати, кімнати для вирощування культур клітин, для серологічних досліджень, віварій. В залежності від умов роботи вірусологічної лабораторії доцільно мати термальні та морозильні кімнати. Мийна кімната площею біля 10 м<sup>2</sup>, з розрахунку 5 м<sup>2</sup> на одного працівника, повинна мати прилади для миття посуду та прання білизни, раковини з гарячою та холодною водою, столи, газові та електричні плити, сушильні шафи. Посуд та інструментарій, забруднені інфекційним матеріалом, миють після знезараження дезінфекційними речовинами.

В стерилізаційній кімнаті розташовані дистилятор, автоклав, парові стерилізатори, сушильні шафи та інша апаратура для сушіння та стерилізації посуду, інструментарію, одягу, живильних середовищ, води, буферних розчинів. Для кожного парового стерилізатора за правилами техніки безпеки треба відводити площу 7,5 м<sup>2</sup>.

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, інвентаря 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 або молочного скла, оскільки віруси інактивуються прямим сонячним світлом. Ці кімнати повинні складатися з двох відділень – боксу площею не менше 9 м<sup>2</sup> та передбокснику площею біля 4 м<sup>2</sup>, розділених скляною перегородкою з розсувними, а не на петлях дверима, для економії площі та для того, щоб уникнути коливань повітря та запобігти зайвому попаданню повітря в бокс.

**Обладнання вірусологічних лабораторій** Крім устаткування та посуду, який використовується в 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°C до -170°C. Це – камери глибокого та надглибокого заморожування (- 30°C, -170°C), холодильні камери (-20°C), холодильники (+4°C), холодильні кімнати з внутрішньою температурою до +4°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 їх 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 та курячих ембріонів і для відбору вірусомісного матеріалу потрібний набір різних спеціальних інструментів – шприци різних розмірів (туберкулінові на 1 мл, Люера на 2, 5, 10, 20 мл), голки, шпателі, 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 бюкси, бактеріальні фільтри, скляний посуд (бажано з боросилікатного скла); матраси, чашки Карреля, пробірки Лейтона та інший скляний та пластмасовий посуд для вирощування культур клітин, флакони, склянки, колби різного об'єму зі шліфами та без них, круглодонні та плоскодонні, конічні (Ерленмейера), 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, ексикатори, воронки, мірні циліндри.

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

В лабораторії у 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 чорнила для скла, фільтрувальний папір, лейкопластир, тощо.

Значна кількість всього описаного обладнання використовується у стерильному вигляді. Для цього, згідно різних методів 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.

### **Правила роботи в учбових вірусологічних лабораторіях**

1. Вхід у вірусологічну лабораторію дозволяється 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 забороняється приносити особисті речі, палити, приймати їжу та зберігати продукти і воду, користуватися косметикою.
5. Проводити відсмоктування інфекційного матеріалу тільки за допомогою автоматичних та напівавтоматичних піпеток чи гумових балонів. Категорично забороняється всмоктувати в піпетку досліджуваний матеріал ротом.
6. Для виключення випадкових уколів вміло та обережно користуватися шприцями та голками під час зараження курячих ембріонів та 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 при необхідності продезінфікувати їх спиртом.
10. Забороняється викидати та виливати відходи у каналізаційну мережу.
11. При аварії під час роботи з вірусомісним матеріалом обов'язково попередити викладача або лаборанта.

### **2. Практичні завдання**

1. Ознайомитися з вірусологічною лабораторією кафедри 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. Зафіксувати в учбових альбомах основні типи посуду, інструментарію, приладів та обладнання, які використовуються у вірусологічній лабораторії.

5. Вивчити особливості електронної мікроскопії і її можливості при вивченні морфології і ультраструктури вірусів. Ознайомитися з наведеною нижче характеристикою методу електронної мікроскопії. На рис. 1.1 зображено просвічуючий електронний мікроскоп (зовнішній вигляд та схема).

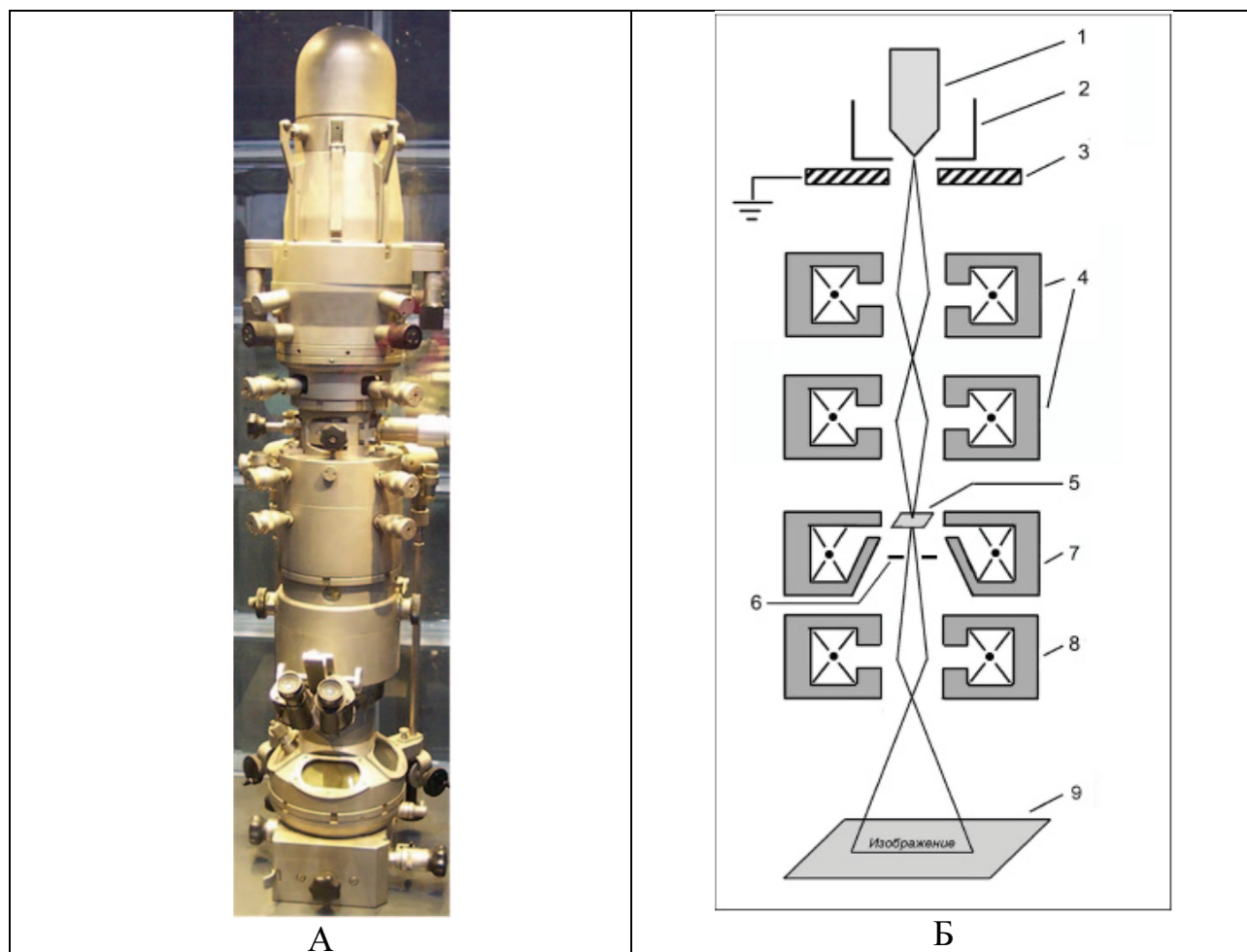


Рис. 1.1. Зовнішній вигляд (А) та схема (Б) просвічуючого електронного мікроскопа: 1 – катод; 2 – фокусуєчий циліндр; 3 – анод; 4 – перша та друга конденсорні лінзи; 5 – зразок; 6 – апертурна діафрагма; 7 – лінза-об'єктив; 8 – проєкційна лінза; 9 – катодолюмінісцентний екран.

*Електронна мікроскопія.* Теоретично роздільна здатність просвітлюючого електронного мікроскопу складає 0,002 нм; реальна роздільність сучасних мікроскопів наближається до 0,1 нм. На практиці роздільність для біологічних об'єктів досягає 2 нм. В електронному мікроскопі віруси ідентифікують за тонкими деталями їхньої ультраструктури. З цією метою одержують мікрофотографії. Для цього вірусомісний матеріал суспендують в добре випаровуваному середовищі і наносять на сітку з підкладкою, що являє собою плівку із колодія чи чистого вуглецю, яка слабо поглинає електрони. Покращення електронно-мікроскопічного зображення вірусів досягається збільшенням їхньої електронної щільності шляхом впливу на них парів чотирьохоксику осмію. Широко використовуються також методи напилення на вірусомісні матеріали важких металів (золото, паладій, уран). Конфігурація

віріонів чітко відбивається на матрицях-репліках сухих пластмасових плівок, розчином яких вони заливаються.

Симетрію і розподіл білкових субодиниць в блоці-ансамблі вірусних кристалів вивчають за допомогою рентгеноструктурного аналізу.

Просвічуючий електронний мікроскоп (рис.1.1) складається із колони, через яку у вакуумі проходять електрони, що випромінюються катодною ниткою. Пучок електронів, що фокусується кільцевими магнітами, проходить крізь підготовлений зразок. Характер розсіювання електронів залежить від щільності зразка. Електрони, що проходять через зразок, спостерігають на катодолномінісцентному екрані та реєструють за допомогою фотопластинки.

Скануючий (растровий) електронний мікроскоп РЕМ застосовують для одержання тривимірного зображення поверхні досліджуваного об'єкта.

### **Висновки:**

---

---

---

---

### **Контрольні питання 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. 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. Гудзь С.П., Перетятко Т.Б., Галушка А.А. Вірусологія: підручник: [для студ. закл. вищ. осв.]/ С.П. Гудзь, Т.Б. Перетятко, А.А. Галушка. - Львів: ЛНУ імені Івана Франка, 2018. – 536 с. – (Серія «Біологічні студії»).
2. Гудзь С.П., Перетятко Т.Б., Павлова Ю.О. Загальна вірусологія. - Львів: Видавничий центр ЛНУ імені Івана Франка, 2010. – 264 с.
3. Посібник з медичної вірусології / під ред. В.М. Гиріна. – К.: Здоров'я, 1995. – 367 с.
4. Практикум із загальної вірусології / за ред. А.Л. Бойка.– К.: Видавничий центр „Київський університет”, 2000. – 269 с.



## ЗМІСТОВИЙ МОДУЛЬ 2 ОСОБЛИВОСТІ БУДОВИ, КЛАСИФІКАЦІЇ ТА ХІМІЧНОГО СКЛАДУ ВІРУСІВ.

*Лабораторне заняття №2*

### МОРФОЛОГІЯ ТА УЛЬТРАСТРУКТУРА ВІРУСІВ

**Мета роботи:** вивчити особливості морфології і ультраструктури вірусів.

**Матеріали та обладнання:** роздатковий матеріал (мікрофотографії вірусів), методичні рекомендації до лабораторної роботи.

#### 1. Основні теоретичні питання, що підлягають вивченню.

1. Загальна характеристика вірусів, їх основні властивості.
2. Класифікація вірусів. Принципи, покладені в основу класифікації.
3. Морфологія і ультраструктура віріона.
4. Хімічний склад вірусів: нуклеїнові кислоти, білки, ліпіди, полісахариди. Їх особливості та функції.
5. Типи симетрії вірусів (кубічний, спіральний, змішаний). Взаємодія білків і нуклеїнових кислот при упаковці геномів вірусів (утворення нуклеокапсида).
6. Репродукція вірусів у процесі взаємодії їх з клітиною. Основні етапи взаємодії вірусів з клітинами при продуктивній інфекції.
7. Інтегративний та абортивний типи взаємодії вірусів з клітиною господаря.
8. Персистенція вірусу в клітинах.
9. Інтерференція вірусів, дефектні інтерферуючі частки.
10. Використання мікроскопії для виявлення вірусів і вивчення їхньої структури.

#### 2. Основні теоретичні відомості.

**Віруси** - особливе царство організмів ультрамікроскопічних розмірів, що мають тільки один тип нуклеїнових кислот, позбавлені власних систем синтезу білка і мобілізації енергії і тому є абсолютними внутрішньоклітинними паразитами. У 1892 р. російський учений-ботаник Д.І. Івановський, вивчаючи мозаїчну хворобу листя тютюну, встановив, що захворювання це викликається найдрібнішими мікроорганізмами, які проходять через дрібнопористі бактеріальні фільтри. Ці мікроорганізми отримали назву вірусів (від лат. *virus* - отрута). Великий внесок у вивчення вірусів внесли вірусологи: М.А. Морозов, М.Ф. Гамалея, Л.О. Зільбер, М.П. Чумаков, А.О. Смородінцев, В.М. Жданов і ін.

**Віруси** - найдрібніші мікроби («агенти, що фільтруються»), що не мають клітинної будови, білоксинтезуючої системи, що містять один тип нуклеїнової кислоти (тільки ДНК або РНК). Віруси, як облігатні внутрішньоклітинні паразити, репродукуються в цитоплазмі або ядрі клітини. Вони є автономними генетичними структурами і відрізняються особливим, роз'єднаним (диз'юнктивним), способом реплікації (репродукції): у клітині окремо синтезуються нуклеїнові кислоти вірусів і їх білки, потім відбувається їх збірка у вірусні частинки. Сформована вірусна частинка називається **віріоном**.

Основними властивостями вірусів є:

1. Ультрамiкроскопiчнi розмiри;
2. Вмiст нуклеїнової кислоти тiльки одного типу (ДНК або РНК);
3. Вiдсутнiсть здатностi до зростання i бiнарного подiлу;
4. Реплiкацiя шляхом вiдтворення себе з власної нуклеїнової кислоти генома;
5. Вiдсутнiсть власних систем мобiлiзацiї енергiї;
6. Вiдсутнiсть бiлок-синтезуючих систем;
7. Вiруси - абсолютнi внутрiшньоклiтиннi паразити.

Морфологiю i структуру вiрусiв вивчають за допомогою електронної мiкроскопiї, оскiльки їх розмiри малi i порiвнянi з товщиною оболонки бактерiй. Розрiзняють просто влаштованi вiруси (наприклад, вiруси полiомiєліту, гепатиту А) i складно влаштованi вiруси (наприклад, вiруси кору, грипу, герпесу, коронавiруси). У просто влаштованих вiрусiв нуклеїнова кислота пов'язана з бiлковою оболонкою, яка називається капсидом (вiд лат. capsula - футляр). Капсид складається з повторюваних морфологiчних суб'єдиниць - капсомерiв. Нуклеїнова кислота i капсид взаємодiють один iз одним i разом називаються нуклеокапсидом. У складно влаштованих вiрусiв капсид оточений лiпопротеїновою оболонкою - суперкапсидом, або пеплосом. Оболонка вiрусу є похiдною структурою вiд мембран вiрус-iнфiкованої клiтини. На оболонцi вiрусу розташованi глікопротеїновi «шпильки», або «шипики» (пепломери, або суперкапсиднi бiлки). Пiд оболонкою деяких вiрусiв знаходиться М-бiлок. Таким чином, **просто влаштованi вiруси складаються з нуклеїнової кислоти i капсида. Складно влаштованi вiруси складаються з нуклеїнової кислоти, капсида i лiпопротеїнової оболонки.** Вiріони мають спiральний, iкосаедричний (кубiчний) або складний тип симетрiї капсида (нуклеокапсида). Спiральний тип симетрiї обумовлений гвинтоподiбною структурою нуклеокапсида (наприклад, у вiрусiв грипу, коронавiрусiв). Iкосаедричний тип симетрiї обумовлений утворенням iзометричного порожнистого тiла з капсида, що мiстить вiрусну нуклеїнову кислоту (наприклад, у вiруса герпесу). Капсид i оболонка (суперкапсид) захищають вiріони вiд дiї навколишнього середовища, обумовлюють вибiркову взаємодiю (адсорбцiю) з певними клiтинами, а також антигеннi i iмуногеннi властивостi вiріонiв. Внутрiшнi структури вiрусiв називають серцевиною. У аденовiрусiв серцевина складається з гiстоноподiбних бiлків, пов'язаних з ДНК, у реовiрусiв - з бiлків внутрiшнього капсида. Форма вiріонiв може бути рiзною: паличкоподiбною (ортомiксовiруси, парамiксовiруси, коронавiруси), кулеподiбною (рабдовiруси), сферичною (вiруси полiомiєліту, ВІЛ, аденовiруси), ниткоподiбною (фiловiруси), у виглядi сперматозоїда (бактеріофаги).

Розмiри вiрусiв визначають за допомогою електронної мiкроскопiї, методом ультрафiльтрацiї крiзь фiльтри з вiдомим дiаметром пор, методом ультрацентрифугування. Найбiльш дрiбними вiрусами є парвовiруси (18 нм) i вiрус полiомiєліту (близько 20 нм), найбiльш великим - вiрус натуральної вiспи (близько 350 нм).

Розрізняють віруси, що містять ДНК або РНК. Вони зазвичай гаплоїдні, тобто мають один набір генів. Виключенням є ретровіруси, що мають диплоїдний геном. Геном вірусів містить від шести до декількох сотень генів і представлений різними видами нуклеїнових кислот: двонитковими, одностовковими, лінійними, кільцями, фрагментованими. Серед РНК-вмісних вірусів розрізняють віруси з позитивним (плюс-нитка РНК) геномом. Плюс-нитка РНК цих вірусів виконує спадкову (геномну) функцію і функцію інформаційної РНК (іРНК). Є також РНК-вмісні віруси з негативним (мінус-нитка РНК) геномом. Мінус-нитка РНК цих вірусів виконує тільки спадкову функцію. Геном вірусів здатний включатися в геном клітини у вигляді провіруса, проявляючи себе генетичним паразитом клітини. Нуклеїнові кислоти деяких вірусів, наприклад, вірусів герпесу, можуть знаходитися в цитоплазмі інфікованих клітин, нагадуючи плазмід.

У вірусології використовують наступні таксономічні категорії: родина (назва закінчується на *viridae*), підродина (назва закінчується на *virinae*), рід (назва закінчується на *virus*). Проте назви родів і особливо підродин є не для всіх вірусів.

У основу класифікації вірусів покладені наступні категорії:

- тип нуклеїнової кислоти (ДНК або РНК), її структура,
- кількість ниток (одна або дві),
- особливості відтворення вірусного генома,
- розмір і морфологія віріонів,
- кількість капсомерів і тип симетрії нуклеокапсида,
- наявність оболонки (суперкапсида),
- чутливість до ефіру і дезоксихолату,
- місце репродукції в клітині,
- антигенні властивості і ін.

Іншими незвичайними агентами, близькими до вірусів, є **віроїди** - невеликі молекули кільцевої РНК, що суперспіралізована, вони не містять білка і викликають захворювання рослин.

Розрізняють **три типи взаємодії вірусу з клітиною**: продуктивний, абортивний і інтеграційний. **1. Продуктивний тип** - завершується утворенням нового покоління віріонів і загибеллю (лізисом) заражених клітин (цитолітична форма). Деякі віруси виходять з клітин, не руйнуючи їх (нецитолітична форма). **2. Абортивний тип** - не завершується утворенням нових віріонів, оскільки інфекційний процес в клітині переривається на одному з етапів. **3. Інтеграційний тип, або вірогенія** - характеризується вбудовуванням (інтеграцією) вірусної ДНК у вигляді провіруса в хромосому клітини і їх сумісним співіснуванням (сумісна реплікація).

### **Репродукція вірусів**

I. Продуктивний тип взаємодії вірусу з клітиною, тобто репродукція вірусу (лат. *re* - повторення, *productio* - виробництво), проходить у 6 стадій:

- 1) адсорбція віріонів на клітині;
- 2) проникнення вірусу в клітину;
- 3) «роздягання» і вивільнення вірусного генома (депротеїнізація вірусу);
- 4) синтез вірусних компонентів;
- 5) формування віріонів;
- 6) вихід віріонів із клітини.

II. Абортивний тип взаємодії вірусів з клітиною. Цей тип взаємодії не завершується утворенням вірусного потомства і може виникати при наступних обставинах:

- 1) зараження чутливих клітин дефектними вірусами або дефектними віріонами;
- 2) зараження стандартним вірусом генетично резистентних до нього клітин;
- 3) зараження стандартним вірусом чутливих клітин в непермісивних (що не дозволяють) умовах.

Розрізняють **дефектні віруси, дефектні віріони і псевдовіріони.**

Дефектні віруси існують як самостійні види, які репродукуються лише за наявності вірусу-помічника (наприклад, вірус гепатиту D репродукується тільки у присутності вірусу гепатиту В). Дефектні віріони зазвичай позбавлені частини генетичного матеріалу і можуть накопичуватися в популяції багатьох вірусів при множинному зараженні клітин. Псевдовіріони - це віруси, в капсид яких поміщена нуклеїнова кислота клітини господаря, а не вірусна нуклеїнова кислота.

III. Інтеграційний тип взаємодії вірусів з клітиною (вірогенія). Це взаємне співіснування вірусу і клітини в результаті інтеграції нуклеїнової кислоти вірусу в хромосому клітини господаря. При цьому інтегрований геном вірусу реплікується і функціонує як складова частина генома клітини.

### **3. Практичні завдання**

1. Заповніть протокол лабораторної роботи №2.
2. Вивчіть морфологічні та структурні особливості вірусів. Розгляньте електронні мікрофотографії вірусів (демонстраційний матеріал): аденовіруси, вірус гепатиту А, вірус грипу, вірус герпесу, вірус поліомієліту. Знайдіть відповідність структурних елементів віріона віспи на схемі і фотографії.
3. З'ясуйте основні етапи взаємодії вірусу з чутливими клітинами. Заповніть таблицю «Особливості синтезу вірусних білків та реплікації нуклеїнових кислот в залежності від структури генома».
4. Замалюйте в протоколі основні морфологічні типи віріонів.
5. Замалюйте в протоколі етапи взаємодії віріону з чутливими клітинами і реплікацію.

### **Протокол лабораторної роботи №2**

**I. Дайте визначення основним поняттям; перерахуйте структурні компоненти вірусів; вкажіть морфологічні і біологічні особливості вірусів.**

1. Віруси – це

---

---

2. Основні властивості вірусів:

- 1)
- 2)
- 3)
- 4)
- 5)
- 6)
- 7)

3. Дайте назву і охарактеризуйте форми існування вірусів:

1) позаклітинна форма

2) внутрішньоклітинна форма

4. Віроїд – це

6. Відмінності віроїдів від вірусів:

- 1)
- 2)
- 3)

6. Один із найбільших вірусів -

7. Під архітектурою віріонів розуміють

8. Капсид –

9. Капсомер –

10.Протомер –

11. Нуклеокапсид –

12. Суперкапсид –

**II. Виконайте наступні завдання.**

1. Назвіть типи симетрії вірусів. Заповніть таблицю 2.1.

Таблиця 2.1

**Типи симетрії вірусів**

	Тип симетрії	Особливості будови	Представники
1			
2			
3			

2. Зазначте структурні елементи віріонів наведених на рисунку 2.1.

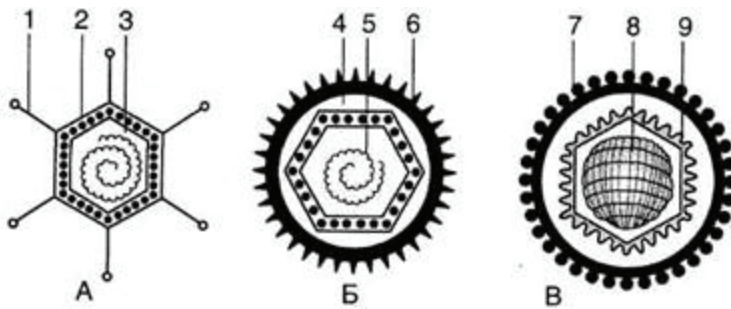


Рис. 2.1. Схематичне зображення структури деяких ікосаедричних вірусів із складним капсидом:

А – аденовірус

1 –

2 –

3 –

Б – вірус герпесу

4 –

5 –

б –

В – вірус саркоми Рауса

7 –

8 –

9 –

3. Розкрийте характер взаємодії між білком і нуклеїновою кислотою при упаковці генома віруса за відповідного типу симетрії нуклеокапсида:

1) Кубічний

---

---

2) Спіральний

---

---

3) Подвійний

---

---

**III. Вкажіть хімічний склад вірусів і функції окремих класів хімічних сполук.**

1. Зазначте хімічну природу компонентів вірусних частинок:

1)

---

2)

---

3)

---

2. Вкажіть функції нуклеїнових кислот:

---

---

3. Вкажіть функції білкових компонентів віріонів:

1) структурні білки –

---

---

2) білки-ферменти –

---

---

а) віріонні ферменти –

---

---

б) вірусіндуковані ферменти –

---

---

3) Глікопротеїни –

---

---

---

---

4) F-білки –

---

---

5) M-білки –

---

---

4. Назвіть функції ферментів:

а) ферменти нуклеїнового обміну і посттрансляційного процесингу та модифікації білків

*ДНК-залежна ДНК-полімераза –*

---

*ДНК-залежна РНК-полімераза –*

---

*РНК-залежна РНК-полімераза –*

---

*Обернена транскриптаза –*

---

*Хеліказа –*

---

мРНК-модифікуючі ферменти:

*полі-А-полімераза –*

---

*кеп-ензим –*

---

*АТФ-аза, ГТФ-аза –*

---

*Рибонуклеаза H –*

---

б) ферменти білкового обміну:

*Протеїнази*

---

*Протеїнкінази*

---

5. Зазначте функції ліпідів:

---

---

**IV.** Розгляньте електронну мікрофотографію віріона віспи (роздатковий матеріал) і знайдіть відповідність структурних елементів на схемі і фотографії. Замалюйте схему будови віріона віспи і вкажіть серцевину, капсид, суперкапсид, фрагмент захопленої віріоном плазмолемі.



V. Заповніть таблицю 2.2.

Таблиця 2.2

**Особливості синтезу вірусних білків та реплікації нуклеїнових кислот в залежності від структури генома**

ДНК-віруси	Одноланцюгові	
	Дволанцюгові	
РНК-віруси	Одноланцюгові +РНК- геноми	
	Одноланцюгові - РНК-геноми	
	Ретровіруси	

**Висновок:**

---

---

---

---

---

---

---

---

**Контрольні питання.**

1. Які форми існування розрізняють у вірусів?

2. Які властивості характеризують віруси як особливе царство ультрамікроскопічних організмів?
3. Наведіть приклади різноманітності морфології вірусів.
4. Назвіть структурні елементи простих і складних вірусів.
5. Що є морфологічною і структурною одиницею капсиду?
6. Яке походження має суперкапсид складних вірусів?
7. Дайте характеристику кубічному, спіральному та змішаному типам симетрії і наведіть приклади вірусів з цими типами симетрії.
8. Які функції виконує капсид і суперкапсид?
9. Назвіть білкові структури вірусної частинки і їхні функції.

### **Матеріали для самоконтролю:**

#### **Тести:**

1. Зазначте, що покладено в основу класифікації вірусів:

- А. Все перераховане.
- Б. Тип нуклеїнової кислоти.
- В. Вміст пар гуанін/цитозин.
- Г. Тип симетрії віріонів.
- Д. Наявність або відсутність суперкапсиду.

2. Вкажіть, що є структурним елементом вірусної оболонки:

- А. Капсомер.
- Б. Пептомер.
- В. Гемаглютинін.
- Г. Шипи.
- Д. Нейрамінідаза.

3. Зазначте, яких компонентів не містять віруси:

- А. Спори.
- Б. РНК.
- В. Капсиду
- Г. ДНК.
- Д. Суперкапсиду.

4. У хворої з діагнозом “рак шийки матки” за допомогою ПЛР лікар виявив вірус папіломи людини типу 16 (ВПЛ-16), який, як відомо, інтегрує свою ДНК у геном клітини хазяїна. Яку назву має вірус, який інтегрував у геном клітини?

- А. Провірус. Г. Віроїд
- Б. Віріон. Д. Пріон
- В. Вірусоїд.

## *Література*

1. Гудзь С.П., Перетятко Т.Б., Галушка А.А. Вірусологія: підручник: [для студ. закл. вищ. осв.]/ С.П. Гудзь, Т.Б. Перетятко, А.А. Галушка. - Львів: ЛНУ імені Івана Франка, 2018. – 536 с. – (Серія «Біологічні студії»).
2. Гудзь С.П., Перетятко Т.Б., Павлова Ю.О. Загальна вірусологія. - Львів: Видавничий центр ЛНУ імені Івана Франка, 2010. – 264 с.
3. Посібник з медичної вірусології / під ред. В.М. Гиріна. – К.: Здоров'я, 1995. – 367 с.
4. Практикум із загальної вірусології / за ред. А.Л. Бойка.– К.: Видавничий центр „Київський університет”, 2000. – 269 с.

## МЕТОДИ ВИДІЛЕННЯ, КУЛЬТИВУВАННЯ ТА ІДЕНТИФІКАЦІЇ ВІРУСІВ

**Мета заняття:** вивчити принципи і методи виділення, культивування вірусів на курячих ембріонах, методи культивування клітин та тканин тварин *in vitro*; використання клітинних культур у вірусології.

**Матеріали та обладнання:** роздатковий матеріал (фотографії та рисунки цитопатичної дії вірусів), відеоматеріали, методичні рекомендації до лабораторної роботи.

### 1. Основні теоретичні питання, що підлягають вивченню.

1. Етапи лабораторних досліджень при діагностиці вірусних інфекцій.
2. Використання курячих ембріонів для виділення і культивування вірусів.
3. Культура клітин.
4. Використання культури клітин для виділення вірусів і одержання їх чистих культур.
5. Використання лабораторних тварин як біологічних моделей для виділення і культивування вірусів (Доповідь з презентацією).
6. Ідентифікація вірусів в курячому ембріоні і на лабораторних тваринах.
7. Методи ідентифікації вірусів.

### 2. Основні теоретичні відомості.

Незважаючи на велике різноманіття експериментальних об'єктів, головними серед них у вірусології залишаються лабораторні тварини, курячі ембріони, культури тваринних та рослинних клітин, рослини-індикатори та бактеріальні культури. Відповідно, при дослідженні вірусів людини та тварин найчастіше застосовуються модельні системи із залученням лабораторних тварин, курячих ембріонів та культур тваринних клітин.

#### Методи культивування вірусів.

Лабораторні дослідження при проведенні ідентифікації вірусів та діагностики вірусних інфекцій включають наступні етапи: виділення, культивування, індикація (виявлення) та ідентифікація вірусів.

Віруси не ростуть на штучних поживних середовищах, а розмножуються тільки внутрішньоклітинно. Великим досягненням була пропозиція Е. Гудпасчура в 1932 р. використовувати для культивування вірусів курячі ембріони. Остаточне вирішення проблеми культивування вірусів виявилось можливим лише після того, як були розроблені основні способи культивування клітин поза організмом.

**Використання курячих ембріонів.** Курячі ембріони – практично ідеальні моделі для культивування деяких вірусів (наприклад, грипу і кору). Ембріони застосовують для первинного виділення вірусів з патологічного матеріалу; для пасажування і збереження їх, а також для отримання необхідних кількостей вірусу. Деякі збудники (наприклад, герпесвіруси) викликають характерні зміни (за ними можна розпізнавати збудника).

Для зараження зазвичай використовують курячі ембріони 7-12-денного віку. Перед зараженням визначають життєздатність ембріона шляхом овоскопіювання (переглядають в світлі). Курячі ембріони заражають вірусомісним матеріалом в асептичних умовах стерильними інструментами, попередньо обробивши шкаралупу над повітряним простором йодом і спиртом. Зараження проводять на хоріон-аллантаїсну оболонку, в амніотичну або аллантаїсну порожнину, або в жовтковий мішок (рис.3.1). Вибір методу зараження залежить від біологічних властивостей віруса.

**Культура клітин.** Спочатку був використаний метод переживаючих тканин. Він полягав у тому, що в колбу з поживним середовищем, вносили шматочок тканини. Клітини деяких тканин в таких умовах можуть переживати (але не розмножуватися) до 30 днів, а в них можуть розмножуватися віруси. Однак цей спосіб давав дуже невеликий вихід вірусів. Необхідно було розробити умови, за яких клітини тканини могли б вільно розмножуватися.

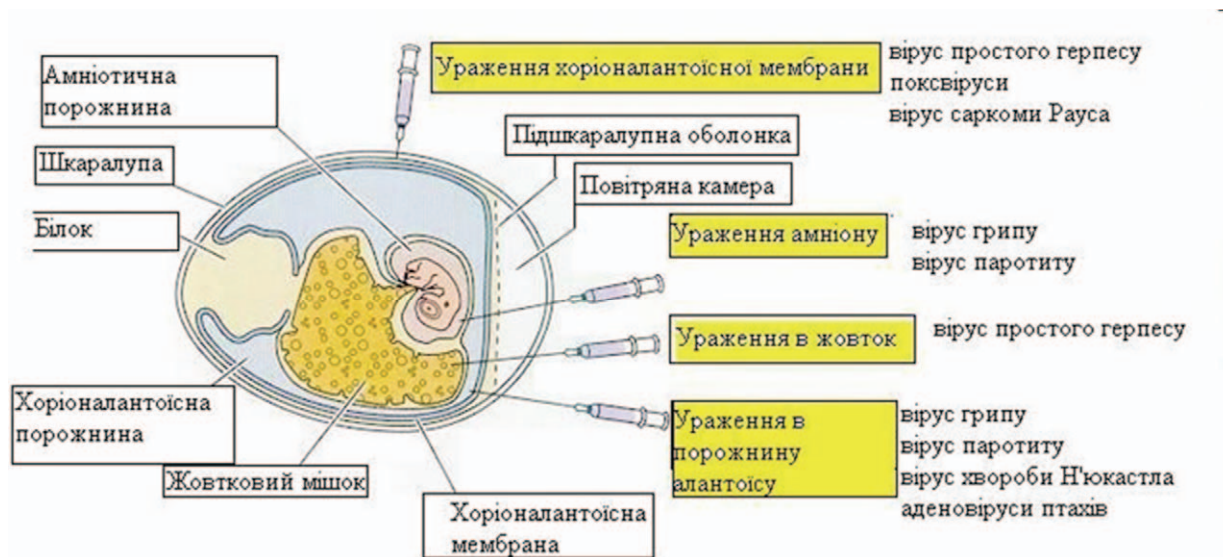


Рис.3.1. Схема будови курячого ембріону та способи його ураження

Для отримання культур клітин необхідно було вирішити чотири головних завдання:

- отримати в необхідній кількості вільні (ізолювані одна від одної) клітини;
- створити такі поживні середовища та умови, в яких клітини могли б активно розмножуватися;
- забезпечити умови, за яких в культурах клітин не могли б розмножуватися бактерії;
- визначити методи, за допомогою яких можна було б розпізнавати розвиток вірусу в культурі клітин і ідентифікувати його.

Для виділення ізолюваних (розз'єднаних), але життєздатних клітин із зруйнованих тканин, стали використовувати обробку їх слабким розчином трипсину, що руйнує міжклітинні містки. Для культивування клітин були запропоновані різні середовища, що містять всі необхідні для розмноження

клітин поживні речовини (амінокислоти, основи, вітаміни та інші), мінеральні солі, які мають оптимальне рН і т. д. До поживних середовищ додавали індикатор, за зміною кольору якого можна було судити про метаболізм клітин і їх розмноження. Було встановлено, що як основа, на якій клітини розмножуються і утворюють моношар, може бути використано добре оброблене скло пробірок і колб. Перед посівом вірусомісний матеріал стали обробляти антибіотиками для пригнічення можливого росту бактерій в культурі клітин.

У 1949 р Дж. Ендерс, Т. Веллер і Ф. Роббінс показали, що вірус поліомієліту добре розмножується в первинно-трипсинізованих культурах клітин, отриманих з нирок мавп. Основний недолік первинно-трипсинізованих клітин полягає в тому, що після кількох пересівань вони перестають розмножуватися. Тому перевагою стали користуватися культури таких клітин, які здатні розмножуватися *in vitro* нескінченно довго. Такі перещеплювальні культури клітин (клітинні лінії характеризуються безсмертям і гетероплоїдним каріотипом) отримують з пухлинних тканин (HeLa отримана з карциноми шийки матки, HEp-2 - з карциноми гортані; Детройт-6 - з метастазу раку легень в кістковий мозок; RH - з пухлини нирки людини) або з мутантних клітин з поліплоїдним набором хромосом. Однак пухлинні клітини не можна застосовувати для отримання вакцин. З цією метою використовують тільки культури таких клітин, які не містять жодних контамінантних вірусів і не володіють злоякісністю. Найкраще цим вимогам відповідають культури диплоїдних клітин.

Напівперещеплювані лінії клітин (диплоїдні) - клітини одного генотипу, здатні *in vitro* витримувати 50-100 пасажів, зберігаючи при цьому свій вихідний диплоїдний набір хромосом. Диплоїдні лінії фібробластів ембріона людини використовуються як для діагностики вірусних інфекцій, так і при виробництві вірусних вакцин. З'ясувалося, що віруси можуть розмножуватися не лише в культурах клітин, що утворюють моношар на склі пробірок, але і в суспензіях живих клітин.

Для забезпечення життєдіяльності культивованих клітин необхідні поживні середовища. За призначенням вони поділяються на ростові і підтримувальні. У ростових поживних середовищах повинно міститися більше поживних речовин, що забезпечують активне розмноження клітин і формування моношару. Підтримувальні середовища забезпечують переживання клітин у вже сформованому моношарі в період розмноження в них вірусів.

**Виділення вірусів в культурах клітин.** При виділенні вірусів із різних інфекційних матеріалів (кров, сеча, слизисті виділення, змиви з органів) застосовують культури клітин, що мають найбільшу чутливість до передбачуваного вірусу. Для зараження використовують культури в пробірках з добре розвиненим моношаром клітин. Перед зараженням клітин поживне середовище видаляють і в кожному пробірці вносять по 0,1-0,2 мл суспензії досліджуваного матеріалу, попередньо обробленого антибіотиками для знищення бактерій і грибів. Після 30-60 хв контакту вірусу з моношаром клітин

видаляють надлишок матеріалу, в культуру вносять підтримуюче середовище та залишають проби в термостаті до виявлення ознак розмноження вірусу.

**Виділення вірусів на лабораторних тваринах.** При неможливості виділити і ідентифікувати вірус стандартними методами *in vitro* інфекційний матеріал вводять чутливим до збудника тваринам, і після розвитку типового інфекційного процесу проводять повторне зараження чутливих клітинних культур. Найчастіше використовують мишей, кроликів і мавп; для виділення деяких вірусів (наприклад, вірусів Коксакі) заражають мишенят-сисунів. Внаслідок дорожнечі і складності утримання лабораторних тварин, практично скрізь їх витіснили клітинні культури. Проте тварин активно використовують для вивчення особливостей патогенезу та формування імунних реакцій при вірусних інфекціях.

Таким чином, для виділення чистих культур вірусів в лабораторних умовах в даний час використовуються наступні живі об'єкти (біологічні моделі): 1) культура клітин (тканин, органів); 2) курячі ембріони; 3) лабораторні тварини.

**Індикація вірусу в курячому ембріоні.** Індикація вірусу в курячому ембріоні проводиться за загибеллю ембріона, позитивною реакцією гемаглютинації на склі з аллантаїсною або амніотичною рідиною, за утворенням «бляшок» на хоріоналантаїсній оболонці.

**Індикація вірусів в культурах клітин.** Індикатором наявності вірусу в заражених культурах клітин може бути:

1) розвиток специфічної дегенерації клітин - цитопатична дія вірусу (ЦПД), що має три основних типи: велико- або дрібноклітинна дегенерація; утворення багатоядерних гігантських клітин (симпластів); розвиток осередків клітинної проліферації, що складаються з декількох шарів клітин (гроноподібна дегенерація клітин).

Розрізняють два механізми загибелі клітин, що викликається вірусами, - *некроз* і *апоптоз*. *Некроз* відбувається через незворотні порушення цілісності клітинних мембран, *апоптоз* - внаслідок фрагментації ядерної ДНК під дією клітинної ендонуклеази.

Цитопатичні ефекти оцінюють при мікроскопії клітинних культур. За ступенем ураження клітин виділяють віруси з високою або помірною цитопатогенністю:

2) виявлення внутрішньоклітинних включень, розташованих в цитоплазмі і/або в ядрах уражених клітин;

3) позитивна реакція гемаглютинації (РГА) або гемадсорбції (РГАдс). Деякі віруси, зокрема, вірус грипу, мають особливі рецептори (гемаглютиніни), за допомогою яких вони адсорбуються на еритроцитах і викликають їх склеювання (гемаглютинацію). Такі віруси легко виявляються за допомогою реакції гемаглютинації або гемадсорбції (еритроцити адсорбуються на інфікованих вірусами клітинах культури тканин);

4) феномен бляшкоутворення. Широке поширення набув запропонований в 1952 р. Р. Дульбекко метод бляшок (негативних колоній), що дозволяє здійснити кількісне визначення вірусів. Для виділення вірусів моношар клітин

після видалення поживного середовища заражають вірусомісним матеріалом і покривають шаром агару, що містить індикатор нейтральний червоний. Чашки (флакони) інкубують при 37°C. Через 48-96 год виявляються плями - бляшки. Вони мають діаметр 1-3 мм і виглядають незафарбованими на рожевому фоні. Плями виникають за рахунок цитопатичної дії вірусу;

5) кольорова реакція Солка. Про репродукцію вірусів в клітинах можна судити за допомогою індикатора, який додається до живильного середовища. Якщо клітини активно здійснюють метаболізм, рН середовища зсувається в кислий бік, і середовище забарвлюється в жовтий колір. У разі розмноження вірусу клітини гинуть, рН середовища мало змінюється, і воно зберігає первинний (малиновий) колір або (при нейтральному рН) набуває помаранчевого;

б) реакція інтерференції (використовується при відсутності ЦПД, гемаглютинації і гемадсорбції): досліджувана культура повторно заражається вірусом, що викликає ЦПД. У позитивному випадку ЦПД буде відсутня (реакція інтерференції позитивна). Якщо в досліджуваному матеріалі вірусу не було, спостерігається ЦПД.

Крім того, для виявлення вірусу в культурах клітин можуть бути використані різні серологічні реакції.

**Індикація вірусів на лабораторних тваринах.** Індикація вірусу базується на виявленні у тварин ознак інфекційного захворювання, реєстрації їх загибелі, вивченні характеру патоморфологічних і патогістологічних змін в тканинах і органах, виявленні позитивної реакції гемаглютинації.

У вірусологічних дослідженнях лабораторних тварин використовували раніше і використовують сьогодні з різними цілями:

- для безпосереднього виділення вірусів з оточуючого середовища;
- для виявлення (індикації) вірусу в патологічному матеріалі, тобто для проведення біологічної проби;
- для накопичення вірусів у значній кількості;
- для пасажування вірусів у лабораторних умовах з метою тривалого підтримання їх в активному стані;
- для титрування вірусів, тобто встановлення їх концентрації у патологічному матеріалі;
- для застосування їх в якості індикатора вільного 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 на рівні організму;
- для дослідження імунної відповіді організму на ураження вірусом.

В лабораторіях часто є потрібним підтримання вірусів протягом багатьох років в активному стані. По суті, підтримання вірусу є чергуванням пасажів вірусу на живих системах, в тому числі на лабораторних тваринах, та його збереженні в законсервованому стані. При будь-якому способі консервації



віруси з тією чи іншою швидкістю втрачають свою активність. Новий пасаж дозволяє її відновити. Під *пасажем* розуміють зараження чутливої тварини з метою отримання від неї нової популяції вірусу. Такий вірус в подальшому знову зберігають у консервуючих умовах.

При роботі з вірусом потрібно також знати його *інфекційний титр*, тобто його відносну концентрацію у матеріалі (під *титром* також розуміють таку мінімальну концентрацію вірусу, яка ще здатна викликати позитивну реакцію у 50% тест-об'єктів). Титр можна визначити за допомогою ураження чутливих модельних об'єктів різними розведеннями вірусомісного матеріалу. Іншими способами вираження відносної концентрації вірусу є інфекційна доза-50 (ID<sub>50</sub>), летальна доза-50 (LD<sub>50</sub>) та деякі інші. Відповідно до визначення титру, ID<sub>50</sub> є такою дозою вірусу, яка викликає специфічні прояви інфекційного захворювання у 50% інфікованих дослідних тварин. Аналогічно, LD<sub>50</sub> є такою дозою вірусу, що індукує загибель 50% інфікованих дослідних тварин.

#### 4. Практичні завдання

1. Ознайомтеся з будовою курячого ембріона за рисунками.
2. Охарактеризуйте вірусологічний метод дослідження, що базується на використанні курячих ембріонів.
3. Охарактеризуйте вірусологічний метод дослідження, що базується на використанні культури клітин.
4. З'ясуйте особливості використання тварин у вірусологічних дослідженнях. Запишіть етапи роботи з тваринами при виконанні вірусологічного експерименту.
5. Вивчіть методи індикації вірусів в культурі клітин.
6. Вивчіть механізми реакцій гемаглютинації та гемадсорбції.
7. Заповніть протокол лабораторної роботи №3.

#### Протокол лабораторної роботи №3

I. Продовжіть нижче наведені твердження.

1. Основні етапи лабораторних досліджень при діагностиці вірусних інфекцій:

- 1) \_\_\_\_\_
- 2) \_\_\_\_\_
- 3) \_\_\_\_\_
- 4) \_\_\_\_\_

2. Біологічні моделі, що використовуються для культивування вірусів:

- 1) \_\_\_\_\_
- 2) \_\_\_\_\_
- 3) \_\_\_\_\_

II. Дайте характеристику вірусологічного метода дослідження, що базується на використанні курячих ембріонів.

1. У вірусології курячі ембріони застосовують для:

- 1) \_\_\_\_\_
- 2) \_\_\_\_\_

3)

4)

5)

2. Індикація вірусів в курячому ембріоні відбувається за:

1)

2)

3)

**III.** Дайте характеристику вірусологічного метода дослідження, що базується на використанні культури клітин:

1. Метод переживаючих тканин полягає в тому, що

---

---

---

2. Основний недолік метода переживаючих тканин –

---

---

---

3. Метод первинно-трипсинізованих тканин полягає в тому, що

---

---

---

4. Основний недолік метода первинно-трипсинізованих тканин –

---

---

---

5. Напівперещеплювальна культура клітин – це

---

---

---

6. Напівперещеплювальна культура клітин використовується для:

1)

2)

7. Перещеплювальна культура клітин – це

---

---

---

8. Для одержання перещеплювальної культури клітин використовують:

---

---

---

9. Перещеплювальну культуру клітин не можна використовувати для:

---

---

---

---

---

10. Для забезпечення життєдіяльності культивуємих клітин необхідні живильні середовища:

1) —

---

---

2) —

---

---

11. Для попередження розвитку бактерій культуру клітин обробляють

---

---

12. Основні вимоги при виборі культури клітин для виділення вірусів -

---

---

---

---

13. Послідовність маніпуляцій при зараженні культури клітин вірусом

---

---

---

---

**IV.** Коротко опишіть методи індикації вірусів в культурі клітин.

Індикація вірусів в культурі клітин проводиться за:

1) цитопатичною дією віруса (ЦПД):

а)

---

---

б) —

---

---

в)

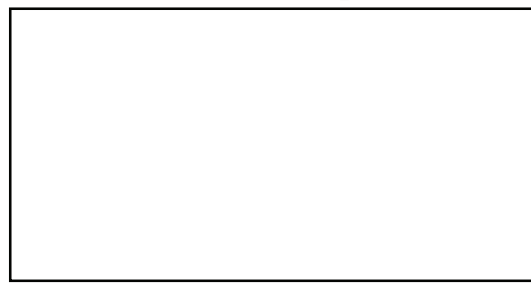
---

---

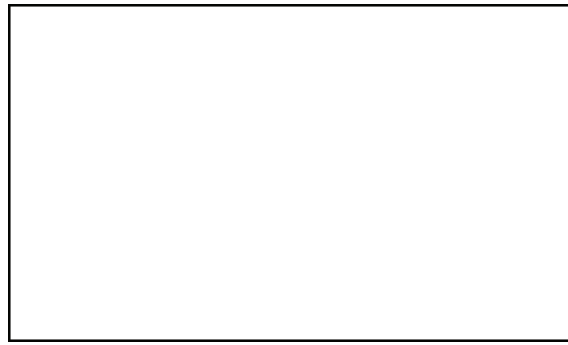
Зарисуйте перераховані типи цитопатичної дії вірусів:



А



Б



В

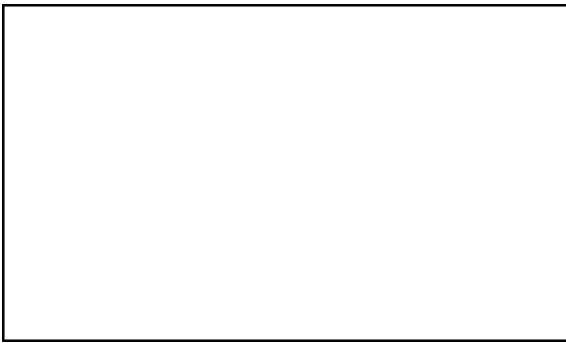
Рис. 3.2. Типи цитопатичної дії вірусів

А

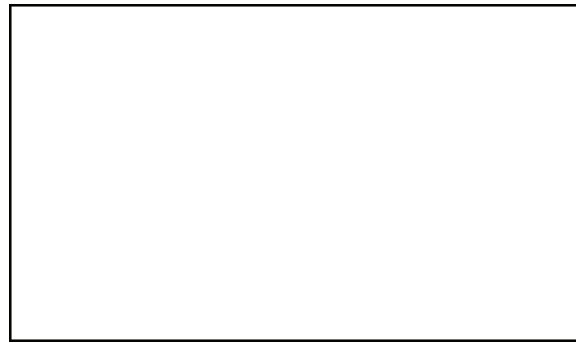
Б

В

- 2) наявністю внутрішньоклітинних включень, що розташовуються в цитоплазмі і/або в ядрах вражених клітин (зробіть відповідні рисунки).



А

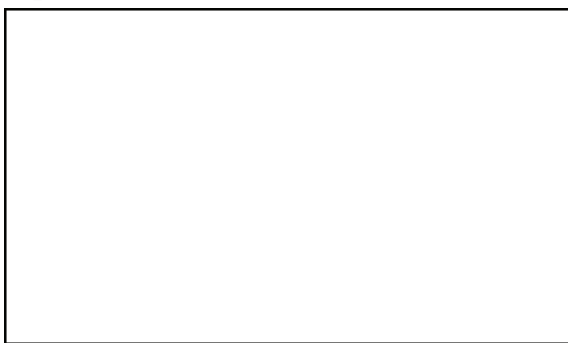


Б

Рис. 3.3. Внутрішньоклітинні включення вірусів

А – цитоплазматичні, Б – внутрішньоядерні

- 3) позитивною реакцією гемаглютинації (РГА) чи гемадсорбції (РГАдс) (зарисуйте)



А



Б

Рис. 3.4. Реакція гемаглютинації (А) та гемадсорбції (Б)

Вивчіть механізми реакцій гемаглютинації та гемадсорбції і коротко опишіть їх:

а) гемаглютинація – це

---

---

---

---

---

б) гемадсорбція – це

---

---

---

4) феноменом бляшкоутворення (феномен Дульбекко) (зарисуйте).

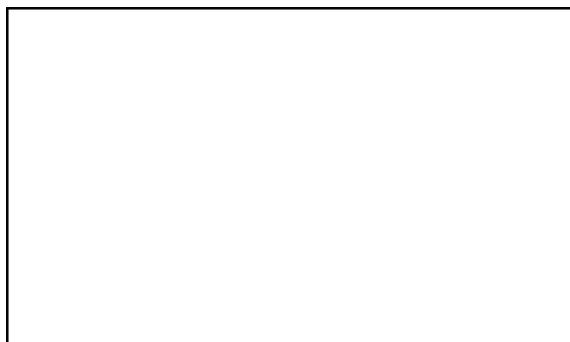


Рис. 3.5. Феномен бляшкоутворення.

5) кольоровою реакцією Солка. Розгляньте демонстрацію результатів кольорової реакції Солка, відобразіть результати на рисунку, зробіть висновок про наявність вірусу в культурі клітин.

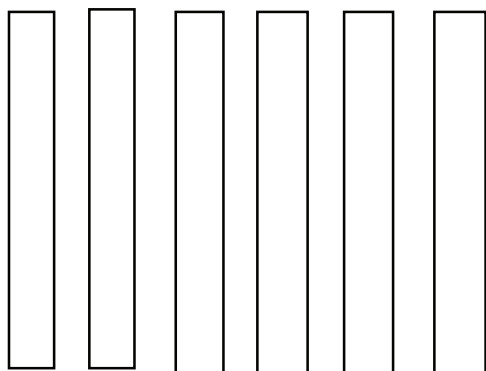


Рис. 3.6. Кольорова реакція Солка

Висновок:

---

б) реакцією інтерференції (використовується за відсутності ЦПД, гемаглютинації та гемадсорбції).

---

V. Зазначте головні критерії вибору тварин для вірусологічних досліджень.

1)

---

2)

---

1. Дайте характеристику тваринам, які використовуються у вірусологічних дослідженнях:

1) гнотобіоти – це

---

---

2) індикаторні тварини – це

---

---

2. Зазначте етапи роботи з тваринами при виконанні вірусологічного експерименту.

---

---

---

---

---

---

3. Методи ураження лабораторних тварин:

1) інтраназальний

2) інтравенозний

3) інтрамускулярний

4) інтраперитоніальний

5) інтрацеребральний

---

## **Висновок**

---

---

---

---

---

---

---

## **Контрольні питання.**

1. Які етапи включають в себе лабораторні дослідження при ідентифікації вірусів та діагностиці вірусних інфекцій?
2. Які біологічні моделі використовуються для виділення і культивування вірусів людини і тварин?
3. Як відбувається зараження курячих ембріонів в лабораторних умовах?
4. Які методи отримання культури клітин ви знаєте?
5. Як проводять ідентифікацію вірусів в курячому ембріоні і на лабораторних тваринах?

6. Які існують методи індикації вірусів на культурі клітин?
7. З якою метою використовують лабораторних тварин у вірусологічних дослідженнях?
8. Яким вимогам повинні відповідати тварини при вірусологічних дослідженнях?

### *Література*

1. Гудзь С.П., Перетятко Т.Б., Галушка А.А. Вірусологія: підручник: [для студ. закл. вищ. осв.]/ С.П. Гудзь, Т.Б. Перетятко, А.А. Галушка. - Львів: ЛНУ імені Івана Франка, 2018. – 536 с. – (Серія «Біологічні студії»).
2. Гудзь С.П., Перетятко Т.Б., Павлова Ю.О. Загальна вірусологія. - Львів: Видавничий центр ЛНУ імені Івана Франка, 2010. – 264 с.
3. Посібник з медичної вірусології / під ред. В.М. Гиріна. – К.: Здоров'я, 1995. – 367 с.
4. Практикум із загальної вірусології / за ред. А.Л. Бойка.– К.: Видавничий центр „Київський університет”, 2000. – 269 с.

## МЕТОДИ ДІАГНОСТИКИ ВІРУСНИХ ІНФЕКЦІЙ ТА ІДЕНТИФІКАЦІЇ ВІРУСІВ

**Мета заняття:** ознайомитись із загальними принципами діагностики вірусних інфекцій. Вивчити методи індикації та ідентифікації вірусів. Ознайомитись з методикою постановки і перебігу серологічних реакцій, що використовуються для діагностики вірусних інфекцій

**Матеріали та обладнання:** роздатковий матеріал (рисунок-схеми постановки реакцій ідентифікації вірусів), відеоматеріали, мультимедійний проектор, методичні рекомендації до лабораторної роботи.

### 1. Основні теоретичні питання, що підлягають вивченню.

1. Методи індикації і ідентифікації вірусів (характер ЦПД в культурі тканини, реакція гемадсорбції і гемаглютинації і ін.)
2. Сучасні методи лабораторної діагностики вірусних захворювань.
3. Особливості вірусних діагностиків.
4. РЗГА та реакції гемадсорбції.
5. Реакція віруснейтралізації в культурі клітин та на тваринах.
6. Сучасні методи експрес-діагностики у вірусології: полімеразна ланцюгова реакція, реакція імунофлюоресценції, імуноферментний аналіз, вестерн-блот.

### 2. Основні теоретичні відомості.

#### Реакція гемаглютинації.

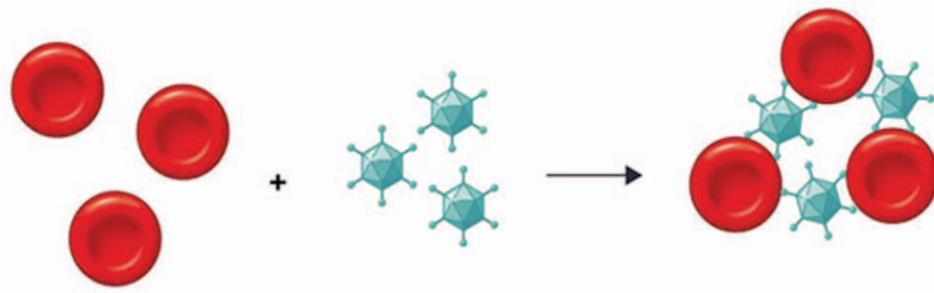
Гемаглютинація – це феномен склеювання еритроцитів унаслідок дії на них різних біологічних агентів, зокрема, й вірусів. На цьому явищі ґрунтуються реакція гемаглютинації (РГА) і реакція гальмування гемаглютинації (РГГА). Гемаглютинувальні властивості виявлено в багатьох вірусів, патогенних для людини. Це представники родин *Orthomyxoviridae*, *Paramyxoviridae*, *Rhabdoviridae*, *Poxviridae*, *Reoviridae*, *Adenoviridae* та інші.

Гемаглютинувальні властивості зумовлені взаємодією поверхневих вірусних білків (у простих вірусів це білки капсиду, у складних – білки суперкапсиду, гліко- та ліпопротеїди) з рецепторами еритроцитів без участі специфічної антисироватки. Ці вірусні білки мають назву гемаглютининів.

Механізм гемаглютинації полягає в тому, що еритроцити, на поверхні яких адсорбувалися віруси, склеюються (рис. 4.1).

Це призводить 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'ятачком». 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.





Еритроцити

Віруси

Склеювання еритроцитів

Рис. 4.1. 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). 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 еритроцити окремих особин курей.

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 3,0%. 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, Альсевра, гепарину). Дефібриновану кров тричі відмивають центрифугуванням у фізіологічному розчині при 1000–1500 об/хв, а з осаду готують необхідну концентрацію еритроцитів. Зберігаються вони в холодильнику приблизно тиждень. У разі потреби можна використати формалізовані 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°C, для вірусу поліоми +4°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 за певної температури (для вірусу грипу +22–37<sup>0</sup>С). Після певного часу експозиції вираховують результати. Позитивну реакцію оцінюють плюсами від одного до трьох відповідно, за інтенсивністю аглютинації (рис. 4.2.).



Рис. 4.2. 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'ятчка», по краях якого є незначна «парасолька»;
- – усі еритроцити не аглютинували й осіли у вигляді «п'ятчка» 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 вірусомісного 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 противірусних антитіл.

#### **Імунологічні методи дослідження**

Від самого початку досліджень вірусних хвороб постала актуальна проблема їх розпізнавання й діагностики, оскільки були відсутні швидкі та надійні методи. Візуальне спостереження зовнішніх симптомів широко застосовувалось, так як прояв симптомів залежить головним чином від взаємодії вірусу і організму. Але на характер прояву симптомів впливають різноманітні фактори, що ускладнює діагностику. Саме тому було розроблено методи виявлення та використання антитіл (імуноглобулінів) для розпізнавання антигенів, тобто серологічні реакції. Ці методи досліджень, засновані на виявленні антигенної специфічності вірусів, не залежать від взаємовідносин вірусу та організму. Завдяки специфічності антитіла реагують тільки з тими антигенними детермінантами вірусного білку, у відповідь на введення якого вони утворились, або з вірусами, що подібні за антигенною структурою. При контакті специфічних антитіл з антигеном між амінокислотними залишками антигензв'язуючого центру і епітопом антигену утворюються багаточисельні нековалентні зв'язки. В порівнянні з ковалентними зв'язками сили нековалентної міжмолекулярної взаємодії (водневі зв'язки, електростатичні, ван-дер-ваальсові та гідрофобні взаємодії) досить слабкі, однак при великій кількості слабких взаємодій сумарна енергія зв'язування стає значною.

Основна структурна одиниця імуноглобуліну будь-якого класу складається з двох однакових легких і двох однакових важких поліпептидних ланцюгів, що утримуються разом дисульфідними зв'язками (рис. 4.3). Від типу важких ланцюгів залежить належність молекули імуноглобуліну до того чи іншого класу і підкласу. Так у людини чотири підкласи IgG (IgG 1, IgG 2, IgG 3 та IgG 4). Відомі також два підкласи IgA (IgA 1 та IgA 2), але підкласів імуноглобулінів IgM, IgD та IgE людини не виявлено.

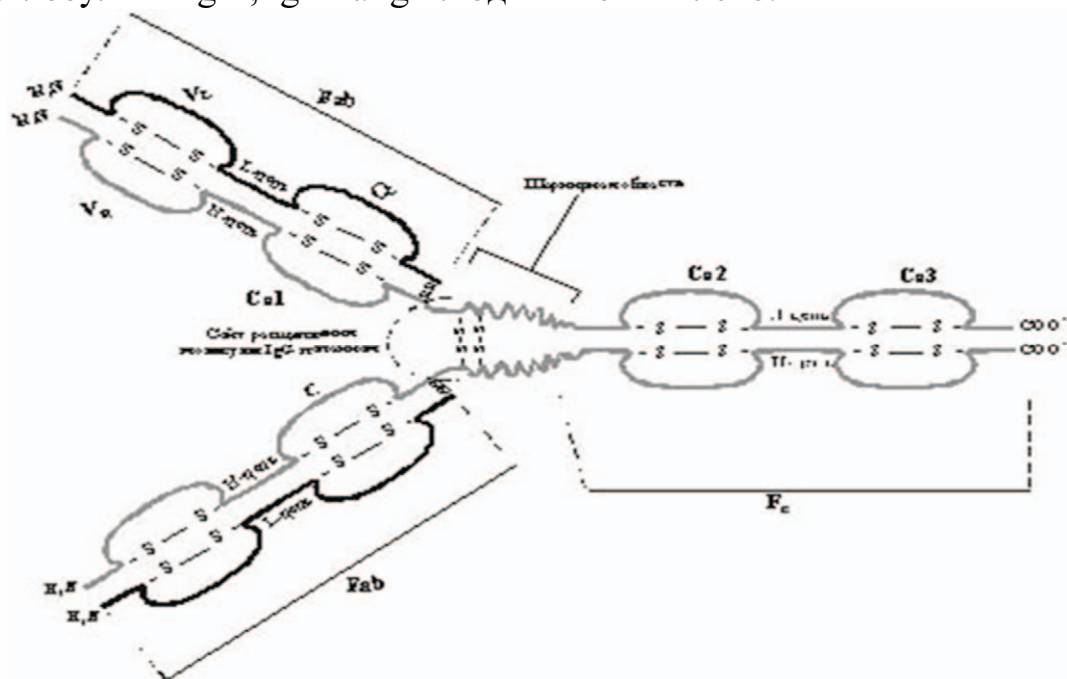


Рис. 4.3. Структура імуноглобуліну класу G [за А Ройтом та ін., 2000]:  
 Fab-область – варіабельна область молекули імуноглобуліну;  
 Fc-область – константна область молекули імуноглобуліну.

Переваги серологічних методів – швидкість отримання результатів діагностики в поєднанні з високою специфічністю. **Чутливість** серологічних реакцій – це найменша кількість вірусних часток в одиниці об'єму зразка, яку даний метод може виявити. Чутливість (кількісний показник) оцінюється на модельних об'єктах – очищених препаратах вірусів, соці штучно заражених рослин, мазках-відбитках різних органів та деяких інших. Чутливість та специфічність імунологічних тестів – це основні критерії, за якими оцінюється доцільність їх використання. Підбір відповідного методу і вибір оптимальних умов для протікання реакції антиген-антитіло – одна з важливих задач, яку ставить перед собою спеціаліст.

#### **Реакція гальмування (затримки) гемаглютинації (РГГА або РЗГА).**

Принцип реакції РГГА полягає в тому, що блокований антитілами вірус не може аглютинувати еритроцити (рис. 4.4). Переваги РГГА – специфічність, простота техніки, швидкість, він не потребує стерильності. Недоліки - реакція можлива тільки з гемаглютинуючими вірусами. Всі сироватки, досліджувані в РГГА, перед роботою прогривають при 56 – 60<sup>0</sup>С протягом 30хв для видалення неспецифічних інгібіторів. Для РГГА використовують еритроцити тих видів, що і для РГА.

Постановку реакції проводять в два етапи. На першому етапі готують робочу дозу антигену (для вірусу грипу – 4 ГАО), перевіряють її правильність за допомогою РГА. Ця процедура необхідна і тому, що чим нижчий титр вірусу, взятого для РГА, тим менші концентрації антитіл він виявляє. Титр в 4 ГАО є найнижчим, що дозволяє отримувати достовірну гемаглютинацію, а оскільки в процесі реакції вірус ще двічі розводять, то кількість віріонів буде такою, яка є необхідною для аглютинації всіх 100% еритроцитів (1 ГАО вірусу аглютинуює 50% 1% зависі еритроцитів). Другий етап - готують серію розведень сироватки в однакових об'ємах в лунках планшету (від 1:10 до 1:1280). На точність виявлення титру антитіл впливає кратність розведень сироватки. До кожного розведення сироватки додають рівний об'єм вірусу в титрі 4 ГАО. Суміш витримують певний час при визначеній температурі. В кожному лунку з АГ та АТ додають рівний об'єм 1% зависі еритроцитів. Отже, в пробірці змішують рівні об'єми сироватки крові та суспензії вірусу і після експозиції визначають, чи зберігся в суміші вірус шляхом додавання суспензії еритроцитів. Аглютинація еритроцитів вказує на наявність, а відсутність гемаглютинації – на відсутність вірусу в суміші. Відсутність вільного вірусу в суміші вірус+сироватка розцінюється як ознака взаємодії антитіл сироватки і вірусу. Іншими словами, якщо в сироватці є специфічні антитіла, то вірус втрачає здатність аглютинувати еритроцити і аглютинація відсутня.

Титром антитіл вважають те найбільше розведення сироватки, яке дає повну затримку гемаглютинації.

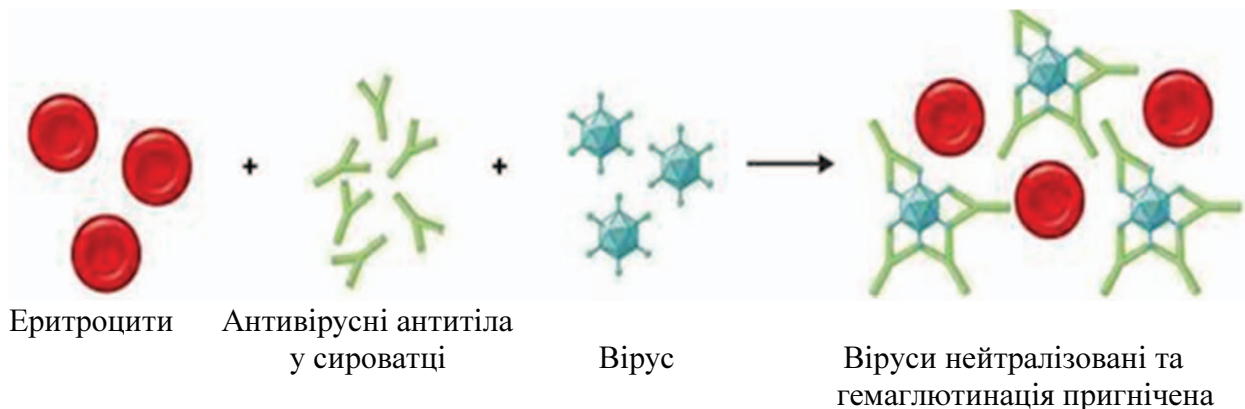


Рис. 4.4. Визначення вірусних антигенів реакцією гальмування гемаглютинації еритроцитів

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.

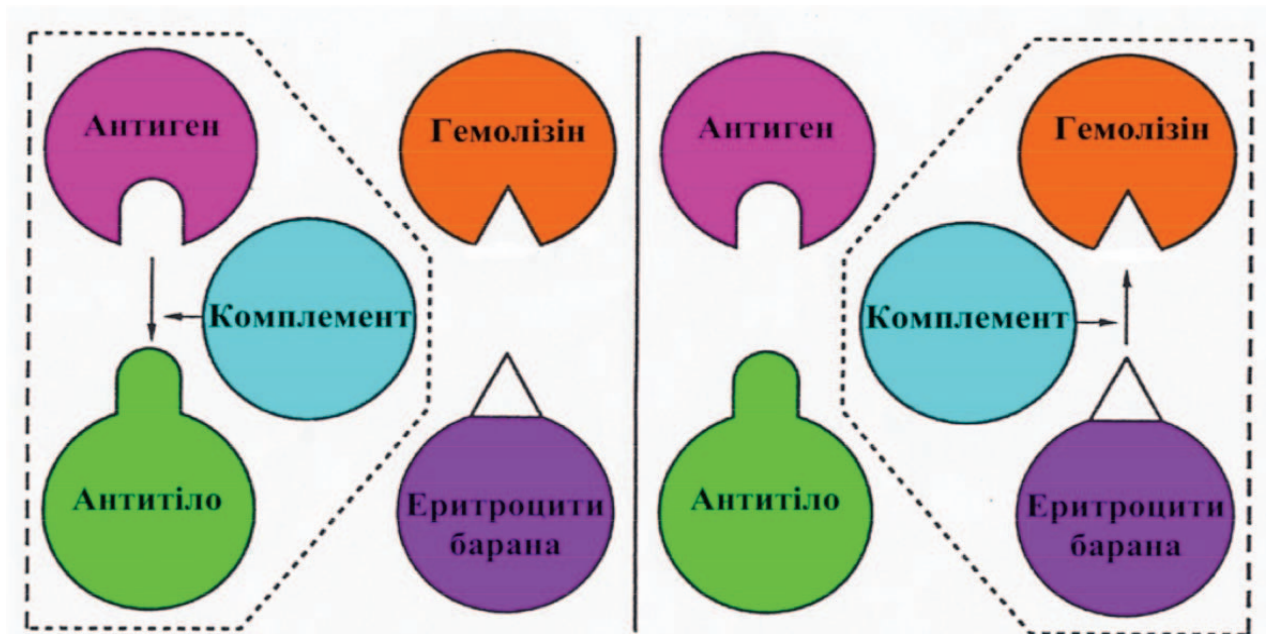
Облік результатів проводять після осадження еритроцитів у контрольних лунках. За позитивний результат приймають аглютинацію еритроцитів (вони вільно розміщені по дну лунки); за негативний – компактне осідання еритроцитів у формі диска на дно лунки.

За титр антитіл у сироватці приймають найбільше її розведення, що викликає аглютинацію сенсibilізованих еритроцитів.

**Реакція зв'язування комплементу (РЗК).** Реакцію зв'язування комплементу часто використовують для діагностики вірусних інфекцій, спричинених адено-, бунья-, герпес-, ортоміксо-, параміксо-, рота- і тогавірусами як для ідентифікації збудника, так і для серологічної діагностики. Реакція 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. *Система комплементу – це група білків сироватки крові (глобуліни, глікопротеїни), які приймають участь у реакціях неспецифічного захисту: лізису клітин, хемотаксису, фагоцитозу та ін.* 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.



**Результат позитивний: затримка гемолізу. Результат негативний: Гемоліз**

Рис. 4.5. Схема РЗК (Я.Є.Коляков, 1986)

**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 в 1897р. при вивченні бактеріальних захворювань. З того часу вона широко застосовується при діагностиці бактеріальних і вірусних захворювань, особливо фітовірусних інфекцій. Реакція характеризується високою чутливістю (можна виявити 0,3 - 0,5 мкг білка), простотою, її можна виконувати як в лабораторії, так і в 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 частинка здатна зв'язуватися з антитілами, що несуть два активних центри ідентичної специфічності, утворюючи структуру решітки. З'єднання відбувається за рахунок притягування полярних груп антигенних детермінант і активного центру. Протяжність утвореної решітки залежить від відносних концентрацій реагентів. Видимий преципітат утворюється лише у випадку, коли в розчині міститься велика кількість антигена. Мінімальна кількість вірусу, необхідна для утворення видимого преципітата - 0,1-1,0 мкг. Утворення специфічного осаду може гальмуватися надлишком антигену (вірусу) або антисироватки, тому необхідно проводити їх серійне розведення. Співвідношення реагентів, яке дає швидку преципітацію, називається оптимальним співвідношенням. Для кожного вірусу та антисироватки існує межове розведення, далі якого преципітація не спостерігається.

Досить розповсюдженою серед імунодифузійних тестів є реакція кільцепреципітації. Її використовують для визначення титру антисироватки або антигену. Для цього роблять розведення одного з компонентів реакції (антигену або антитіла) та обережно нашаровують інший компонент в певній концентрації. В результаті реакції на межі двох фаз утворюється кільце преципітації, звичайно, при умові специфічності антигену і антитіла. Останнє розведення антигену, при якому ще утворюється кільце преципітації, вважають титром сироватки, і навпаки, останнє розведення сироватки – титром антигену. Реакція супроводжується двома контролями – в кожному один з компонентів замінюється фізіологічним розчином.

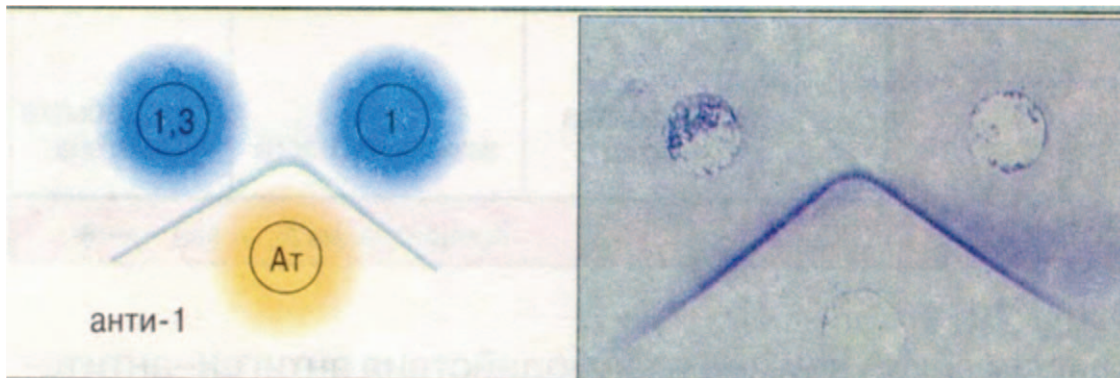
Розвиток методів імунодифузії став можливий завдяки використанню гелевих носіїв. Перенесення реакції преципітації між антигеном і антитілом із рідкого середовища (кільцепреципітація, преципітація в пробірках) в гель



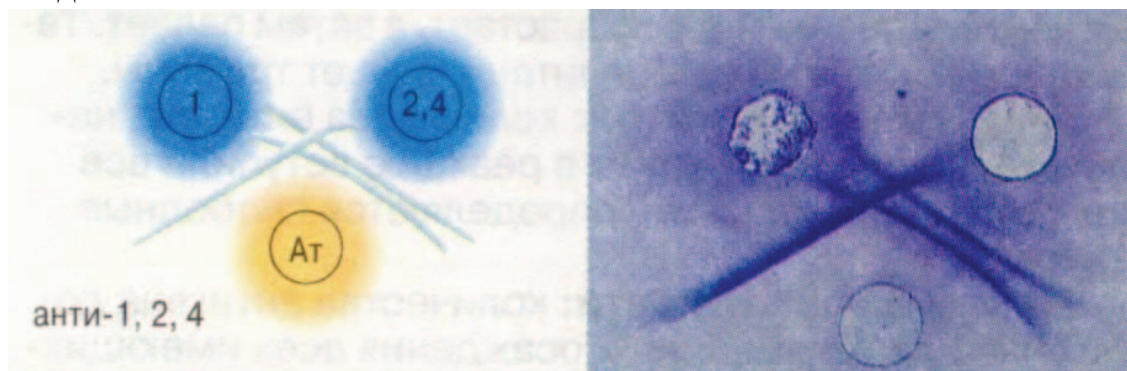
дозволило досліджувати індивідуально кожну пару антиген-антитіло, так як антиген дифундує назустріч гомологічним антитілам з певною швидкістю. Отже, реакції базуються на здатності до дифузії в гелях антитіл та розчинених антигенів і відсутності такої здатності у комплексу антиген+антитіло, який утворюється при контакті дифундуючих назустріч один одному гомологічних антигену та антитіла. Комплекс антиген+антитіло осаджується в тій ділянці, де співвідношення Аг і Ат є оптимальним, в результаті утворюються смуги преципітації у вигляді мутно-білих ліній в гелі.

Тести, які базуються на імунодифузії, пов'язані з розділенням суміші антигену та антитіл за розміром часток, коефіцієнтом дифузії і концентраціями реагентів. Ці методи дозволяють одночасно визначати специфічність антисироваток, ступінь антигенної спорідненості між досліджуваними вірусами (рис. 4.6) та їх штамами, вести контроль за чистотою моноспецифічних сироваток і антигенів та т.д. Чутливість реакцій досягає 50-100 мг/мл.

### 1. Ідентичні епітопи



### 2. Неідентичні антигени



### 3. Частково ідентичні епітопи

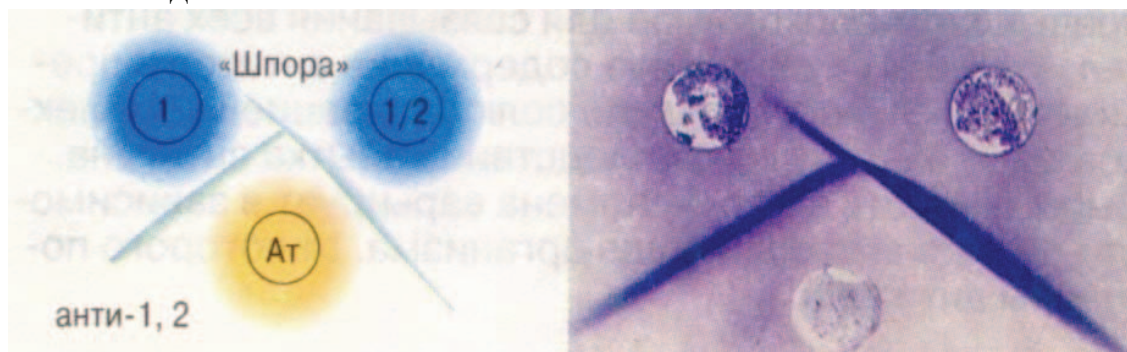


Рис. 4.6. Реакція преципітації в гелі: подвійна імунодифузія.

**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.4.6).

### **Радіоімунологічний аналіз (РІА)**

В 1959 р. Р. Ялоу і С. Берсон розробили кількісний імунологічний метод виявлення інсуліну в плазмі людини з використанням інсуліну, міченого радіоактивним ізотопом йоду ( $^{151}\text{J}$ ). Використання радіоактивних ізотопів в поєднанні з імунохімічними методами досліджень дозволяє реалізувати виключну вибірковість останніх для мінімальних кількостей біополімерів. Особлива перевага радіоімунологічного аналізу – висока чутливість. За його допомоги вдається виявити нанограмові ( $10^{-9}$ ), а іноді і пікограмові ( $10^{-10}$ ) рівні антитіл та вірусів. В РІА поєднується специфічність, властива реакціям антиген-антитіло, з чутливістю, яку дає використання радіоактивної мітки.

Радіоімунологічний аналіз базується на законі дії мас, за яким речовина, що визначається, буде конкурувати зі своїм міченим аналогом (антигеном) за обмежену кількість зв'язуючих місць антитіла до досягнення хімічної рівноваги всіх компонентів реакційної суміші.

Мічений антиген зв'язується зі специфічним антитілом з утворенням міченого комплексу антиген-антитіло. При проведенні РІА проявляється здатність неміченого антигену дослідного матеріалу конкурувати за активні центри антитіл, пригнічуючи зв'язування міченого антигену. Як результат конкурентного пригнічення відношення зв'язаного з антитілом антигену до вільного міченого антигену зменшується при збільшенні концентрації неміченого антигену. Іншими словами, метод базується на здатності антитіл зв'язуватися з міченим радіоактивним ізотопом антигеном та на конкурентному пригніченні цієї реакції неміченим антигеном. Потім, коли цей антиген відділяється від незв'язаного, вимірюється радіоактивність однієї або обох фракцій. Мітять препарати антигенів як правило радіоактивним  $^{125}\text{I}$ . Відомі різні засоби йодування білків: хлораміновий метод, лактопероксидазний, активованим ефіром та інші.

Існує декілька варіантів РІА, з яких в вірусології для практичної мети найчастіше використовують адсорбційний в різних модифікаціях: конкурентний метод (в рідкій фазі) та твердофазні прямий і непрямий методи. Останнім часом

РІА використовується все рідше, оскільки пов'язаний з застосуванням радіоактивних ізотопів.

### **Імунофлуоресцентний аналіз (ІФ)**

Імунофлуоресцентний аналіз, або метод флуоресціюючих антитіл, з'явився на початку 40-х років ХХ ст., коли А. Кунс з співробітниками використали здатність до флуоресценції одного з флюорохромів, кон'югували з ним антитіла і показали наявність збудника інфекції в тканинах. З того часу метод отримав значний розвиток і почав використовуватись в різних областях науки.

Особливість цього методу полягає в тому, що імунний комплекс (антиген+антитіло) стає видимим у люмінесцентному мікроскопі внаслідок ковалентного зв'язку антитіла з флуоресціюючим барвником. При цьому антитіла зберігають свою основну властивість – специфічність, а флюорохром – здатність до випромінювання світла (рис. 4.7).

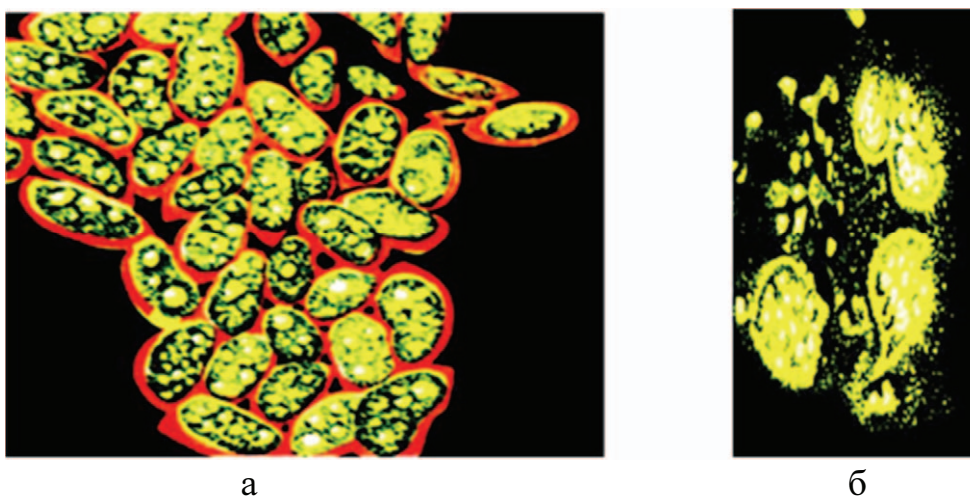


Рис.4.7. Зображення інфікованих аденовірусом клітин, оброблених антитілами, мічених акридиновим оранжевим (а) та ФІТЦ (б)

Перевага імунофлуоресцентного аналізу в порівнянні з іншими методами полягає в дослідженні внутрішньоклітинної локалізації антигену.

Розроблені декілька варіантів реакції імунофлуоресценції: прямий, непрямий, сендвіч-метод, модифікація непрямого методу з використанням комплекменту та інші (рис.4.8).

Прямий метод – виявлення флуоресціюючими антитілами антигенів (мають вигляд гістологічних зрізів, фіксованих на склі препаратів культур тканин, мазків-відбитків з патологічних матеріалів) полягає в нанесенні імунної флуоресціюючої сироватки безпосередньо на антиген, після певного часу контакту та неодноразового відмиванням буферним розчином, препарати переглядають під люмінесцентним мікроскопом. Цей метод не зовсім зручний, тому що скільки антигенів, стільки ж потрібно флуоресціюючих сироваток.

Непрямий метод – на препарат з антигеном спочатку наноситься імунна нефлуоресціююча сироватка, антитіла якої зв'язуються з антигенами препарату. Преципітовані на антигенах антитіла виявляють шляхом додаткової обробки препарату флуоресціюючою антивидовою сироваткою, яка є імунною до  $\gamma$ -

глобуліну сироватки того виду тварини, від якої була отримана імунна сироватка для первинної обробки препарату.

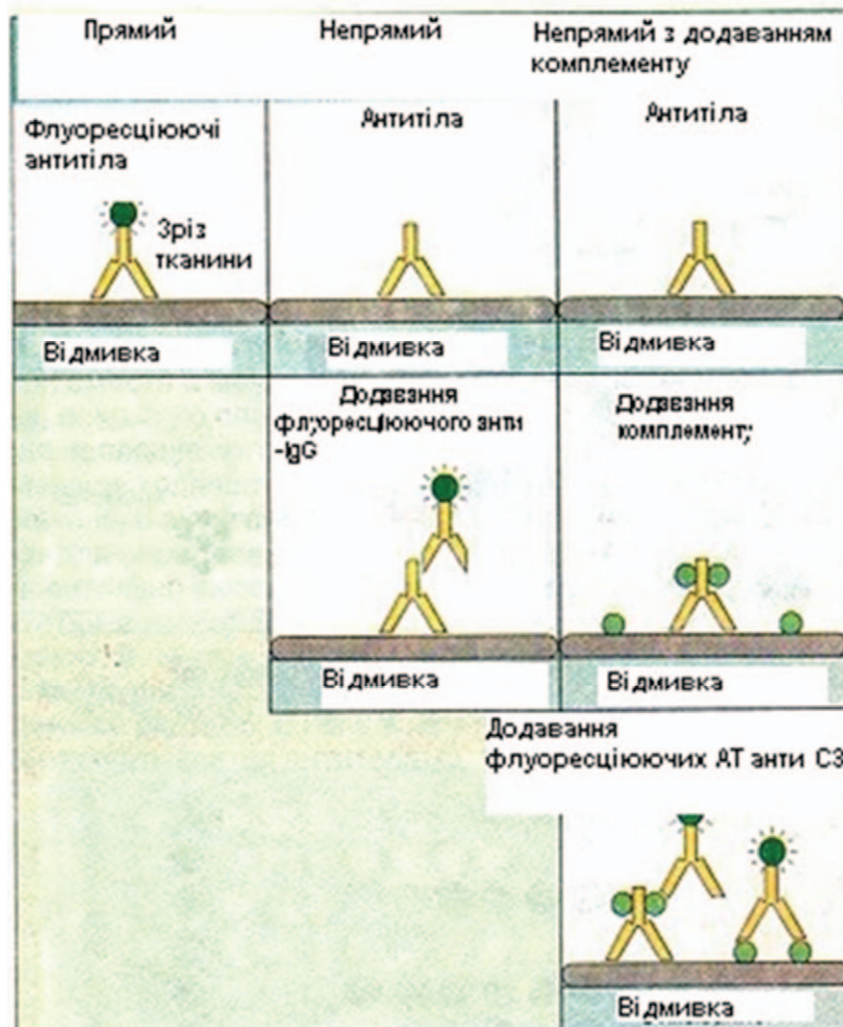


Рис. 4.8. Порівняння різних модифікацій імунофлюоресцентного аналізу.

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

Початком використання імуноферментних методик у вірусологічних дослідженнях вважають появу перших повідомлень про можливість приєднання ферментів до білків, в тому числі і до імуноглобулінів. Зусилля дослідників зконцентрувались на розробці методів кількісного

імунохімічного аналізу, заснованого на використанні антигенів (Аг) та антитіл (Ат), мічених ферментами. На початку 1970-х років був запропонований метод, який поєднує ферментативний та імунохімічний підходи, що призвело 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.

Методи ІФА розділяються на дві великі групи: твердофазний і гомогенний аналіз. В світовій літературі перший скорочено позначають “ELISA” (від англ. enzyme-linked immunosorbent assay, що означає дослівно “ферментзв’язаний імуносорбентний аналіз”). В цьому методі використовується принцип іммобілізації одного із компонентів (антигену або антитіла) на носії. Гомогенні методи аналізу (“ЕМІ”, enzyme multiplay 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 таким чином, що після його взаємодії з антитілом молекула ферменту втрачає свою каталітичну активність. Додавання в цю систему вільного гаптenu призводить до пропорційного збільшення активності ферменту в результаті витіснення антитіл з комплексу. Як ферменти в таких системах використовують лізоцим, малатдегідрогеназу та ін. Це високочутливий тест, який дозволяє виявляти білки, що містяться в кількості декількох нанограм в 1 мл.

Широко ввійшов в практику ІФА – метод фізичної адсорбції антигенів та антитіл на поверхні мікроплат із непористого полістирола. Аналіз проводиться в 5 основних етапів: 1) фізична сорбція антитіл (або антигену) на твердофазний носій; 2) імунологічна реакція: внесення антигену (або антитіл) в ті ж лунки; 3) імунологічна реакція (друге специфічне зв’язування): внесення комплексу кон’югат-фермент, хімічним шляхом зв’язаного з антитілами; 4) ензиматична реакція, коли фермент, діючи на субстрат, сприяє появі забарвленого комплексу; інтенсивність забарвлення пропорційна кількості антигену (або антитіла) в лунках; 5) врахування результатів з допомогою приладів – абсорбціометрів, які дозволяють вимірювати оптичну густину продукту ферментативної реакції безпосередньо в лунках імунологічного планшету (рис. 4.9). Таким чином, весь процес ІФА можна умовно розділити на три основні стадії: формування специфічного комплексу антиген-антитіло, введення в нього мітки (імунохімічний процес) і її візуалізація тим чи іншим фізичним способом. Перед постановкою ІФА проводиться робота, яка включає наступні етапи: вирощування біологічно чистого матеріалу з моноінфекцією, отримання очищених вірусних препаратів, приготування антисироваток з високим титром специфічних антитіл, виділення IgG і кон’югування з ферментами.

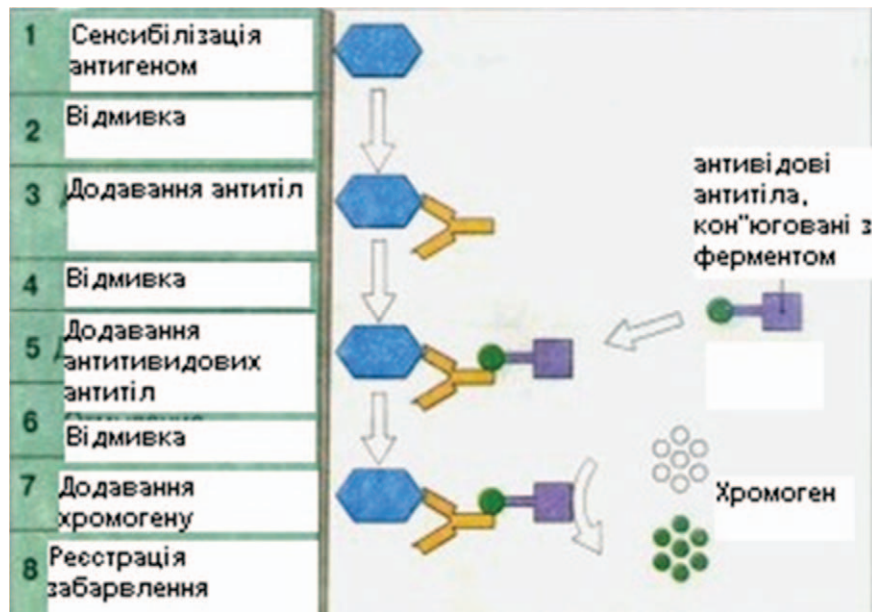


Рис. 4.9. Основні етапи ІФА.

Кількість адсорбованої речовини на полістиролі залежить від багатьох факторів (температури, рН, іонної сили, часу інкубації, присутності в суміші інших компонентів) і змінюється при їх варіюванні. Зв'язування білку з носієм залежить і від його концентрації, причому сумісний вплив рН та іонної сили найбільш чітко проявляється при більш високих концентраціях білку в розчинах. Зв'язування з полістироловим носієм безпосередньо залежить від часу і температури обробки. Обробка мікроплат яким-небудь інертним білком, наприклад, альбуміном або желатином, після їх насичення антитілами, дозволяє заблокувати залишкові вільні центри зв'язування, з якими могли б неспецифічно взаємодіяти молекули кон'югату.

Після з'єднання антигену або антитіла з твердим носієм можна проводити реакцію прямого, непрямого, конкурентного і сендвіч-типу (рис.4.10. – 4.12).

**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-аміносалицилову кислоту). Інтенсивність забарвлення пропорційна кількості антигена. Метод потребує мінімальної кількості операцій, незначної витрати реагентів і легко може бути автоматизований

**Непрямий метод** (рис. 4.10). При непрямому варіанті імунний комплекс АГ-АТ, іммобілізований на твердому носії інкубують з антивидовими антитілами – антитіла, одержані до імуноглобулінів, які мають ферментну мітку АТ<sub>2</sub>-Ф.



Рис. 4.10. Варіанти непрямого ІФА: аналіз досліджуваного АГ (а) та досліджуваного АТ (б)

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.

**Сендвіч-ІФА.** Найбільшого розповсюдження сьогодні набув сендвіч-ІФА (рис. 4.11).

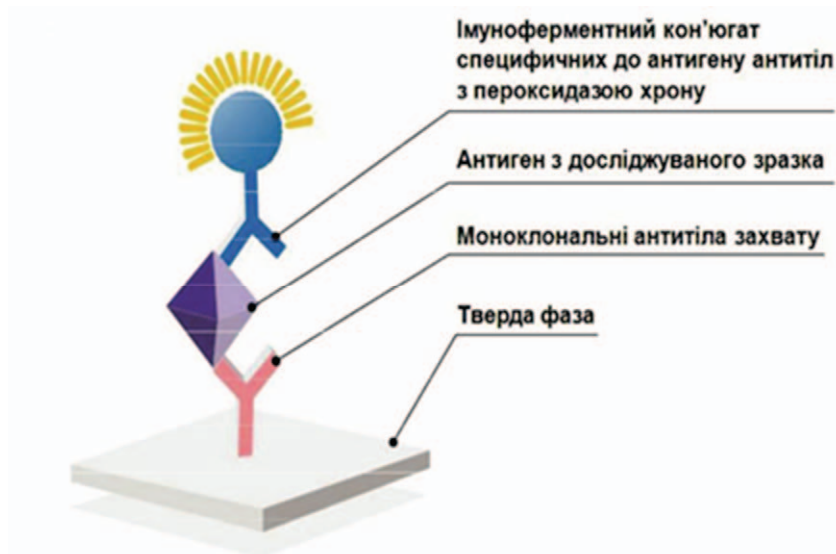


Рис. 4.11. Сендвіч варіант ІФА

Відомо два варіанти методу: прямий і непрямий. У прямому варіанті або double antibody sandwich (DAS) – подвійних антитіл сендвіч – 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 сендвіч – 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)<sub>2</sub>-фрагменти для того, щоб усунути більшість епітопів імуноглобуліну, які могли б реагувати з третім міченим антитілом.

Крім того, серед методів ІФА можна виділити два типи – це так званий послідовний, або неконкурентний, та конкурентний аналіз.

При конкурентному гетерогенному аналізі (рис.4.12) 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 воно послаблюється, особливо у разі проведення реакції при підвищеній температурі.

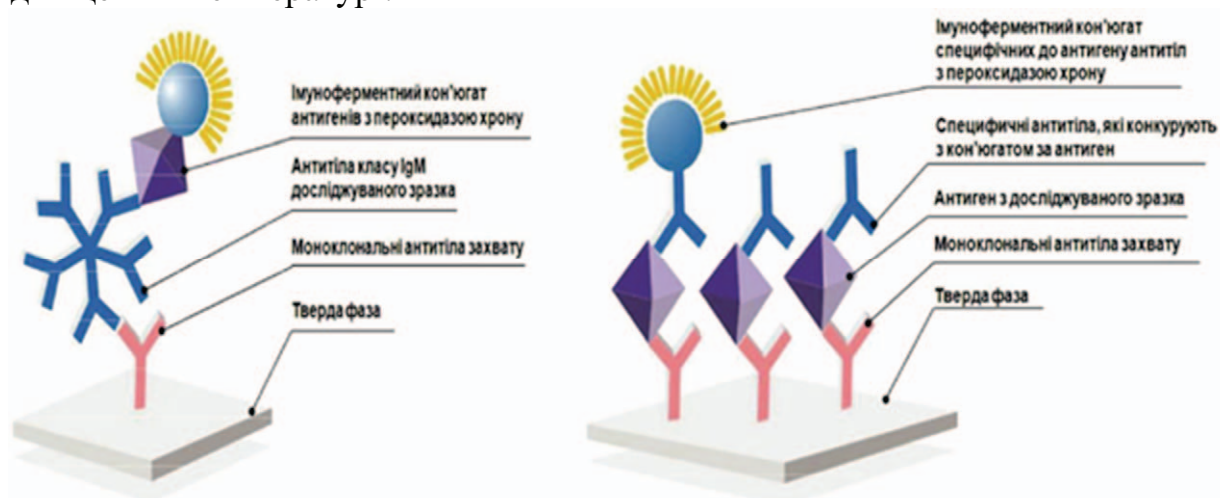


Рис. 4.12. Варіанти конкурентного ІФА

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.

### **3. Практичні завдання.**

1. Ознайомитися з методами діагностики вірусних інфекцій та ідентифікації вірусів та заповнити таблицю 4.1

Таблиця 4.1

#### **Загальна характеристика методів діагностики вірусних інфекцій**

<b>Назва методу</b>	<b>Характеристика</b>	<b>Галузь застосування</b>
<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>

--	--	--

--	--	--

--	--	--

--	--	--

2. Замалювати дослідну пробірку визначення антитіл в сироватці крові методом кільцепреципітації.

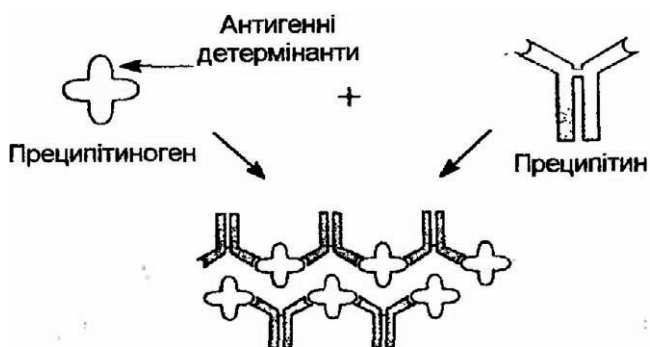


Схема реакції преципітації

Дослідна пробірка

### Контрольні питання:

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. Кэти. М.: Мир, 1991. 287 с.
2. Антитела. Методы: Кн. 2: Пер. с англ. /Под ред. Д. Кэти. 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. 183 с.
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. 163 с.
7. Иммунологическая диагностика вирусных инфекций. /Под ред. Т.В. Перадзе, П. Халомена. М. 1985.
8. Иммуноферментный 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., Максименок О.В. К., 2005. с. 63.
13. 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. 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.

## ЗМІСТОВИЙ МОДУЛЬ 3 ВЗАЄМОДІЯ ВІРУСІВ З КЛІТИНАМИ ХАЗЯЇВ

*Лабораторне заняття №5*

### ВІРУЛЕНТНІ ТА ПОМІРНІ ФАГИ. ВИДІЛЕННЯ ТА ІНДИКАЦІЯ БАКТЕРІОФАГІВ

**Мета заняття:** сформуванню уявлення про бактеріофаги, вивчити механізм репродукції та форми взаємодії з бактеріями. Познайомитись з методами виділення бактеріофагів із навколишнього середовища, отримання фаголізату та виявлення (індикації) бактеріофагів.

**Матеріали та обладнання:** методичні рекомендації до лабораторної роботи, презентація на тему «Резистентність бактеріофагів. Практичне використання бактеріофагів», мультимедійний проектор.

#### 1. Основні теоретичні питання, що підлягають вивченню.

1. Бактеріофаги, бактеріофагія. Визначення понять. Відкриття бактеріофагів, класифікація, організація геному.
2. Класифікація бактеріофагів за здатністю викликати інфекцію і за спектром дії. Три стани фагу.
3. Морфологічна класифікація бактеріофагів. ДНК-вмісні фаги, їх будова. Особливості будови фага T2.
4. Форми фагової інфекції. Організація та реплікація геномів T-бактеріофагів. Життєвий цикл вірулентних фагів. Особливості їх морфогенезу на прикладі фагу T4.
5. Лізогенія та лізогенна конверсія. Загальна характеристика та життєвий цикл помірних бактеріофагів. Механізм сайт-специфічної інтеграції фага  $\lambda$  в хромосому бактеріальної клітини.
6. Резистентність бактеріофагів. Практичне використання бактеріофагів.
7. Виділення бактеріофагів із навколишнього середовища. Техніка отримання фаголізату, виявлення (індикація) фагів (вивчається на лабораторному занятті).

#### 2. Основні теоретичні відомості.

Бактеріофаги (або просто фаги) - віруси бактерій. Бактеріофагія - процес взаємодії фагів з бактеріями, що закінчується руйнуванням останніх (від лат. *Bacteriophaga* - пожираючий бактерії).

Ф. Туорт в 1915 р. вперше описав «скління» (лізис) колоній білого стафілокока. Цілісне вчення про бактеріофаги як про віруси пов'язано з ім'ям канадського вченого Ф. д'Ерелля, який виявив агент, здатний руйнувати дизентерійні бактерії. Д'Ерелль назвав його *Bacteriophagum intestinale*, тобто, виділений з кишечника пожирач бактерій.

Бактеріофаги поширені скрізь. Вони зустрічаються в ґрунті, воді, кишковому тракті людини і тварин, гнійних виділеннях і т. д. Особливо багато фагів в стічних водах.



Фагам притаманні всі біологічні особливості, які властиві вірусам. Вони стійкі в межах рН від 5,0 до 8,0, більшість з них не інактивується холодними водними розчинами гліцерину і етилового спирту. На них не діють такі ферментні отрути, як ціанід, фторид, динітрофенол, а також хлороформ і фенол. Фаги добре зберігаються в запаяних ампулах і в ліофілізованому стані, але легко руйнуються при кип'ятінні, дії кислот, хімічних дезінфектантів, при УФ опроміненні.

Фаги за вмістом нуклеїнових кислот підрозділяються на ДНК і РНК-вмісні.

За здатністю викликати інфекцію розрізняють фаги:

- інфекційні, тобто, здатні викликати різні форми фагової інфекції;
- неінфекційні (вегетативні), або незрілі фаги, що знаходяться ще в стадії розмноження.
- У свою чергу інфекційні фаги поділяють на:
  - в стані спокою - знаходяться поза клітиною;
  - вірулентні - здатні викликати продуктивну форму інфекції;
  - помірні фаги - здатні викликати не тільки продуктивну, але і редуковану фагову інфекцію.

Серед помірних фагів розрізняють фаги з повноцінним і дефектним геном. Помірні фаги характеризуються здатністю існувати в стані профага, коли фаг замість реплікації оборотно взаємодіє з генетичною системою клітини-господаря, інтегруючись в хромосому або зберігаючись у вигляді плазміди (вірусний геном реплікується синхронно з ДНК хазяїна і поділом клітини). У стані профага літичні функції фага пригнічені.

Таким чином, типовий бактеріофаг може існувати в трьох станах: профага, вегетативного фага і зрілого фага.

За спектром дії на бактерії фаги поділяються на:

- полівалентні, лізують бактерії декількох видів;
- монофаги, лізують бактерії тільки одного виду;
- типоспецифічні фаги (типові, Т-фаги), які вибірково лізують окремі варіанти бактерій всередині виду. За допомогою таких фагів проводиться найбільш тонка диференціація бактерій всередині виду, з поділом їх на фаговаріанти.

### **Будова віріона і організація генома бактеріофагів.**

Геном фагів укладений в капсид, структурні субодиниці якого впорядковані за типом або спіральної, або кубічної симетрії. Великі фаги, що мають хвостик, влаштовані за типом подвійної симетрії (головка - ікосаедр, хвостик - спіральна симетрія).

Фаги відрізняються:

- за розмірами - дрібні, середнього розміру і великі. До найменших відносяться фаги М13 і фХ174;
- за формою - ниткоподібні, сферичні; фаги, що мають головку і хвостик (рис. 5.1).

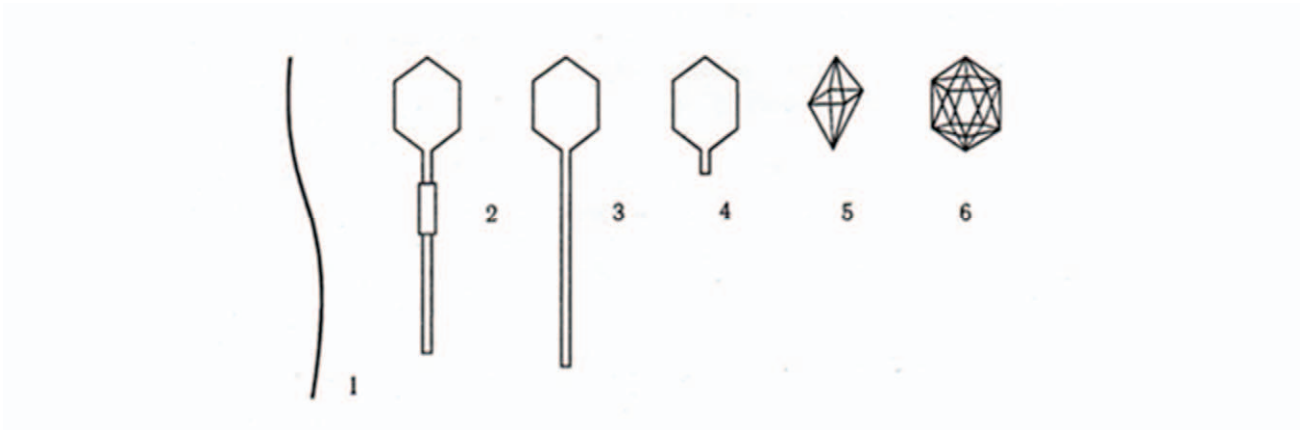


Рис. 5.1. Різні форми фагових віріонів (за Г. Шлегелем, 1972):

1 – ниткоподібна форма (фаг fd); 2 – гексагональна головка з відростком та скоротливим чохлом (фаги T2, T4, T6); 3 – гексагональна головка з довгим, не здатним до скорочення хвостиком; 4 – головка з коротким відростком (фаги T3, T7); 5 – октаедр; 6 – ікосаедр

*Морфологічна класифікація бактеріофагів:*

I тип - ниткоподібні ДНК-вмісні фаги, лізують бактерії, що мають F-плазміді;

II тип - фаги з аналогом відростка, дрібні РНК-вмісні фаги;

III тип - фаги з коротким відростком (T3, T7);

IV тип - фаги з нескоротливим чохлом відростка і двонитковою ДНК (T1, T5 і ін.);

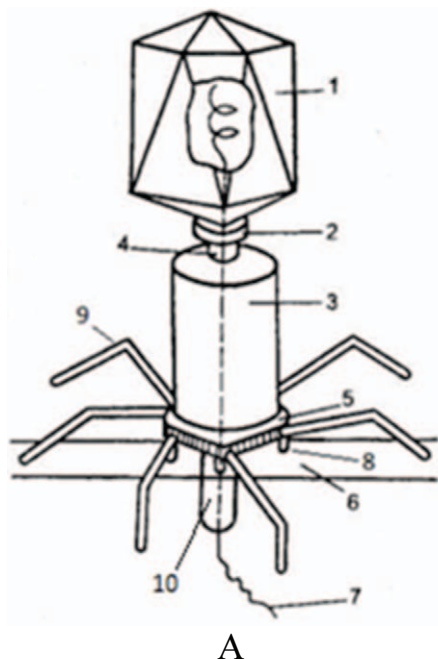
V тип - ДНК-вмісні фаги зі скоротливим чохлом відростка, закінчуються базальною мембраною (T2, T4, T6).

**Фаг M13** - ниткоподібний, геном - одониткова кільцеподібна молекула ДНК з молекулярною масою 2 МД, містить 8 генів. Оболонка складається з 3000 білкових субодиниць, укладених по спіралі. Довжина віріона 1000 нм, його діаметр 6 нм.

**Фаг φX174** - ікосаедр з молекулярною масою 6,2 МД, діаметр 25 нм. Геном - одониткова кільцеподібна молекула ДНК, що складається з 5400 нуклеотидів, несе 9 генів.

Прості за будовою головчасті і ниткоподібні фаги містять одноланцюгову кільцеву ДНК, в якій знаходиться по одному залишку метілцитозина (φX174, φ1 і fd), або одноланцюгову лінійну РНК (MS-2 і f2). Найбільш складно влаштовані великі фаги, що складаються з головки і хвостика. Фаги сперматозоїдної форми (подвійний тип симетрії) складаються з 40-50% спірально скрученої дволанцюгової ДНК, що знаходиться в порожнині головки фага, і 50-60% білка, з якого побудовані оболонка головки і відросток фага.

**Фаг T2** паразитує у *E. coli* і має наступну структуру (рис. 5.2).



А

Б

Рис. 5.2. Будова бактеріофага Т2 (ін'єкція ДНК в бактерію) а: 1 – головка (капсид); 2 – «комірець»; 3- хвіст (білковий чохол хвоста) нуклеїнова кислота; 4 – шийка; 5 – базальна пластинка; 6 – оболонка бактерії; 7 – фагова ДНК; 8 – шип; 9 – фібрилла (ворсинка) хвоста; 10 – порожній стержень; б: електронна мікрофотографія бактеріофага, одержана методом негативного контрастування.

**Фаг  $\lambda$**  (лямбда) складається з головки і хвостика. Його геном представлений двохнитковою лінійною ДНК, що має «липкі» кінці (надлишкові нуклеотидні послідовності на протилежних кінцях ниток, комплементарні одна одній), тому вона може переходити в кільцеву структуру, необхідну для її включення в хромосому клітини-господаря. ДНК фага  $\lambda$ , має молекулярну масу близько 30 МД, містить 46 500 нуклеотидних пар і несе 32 гена, 7 з яких кодують голівку, 11- хвостик, а решта відіграють регуляторну роль.

#### **Життєвий цикл інфекційних фагів.**

Життєвий цикл фага може проявлятися у формі:

- продуктивної інфекції - фаг розмножується в клітині і виходить з неї;
- редуktivної інфекції - геном фага проникає в клітину, однак розмноження фага не відбувається, його геном інтегрується в хромосому клітини-господаря, стає її складовою частиною, тобто, фаг перетворюється в профаг;
- абортивної інфекції, при якій взаємодія фага з клітиною обривається на якійсь стадії життєвого циклу фага, і він гине.

Клітина, яка несе профаг, називається лізогенною, тому що профаг, який передається клітиною у спадок, може вийти з хромосоми, активуватися і викликати продуктивну форму інфекції.

Якщо в результаті лізогенії, тобто, інтеграції профага в хромосому клітини-господаря, вона отримує нові успадковані ознаки, таку форму її мінливості називають *лізогенною конверсією*. Лізогенну конверсію викликають лише помірні фаги.

Стадії життєвого циклу вірулентного фага:

1) адсорбція фагів на поверхні клітини бактерій за допомогою специфічних рецепторів (білків-лоцманів), які розташовуються на кінчику нитки, шпильки або хвостика;

2) проникнення фагового генома через клітинну стінку і цитоплазматичну мембрану всередину клітини і звільнення його від оболонки (роздягання фага);

3) встановлення фагового генома за допомогою білка-лоцмана для реалізації інформації, яка міститься в геномі;

1) реплікація фагової геномної ДНК або РНК;

2) складання нових синтезованих віріонів - укладання геномної нуклеїнової кислоти в білкову оболонку, морфогенез фагів;

3) вихід синтезованих фагів з клітини:

а) шляхом брунькування (M13 - єдиний фаг, який не викликає при виході з клітини її загибелі);

б) шляхом лізису клітини зсередини. Він здійснюється вільним лізоцимом і викликає загибель клітини. Він синтезується на останньому етапі розмноження фага. Іноді буває лізис бактерій ззовні як наслідок адсорбції багатьох фагів на одній клітині, але при цьому розмноження фагів не відбувається. Зазвичай після включення фагового генома в клітину у неї виникає стан імунітету до суперінфекції даними фагом, тобто, проникнення інших фагових геномів стає неможливим.

**Морфогенез** дрібних фагів протікає за типом самозбірки. У великих фагів цей процес має більш складний характер. Наприклад, морфогенез фага T4 вимагає активності більш ніж 40 генів і протікає за участю трьох самостійних ліній. На одній з них відбувається збірка хвостика (бере участь близько 20 генів), на іншій - головки фага (не менше 16 генів) і на третій - складання ворсинок (5 генів). З'єднання хвостика з головкою не вимагає участі генів, проте воно не може відбутися доти, поки і хвостик, і головка не будуть змонтовані повністю. Точно так же ворсинки можуть приєднуватися до хвостика тільки після того, як він з'єднається з повністю готовою головкою. Завдяки суворому генетичному контролю з боку фага забезпечується послідовність і узгодженість всіх процесів його внутрішньоклітинного розмноження.

Стадії життєвого циклу помірною фага:

1) адсорбція фага на поверхні клітини;

2) проникнення фагової ДНК в бактеріальну клітину;

3) сайтспецифічна інтеграція фагової ДНК в хромосому клітини-господаря і перетворення фага в профаг.

**Механізм інтеграції фагової ДНК в хромосому бактеріальної клітини** найкраще вивчено на прикладі фага  $\lambda$  (лямбда). Фаг  $\lambda$  вбудовується в хромосому *E. coli* між генами *gal* та *bio* за допомогою сайт-специфічної рекомбінації. Вона виявляється можливою тому, що ДНК фага має особливу ділянку - *attP* (від англ. Attachment phage - прикріплення фага). Така ж ділянка є і в хромосомі *E. coli* - *attB*. Вона розташована між генами *gal* та *bio*. Ділянки *att* мають складну структуру і складаються з 250 нуклеотидів. В результаті рекомбінації між *attP* і

*attB*, що протікає за механізмом кросинговеру, фагова ДНК виявляється включеною в хромосому, причому ліворуч вона фланкірована ділянкою *attL* (від англ. Left - лівий), а праворуч - *attR* (від англ. Right - правий), які утворюються внаслідок рекомбінації між *attP* і *attB*. Рекомбінація протікає за участю генів *red* фага і *recA* - бактерії. Для інтеграції потрібен також білок фага - продукт гена *int* (інтеграза) і особливий білок інтеграції хазяїна. Таким чином, геном фага, інтегруючись в хромосому, перетворюється в профаг, а клітина стає лізогенною. Виходу профага з хромосоми перешкоджає цитоплазматичний репресор, який наділяє клітину одночасно імунітетом проти повторного інфікування даним фагом. Синтез репресора контролюється фагом. Однак профаг спонтанно або під впливом різних факторів (хімічні речовини, опромінення УФ, рентгенівськими променями, підвищена температура) може виходити з хромосоми клітини і викликати продуктивну інфекцію, яка закінчується лізисом клітини і виходом з неї синтезованих віріонів. Механізм виходу (виключення фага) з хромосоми полягає в тому, що відбувається рекомбінація між *attL* і *attR*, в результаті якої відновлюються *attP* і *attB*, а фагова ДНК набуває кільцеподібну структуру і виключається з хромосоми. Процес виходу вимагає участі, крім зазначених вище білків, ще одного білка - продукту фагового гена *xis* (ген ексцизиї, виключення).

Зв'язок профага з бактерією дуже міцний і в природних умовах порушується з частотою  $10^{-2}$ - $10^{-3}$  (спонтанна продукція фага). Частоту відщеплення профага від бактеріальної хромосоми можна збільшити, впливаючи на лізогенні бактерії ультрафіолетовими променями, іонізуючою радіацією і хімічними мутагенами (індукція лізогенних бактерій).

### **Виділення бактеріофагів з навколишнього середовища, отримання фаголізатів, виявлення (індикація) бактеріофагів**

Бактеріофаги виявляються в зовнішньому середовищі (вода, ґрунт, харчові продукти), в виділеннях людей і тварин, в популяціях уражених фагом бактерій.

**Виділення бактеріофагів** складається з декількох етапів. Спочатку досліджуваний матеріал звільняють від великих частинок. Для цього застосовують центрифугування при 1-1,5 тис. об/хв протягом 15-20 хв або фільтрування через паперовий фільтр. Потім з фільтрату або центрифугату (надосадової рідини) видаляють бактерії, для чого пропускають їх через бактеріальні фільтри №2 або №3. Від живих бактерій можна також звільнитися обробкою матеріалу прогріванням і 1-2-годинною експозицією його при кімнатній температурі з хлороформом (1-2 краплі на 10 мл) і подальшим цунтрифугуванням. Надосад або фільтрат досліджують на присутність фага крапаючи на газони культур чутливих до нього бактерій або методом агарових шарів. Для виділення фага лізогенні культури вирощують в оптимальних умовах до фази логарифмічного росту, обробляють і досліджують, як зазначено вище.

**Отримання фаголізатів, виявлення бактеріофагів.** Фаги розмножуються тільки за рахунок паразитування в мікробній клітині. Їх розмноження в бульонній культурі призводить до того, що культура, яка була

перед додаванням фага каламутною, через кілька годин інкубації при 37 ° С стає прозорою (рис.5.3).

Фаголізат - продукт лізису рідкої бактеріальної культури бактеріофагом, що представляє собою суміш компонентів бактеріальних клітин і живильного середовища, що містить частинки бактеріофага.

Для отримання «чистої лінії» фага (вільної від домішок інших фагів) проводять послідовні пасажі морфологічно однотипних негативних колоній на газоні одного і того ж бактеріального штаму. Готовий препарат фага являє собою прозору жовтувату рідину. У промислових умовах і в спеціалізованих лабораторіях з метою підвищення стабільності фільтрат ліофільно висушують та таблетують.

На щільних середовищах фаги виявляють або за допомогою спот-тесту, або методом агарових шарів, запропонованим А. Грація (1936).



Рис. 5.3. Літична дія бактеріофагів (праворуч – позитивний результат)

*Спот-тест.* На поверхню агару в чашці засівають бактеріальну культуру, а потім на неї наносять краплю фаговмісного матеріалу. Якщо в ньому міститься багато віріонів, то на місці нанесення краплі буде велика стерильна пляма (англ. Spot - пляма).

*Метод агарових шарів.* Спочатку в чашку наливають шар живильного агару. Після застигання на цей шар додають 2 мл розплавленого і охолодженого до 45°C 0,7% агару, в який попередньо додають краплю концентрованої суспензії бактерій і певний об'єм суспензії фага (фаголізату). Після того, як верхній шар застигне, чашку поміщають в термостат. Бактерії розмножуються всередині м'якого шару агару, утворюючи суцільний непрозорий фон, на якому добре видно колонії фага у вигляді стерильних плям. Кожна колонія утворюється за рахунок розмноження одного вихідного фагового віріона.

### 3. Практичні завдання

#### Протокол лабораторної роботи № 5

А. Відмітьте найважливіші події в історії відкриття бактеріофагів.

1. Перше повідомлення, яке відноситься до вірусів бактерій, було зроблено \_\_\_\_\_ в 18\_\_ р. В ньому стверджувалось, що \_\_\_\_\_

2. Принцип передачі «лізису» культурам в ряді поколінь бактерій описав \_\_\_\_\_ в 19\_\_ р.

3. Пов'язав явище «лізису» бактерій з фільтруючим агентом і надав цьому агенту назву *Bacteriophagum intestinale* \_\_\_\_\_ в 19\_\_ р.

**Б.** Дайте визначення основним поняттям, укажіть принципи класифікації бактеріофагів.

1. Бактеріофаги - \_\_\_\_\_

2. Бактеріофагія - \_\_\_\_\_

3. Профаг - \_\_\_\_\_

4. Лізогенія - \_\_\_\_\_

5. Лізигенна конверсія - \_\_\_\_\_

6. В основу класифікації бактеріофагів закладені наступні ознаки:

1) \_\_\_\_\_ 2) \_\_\_\_\_

3) \_\_\_\_\_ 4) \_\_\_\_\_

та ін. \_\_\_\_\_

7. За типом нуклеїнової кислоти бактеріофаги підрозділяють на:

1) \_\_\_\_\_ 2) \_\_\_\_\_

8. За здатністю викликати інфекцію розрізняють фаги:

1) \_\_\_\_\_ – \_\_\_\_\_

2) \_\_\_\_\_ ( \_\_\_\_\_ ) – \_\_\_\_\_

9. Інфекційні фаги підрозділяють на:

1) \_\_\_\_\_ – \_\_\_\_\_

2) \_\_\_\_\_ – \_\_\_\_\_

3) \_\_\_\_\_ – \_\_\_\_\_

10. За спектром дії бактеріофаги підрозділяють на:

1) \_\_\_\_\_ – \_\_\_\_\_

2) \_\_\_\_\_ – \_\_\_\_\_

3) \_\_\_\_\_ – \_\_\_\_\_

11. За морфологією розрізняють наступні типи бактеріофагів:

I тип -

---

II тип -

---

III тип -

---

IV тип -

---

V тип -

---

**В.** Вкажіть морфологічні особливості бактеріофагів та особливості будови їх геному.

1. Для бактеріофагів характерні наступні типи симетрії:

1)

---

2)

---

3)

---

2. За формою фаги розрізняють: 1)

---

2)

---

3)

---

3. За розмірами фаги розрізняють: 1)

---

2)

---

3)

---

4. До найменших фагів відносяться:

---

5. Стислий опис будови фагу M13:

---

6. Стислий опис фагу  $\phi$ X174:

---

7. Особливості будови геному фага  $\lambda$ :

---

8. Розшифруйте позначення на рисунку 5.4 відповідних елементів у структурі фагу T2 (після ін'єкції):

Головка - \_\_\_\_; шийка - \_\_\_\_; комірць - \_\_\_\_; хвіст (білковий чохол хвоста) - \_\_\_\_; базальна пластинка - \_\_\_\_; пустий стержень - \_\_\_\_; фагова ДНК - \_\_\_\_; шип - \_\_\_\_; фібрила (війка) хвоста - \_\_\_\_; оболонка бактерії - \_\_\_\_.

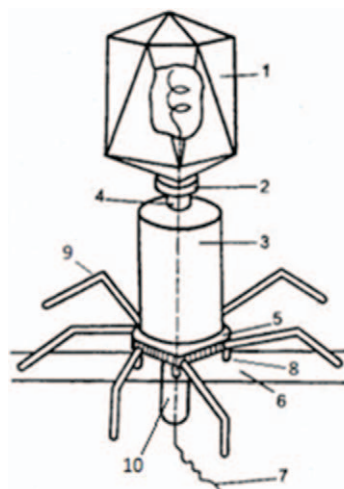


Рис.5.4. Будова фага *E.coli* (фаг T2 після ін'єкції).



Г. Дайте класифікацію фагових інфекцій та вкажіть стадії життєвого циклу вірулентного та помірною бактеріофагу.

1. Види фагових інфекцій:

- 1) \_\_\_\_\_ - \_\_\_\_\_
- 2) \_\_\_\_\_ - \_\_\_\_\_
- 3) \_\_\_\_\_ - \_\_\_\_\_

2. Вкажіть стадії життєвого циклу вірулентного бактеріофагу:

- 1) \_\_\_\_\_
- 2) \_\_\_\_\_
- 3) \_\_\_\_\_
- 4) \_\_\_\_\_
- 5) \_\_\_\_\_
- 6) \_\_\_\_\_
- а) \_\_\_\_\_
- б) \_\_\_\_\_

3. Вкажіть стадії життєвого циклу помірною фагу (редуктивна інфекція):

- 1) \_\_\_\_\_
- 2) \_\_\_\_\_
- 3) \_\_\_\_\_

4. Зазначте три стани існування бактеріофага:

- 1) \_\_\_\_\_
- 2) \_\_\_\_\_
- 3) \_\_\_\_\_

Д. Розкрийте зміст сайт-специфічної інтеграції фагової ДНК в хромосому бактеріальної клітини.

Фаг  $\lambda$  включається в хромосому *E.coli* між генами \_\_\_\_\_ та \_\_\_\_\_ за допомогою \_\_\_\_\_. Це виявляється можливим тому, що ДНК фагу має особливу ділянку - \_\_\_\_\_ (від англ. attachment phage – прикріплення фагу). Така ж ділянка наявна і в хромосомі *E.coli* - \_\_\_\_\_ між генами *gal* та *bio*. Ділянки *att* складаються із \_\_\_\_\_ нуклеотидів. В результаті рекомбінації між \_\_\_\_\_ та \_\_\_\_\_, яка протікає за механізмом \_\_\_\_\_, фагова ДНК виявляється включеною в хромосому. Рекомбінація протікає за участю генів \_\_\_\_\_ фагу та \_\_\_\_\_ - бактерії. Для інтеграції потрібен також білок фагу - продукт гену \_\_\_\_\_ (\_\_\_\_\_) та особливий хазяйський білок інтеграції. Виходу профагу із хромосоми перешкоджає \_\_\_\_\_, який наділяє клітину одночасно \_\_\_\_\_.

Синтез репресора контролюється \_\_\_\_\_.

Е. Вивчіть за практичним посібником технологію виділення бактеріофагів із навколишнього середовища, отримання фаголізату та виявлення (індикації) бактеріофагів. Розгляньте рисунки та фотографії що відповідають схемі виділення бактеріофагів. Виконайте наступні завдання.

**Виділення бактеріофагів та отримання фаголізату**

1. Вкажіть із яких об'єктів можна виділити бактеріофаги

2. Опишіть технологію виділення бактеріофагів та отримання фаголізату:

1-й етап – вивільнення досліджуваного матеріалу від великих частинок:

2-й етап – видалення бактерій із  
шляхом: 1)

або  
або 2)

3-й етап – випробування на присутність фагу:

Фаголізат – це

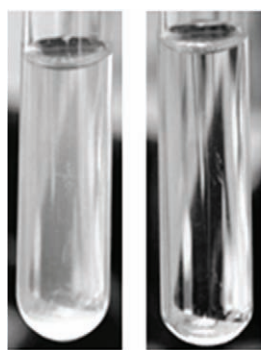
Для виділення із лізогенної культури фага культуру чутливих бактерій

Для отримання «чистої лінії» фагу (вільної від домішок інших фагів) проводять послідовні пасажі морфологічно однотипових негативних колоній на газоні одного й того ж бактеріального штаму. Готовий препарат фагу представляє собою прозору жовтувату рідину. В промислових умовах і в спеціалізованих лабораторіях з метою підвищення стабільності фільтрат фаголізатів піддають ліофільній сушці та таблетують.

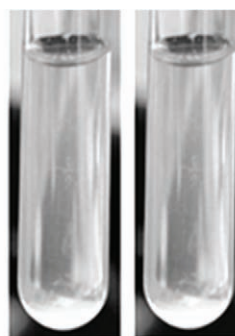
#### **Виявлення (індикація, якісне визначення) бактеріофагів**

1. Індикацію бактеріофагу в бульйонній культурі бактерій проводять за її прозорістю через декілька годин інкубації при 37°C.

На рис.5.5 показані результати двох визначень, поставлених з використанням чистих культур *Escherichia coli* та *Salmonella enterica*. Зробіть висновок про специфічність фага, виділеного з річкової води.



1 2  
*Escherichia coli*



1 2  
*Salmonella enterica*

Рис. 5.5. Результати індикації та якісного визначення фага (після інкубації)

Висновок: в річковій воді міститься фаг

---

Дайте пояснення отриманому результату:

---

---

---

2. Індикацію бактеріофага на щільних середовищах проводять або за допомогою спот-тесту або методом агарових шарів, запропонованим А. Грація.

1) Сутність методу спот-тест (рис.5.6):

---

---

---

Причина появи стерильної плями на місці нанесення краплі, яка містить матеріал:

---

---



Рис. 5.6. Спот-тест

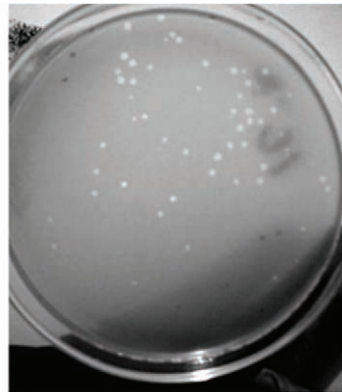


Рис. 5.7. Метод агарових шарів

2) Розкрийте суть методу агарових шарів (рис.5.7):

---

---

---

---

Поясніть як утворюється негативна колонія бактеріофага

---

---

---

---

## **Висновки:**

---

---

---

---

---

---

---

---

## **Контрольні питання:**

1. Дайте визначення поняттям «бактеріофаги», «бактеріофагія».
2. Дайте класифікацію бактеріофагів за здатністю викликати інфекцію і за спектром дії.
3. Назвіть і охарактеризуйте три стани фага.
4. Наведіть морфологічну класифікацію бактеріофагів.
5. Назвіть приклади ДНК-вмісних фагів. Яку вони мають будову?
6. Намалюйте схему будови фага T2 і назвіть елементи його структури.
7. Перерахуйте форми фагової інфекції і дайте їм визначення.
8. Назвіть стадії життєвого циклу вірулентних і помірних фагів.
9. Покажіть особливості морфогенеза вірулентних фагів на прикладі фага T4.
10. Дайте визначення поняттям «лізогенія» і «лізогенна конверсія».
11. У чому полягає механізм сайт-специфічної інтеграції фага  $\lambda$  в хромосому бактеріальної клітини?
12. Назвіть напрямки практичного використання бактеріофагів.
13. Розкрийте сутність технології виділення бактеріофагів з навколишнього середовища, отримання фаголізатів і виявлення фагів.

## **Література**

1. Гудзь С.П., Перетятко Т.Б., Галушка А.А. Вірусологія: підручник: [для студ. закл. вищ. осв.]/ С.П. Гудзь, Т.Б. Перетятко, А.А. Галушка. - Львів: ЛНУ імені Івана Франка, 2018. – 536 с. – (Серія «Біологічні студії»).
2. Гудзь С.П., Перетятко Т.Б., Павлова Ю.О. Загальна вірусологія. - Львів: Видавничий центр ЛНУ імені Івана Франка, 2010. – 264 с.
3. Посібник з медичної вірусології / під ред. В.М. Гиріна. – К.: Здоров'я, 1995. – 367 с.
4. Практикум із загальної вірусології / за ред. А.Л. Бойка.– К.: Видавничий центр „Київський університет”, 2000. – 269 с.

## ЗМІСТОВИЙ МОДУЛЬ 4

### РОЗПОВСЮДЖЕННЯ ВІРУСІВ, ЇХ РОЛЬ У БІОСФЕРНИХ ПРОЦЕСАХ. ВІРУСНІ ХВОРОБИ. ЗНАЧЕННЯ ВІРУСІВ ДЛЯ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ПРОЦЕСІВ

*Лабораторне заняття №6*

#### **ВІРУСИ РОСЛИН. РОСЛИНИ-ІНДИКАТОРИ. ВИДІЛЕННЯ, ОЧИСТКА ТА КОНЦЕНТРУВАННЯ ВІРУСІВ РОСЛИН.**

**Мета заняття:** Ознайомитися з рослинами-індикаторами, способами передачі вірусів рослин, симптомами вірусної інфекції рослин. Ознайомитися з методами виділення, очистки та концентрування вірусів рослин.

**Матеріали та обладнання:** роздатковий матеріал (фотографії та рисунки рослин зі змінами, спричиненими деякими вірусами), відеоматеріали, методичні рекомендації до лабораторної роботи, мультимедійний проектор.

#### **1. Основні теоретичні питання, що підлягають вивченню.**

1. Загальна характеристика фітопатогенних вірусів.
2. Симптоми захворювань рослин, заражених вірусами.
3. Способи передавання фітопатогенних вірусів.
4. Поширення вірусів по рослині.
5. Внутрішньоклітинний розвиток вірусів.
6. Біорізноманітність фітовірусів. (Повна характеристика фітопатогенних вірусів, що циркулюють на території України).

#### **2. Основні теоретичні відомості.**

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 також довів, що фільтрати листків тютюну, хворих на мозаїчність, залишаються інфекційними, хоча мікроскопічні та культуральні дослідження не виявляють у них бактерій. М.В. Беєринк 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 облігатними 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 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).

Під час механічного ураження вірус потрапляє спочатку в клітини епідермісу, потім преміщується в мезофіл та інші тканини по плазмодесмах – цитоплазматичних тяжках. Встановлена кореляція між кількістю ектодесм та чутливістю рослин до вірусів: чим менша їхня кількість на одиницю площі листової 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 флоємою. Гіббс А. та Харрісон Б. показали, що комбінація цих двох шляхів транспорту призводить до генералізації вірусної інфекції у рослині. 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. 6.1).

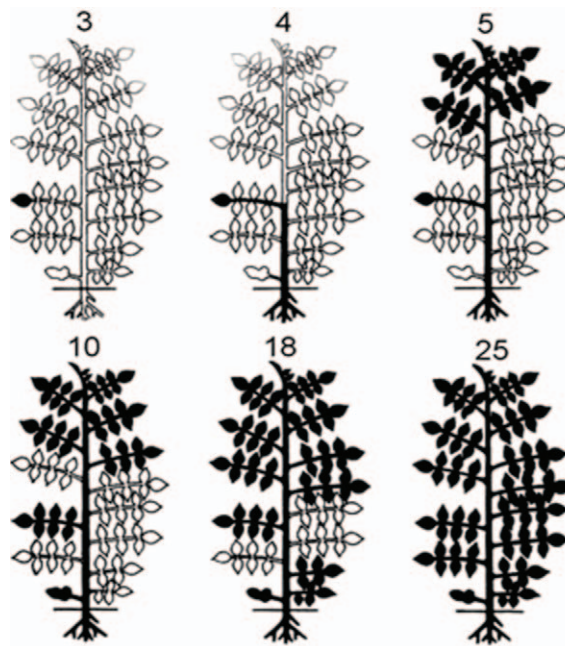


Рис. 6.1. Схема системного транспорту вірусу по рослині з часом. Цифрами позначені дні після інфікування (Гиббс, Харрисон, 1978)

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 obligatними паразитами, а час 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 використовувати 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, вірус огіркової мозаїки, вірус тютюнової мозаїки). Передача вірусів у процесі вегетативного розмноження рослин може здійснюватись за допомогою бульб (наприклад, X-вірус картоплі), цибулин, живців та ін.

В іншому разі віруси можуть потрапляти в рослину за допомогою переносників, таких, як членистоногі, нематоди та гриби. Членистоногих переносників поділяють 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 поділяться 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, Y-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 електронцільного 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.

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 розпливчатими. 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 (Cucurbitaceae) – *Cucurbita maxima*, *Cucumis sativus*.

Щирицеві (Amaranthaceae) – *Gomphrena globosa*.

Чутливість до вірусів підвищується, якщо перед зараженням рослини-індикатори на 36-48 год поміщають у темряву. 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.

#### **Виділення, очистка 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 був отриманий у вигляді паракристалів У. Стенлі в 1935 році, за що йому була присуджена Нобелівська премія.

Чистий вірусний препарат повинен містити віріони відповідного вірусу, ідентичні за розміром, морфологією, хімічним складом, біологічними та фізичними властивостями. Безпосередньо сам процес очищення включає в себе 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 абсолютно чистий вірус дуже важко, тому необхідна чистота препарату визначається цілями наступних досліджень.

## Реакція рослин-індикаторів на віруси

Вірус	Рослини-індикатори	Реакція рослин
Вірус тютюнової мозаїки (ВТМ)	Тютюн клейкий – <i>Nicotiana glutinosa</i> L.	Локальна реакція, некрози
	Тютюн звичайний – <i>Nicotiana tabacum</i> L.	Локальна реакція, некрози
	Дурман звичайний – <i>Datura Stramonium</i>	Локальна реакція, некрози
Вірус огіркової мозаїки (ВОМ)	Огірок посівний – <i>Cucumis sativus</i> L.	Локальна реакція, некрози
Х-вірус картоплі (ХВК)	Гомфрена головчаста – <i>Gomphrena globosa</i> L.	Локальна реакція, некрози Залежно від штаму вірусу – системна реакція, мозаїка
	Дурман звичайний – <i>Datura stramonium</i> L.	Локальна реакція, некрози Комплексна локальна та системна реакції
У-вірус картоплі (УВК)	Тютюн звичайний – <i>Nicotiana tabacum</i> L.	Локальна реакція, просвітлення жилок
	Дурман – <i>Datura metel</i>	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
М-вірус картоплі (МВК)	Дурман – <i>Datura metel</i>	Локальна реакція, хлоротичні плями на листках.
	Тютюн Дебни – <i>Nicotiana debneyi</i> L.	Локальна реакція, коричневі, кільцеподібні некрози
Вірус кільцевої плямистості томатів (ВКПТ)	Лобода рожева - <i>Chenopodium amaranticolor</i> L	Локальні хлорози або некрози; системний апікальний некроз
Тосповірус плямистого в'янення (вілту) томату	Петунія гібридна - <i>Petunia hybrida</i> L	
	Тютюн клейкий – <i>Nicotiana glutinosa</i> L.	Локальна реакція, некрози
Вірус некротичного пожовтіння жилок цукрового буряка	Лобода рожева – <i>Chenopodium amaranticolor</i> L	Локальні хлоротичні або некротичні ураження.

Виділення та очищення вірусів проводиться з наступними цілями:

- для пасирування (накопичення та підтримання вірусу);
- для електронномікроскопічних досліджень (визначення структури та морфології) – найважливіше зберегти віріони цілими;
- для вивчення серологічних та антигенних властивостей вірусів (в т.ч. отримання АС) – найважливіше добре очистити від антигенів господаря;
- для встановлення хімічної та субмолекулярної будови віріонів – необхідний максимальний ступінь чистоти вірусного препарату.

Зазвичай перед виділенням вірус накопичують на сприйнятливому господарі.

### **Екстракція вірусів з рослини**

Під екстракцією вірусу з рослини розуміється механічне руйнування тканин рослин (клітинних стінок і т.п.) для того, щоб вірус з клітин вийшов у отриманий рослинний сік. Механічне подрібнення тканини може відбуватися декількома 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 вивільнюються рослинні ферменти і рН зменшується у кислий бік. Вибір буферу 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). Тому потрібно підбирати такий буфер для екстракції вірусів, щоб його рН не співпадало зі значенням ізоелектричної точки вірусу. Ізоелектрична точка більшості вірусів рослин знаходиться в кислій зоні, тому для їх екстракції використовують буфери з нейтральною або помірно-лужною реакцією. Найчастіше використовуються фосфатний буфер (рН 7,4), трісборатний (рН 8,4), цитратний, карбонатний (рН 9,6), гліциновий, трісовий та ін. Як вже було сказано, при перетиранні рослинних тканин вивільнюються рослинні ферменти (поліфенолоксидази, каталази, пероксидази та ін.), які сприяють зниженню рН та безпосередньо руйнують віріони. Тому у буферні розчини рекомендується додавати хелатуючі речовини (наприклад ЕДТА), які інактивують рослинні ферменти. Це дозволяє утримати рН на потрібному рівні (тобто, вірус не випаде в осад при досягненні його ізоелектричної точки) і збільшити загальний вихід вірусу з тканини.

При виділенні вірусів рослин зазвичай наважку рослини розтирають у подвійному об'ємі відповідного буферу. Тобто, наприклад, 50 грамів рослинної тканини перетирають у 100 мл буферу. Слід також зазначити, що гомогенізація тканини, як і всі наступні операції при виділенні та очищенні 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 отримується суспензія, що містить дуже розбавлений вірус, рештки клітин (мембрани, органели, уламки клітинної стінки та ін.) та пігменти. Тому наступним етапом є очистка первинної суспензії від вищеперерахованих сторонніх компонентів. Більшість з них містить ліпіди, тому використовуються органічні розчинники, які дозволяють розчинити ці ліпидовмісні 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. З цієї причини даний етап і 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 при очищенні 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, приміром, 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. В 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 у 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.

### **Концентрування вірусної суспензії**

На наступному етапі потрібно концентрувати розбавлений вірус. Це можна зробити декількома методами, серед яких:

- осадження вірусу в ізоелектричній точці;
- висолювання;
- діаліз;
- хроматографія (іонообмінна, афінна);
- гель-фільтрація;
- диференційне центрифугування (з етапом ультра-центрифугування).

**Осадження вірусу в ізоелектричній точці.** рН отриманої суспензії доводять до ізоелектричної точки вірусу. В результаті цього вірус починає випадати в осад. Витримавши суспензію 1-2 год при даному 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 випадають в осад), а також те, що деякі віруси є чутливими до зміни рН, що може призвести до руйнування віріонів.

**Висолювання.** Білкова оболонка вірусу має зовні гідрофобні зони (їх наявність зумовлена амінокислотним складом капсидних білків), які впорядковують навколо себе молекули води у розчині буферу. Внесення у суспензію солей у дуже високих концентраціях призводить 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 їх випадіння в осад. Для висолювання найчастіше використовуються сульфати та фосфати, наприклад, сульфат амонію. Недоліком методу може бути відсутність в 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 у 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, 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 зконцентрований вірус, розчиняють (ресуспендують) у мінімальному об'ємі буферу, 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 зконцентрований 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.

### **3. Практичні 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).
3. Скласти таблицю «Характеристика фітопатогенних вірусів, що циркулюють на території України» (за доповіддю та презентацією студентів)
4. Скласти схему «Взаємодія вірусів рослин з переносниками».
5. Порівняти методи виділення вірусів для електронної мікроскопії та для пасування на рослинах.
6. Порівняти схеми виділення вірусів рослин для отримання антивірусної сироватки та для накопичення вірусу.



7. Зазначити методи які: а) використовуються тільки для очистки вірусних препаратів; б) використовуються як для очищення, так і концентрації фітовірусів.

### **Протокол лабораторної роботи №6**

1. Симптоми ураження рослин вірусами.

2. Схеми способів передачі вірусів рослин (ВТМ, ХВК, ВОМ).

**3. Фітопатогенні віруси, що циркулюють на території України:**

*Зернові культури* – вірус жовтої карликовості ячменю (ВЖКЯ), вірус смугастої мозаїки пшениці (ВСМП), вірус штрихуватої мозаїки ячменю (ВШМЯ).

*Бобові культури* – вірус мозаїки люцерни (ВМЛ), вірус жовтої мозаїки квасолі (ВЖМК).

*Овочеві культури* – вірус тютюнової мозаїки (ВТМ), вірус огіркової мозаїки (ВОМ), вірус плямистого зів'янення томатів (ВПЗТ).

*Цукрові буряки* – вірус жовтяниці цукрових буряків (ВЖБ), вірус мозаїки цукрових буряків (ВМБ).

*Картопля* – Y-вірус картоплі (YVK), X-вірус картоплі, вірус скручування листя картоплі (VCLK).

*Плодові* - вірус мозаїки яблуні (ВМЯ).

**4. Взаємодія вірусів рослин з переносниками (схема)**

**5. Методи виділення вірусів для електронної мікроскопії**

---

---

---

**6. Методи виділення вірусів для пасування на рослинах.**

---

---

7. Схема виділення вірусів рослин для отримання антивірусної сироватки

Схема виділення вірусів рослин для накопичення вірусу

8. Методи які використовуються: а) тільки для очистки вірусних препаратів;

---

---

---

б) для очищення і концентрації фітовірусів;

---

---

---

---

**Висновок:**

---

---

---

---

---

---

**Контрольні питання.**

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. Для яких цілей проводять виділення та очищення вірусів рослин?
8. Як отримують інокулюм?
9. Чим відрізняється екстракція вірусів рослин від освітлення вірусного екстракту?
10. При виділенні яких вірусів не використовують освітлення соку органічними розчинниками і чому?
11. Які чинники можуть впливати на інфекційність вірусу при виділенні та очищенні?
12. Охарактеризуйте диференційне центрифугування як метод отримання вірусного препарату.
13. Який принцип лежить в основі очищення вірусів методом висолювання?
14. Який принцип лежить в основі очищення та концентрації вірусів методом осадження вірусу в ізоелектричній точці?
15. Принцип гель-фільтрації та навести приклади її застосування у фітовірусології.

### Література

1. Гудзь С.П., Перетятко Т.Б., Галушка А.А. Вірусологія: підручник: [для студ. закл. вищ. осв.]/ С.П. Гудзь, Т.Б. Перетятко, А.А. Галушка. - Львів: ЛНУ імені Івана Франка, 2018. – 536 с. – (Серія «Біологічні студії»).
2. Гудзь С.П., Перетятко Т.Б., Павлова Ю.О. Загальна вірусологія. - Львів: Видавничий центр ЛНУ імені Івана Франка, 2010. – 264 с.
3. Практикум із загальної вірусології / за ред. А.Л. Бойка.– К.: Видавничий центр „Київський університет”, 2000. – 269 с.
4. Бойко А.Л. Экология вирусов растений. – К.: Вища школа, 1990. – 167 с.
5. Гиббс А., Харрисон Б. Основы вирусологии растений. – М.: Мир, 1978. – С.429.
6. Гнутова Р.В. Серология и иммунохимия вирусов растений. – М.: Наука, 1993. – 301с.
7. Френкель-Конрат Х. Химия и биология вирусов. – М.: Мир, 1972. – С.74-82.
8. Cann A.J. Principles of molecular virology /Academic Press Inc. San Diego, 1993.– 234 p.
9. Matthews R.E.F. Fundamentals of plant virology. Academic Press, San Diego., 1992. – 403 p.

## **ВІРУСИ ГРИПУ, ПАРАГРИПУ, КОРУ. БІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ. МЕТОДИ ЛАБОРАТОРНОЇ ДІАГНОСТИКИ.**

**Мета заняття:** ознайомитися з методами лабораторної діагностики, лікування та профілактики грипу, парагрипу та кору. Ознайомитися з принципами ідентифікації вірусів в інфекційному матеріалі; проведенням врахування результатів серологічних реакцій, вибором методів лабораторної діагностики захворювання в залежності від термінів хвороби, а також ознайомитися з хіміотерапевтичними противірусними препаратами та специфічною профілактикою грипу, парагрипу, кору.

**Матеріали та обладнання:** роздатковий матеріал (фотографії та рисунки будови та змін клітин, спричинених вірусами грипу, парагрипу, кору), відеоматеріали, методичні рекомендації до лабораторної роботи, мультимедійний проектор.

### **1. Основні теоретичні питання, що підлягають вивченню.**

1. Систематичне положення, ультраструктура вірусів грипу, парагрипу, кору.
2. Антигенна будова та типи вірусних геномів вірусів грипу, парагрипу та кору.
3. Методи культивування, індикації та ідентифікації вірусів грипу, парагрипу, кору.
4. Епідеміологія та патогенез захворювань, спричинених вірусами грипу, парагрипу, кору.
5. Лабораторна діагностика грипу, парагрипу, кору. Особливості вірусологічних та серологічних методів.
6. Препарати для лікування, специфічної профілактики грипу, парагрипу, кору.

### **2. Основні теоретичні відомості**

Вірус грипу належать до родини *Orthomyxoviridae*, роду *Influenzavirus*.  
**Морфологія:** вірус представлений одонитковою РНК, сферичної форми, складний за будовою. **Антигенна будова:** N-нейрамінідаза (N1, N2); H-гемаглютиніни (H1, H2, H3). **Методи культивування.** Виділення та культивування вірусів грипу на культурі клітин Madin-Darby canine kidney (MDCK) або 10-11-денні курячі ембріони. Визначення наявності вірусу грипу в амніотичній, алантоїсній або культуральній рідині проводять у реакції гемаглютинації (РГА); типування вірусу грипу проводять у реакції гальмування гемаглютинації (РГГА), для чого відбирають у стерильні пробірки алантоїсну (амніотичну) рідину, тестують з грипозними діагностичними сироватками згідно з інструкцією виробника; додатковий метод підтвердження наявності вірусу грипу в ізоляті - імунохроматографія (ІХА).

Джерелом інфекції є людина (хвора або носій). Основний механізм передачі захворювання - повітряно-краплинний. Інкубаційний період короткий - 1-2 доби. Вірус адгезується і проникає у клітини епітелію верхніх дихальних шляхів, де він репродукується і руйнує інфіковані клітини, що клінічно проявляється сухим болючим кашлем. Вірус грипу малостійкий у

навколишньому середовищі, чутливий до ультрафіолетового опромінення, високої температури та дезінфікуючих засобів. Матеріалом для дослідження є змиви з носоглотки, виділення із носу, кров, спинномозкова рідина, секційний матеріал. Під час проведення вірусологічного дослідження найчутливішим методом виділення вірусу є зараження 10-11 денних курячих ембріонів. Як правило, матеріал забирають у перші дні хвороби, що пов'язано із високою концентрацією вірусу. Супутню мікробіоту знищують шляхом додавання пеніциліну та стрептоміцину. При серологічному дослідженні проводять визначення титру антитіл в парних сироватках хворого за допомогою РГГА та РЗК. Застосовують біологічний метод: зараження дослідним матеріалом білих мишей або хом'яків. Для експрес-діагностики використовують риноцитоскопію, РІФ та ПЛР. Постінфекційний імунітет: напружений, тривалий, типоспецифічний. Для профілактики грипу застосовують живі, інактивовані, рекомбінантні, хімічні вакцини та протигрипозний гамма-глобулін.

Віруси парагрипу та кору належать до родини *Paramyxoviridae*. **Морфологія:** нуклеїнова кислота представлена одонитковою РНК, сферичної форми, складної будови. **Антигенна будова:** у вірусу парагрипу HN, у вірусу кору - Н. **Культивують** віруси в культурі клітинної лінії Vero/SLAM. Вона являє собою клітини Vero, що модифіковані шляхом трансфекції плазмідною, яка кодує ген рецептора людини SLAM (сигнальної лімфоцитаактивуючої молекули, відомої як CDw150), нещодавно відкритого глікопротеїна, який експресується на поверхні деяких Т і В лімфоцитів і є клітинним рецептором для вірусу кору. Культура клітин Vero/SLAM також чутлива до вірусу червоної висипки, хоча ЦПД при цьому важко розрізнити. **Джерелом інфекції** є лише хвора людина і досить обмежений час – від останніх двох-трьох діб інкубаційного періоду до закінчення періоду висипань (5-7 доба хвороби). Основні механізми передачі захворювань - повітряно-крапельний, для вірусу кору існує також вертикальний від матері до дитини через плаценту.

Віруси малостійкі у навколишньому середовищі, чутливі до ультрафіолетового опромінення, високої температури, дезінфікуючих засобів, висушування. Матеріалом для дослідження є змиви з носоглотки, виділення із носу, кров, спинномозкова рідина, секційний матеріал. Постінфекційний імунітет при парагрипі недовготривалий (декілька місяців), при кору - напружений тривалий та зберігається впродовж всього життя. Для лабораторної діагностики застосовують вірусологічний, серологічний та експрес методи. Під час проведення вірусологічного дослідження заражають культури клітин. При серологічному дослідженні проводять визначення титру антитіл в парних сироватках хворого за допомогою РГГА та РЗК. Для експрес-діагностики використовують РІФ. Специфічна профілактика кору проводиться живою атенуваною коровою вакциною відповідно до календаря щеплень, або трьохкомпонентною КПК (кір, червона висипка, паротит) вакциною. Специфічної профілактики парагрипу не розроблено.

**Постановка реакцій для ідентифікації вірусів, з якими знайомляться студенти на занятті:**

1. Для серотипування вірусу грипу ставлять РГГА крапельним методом. На предметні скельця наносять 5 крапель змиву з носоглотки хворого. Додають по краплі типові антигрипозні сироватки N1H1, N2H2 та нормальну сироватку для контролю. Потім у кожен краплю додають по 1 краплі завису курячих еритроцитів. Результати враховують через 2-5 хв. Тип вірусу відповідає тій діагностичній сироватці, в присутності якої відбувається гальмування гемаглютинації. Інші сироватки, зокрема нормальна, не гальмують аглютинацію еритроцитів.

2. Врахування результатів РГГА для виявлення титру протипарагрипозних антитіл в парних сироватках хворого.

Реакція ставиться у двох рядах лунок. В кожному ряді лунок знаходиться розведення сироватки пацієнта, взятої на початку захворювання (I ряд) і через 10 днів (II ряд). До лунок кожного ряду вносять вірусний діагностикум в об'ємі 0,2 мл (4 гемаглютинуючі одиниці). Вихідне розведення сироваток від 1:10 до 1:640. Після чого до кожної лунки додають 1% суспензію курячих еритроцитів. Реакція супроводжується контролями: K1- контроль сироватки; K2 - контроль діагностикуму, K3 - контроль еритроцитів. Результат реакції оцінюється починаючи із контролів в якому спостерігається компактний осад еритроцитів у вигляді "гудзика" (K1, K3) та аглютинація еритроцитів "парасолька" (K2). У деяких дослідних лунках еритроцити осідають компактно у вигляді "гудзика" (результат позитивний). Це відбувається тому, що антитіла пацієнта взаємодіють з гемаглютиніном вірусного діагностикуму і еритроцити осідають на дно лунки. У деяких дослідних лунках відбувається склеювання еритроцитів за допомогою вірусного діагностикуму (результат негативний). Титр антитіл - найбільше розведення досліджуваної сироватки, яке дає позитивну реакцію (остання лунка із компактним осадом). Зростання титру антитіл в 4 і більше разів підтверджує діагноз.

3. Виявлення приросту титру антитіл проти вірусу кору враховують за допомогою реакції зв'язування комплементу (РЗК), яка складається з 2 систем: антиген + антитіло + комплемент (I система), завис еритроцитів + гемолітична сироватка (II система). Проходить в 2 фази: I специфічна, яка обумовлює зв'язування комплементу в разі відповідності антитіл та антигену, при невідповідності – антиген залишається вільним. При введенні в дослід II (індикаторної) системи гемоліз відбудеться тільки при наявності вільного комплементу (реакція негативна). В разі, коли комплемент адсорбувався на системі антиген-антитіло, гемоліз не відбувається (реакція позитивна).

### **Протокол лабораторної роботи №7**

1. Ознайомитися з таксономією вірусів родин *Orthomyxoviridae* та *Paramyxoviridae* та визначити таксономічне положення вірусів грипу А, В, С, вірусу кору, парагрипу і епідемічного паротиту (родина→рід→вид).

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

2. Ознайомитись з життєвим циклом *вірусу грипу А* (роздатковий матеріал).  
Замалювати його та зазначити особливості кожного етапу.

3. Замалювати життєвий цикл параміксовірусів (за рисунками роздаткового матеріалу).



4. Ознайомитись з матеріалом підручника [1] ст. 313 – 319 та зазначити особливості будови віріонів грипу А та функції білкових компонентів:

Геном представлено

Тип симетрії нуклеокапсиду -

Функції гемаглютиніну (Н):

1)

2)

3)

4)

Функції нейрамінідази (N):

1)

2)

F-білок -

NP-білок -

PB1-транскриптаза -

PB2-ендонуклеаза -

PA-репліказа -

M1-білок -

M2-білок -

Зазначити місце транскрипції, синтезу білка та реплікації генома вірусу грипу А

5. Зазначити особливості будови віріонів *Морбілівірусу кору* та функції білкових компонентів:

Геном представлено

Тип симетрії нуклеокапсиду

Функції білків:

F-білок -

M-білок -

N-білок -

Зазначити місце транскрипції, синтезу білка та реплікації генома *Морбілівірусу* *кору*

---

---

---

---

6. Розглянути та запропонувати вирішення ситуативних задач.

1. При обстеженні хворого на ГРВІ було взято змив із носоглотки, яким заразили курячий ембріон. Через тиждень курячий ембріон загинув. Як довести, що причиною загибелі ембріона був вірус грипу?

2. У дитини ознаки гострої респіраторної вірусної інфекції на 4-й день після захворювання з'явився папульозний висип за вухами, потім на лобі, обличчі, а далі на тулубі; на слизовій оболонці щік виявляються плями Коплика-Філатова. Який діагноз можна поставити за клінічними ознаками? Як його уточнити?

**Висновок:**

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### Контрольні питання.

1. Які віруси називають зоопатогенними?
2. Назвіть способи проникнення зоопатогенних вірусів в організм людини.
3. Що таке тропізм вірусів?
4. Опишіть будову і процес взаємодії з клітиною *вірусу групи А*.
5. Порівняйте реплікацію генома ортоміксо- і параміксовірусів.
6. Які захворювання спричиняють представники родини *Paramyxoviridae*?
7. Які методи застосовують для лабораторної діагностики захворювання, спричиненого *вірусом групи А*?
8. Які методи застосовують для лабораторної діагностики захворювання, спричиненого *Морбілівірусом кору*?

### Література

1. Гудзь С.П., Перетятко Т.Б., Галушка А.А. Вірусологія: підручник: [для студ. закл. вищ. осв.]/ С.П. Гудзь, Т.Б. Перетятко, А.А. Галушка. - Львів: ЛНУ імені Івана Франка, 2018. – 536 с. – (Серія «Біологічні студії»).
2. Гудзь С.П., Перетятко Т.Б., Павлова Ю.О. Загальна вірусологія. - Львів: Видавничий центр ЛНУ імені Івана Франка, 2010. – 264 с.
3. Практикум із загальної вірусології / за ред. А.Л. Бойка.– К.: Видавничий центр „Київський університет”, 2000. – 269 с.
4. В.П.Широбоков та співавт. Медична мікробіологія, вірусологія, імунологія, Нова книга, Вінниця, 2011. – С. 544, 545-547.
5. К.Д. Пяткін, Ю.С. Кривошеїн. Мікробіологія з вірусологією та імунологією; Київ, 1992. - С. 357-360.
6. І.С. Гайдаш, В.В. Флегонтова. Медична вірологія. Луганськ, 2002. – С.228-237.
7. Мікробіологія, вірусологія, імунологія, інфекційні хвороби. Словник/ За ред Г.К.Палія, В.І.Палія. – Київ: Здоров'я, 2004. – С. 33, 83, 88, 91.

## ВІРУСИ ПОЛІОМІЄЛІТУ, ЕСНО, КОКСАКІ. БІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ. МЕТОДИ ЛАБОРАТОРНОЇ ДІАГНОСТИКИ ЗАХВОРЮВАНЬ

**Мета заняття:** ознайомитися з методами вірусологічної діагностики поліомієліту, ЕСНО, Коксакі; ознайомитися з інтерпретацією результатів діагностики інфекцій, які спричиняють пікорнавіруси та вибором препаратів для специфічної профілактики поліомієліту. Ознайомитися з обліком результатів „кольорової проби”, цитопатичної дії (ЦПД) вірусу на культурі клітин, реакції нейтралізації; ознайомитись з перевагами та недоліками живої й інактивованої вакцин проти поліомієліту, календарем щеплень проти поліомієліту.

**Матеріали та обладнання:** роздатковий матеріал (фотографії та рисунки будови та змін клітин, спричинених вірусами поліомієліту, ЕСНО, Коксакі), методичні рекомендації до лабораторної роботи, мультимедійний проектор.

### 1. Основні теоретичні питання, що підлягають вивченню.

1. Систематичне положення, ультраструктура вірусів поліомієліту, ЕСНО (Enteric Cytopathogenesis Human Orphan), Коксакі, вірусного гепатиту А.
2. Антигенна структура вірусів поліомієліту, ЕСНО, Коксакі.
3. Резистентність, методи культивування вірусів поліомієліту, ЕСНО, Коксакі.
4. Патогенез захворювань, спричинених вірусами поліомієліту, ЕСНО, Коксакі, вірусного гепатиту А.
5. Методи лабораторної діагностики захворювань.
6. Профілактика захворювань: неспецифічна; препарати для специфічної профілактики поліомієліту, вірусного гепатиту А.

### 2. Основні теоретичні відомості

Віруси поліомієліту, ЕСНО (Enteric Cytopathogenesis Human Orphan), Коксакі належать до родини *Picornaviridae*. **Морфологія:** прості віруси, які мають форму багатогранника і містять одониткову +РНК. **Антигена будова:** вірус поліомієліту має серовари I, II, III, які чітко розрізняються в РН і не викликають перехресного імунітета; віруси ЕСНО – 31 серотип; віруси Коксакі А – 23 серотипи; віруси Коксакі В – 6 серотипів. **Методи культивування:** культура клітин фібробластів, HeLa, ізоляція поліовірусу з використанням моношарової клітинної культури тканин (RD и L20B). **Резистентність:** стійкі до детергентів, спиртів, до низьких температур; чутливі до альдегідів, сполук хлору, фенолу, УФО, висушування, нагрівання вище 50°C. Тривало зберігається в молоці, маслі, воді, на білизні, в фекаліях, стічних водах. **Джерелом інфекції** є хвора людина або носій. **Механізм зараження** - фекально-оральний. **Шлях передачі вірусів** – аліментарний. **Органотропність вірусів:** ентероцити, лімфоїдний апарат тонкого кишківника, мотонейрони головного та спинного мозку. **Імунітет** – типоспецифічний. **Методи лабораторної діагностики захворювань:** вірусологічний, серологічний. **Специфічна профілактика**

**поліомієліту:** жива вакцина Сейбіна; інактивована вакцина Солка. **Терапія захворювань:** використання інтерферону, імуноглобуліну.

**Структура лабораторного дослідження на поліомієліт, ЕСНО та Коксакі**

Матеріал для дослідження: фекалії, ліквор, кров, сеча, секційний матеріал.

***Вірусологічне дослідження***

1. Культивування вірусів: зараження культури клітин HeLa (віруси поліомієліту, ЕСНО, Коксакі), білих мишей (віруси Коксакі).
2. Індикація вірусів за ЦПД, бляшкоутворенням, „кольоровій” пробі, спастичному паралічі та смерті мишей.
3. Ідентифікація вірусів за РЗК, РН в культурі клітин або на новонароджених мишах.

***Серологічне дослідження***

Виявлення титру антитіл в парних сироватках за допомогою РЗК, РН «кольорової проби».

***Експрес-діагностика***

РІФ, імунона електронна мікроскопія

**3. Практичні завдання:**

1. Ознайомитися з мікрофотографіями незміненої культури клітин та ЦПД вірусу поліомієліту (роздатковий матеріал).
2. Ознайомитися з урахуванням результатів РН методом „кольорової” проби для ідентифікації вірусу поліомієліту.

***Принцип методу.*** Вірус, нейтралізований антитілами специфічної сироватки, не спричиняє цитопатичну дію у культурі клітин. Позитивний результат реакції візуально виявляється зміною кольору середовища через утворення метаболітів неушкодженими клітинами. ***Хід постановки реакції нейтралізації (РН).*** У дослідні пробірки з культурою клітин було внесено наступні компоненти: 1 дослідна пробірка – діагностична сироватка проти вірусу поліомієліту I типу і виділений вірус; 2 дослідна пробірка – діагностична сироватка проти вірусу поліомієліту II типу і виділений вірус; 3 дослідна пробірка – діагностична сироватка проти вірусу поліомієліту III типу і виділений вірус; 4 пробірка - контроль вірусу; 5 пробірка - контроль сироваток на цитотоксичність; 6 пробірка - контроль культури; 7 пробірка - контроль середовища. Облік реакції починають з контролів. Колір контрольного середовища – малиновий. Контроль культури – колір середовища – жовтий (рН – 6,6). Контроль сироваток – середовище жовте. Контроль вірусу – колір середовища не змінений. Тип вірусу встановлюють за зміною кольору середовища з малинового на жовтий у одній із дослідних пробірок, у якій діагностична сироватка нейтралізувала вірус.

3. Врахувати результати реакції нейтралізації (РН) методом „кольорової” проби для встановлення титру антитіл в сироватці крові хворого поліомієлітом.

Метод парних сироваток використовують для серологічної діагностики поліомієліту. «Кольорова проба» базується на здатності вірусу пригнічувати обмінні процеси в інфікованих культурах клітин. В результаті зберігається вихідний колір середовища (малиновий). Антитіла сироватки крові хворих нейтралізують вірус і метаболізм клітин продовжується. Це призводить до накопичення кислих продуктів, які змінюють рН середовища і воно набуває жовтого кольору (реакція позитивна).

Для постановки реакції в двох рядах пробірок готують розведення парних сироваток пацієнта (1:10 – 1:160). До кожної пробірки додають живильне середовище для культур клітин та поліовірус певного типу (100 ЦПД<sub>50</sub>/мл) та проводять інкубування 30 хв при 18-20 °С. Потім додають завис клітин HeLa (40000 кл/мл) з індикатором та інкубують 5-7 діб при 37 °С.

Результати реакції враховують візуально, порівнюючи колір середовища в дослідних та контрольних пробірках. **Титр сироватки** – це найбільше її розведення, при якому відбулась нейтралізація вірусу (остання пробірка з культурою клітин, де середовище жовтого кольору). Діагностичне значення має наростання титру антитіл у другій сироватці більш, ніж у 4 рази в порівнянні з першою сироваткою.

4. Врахувати результати реакції зв'язування комплементу (РЗК). Визначити титр антитіл в парних сироватках хворого поліомієлітом.

Реакція зв'язування комплементу ставиться з парними сироватками хворого на поліомієліт. Для цього кров у пацієнта беруть двічі: в перші дні хвороби та через 3-4 тижні. Першу сироватку зберігають в холодильнику і реакцію ставлять одночасно з обома сироватками. Для постановки РЗК в двох рядах пробірок готують послідовні розведення парних сироваток пацієнта (1:4 – 1:64). Потім додають відтитрований антиген та комплемент в робочих дозах. Дослід супроводжують 2 контролями: сироватки (фізіологічний розчин, сироватка, комплемент) та антигену (фізіологічний розчин, антиген, комплемент). Одночасно готують індикаторну систему (інактивована гемолітична сироватка кролика та 3 % завис еритроцитів барана у фізіологічному розчині). Обидві системи витримують в термостаті 40 хв., після чого до основного дослідження та контролів додають гемолітичну систему. Повторно витримують реакцію в термостаті до появи гемолізу в контролях. РЗК вважають позитивною при затримці гемолізу в дослідних пробірках не менш як на «++». **Титр антитіл** визначають за найбільшим розведенням сироватки, при якому реєструють позитивну РЗК. Діагностичне значення має наростання титру антитіл у другій сироватці більш, ніж у 4 рази в порівнянні з першою сироваткою.

5. Познайомитись з препаратами для профілактики та діагностики поліомієліту, ЕСНО, Коксакі.

1) Полівалентна та типоспецифічні поліомієлітні сироватки I-III типів. Використовують для типування вірусів поліомієліту в реакціях нейтралізації «кольорової проби» та ЦПД.

2) Полівалентні та типоспецифічні (моновалентні) сироватки Коксакі та ЕСНО. Використовують для диференціації та типування відповідних вірусів.

3) Пероральна жива вакцина проти поліомієліту. Містить атенуйовані штами вірусів поліомієліту I-III типів, культивованих на культурі клітин. Вакцину випускають у рідкому вигляді для перорального використання, починаючи з 2-місячного віку.

### Протокол лабораторної роботи №8:

1. Ознайомитися з таксономією вірусів родини *Picornaviridae* [1, с. 106] та визначити таксономічне положення вірусів поліомієліту, ЕНСО, Коксакі, вірусного гепатиту А (родина→рід→вид).

---

---

---

---

---

---

---

---

2. Зазначити особливості будови віріонів родини пікорнавірусів.

Тип симетрії нуклеокапсиду

Поліпептидний склад протомерів капсиду

Геном пікорнавірусів представлено

3. Ознайомитися з загальною схемою будови геномної РНК і процесингу поліпротеїну пікорнавірусів (рис.8.1) та зазначити, які білки кодують ділянки Р1, Р2, Р3.

Ділянка Р1 кодує

Ділянки Р2 і Р3 кодують

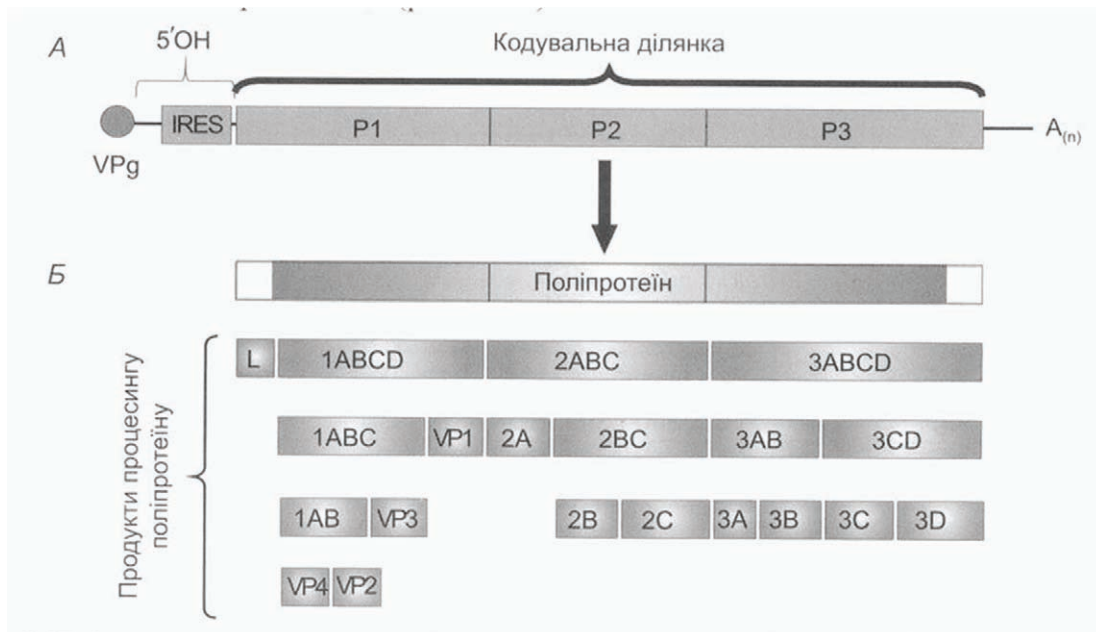


Рис. 8.1. Загальна схема будови геномної РНК (А) і процесингу поліпротеїну (Б) пікорнавірусів

4. Ознайомитись з рисунком 8.2. Зазначити клітинні рецептори для пікорнавірусів. Заповнити таблицю 8.1.

Таблиця 8.1

**Клітинні рецептори для пікорнавірусів**

Вірус	Серотип	Рецептор	Опис
Риновіруси			
Риновіруси			
Ентеровіруси			
Ентеровіруси			
Ентеровіруси			
Ентеровіруси			



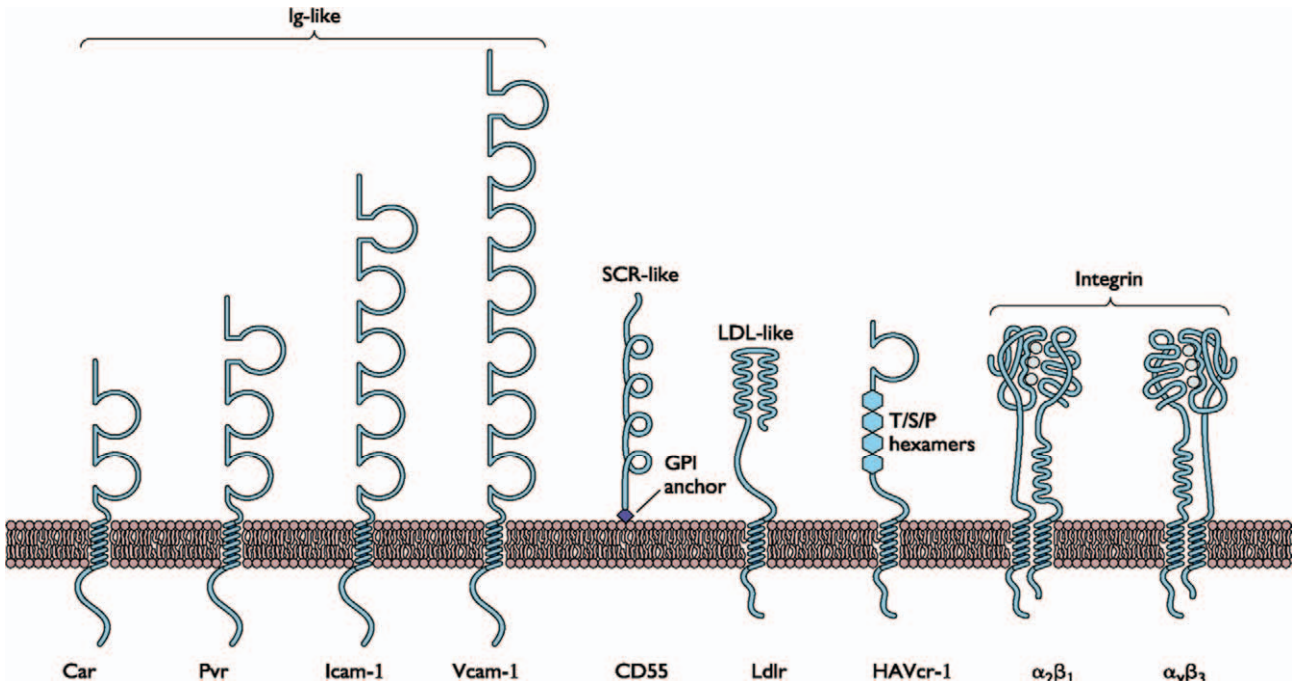


Рис. 8. 2. Клітинні рецептори до яких приєднуються представники родини *Picornaviridae*: ІG-подібні молекули, представники родини імуноглобулінових рецепторів виявляються на клітинах імунної системи. Scr - Короткі консенсусні повтори. LDL-ліпопротеїни низької щільності. T/S/P - треонін/серин/пролін.

5. За матеріалами підручника [1, с. 325] з'ясувати відмінності між ентеро- та риновірусами. Заповнити таблицю 8.2.

Таблиця 8.2

**Різниця між ентеро- та риновірусами**

Назва	Чутливість до змін рН	T <sub>опт</sub> репродукції	Чутливість до детергентів	Серотипи
<i>Rhinoviruses</i>				
<i>Enteroviruses</i>				

6. Скласти та замалювати схему трансляції пікорнавірусів.

7. За матеріалами доповіді студентів ознайомитися з клінічними формами поліомієліту та заповнити таблицю 8.3.

Таблиця 8.3

**Форми поліомієліту**

Форма поліомієліту	Характеристика

8. Дати характеристику вакцинам, які застосовуються для профілактики поліомієліту:

Вакцини:

1) вакцина Дж.Солка (1953 р.) –

---

---

2) вакцина А. Себіна (1956 р.) –

---

---

9. Назвіть захворювання, які викликають віруси Коксакі.

---

---

---

---

10. У процесі вивчення ентеровірусів були виявлені віруси, які не могли бути віднесені до ентеровірусів (віруси ЕСНО). Зазначте за якими властивостями вони відрізняються.

1.

2.

11. Зазначте особливості епідеміології вірусного гепатиту А.

Джерело інфекції:

Механізм передачі:

Чутливість до ВГА:

Сезонність:

Циклічність:

12. Назвіть типи вакцин, які розробляють та використовують для специфічної профілактики гепатиту А.

**Висновок:**

## Матеріали для самоконтролю

### Тестові завдання.

1) Перше щеплення проти поліомієліту проводять у трьохмісячному віці з використанням вакцини Себіна. Який клас імуноглобулінів не відповідає в цьому разі за утворення поствакцинального імунітету?

- A. Ig G
- B. IgA секреторні
- C. IgA сироваткові
- D. IgE
- E. IgM

2) Матеріалом від дитини з попереднім діагнозом «ентеровірусна інфекція» заразили культури клітин мавпи (Vero) і мишат-сисунків, в результаті не виявлено цитопатичного ефекту на культурі клітин, але зареєстрована загибель мишок-сисунців. Які ентеровіруси могли викликати захворювання у цієї дитини?

- A. Коксакі А
- B. Коксакі В
- C. ЕСНО
- D. Поліовіруси
- E. Некласифіковані

3) Для серологічної діагностики поліомієліту досліджують парні сироватки хворого. Що слід використати як антиген в реакції нейтралізації цитопатичної дії?

- A. Антигени -гемаглютиніни.
- B. Антигени з капсидних білків віруса.
- C. Антигени, інактивовані формаліном.
- D. Живі віруси трьох типів.
- E. Комплементзв'язуючі антигени віруса.

4) У хворого М., після повернення з Індії запідозрили поліомієліт. Які дослідження необхідно провести з метою підтвердження діагнозу?

- A. Виділення вірусу із фекалій та його ідентифікацію, серологічне дослідження парних сироваток крові.
- B. Дослідження промивних вод шлунка методом флюорисціюючих антитіл.
- C. Здійснити посів випорожнень на середовища збагачення.
- D. Індикація вірусу в фекаліях методом електронної мікроскопії.
- E. Мікроскопія крові методом роздавленої та висячої краплі.

5) Від хворого гострою кишковою інфекцією виділено вірус, який віднесено до роду ентеровірусів. Для встановлення серотипу віруса застосовують діагностичні сироватки. Вкажіть, які антитіла повинні містити ці сироватки?

- A. Проти білків капсиду.
- B. Проти білків суперкапсидної оболонки.
- C. Проти вірусних гемаглютининів.

- D. Проти вірусних ферментів.
- E. Проти неструктурних білків віруса.

### **Контрольне завдання.**

*Ситуаційна задача.* До лікарні госпіталізували хлопчика 6 років, який захворів 5 днів тому. У нього раптово підвищилась температура, сильно заболіла голова, була повторна блювота, відзначались біль у руках і ногах. У наступні дні стан дитини погіршився. При обстеженні у дитини реєструвались висока температура, різка слабкість, менингеальні симптоми, на правій нозі знижений м'язовий тонус, різко ослаблені сухожильні рефлекси, стопа звисає. При пункції спинномозкового каналу цереброспінальна рідина витікала під тиском, бактерії не виявлені. Дитині поставлений попередній діагноз: «паралітична форма поліомієліту?»

Завдання:

1. Вкажіть таксономічне положення вірусу поліомієліту, опишіть його ультраструктуру.
2. Назвіть джерело та шляхи поширення поліомієліту. Яким чином міг заразитися хлопчик?
3. Опишіть патогенез поліомієліту. Назвіть основні клінічні форми захворювання.
4. Який досліджуваний матеріал потрібно взяти для мікробіологічного дослідження? Назвіть мету методів мікробіологічної діагностики захворювання.
5. Якими препаратами проводять специфічну активну профілактику поліомієліту? Назвіть їх переваги та недоліки.

### **Література**

1. Гудзь С.П., Перетятко Т.Б., Галушка А.А. Вірусологія: підручник: [для студ. закл. вищ. осв.]/ С.П. Гудзь, Т.Б. Перетятко, А.А. Галушка. - Львів: ЛНУ імені Івана Франка, 2018. – 536 с. – (Серія «Біологічні студії»).
2. Гудзь С.П., Перетятко Т.Б., Павлова Ю.О. Загальна вірусологія. - Львів: Видавничий центр ЛНУ імені Івана Франка, 2010. – 264 с.
3. Практикум із загальної вірусології / за ред. А.Л. Бойка.– К.: Видавничий центр „Київський університет”, 2000. – 269 с.
4. В.П.Широбоков та співавт. Медична мікробіологія, вірусологія, імунологія, Нова книга, Вінниця, 2011. – С. 544, 545-547.
5. К.Д. Пяткін, Ю.С. Кривошеїн. Мікробіологія з вірусологією та імунологією; Київ, 1992. - С. 357-360.
6. І.С. Гайдаш, В.В. Флегонтова. Медична вірологія. Луганськ, 2002. – С.228-237.
7. Мікробіологія, вірусологія, імунологія, інфекційні хвороби. Словник/ За ред Г.К.Палія, В.І.Палія. – Київ: Здоров'я, 2004. – С. 33, 83, 88, 91.

**ВІРУСИ РОДИН *REOVIRIDAE*, *RETROVIRIDAE*, *TOGAVIRIDAE*.  
БІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ. МЕТОДИ ЛАБОРАТОРНОЇ  
ДІАГНОСТИКИ ЗАХВОРЮВАНЬ**

**Мета заняття:** Ознайомитися з особливостями морфологічної будови, основними біологічними властивостями, принципами класифікації вірусів родин *Reoviridae*, *Retroviridae*, *Togaviridae*. Ознайомитись з основними періодами та типами взаємодії вірусів з чутливими клітинами, основними механізмами неспецифічного та специфічного противірусного захисту. Ознайомитися з методами діагностики ВІЛ-інфекції. Навчитись пояснювати етапи постановки імуноферментного аналізу для виявлення противірусних антитіл; інтерпретувати результати реакції ІФА, поставленої з метою виявлення противірусних антитіл.

**Матеріали та обладнання:** роздатковий матеріал (фотографії та рисунки будови віріонів вірусу імунодефіциту людини, вірусу краснухи), відеоматеріали, методичні рекомендації до лабораторної роботи, мультимедійний проектор.

**1. Основні теоретичні питання, що підлягають вивченню.**

1. Загальна характеристика вірусів родини *Reoviridae*. Ротавірусна інфекція.
2. Загальна характеристика вірусів родини *Retroviridae*. Класифікація, роль в патогенезі людини.
3. Ультраструктура, антигенна будова, резистентність ВІЛ.
4. Патогенез ВІЛ-інфекції.
5. Методи лабораторної діагностики ВІЛ-інфекції.
6. Профілактика СНІДу.
7. Загальна характеристика вірусів родини *Togaviridae*.
8. Краснуха (червона висипка): епідеміологія, патогенез та профілактика захворювання.

**2. Основні теоретичні відомості**

**Родина *Reoviridae***

Назва родини походить від початкових слів *respiratory enteric orphan*, що в перекладі з англ. означає "респіраторний ентеральний сиротський вірус" (Себін, 1959). Раніше реовіруси відносили до вірусів ЕСНО. Нині до складу родини входять дві підродина: *Spinareovirinae* та *Sedoreovirinae*.

Підродина *Spinareovirinae* містить роди: *Orthoreovirus*, *Aquareovirus*, *Oryzavirus*, *Fijivirus*, *Mycoreovirus*, *Cypovirus*, *Idnoreovirus*, *Dinovernavirus*, *Coltivirus*.

1. Рід *Aquareovirus* включає шість антигенних груп (А–G). Група А містить реовіруси американського омара 13p2V, атлантичної сельді; В – віруси чавичі; С – золотавого синця; D – сома; Е – віруси білокорового палтуса; F – реовіруси кети, кіжуча; G – вірус американського трав'яного коропа.
2. До роду *Coltivirus* належать віруси колорадської кліщової гарячки, Ейч, каліфорнійського зайця, лосося.

3. Рід *Cypovirus* містить 14 серотипів вірусів лускокрилих, зокрема тутувого шовкопряда та ін.
4. До роду *Orthoreovirus* належать ортореовіруси ссавців, птахів, бабуїнів, рептилій.
5. Рід *Idnoreovirus* містить віруси дрозодфіли, плодової мошки тощо.
6. Рід *Dinovernavirus* – реовірус комара *Aedes pseudoscutellaris*.

Роди *Fijivirus* та *Oryzavirus* містять віруси рослин, а рід *Mycoreovirus* – віруси грибів.

До складу підродини *Sedoreovirinae* входять:

1. Рід *Orbivirus* – віруси синього язика овець, епізоотичної геморагічної хвороби оленів, африканської хвороби коней, Корріпарта, Чангінола, Орунго, Кемерово та ін.
2. Рід *Rotavirus* включає п'ять антигенних груп (А–Е) і, можливо, ще дві групи (F та G). До групи А відносять ротавіруси мавп, до С, Е – свиней, до D, F, G – ротавіруси курей.
3. Рід *Seadornavirus* – віруси Банна, Кадіпіро, Лаонінг.
4. Рід *Cardoreovirus* – реовірус китайського мохнаторукого краба *Eriocheir sinensis*.

Представники роду *Mimoreovirus* інфікують мікрководорості *Micromonas pusilla*, а роду *Phytoreovirus* – вищі рослини.

Віріони діаметром 60–80 нм. Зовнішня ліпідна оболонка відсутня (рис. 9.1). Віріон може складатися з одного, двох чи трьох шарів капсомерів. Кожна капсидна оболонка має ікосаедричну симетрію. У випадку двошарового капсиду зовнішній капсид складається з 32 капсомерів діаметром 18 нм. Він може бути видалений шляхом обробки хемотрипсином або детергентами. Серцевина має 12 п'ятикутних фасеток, що утворюються капсомерами внутрішнього капсиду, у центрі яких є відростки діаметром 10 нм із внутрішнім каналом, через який виходять назвні нові синтезовані молекули мРНК.

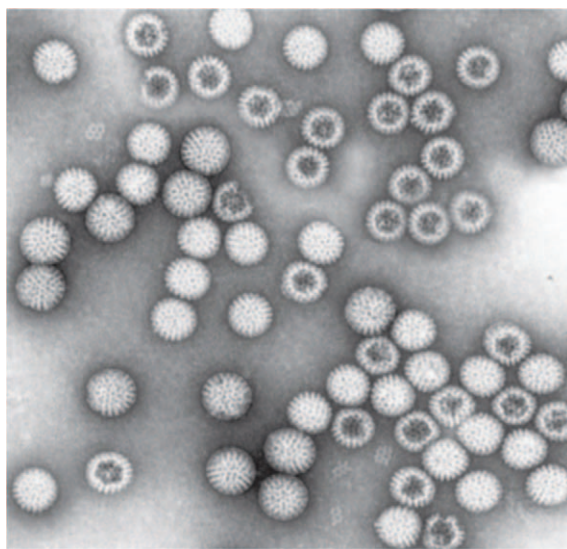


Рис. 9.1. Електронномікроскопічне зображення віріонів Ротавірусів

Геном складається з 10–12 сегментів лінійної дволанцюгової РНК (длРНК) із загальною молекулярною масою 12–20 x 10<sup>6</sup> Да. Вміст РНК становить 14 % від сухої маси віріона. Кожний фрагмент РНК є окремим геном. Для виникнення інфекційного процесу необхідна наявність усіх фрагментів РНК. Віріони містять від шести до десяти поліпротеїнів, включаючи транскриптазу та інші ферменти (фосфогідролаза, гуанілінтрансфераза, метилтрансфераза), необхідні для синтезу кеп-структури. Вісім білків є структурними:  $\lambda_1$ – $\lambda_3$ ,  $\mu_1$ ,  $\mu_2$ ,  $\sigma_1$ – $\sigma_3$ . Три поліпептиди ( $\mu_1C$ ,  $\sigma_1$  та  $\sigma_3$ ) входять до складу зовнішнього капсиду, а п'ять – до складу серцевини. Білок  $\sigma_1$  забезпечує зв'язування з клітинними рецепторами, він також є вірусним гемаглютиніном і основним типоспецифічним антигеном. Білок  $\mu_1C$  забезпечує проникнення вірусу в клітину та його поширення в організмі. Він утворюється шляхом протеолітичного нарізання білка  $\mu_1$ . Ліпіди у структурі віріонів не виявлені. Вуглеводи входять до складу глікопротеїдів зовнішнього капсиду. Реплікація та збірка відбуваються в цитоплазмі, часто у зв'язку з гранулярною чи фібрилярною віроплазмою.  $M=13025 \times 10^3$  кДа. Густина в градієнті хлориду цезія 1,36–1,39 г/см<sup>3</sup>. Коефіцієнт седиментації 740 S. Віруси стійкі до нагрівання при температурі 56 °С упродовж 2 год, стабільні при рН 2,2–8, стійкі до ефіру й детергентів. Відносно стійкі до дії деяких хімічних речовин, у тому числі до 3 % розчину формаліну та 1 % розчину перекису водню.

Реовіруси мають широкий спектр хазяїв. Вони виділені від великої рогатої худоби (ВРХ), мавп, собак, курей, мишей, диких птахів, москитів, рослин. Антитіла до вірусів виявлені в багатьох видів тварин. Ротавіруси найчастіше є збудниками гастроентеритів у дітей і молодих тварин. Рота- й реовіруси передаються прямим шляхом, а орбівіруси та вірус колорадської кліщової гарячки переносяться членистоногими. Орбівіруси передаються за допомогою кліщів, москитів, комарів і викликають хвороби з природною вогнищевістю.

### **Родина *Retroviridae***

Родина *Retroviridae* поділяється на дві підродини: *Orthoretrovirinae* та *Sputovirinae*. До складу підродини *Orthoretrovirinae* входять шість родів.

1. Рід *Alpharetrovirus*: віруси лейкозу птахів, саркоми Рауса, карциноми птахів Мілл-Хілл 2, мієлобластозу птахів, мієлобластозу птахів 29, саркоми птахів СТ10, сарком UR2, У73, Фуджінами.
2. Рід *Betaretrovirus*: віруси Лангур, мавп Мезон – Пфайзера, раку молочних залоз мишей; ретровіруси мавп, овець Джагсікте та ін.
3. Рід *Gammaretrovirus*: віруси саркоми й лейкозу мишей, лейкозу котів; онковіруси мурчаків і свиней типу С; вірус саркоми шорстистих мавп; вірус гадюк; синцитіальний вірус курей та ін.
4. Рід *Deltaretrovirus*: вірус лейкемії великої рогатої худоби, Т-лімфотропний вірус приматів 1 (Human T-lymphotropic virus; HTLV-1), 2 (HTLV-2), Т-лімфотропний вірус мавп 1–3, L.
5. Рід *Epsilonretrovirus*: віруси саркоми шкіри; епідермальної гіперплазії Уллі 1, 2; гіперплазії окуней; ретровірус змій.



6. Рід *Lentivirus*. До нього належать: віруси імунодефіциту людини 1 (ВІЛ1), 2 (ВІЛ2), мавп, ВРХ, котів; віруси інфекційної анемії коней, артрити/енцефаліту овець, вісна/меді; лентівірус пум. Підродина *Sputovirinae* має єдиний рід *Sputavirus*. Віруси не пов'язані з патологією у тварин, але викликають пінні зміни в культурі клітин людини, мавп, биків.

Віріони сферичної форми, діаметром 100–120 нм (рис. 9.2).

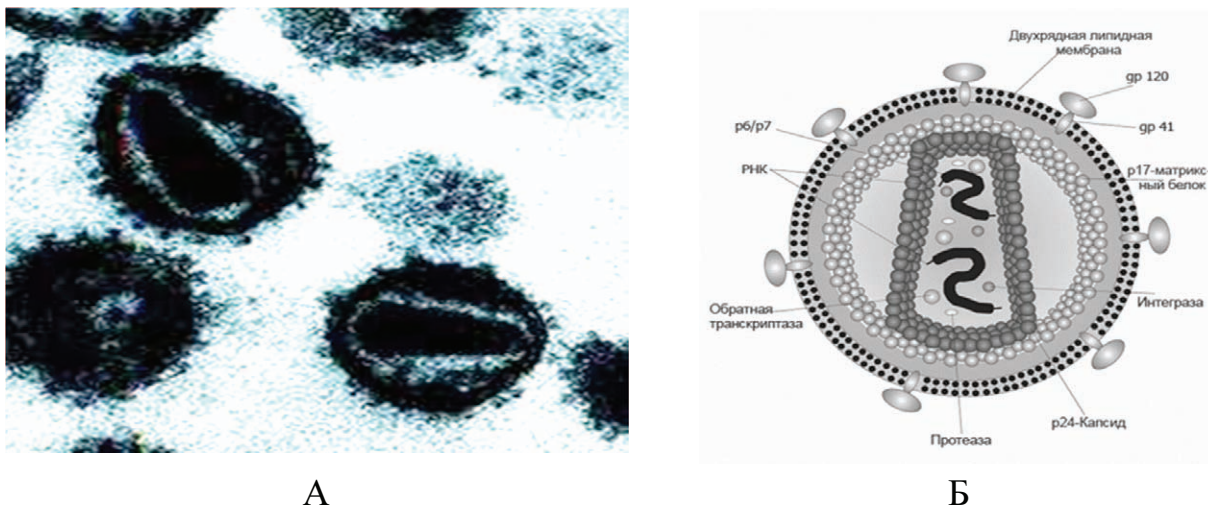


Рис.9.2. Електронномікроскопічне зображення часток (А) та модель будови віріона (Б) вірусу імунодефіциту людини.

На поверхні вірусних часток розміщені глікопротеїнові пепломери завдовжки 8 нм. Вірусний нуклеокапсид оточений білком серцевини. Сферичний нуклеокапсид розміщений ексцентрично (у представників роду *Betaretrovirus*) і концентрично (роди *Alpharetrovirus*, *Gammaretrovirus*, *Deltaretrovirus* та *Sputavirus*). У представників роду *Lentivirus* нуклеокапсид паличкоподібний.

Вірусний генوم складається з димеру лінійної олРНК, кожний мономер якої має розмір 7–11 тис. о. РНК становить 2 % від сухої маси віріона. Мономери РНК з'єднані водневими зв'язками. Кожний мономер поліаденільований на 3'-кінці й має кеп-структуру на 5'-кінці. Очищені РНК не інфекційні. Ретровірусна РНК має три основні рамки зчитування та, відповідно, кодує три головні групи структурних білків, що виявляються у складі віріона ретровірусів. Білки групи *gag* формують внутрішню структуру віріона та включають три основні поліпептиди: капсид (CA), матриксний білок (MA) і нуклеокапсидний білок (NC). Ферменти, що відповідають за різні етапи розмноження ретровірусів, входять до складу другої групи білків – *Pol*, включаючи протеазу (PR), зворотну транскриптазу (RT) та інтегразу (IN). Остання третя група вірусних білків – *Env* – має два глікопротеїди: поверхневий (SU) і трансмембранний (TM).

У геномі вірусу імунодефіциту людини виявлено дев'ять генів: структурні (*gag*, *pol*, *env*), регуляторні (*tat*, *rev*, *nef*), допоміжні (*vif*, *vpr*, *vpu*). Геном вірусу кодує 15 білків. Структурні білки становлять приблизно 60 % від сухої маси віріона. Вміст ліпідів – приблизно 35 % від сухої маси. Вони походять від плазматичної мембрани клітини-хазяїна. Вуглеводи становлять близько 3 % від

маси віріона. Цей рівень варіює залежно від виду вірусу. Щонайменше один, здебільшого два оболонкові білки глікозильовані. У вірусній оболонці також виявлено клітинні гліколіпіди. Плавуча густина віріонів у градієнті сахарози становить 1,16–1,18 г/см<sup>3</sup>. Коефіцієнт седиментації приблизно 600 S. Віріони чутливі до нагрівання, детергентів і формальдегіду. Поверхневі глікопротеїди можуть бути частково зруйновані протеолітичними ферментами.

Віріони відносно стійкі до ультрафіолетового опромінення. Незважаючи на подібність морфології віріона та організації геному, ретровіруси мають значні відмінності в патогенних властивостях – деякі віруси з цієї групи взагалі не патогенні для своїх хазяїв, водночас ВІЛ є причиною пандемії СНІДу у світі.

**Вірус імунodefіциту людини (ВІЛ)** належить до родини *Retroviridae*. Вірус складний сферичної форми. Має двониткову РНК. Антигена будова: поверхневі Аг (глікопротеїни суперкапсиду (gp 41, gp 120), внутрішні типоспецифічні Аг (структурні білки капсиду - матриксний білок - p17, капсидний білок - p 24, зв'язувальні білки – p9 і p6). **Методи культивування:** перещеплювані культури лейкозних Т-хелперів, моношарові культури астроцитів, первинні культури Т-хелперів, стимульованих ІЛ-2. **Резистентність:** чутливий до H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, концентрованих кислот та лугів, жиророзчинників (етилового спирту, ефіру, ацетону), глютаральдегіду; стійкий до низьких температур, іонізуючої радіації, УФП. **Джерело зараження** - хвора людина, носій (ВІЛ-інфікований). **Механізм та шляхи передачі захворювання:** парентеральний (перкутанний) і трансплацентарний механізми. Статевий, трансфузійний, інструментальний, ін'єкційний, трансплантаційний, трансплацентарний шляхи. Органотропність: клітини із CD-4 рецепторами: макрофаги, моноцити, дендритні клітини лімфатичних вузлів, астроцити, олігодендроцити головного мозку, клітини Лангерганса, Т-хелпери. **Імунітет:** розвивається імунодепресія. **Методи лабораторної діагностики:** ІФА; РІА; імуноблотинг; ПЛР. **Профілактика:** раннє виявлення джерела інфекції; розрив механізмів і шляхів передачі інфекції. **Терапія:** нуклеозидні інгібітори зворотної транскриптази, інгібітори протеази, інгібітор інтеграли, блокатори вірусних рецепторів.

### **Структура мікробіологічного дослідження ВІЛ-інфекції**

Матеріал для дослідження: кров, сироватка.

#### ***Серологічна діагностика.***

1 етап - виявлення антитіл за допомогою ІФА (трикратний повтор).

2 етап – виявлення антитіл до певних вірусних білків за допомогою імуноблотінгу.

#### ***Молекулярно-генетичний метод.***

Виявлення провірусу в лімфоцитах, вірусних нуклеїнових кислот в патологічному матеріалі за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР).

#### ***Вірусологічна діагностика.***

1 етап – зараження культур клітин Т-лімфоцитів.

2 етап – ідентифікація вірусів за допомогою ІФА, РІФ.

## Родина *Togaviridae*

Назва родини походить від лат. *toga* – "плащ", що підкреслює наявність у структурі віріона ліпідної оболонки зі вбудованими в неї вірусними ліпопротеїдами у вигляді п'яти- та шестивимірних фасеток пепломерів.

Родина складається з двох родів.

1. До роду *Alphavirus* відносять віруси Синдбіс, лісу Семліки, венесуельського енцефаломієліту коней (ВВЕК), східного енцефаломієліту коней (ВСЕК), західного енцефаломієліту коней (ВЗЕК), карельської гарячки, Чикунгун'я, О'Ньонг-Ньонг, Аура, Бебару, Маяру та ін.

2. До роду *Rubivirus* належить вірус червоної висипки (німецький кір).

Віріони сферичні, діаметром 70 нм (рис. 9.3). Капсид діаметром 40 нм ікосаедричного типу симетрії ( $T=4$ ), побудований з 80 капсомерів і оточений ліпідною оболонкою, яка щільно прилягає до нього. До складу оболонки входять гетеродимерні глікопротеїнові виступи, що складються з двох вірусних глікопротеїнів (E1 та E2). Віріони вірусу червоної висипки плеїоморфні, у них відсутній тісний зв'язок між глікопротеїдами оболонки та білками нуклеокапсиду.

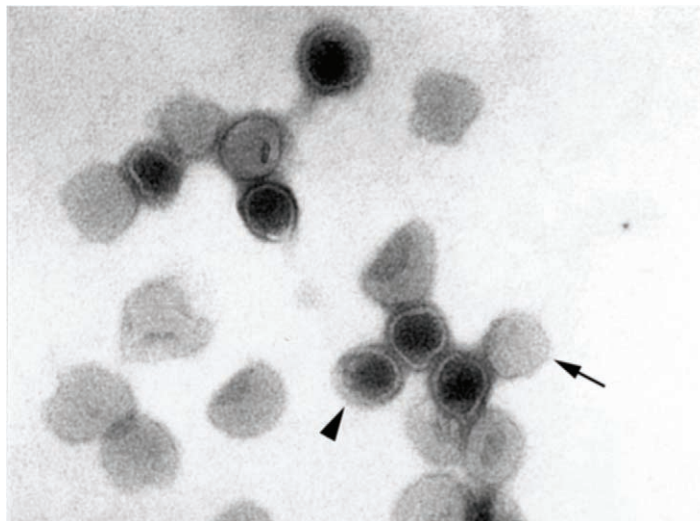


Рис. 9.3. Електронномікроскопічне зображення часток вірусу червоної висипки

Геном – єдина молекула лінійної РНК позитивної полярності. Розмір РНК від 9 до 11,8 тис. о. На 5'-кінці розташована кеп-структура, а на 3'-кінці – полі(А). Дві некодуючі ділянки розташовані біля кінців РНК. Інформація про структурні білки займає 1/3 геному, а про неструктурні – 2/3. Неструктурні білки: NSP1 (метилування й кепування вірусної РНК); NSP2 (геліказа та протеаза); NSP3 (білок, що переключає репліказу на реплікацію ланцюгів РНК позитивної полярності); NSP4 (репліказа). Структурні білки включають: капсидний білок (С); білки, що формують пепломери оболонки (E1-E3); окрім того, у структурі віріона виявлений малий трансмембранний білок. Ліпіди становлять близько 30 % від загальної маси віріона. Вони походять із цитоплазматичної мембрани клітини (альфавірус) або плазматичної та внутрішньоклітинних мембран (вірус червоної висипки). Їх склад і структура залежать від клітини-хазяїна.

Співвідношення фосфоліпідів і холестеролу в оболонках для альфавірусів становить 2 : 1, а для вірусу червоної висипки 4 : 1.

У складі глікопротеїнів оболонки виявлені комплекси N-зв'язаних гліканів і високоманозний. До складу білка E2 вірусу червоної висипки входить також O-зв'язаний глікан. Маса віріонів близько  $52 \times 10^6$  Да. Плавуча густина віріонів альфавірусів у сахарозі  $1,22 \text{ г/см}^3$ . S<sub>20W</sub> = 280 S. Плавуча густина віріонів вірусу червоної висипки в сахарозі  $1,18\text{--}1,19 \text{ г/см}^3$ . Коефіцієнт седиментації подібний до такого в альфавірусів. Альфавіруси чутливі до дії фізико-хімічних факторів. Інактивуються протеазами, ліпазами, неіонними детергентами, прогріванням при температурі  $56\text{--}60 \text{ }^\circ\text{C}$  упродовж 30 хв, високочутливі до УФ. Стабільні в широкому діапазоні рН (від 6,5 до 9,0). Віріони вірусу червоної висипки чутливіші до підвищеної температури, ніж альфавіруси (півперіод їх активності за  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  1–2 год, а за  $58 \text{ }^\circ\text{C}$  – від 5 до 20 хв). Найбільше медичне значення мають ВСЕК, ВВЕК та ВЗЕК (Південна та Північна Америка), гарячки Чикунгун'я (Азія), О'Ньонг-Ньонг (Африка), Росс-Рівер (Австралія), карельська (Феноскандія), Синдбіс (Африка, Європа, Азія, Австралія). Для вірусів Нового світу характерні захворювання з важким перебігом, включаючи гарячку та енцефаліти (летальність 15-20 %). Деякі представники альфавірусів належать до вірусів другої групи патогенності та є етіологічною причиною низки нових інфекцій і тих, що повертаються (emerging-reemerging infections). Вірус червоної висипки дуже поширений у світі й викликає гостре респіраторне захворювання в дітей, а також ураження плоду у вагітних.

### 3. Практичні завдання:

1. Ознайомитись з принципом постановки ІФА з метою виявлення специфічних антигенів в сироватці крові хворого.

В якості твердофазного носія використовують планшети з адсорбованими на дні луночок антитілами. В лунки вносять по 1 краплині досліджуваної сироватки і вміщують планшети в термостат при  $t 37 \text{ }^\circ\text{C}$ . Промивають луночки буферним розчином і вносять мічені ферментом (пероксидазою хрому) антитіла проти цього антигену (прямий варіант). Планшети вміщують в термостат при  $t 37 \text{ }^\circ\text{C}$ . Промивають луночки буферним розчином, вносять по 1 краплині перекису водню та ортофенілдіаміну (ОФД). Планшети вміщують в термостат до появи жовтого забарвлення в луночці з контролем. Кількість приєднаного до твердої фази ензиму відповідає кількості антигенів. При наявності в досліджуваній сироватці антигенів вірусу в лунках змінюється колір рідини на жовтий або жовтувато-коричневий (результат позитивний). В лунках з сироваткою, яка не містить антигенів вірусів, колір рідини не змінюється (результат негативний).

2. Ознайомитись з принципом постановки імуоферментного методу з метою виявлення специфічних протиВІЛ-антитіл в сироватці крові хворого

В якості твердофазного носія використовують планшети з адсорбованими на дні луночок антигенами. В луночки вносять по одній краплі досліджуваних сироваток і вміщують планшети в термостат на 30 хвилин ( $37^\circ\text{C}$ ). Потім промивають буферним розчином і вносять мічені ферментом (пероксидазою

хрону) антивидові (антиімуноглобулінові) сироватки. Планшети ставлять в термостат на 30-40 хвилин при температурі 37°C. Промивають луночки буферним розчином, вносять по краплі перекису водню та ортофенілдіаміну (ОФД). Вміщують в термостат до появи жовтого забарвлення в луночці з контрольною позитивною сироваткою. Інтенсивність забарвлення залежить від кількості приєднаного до твердої фази ензиму і відповідає кількості вірусоспецифічних антитіл в досліджуваній сироватці. Схему реакції замалювати.

3. Познайомитись із принципом постановки реакції гібридизації нуклеїнових кислот. Метою методу є виявлення в досліджуваному матеріалі ділянок ДНК, характерних для даного збудника. Для цього використовують їх гібридизацію з діагностичними ДНК-зондами. ДНК-зонди – це одниткові фрагменти ДНК (комплементарні до специфічних ділянок ДНК збудника), мічені радіонуклідами, ферментами або флуорохромами.

### Протокол лабораторної роботи №9

1. Ознайомитися з таксономією вірусів родин *Reoviridae*, *Retroviridae*, *Togaviridae*. та визначити таксономічне положення ротавірусів, ВІЛу, вірусу краснухи (родина→рід→вид).

---



---



---



---

2. Зазначити особливості будови віріонів родини *Reoviridae*.

Тип симетрії нуклеокапсиду

Геном реовірусів представлено

---

3. Розглянути рис. 9.4 та зазначити процеси, що відбуваються під час реплікації реовірусів.

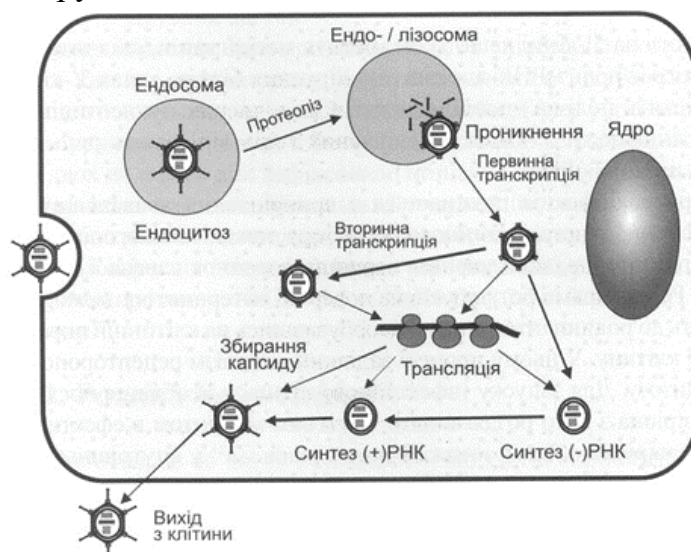


Рис.9.4. Життєвий цикл реовірусів

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

4. Зазначити особливості будови віріонів родини *Retroviridae*.

Тип симетрії нуклеокапсиду

Геном реовірусів представлено

5. За матеріалом підручника [1] з'ясувати функції білків віріонів ретровірусів та заповнити таблицю 9.1.

Таблиця 9.1

**Ретровірусні білки та їхні функції**

<b>Білок</b>	<b>Функції</b>
МА (матриксний)	
СА(капсидний)	
NC(нуклеокапсидний)	
PR(протеаза)	
RT(зворотна транскриптаза)	
IN(інтеграза)	
SU(поверхневий глікопротеїн)	
TM(трансмембранний білок)	

6. Зазначити основні етапи реплікації ретровірусів.

1)

---

2)

---

3)

---

4)

---

7. Зазначити функції структурних генів, які входять в геном ВІЛ (*gag*, *pol*, *env*)

*gag* –

---

*pol* –

---

*env* –

---

8. Ознайомитися зі схемою репродукції ВІЛ (рис.9.5) та зазначити процеси, що відбуваються.

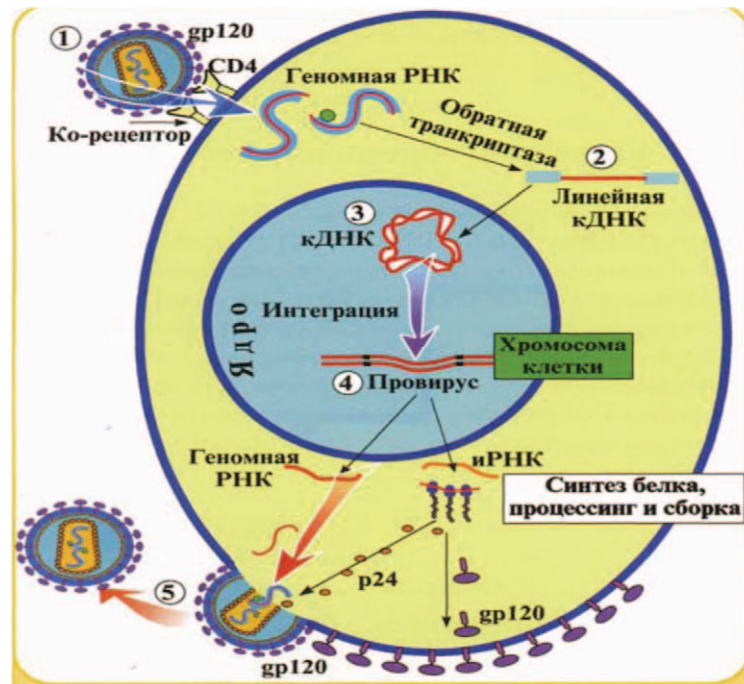


Рис. 9.5. Схема репродукції ВІЛ.

1.

---

2.

---

3.

---

4.

---

5.

---

9. Замалювати схему реакції імуноферментного методу виявлення специфічних протиВІЛантитіл в сироватці крові хворого.

10. Вказати особливості будови віріонів родини *Togaviridae*.

Тип симетрії нуклеокапсиду

Геном реовірусів представлено

11. Розглянути рисунок 9.6 та описати процес проникнення тогавірусу в клітину.

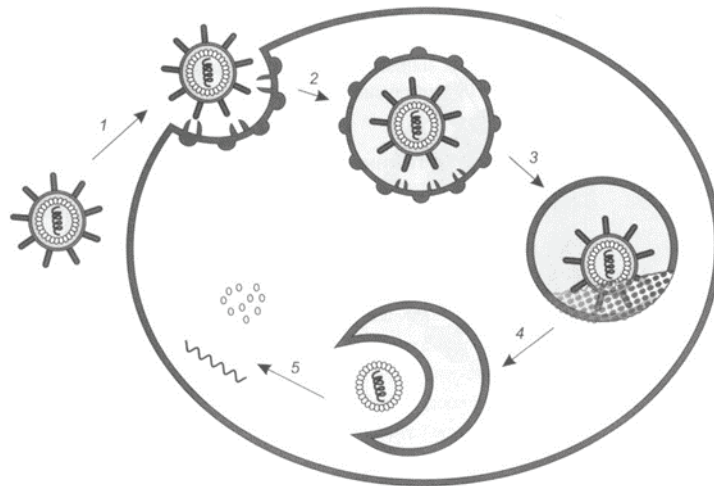


Рис. 9.6. Проникнення тогавірусу в клітину за адсорбційного ендоцитозу

1.

2.

3.

4.

5.

12. Зазначити особливості епідеміології краснухи (червоної висипки).

Джерело інфекції

Механізм передачі

Чутливість до вірусу краснухи



---

Сезонність

---

Циклічність

---

**Висновок:**

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### **Матеріали для самоконтролю**

#### **Тестові завдання.**

1) При перевірці крові донорів на станції переливання крові, в сироватці одного з них виявлені антитіла до вірусу імунодефіциту людини. Який метод рекомендується для підтвердження діагнозу ВІЛ-інфекції?

- A. Імунофлюоресценції.
- B. Електронної мікроскопії.
- C. Імуноферментного аналізу.
- D. Вестернблоту (імуноблотингу).
- E. Радіоімунного аналізу.

2) Після лабораторного обстеження хворого з часто рецидивуючими вірусними, бактеріальними та грибковими опортуністичними інфекціями виставлений діагноз «ВІЛ - інфекція». Результати якого дослідження дозволили поставити такий діагноз?

- A. Реакція гальмування гемаглютинації.
- B. Реакція зв'язування комплекменту.
- C. Реакція преципітації в гелі.
- D. Імуноферментний аналіз.
- E. Реакція пасивної гемаглютинації.

3) У пацієнтки 20 років встановлено діагноз - СНІД. Які популяції клітин найбільш чутливі до вірусу імунодефіциту людини?

- A. Гепатоцити.
- B. Т-хелпери.
- C. Ендотеліоцити.
- D. Епітеліоцити.
- E. В-лімфоцити.

### **Контрольне завдання.**

*Проблемна задача.* В терапевтичне відділення лікарні госпіталізували хворого з пневмонією. Останні півроку він часто хворіє: спостерігається хронічний кандидоз, періодично загострюється фурункульоз та оперізуючий герпес. Хворий дуже схуд. Протягом 10 років мав гомосексуальні зв'язки. Результати лабораторного дослідження: попередній аналіз на ВІЛ-інфекцію позитивний (імуноферментний аналіз), встановлена пневмоцистна природа пневмонії. Попередній діагноз: «ВІЛ-інфекція».

#### **Завдання.**

1. Вкажіть таксономічне положення ВІЛ, опишіть його ультраструктуру.
2. Охарактеризуйте антигенну будову ВІЛ.
3. Як відбувається зараження ВІЛ-інфекцією?
4. Назвіть методи лабораторної діагностики ВІЛ-інфекції.
5. Назвіть принципи лікування ВІЛ-інфекції.

#### **Література**

1. Гудзь С.П., Перетятко Т.Б., Галушка А.А. Вірусологія: підручник: [для студ. закл. вищ. осв.]/ С.П. Гудзь, Т.Б. Перетятко, А.А. Галушка. - Львів: ЛНУ імені Івана Франка, 2018. – 536 с. – (Серія «Біологічні студії»).
2. Гудзь С.П., Перетятко Т.Б., Павлова Ю.О. Загальна вірусологія. - Львів: Видавничий центр ЛНУ імені Івана Франка, 2010. – 264 с.
3. Практикум із загальної вірусології / за ред. А.Л. Бойка.– К.: Видавничий центр „Київський університет”, 2000. – 269 с.
4. В.П.Широбоков та співавт. Медична мікробіологія, вірусологія, імунологія, Нова книга, Вінниця, 2011. – С. 544, 545-547.
5. К.Д. Пяткін, Ю.С. Кривошеїн. Мікробіологія з вірусологією та імунологією; Київ, 1992. - С. 357-360.
6. І.С. Гайдаш, В.В. Флегонтова. Медична вірологія. Луганськ, 2002. – С.228-237.
7. Мікробіологія, вірусологія, імунологія, інфекційні хвороби. Словник/ За ред Г.К.Палія, В.І.Палія. – Київ: Здоров'я, 2004. – С. 33, 83, 88, 91.

## **ВІРУСИ СКАЗУ Й ЕНЦЕФАЛІТІВ. БІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ. МЕТОДИ ЛАБОРАТОРНОЇ ДІАГНОСТИКИ ЗАХВОРЮВАНЬ**

**Мета заняття:** ознайомитися з методами лабораторної діагностики сказу, японського та кліщового енцефаліту при підозрі на захворювання, знати біологічні властивості збудників сказу, японського та кліщового енцефалітів, що зумовлюють патогенез захворювання, обґрунтувати методи профілактики захворювань.

**Матеріали та обладнання:** роздатковий матеріал (фотографії та рисунки будови рабдовірусів та флавівірусів), відеоматеріали, методичні рекомендації до лабораторної роботи, мультимедійний проектор.

### **1. Основні теоретичні питання, що підлягають вивченню.**

1. Таксономічне положення, морфологія та резистентність вірусу сказу.
2. Патогенез сказу.
3. Лабораторна діагностика сказу: прижиттєва та постмортальна.
4. Профілактика сказу: неспецифічна та специфічна.
5. Таксономічне положення, морфологія та резистентність вірусів кліщового та японського енцефалітів.
6. Методи культивування та резистентність флавівірусів.
7. Патогенез кліщового та японського енцефалітів.
8. Методи лабораторної діагностики кліщового та японського енцефалітів.
9. Профілактика кліщового та японського енцефалітів: специфічна та неспецифічна.

### **2. Основні теоретичні відомості**

#### **Родина *Rhabdoviridae***

Рабдовіруси включають велику групу вірусів хребетних, членистоногих і рослин. До родини відносять шість родів.

1. Рід *Vesiculovirus* – віруси везикулярного стоматиту (ВВС; штами Індіана, Нью-Джерсі, Алагаос), Чандіпура, Мараба, Кокал, краснухи коропу та ін.
2. Рід *Lyssavirus* – віруси сказу, австралійських кажанів, кажанів Лагос, Мокола; європейський рабдовірус кажанів 1, 2 та ін.
3. Рід *Ephemerovirus* – віруси ефемерної гарячки ВРХ, Аделаїд-Рівер (птахи), Беррімак.
4. Рід *Novirhabdovirus* – віруси інфекційного гемопоетичного некрозу, геморагічної септицемії (віруси райдужної форелі) та ін.
- 5, 6. Роди *Cytorhabdovirus* та *Nucleorhabdovirus* об'єднують віруси рослин.

Деякі віруси реплікуються лише в організмі ссавців, риб, членистоногих чи інших безхребетних; багато вірусів можуть реплікуватися в організмі членистоногих і хребетних-хазяїв (арбовіруси); деякі види інфікують рослини та членистоногих, що харчуються ними. Багато клітин хребетних і безхребетних в умовах *in vitro* є чутливими до рабдовірусів хребетних. Сігмавірус був першим

вірусом, для якого було показано зчеплене зі статтю передавання в дрозофіл. Жоден рабдовірус хребетних і рослин не передається вертикально. Віріони завдовжки 100–430 і діаметром 45–100 нм. Дефектні вірусні частки значно меншої довжини. Віруси, що уражують хребетних, зазвичай мають кулеподібну чи конусоподібну форму (рис. 10.1), а віруси, що уражують рослини – бацилоподібну (у фіксованих препаратах) і кулеподібну чи плеїоморфну форму (у нефіксованих препаратах). Зовнішня оболонка віріонів (за винятком тупого кінця кулеподібних віріонів) укрита пепломерами завдовжки 5–10 нм і 3 нм у діаметрі. Вони є тримерами вірусного глікопротеїну G. До складу ліпідної оболонки входить глікопротеїн G, що взаємодіє за допомогою M-білка з нуклеокапсидом. Нуклеокапсид діаметром 30–70 нм, має спіральну симетрію. На електронограмах його можна побачити як посмуговану структуру (відстань між смугами 4,5–5 нм). Нуклеокапсид складається з РНК і білка N у комплексі з L- та Р-білками. Нуклеокапсид виявляє транскриптазну активність і є інфекційним. Крім того, частина ферментів, виявлених у його складі, можуть мати клітинне походження. При розкручуванні нуклеокапсид має довжину до 700 нм і діаметр 20 нм.

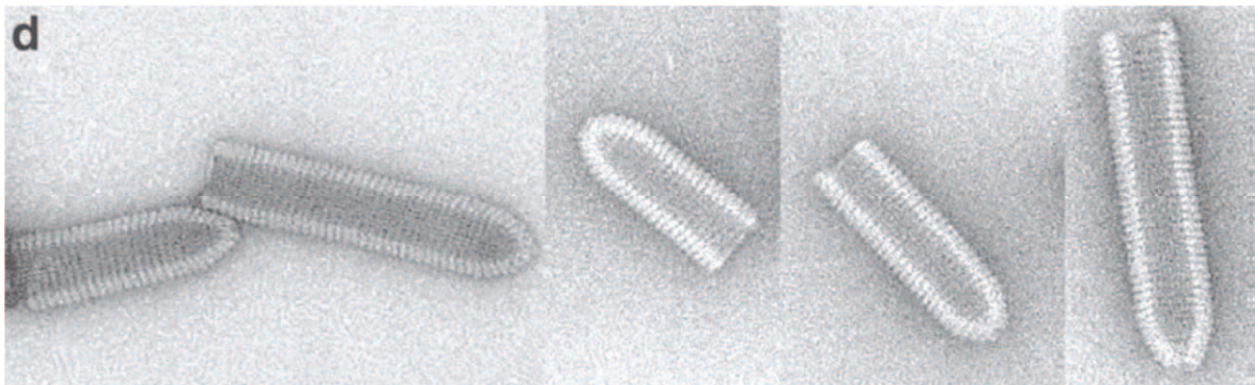


Рис. 10.1. Електронномікроскопічне зображення часток вірусу везикулярного стоматиту

Віріони містять одну молекулу лінійної РНК негативної полярності. Маса РНК становить  $4,2\text{--}4,6 \times 10^6$  Да, а розмір – 11–15 тис. о. РНК становить 1–2 % сухої маси віріона. На 5'-кінці РНК є трифосфат, а на 3'-кінці відсутні полі(А)-послідовності. На кінцях РНК розташовані інвертовані комплементарні послідовності. Дефектні РНК зазвичай представлені коротшими, ніж повноцінні РНК, формами (їх розмір менший від половини розміру РНК). Вони здебільшого негативної полярності, крім того, у популяції виявляються шпилькоподібні форми. Дефектні форми реплікуються лише в присутності гомологічних чи (зрідка) певних гетерологічних віріонів-помічників. Вони повинні містити функціональні гени. У вірусній популяції до 5 % часток мають повнорозмірну РНК позитивної полярності. Віруси зазвичай містять п'ять структурних білків: G (поверхневий) формує поверхневі глікопротеїнові шипи (тримери), бере участь у зв'язуванні з клітинним рецептором; M – матриксний, периферійний

мембранний білок, що формує внутрішній шар вірусної облонки; N – нуклеокапсидний білок, укриває вірусну РНК, захищаючи її від нуклеаз, і утримує РНК у конформації, яка сприяє транскрипції; білки L та P (NS) разом формують РНК-залежну РНК-полімеразу. Ген, що кодує L-білок, займає 60 % геному. Структурні протеїни становлять 65–75 % сухої маси віріона. Для певних вірусів застосовується інша номенклатура в назвах P- (NS, M1 чи M2) та M-білка (M1 чи M2). У структурі віріонів виявлені такі ферменти: РНК-транскриптаза (L- та P-білки), 5'-кепуєчий фермент, гуаніл- і метилтрансфераза, протеїнкіназа (вірусна чи, можливо, клітинного походження), нуклеозидтрифосфатаза та нуклеотиддифосфаткіназа. Їх активності можуть бути функціями L-білка. Віріони містять близько 15–25 % ліпідів, їх структура відповідає структурі ліпідів у цитоплазматичній мембрані клітини-хазяїна. Зазвичай фосfolіпід становлять до 55–60 % від усіх ліпідів, стероли та гліколіпідів – 35–40 %. G-білок ковалентно зв'язаний з ліпідною оболонкою залишком жирної кислоти. Віріони містять до 3% вуглеводів. G-білок лісавірусів є сильним імуногеном, він індукує формування вірусонейтралізуючих антитіл і визначає серотип вірусу. N-білок є перехресним і комплементозв'язуючим антигеном (CF).

Специфічна профілактика включає вакцинацію атенуєваними, убитими вірусами, субодинаціями віріонів, що містять G-білок чи G-білок разом з рибонуклеопротеїновим комплексом.

Маса віріона 300–1000 x 10<sup>6</sup> Да. S<sub>20w</sub>=5501045 S (у рослинних вірусів більше). Плаваюча густина в градієнті сахарози 1,17–1,19, а в градієнті хлориду цезію 1,19–1,2 г/см<sup>3</sup>. Інфекційність вірусів втрачається за 1 год при 56 °C (при 100 °C – за 2 хв), при УФ- чи рентгенівському опроміненні, а також під впливом органічних розчинників. Вірус сказу швидко інактивується 1%-ним розчином хлораміну; розчинами лізолу, сулеми, а також концентрованими розчинами кислот і лугів. У тканинах за присутності повітря при кімнатній температурі біологічна активність вірусу зберігається до двох тижнів, а в замороженому стані – більше року.

Серед рабдовірусів найбільше значення в патології людини та тварин мають лісавіруси, везикуловіруси та ефемеровіруси. Глобальний характер поширеності лісавірусів, висока патогенність для людини та інших ссавців, висока летальність і відсутність засобів лікування висувають лісавіруси на перше місце за їх значенням для здоров'я людини та тварин.

### **Родина *Flaviviridae***

Назва родини й родів походить від слів *flavus* – жовтий, *pestis* – бляшка, *hepatos* – печінка. Родина об'єднує три роди.

1. Рід *Flavivirus* – віруси антигенного комплексу жовтої гарячки, комплексу кліщового енцефаліту (європейський, сибірський і східносибірський, хвороби лісу Кіасанур, Омської геморагічної гарячки (ОГГ) та ін.), комплекси вірусів Ріо-Браво і вірусів японського енцефаліту (вірус долини Муррея, енцефаліт Сент-Луїс, вірус Західного Нілу та ін.), віруси комплексів Тюленій, Нтайа, денге, Модок тощо.

2. Рід *Pestivirus* – вірус класичної чуми свиней (ВКЧС), віруси діареї корів першого, другого типів, вірус хвороби Бордер (вівці).

3. Рід *Hepacivirus* – віруси гепатитів С та G.

Віріони сферичні (рис. 10.2), діаметром 40–60 нм, мають ліпопротеїнову оболонку, на поверхні якої є пепломери. Серцевина віріона ікосаедрична, діаметром 39 нм. У флавівірусів ліпідна оболонка оточена щільним шаром завтовшки 6 нм, що складається з двох білків: Е та преМ (у випадку вірусних часток, асоційованих із клітинами) і Е та М (у випадку позаклітинних віріонів).

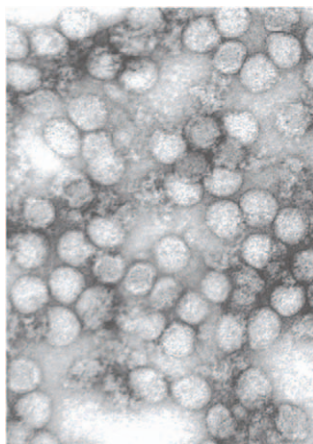


Рис. 10.2. Електронномікроскопічне зображення вірусу жовтої гарячки

Віріони містять одну молекулу лінійної олРНК позитивної полярності. Розміри геномів флавівірусів, пестивірусів і ВГС становлять 10,7; 12,5 та 9,5 тис. о., відповідно. 5'-кінець вірусної РНК не охарактеризований для всіх представників. До складу віріонів входять два – три білки, асоційовані з ліпідною мембраною, та один білок капсиду (13,5 кДа). Е-мембранний білок (50 кДа) завжди глікозильований. Він містить 12 залишків цистеїну, що формують 6 дисульфідних містків. М-мембранний білок (8 кДа) слабо глікозильований і містить 6 дисульфідних містків. С-капсидний білок (13 кДа) багатий на аргінін і залишки лізину. Неструктурні білки, які в геномі розташовані за Е-білком, включають: NS1 (виявляється на клітинній поверхні), NS2A (інтегральний мембранний білок), NS2B (інтегральний білок, пов'язаний із NS3), NS3 (на N-кінці – активність серинової протеази та на С-кінці – хелікази), NS4A (інтегральний мембранний білок), NS4B (інтегральний мембранний білок), NS5 (периферійний мембранний білок, компонент – РНК-залежна РНК-полімераза); NS3 та NS5 є компонентами РНК-полімерази. У пестивірусів до складу віріонів входять чотири структурні білки: нуклеокапсидний білок р14, три оболонкових глікопротеїни: gp48, gp25 та gp53. У ВГС три структурні та п'ять неструктурних білків. Ліпіди мають клітинне походження. Віріони містять гліколіпіди та глікопротеїни. Деякі з віріонів не містять глікозильованих білків оболонки. Співвідношення та структура вуглеводів залежать від клітини-хазяїна. Представники кожного роду близькоспоріднені між собою, проте не з представниками інших родів. РНК становить 8 %, ліпіди – 25 % від сухої маси

віріона, усе інше – білки. Молекулярна маса віріона 60 x 10<sup>6</sup> Да. Густина в градієнті сахарози 1,1–1,23, у CsCl – 1,31–34 г/см<sup>3</sup>. S<sub>20w</sub> = 140–200. Віріони чутливі до нагрівання (втрачають інфекційність при нагрівання при 56–60 °С протягом 10–30 хв), низьких рН, органічних розчинників і детергентів. Флавівіруси здатні викликати епідемії (жовта гарячка, гарячка Денге), епідемічні спалахи (японський енцефаліт, Вент-Луї, Росіо, долини Муррея, кліщового енцефаліту, ОГГ). Більша частина флавівірусів передається комарами, деякі – кліщами. Віруси поширені на всіх континентах, більша частина – у країнах з екваторіальним і тропічним кліматом (ті, що передаються комарами), менша – в умовах помірного кліматичного поясу (передаються кліщами). Пестивіруси мають велике ветеринарне значення, інфікують свійських і диких копитних тварин. У патології печінки велику роль відіграють віруси гепатитів С та G, що передаються парентерально.

#### **Схема лабораторного дослідження на сказ.**

Матеріал для дослідження: слина, слинні залози, мозок, сироватка крові.

**Мікроскопічне дослідження:** забарвлення за Гуревичем та Муромцевим гістологічних зрізів слинних залоз, мозку для виявлення тілець Бабеша-Негрі.

**Біологічне дослідження:** інтрацеребральне зараження білих мишей (розвиток паралітичної форми сказу); виявлення тілець Бабеша-Негрі.

**Серологічна діагностика:** виявлення антирабічних антитіл в РЗК, РІА, ІФА, РН на мишах.

**Експрес-діагностика:** РІФ для виявлення вірусних антигенів на мазках відбитках рогівки, гістологічних зрізах слинних залоз або мозку.

#### **Схема лабораторного дослідження кліщового та японського енцефалітів.**

Матеріал для дослідження: спинномозкова рідина, мозок, сироватка крові.

**Вірусологічний метод:** культивування в культурі клітин, оболонках курячого ембріону, в організмі новонароджених мишей.

Індикація: ЦПД, бляшкоутворення, загибель мишей та курячих ембріонів.

Ідентифікація: РН, РГГА, РЗК.

**Серологічний метод:** виявлення титру антитіл в РН, ГГА, РЗК з парними сироватками. Виявляють Ig M (3-4 день), Ig G (3 тиждень).

**Біологічний:** зараження новонароджених мишей.

**Експрес-діагностика:** РІФ, РІА, ІФА.

**Молекулярно-генетичний метод:** ПЛР.

### **3. Практичні завдання:**

1. Ознайомитися з постановкою *реакції гальмування гемаглютинації* (крапельний метод) з метою ідентифікації вірусів японського та кліщового енцефалітів.

На предметне скло до досліджуваного матеріалу вносять діагностичні сироватки, а потім завис еритроцитів. Вид вірусу визначають за сироваткою, яка гальмує гемаглютинацію еритроцитів.

2. *Реакція нейтралізації кольорової проби* в пробірках ставиться з метою встановлення титру антитіл до вірусу кліщового енцефаліту в сироватці крові пацієнта. При постановці реакції спочатку змішують 0,25 мл досліджуваного вірусомісного матеріалу, з різними розведеннями специфічної противірусної імунної сироватки. Після 30-60-хвилинної інкубації при температурі 37 °С у пробірки додають по 0,25 мл клітинної суспензії з індикатором фенолротом і заливають їх шаром вазелінової олії або закривають резиновими корками. Пробірки витримують у термостаті при 37 °С протягом одного тижня, а потім читають результати. «+» результат – зміна кольору середовища на солом'яно-жовтий або оранжевий; «-» результат – середовище залишається червоного кольору.
3. *Реакція зв'язування комплекменту*, ставиться з метою встановлення титру антитіл в сироватці крові хворого на японський енцефаліт.

Для постановки РЗК компоненти вносять у певній послідовності. Спочатку в пробірки, у яких міститься розведена сироватка хворого, додають рівні об'єми антигена і комплекменту в робочій дозі. Пробірки ретельно струшують і ставлять у термостат при 37 °С на 1 год. За цей час з'єднується антиген з антитілом, і на цьому комплексі фіксується комплемент. Одночасно в термостаті інкубують гемолітичну систему. Через годину в усі пробірки основного дослідження додають по 1 мл гемолітичної системи і знову ставлять у термостат. Через 30-45 хв проводять облік реакції при умові повного гемолізу в контролях сироватки, антигена і комплекменту. «+» результат – червоний осад на дні пробірки, надосадова рідина прозора; «-» результат – повний гемоліз, осад відсутній, рідина червона і прозора.

4. *Реакція гальмування гемаглютинації*, ставиться з метою встановлення титру антитіл до збудників японського та кліщового енцефалітів.

Для постановки реакції з метою визначення невідомого вірусу або його антигенів у буферному розчині (0,2) роблять двократні розведення імунної сироватки (вихідне розведення 1:10), а потім додають невідомий антиген в об'ємі 0,2 мл - в перший ряд луночок планшету до розведення сироватки (1:10-1:5120) внесено діагностикум вірусу кліщового енцефаліту, в другий ряд – діагностикум вірусу японського енцефаліту. Систему інкубують залежно від властивостей вірусу при температурі 4 °С, 18 °С, 37 °С 1-18 год. Потім до комплексу додають подвійний об'єм зависі еритроцитів. Пластини інкубують протягом 1-3 год при тій самій температурі до повного осідання еритроцитів і оцінюють результати.



## Протокол лабораторної роботи №10.

1. Ознайомитися з таксономією вірусів родин *Rabdoviridae*, *Flaviviridae* та визначити таксономічне положення вірусу сказу, вірусів кліщового та японського енцефалітів (родина→рід→вид)

---



---



---



---

2. Дати характеристику патогенних для людини рабдовірусів та флавівірусів. Заповнити таблицю 10.1

Таблиця 10.1

### Вірус сказу

<b>Родина</b>		
<b>Морфологія</b>	Тип НК	
	Форма	
	Складність будови	
<b>Антигена будова</b>		
<b>Методи культивування</b>	1) 2) 3)	
<b>Резистентність</b>		
<b>Джерело зараження</b>		
<b>Механізм та шляхи передачі захворювання</b>		
<b>Органотропність</b>		
<b>Імунітет</b>		
<b>Методи лабораторної діагностики</b>	Експрес-діагностика: Молекулярно-генетичний: Серологічний: Біологічний. Цитоскопічний:	
<b>Профілактика</b>		

## Віруси кліщового та японського енцефалітів

<b>Родина</b>		
<b>Морфологія</b>	Тип НК	
	Форма	
	Складність будови	
<b>Антигена будова</b>	Вірус кліщового енцефаліту – Вірус японського енцефаліту –	
<b>Резистентність</b>		
<b>Методи Культивування</b>		
<b>Джерело зараження</b>		
<b>Механізм та шляхи передачі захворювання</b>	Трансмісивний: Аліментарний:	
<b>Органотропність</b>		
<b>Імунітет</b>		
<b>Методи лабораторної діагностики</b>	Вірусологічний Серологічний Біологічний Молекулярно-генетичний	
<b>Профілактика</b>		
<b>Терапія</b>		

### Висновок:

---



---



---



---



---



---



---

### Матеріали для самоконтролю:

#### Тести:

1. В лікарню поступив хворий з рваною раною гомілки, внаслідок укусу хворої на сказ тварини. Яку вакцину необхідно ввести для попередження сказу?

А. АДП

- Б. АКДП
- В. Антирабічну вакцину
- Г. БЦЖ
- Д. ТАВте

2. Хворий звернувся до поліклініки з приводу укусів собаки. Собаку вдалося піймати, і виявилось, що тварина хвора на сказ. Яку вакцину необхідно використати для специфічної профілактики сказу у людини?

- А. Анатоксин
- Б. Живу
- В. Хімічну
- Г. Рекомбінантну
- Д. Синтетичну

3. В інфекційну лікарню поступив пацієнт з клінічними ознаками енцефаліту. В анамнезі - укуси кліща. В реакції затримки гемаглютинації виявлено антитіла проти збудника кліщового енцефаліту в розведенні 1:20, що не є діагностичним. Вкажіть наступні дії лікаря після одержання вказаного результату:

- А. Повторити дослідження з іншим діагностикумом.
- Б. Дослідити цю ж сироватку повторно.
- В. Використати чутливішу реакцію.
- Г. Повторити дослідження із сироваткою, взятою через 10 днів
- Д. Відхилити діагноз кліщового енцефаліту.

4. В клітинах мозку лисиці, відловленої в межах міста, виявлені включення у вигляді тілець Бабеша-Негрі. Джерелом якого захворювання була тварина?

- А. Сказ
- Б. Інфекційний мононуклеоз
- В. Грип
- Г. Кліщовий енцефаліт
- Д. Вітряна віспа

5. Вкажіть найбільш поширений шлях передачі інфекції при кліщовому енцефаліті.

- А. Вертикальний
- Б. Фекально-оральний
- В. Контактний
- Г. Повітряно-краплинний
- Д. Трансмісивний

#### **Контрольне завдання.**

*Проблемна задача.* Хворий 48 років, лісничий, доставлений в лікарню зі скаргами на періодичні напади психомоторного збудження і агресивність. Два

дні тому погіршився настрій, з'явилися біль у спині, слабкість, водобоязнь. Місяць тому зловив лисицю, яка через 2 дні зникла.

1. Назвіть збудника, який викликав захворювання.
2. Які методи лабораторної діагностики можна використати для постановки діагнозу?
3. Які методи специфічного лікування існують для лікування та профілактики захворювання?

### Лабораторне заняття №11

## ПРІОНИ. БІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ. МЕТОДИ ЛАБОРАТОРНОЇ ДІАГНОСТИКИ ЗАХВОРЮВАНЬ

**Мета:** засвоїти особливості будови та властивості пріонів, засвоїти основи етіології та епідеміології повільних вірусних інфекцій та пріонних хвороб. Вивчити класифікацію, патогенез, клінічні прояви захворювань, викликаних пріонами. Ознайомитися з принципами лабораторної діагностики, профілактичними заходами.

### 1. Основні теоретичні питання, що підлягають вивченню.

1. Історія відкриття пріонів, хімічна будова та властивості пріонів.
2. Шляхи проникнення в організм людини.
3. Патогенез пріонових захворювань.
4. Методи діагностики пріонових захворювань.
5. Розповсюдження пріонових захворювань.

### 2. Основні теоретичні відомості

Деякі інфекційні хвороби людини і тварин викликаються інфекційними агентами, що були названі пріонами. Пріони не є вірусами, однак більшість присвячених пріонам досліджень публікуються в журналах з проблем вірусології; пріони фактично «за замовчуванням» були віднесені до царини вірусології. Збудниками пріонних хвороб є білкові молекули, які мають походження від білків клітини; з ними не пов'язані жодні нуклеїнові кислоти. **Пріони** – це білкові інфекційні агенти (від англ. *Protein infections particle*) паличкоподібної форми довжиною 100-200 нм, які складаються приблизно з 1000 однакових молекул низькомолекулярного білка (сіалоглікопротеїну з молекулярною масою 27 – 30 кДа). Пріони є модифікаційною ізоформою нормального білка організму хазяїна, які не містять генетичного матеріалу.

Варіанти нормального білка клітини були знайдені у ссавців, птахів і рептилій; у людини цей білок кодується геном *Prn p*. Роль нормальної форми білка в клітині досі не зовсім з'ясована. Він циклічно переміщується між ендосомами і поверхнею клітини, де він «заякорюється» в плазматичній мембрані за рахунок гідрофобного якоря на С-кінці. Він знайдений у багатьох типах клітин, але особливо багато в клітинах центральної нервової системи. У нормальній формі білок має вторинну структуру, яка містить 42%  $\alpha$ -спіралей і

3%  $\beta$ -структур, тоді як у вигляді форми, що неправильно згорнулася, частка ділянок з  $\alpha$ -спіралями зменшується до 30%, а частка ділянок з  $\beta$ -структурами зростає до 43% (рис. 10.3).



Рис.10.3. Схематичне зображення нормальної і неправильно згорнутої форми пріона. Неправильно згорнута форма має більше  $\beta$ -структур (показані блакитним і жовтим кольорами) у порівнянні з нормальною формою.

Така зміна конформації супроводжується зміною властивостей білка. Якщо нормальний білок повністю руйнується протеїназою К, то білок, що неправильно згорнувся, високо стійкий до дії ферменту. Помилкове згортання також робить білок нерозчинним в неіонних детергентах. У тканинах, що містять пріони, молекули білків, що неправильно згорнулися, формують агрегати у вигляді фібрил, паличок або інших форм, залежно від виду хазяїна і штаму пріона. Щодо нормальної форми білків, що неправильно згорнулися, використовуються різні позначення. Нормальний білок зазвичай позначають як PrP<sup>c</sup> (PrP – prion protein; c – cell), тоді як форму, що неправильно згорнулася, позначають як PrP<sup>Sc</sup> (Sc – scrapie) або як PrP<sup>res</sup> (res – resistant to proteinase).

Механізм, за допомогою якого пріон «реплікується», є незрозумілим. Білок, що неправильно згорнувся, якимось чином викликає неправильне згортання нормальних білків клітини, але як саме це відбувається, залишається невідомим.

Передбачається, що ініціація процесу «реплікації» пріона вимагає чогось на кшталт «зерна», яке являє собою агрегат декількох молекул неправильно згорнутого білка (рис. 10.4). Таке «зерно» може бути сформовано після зараження пріонами, або після дуже рідко спостережуваної конформаційної зміни нормальної молекули, або як результат експресії мутантного гена пріона.

Молекули білка, що неправильно згорнувся, накопичуються в ендосомах і лізосомах, що особливо виражено в нервових клітинах. При деяких пріонних захворюваннях такий білок виявляється також в інших органах і тканинах, включаючи селезінку і лімфатичні вузли.

Для захворювань, що викликаються пріонами, є характерним дуже тривалий інкубаційний період (триває роками). Ознаки захворювання, викликаного пріонами, включають недоумство і втрату координації, пацієнт деградує з неминучою смертю.

Хвороби, що викликаються пріонами, носять назву трансмісивні губчасті енцефалопатії (ТГЕ). Слово "енцефалопатія" означає захворювання мозку. Слово "губчаста" пов'язано з формуванням мікропорожнин у мозку, який виглядає як губка. Нарешті, слово "трансмісивні" означає, що захворювання може передаватися за допомогою інфекційного агента від однієї особини цього виду іншій особині цього ж виду, або іноді від особини одного виду особині іншого виду.

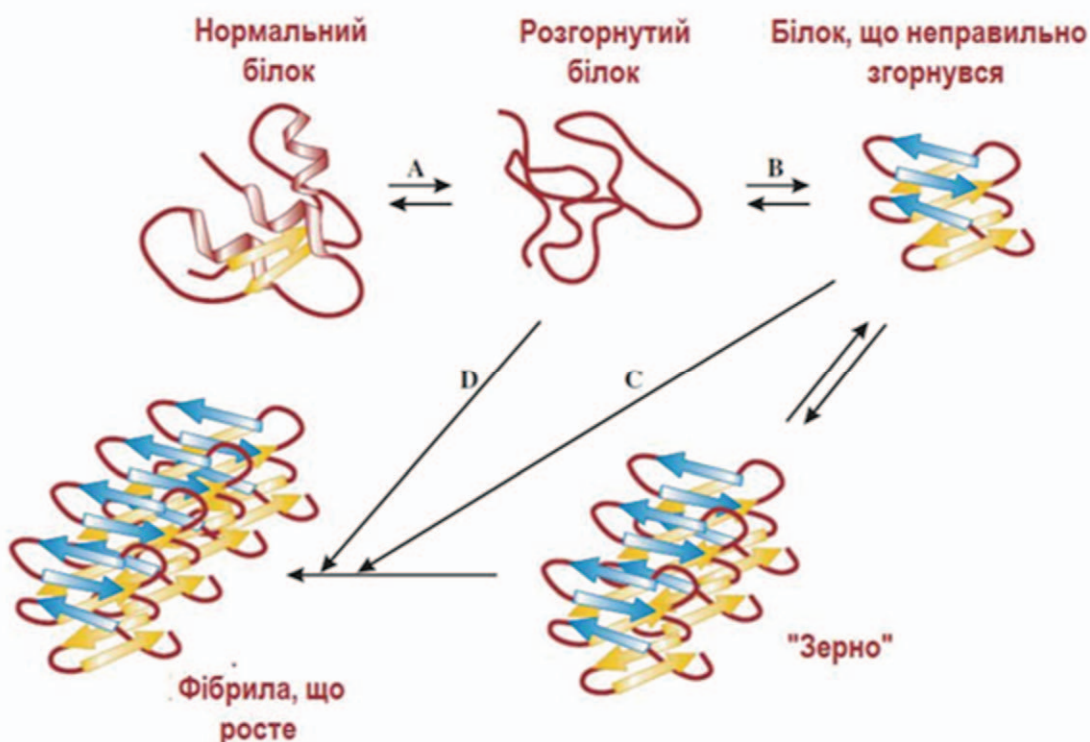


Рис.10.4. Модель реплікації пріонів. Копії нормального білка розгортаються (А) і знову згортаються у форму, яка представлена головним чином β-структурами (показані блакитним і жовтим кольорами). Реплікація може потребувати «зерна» критичного розміру. Приєднання такого «зерна» неправильно згорнутих (С) або розгорнутих (D) молекул призводить до незворотності процесу.

**Резистентність.** Неповна інактивація при дії: УФ променів, ультразвуку, іонізуючого випромінювання, кип'ятіння. Повна інактивація при дії: автоклавовання (при 2 атм) за 18 хв, сухого жару (160°C) за 24 год. Стійкі до ендонуклеаз.

**Властивості:** проходять через бактеріальні фільтри, не розмножуються на штучних середовищах, викликають експериментальну інфекцію, спочатку накопичуються в селезінці, інших органах РЕС, потім – в мозковій тканині, адаптуються до нового хазяїна, не є індуктором інтерферону, не викликають запальної реакції та імунної відповіді.

**Епідеміологія:** Джерелом інфекції є різні види ссавців. Зараження відбувається при - спадковій передачі (аутосомно-домінантний тип); трансмісії аліментарним або ятрогенним шляхом; вживанні інфікованих харчових продуктів з м'яса, желатину; використанні лікувальних засобів, що містять деривати тканин; використанні косметичних засобів, що містять колаген, витяжки з тканин; використанні гормональних препаратів тваринного походження; при трансплантації рогівки та мозкової оболонки.

**Патогенез:** *Нейропатологія пріонових хвороб характеризується:* спонгіозними змінами, втратою нейронів, вакуолізацією цитоплазми, астроцитозом, формуванням амілоїдних бляшок.

**Клінічні прояви:** розлади чуттєвої та рухової сфер, порушення психіки.

**Підгострі пріонові інфекції:**

- Хвороба Крейцфельда-Якоба
- Синдром Герстмана-Страуселера-Штейнкера
- Синдром фатального родинного безсоння
- Хвороба Куру
- Хронічна прогресуюча енцефалопатія дитячого віку
- Аміотрофічний лейкоспонгіоз
- Спонгіоформний міозит

**Імунітет:**

При пріонових інфекціях не розвивається.

**Лабораторна діагностика:**

**Матеріал для дослідження:** тканини органів. Використовують електронну мікроскопію та імунохімічний метод визначення пріонного білка.

**Профілактика і лікування:**

**Неспецифічна** - здійснення заходів безпеки до груп ризику (особи, які стикаються з зараженим матеріалом або хворими на губчасті енцефалопатії), контроль харчового ланцюга, контроль медикаментозного ланцюга.

**Специфічна** профілактика не розроблена.

**Лікування** не розроблено.

### 3. Практичні завдання.

1. Заслухати повідомлення студента: «Історія відкриття пріонів, хімічна будова та властивості пріонів». Обговорити питання особливостей хімічної будови пріонів, їх властивостей.
2. Заслухати повідомлення студента: «Шляхи проникнення пріонів в організм людини, розповсюдження пріонових захворювань, резистентність». Обговорити з студентською групою питання проблеми можливого інфікування пріоновими інфекціями, світову статистику захворюваності на пріонові інфекції. Особливу увагу звернути на особливості резистентності пріонових білків щодо фізичних та хімічних факторів.

3. Заслухати повідомлення студентів: «Патогенез захворювань, основними етіологічними чинниками яких є пріонові білки». Обговорити проблему патогенезу та особливостей розвитку пріонових інфекцій.
4. Заслухати повідомлення студентів: «Мікробіологічна діагностика пріонових інфекцій». Обговорити основні методи діагностики даної групи інфекцій, їх діагностичні можливості, та частоту застосування.

### Протокол лабораторної роботи №11

1. Зазначте положення пріонної концепції, сформульованої С. Прузінером у 1982 році.

1)

---

2)

---

3)

---

4)

---



---



---



---



---

2. Зазначте властивості нормального білка PrP<sup>c</sup> та ізоморфної форми білка PrP<sup>Sc</sup>. Заповніть таблицю 11.1.

Таблиця 11.1

#### Властивості пріонів

PrP <sup>c</sup> (cellular prion protein)	PrP <sup>Sc</sup> (scrapie prion protein)



## **Висновок:**

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## **Матеріали для самоконтролю:**

### **Тести:**

1. У чоловіка 65-ти років розвивається прогресуюче слабоуміє з атаксією і сонливістю, що дозволило запідозрити хворобу Крейтцфельда-Якоба. Який інфекційний агент викликає це захворювання?

- А. Пріон
- Б. Бактерія
- В. Вірус
- Г. Віроїд
- Д. Плазміда

2. Закінчіть речення:

Особливі інфекційні білки називають

Розмножуються пріони тільки в

Під впливом пріонів відбувається переродження тканин

До пріонних хвороб людини належать

Пріони в організм можуть потрапити

Інкубаційний період пріонних захворювань триває

Пріони стійкі до

## **Література**

1. Гудзь С.П., Перетятко Т.Б., Галушка А.А. Вірусологія: підручник: [для студ. закл. вищ. осв.]. Львів: ЛНУ імені Івана Франка. Серія «Біологічні студії». 2018. 536 с.
2. Гудзь С.П., Перетятко Т.Б., Павлова Ю.О. Загальна вірусологія. Львів: Видавничий центр ЛНУ імені Івана Франка. 2010. 264 с.
3. Практикум із загальної вірусології / за ред. А.Л. Бойка. К.: Видавничий центр „Київський університет”. 2000. 269 с.

4. В.П.Широбоков та співавт. Медична мікробіологія, вірусологія, імунологія, Нова книга, Вінниця. 2011. С. 544-547.
5. К.Д. Пяткін, Ю.С. Кривошеїн. Мікробіологія з вірусологією та імунологією. Київ. 1992. С. 357-360.
6. І.С. Гайдаш, В.В. Флегонтова. Медична вірологія. Луганськ. 2002. С.228-237.
7. Мікробіологія, вірусологія, імунологія, інфекційні хвороби. Словник/ За ред Г.К.Палія, В.І.Палія. Київ: Здоров'я. 2004.
8. Негрич Т., Матвієнко Ю. Пріонові хвороби. Медицина світу. 2012. №7.

### Проблемні завдання

1. У 1892 році дослідниками вченого Д.І. Івановського було проведено експерименти, завдяки яким було відкрито нові мікроорганізми. В чому їх суть? Роботи яких вітчизняних вчених сприяли подальшому розвитку нової науки?
2. Які особливості вірусів дали можливість характеризувати їх, як генетичних паразитів клітин тварин, рослин і людини?
3. Властивістю усього живого є здатність до самовідтворення. Для вірусів існує один тип розмноження. Як він називається? У чому його суть?
4. Первинною моделлю для культивування вірусів були лабораторні тварини. Назвіть їх, вкажіть переваги та обмеження їх застосування.
5. Віруси є облігатними паразитами клітин людини, тварин і рослин. Як цю особливість вірусів було використано для культивування вірусів *in vitro*?
6. У діагностиці бактеріальних інфекцій використовують здатність бактерій розчинятися під дією специфічного вірусу. Які віруси мають таку дію, на чому вона заснована?
7. Для мікробних клітин можлива інтеграція з помірним фагом. Як називається це явище? Чим воно характеризується? Де використовується?
8. На чому засноване використання вірусів бактерій з діагностичною, профілактичною та лікувальною метою? Наведіть приклади.
9. Для виявлення вірусу дослідним матеріалом заразили курячий ембріон. Через 48 годин інкубації в алантоїсній рідині встановили наявність вірусу. Які методи, реакції і ознаки дозволили це зробити?
10. Серологічні реакції широко використовують для ідентифікації мікроорганізмів. Які особливості їх використання у вірусології? Наведіть 2-3 приклади.
11. Клітини і тканини, що вирощуються поза організмом, використовуються для культивування вірусів. Які різновиди цієї моделі відомі? Методи отримання і вирощування.

12. Про розмноження вірусу в культурі клітин свідчать ознаки його дії. Охарактеризуйте ці ознаки і методи їх виявлення.
13. З 50-тих років ХХ століття віруси почали вирощувати на культурах клітин. Як виявити вірус та ідентифікувати його в цій клітинній системі?
14. При лікуванні хворого з післяопераційним ускладненням, спричиненим бактеріями з множинною резистентністю до медикаментів, був використаний біологічний препарат, що зумовив виражений лікувальний ефект протягом декількох днів. Назвіть і охарактеризуйте його.
15. Як ідентифікувати вірус при використанні чутливої системи - лабораторні тварини?
16. Наведіть приклади живих противірусних вакцин і охарактеризуйте створений ними імунітет.
17. Наведіть приклади вбитих противірусних вакцин і охарактеризуйте імунітет, який при цьому формується.
18. Назвіть хіміопрепарати, що використовуються для лікування і профілактики вірусних інфекцій. Охарактеризуйте механізм їх дії.
19. Назвіть імунобіологічні препарати, що використовуються для лікування і профілактики вірусних інфекцій. Охарактеризуйте механізм їх дії.
20. Про вірус відомо, що він належить до родини *Paramyxoviridae*; викликає інфекцію, що супроводжується висипкою; при культивуванні *in vitro* викликає в культурі клітин утворення симпластів. Якому вірусу відповідають згадані ознаки? Як попередити розвиток інфекції? Які препарати слід використати для активної імунізації?
21. Основний механізм передачі цієї інфекції - парентеральний, хвороба характеризується тривалим інкубаційним періодом, ураженням клітин печінки, жовтяницею. Про яку хворобу слід думати? Як можна підтвердити діагноз цієї хвороби? Як попередити інфекцію? Які препарати для цього застосовують?
22. Хворому з ураженням ЦНС встановлено діагноз: поліомієліт. Охарактеризуйте збудника цієї інфекції та препарати, що використовують для специфічної профілактики.
23. Які особливості структури і культивування має збудник ВІЛ-інфекції?
24. Виникнення вірусного захворювання людини можливе тільки за наявності асоціації двох мікроорганізмів, тобто репродукція збудника є неможливою при відсутності іншого мікроба. Назвіть і охарактеризуйте цю хворобу.

## ПЕРЕЛІК ПИТАНЬ ДО ПІДСУМКОВОГО МОДУЛЬНОГО КОНТРОЛЮ З ВІДПОВІДНИХ МОДУЛІВ ТА ДИСЦИПЛІНИ В ЦІЛОМУ

### *Загальна вірусологія.*

1. Історія відкриття вірусів. Особливості вірусів як біологічних систем. Морфологія вірусів. Типи симетрії, будова віріона. Вірусні білки, вірусні нуклеїнові кислоти.
2. Неклітинні інфекційні агенти – віроїди, пріони. Бактеріофаги. Структура, типи взаємодії з бактеріальною клітиною. Практичне використання бактеріофагів (фаготипування та фагоідентифікація, фагодіагностика, фаголікування, використання фагів з профілактичною метою).
3. Взаємодія вірусів з клітинами. Види і етапи взаємодії. Репродукція вірусів.
4. Культивування вірусів. Культури клітин у вірусології. Види клітинних культур, умови культивування, середовища для культури клітин. Виявлення та ідентифікація вірусів при культивуванні на культурі клітин. Цитопатогенна дія вірусів (види, серологічні реакції, кольорова проба).
5. Курячий ембріон. Виявлення та ідентифікація вірусів при культивуванні в курячому ембріоні. РГА, РЗГА, інші серологічні реакції.
6. Культивування вірусів на лабораторних тваринах. Виявлення та ідентифікація вірусів.
7. Вірусоскопічний метод в діагностиці вірусних інфекцій (імунолюмінесцентний, електронномікроскопічний метод).
8. Вірусологічний метод. Завдання та етапи. Критерії ідентифікації вірусів.
9. Особливості серологічної діагностики вірусних захворювань (дослідження парних сироваток, виявлення окремих класів антитіл).
10. Генодіагностика вірусних хвороб, значення полімеразної ланцюгової реакції.
11. Особливості патогенезу вірусних інфекцій. Гострі, хронічні, латентні, персистуючі інфекції. Вірусний канцерогенез.
12. Противірусний імунітет. Інтерферони, механізм противірусної дії. Лікувальні препарати інтерферонів, способи одержання і використання.
13. Специфічна профілактика вірусних хвороб. Основні противірусні вакцини.

### *Спеціальна вірусологія.*

1. Ортоміксовіруси, віруси грипу, вірусологічна діагностика, препарати для специфічної профілактики та лікування.
2. Ортоміксовіруси. Вірус кору, особливості епідеміології та патогенезу, вірусологічна діагностика, препарати для специфічної профілактики.
3. Параміксовіруси. Вірус паротиту, особливості епідеміології та патогенезу, вірусологічна діагностика, препарати для специфічної профілактики та лікування.

4. Ентеровіруси. Вірус поліомієліту, особливості епідеміології та патогенезу, вірусологічна діагностика, препарати для специфічної профілактики.
5. Ретровіруси. ВІЛ, СНІД, особливості епідеміології та патогенезу, вірусологічна діагностика, препарати для специфічної профілактики та лікування.
6. Рабдовіруси. Вірус сказу, особливості епідеміології та патогенезу, вірусологічна діагностика, препарати для специфічної профілактики.
7. Загальна характеристика вірусів, що передаються членистоногими. Вірус кліщового енцефаліту. Діагностика, препарати для профілактики.
8. Герпесвіруси, класифікація, особливості епідеміології та патогенезу, вірусологічна діагностика, препарати для специфічного лікування.
9. Аденовіруси. Особливості епідеміології та патогенезу, вірусологічна діагностика.
10. Збудники вірусних гепатитів. Вірус гепатиту А, способи передачі, вірусологічна діагностика. Вірус гепатиту В, особливості будови, епідеміології та патогенезу, методи вірусологічної діагностики. Профілактика передачі гепатиту В, препарати для специфічної профілактики.
11. Вірус гепатиту С. Вірус гепатиту Д, вірус гепатиту Е, особливості епідеміології та патогенезу, вірусологічна діагностика, препарати для специфічної профілактики.

## Словник використаних термінів

***“In situ” гібридизація*** - гібридизація фрагменту ДНК (проба, зонд), міченого радіактивно або флюоресцентно з препаратом хромосом, які підготовані спеціально для подальшого дослідження під мікроскопом. За допомогою методу вдається визначати місцеположення ділянок, комплементарних пробі.

***1 БУО (1 бляшкоутворююча одиниця)*** – те найбільше розведення вірусу, яке в культурі клітин здатне утворити 1 бляшку.

***3’-кінцева послідовність*** - послідовність на 3’-кінці мРНК, яка не транскрибується, наступна за термінуючим кодоном.

***Абортивна вірусна інфекція*** – інфекція, для якої не характерно 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 геному.

***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, що виявляються в хромосомній або позахромосомній ДНК.

***Анамнез*** - відомості про попередній стан хворого

***Антикоагулянти*** – група речовин, які перешкоджають зсіданню крові.

***Антисептика*** – хімічне та біологічне знешкодження мікроорганізмів та вірусів для запобігання ураженню.

***Антисироватка*** – сироватка, виділена з крові імунізованої тварини, яка містить специфічні антитіла до певного вірусу (антигену).

***Асептика*** – сукупність профілактичних заходів, спрямованих на створення безмікробних умов для запобігання ураженню.

***Бактеріофаги*** – група вірусів здатних розмножуватись тільки в бактеріальних клітинах.

***Біологічної нейтралізації реакція*** – встановлення інактивуючої дії сироватки на вірус, шляхом введення суміші лабораторній тварині.

***Блотинг ДНК по Саузерну*** - процедура переносу денатурованої ДНК з агарозного гелю на нітроцелюлозний фільтр для гібридизації з комплементарними нуклеотидами. (Синонім –саузерн-блотинг).

***Бляшка*** - результат руйнування клітин в місці взаємодії вірусної частинки (в тому числі бактеріофагу) з моношаром клітинної культури.

***Вакцина*** – препарат, який містить інактивованій вірус або його компоненти. Вакцини вводять в організми людей та 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 (дігнотофори 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 виводжує і не містить вірусних компонентів.

**Деканітація** – 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, у крайньому випадку, 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 їх галуження і робить неможливим подальший рух крові судинами. В результаті це призводить до загибелі тварини протягом 1-5хв, залежно від її розміру та об'єму введенного 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 антигену з антитілом в присутності комплементу.

**Зворотня транскрипція** - синтез ДНК на матриці РНК; здійснюється ферментом зворотньою транскриптазою. (Синонім -РНК-залежна ДНК-полімераза, ревертаза).

**Ідентифікація вірусу** – встановлення таксономічного положення вірусу.

**Ізоелектрична точка** - це рН розчину, при якому врівноважуються позитивні та негативні заряди поверхні віріонів і вони випадають в осад.

**Імунізація лабораторних тварин** - введення вірусмісного матеріалу тварині (обов'язково за певною схемою з урахуванням методу та часу введення) з метою отримання специфічної антисироватки до відповідного вірусу.

**Імунність рослин** - рослини не уражуються вірусом (синонім – стійкість)

**Індикація вірусу** – визначення наявності чи відсутності вірусу у 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 у два рази перевищує інкубаційний термін відповідної хвороби.

**Карликовість та пригнічення росту** – розмір рослини зменшуються внаслідок вкорочення міжвузлів, зменшення листків, плодів та інших частин рослини.

**кДНК** - одноланцюгова ДНК, синтезована *in vitro* шляхом зворотної транскрипції; комплементарна РНК.

**Кільцева плямистість** – поява хлоротичних або некротичних круглих плям на листках, а іноді на плодах та пагонах.

**Комплемент** – компонент сироватки крові, який приймає участь в імунній відповіді.

**Контамінація** – забруднення.

**Лізис** – розпад клітини, викликаний руйнуванням її оболонки.

**Літична інфекція** – інфекція, в результаті якої відбувається лізис клітини.

**Матриця** - ДНК або РНК, які використовуються полімеризуючим ферментом (ДНК- або РНКполімерази) для синтезу комплементарного ланцюга.

**Модельні об'єкти** (експериментальні або тест-об'єкти) - макроорганізми або культури клітин (в тому числі, мікроорганізмів), чії властивості є достеменно відомими і постійними для представників одного виду (у випадку культури клітин – штаму, популяції або лінії). Відомі властивості модельного об'єкту



дозволяють їх використовувати для детекції або дослідження особливостей патогенів невідомої природи.

**Мозаїка** – характеризується чергуванням зон із зеленим та світлозеленим, жовтим забарвленням, що може зустрічатись як на листках, так і плодах.

**Надчутливість рослин** – рослини уражуються з утворенням місцевих некрозів, які з'являються внаслідок відмирання клітин біля точки зараження.

**Некроз** – загибель клітин – гіперчутлива відповідь.

**Олігонуклеотид** - декілька нуклеозидів, з'єднаних фосфодіефірними 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 с 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 їх розмноження.

**Плавлення ДНК** - втрата двоспіральної структури ДНК під дією температури.

**Помірні бактеріофаги** – бактеріофаги здатні лізогенізувати клітину та у вигляді профагу знаходиться 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 ДНКполімеразою 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, при яких його літичні функції пригнічуються.

**Репресор** – білок або антисмислова РНК, що пригнічують активність генів.

**Рослини-індикатори** – це рослини, які дають чітку специфічну реакцію на даний 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 крові.

**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 репродукується з чітким проявом симптомів захворювання.

**Сіквенс** - визначення послідовностей амінокислот (сіквенс білку) або нуклеотидів (сіквенс НК).

**Стерильні тварини** - макроорганізми, які не мають ніяких життєздатних мікроорганізмів, які можна виявити.

**Титр вірусу** – кількість вірусу, що міститься в одиниці об'єму матеріалу.

**Толерантність рослин** – вірус транспортується по тканинам рослини, але симптоми захворювання слабо виражені або не виражені зовсім (замасковані).

**Транфекція** – 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, при якій клітини продовжують продукувати вірусні частки або їх 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.

## Література

1. Воронкова О.С., Голодок Л.П., Гаврилюк В.Г., Вінніков А.І. Основи вірусології. – Дніпропетровськ: Порги, 2014. – 273с.
2. Гудзь С.П., Перетятко Т.Б., Галушка А.А. Вірусологія: підручник: [для студ. закл. вищ. осв.]/ С.П. Гудзь, Т.Б. Перетятко, А.А. Галушка. - Львів: ЛНУ імені Івана Франка, 2018. – 536 с. – (Серія «Біологічні студії»).
3. Гудзь С.П., Перетятко Т.Б., Павлова Ю.О. Загальна вірусологія. - Львів: Видавничий центр ЛНУ імені Івана Франка, 2010. – 264 с.
4. Лурия С., Дарнелл Дж. Общая вирусология. – М.: Изд-во, 1981. – 573с.
5. Тихоненко Т.И. Биохимия вирусов. – М.: Медицина, 1966. – 296с.
6. Стент Г. Молекулярная биология вирусов бактерий. – М.: Мир, 1965. – 467с.
7. Агол В.И., Атабеков И.Г., Крылов В.Н. Молекулярная биология вирусов. – М.: Наука, 1971. – 496с.
1. Букринская А.Г. Вирусология. – М.: Медицина, 1986. – 336с.
2. Пташне М. Переключение генов. Регуляция генной активности и фаг λ. – М.: Мир, 1988.– 160с.
3. Практикум із загальної вірусології / за ред. А.Л. Бойка.– К.: Видавничий центр „Київський університет”, 2000. – 269 с.
4. В.П. Ширококов та співавт. Медична мікробіологія, вірусологія, імунологія, Нова книга, Вінниця, 2011. – С. 544, 545-547.
5. К.Д. Пяткін, Ю.С. Кривошеїн. Мікробіологія з вірусологією та імунологією; Київ, 1992. - С. 357-360.
6. І.С. Гайдаш, В.В. Флегонтова. Медична вірологія. Луганськ, 2002. – С.228-237.
7. Мікробіологія, вірусологія, імунологія, інфекційні хвороби. Словник/ За ред Г.К.Палія, В.І.Палія. – Київ: Здоров'я, 2004. – С. 33, 83, 88, 91.
8. В.Г.Шлопов, Л.І.Волос, «Пріонові інфекції», Ж. „Інфекційні хвороби” (укр.)1999р.
9. Cann A.J. Principles of molecular virology / A.J. Cann. – Burlington: Elsevier Academic Press,2005. – 316 с.
10. Carter J. Virology: principles and applications / J. Carter, V. Saunders. – Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 2007. – 382 p.

## НАВЧАЛЬНО-МЕТОДИЧНЕ ВИДАННЯ

*Укладач:*  
Демченко Наталія Ростиславівна

# ВІРУСОЛОГІЯ

*Навчально-методичний посібник  
до лабораторних занять та самостійної роботи студентів  
спеціальності 091 Біологія  
природничо-математичного факультету*

Технічний редактор *О. М. Єрмоленко*  
Макетування *Н.Р. Демченко*

Підписано до друку 11.06.2020 р. Формат 60 x 84 1/16.  
Папір офсетний. Друк на різнографі.  
Ум. друк. арк. 9,25. Обл.-вид. арк. 8,6  
Наклад 100 прим. Зам. № 0128.

Віддруковано ТОВ «Видавництво «Десна Поліграф»  
Свідоцтво про внесення суб'єкта видавничої справи до Державного реєстру  
видавців, виготівників і розповсюджувачів видавничої продукції.  
Серія ДК № 4079 від 1 червня 2011 року  
14035, м. Чернігів, вул. Станіславського, 40  
Тел. (0462) 972-664