

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

Кафедра мікробіології та вірусології

О. С. Калініна

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

**Навчально-методичний посібник
для здобувачів вищої освіти
другого (магістерського) рівня
спеціальності Н6 «Ветеринарна медицина»,
які навчаються за скороченою програмою**



Львів – 2025

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

Кафедра мікробіології та вірусології

О. С. Калініна

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

**Навчально-методичний посібник
для здобувачів вищої освіти
другого (магістерського) рівня
спеціальності Нб «Ветеринарна медицина»,
які навчаються за скороченою програмою**

Студент _____
Прізвище, ім'я, по-батькові

підгрупа _____ **курс** _____

факультет _____

Викладач _____
Прізвище, ім'я, по-батькові

_____ **навчальний рік**

Рецензент:

Куртяк Б. М., в. о. завідувача кафедри епізоотології ЛНУВМБ імені С. З. Гжицького, доктор ветеринарних наук, професор

Укладач:

Калініна О. С.

Лабораторні заняття і тематична самостійна робота з навчальної дисципліни «Ветеринарна вірусологія». Навч.-метод. посіб. для здобувачів вищої освіти другого (магістерського) рівня спеціальності Н6 «Ветеринарна медицина», які навчаються за скороченою програмою. Львів: ЛНУВМБ імені С.З. Гжицького, 2025. 127 с.

Навчально-методичний посібник складено згідно з програмою навчальної дисципліни «Ветеринарна вірусологія» для студентів 2 курсу ФВМ СП. Викладено методологію лабораторної діагностики вірусних хвороб тварин.

Рекомендовано до видання на засіданні кафедри мікробіології та вірусології 03 червня 2025 р., протокол № 14.

Схвалено рішенням навчально-методичної ради факультету ветеринарної медицини факультету ветеринарної медицини 20 червня 2025 р., протокол № 9.

Інформація про пропуски занять

План			Пропущено		
Лекції	Лабор.	Всього	Лекції	Лабор.	Всього
32 год 2 год – 6%	32 год 2 год – 6%	64 год 2 год – 3%	___ год ___ %	___ год ___ %	___ год ___ %

Успішність здобувача вищої освіти

Назви розділів	Поточні оцінки	Середнє арифметичне (САЗ)	Поточний контроль (ПК)
Розділ 1. Фундаментальні властивості вірусів та методи лабораторної діагностики вірусних хвороб тварин			
Розділ 2. Особливості патогенезу вірусних інфекцій та противірусного імунітету			
Розділ 3. Збудники вірусних хвороб тварин. Пріони			

Дата: _____

Підпис викладача _____

Список умовних скорочень

АЧС	– африканська чума свиней
в/в	– внутрішньовенно
в/м	– внутрішньом'язово
ВРХ	– велика рогата худоба
в/ч	– внутрішньочеревно
в/ш	– внутрішньошкірно
ГАО	– гемаглютинувальна одиниця
ЕД ₅₀	– 50 %-ва ефективна доза
ЕМ	– електронна мікроскопія
ЗІЕФ	– зустрічний імуноелектрофорез
ІЕМ	– імуноелектронна мікроскопія
і/н	– інтраназально
і/т	– інтратрахеально
і/ц	– інтрацеребрально
ІФА	– імуноферментний аналіз
ІХА	– імунохроматографічний аналіз
КЧС	– класична чума свиней
мкг	– мікрограм
мкм	– мікромметр
нм	– нанометр
НСК	– нормальна сироватка кроля
ОД	– одиниця дії
ПЕГ-6000	– поліетиленгліколь із мол. масою 6000 Д
ПЛР	– полімеразна ланцюгова реакція
п/ш	– підшкірно
РАЛ	– реакція аглютинації латексу
РГА	– реакція гемаглютинації
РГАд	– реакція гемадсорбції
РГГА	– реакція гальмування гемаглютинації
РГГАд	– реакція гальмування гемадсорбції
РЗК	– реакція зв'язування комплементу
РА	– радіоімунний аналіз
РІФ	– реакція імунофлуоресценції
РК-15	– перещеплювана культура клітин нирки поросяти
РН	– реакція нейтралізації
РНГА	– реакція непрямой гемаглютинації
РНІФ	– реакція непрямой імунофлуоресценції
РНФМ	– реакція нейтралізації флуоресціювальних мікробляшок
РРГ	– реакція радіального гемолізу
РРІД	– реакція радіальної імунодифузії
СНЕВ	– перещеплювана культура клітин нирки ембріона свині
УФ	– ультрафіолетовий
ФБР	– фосфатно-буферний розчин
ХАО	– хоріоналантаїсна оболонка
ЦНС	– центральна нервова система
ЦПД	– цитопатогенна дія
ВНК-21	– перещеплювана культура клітин нирки сірійського хом'яка
МДВК	– перещеплювана культура клітин нирки теляти
Vero	– перещеплювана культура клітин нирки африканської зеленої мавпи
pH	– показник концентрації водневих іонів

Т е м а 1

Організація та обладнання вірусологічної лабораторії. Техніка безпеки і правила роботи з вірусомісним матеріалом. Загальні принципи лабораторної діагностики вірусних хвороб тварин

Кількість годин: 2

Мета заняття. Вивчити природу вірусів та їхні основні властивості.

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

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

Дата: _____

Теоретичне обґрунтування теми

Природа вірусів

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

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

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

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

Структура і режим роботи вірусологічної лабораторії

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

Вірусологічна лабораторія повинна мати такі окремі приміщення:

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

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

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

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

Загальні принципи лабораторної діагностики вірусних хвороб тварин

Постановка діагнозу на вірусні хвороби тварин складається з *двох етапів*: клініко-епізоотологічна і лабораторна діагностика.

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

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

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

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

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

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

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

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

Результат: _____

1. Що таке віруси? **2.** Які властивості клітинних форм життя притаманні вірусам? **3.** У чому полягають докорінні відмінності вірусів від клітинних форм життя? **4.** Вірус і віріон – це синоніми? **5.** Яка роль вірусів в інфекційній патології тварин і людини? **6.** Які основні завдання вірусологічної лабораторії? **7.** Охарактеризуйте структуру вірусологічної лабораторії. **8.** Назвіть обладнання вірусологічної лабораторії. **9.** Який режим роботи вірусологічної лабораторії? **10.** Яких основних вимог треба дотримуватися під час роботи з вірусомісним матеріалом? **11.** Які методи дезінфекції застосовують у вірусологічній лабораторії? **12.** Як зберігають

вірусні штами в лабораторії? **13.** Як культивують віруси в лабораторних умовах? **14.** Як ставлять діагноз на вірусні хвороби тварин? **15.** Як проводять клініко-епізоотологічну діагностику вірусних хвороб тварин? **16.** Які ви знаєте методи лабораторної діагностики вірусних хвороб тварин? **17.** Охарактеризуйте експрес-методи лабораторної діагностики вірусних хвороб тварин. **18.** У чому полягають вірусологічні методи лабораторної діагностики вірусних хвороб тварин? **19.** У чому суть серологічної (ретроспективної) діагностики вірусних хвороб тварин?

Т е м а 2

Відбір патологічного матеріалу від хворих і загиблих тварин для лабораторної діагностики вірусних хвороб. Підготовка вірусовмісного матеріалу для дослідження

Кількість годин: 2

Мета заняття. Вивчити правила відбору патматеріалу для лабораторної діагностики вірусних хвороб тварин. Засвоїти методи консервування патматеріалу і транспортування його в лабораторію. Освоїти техніку первинної обробки вірусовмісного матеріалу.

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

Дата: _____

Теоретичне обґрунтування теми

Відбір клінічного і патологоанатомічного вірусовмісного матеріалу

У лабораторній діагностиці вірусних хвороб тварин точність діагнозу залежить передусім від правильного відбору патматеріалу від хворих, загиблих або вимушено забитих тварин і швидкого транспортування його в лабораторію. *Загальне правило* – патматеріал потрібно брати за можливістю *стерильно*, якнайскоріше після появи чітких клінічних ознак хвороби, коли концентрація вірусу є максимальною, або не пізніше 2–4 год після загибелі, щоб уникнути дисемінації кишкової мікрофлори (внаслідок послаблення бар'єрної функції кишечника) та посмертних змін тканин.

Патматеріал беруть із урахуванням *тропізму вірусу* (тобто здатністю репродукуватися в певних типах клітин) і шляхів виділення його з організму в різні стадії хвороби. За тропізмом віруси поділяються на 6 *основних груп*: 1) *пневмотропні* – уражають клітини слизової оболонки верхніх дихальних шляхів і легень (збудники грипу свиней і коней, парагрипу ВРХ); 2) *неймотропні* – уражають нервові клітини (збудники сказу, хвороби Тешена); 3) *дерматропні (епітеліотропні)* – уражають клітини шкіри і слизових оболонок (збудники віспи, ящуру); 4) *ентеротропні* – уражають клітини слизової оболонки шлунково-кишкового тракту (збудники ротавірусної та коронавірусної інфекцій ВРХ); 5) *політропні* – уражають багато типів клітин (збудники інфекційного ринотрахеїту та вірусної діареї ВРХ); 6) *пантропні* – уражають усі типи клітин (збудники класичної та африканської чуми свиней).

Від *хворих* тварин відбирають такий патматеріал: секрети (носовий, вагінальний, цервікальний); змиви зі слизових оболонок; слина; стінки і вміст везикул, пустул, афт; зіскрібки зі шкіри і слизових оболонок; кал; сеча; кров (цільна дефібринована; «лакова» – в суміші з дистильованою водою 1:1; цільна з антикоагулянтом – гепарином або натрію цитратом; зсіла). Кров використовують для ізоляції вірусів (насамперед пантропних, а також політропних). Від *загиблих* тварин беруть шматочки паренхіматозних органів масою 10–20 г, лімфатичних вузлів, слизових оболонок респіраторного і травного трактів, новоутворень, головний та спинний мозок. Для *ретроспективної діагностики* беруть парні сироватки крові (без антикоагулянту, з інтервалом 2–3 тижні).

Консервування і транспортування патматеріалу

Узятий патматеріал потрібно якнайскоріше законсервувати, щоб зберегти вірус, оскільки його титр за відсутності живих клітин швидко знижується. Найкращим методом консервування патматеріалу є використання контейнерів з охолоджувачем (-20°C). За респіраторних інфекцій застосовують танучий лід ($2-4^{\circ}\text{C}$). У разі транспортування патматеріалу на далекі відстані використовують сухий лід (-79°C), а за хвороби Марека (кров і пухлинна тканина) – рідкий азот (-196°C).

Для консервування шматочків органів і тканин можна застосовувати 50%-й розчин *гліцерину* або *стабілізувальне середовище*, яке складається з 0,9%-го розчину NaCl, антибіотиків і

протеїнового стабілізатора (0,5% желатини або 0,5–1% альбуміну сироватки крові ВРХ). За такого методу консервування патматеріал посилають за температури танучого льоду (2–4°C). Треба мати на увазі, що патматеріал, консервований 50%-м гліцерином, не придатний для дослідження в РІФ, консервування вірусомісних рідин і зараження лабораторних об'єктів.

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

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

Підготовка вірусомісного матеріалу для дослідження

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

пов'язано з частковою адсорбцією на них вірусу. Вірусомісну суспензію зберігають за $-20-70^{\circ}\text{C}$.

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

Самостійна робота. Оформити супровідну документацію на патматеріал. Приготувати 10%-ву вірусомісну суспензію.

Результат: _____

Контрольні запитання

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

Тема 3

Індикація вірусів у патологічному матеріалі за наявністю віріонів, тілець-включень і вірусних нуклеїнових кислот

Кількість годин: 2

Мета заняття. Засвоїти методи вірусоскопії та індикації тілець Бабеша–Негрі. Ознайомитися з будовою та принципом роботи електронного мікроскопа. Вивчити методи виготовлення препаратів для електронної мікроскопії. Засвоїти суть методу ДНК-зондів і ПЛР.

Матеріальне забезпечення. Препарати з віріонами вірусу віспи курей і тільцями Бабеша–Негрі, світлові мікроскопи, імерсійна олія, електронний мікроскоп, електронограми віріонів вірусів різних родин, тест-системи для методу ДНК-зондів і ПЛР.

Дата: _____

Теоретичне обґрунтування теми

Морфологія вірусів

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

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

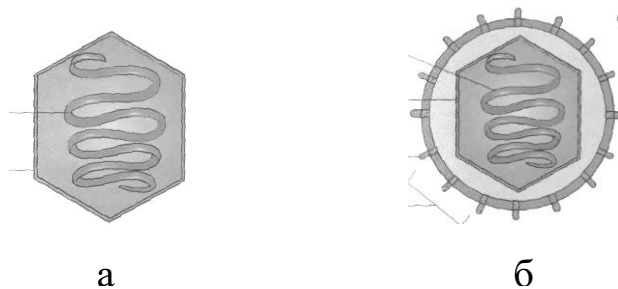


Рис. 1. Віріони простих (а) і складних (б) вірусів

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

Виявлення віріонів вірусів методом світлової мікроскопії (вірусоскопія)

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

Для фарбування віріонів найчастіше використовують **метод Морозова**: 1) рідина Руге – 1 хв; промивання дистильованою водою; 2) розчин таніну – 1–2 хв; промивання; 3) розчин аміачного нітрату срібла – 1–2 хв за легкого підігрівання; промивання.

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

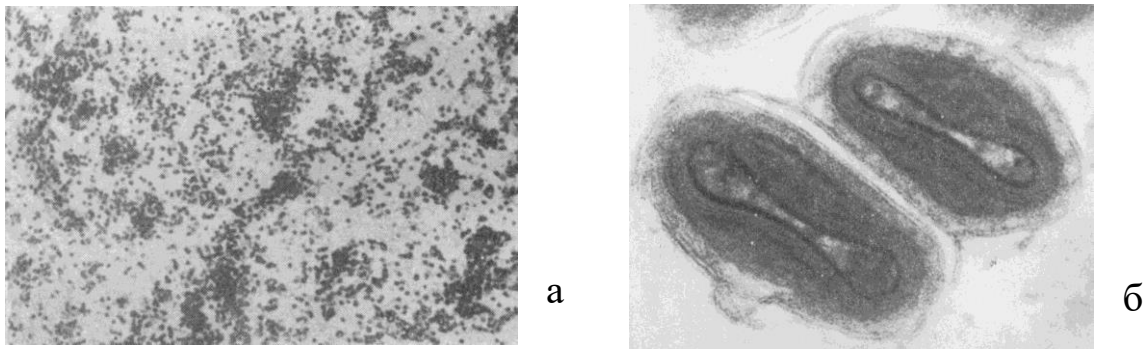


Рис. 2. Віріони вірусу віспи корів за світлової (а) та електронної (б) мікроскопії

Електронна мікроскопія

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

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

Досліджувані об'єкти для електронної мікроскопії мають бути у вигляді вірусомісних суспензій або ультратонких зрізів, які поміщають на *мідні предметні сітки*, покриті колодієвими,

формваровими або вуглецевими *плівками-підкладками*. Для створення контрасту між досліджуваним об'єктом та фоном препарату застосовують *методи негативного і позитивного контрастування*. За негативного контрастування контрастувальна речовина високої електронної щільності оточує віріони, що мають меншу щільність, і вони виглядають світлішими на темному фоні (рис. 3). За позитивного контрастування, навпаки, віріони виглядають темнішими на світлому фоні (рис. 2б, 4).

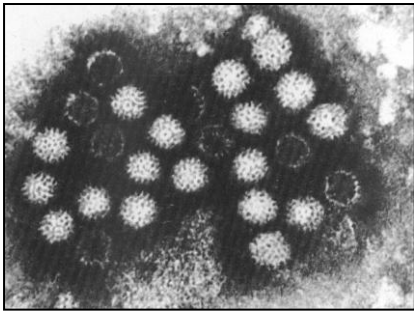


Рис. 3. Віріони збудника африканської чуми коней, негативне контрастування

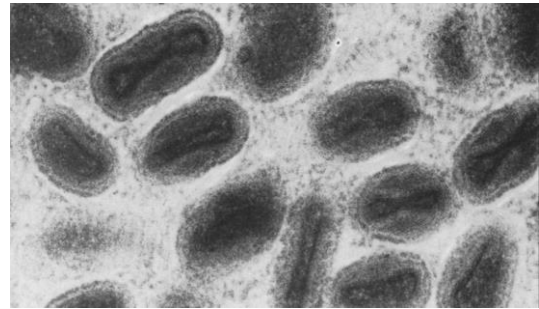


Рис. 4. Віріони збудника фіброми кролів, позитивне контрастування

Підготовка вірусомісного матеріалу для електронної мікроскопії залежить від концентрації вірусу, його чистоти від сторонніх баластних речовин та морфології. Електронна мікроскопія дає позитивні результати, якщо вміст віріонів у 1 мл вірусомісної суспензії становить не менше 10^5 – 10^6 . Здебільшого потрібне попереднє очищення і концентрація вірусу.

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

Виявлення тілець-включень вірусів

У патматеріалі хворих і загиблих тварин за багатьох вірусних хвороб виявляють *тілець-включення*. Вони локалізуються в ядрі або цитоплазмі заражених клітин, розрізняються за морфологією та тинкторіальними властивостями (базофільні, ацидофільні). *Природа*

тілець-включень різноманітна залежно від виду вірусу: 1) скупчення віріонів потомства (зрілих або на стадії формування); 2) накопичення вірусних протеїнів, що не увійшли до складу віріонів потомства; 3) клітинний матеріал, змінений унаслідок репродукції вірусу. Здебільшого тільця-включення являють собою *вірусні «фабрики»* – місця синтезу вірусних протеїнів і нуклеїнових кислот та складання віріонів потомства. У вірусних «фабриках» виявляють клітинні структури (рибосоми, мембрани, мікротрубочки, осміофільні волокна).

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

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

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

Виявлення вірусних нуклеїнових кислот молекулярно-генетичними методами

Метод ДНК-зондів ґрунтується на виявленні в патматеріалі вірусних геномів за допомогою плазмідної ДНК, в яку вбудовують фрагмент вірусної ДНК (або ДНК-копії РНК-геному). Гібридну ДНК мітять радіоактивним фосфором або біотином і денатурують за 80–100°C. У результаті отримують дві 1-ланцюгові молекули ДНК із вірусоспецифічними нуклеотидними послідовностями, які є ДНК-зондами.

З досліджуваного патматеріалу за допомогою спеціальних методик виділяють вірусні нуклеїнові кислоти, денатурують їх кип'ятінням або обробкою лугом і контактують із ДНК-зондом. Це призводить до утворення 2-ланцюгових молекул у разі їхньої комплементарності (*молекулярна гібридизація*). Індикацію новоутворених ДНК проводять за міткою зонда, а саме: P³² виявляють методом авторадіографії або шляхом підрахунку імпульсів у гамма-лічильнику, а наявність біотину встановлюють колориметричним методом.

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

Весь цикл ампліфікації триває всього 5–10 хв і може повторюватися до 20–40 разів. За кожний цикл відбувається подвоєння кількості молекул ДНК. За 40 циклів ампліфікації кількість копій ДНК зростає в 10¹³ разів. Збільшення кількості вірусної ДНК у 10⁶ разів цілком достатньо для виявлення її методом ДНК-зондів без попереднього накопичення вірусу в культурі клітин.

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

сильно контаміновані мікроорганізмами і не придатні для зараження культури клітин.

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

Результат: _____

Контрольні запитання

1. Що таке віріон, яка його структура? **2.** У чому полягає відмінність між просто і складно організованими вірусами? **3.** Який принцип будови капсиду віріона? **4.** Що таке нуклеокапсид? **5.** Що таке серцевина (нуклеоїд) віріона? **6.** Що являє собою вірусний геном? **7.** У чому полягає вірусоскопія? **8.** Розкажіть суть методу фарбування віріонів за Морозовим. **9.** З якою метою використовується електронна мікроскопія в лабораторній діагностиці вірусних хвороб тварин? **10.** Розкажіть принцип роботи електронного мікроскопа. **11.** Як виготовляють препарати для електронної мікроскопії? **12.** У чому суть позитивного і негативного контрастування препаратів для електронної мікроскопії? **13.** Яка перевага імуноелектронної мікроскопії? **14.** Що таке тільця-включення вірусів, яка їхня природа? **15.** Що являють собою тільця-включення вірусів за більшості вірусних хвороб тварин? **16.** Які ви знаєте тільця-включення вірусів? **17.** Що таке тільця Бабеша–Негрі, як їх виявляють? **18.** Які ви знаєте молекулярно-генетичні методи діагностики і з якою метою їх використовують? **19.** У чому суть методу ДНК-зондів? **20.** У чому суть ПЛР? **20.** Які переваги методу ДНК-зондів і ПЛР?

Т е м а 4

Культивування вірусів у організмі лабораторних тварин

Кількість годин: 2

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

Матеріальне забезпечення. Лабораторні тварини (білі миші), стерилізатор зі стерильними інструментами, вірусовмісна суспензія, йодований спирт, вата, ватні тампони на паличках, ефір, спиртівка, дошка і цвяхи для фіксації трупа тварини, чашки Петрі, пробірки, піпетки, предметні скельця, гумові груші.

Дата: _____

Теоретичне обґрунтування теми Біопроба на лабораторних тваринах

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

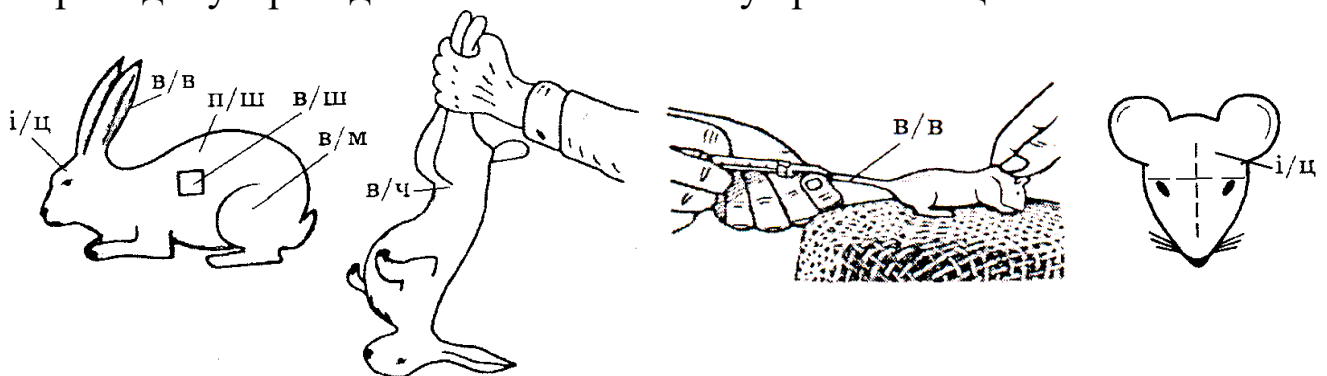


Рис. 5. Методи експериментального зараження лабораторних тварин

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

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

Індикація вірусів у організмі лабораторних тварин

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

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

Техніка розтину (рис. 6). Труп тварин фіксують голками (або цвяхами) на дошці в спинному положенні. Шкіру обробляють йодованим спиртом або дезрозчином, розрізають по середній лінії та в напрямку до кінцівок, препарують і фіксують голками. Роблять розріз *черевної стінки* по середній лінії до мечоподібного відростка і під лінією діафрагми. Утворені трикутники черевної стінки відводять убік і фіксують. Пінцетом відтягують кишечник уліво і відбирають шматочки паренхіматозних органів масою 10–20 г (у мишей – повністю). Під час розтину *грудної порожнини* розрізають ребра, видаляють їх разом із грудною кісткою і відбирають шматочки

легень. Для розтину *черепної порожнини* тварину кладуть на черево, фіксують передні кінцівки і голову. Шкіру розрізають у ділянці шиї та в напрямку до очниць, препарують, стягують уперед і фіксують. Розріз черепної коробки проводять від великого мозкового отвору в напрямку до очниць і між ними, видаляють черепну кістку і дістають головний мозок.

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

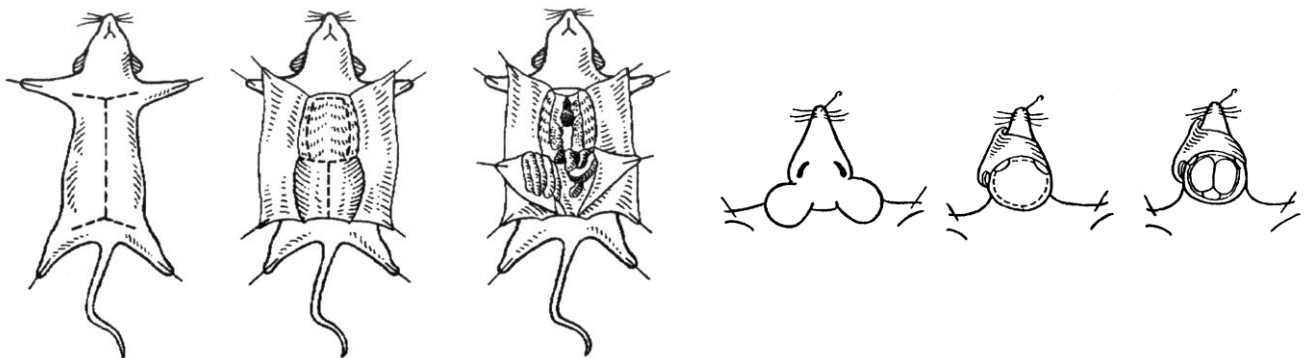


Рис. 6. Розтин миші

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

Результат: _____

Контрольні запитання

1. З якою метою використовують лабораторних тварин у вірусології?
2. Які вимоги ставляться до лабораторних тварин?
3. Як виявити серед лабораторних тварин латентних вірусоносіїв?
4. Як досягається стандартна чутливість лабораторних тварин до вірусів?
5. Які ви знаєте методи експериментального зараження лабораторних тварин?
6. Як проводять підшкірне зараження?
7. Як проводять внутрішньошкірне зараження?
8. Як проводять зараження в скарифіковану шкіру?
9. Як

проводять внутрішньом'язове зараження? **10.** Як проводять внутрішньочеревне зараження? **11.** Як проводять внутрішньовенне зараження? **12.** Як проводять інтраназальне зараження? **13.** Як проводять інтрацеребральне зараження? **14.** Які ознаки розмноження вірусів в організмі лабораторних тварин? **15.** За яких вірусних інфекцій біопробу на лабораторних тваринах можна відтворити типові клінічні ознаки хвороби? **16.** З якою метою проводять розтин заражених лабораторних тварин? **17.** Розкажіть техніку розтину лабораторних тварин. **18.** Які віруси культивують в організмі лабораторних тварин, методи зараження та індикації?

Т е м а 5

Культивування вірусів у курячих ембріонах

Кількість годин: 2

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

Матеріальне забезпечення. Курячі ембріони, овоскопи, штативи для курячих ембріонів, пробійник, йодований спирт, стерилізатор зі стерильними інструментами, вірусовмісна суспензія, ватні тампони на паличках, парафіноні палички, лейкопластир, простий олівець, чашки Петрі, пробірки, піпетки, гумові груші, спиртівка, дезрозчин, предметні скельця, 5%-ва суспензія еритроцитів курей, 0,9%-й розчин NaCl.

Дата: _____

Теоретичне обґрунтування теми

Біопроба на курячих ембріонах

Курячі ембріони використовуються у вірусології з *метою*: 1) первинного виділення вірусів із патматеріалу; 2) підтримання вірусних штамів у лабораторії; 3) накопичення вірусів під час виробництва вакцин і діагностикумів; 4) титрування вірусів; 5) як тест-об'єкт у реакції нейтралізації.

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

Будова курячого ембріона (рис. 7). Зовні ембріон вкритий твердою пористою *шкаралупою*, до якої прилягає *підшкаралупна оболонка*. Біля тупого кінця яйця вона розділяється на два листки, де утворюється *повітряна камера*. До підшкаралупної оболонки прилягає *хоріоналантоїсна оболонка (ХАО)*, що пронизана кровоносними судинами і виконує функцію органа дихання ембріона. ХАО обмежує *алантоїсну порожнину*, в якій накопичуються продукти обміну. Зародок знаходиться в *амніотичній порожнині*, що заповнена навколоплідною рідиною та оточена оболонкою. Зародок пуповиною зв'язаний із *жовтковим мішком*, який є резервуаром поживних речовин. У гострому кінці яйця знаходиться залишок білка, який містить лізоцим, що захищає зародок від стафілококової та інших інфекцій.

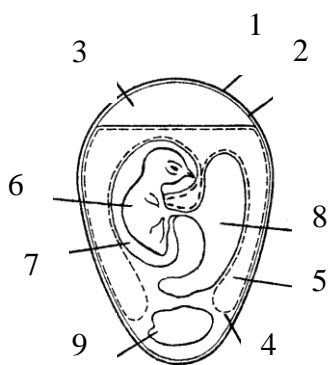


Рис. 4. Будова курячого ембріона:

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

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

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

1) В алантоїсну порожнину (9–11-й день інкубації). Курячий ембріон розміщують вертикально. У шкаралупі роблять отвір на

5–6 мм вище межі повітряної камери. Голку вводять вертикально на глибину 10–12 мм.

2) *На ХАО* (через штучну повітряну камеру, 10–12-й день інкубації). Курячий ембріон розміщують горизонтально. У шкаралупі роблять 2 отвори: невеликий – над центром повітряної камери і більший – на боці. Гумовою грушею відсмоктують повітря з природної повітряної камери. Тоді ХАО переміщається та утворюється штучна повітряна камера. Через боковий отвір наносять на ХАО вірусомісний матеріал.

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

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

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

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

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

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

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

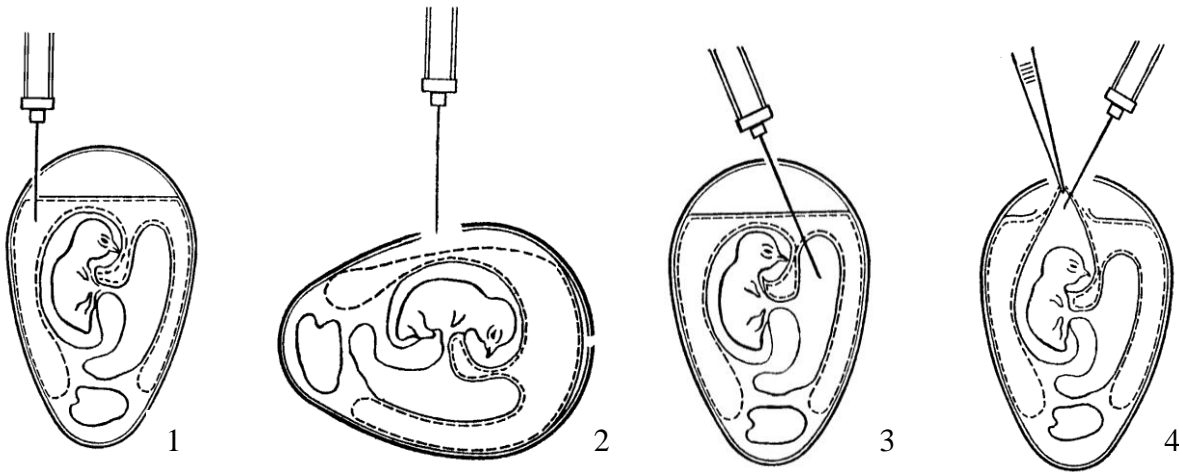


Рис. 8. Методи експериментального зараження курячих ембріонів:
1 – в алантоїсну порожнину; 2 – на ХАО; 3 – у жовтковий мішок;
4 – в амніотичну порожнину.

Індикація вірусів у курячих ембріонах

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

Розтин курячих ембріонів проводять у стерильних умовах із метою аналізу патологоанатомічних змін і головне – відбору вірусомісного матеріалу для ідентифікації виділеного збудника.

Техніка розтину (рис. 9). Шкаралупу протирають 2%-м спиртовим розчином йоду і зрізають вище межі повітряної камери. Проколюють підшкаралупну оболонку разом із ХАО, пінцетом притримують структури курячого ембріона і пастерівською піпеткою відбирають до

10 мл алантоїсної рідини. Піпетку вводять в амніон під шию зародка і відбирають до 1 мл амніотичної рідини. Зрізають верхню частину ХАО, виймають зародок, жовтковий мішок, білок і частину ХАО, що залишилася на шкаралупі. ХАО поміщають у чашку Петрі з 0,9%-м розчином NaCl, промивають до отримання прозорої рідини і розглядають на темному фоні. Жовтковий мішок після витискання вмісту переносять у чашку Петрі з 0,9%-м розчином NaCl і промивають.

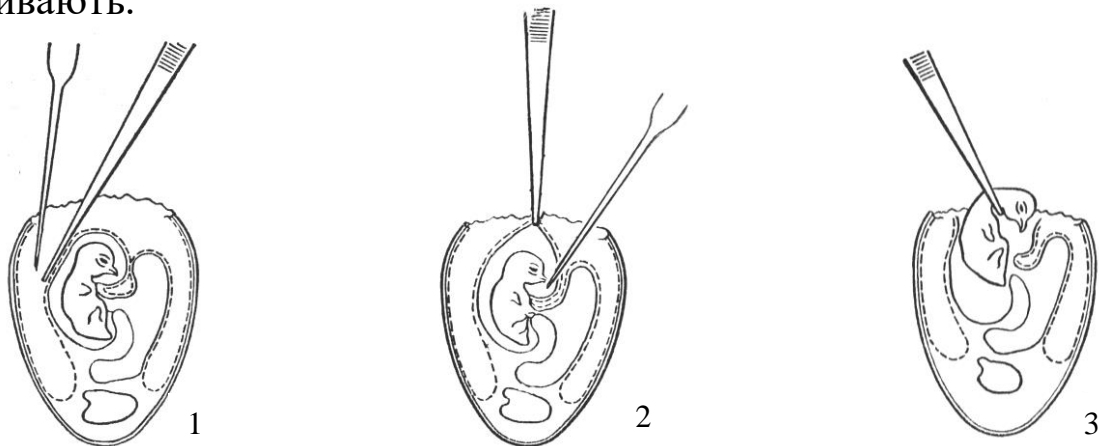


Рис. 9. Розтин курячого ембріона:

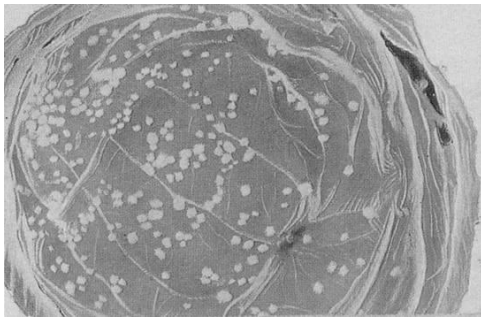
- 1 – відбір алантоїсної рідини; 2 – відбір амніотичної рідини;
3 – отримання зародка.

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

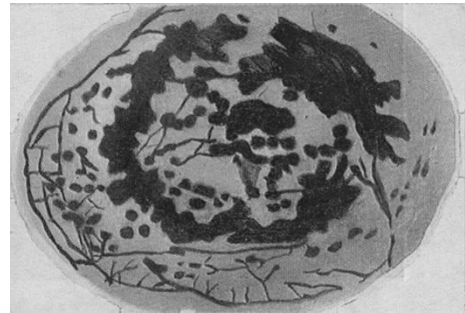
Ознаками розмноження вірусів у курячих ембріонах є загибель (у характерні для кожного виду вірусу строки), патологоанатомічні зміни та гемаглютинація з ембріональними рідинами. З патологоанатомічних змін найтипівішими є помутніння і набряк ХАО, утворення на ХАО некротичних вузликів – віспин (рис. 10),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

Важливим методом індикації вірусів у курячих ембріонах є *реакція гемаглютинації (РГА)*, що ґрунтується на здатності вірусів склеювати еритроцити певного виду (за рахунок вірусного протеїну гемаглютиніну). Особливо цінна ця реакція в разі виявлення вірусів,

які розмножуються в курячих ембріонах, але не зумовлюють жодних змін (наприклад, збудник парагрипу ВРХ, слабовірулентні штами збудника ньюкаслської хвороби). Для постановки РГА на склі змішують краплю ембріональної рідини (алантоїсної або амніотичної) з краплею 5%-ї суспензії еритроцитів певного виду. За наявності гемаглютинувального вірусу через 5–10 хв випадають пластівці склеєних еритроцитів.



а



б

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

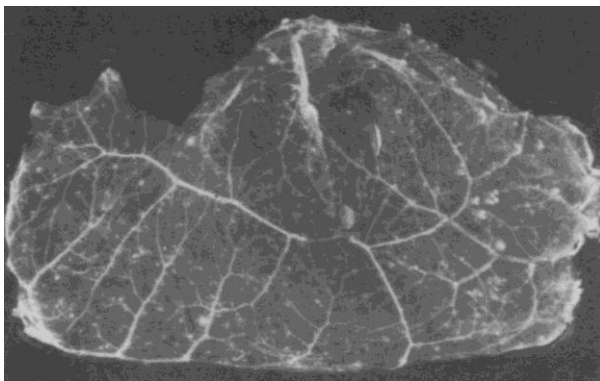


Рис. 11. Пустули на ХАО курячого ембріона

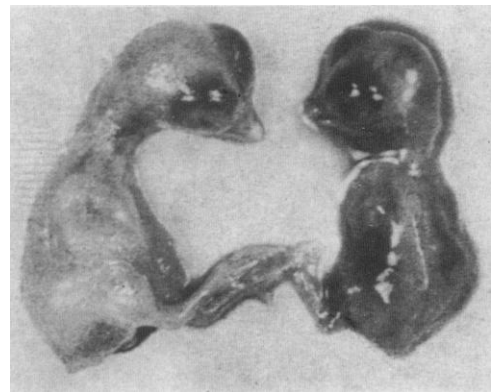


Рис. 12. Карликовість і муміфікація зародка курячого ембріона

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

Результат: _____

Контрольні запитання

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

Т е м а 6

Культивування вірусів у культурах клітин

Кількість годин: 4

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

Матеріальне забезпечення. Вихідна тканина для виготовлення первинно-трипсинізованої культури клітин (курячі ембріони або нирка теляти); розчини Хенкса, Ерла, трипсину, версену; середовища 199, Ігла, гідролізат лактоальбуміну; сироватка крові ВРХ; антибіотики (пеніцилін, стрептоміцин); стерилізатор зі стерильними інструментами, спиртівка, спирт, вата, магнітні мішалки, центрифуга, світлові мікроскопи, камери Горяєва, 0,1%-й розчин кристалвіолету, стерильний посуд (пробірки з гумовими пробками, матраци, пластикові мікропланшети, центрифужні пробірки, піпетки, колба для трипсинізації), марлеві фільтри, фольга, лотки для пробірок, гумові груші, лід, дезрочин, фіксовані препарати з культурою клітин (незараженою, з різними формами ЦПД і гемадсорбцією), матраци з бляшками.

Дата: _____

Теоретичне обґрунтування теми

Класифікація тканинних культур і принцип їхнього виготовлення

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

У вірусологічній практиці культура клітин використовується з цією ж метою, що й інші біологічні об'єкти: 1) для первинного виділення вірусу з патматеріалу; 2) підтримання вірусних штамів у лабораторії; 3) накопичення вірусів під час виготовлення вакцин і діагностикумів; 4) титрування вірусів; 5) як тест-об'єкт у реакції нейтралізації.

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

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

Органна культура – це підтримання *in vitro* фрагментів тканин, цілих органів або їхніх частин за збереження їхньої структури і функції. Органні культури не здатні до розмноження. В органних

культурах успішно вирощують шматочки слизової оболонки носа і трахеї, шкіри, легень, печінки, селезінки, кишечника, нирок та інших органів.

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

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

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

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

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

Первинні культури позбавлені багатьох клітин, які присутні у вихідній тканині, оскільки не всі клітини здатні прикріпитися до

субстрату і вижити в умовах *in vitro*. Проте клітини первинних культур гетерогенні, і в них найповніше представлені типи клітин тієї тканини, звідки вони отримані. Первинні культури високочутливі до вірусів, онкогенно безпечні. *Недоліком* їх є значна трудомісткість виготовлення, а також можливість контамінації латентними вірусами і мікоплазмами, що персистують в організмі тварин, тканини яких використовують для трипсинізації.

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

Перещеплювані культури клітин (син.: *стабільні*, або *постійні, клітинні лінії*) виготовляють із первинних шляхом тривалих пересівів (не менше 70 разів із 3-денними інтервалами). Такі клітини зазвичай мають змінений каріотип порівняно з вихідною культурою (гетероплоїдний набір хромосом), необмежений строк життя, і багато з них проявляють онкогенні властивості.

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

Перещеплювані культури клітин мають *переваги* порівняно з первинними. Їхнє застосування вирішує проблему сировини, виключає необхідність постійного постачання свіжими тканинами. Перещеплювані культури клітин складаються з відносно однорідних клітин (епітеліоїдних, фібробластоїдних), що забезпечує стандартні

умови репродукції вірусів. Окрім того, за пересівів з'являється можливість виявити контамінацію клітинної культури вірусами і мікоплазмами. Проте перещеплювані культури клітин мають серйозний *недолік*: схильність до малігнізації, тобто злякисного переродження. Це в певній мірі обмежує їхнє використання у виробництві живих вакцин, особливо в медичній практиці.

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

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

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

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

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

Розчини і живильні середовища для культур клітин

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

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

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

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

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

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

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

Виготовлення первинно-трипсинізованої культури клітин і субкультури клітин

Методика виготовлення первинно-трипсинізованої культури клітин

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

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

3. Трипсинізацію можна проводити такими методами:

а) *Метод теплої трипсинізації* частіше використовують для диспергування ембріональних тканин. Трипсинізацію проводять дробно за 37°C кілька разів по 5–30 хв (залежно від типу тканини). Першу порцію трипсину виливають. Трипсин із клітинами, що відділилися, зливають через 2–3 шари марлі в колбу, яку поміщають на лід або в холодильник для припинення дії ензиму. До тканини, що залишилася в колбі, додають свіжу порцію трипсину і знову трипсинізують. Трипсинізацію проводять 3–5 разів до повного виснаження тканини.

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

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

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

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

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

Методика виготовлення субкультури клітин

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

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

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

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

5. Після формування моношару ростове середовище змінюють на підтримувальне.

Самостійна робота. Розглянути у світловому мікроскопі фіксовані препарати з незараженою культурою клітин. Ознайомитися з розчинами і живильними середовищами для культури клітин. Відпрацювати методику виготовлення первинно-трипсинізованої культури клітин нирки теляти або фібробластів курячого ембріона та субкультури клітин.

Результат: _____

Дата: _____

Теоретичне обґрунтування теми

Індикація вірусів у культурі клітин

Методика зараження культури клітин

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

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

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

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

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

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

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

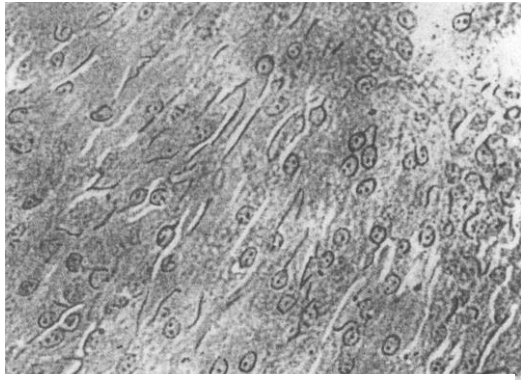


Рис. 13. Первинна культура клітин сім'яників теляти

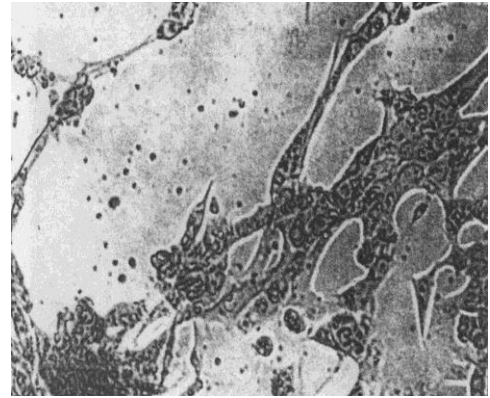


Рис. 14. ЦПД – округлення клітин

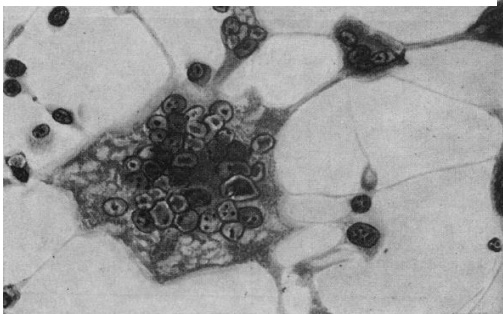


Рис. 15. ЦПД – фрагментація клітин

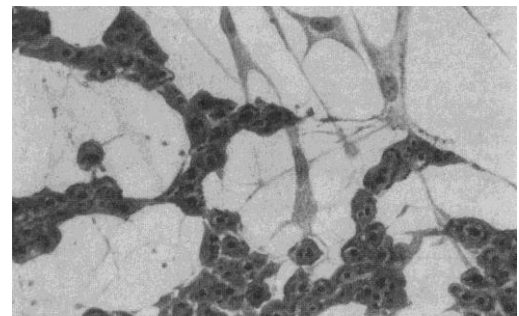


Рис. 16. ЦПД – утворення симпластів

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

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

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

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

Деякі онкогенні віруси (зокрема вірус саркоми Рауса) можуть спричинити в культурі клітин *цитопроліферативний* (або

трансформувальний) ефект (рис. 17). Він полягає в утворенні фокусів трансформації, що складаються зі скупчень кількох шарів округлих клітин, які під впливом вірусу втратили властивість контактної інгібіції та набули здатності до безперервного поділу.

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

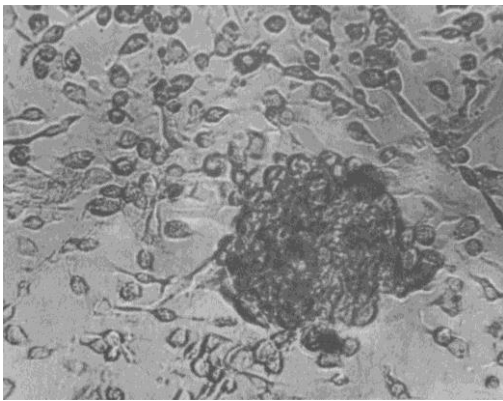


Рис. 17. Трансформувальний ефект

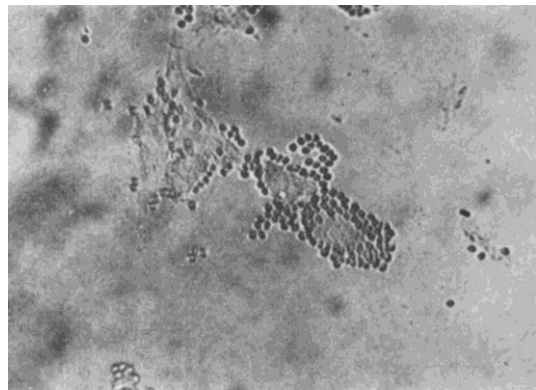


Рис. 18. Гемадсорбція

Для постановки *реакції гемадсорбції (РГАд)* в 2–4 пробірки з інфікованою культурою клітин через 3–5 діб після зараження вносять по 0,2 мл (в лунки мікропланшетів – по 0,05 мл) 0,4–0,5%-ї суспензії еритроцитів певного виду. Пробірки і планшети витримують у горизонтальному положенні 10–15 хв за кімнатної температури або 30–40 хв за 4°C (залежно від виду вірусу), злегка струшують і розглядають під малим збільшенням мікроскопа. Для контролю такі самі маніпуляції проводять із незараженою культурою клітин. Реакція вважається позитивною, якщо в пробірках з інфікованою культурою еритроцити прикріпилися до поверхні клітин, а в контрольних – гемадсорбція відсутня. Гемадсорбція буває дифузною, вогнищевою або тільки на периферії моношару у вигляді «намиста», що залежить від виду вірусу і культури клітин.

Для індикації вірусів у культурі клітин можна застосовувати **метод бляшок** (рис. 19). Це обмежені вогнища загиблих під дією вірусу клітин у суцільному моношарі культури. Для отримання

бляшок культуру клітин, вирощену в матрацах, заражають вірусом (у невисокій концентрації) і вносять спеціальне агарове покриття такого складу: агар, розчин Ерла, сироватка крові ВРХ, натрію гідрокарбонат, антибіотики та індикатор нейтральний червоний. Через 30–60 хв після застигання середовища матраці поміщають у термостат за 37°C, загорнувши в світлонепроникливий матеріал. Інкубацію проводять клітинами догори. Спостерігають за появою бляшок упродовж 4–12 діб.

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

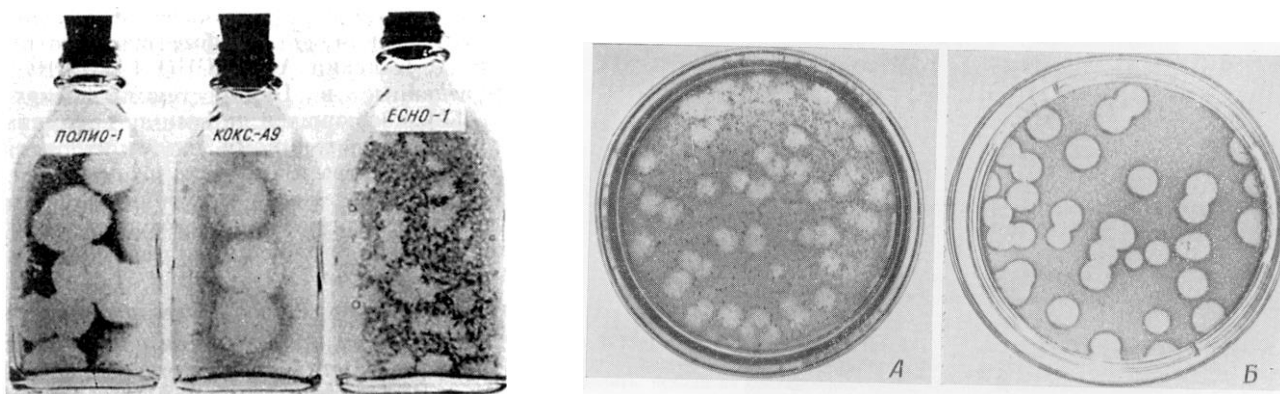


Рис. 19. Бляшки

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

Орієнтовним методом виявлення вірусів у культурі клітин є **кольорова (або метаболічна) проба**. Вона полягає в тому, що в незаражених культурах під впливом продуктів метаболізму клітин живильне середовище, яке містить індикатор феноловий червоний, підкислюється і стає жовтого кольору. У той час у заражених

виготовлення субкультури клітин. **21.** Розкажіть методику зараження культури клітин. **22.** Як проводять індикацію вірусів у культурі клітин? **23.** Що таке ЦПД? Охарактеризуйте форми ЦПД. **24.** Що таке трансформувальний ефект? **25.** Що таке гемадсорбція? Техніка постановки РГАд. **26.** Що таке бляшки? Техніка отримання їх. **27.** Що таке кольорова (метаболічна) проба? **28.** Що таке неспецифічна дегенерація культури клітин?

Т е м а 7

Титрування вірусів

Кількість годин: 2

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

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

Дата: _____

Теоретичне обґрунтування теми

Загальні принципи титрування вірусів

В умовах лабораторії та біофабричного виробництва під час роботи з вірусами постійно виникає необхідність їхнього кількісного визначення. Це потрібно, зокрема, в разі виготовлення вірусних вакцин, імунних сироваток і діагностиків, зараження лабораторних об'єктів, постановки серологічних реакцій.

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

Титрування вірусів за інфекційною активністю

Титрування вірусів за інфекційною активністю зі статистично оцінюваним ефектом

Оскільки чутливість біологічних систем до вірусів (навіть високовірулентних штамів) коливається в широких межах, інфекційний титр здебільшого можна визначити як статистичну величину. За одиницю інфекційного титру прийнята **50%-ва ефективна доза – ЕД₅₀**. Це така доза вірусу, яка спричинює інфекційний ефект у 50% заражених біологічних систем. Залежно від виду тест-об'єкта і

форми прояву інфекційної дії вірусу ЕД₅₀ називається по-різному в кожному конкретному випадку (див. таблицю 1).

Т а б л и ц я 1. Значення ЕД₅₀

Тест-об'єкти	Інфекційна дія вірусу	Назва ЕД ₅₀
Лабораторні тварини	Загибель	ЛД₅₀ – 50%-ва летальна доза
	Клінічні ознаки або патологоанатомічні зміни	ІД₅₀ – 50%-ва інфекційна доза
Курячі ембріони	Загибель	ЕЛД₅₀ – 50%-ва ембріональна летальна доза
	Патологоанатомічні зміни	ЕІД₅₀ – 50%-ва ембріональна інфекційна доза
Культура клітин	Цитопатичний ефект	ТЦД₅₀ – 50%-ва тканинна цитопатична доза

Методика визначення ЕД₅₀

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

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

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

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

5. Визначають, скільки ЕД₅₀ містить такий самий об'єм нерозведеного вірусу і перераховують кількість ЕД₅₀ на 1 см³ вірусомісного матеріалу.

Титрування вірусів за інфекційною активністю, оцінюваною за одиничним ефектом

Інфекційну активність вірусів можна оцінити за *одиничним ефектом* – появі в тест-об'єктів локальних уражень, а саме: утворення бляшок у культурі клітин і віспин на ХАО курячого ембріона. Відповідно інфекційний титр вірусу визначають у

бляшкоутворювальних одиницях (БУО) і віспоутворювальних одиницях (ВУО). 1 БУО – це доза вірусу, яка спричинює утворення однієї бляшки в культурі клітин. 1 ВУО – це доза вірусу, що спричинює утворення однієї віспини на ХАО курячого ембріона.

Для визначення інфекційного титру вірусу в БУО або ВУО певним розведенням вірусомісного матеріалу в однаковому об'ємі заражають кілька матраців із культурою клітин або курячих ембріонів на ХАО. Через відповідний час підраховують кількість бляшок або віспин, виводять середнє арифметичне і роблять перерахунок на 1 мл нерозведеної вірусомісної суспензії.

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

Титрування вірусів за гемаглютинувальною активністю

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

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

Постановка РГА

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

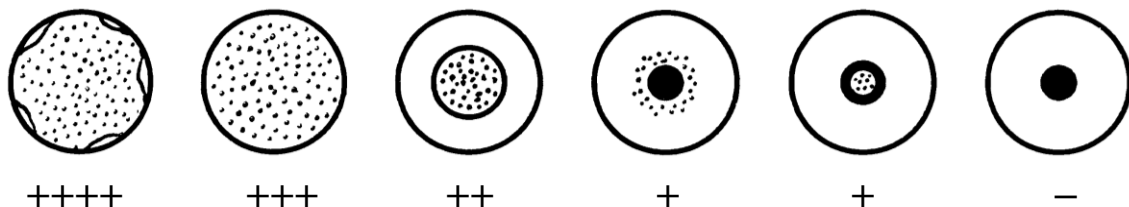


Рис. 20. Оцінка результатів РГА

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

Т е м а 8

Серологічні реакції

Кількість годин: 6

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

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

Дата: _____

Теоретичне обґрунтування теми

Загальні принципи серологічних реакцій

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

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

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

донорів, а *нормальні сироватки* беруть від здорових тварин. На кожний набір діагностикумів затверджена настанова щодо його практичного використання.

Під час дослідження сироваток крові треба врахувати наявність у них *вірусних інгібіторів* – протеїнів, що, як і антитіла, здатні нейтралізувати інфекційну та гемаглютинувальну активність вірусів, імітуючи таким способом позитивний результат серологічної реакції, що може призвести до діагностичної помилки. Тому перед постановкою серологічних реакцій сироватки інактивують за 56–60°C упродовж 30 хв.

Реакція нейтралізації (РН)

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

Виявлення антитіл у РН

Компоненти реакції:

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

Постановка РН

1. Визначення робочої дози вірусу

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

2. Основний дослід РН

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

б) До кожного розведення сироватки додають по 0,5 мл вірусу в робочій дозі 100 або 1000 ЕД₅₀ на 1 тест-об'єкт.

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

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

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

е) Розраховують за методом Ріда і Менча розведення сироватки, яке захищає 50% тест-об'єктів від інфекційної дії вірусу в робочій дозі 100 або 1000 ЕД₅₀ на 1 тест-об'єкт. Це розведення сироватки є показником *титру вірусонейтралізувальних антитіл*.

є) Одночасно ставлять *контролі*:

– контроль вірусу на інфекційну активність (вірус у робочій дозі 100 або 1000 ЕД₅₀ на 1 тест-об'єкт розводять у 2 рази і заражають 4 тест-об'єкти);

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

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

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

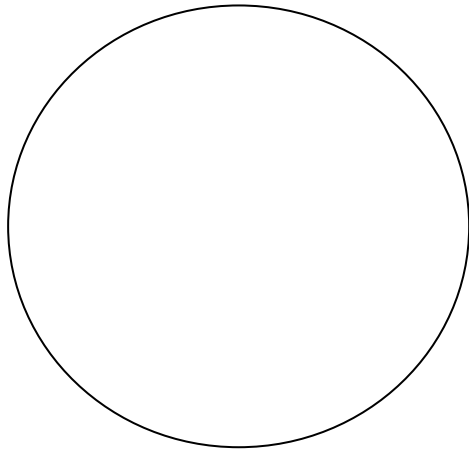
Цю методику постановки РН можна застосовувати і для *ідентифікації виділеного вірусу*. Для цього до дворазових розведень специфічної та нормальної сироваток додають такий самий об'єм досліджуваного вірусу в робочій дозі 100 або 1000 ЕД₅₀ на один тест-об'єкт і після контакту заражають чутливі тест-об'єкти. Вірус вважається ідентифікованим, якщо специфічна сироватка нейтралізує інфекційну активність досліджуваного збудника до її титру за умови прояву інфекційного ефекту в присутності нормальної сироватки.

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

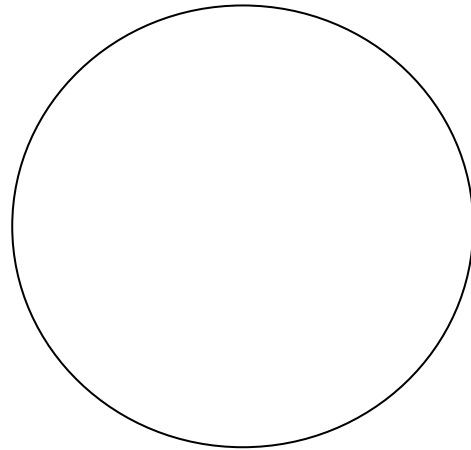
Самостійна робота. Оцінити результати РН на основі перегляду фіксованих препаратів із культурою клітин. Зробити рисунки.

Результат: _____

Результат РН у культурі клітин



Позитивна реакція



Негативна реакція

Теоретичне обґрунтування теми

Реакція гальмування гемаглютинації (РГГА)

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

Виявлення антитіл у РГГА

Компоненти реакції:

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

Постановка РГГА

1. Визначення робочої дози вірусу

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

2. Контроль робочої дози вірусу 4 ГАО

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

3. Основний дослід РГГА

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

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

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

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

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

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

є) Одночасно ставлять *контролі*:

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

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

– контроль специфічності (постановка основного дослідження РГГА зі специфічною та нормальною сироватками).

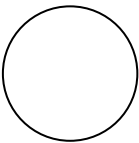
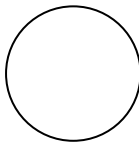
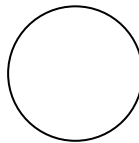
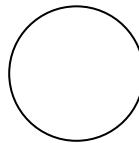
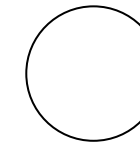
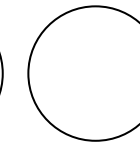
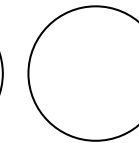
Цю методику використовують і для *ідентифікації вірусів*. Для цього до дворазових розведень специфічної та нормальної сироваток додають рівний об'єм досліджуваного вірусу в робочій дозі 4 ГАО і після контакту – 1%-ву суспензію еритроцитів. Вірус вважається ідентифікованим, якщо специфічна сироватка гальмує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

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

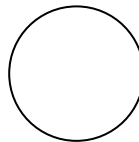
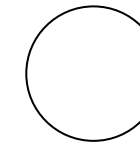
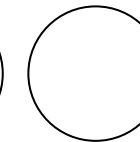
Самостійна робота. Відпрацювати методику постановки РГГА. Провести облік та інтерпретацію результатів реакції. Зробити рисунки.

Результат: _____

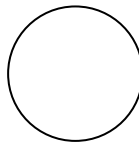
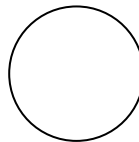
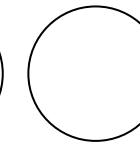
Результат РГГА
Досліджувана сироватка

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

Специфічна сироватка

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

Нормальна сироватка

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

Теоретичне обґрунтування теми

Реакція непрямой гемаглютинації (РНГА)

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

Виявлення антитіл у РНГА

Компоненти реакції:

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

Приготування еритроцитарного антигену включає такі етапи:

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

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

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

Постановка РНГА

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

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

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

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

5. Одночасно ставлять *контролі*:

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

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

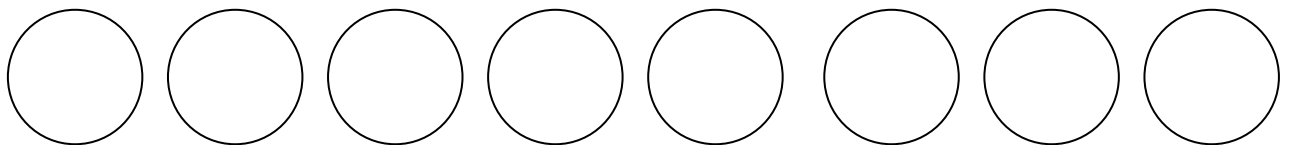
Цю методику використовують і для *ідентифікації вірусів* (збудників ящуру, хвороби Ауескі, класичної чуми свиней, вірусного гепатиту каченят, лейкозу птиці) за допомогою *антитільних еритроцитарних діагностикумів*, які представляють собою еритроцити, сенсibiliзовані антитілами.

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

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

Результат: _____

Результат РНГА
Досліджувана сироватка



1:10

1:20

1:40

1:80

1:160

1:320

1:640

Контроль
еритроцит.
антигену

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

Оцінка реакції в плюсах

Титр антитіл _____

Ідентифікація вірусу в РГГАд

Компоненти реакції:

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

Постановка РГГАд

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

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

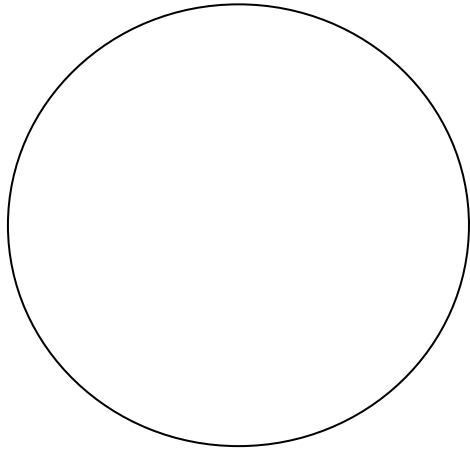
3. У всі пробірки вносять по 0,2 мл 0,5%-ї суспензії еритроцитів (у лунки мікропланшетів – по 0,05 мл), витримують 10–15 хв за кімнатної температури або 30–40 хв за 4°C, злегка струшують і розглядають під малим збільшенням мікроскопа.

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

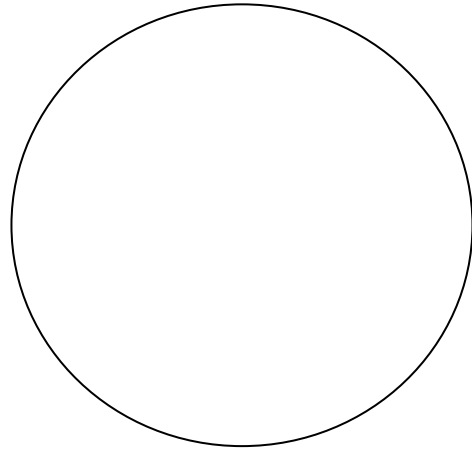
Самостійна робота. Оцінити результати РГГАд на основі перегляду фіксованих препаратів із культурою клітин. Зробити рисунки.

Результат: _____

Результат РГГАд



Позитивна реакція



Негативна реакція

Теоретичне обґрунтування теми

Реакція дифузійної преципітації (РДП)

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

Компоненти РДП:

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

Постановка РДП

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

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

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

4. Реакція вважається позитивною, якщо в агарі між лунками з досліджуваними вірусомісними суспензіями (досліджуваними сироватками) і специфічною сироваткою (специфічним вірусним антигеном) утворюються *білі лінії преципітації*. За ретроспективної

діагностики за *титр антитіл* приймають найвище розведення сироватки, яке спричинює утворення ліній преципітації.

5. Одночасно ставлять *контролі*:

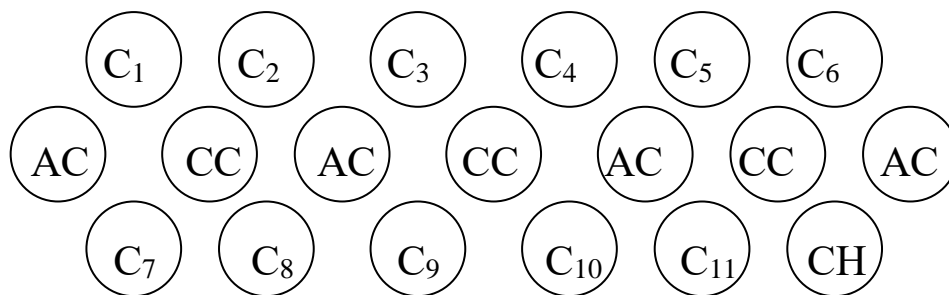
- специфічна сироватка + специфічний антиген;
- специфічна сироватка + нормальний антиген (за ідентифікації вірусу);
- нормальна сироватка + специфічний антиген (за виявлення антитіл).

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

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

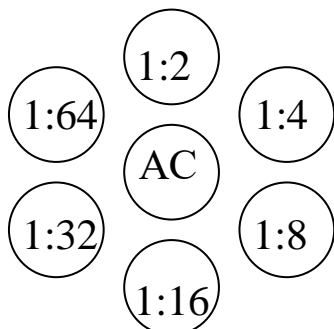
Результат: _____

Результат РДП
Виявлення антитіл



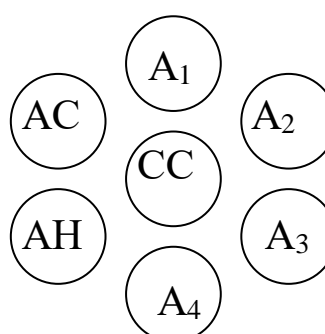
Позитивний результат _____

Титрування антитіл



Титр антитіл _____

Ідентифікація вірусу



Позитивний результат _____

Умовні позначення: С₁–С₁₁ – досліджувані сироватки; А₁–А₄ – досліджувані антигени; СС – специфічна сироватка; СН – нормальна сироватка; АС – специфічний антиген; АН – нормальний антиген; 1:2–1:64 – розведення досліджуваної сироватки.

Теоретичне обґрунтування теми

Реакція зв'язування комплементу (РЗК)

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

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

У РЗК беруть участь *2 системи антиген–антитіло*: специфічна (вірусологічна) та гемолітична. До *специфічної системи* належать вірусні антигени та сироватки з гомологічними антитілами, а до *гемолітичної* – гемолізін та еритроцити барана. *Гемолізін* – це сироватка крові кроля, імунізованого еритроцитами барана; містить антитіла до еритроцитів барана. *Комплемент* – це складний комплекс протеїнів, присутніх у нормальній сироватці крові людини і тварин. Як комплемент використовують сироватку крові мурчака, що випускають на біофабриках у ліофілізованому вигляді. Комплемент має властивість приєднуватися до будь-якого комплексу антиген–антитіло. Це призводить до його активації з утворенням біологічно активних речовин, які спричинюють лізис антигену. Зокрема, в присутності гемолітичної сироватки комплемент зумовлює лізис еритроцитів барана (гемоліз).

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

РЗК ставиться в кілька *етапів*: 1) титрування гемолізіну; 2) титрування комплементу; 3) основний дослід. Для отримання вірогідних результатів РЗК обов'язково необхідно визначити оптимальну концентрацію всіх відомих її компонентів. Так, за

надлишку комплекменту відбувається його зв'язування і з комплексом антиген–антитіло (якщо він утворився), і з гемолітичною системою, внаслідок чого може виникнути гемоліз і буде поставлений неправильний діагноз. Недостача комплекменту зумовить затримку гемолізу в разі взаємодії його з гемолітичною системою і теж призведе до діагностичної помилки.

Постановка РЗК для виявлення антитіл

Компоненти реакції:

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

1. Титрування гемолізину

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

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

в) Витримують у термостаті за 37°C 10 хв.

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

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

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

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

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

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

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

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

2. Титрування комплементу

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

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

в) Витримують у термостаті за 37°C 30 хв.

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

д) Для основного дослідження беруть комплемент у подвійному титрі й уточнюють його робочу дозу шляхом титрування в присутності антигенів і сироваток, які мають різний ступінь антикомплементації¹.

3. Основний дослід РЗК

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

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

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

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

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

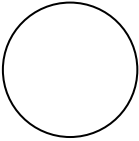
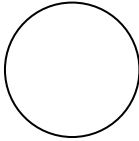
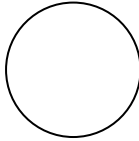
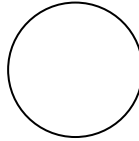
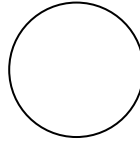
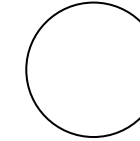
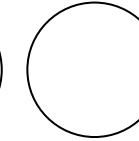
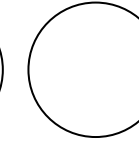
е) За наявності в досліджуваній сироватці антитіл буде затримка гемолізу (на 2–4 плюси), а за їхньої відсутності спостерігається повний гемоліз. За *титр антитіл* приймають найвище розведення сироватки, яке спричинює затримку гемолізу не менше ніж на 2 плюси.

є) Одночасно ставлять *контролі*:

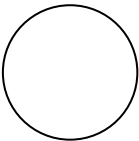
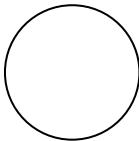
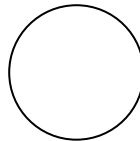
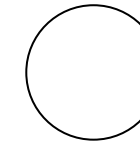
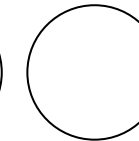
– контроль специфічності (постановка основного дослідження РЗК із специфічною та нормальною сироватками, досліджуваною сироваткою та нормальним антигеном);

* *Антикомплементація* – це здатність вірусних антигенів і сироваток адсорбувати комплемент за відсутності гомологічних імунних компонентів.

Результат РЗК
Досліджувана сироватка

							
1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280
Розведення сироватки							
.....
Оцінка реакції в плюсах							
Титр антитіл _____							

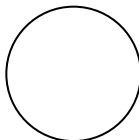
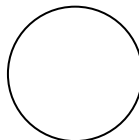
Специфічна сироватка

							
1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280
Розведення сироватки							
.....
Оцінка реакції в плюсах							
Титр антитіл _____							

Нормальна сироватка

							
1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280
Розведення сироватки							
.....
Оцінка реакції в плюсах							
Титр антитіл _____							

Контроль гемолітичної системи

	
з КОМПЛЕМЕНТОМ	без КОМПЛЕМЕНТУ

Дата: _____

Теоретичне обґрунтування теми Реакція імунофлуоресценції (РІФ)

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

РІФ ставиться *2 методами*: прямим і непрямим.

Прямий метод РІФ

Компоненти реакції:

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

Постановка реакції

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

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

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

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

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

+++ – яскраве світіння зеленого кольору;

++ – слабе світіння жовто-зеленого кольору;

+ – дуже слабе світіння невизначеного кольору;

– – відсутність флуоресценції.

6. Реакція вважається позитивною, якщо в препараті в 3 полях зору виявляється не менше як по 3–5 уражених вірусом клітин, що флуоресціюють яскраво-зеленим кольором на 3–4 плюси (внаслідок

утворення комплексів антиген–антитіло). Флуоресценція буває дифузною та гранулярною залежно від виду вірусу і стадії його накопичення в клітині (рис. 21).

7. Одночасно ставлять *контролі*:

- незаражені клітини, оброблені флуоресціювальною специфічною сироваткою;
- заражені клітини, оброблені флуоресціювальною нормальною сироваткою;
- заражені клітини, оброблені спочатку неміченою специфічною сироваткою, а потім – флуоресціювальною специфічною сироваткою;
- заражені клітини, оброблені спочатку неміченою нормальною сироваткою, а потім – флуоресціювальною специфічною сироваткою.

Непрямий метод РІФ (РНІФ)

Компоненти реакції:

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

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

Постановка реакції

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

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

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

4. Одночасно ставлять *контролі*:

- незаражені клітини, оброблені флуоресціювальною антивидовою сироваткою;
- заражені клітини, оброблені флуоресціювальною антивидовою сироваткою;

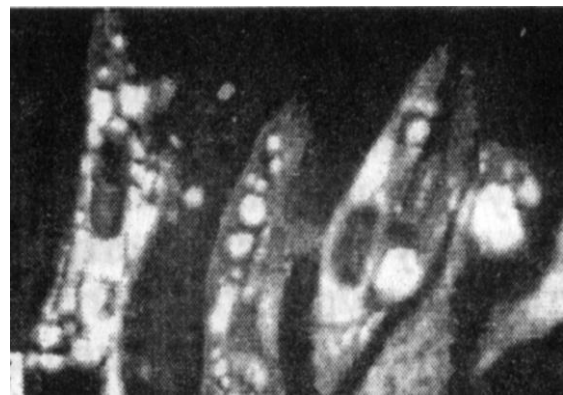
– заражені клітини, оброблені спочатку нормальною сироваткою, а потім – флуоресціювальною антивидовою сироваткою;

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

Непрямий метод РІФ має *переваги*. Він потребує лише однієї флуоресціювальної сироватки – антивидової, за допомогою якої можна виявити антигени різних вірусів (за умови, що специфічні сироватки до цих вірусів отримані шляхом імунізації тварин одного виду). Окрім того, РНІФ використовується не тільки для ідентифікації вірусу, а й для *виявлення антитіл*. Для цього на фіксовані препарати з культури клітин, зараженої відомим вірусом, наносять спочатку дворазові розведення досліджуваної сироватки (від 1:10 до 1:1280), а після контакту – флуоресціювальну антивидову сироватку. Специфічні антитіла в досліджуваних сироватках виявляють за яскраво-зеленим світінням вірусного антигену в заражених клітинах. За *титр антитіл* приймають найвище розведення сироватки, за якого спостерігається чітка флуоресценція гомологічного антигену.



а



б

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

РІФ характеризується високою чутливістю, специфічністю та швидким отриманням результатів. Особливо цінна ця реакція для ідентифікації тих вірусів, які не мають цитопатогенних, гемаглютинувальних та гемадсорбтивних властивостей. РІФ дає можливість вивчити процеси взаємодії вірусів із клітинами, дослідити динаміку накопичення вірусних антигенів у клітинах, антигенні зв'язки вірусів, а також патогенез вірусних інфекцій. Особливо важливе значення цього методу в разі дослідження змішаних і хронічних інфекцій. Недолік РІФ – випадки неспецифічної

флуоресценції, яку можуть спричинити нормальні антитіла специфічних сироваток, фіксація мічених антитіл на лейкоцитах тощо.

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

Результат: _____

Теоретичне обґрунтування теми

Імуноферментний аналіз (ІФА)

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

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

Імунопероксидазна реакція

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

Реакцію ставлять *прямим і непрямим методами*.

За *прямого імунопероксидазного методу* на фіксовані в ацетоні препарати наносять імунопероксидазний кон'югат (1–2 год у вологій камері за 37°C), промивають 0,9%-м розчином NaCl (15 хв) і дистильованою водою, наносять бензидиновий субстрат (5–10 хв у вологій камері за кімнатної температури), знову промивають і розглядають у світловому мікроскопі під імерсійною олією. Реакція

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

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

Методи твердофазного ІФА

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

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

підвищення оптичної густини досліджуваних проб над контрольними в 5–10 разів. Тривалість проведення дослідження – 2,5–3 год.

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

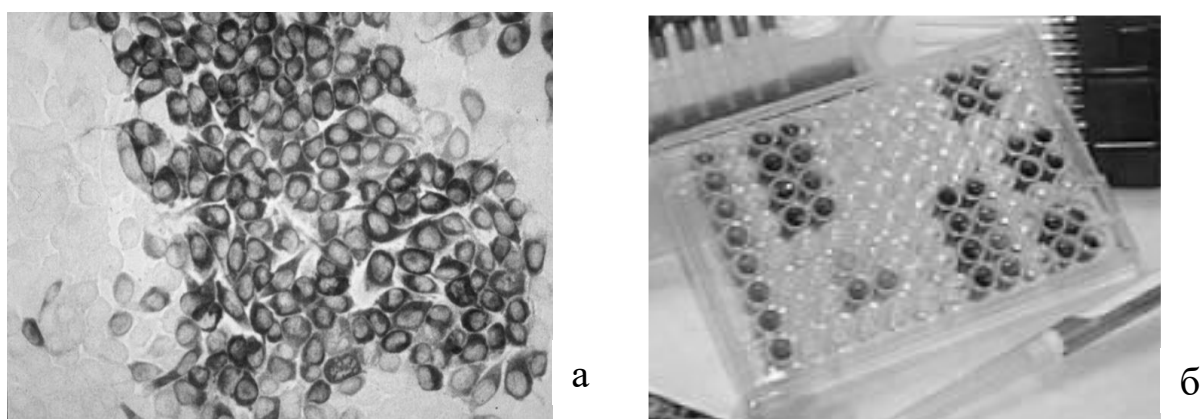


Рис. 22. Імунопероксидазний (а) і твердофазний (б) методи ІФА

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

Результат: _____

Контрольні запитання

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

Т е м а 9

Лабораторна діагностика вірусних хвороб тварин

Кількість годин: 10

Мета занять. Засвоїти постановку попереднього діагнозу на основі аналізу клініко-епізоотологічних даних хвороби і патологоанатомічних змін. Вивчити перелік патматеріалу, який відбирається від хворих і загинувих тварин для лабораторної діагностики вірусних інфекцій. Уміти скласти план лабораторного дослідження за підозри конкретної вірусної хвороби. Знати методи швидкої індикації збудника безпосередньо в патматеріалі, ізоляції його на чутливих тест-об'єктах та методи серологічної ідентифікації вірусу і специфічних антитіл. Уміти грамотно проаналізувати отримані результати лабораторного дослідження.

Матеріальне забезпечення. Досліджуваний вірусовмісний матеріал, досліджувані сироватки крові, біофабричні набори діагностикумів, фарфорові ступки, чашки Петрі, пробірки, піпетки, предметні скельця, гумові груші, спирт, спиртівка, стерилізатор зі стерильними інструментами, 0,9%-й розчин NaCl, дезрозчин, планшети для серологічних реакцій, суспензія еритроцитів (для РГГА і РЗК), 1–2%-й агар (для РДП), фіксовані препарати з культурою клітин (незараженою, з ЦПД і гемадсорбцією), фотографії РІФ, ІФА та ЕМ, препарати з тільцями Бабеша–Негрі та віріонами вірусу віспи курей, демонстрація результатів РГГА, РНГА, РЗК, РДП та ІФА, світлові мікроскопи.

Дата: _____

Теоретичне обґрунтування теми

Сказ – це зоонозне інфекційне захворювання всіх видів теплокровних тварин із гострим перебігом, яке характеризується ураженням ЦНС (негнійним енцефаломієлітом), проявляється збудженням, агресивністю, слинотечею, судомами, парезами, паралічами і закінчується загибеллю. Найбільш чутливі лисиці, вовки, шакали, гризуни, коти і ВРХ. Зараження відбувається контактним шляхом через укуси, за ослинення пошкодженої шкіри. Можливі аліментарний та аерогенний шляхи зараження.

Збудник – *Lissavirus rabies* – належить до родини *Rhabdoviridae*, роду *Lissavirus*. Віріони кулеподібної форми, завдовжки 180 нм, діаметром 75–80 нм. *Структура віріона*: суперкапсид, спіральний нуклеокапсид (серцевина), 1-ланцюгова РНК (мінус-нитка), 5 протеїнів, у т. ч. транскриптаза, М-протеїн. Вірус має 4 серотипи, проявляє гемаглютинувальні властивості тільки за низької температури (0–4°C), є нейтропним.

Патматеріал: після загибелі – голова з двома шийними хребцями від великих і середніх тварин, трупи дрібних тварин (головний і спинний мозок).

Лабораторна діагностика

1. Експрес-методи: виявлення вірусного антигену в РІФ, ІФА, РДП; ; виявлення цитоплазматичних тілець-включень Бабеша–Негрі; виявлення вірусного геному в ПЛР.

2. Вірусологічні методи. Ізоляція та індикація вірусу:

1) Біопроба на 6–10 білих мишенятах віком 3–5 тижнів, зараження і/ц. Строк спостереження – 30 діб. Через 7–10 діб клінічні ознаки: скуйовдження шерсті, горбатість спини, порушення координації рухів, параліч кінцівок. Тварини гинуть.

2) Перещеплювана культура клітин нейробластоми мишей КЛ-1300 або невриноми Гасерового вузла пацюків. ЦПД не проявляється.

Ідентифікація вірусу: РІФ.

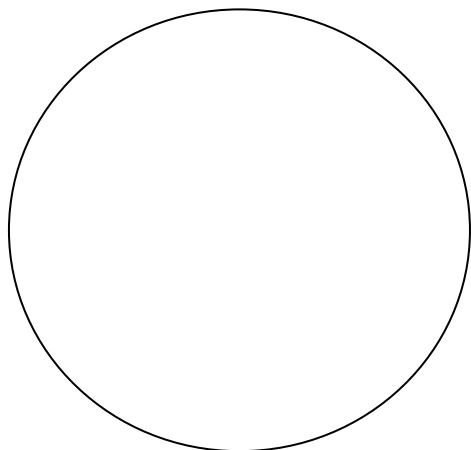
3. Серологічна діагностика: не проводиться.

Диференціальна діагностика: хвороба Ауескі, чума м'ясоїдних (нервова форма), східний, західний і венесуельський енцефаломієліти коней.

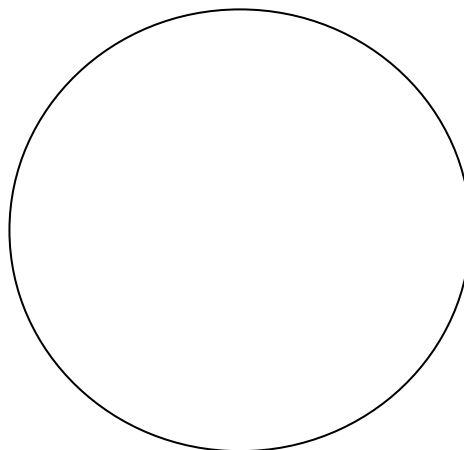
Самостійна робота. Вивчити основні клінічні ознаки хвороби і патологоанатомічні зміни. Зробити рисунки.

Результат:

Структура віріона



Тільця Бабеша–Негрі



Теоретичне обґрунтування теми

Хвороба Ауєскі – це інфекційне захворювання всіх видів свійських і диких ссавців із гострим перебігом, яке характеризується ураженням ЦНС (негнійним менінгоенцефаломієлітом) та проявляється збудженням, судомами, паралічами, а також сильним свербінням у всіх тварин, окрім свиней, норок і соболів. У свиней спостерігаються також симптоми септицемії та ураження органів дихання. У супоросних свиноматок вірус спричинює аборти, муміфікацію плоду і мертвонародження. Найчастіше хворіють свині, собаки, коти і гризуни, а також велика і дрібна рогата худоба та хутрові звірі. Зараження відбувається аерогенно, аліментарно, контактним шляхом через пошкоджену шкіру і слизові оболонки, лактогенно та внутрішньоутробно. Захворюваність серед поросят досягає 70–100%, летальність – 80–100%. Тварини інших видів незалежно від віку гинуть.

Збудник – *Varicellovirus suisalpha1* – належить до родини *Orthoherpesviridae*, роду *Varicellovirus*. Віріони сферичної форми, діаметром 150–180 нм. *Структура віріона*: суперкапсид, тегумент (мембрана з глобулярних протеїнів), ікосаедральний капсид (162 капсомери), серцевина, 2-ланцюгова ДНК, понад 20 протеїнів. Вірус має 1 серотип, є нейротропним, а в організмі свиней проявляє пантропність.

Патматеріал: *за життя* – носовий слиз, абортований плід, плацента; *після загибелі* – головний мозок, легені, печінка, селезінка, мигдалини, лімфовузли. Для *серологічного дослідження* – парні сироватки крові.

Лабораторна діагностика

1. Експрес-методи: виявлення вірусного антигену в РІФ, РНГА, ІФА; виявлення вірусного геному в ПЛР.

2. Вірусологічні методи. *Ізоляція та індикація вірусу:*

1) Первинні культури клітин нирок або щитоподібної залози поросят, сім'яників телят, фібробластів курячого ембріона, перещеплювані лінії РК-15 і ВНК-21. Через 4–5 діб ЦПД: округлення клітин, симпласти.

2) Біопроба на кролях, зараження п/ш або в/м. Через 2–3 доби клінічні ознаки: збудження, свербіння, розчухи, паралічі. Через 4–8 год загибель.

Ідентифікація вірусу: РН, РІФ, РНГА, РДП, ІФА.

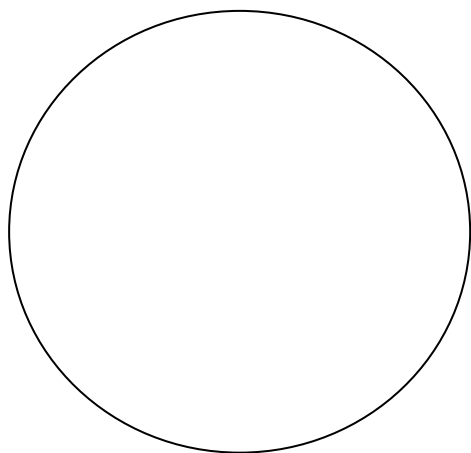
3. Ретроспективна діагностика: виявлення антитіл у РН, РНГА, РЗК, РДП, РАЛ, ІФА.

Диференціальна діагностика: у свиней: сказ, класична чума, грип, хвороба Тешена, сальмонельоз, ешерихіоз (набрякова хвороба), лістеріоз, стрептококоз, сольові отруєння, гіпоглікемія, аскаридоз, авітамінози А і Д; у великої та дрібної рогатої худоби: сказ, лістеріоз, ценуроз, кормові отруєння; у коней: сказ, східний, західний і венесуельський енцефаломієліти, кормові отруєння; у хутрових звірів: чума м'ясоїдних (нервова форма), ензоотичний енцефаломієліт лисиць; у собак: сказ, чума м'ясоїдних (нервова форма); у котів: сказ.

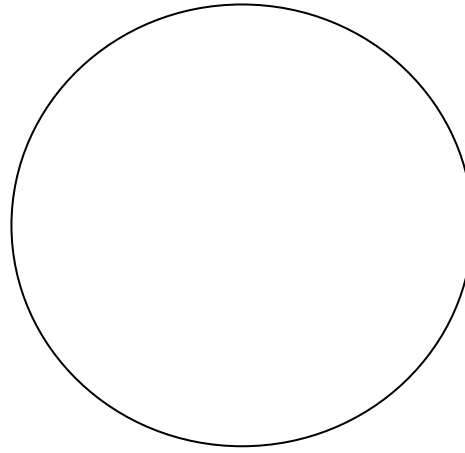
Самостійна робота. Вивчити основні клінічні ознаки хвороби і патологоанатомічні зміни. Зробити рисунки.

Результат:

Структура віріона



ЦПД вірусу



Теоретичне обґрунтування теми

Ящур – це висококонтагіозне інфекційне захворювання парнокопитних із гострим перебігом, яке характеризується афтозно-ерозійним ураженням слизової оболонки ротової порожнини і безшерстих ділянок шкіри (вимені, вінчика та міжкопитної щілини). Хвороба протікає у вигляді епізоотій, іноді – панзоотій. Найбільш чутливі ВРХ і свині. Смертність у ВРХ невисока (0,2–0,5%). Іноді заражається людина за споживання інфікованого молока. У тільних корів вірус спричинює аборти, мертвонародження, післяродові ускладнення. У молодняка ящур протікає злоякісно з ураженням міокарда («тигрове серце»), скелетних м'язів, геморагічним гастроентеритом і високою летальністю (30–100%). Зараження відбувається контактним шляхом через слизову оболонку ротової

порожнини, пошкоджену шкіру вимені та кінцівок, а також аерогенно і внутрішньоутробно.

Збудник – *Aphthovirus vesiculae* – належить до родини *Picornaviridae*, роду *Aphthovirus*. Віріони сферичної форми, діаметром 23–25 нм. *Структура віріона*: ікосаедральний капсид (60 структурних одиниць), 1-ланцюгова РНК (плюс-нитка), 4 протеїни. Є 7 серотипів збудника – А, О, С, Сат-1, Сат-2, Сат-3, Азія-1, які поділяються на 64 варіанти (або підтипи). Вірус епітеліотропний.

Патматеріал: *за життя* – стінки і вміст афт, за відсутності атф – кров у період підвищення температури, для дослідження на вірусноносійство – зскрібки зі слизової оболонки глотки і стравоходу; *після загибелі* – від молодняка: лімфовузли голови і заглоткового кільця, підшлункова залоза, серцевий м'яз. Для *серологічного дослідження* – парні сироватки крові.

Лабораторна діагностика

1. Експрес-методи: виявлення вірусного антигену в РЗК, РДП, РНГА, ІФА; виявлення вірусного геному в ПЛР.

2. Вірусологічні методи. *Ізоляція та індикація вірусу:*

1) Біопроба на 4–6-денних білих мишенятах, зараження п/ш або в/ч. Через 2–5 діб парези і паралічі, загибель. За розтину виявляють некроз скелетних м'язів і міокарда.

2) Біопроба на мурчаках, зараження в/ш у плантарну поверхню задніх кінцівок. Через 2–5 діб поява афт на лапках і слизовій оболонці ротової порожнини.

3) Первинні культури клітин нирок телят, поросят або ягнят, перещеплювана лінія ВНК-21. Через 24 год ЦПД: округлення і фрагментація клітин.

Ідентифікація вірусу: РЗК, РНГА, ІФА.

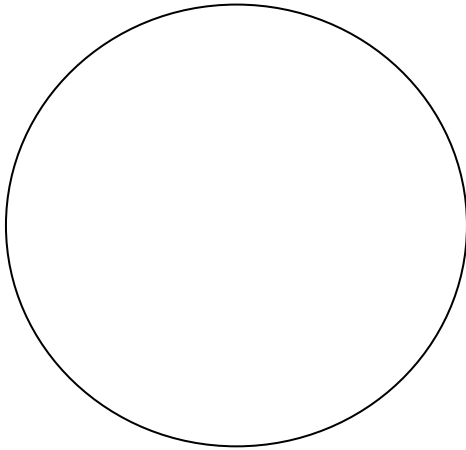
3. Ретроспективна діагностика: виявлення антитіл у РЗК, РНГА, РН, РРІД, РНІФ.

Диференціальна діагностика: везикулярний стоматит, віспа, злаякісна катаральна гарячка, чума ВРХ, вірусна діарея ВРХ, контагіозна ектима овець і кіз, блутанг, везикулярна хвороба свиней, везикулярна екзантема свиней, некробактеріоз, копитна гниль.

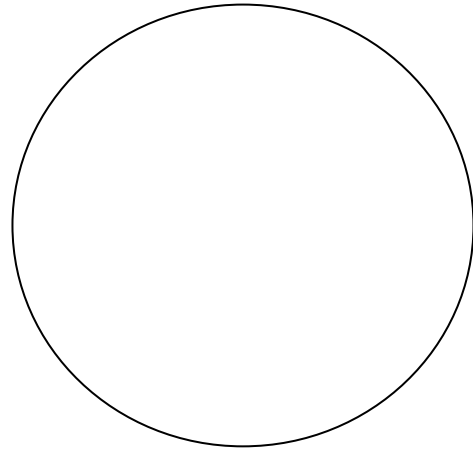
Самостійна робота. Вивчити основні клінічні ознаки хвороби і патологоанатомічні зміни. Зробити рисунки.

Результат:

Структура віріона



ЦПД вірусу



Дата: _____

Теоретичне обґрунтування теми

Парагрип ВРХ – це контагіозне інфекційне захворювання з гострим перебігом, яке характеризується гарячкою, катаральним запаленням слизових оболонок верхніх дихальних шляхів, а за ускладнень – бронхопневмонією та плевритом. Хворіє в основному молодняк віком від 10 днів до року. У тільних корів можливі аборти і народження нежиттєздатних телят. Зараження відбувається аерогенним та аліментарним шляхами, а також внутрішньоутробно. Захворюваність становить 70–100%, летальність – 2–20%.

Збудник – *Respirovirus bovis* – належить до родини *Paramyxoviridae*, роду *Respirovirus*. Віріони плеоморфні, найчастіше сферичної форми, діаметром 150–300 нм. *Структура віріона*: суперкапсид, спіральний нуклеокапсид (серцевина), 1-ланцюгова РНК (мінус-нитка), 6 протеїнів, у т. ч. транскриптаза, нейранідаза, М-протеїн. Вірус має 1 серотип, є гемаглютинувальним і пневмотропним.

Патматеріал: *за життя* – змиви з носової порожнини; *після загибелі* – слизова оболонка носа, трахея, бронхи, легені, бронхіальні та середостінні лімфовузли. Для *серологічного дослідження* – парні сироватки крові.

Лабораторна діагностика

1. Експрес-методи: виявлення вірусного антигену в РІФ, ІФА; виявлення вірусного геному в ПЛР.

2. Вірусологічні методи (ізоляція, індикація та ідентифікація вірусу):

1) Первинні культури клітин нирок або легень ембріона корови, нирок або сім'яників телят. Через 2–3 доби ЦПД: округлення клітин, синцитії. Ставлять РГАд і РГА (з еритроцитами мурчака). Ідентифікують вірус у РГГАд, РГГА, РН, РІФ, ІФА.

2) Курячі ембріони віком 6–10 днів, зараження в амніотичну порожнину. Ембріони не гинуть. Індикацію вірусу проводять у РГА, ідентифікацію – в РГГА.

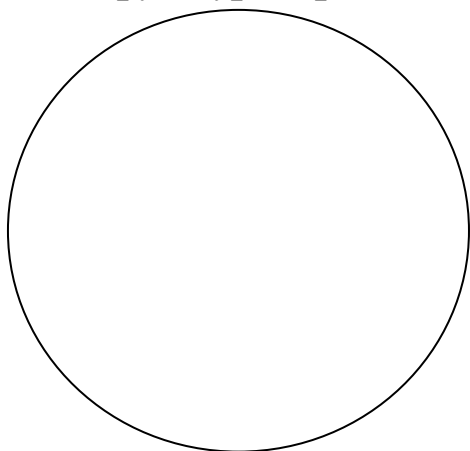
3. Ретроспективна діагностика: виявлення антитіл у РГГА, РН, РНГА, ІФА.

Диференціальна діагностика: інфекційний ринотрахеїт ВРХ, вірусна діарея ВРХ, аденовірусна інфекція ВРХ, респіраторно-синцитіальна інфекція ВРХ, мікоплазмоз, хламідіоз.

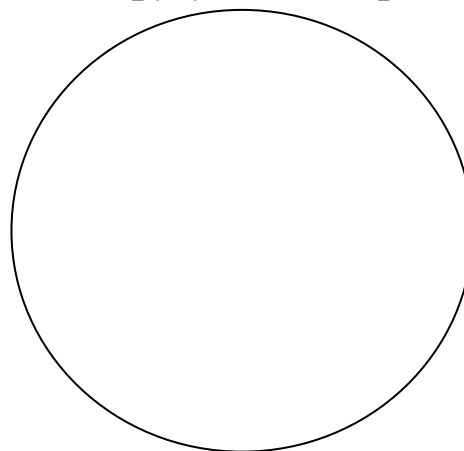
Самостійна робота. Вивчити основні клінічні ознаки хвороби і патологоанатомічні зміни. Зробити рисунки.

Результат:

Структура віріона



ЦПД вірусу, гемадсорбція



Теоретичне обґрунтування теми

Інфекційний ринотрахеїт ВРХ (інфекційний пустульозний вульвовагініт ВРХ) – це контагіозне інфекційне захворювання з гострим перебігом, яке характеризується гарячкою, катарально-некротичним запаленням слизових оболонок верхніх дихальних шляхів, кератокон'юнктивітом, ураженням статевих органів і ЦНС, абортми. У телят раннього віку, крім дихальних шляхів, уражається шлунково-кишковий тракт. Зараження відбувається аерогенним, статевим, внутрішньоутробним, аліментарним і трансмісивним шляхами. Хворіють тварини всіх вікових груп, найважче –

відгодівельний молодняк віком до 2 років, особливо м'ясних порід. Захворюваність при цьому досягає 80–90%, летальність – 10–20%, а за ускладнень – 30–35%.

Збудник – *Varicellovirus bovinealpha1* – належить до родини *Orthoherpesviridae*, роду *Varicellovirus*. Віріони сферичної форми, діаметром 120–200 нм. *Структура віріона*: суперкапсид, тегумент (мембрана з глобулярних протеїнів), ікосаедральний капсид (162 капсомери), серцевина, 2-ланцюгова ДНК, понад 20 протеїнів. Вірус має 1 серотип, який поділяється на 2 підтипи. Гемаглютинувальні властивості проявляються тільки після концентрації вірусу ПЕГ-6000 або ультрацентрифугуванням. Вірус політропний. Особливо виражений тропізм збудник проявляє до епітеліальних клітин слизових оболонок верхніх дихальних шляхів і статевих органів.

Патматеріал: *за життя* – кров, змиви з носової порожнини, кон'юнктиви, вагіни і препуція, сперма, абортований плід; *після загибелі* – слизові оболонки носа, рота, передшлунків, тонкого кишечника, легені, трахея, бронхи, лімфовузли (бронхіальні, середостінні, брижові), мигдалини, селезінка, головний мозок (за менінгоенцефаліту). Для *серологічного дослідження* – парні сироватки крові.

Лабораторна діагностика

1. Експрес-методи: виявлення вірусного антигену в РІФ, ІФА; виявлення вірусного геному методом ДНК-зондів, у ПЛР; виявлення внутрішньоядерних тілець-включень.

2. Вірусологічні методи. Ізоляція та індикація вірусу:

Первинні культури клітин нирок ембріона корови, нирок або сім'яників телят, перещеплювана лінія MDBK. Через 2–4 доби ЦПД: округлення клітин, симпласти. Ставлять РГА (з еритроцитами миші).

Ідентифікація вірусу: РН, РІФ, РГГА, ІФА.

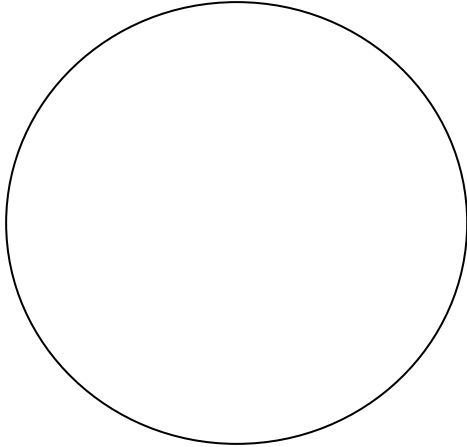
3. Ретроспективна діагностика: виявлення антитіл у РН, РНГА, ІФА.

Диференціальна діагностика: парагрип ВРХ, вірусна діарея ВРХ, аденовірусна інфекція ВРХ, респіраторно-синцитіальна інфекція ВРХ, злоякісна катаральна гарячка, ящур, хламідіоз.

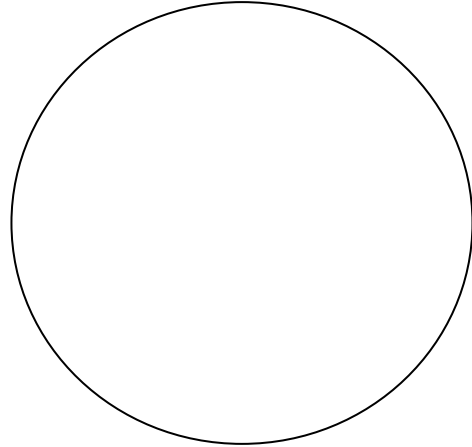
Самостійна робота. Вивчити основні клінічні ознаки хвороби і патологоанатомічні зміни. Зробити рисунки.

Результат:

Структура віріона



ЦПД вірусу



Теоретичне обґрунтування теми

Вірусна діарея ВРХ (хвороба слизових оболонок ВРХ) – це контагіозне інфекційне захворювання з гострим перебігом, яке характеризується гарячкою, ерозійно-виразковим запаленням слизових оболонок шлунково-кишкового тракту, діареєю, ураженням органів дихання, лейкопенією. У тільних корів можливі аборти та аномалії розвитку плоду. Хворіють тварини всіх вікових груп, найбільш сприйнятливий молодняк віком від 2 міс до 2 років. Зараження відбувається аліментарним, аерогенним, статевим, внутрішньоутробним, перинатальним і лактогенним шляхами. Захворюваність коливається в широких межах – від 2 до 100%, летальність у середньому 4–10%, але може досягати 40–70%. Окрім ВРХ, у природних умовах можуть хворіти дикі парнокопитні (буйволи, олені, лосі, лані, косулі, антилопи).

Збудник – *Pestivirus bovis*, *Pestivirus tauri*, *Pestivirus brasiliense* (3 види) – належить до родини *Flaviviridae*, роду *Pestivirus*. Віріони сферичної форми, діаметром 30–50 нм. *Структура віріона*: суперкапсид; ікосаедральний нуклеокапсид, 1-ланцюгова РНК (плюс-нитка), 4 протеїни. Вірус має 1 серотип і є політропним: проявляє тропізм до епітеліальних клітин слизових оболонок травного і респіраторного трактів, а також до лімфоїдної тканини.

Патматеріал: *за життя* – кров, кал, молоко, сперма, змиви з носової порожнини, зскрібки зі слизових оболонок рота і носового дзеркала, абортований плід, плацента, амніотична рідина; *після загибелі* – слизові оболонки носа, рота, передшлунків, тонкого кишечника, легені, трахея, бронхи, селезінка, нирки, мигдалини,

лімфовузли (бронхіальні, середостінні, брижові). Для *серологічного дослідження* – парні сироватки крові.

Лабораторна діагностика

1. Експрес-методи: виявлення вірусного антигену в РІФ, ІФА; виявлення вірусного геному методом ДНК-зондів, у ПЛР.

2. Вірусологічні методи. *Ізоляція та індикація вірусу:*

Первинні культури клітин нирок, легень або селезінки ембріона корови, сім'яників телят. Через 2–5 діб ЦПД: округлення клітин.

Ідентифікація вірусу: РН, РІФ, РДП, ІФА.

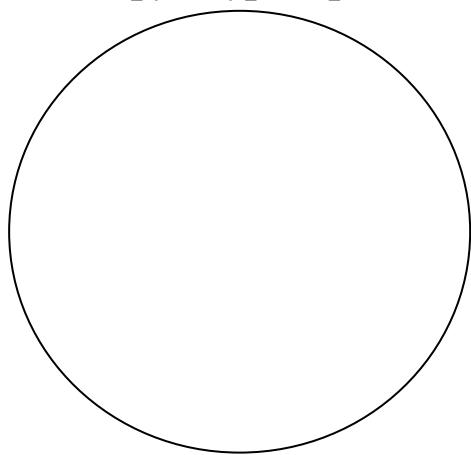
3. Ретроспективна діагностика: виявлення антитіл у РН, РНГА, ІФА.

Диференціальна діагностика: інфекційний ринотрахеїт ВРХ, аденовірусна інфекція ВРХ, респіраторно-синцитіальна інфекція ВРХ, парагрип ВРХ, чума ВРХ, злоякісна катаральна гарячка, ящур, хламідіоз, паратуберкульоз.

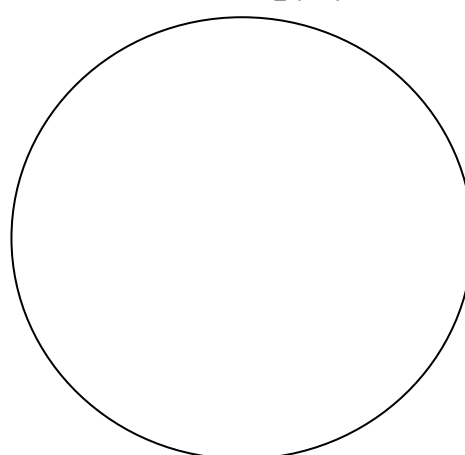
Самостійна робота. Вивчити основні клінічні ознаки хвороби і патологоанатомічні зміни. Зробити рисунки.

Результат:

Структура віріона



ЦПД вірусу



Дата: _____

Теоретичне обґрунтування теми

Класична чума свиней – це висококонтагіозне інфекційне захворювання, яке характеризується гарячкою, ураженням кровоносної та кровотворної систем, геморагічним діатезом, крупозною пневмонією та крупозно-дифтеритичним колітом. Хворіють свійські та дикі свині всіх вікових груп. Зараження відбувається аліментарно, аерогенно, контактно через пошкоджену шкіру і слизові оболонки, внутрішньоутробно і трансмісивно.

Хвороба протікає у вигляді епізоотій, захворюваність становить 95–100%, летальність – 60–100%.

Збудник – *Pestivirus suis* – належить до родини *Flaviviridae*, роду *Pestivirus*. Віріони сферичної форми, діаметром 40–60 нм. *Структура віріона*: суперкапсид; ікосаедральний нуклеокапсид, 1-ланцюгова РНК (плюс-нитка), 4 протеїни. Вірус має 1 серотип, який поділяється на 3 антигенні групи (А, В і С), що відрізняються за вірулентністю. Вірус пантропний.

Патматеріал: від тварин, убитих в агональному стані або загиблих, – кров, паренхіматозні органи, мигдалини, лімфовузли, серце, грудна кістка, головний і спинний мозок. Для *серологічного дослідження* – сироватки крові тварин-реконвалесцентів.

Лабораторна діагностика

1. Експрес-методи: виявлення вірусного антигену в РІФ, РНГА, РДП, ЗІЕФ, ІФА; виявлення вірусного геному методом ДНК-зондів, у ПЛР.

2. Вірусологічні методи. Ізоляція та індикація вірусу:

Первинні культури клітин нирок або сім'яників поросят, лейкоцитів крові свині, перещеплювана лінія РК-15. ЦПД не проявляється.

Ідентифікація вірусу: РІФ, ІФА, РНГА, ПЛР.

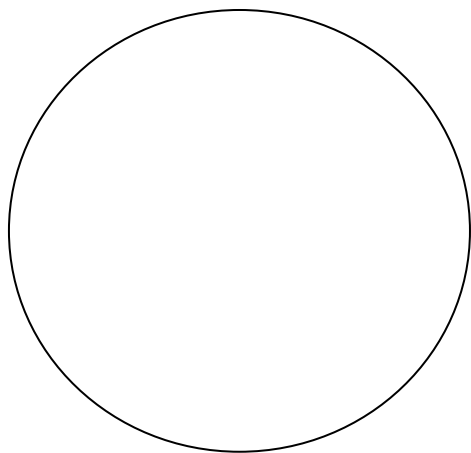
3. Серологічна діагностика: виявлення антитіл у РНІФ, РНФМ, РНГА, ІФА.

Диференціальна діагностика: африканська чума свиней, хвороба Ауескі, грип свиней, парагрип свиней, трансмісивний гастроентерит свиней, бешиха, пастерельоз, сальмонельоз, сибірка.

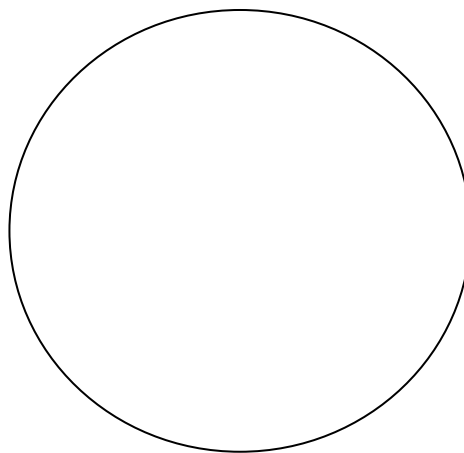
Самостійна робота. Вивчити основні клінічні ознаки хвороби і патологоанатомічні зміни. Зробити рисунки.

Результат:

Структура віріона



Результат РІФ



Теоретичне обґрунтування теми

Хвороба Тешена (ензоотичний енцефаломієліт свиней) – це висококонтагіозне інфекційне захворювання з гострим перебігом, яке характеризується ураженням ЦНС (негнійним енцефаломієлітом) та супроводжується судомою і паралічами. Хворіють свійські та дикі свині. Найбільш сприйнятливі тварини 2–10-місячного віку; рідко хворіють дорослі тварини. Зараження відбувається контактним шляхом через слизову оболонку носа та аліментарно. Захворюваність становить 50–100%, летальність – 30–90%.

Збудник – *Teschovirus asilesi*, *Teschovirus bishikawa* (2 види) – належить родини *Picornaviridae*, роду *Teschovirus*. Віріони сферичної форми, діаметром 25–30 нм. *Структура віріона*: ікосаедральний капсид (60 структурних одиниць), 1-ланцюгова РНК (плюс-нитка), 4 протеїни. Вірус має 1 серотип, який поділяється на 2 підтипи, та є нейротропним.

Патматеріал: *за життя* – кал, змиви з прямої кишки; від тварин, убитих у перші дні появи клінічних ознак хвороби, – головний і спинний мозок, слизова оболонка обідкової кишки. Для *серологічного дослідження* – парні сироватки крові.

Лабораторна діагностика

1. Експрес-методи: виявлення вірусного антигену в РІФ; виявлення вірусного геному в ПЛР.

2. Вірусологічні методи. *Ізоляція та індикація вірусу:*

Первинні культури клітин нирок поросят або ембріона свині, перещеплювана лінія СНЕВ. Через 3–5 діб ЦПД: округлення клітин.

Ідентифікація вірусу: РІФ, ІФА.

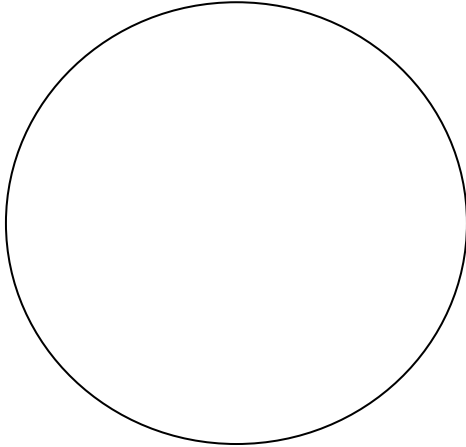
3. Ретроспективна діагностика: виявлення антитіл у РН, ІФА.

Диференціальна діагностика: хвороба Ауескі, сказ, класична чума свиней, лістеріоз, кормові отруєння.

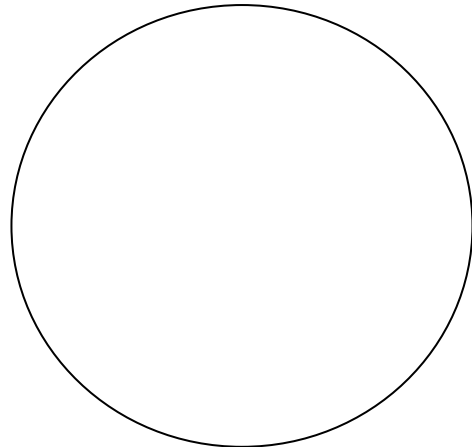
Самостійна робота. Вивчити основні клінічні ознаки хвороби і патологоанатомічні зміни. Зробити рисунки.

Результат:

Структура віріона



ЦПД вірусу



Теоретичне обґрунтування теми

Ринопневмонія коней (вірусний аборт кобил) – це контагіозне інфекційне захворювання з гострим перебігом, яке характеризується гарячкою, кон'юнктивітом, катаральним запаленням слизових оболонок верхніх дихальних шляхів і раптовими абортами в другій половині жеребності. Захворювання може охопити 40–90% жеребних кобил, в яких іноді виникають ускладнення у вигляді паралічів. Хворіють коні всіх вікових груп, а також осли і мули. Найбільш чутливі чистопородні коні та молодняк до 1 року. Зараження відбувається аерогенним, аліментарним, статевим і внутрішньоутробним шляхами.

Збудник – *Varicellovirus equidalpha1* (збудник вірусного абарту кобил), *Varicellovirus equidalpha4* (збудник ринопневмонії коней) (2 види) – належить до родини *Orthoherpesviridae*, роду *Varicellovirus*. Віріони сферичної форми, діаметром 100–150 нм. *Структура віріона*: суперкапсид, тегумент (мембрана з глобулярних протеїнів), ікосаедральний капсид (162 капсомери), серцевина, 2-ланцюгова ДНК, понад 20 протеїнів. Вірус має 1 серотип, є гемаглютинувальним і проявляє тропізм до епітеліальної та ендотеліальної тканин.

Патматеріал: *за життя* – кров, змиви з носової порожнини і вагіни; *після загибелі* – слизова оболонка носа, легені, печінка, селезінка і тимус абортіваних плодів або новонароджених лошат, плацента, від дорослих тварин – головний і спинний мозок (за наявності паралічів). Для *серологічного дослідження* – парні сироватки крові.

Лабораторна діагностика

1. Експрес-методи: виявлення вірусного антигену в РІФ, РЗК, ІФА; виявлення вірусного геному в ПЛР; виявлення внутрішньоядерних тілець-включень.

2. Вірусологічні методи. *Ізоляція та індикація вірусу:*

1) Первинні культури клітин нирок коня, ембріона корови, ембріона свині або кроля. Через 3–5 діб ЦПД: округлення клітин, симпласти. Ставлять РГАд і РГА (з еритроцитами коня).

2) Курячі ембріони віком 8–12 днів, зараження в жовтковий мішок, алантоїсну порожнину або амніон. Через 4 доби загибель. За розтину на ХАО виявляють віспини, а в клітинах ХАО – внутрішньоядерні тільця-включення.

3) Біопроба на вагітних мурчаках, зараження в/ч. Через 3–20 діб аборт або загибель із характерними патологоанатомічними змінами: некрози в печінці, крововиливи в легенях, гастроентерит.

4) Біопроба на 3–4-денних хом'ячках або білих мишенятах, зараження і/ц, і/н, п/ш або в/ч. Тварини гинуть за і/ц зараження через 12–24 год з ознаками ураження ЦНС. За інших методів зараження загибель – через 5–8 діб. За розтину встановлюють патоморфологічні зміни: енцефаломієліт або гепатит (залежно від методу зараження), внутрішньоядерні тільця-включення.

Ідентифікація вірусу: РІФ, РДП, РН, РГГА, РГГАд, ІФА.

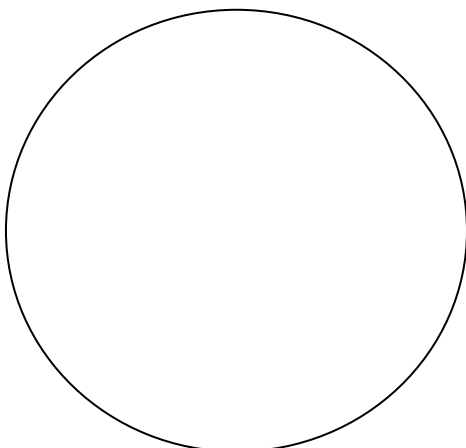
3. Ретроспективна діагностика: виявлення антитіл у РН, РЗК, РГГА, ІФА.

Диференціальна діагностика: грип коней, риновірусна інфекція коней, аденовірусна інфекція коней, вірусний артеріт, сальмонельоз.

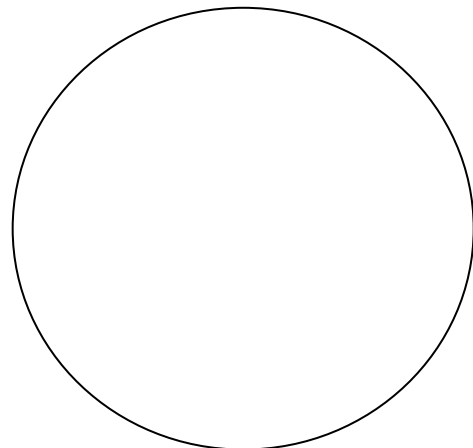
Самостійна робота. Вивчити основні клінічні ознаки хвороби і патологоанатомічні зміни. Зробити рисунки.

Результат:

Структура віріона



ЦПД вірусу, гемадсорбція



Дата: _____

Теоретичне обґрунтування теми

Чума м'ясоїдних (чума собак) – це контагіозне інфекційне захворювання з гострим перебігом, яке характеризується гарячкою, катаральним запаленням слизових оболонок органів дихання, травлення та сечовиділення, пневмонією, шкірною екзантемою, ураженням очей і ЦНС. Хворіють багато видів ряду хижаків: собаки, вовки, шакали, гієни, лисиці, песці, єноти, норки, тхори та ін. Хворіють тварини всіх вікових груп, проте найбільш чутливий молодняк: у собак – до 1 року, в хутрових звірів – до 5 міс. Зараження відбувається аерогенним та аліментарним шляхами. У звіроводних господарствах за епізоотичного спалаху хвороби захворюваність становить 70–100%, летальність серед молодняка може досягати 70–90%, серед дорослих тварин – 40–70%.

Збудник – *Morbillivirus canis* – належить до родини *Paramyxoviridae*, роду *Morbillivirus*. Віріони плеоморфні, найчастіше сферичної форми, діаметром 115–160 нм. *Структура віріона*: суперкапсид, спіральний нуклеокапсид (серцевина), 1-ланцюгова РНК (мінус-нитка), 6 протеїнів, у т. ч. транскриптаза, М-протеїн. Вірус має 1 серотип, є гемаглютинувальним і пантропним.

Патматеріал: *за життя* – кров, слина, змиви і мазки-відбитки зі слизової оболонки носа і кон'юнктиви; *після загибелі* – паренхіматозні органи, трахея, головний мозок, сечовий міхур. Для *серологічного дослідження* – парні сироватки крові.

Лабораторна діагностика

1. Експрес-методи: виявлення вірусного антигену в РІФ, РЗК, РДП, РНГА, ІФА, ІХА; виявлення вірусного геному в ПЛР; виявлення цитоплазматичних і внутрішньоядерних тілець-включень Лентца.

2. Вірусологічні методи. Ізоляція та індикація вірусу:

1) Первинні культури клітин нирок собак, тхорів або кролів. Через 2–6 діб ЦПД: симпласти.

2) Курячі ембріони віком 5–12-днів, зараження в жовтковий мішок, алантоїсну порожнину або на ХАО. Ембріони гинуть (у разі зараження в жовтковий мішок – на 7–11-ту добу), за розтину виявляють помутніння ХАО.

Ідентифікація вірусу: РН, РІФ, РЗК, РДП, РНГА, ІФА.

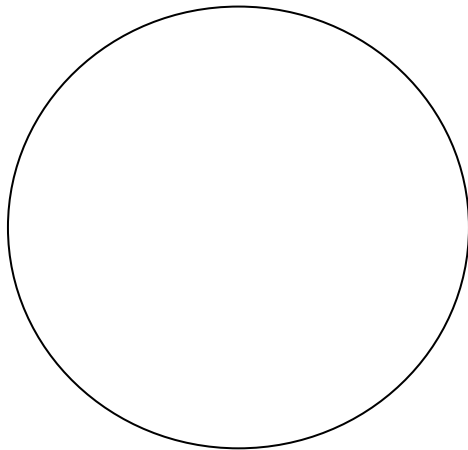
3. Ретроспективна діагностика: виявлення антитіл у РНГА, ІФА.

Диференціальна діагностика: інфекційний гепатит собак, сказ, хвороба Ауєскі, вірусний ентерит норок, алеутська хвороба норок, парвовірусна інфекція собак, сальмонельоз, пастерельоз, лептоспіроз, авітаміноз В, кормові отруєння.

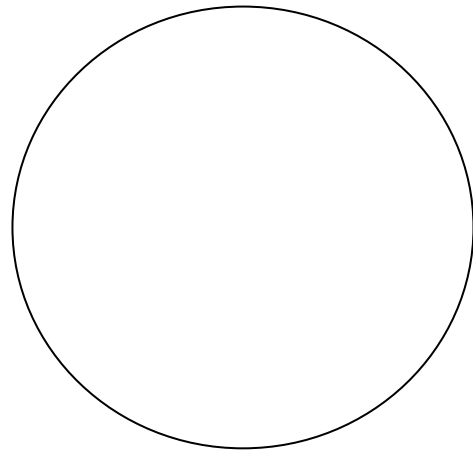
Самостійна робота. Вивчити основні клінічні ознаки хвороби і патологоанатомічні зміни. Зробити рисунки.

Результат:

Структура віріона



ЦПД вірусу



Теоретичне обґрунтування теми

Міксоматоз – це висококонтагіозне інфекційне захворювання кролів із гострим перебігом, яке характеризується блефарокон'юнктивітом, ринітом, утворенням пухлинних вузликів або драглистих набряків у ділянці голови, лап, хребта, статевих органів та анального отвору. Хворіють свійські та дикі кролі всіх вікових груп, летальність серед яких досягає 95–100%. Сприйнятливі також зайці. Зараження відбувається контактним шляхом.

Збудник – *Leporipoxvirus tuxota* – належить до родини *Poxviridae*, роду *Leporipoxvirus*. Віріони мають форму цеглини із заокругленими кінцями, розміри 230×330 нм. **Структура віріона:** зовнішня оболонка; серцевина (у вигляді гантелі), яка містить 2-ланцюгову ДНК, оточену внутрішньою гладкою мембраною та зовнішнім шаром із циліндричних субодиниць; латеральні тільця; 100 протеїнів, у т. ч. транскриптаза. Вірус має 1 серотип і є епітеліотропним.

Патматеріал: *за життя* – клінічно хворі кролі; *після загибелі* – цілі трупи або уражені ділянки шкіри з інфільтрованою підшкірною клітковиною.

Лабораторна діагностика

1. Експрес-методи: виявлення вірусного антигену в РІФ, ІФА; виявлення вірусного геному в ПЛР.

2. Вірусологічні методи. Ізоляція та індикація вірусу:

Курячі ембріони віком 10–12 днів, зараження на ХАО, де утворюються віспини.

Ідентифікація вірусу: РІФ, ІФА.

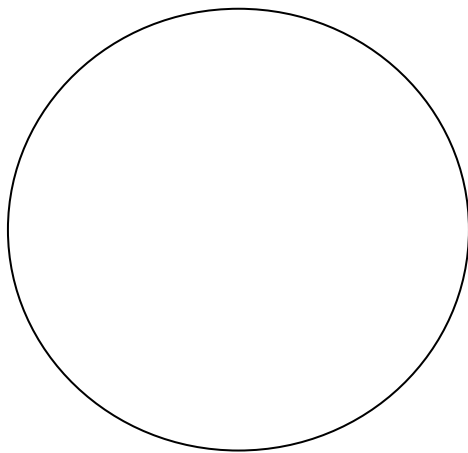
3. Серологічна діагностика: виявлення антитіл у ІФА, РЗК, РНІФ.

Диференціальна діагностика: інфекційний фіброматоз кролів, стафілококоз, бродяча піємія кролів.

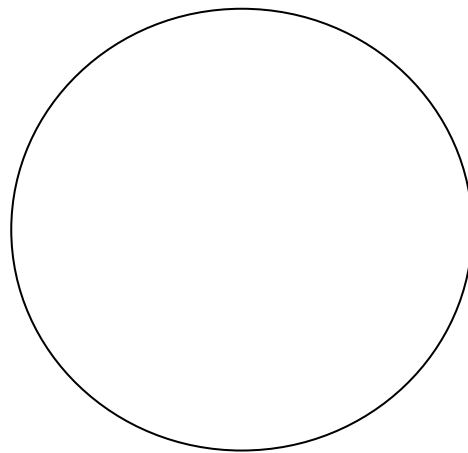
Самостійна робота. Вивчити основні клінічні ознаки хвороби і патологоанатомічні зміни. Зробити рисунки.

Результат:

Структура віріона



Віспини на ХАО курячого ембріона



Теоретичне обґрунтування теми

Алеутська хвороба норок (вірусний плазмоцитоз норок) – це інфекційне захворювання частіше з хронічним перебігом, яке характеризується системною проліферацією плазматичних клітин, різко вираженою гіпергаммаглобулінемією, накопиченням імунних комплексів, гломерулонефритом, периартеріїтом, прогресувальним виснаженням. У вагітних самок спостерігаються аборти і мертвонародження. Хворіють норки всіх порід, незалежно від статі та віку, летальність становить 70–80%. Сприйнятливі також тхори. Зараження відбувається внутрішньоутробно, статевим, аліментарно, аерогенно, трансмісивно і контактним шляхом (за укусів).

Збудник – *Amdoparvovirus carnivoran1* – належить до родини *Parvoviridae*, роду *Amdoparvovirus*. Віріони ікосаедральної форми, діаметром 24–26 нм. *Структура віріона:* ікосаедральний капсид (32 капсомери), 1-ланцюгова ДНК (мінус-нитка), 3 протеїни. Вірус має 1 серотип, зберігає інфекційну активність у складі імунних комплексів та проявляє тропізм до лімфоцитів.

Патматеріал: після загибелі – печінка, селезінка, нирки, лімфовузли. Для серологічного дослідження – сироватки крові.

Лабораторна діагностика

1. Експрес-методи: виявлення вірусного антигену в РІФ; виявлення вірусного геному у ПЛР.

2. Вірусологічні методи. Ізоляція та індикація вірусу:

Біопроба на норках: заражають тварин в/ч. Через 30–40 діб клінічні ознаки хвороби, впродовж 3–4 міс. загибель від кахексії з характерними патоморфологічними змінами.

Ідентифікація вірусу: РІФ, ПЛР.

3. Серологічна діагностика: виявлення антитіл у РНІФ, ЗІЕФ, ІФА.

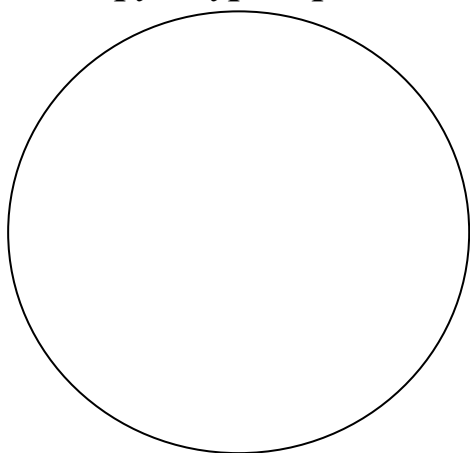
Неспецифічні методи: виявлення змін протеїнового складу сироваток крові – йодно-аглютинаційний тест, реакція імуноелектроосмофорезу, імунодифузія гамма-глобулінів в агаровому гелі, тимолова проба, глутаральдегідний тест.

Диференціальна діагностика: аліментарна жирова дистрофія печінки, псевдомоноз.

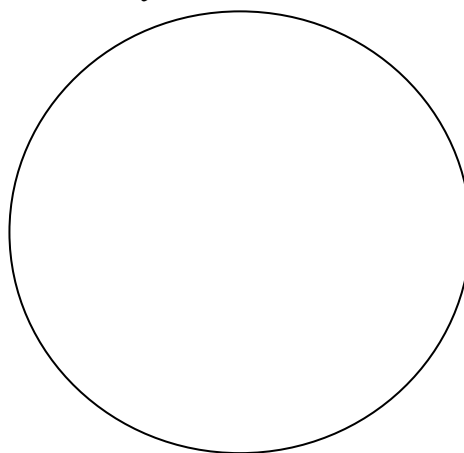
Самостійна робота. Вивчити основні клінічні ознаки хвороби і патологоанатомічні зміни. Зробити рисунки.

Результат:

Структура віріона



Результат РІФ



Дата: _____

Теоретичне обґрунтування теми

Грип птиці (класична чума птиці) – це висококонтагіозне інфекційне захворювання з гострим перебігом, яке характеризується геморагічним діатезом та ураженням респіраторного і шлунково-кишкового трактів та ЦНС. Хворіють кури, індики, голуби, перепілки, фазани та інші види птиці всіх вікових груп. Зараження відбувається аерогенним та аліментарним шляхами. Хвороба протікає у вигляді епізоотій, захворюваність досягає 80–100%, летальність – 10–90%. У дорослої птиці на 40–60% знижується несучість.

Збудник – *Alphainfluenzavirus influenzae* – належить до родини *Orthomyxoviridae*, роду *Alphainfluenzavirus*. Віріони плеоморфні, найчастіше сферичної форми, діаметром 80–120 нм. *Структура віріона*: суперкапсид, спіральний нуклеокапсид (серцевина), 1-ланцюгова фрагментована РНК (8 фрагментів, мінус-нитка), 7 протеїнів, у т. ч. транскриптаза, гемаглютинін, нейрамінідаза, М-протеїн. Встановлено 18 підтипів гемаглютиніну та 11 підтипів нейрамінідази, поєднання яких зумовлює велику кількість антигенних варіантів вірусу (близько 50). Основна маса їх циркулює серед птахів, особливо качок. Для птахів найбільш вірулентними є штами вірусу, які містять гемаглютинін 5- і 7-го підтипів. Вони спричиняють форму грипу, відому під назвою «класична чума птиці». Пташині штами вірусу патогенні для людини і різних видів тварин (свині, коні, коти, собаки, тигри та ін.). Вірус гемаглютинувальний і пантропний.

Патматеріал: *за життя* – змиви з носоглотки і клоаки; *після загибелі* – цілі трупи або трахея, підочні синуси, повітроносні мішки, легені, печінка, селезінка, кишечник, головний мозок. Для серологічного дослідження – парні сироватки крові.

Лабораторна діагностика

1. Експрес-методи: виявлення вірусного антигену в РІФ, ІФА; виявлення вірусного геному в ПЛР; виявлення цитоплазматичних тілець-включень.

2. Вірусологічні методи. *Ізоляція та індикація вірусу:*

1) Курячі ембріони віком 9–11 днів, зараження в алантоїсну або амніотичну порожнину. Через 2–3 доби загибель, за розтину виявляють крововиливи на зародку. Ставлять РГА (з еритроцитами курки).

2) Первинна культура фібробластів курячого ембріона. Через 1–2 доби ЦПД, яка подібна до спонтанної дегенерації клітин. Індикацію вірусу проводять у РГАд і РГА.

Ідентифікація вірусу: РГГА, РГГАд, РН, РЗК.

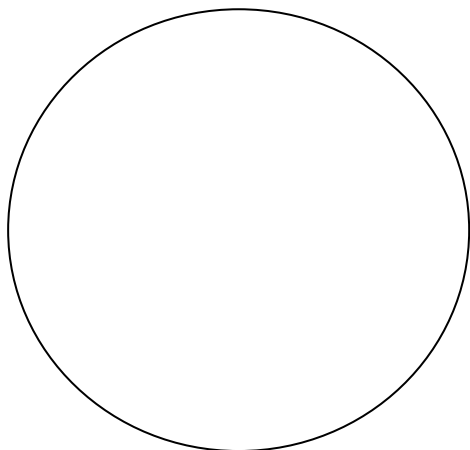
3. Ретроспективна діагностика: виявлення антитіл у РГГА, РЗК, РРГ, ІФА.

Диференціальна діагностика: ньюкаслська хвороба, інфекційний бронхіт курей, інфекційний ларинготрахеїт птиці, респіраторний мікоплазмоз.

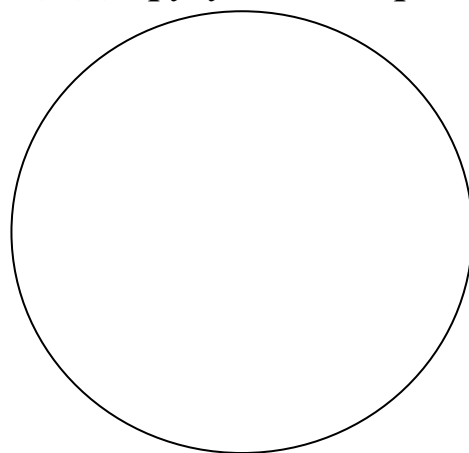
Самостійна робота. Вивчити основні клінічні ознаки хвороби і патологоанатомічні зміни. Зробити рисунки.

Результат:

Структура віріона



ЦПД вірусу, гемадсорбція



Теоретичне обґрунтування теми

Ньюкаслська хвороба (псевдочума птиці) – це висококонтагіозне інфекційне захворювання птахів ряду куроподібних частіше з гострим перебігом, яке характеризується геморагічним діатезом, ураженням респіраторного та шлунково-кишкового трактів і ЦНС. Найчастіше хворіють кури, індики, цесарки, фазани, перепілки і пави всіх вікових груп. Зараження відбувається аліментарним, аерогенним, контактним (через пошкоджену шкіру і слизові оболонки), а також трансмісивним і трансваріальним шляхами. Хвороба протікає у вигляді епізоотій, захворюваність може досягати 100%, а летальність – 60–90%.

Збудник – *Orthoavulavirus javaense* – належить до родини *Paramyxoviridae*, роду *Orthoavulavirus*. Віріони плеоморфні, найчастіше сферичної форми, діаметром 120–300 нм. *Структура віріона:* суперкапсид, спіральний нуклеокапсид (серцевина),

1-ланцюгова РНК (мінус-нитка), 6 протеїнів, у т. ч. транскриптаза, нейранінідаза, М-протеїн. Вірус має 1 серотип, є гемаглютинувальним і пантропним.

Патматеріал: *за життя* – змиви з трахеї та клоаки; *після загибелі* – слизові оболонки трахеї та кишечника, паренхіматозні органи, головний мозок, кістковий мозок. Для *серологічного дослідження* – парні сироватки крові.

Лабораторна діагностика

1. Експрес-методи: виявлення вірусного антигену в РІФ, РНГА, ІФА; виявлення вірусного геному в ПЛР.

2. Вірусологічні методи. *Ізоляція та індикація вірусу:*

1) Курячі ембріони віком 9–11 днів, зараження в алантоїсну порожнину. Через 1–3 доби загибель, за розтину виявляють крововиливи на зародку. Ставлять РГА (з еритроцитами курки).

2) Первинна культура фібробластів курячого ембріона. Через 2–3 доби ЦПД: симпласти. Ставлять РГАд і РГА.

Ідентифікація вірусу: РГГА, РГГАд, ІФА.

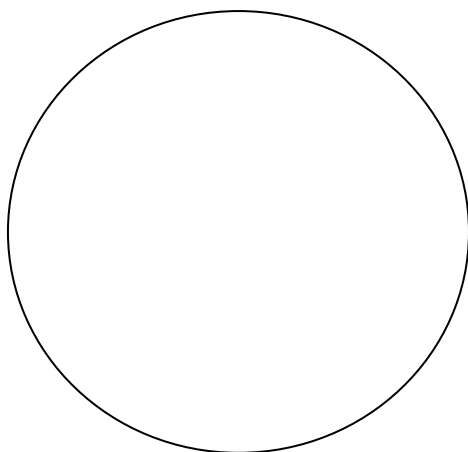
3. Ретроспективна діагностика: виявлення антитіл у РГГА, РРГ, ІФА.

Диференціальна діагностика: грип птиці, інфекційний бронхіт курей, інфекційний ларинготрахеїт птиці, інфекційний енцефаломієліт птиці, параміксовірусна хвороба птиці-2, пастерельоз, респіраторний мікоплазмоз.

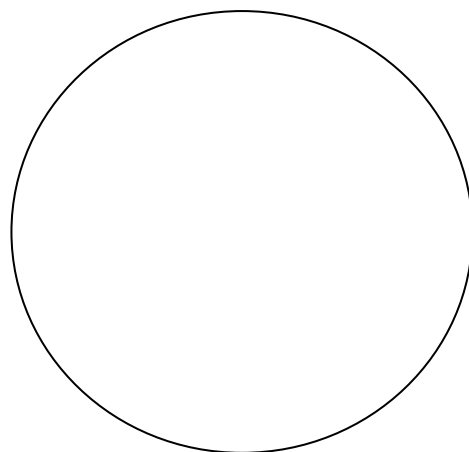
Самостійна робота. Вивчити основні клінічні ознаки хвороби і патологоанатомічні зміни. Зробити рисунки.

Результат:

Структура віріона



ЦПД вірусу, гемадсорбція



Теоретичне обґрунтування теми

Хвороба Марека (нейролімфоматоз птиці) – це висококонтагіозне інфекційне захворювання птахів ряду куроподібних, яке характеризується за гострої форми проліферацією клітин лімфоретикулярної тканини з утворенням пухлин у внутрішніх органах, шкірі й м'язах, а за класичної форми – ураженням центральної та периферійної нервової системи й очей. Найчастіше хворіють кури до 6-місячного віку, найбільш чутливі курчата в перші 2 тижні життя. Також можуть хворіти індики, перепілки, фазани, качки, гуси, лебеді, куріпки і канарки. Зараження відбувається аерогенно, аліментарно, контактним шляхом (через пір'яні фолікули шкіри) і трансваріально. Захворюваність становить 40–85%, летальність коливається в межах 3–80%.

Збудник – *Mardivirus gallidalpha2*, *Mardivirus gallidalpha3* (2 види) – належить до родини *Orthoherpesviridae*, роду *Mardivirus*. Віріони сферичної форми, діаметром 85–170 нм. *Структура віріона*: суперкапсид, тегумент (мембрана з глобулярних протеїнів), ікосаедральний капсид (162 капсомери), серцевина, 2-ланцюгова ДНК, понад 20 протеїнів. Вірус має 1 серотип і проявляє тропізм до лімфоїдних органів та епітеліальних клітин пір'яних фолікулів.

Патматеріал: за життя – 5–10 клінічно хворих курчат, від яких беруть кров і пір'я; після загибелі – паренхіматозні органи, яєчники, сім'яники, серце, клоакальна сумка, тимус, шкіра, м'язи, головний мозок, периферійні нерви (плечового і крижово-сідничного сплетінь). Для серологічного дослідження – парні сироватки крові.

Лабораторна діагностика

1. Експрес-методи: виявлення вірусного антигену в РІФ, РДП, ІФА; виявлення вірусного геному в ПЛР; виявлення внутрішньоядерних тілець-включень.

2. Вірусологічні методи. Ізоляція та індикація вірусу:

1) Курячі ембріони, зараження на ХАО (10–12-й день інкубації) або в жовтковий мішок (4–5-й день інкубації). Загибель відповідно через 3 або 8–9 діб із характерними патологоанатомічними змінами: на ХАО – сіро-білі вогнища клітинної проліферації (пустули, або бляшки), збільшення печінки і селезінки.

2) Первинні культури клітин нирок курячого ембріона або курчат, фібробластів курячого ембріона. Через 4–5 діб ЦПД: округлення клітин, симпласти.

Ідентифікація вірусу: РДП, РІФ, ІФА.

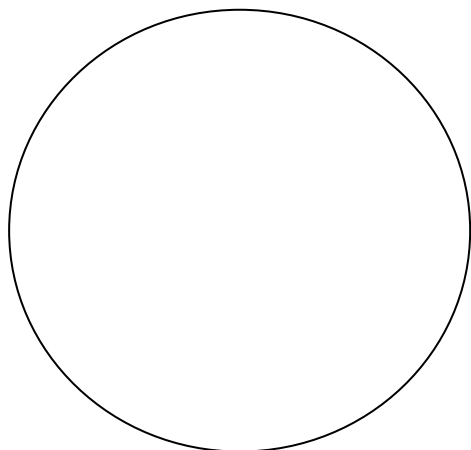
3. Ретроспективна діагностика: виявлення антитіл у РДП, ІФА.

Диференціальна діагностика: лейкоз птиці, інфекційний енцефаломієліт птиці, ньюкаслська хвороба, лістеріоз, авітамінози В, Е і Д, кормові отруєння.

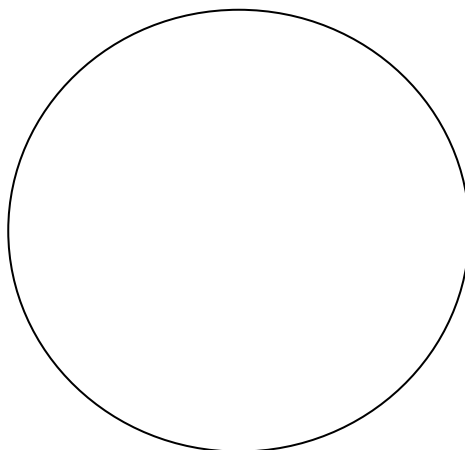
Самостійна робота. Вивчити основні клінічні ознаки хвороби і патологоанатомічні зміни. Зробити рисунки.

Результат:

Структура віріона



ЦПД вірусу



Контрольні запитання

Матеріал щодо кожної вірусної хвороби викласти за такою схемою:

- характеристика збудника;
- клініко-епізоотологічні дані хвороби і патологоанатомічні зміни;
- відбір патологічного матеріалу від хворих і загинув тварин;
- лабораторна діагностика: експрес-методи, вірусологічні методи (ізоляція, індикація та ідентифікація вірусу) і методи ретроспективної діагностики;
- диференціальна діагностика.

1. Сказ. **2.** Хвороба Ауескі. **3.** Ящур. **4.** Парагрип ВРХ. **5.** Інфекційний ринотрахеїт ВРХ. **6.** Вірусна діарея ВРХ. **7.** Класична чума свиней. **8.** Хвороба Тешена. **9.** Ринопневмонія коней. **10.** Чума м'ясоїдних. **11.** Міксоматоз. **12.** Алеутська хвороба норок. **13.** Грип птиці. **14.** Ньюкаслська хвороба. **15.** Хвороба Марека.

Т е м а 10
ТЕМАТИЧНА САМОСТІЙНА РОБОТА

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

Т а б л и ц я 2. Культивування вірусів
в організмі лабораторних тварин

Вірус	Метод зараження	Ознаки розмноження вірусу
1	2	3
Білі миші		
<i>Lissavirus rabies</i> (збудник сказу)	і/ц, п/ш	Скуйовдження шерсті, горбатість спини, порушення координації рухів, параліч кінцівок, загибель
<i>Varicellovirus suidalpha1</i> (збудник хвороби Ауескі)	і/ц, п/ш	Паралічі, загибель
<i>Aphthovirus vesiculae</i> (збудник ящуру)	п/ш, в/ч	Парези, паралічі, загибель, некроз скелетних м'язів і міокарда
<i>Vesiculovirus alagoas</i> , <i>Vesiculovirus cocal</i> , <i>Vesiculovirus indiana</i> , <i>Vesiculovirus newjersey</i> (збудники везикулярного стоматиту)	і/ц, в/ч	Скуйовдження шерсті, тремтіння, атаксія, параліч кінцівок, загибель
<i>Varicellovirus equidalpha1</i> , <i>Varicellovirus equidalpha4</i> (збудники вірусного аборту кобил і ринопневмонії коней)	і/ц	Симптоми енцефаломієліту, загибель
	в/ч, і/н	Загибель, гепатит
<i>Alphainfluenzavirus influenzae</i> штами вірусу свиней, коней і птиці (збудники грипу свиней, коней і птиці)	і/н	Симптоми ураження дихальних шляхів, загибель, вогнищева пневмонія

1	2	3
<i>Orthoflavivirus japonicum</i> (збудник японського енцефаліту)	і/ц	Симптоми енцефаліту, загибель
<i>Alphavirus venezuelan,</i> <i>Alphavirus eastern,</i> <i>Alphavirus western</i> (збудники енцефаломієлітів коней (венесуельського, східного і західного)	і/ц, в/м, в/ч, п/ш	Симптоми енцефаліту або енцефаломієліту, загибель
Білі пацюки		
<i>Varicellovirus suidalpha1</i> (збудник хвороби Ауєскі)	п/ш, і/н	Паралічі, загибель
<i>Alphainfluenzavirus influenzae</i> штами вірусу свиней (збудник грипу свиней)	і/н	Симптоми ураження дихальних шляхів, загибель
<i>Orthoflavivirus japonicum</i> (збудник японського енцефаліту)	і/ц	Симптоми енцефаліту, загибель
<i>Alphavirus venezuelan,</i> <i>Alphavirus eastern,</i> <i>Alphavirus western</i> (збудники енцефаломієлітів коней (венесуельського, східного і західного)	і/ц, в/м, в/ч, п/ш	Симптоми енцефаліту або енцефаломієліту, загибель
Мурчак		
<i>Aphthovirus vesiculae</i> (збудник ящуру)	в/ш	Афти на лапках і слизовій оболонці ротової порожнини
<i>Vesiculovirus alagoas,</i> <i>Vesiculovirus cocal,</i> <i>Vesiculovirus indiana,</i> <i>Vesiculovirus newjersey</i> (збудники везикулярного стоматиту)	в/ш	Везикули на лапках та язиці

1	2	3
<i>Varicellovirus equidalpha1</i> , <i>Varicellovirus equidalpha4</i> (збудники вірусного аборту кобил і ринопневмонії коней)	в/ч	Аборт або загибель, некрози в печінці, крововиливи в легенях, гастроентерит
<i>Orthoflavivirus japonicum</i> (збудник японського енцефаліту)	і/ц	Симптоми енцефаліту, загибель
<i>Alphavirus venezuelan</i> , <i>Alphavirus eastern</i> , <i>Alphavirus western</i> (збудники енцефаломієлітів коней (венесуельського, східного і західного))	і/ц, в/м, в/ч, п/ш	Симптоми енцефаліту або енцефаломієліту, загибель
К р о л і		
<i>Lissavirus rabies</i> (збудник сказу)	і/ц	Паралічі, загибель
<i>Varicellovirus suidalpha1</i> (збудник хвороби Ауескі)	п/ш, в/м	Збудження, свербіння, розчухи, паралічі, загибель
<i>Aphthovirus vesiculae</i> (збудник ящуру)	п/ш, в/ч	Парези, паралічі, загибель, некроз скелетних м'язів і міокарда
<i>Vesiculovirus alagoas</i> , <i>Vesiculovirus cocal</i> , <i>Vesiculovirus indiana</i> , <i>Vesiculovirus newjersey</i> (збудники везикулярного стоматиту)	у слизову оболонку язика	Везикули на слизовій оболонці ротової порожнини
<i>Orthoroxvirus cowpox</i> (збудник віспи корів)	в/ш, у скарифіковану шкіру	Інфільтрати з некрозом і геморагіями, папули, пустули на шкірі
<i>Orthoflavivirus japonicum</i> (збудник японського енцефаліту)	і/ц	Симптоми енцефаліту, загибель

1	2	3
<i>Alphavirus venezuelan</i> , <i>Alphavirus eastern</i> , <i>Alphavirus western</i> (збудники енцефаломієлітів коней (венесуельського, східного і західного)	і/ц, в/м, в/ч, п/ш	Симптоми енцефаліту або енцефаломієліту, загибель
<i>Leporipoxvirus тухота</i> (збудник міксоматозу кролів)	в/ш, у кон'юнктивальний мішок	Блефарокон'юнктивіт, риніт, пухлинні вузлики або драглисті набряки на шкірі
<i>Leporipoxvirus Shope</i> (збудник інфекційного фіброматозу кролів)	п/ш	Пухлини на шкірі з некрозом та ерозіями
<i>Каррарарілломавірус 1</i> (збудник папіломатозу кролів)	у скарифіковану шкіру	Папіломи на шкірі
Х о м ' я к и		
<i>Alphainfluenzavirus influenzae</i> штами вірусу свиней (збудник грипу свиней)	і/н	Симптоми ураження дихальних шляхів, загибель
<i>Varicellovirus equidalpha1</i> , <i>Varicellovirus equidalpha4</i> (збудники вірусного аборту кобил і ринопневмонії коней)	і/ц	Симптоми енцефаломієліту, загибель
	і/н, п/ш, в/ч	Загибель, гепатит
<i>Orthoflavivirus japonicum</i> (збудник японського енцефаліту)	і/ц	Симптоми енцефаліту, загибель
<i>Alphavirus venezuelan</i> , <i>Alphavirus eastern</i> , <i>Alphavirus western</i> (збудники енцефаломієлітів коней (венесуельського, східного і західного)	і/ц, в/м, в/ч, п/ш	Симптоми енцефаліту або енцефаломієліту, загибель

1	2	3
<i>Alpharetrovirus avirousar</i> (збудник саркоми Рауса)	п/ш	Пухлини

Т а б л и ц я 3. Культивування вірусів у курячих ембріонах

Вірус	Метод зараження	Ознаки розмноження вірусу
1	2	3
<i>Orthoroxvirus cowpox</i> (збудник віспи корів)	на ХАО, в алантоїсну порожнину	Загибель, геморагічні віспини на ХАО
<i>Capripoxvirus sheeppox</i> (збудник віспи овець)	на ХАО	Віспини на ХАО
<i>Capripoxvirus goatpox</i> (збудник віспи кіз)	на ХАО	Віспини на ХАО
<i>Aviropoxvirus fowlpox</i> (збудник віспи птиці)	на ХАО	Загибель, віспини на ХАО
<i>Respirovirus bovis</i> (збудник парагрипу ВРХ)	в алантоїсну порожнину, в амніон, на ХАО	РГА
<i>Varicellovirus suidalpha1</i> (збудник хвороби Ауескі)	на ХАО	Загибель, віспини на ХАО
<i>Varicellovirus equidalpha1</i> , <i>Varicellovirus equidalpha4</i> (збудники вірусного аборту кобил і ринопневмонії коней)	у жовтковий мішок, в алантоїсну порожнину, в амніон	Загибель, віспини на ХАО
<i>Morbillivirus canis</i> (збудник чуми м'ясоїдних)	в алантоїсну порожнину, на ХАО, у жовтковий мішок	Загибель, помутніння ХАО
<i>Leroripoxvirus тухота</i> (збудник міксоматозу)	на ХАО	Віспини на ХАО

1	2	3
<i>Alphainfluenzavirus influenzae</i> (збудник грипу) штами вірусу свиней	в алантоїсну порожнину, в амніон	Крововиливи на зародку, РГА
штами вірусу коней		РГА
штами вірусу птиці		Загибель, крововиливи на зародку, РГА
<i>Orthoavulavirus javaense</i> (збудник ньюкаслської хвороби)	в алантоїсну порожнину, в амніон, на ХАО	Загибель, крововиливи на зародку, РГА
<i>Gammacoronavirus galli</i> (збудник інфекційного бронхіту курей)	в алантоїсну порожнину, в амніон, на ХАО	Загибель, карликовість і муміфікація зародка, набряк ХАО та амніотичної оболонки, збільшення об'єму алантоїсної рідини, зменшення об'єму амніотичної рідини, зморщування жовткового мішка, РГА
<i>Avihepatovirus ahepati</i> (збудник вірусного гепатиту каченят)	на ХАО, в алантоїсну порожнину	Загибель, набряки, гіперемія та крововиливи на зародку, набряк ХАО і печінки; печінка жовто-сірого або жовто-зеленого кольору з вогнищами некрозу; ембріональні рідини, вміст кишечника і жовткового мішка зеленого кольору
<i>Mardivirus gallidalpha2</i> , <i>Mardivirus gallidalpha3</i> (збудники хвороби Марека)	на ХАО, у жовтковий мішок	Загибель, вогнища клітинної проліферації на ХАО (бляшки), збільшення печінки і селезінки

1	2	3
<i>Alpharetrovirus avirousar</i> (збудник саркоми Рауса)	на ХАО, в амніон, у кровоносні судини ХАО	Вогнища проліферації на ХАО (бляшки)

Т е м а 3. ПІДГОТОВКА ПОСУДУ ДЛЯ КУЛЬТУРИ КЛІТИН. ІНДИКАЦІЯ В КУЛЬТУРІ КЛІТИН НЕЦИТОПАТОГЕННИХ І ЛАТЕНТНИХ ВІРУСІВ

Підготовка посуду для культури клітин

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

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

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

Шийки матраців, флаконів і колб закривають 2 шарами фольги і обв'язують шпагатом. Пробірки по 10–20 штук обгортають пергаментним папером або фольгою. Піпетки затикають ватою, поміщають у спеціальні пенали для стерилізації або кожен обгортають смужкою пергаментного паперу.

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

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

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

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

В останні десятиліття широко використовують пластиковий посуд для культивування клітин *in vitro*.

Індикація в культурі клітин нецитопатогенних і латентних вірусів

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

Інтерференція – це здатність деяких вірусів пригнічувати репродукцію інших. На основі інтерференції можна виявити в культурі клітин нецитопатогенні віруси шляхом спільного культивування їх із цитопатогенними агентами, репродукцію яких вони гальмують. Так, якщо культуру клітин заразити спочатку нецитопатогенним *Pestivirus suis* (збудником класичної чуми свиней), а потім – *Aphthovirus vesiculae* (збудником ящуру), то ЦПД *Aphthovirus vesiculae* не проявляється внаслідок явища інтерференції. Або інший приклад: нецитопатогенні штами *Alphacoronavirus suis* (збудника трансмісивного гастроентериту свиней) гальмують розвиток ЦПД *Pestivirus bovis*, *Pestivirus tauri* та *Pestivirus braziliense* (збудників вірусної діареї ВРХ).

Феномен екзальтації полягає в прояві ЦПД у культурі клітин, зараженій двома вірусами: один із них нецитопатогенний, а другий – цитопатогенний, але в цій культурі не розмножується. Наприклад, екзальтація *Orthoavulavirus javaense* (збудника ньюкаслської хвороби) *Pestivirus suis* у культурі клітин сім'яників поросят (клітини, заражені нецитопатогенним *Pestivirus suis*, під дією *Orthoavulavirus javaense* лізуються). Інший приклад: екзальтація *Orthoavulavirus javaense* в

культури клітин сім'яників телят у присутності нецитопатогенних штамів *Pestivirus bovis*, *Pestivirus tauri* та *Pestivirus braziliense*.

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

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

Т е м а 4. ГЕМАГЛЮТИНУВАЛЬНІ ВЛАСТИВОСТІ ВІРУСІВ. СЕРОЛОГІЧНІ РЕАКЦІЇ

Т а б л и ц я 3. Гемаглютинувальні властивості вірусів тварин

Вірус	Еритроцити	Температура	pH
1	2	3	4
<i>Lissavirus rabies</i> (збудник сказу)	Гуски, курки, мавпи, мурчака, пацюка, вівці, людини (0 група крові)	0–4 °С	6,2–6,4
<i>Respirovirus bovis</i> (збудник парагрипу ВРХ)	Мурчака, кроля, миші, корови, вівці, кози, свині, буйвола, мавпи, голуба, гуски, індика	4 °С, 18–22°С, 37 °С	5,7–7,2
<i>Varicellovirus bovinealpha1</i> (збудник інфекційного ринотрахеїту ВРХ)	Миші, пацюка, хом'яка, мурчака, людини (0 група крові)*	4 °С	7,2
<i>Varicellovirus equidalpha1</i> , <i>Varicellovirus equidalpha4</i> (збудники вірусного аборту кобил і ринопневмонії коней)	Коня, мурчака	4 °С, 37 °С	7,2

1	2	3	4
<i>Morbillivirus canis</i> (збудник чуми м'ясоїдних)	Курки, мурчака	18–22 °С	7,0
<i>Alphainfluenzavirus influenzae</i> штами вірусу птиці (збудник грипу птиці)	Курки, мурчака, кроля, коня, вівці, людини (0 група крові)	18–22 °С	7,2
<i>Orthoavulavirus javaense</i> (збудник ньюкаслської хвороби)	Курки, голуба, індика, мурчака, миші, корови, вівці, кози, свині, коня, людини (0 група крові)	18–22 °С	7,2

* – після концентрації вірусу ПЕГ-6000 або ультрацентрифугуванням;

** – після обробки вірусу трипсином або фосфоліпазою С.

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

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

Реакція радіальної імунодифузії (РРІД) ґрунтується на внесенні в гелеве середовище відомого імунного компонента (вірусного антигену або специфічної сироватки), а в лунки – досліджуваного, і в разі утворення комплексу антиген–антитіло формуються кільця

преципітації. РРІД використовується для ретроспективної діагностики ящуру та ін.

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

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

Імунохроматографічний аналіз (ІХА) ґрунтується на використанні хроматографічних мембран (імуностріпів) із відомими антитілами або вірусними антигенами. У разі нанесення досліджуваного матеріалу (кров, кал, змиви зі слизових оболонок) за наявності гомологічних імунореагентів утворюється фіолетова смуга. ІХА використовується для експрес- і ретроспективної діагностики вірусних інфекцій дрібних тварин (чума, аденовіроз і грип собак, парвовірусна та коронавірусна інфекції собак і котів, лейкемія та імунодефіцит котів).

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

Т е м а 5. СПЕЦІАЛЬНА ВІРУСОЛОГІЯ. СТІЙКІСТЬ ВІРУСІВ ДО ФІЗИКО-ХІМІЧНИХ ФАКТОРІВ. ОСНОВНІ КЛІНІЧНІ ОЗНАКИ І ПАТОЛОГОАНАТОМІЧНІ ЗМІНИ ЗА ВІРУСНИХ ХВОРОБ ТВАРИН

Віруси різних таксономічних груп мають неоднакову резистентність до дії фізико-хімічних факторів навколишнього середовища. Якщо говорити в дуже загальних рисах, найменш стійкими є складно організовані віруси (із суперкапсидною оболонкою). Вони чутливі до *ефіру*, *хлороформу*, *детергентів*, *кислого рН* (наприклад, ортоміксо-, параміксо-, флаві-, корона- і

ортогерпесвіруси). Просто організовані віруси з ікосаедральним типом симетрії стійкі до зазначених факторів (наприклад, адено-, парво-, седорео- і спінареовіруси).

Згубний вплив на віруси, незалежно від складності їхньої організації, має *висока температура*. Чим вона вища, тим швидше віруси втрачають інфекційні властивості, і навпаки. Проте є віруси, дуже стійкі до дії високих температур (збудники гепатитів А і В).

Стійкість вірусів до *ультрафіолетового опромінення, іонізуючої радіації та дезінфікувальних речовин* залежить від багатьох чинників, зокрема щільності упакування нуклеїнової кислоти в капсид, розмірів геному, наявності зовнішньої ліпопротеїнової оболонки. Висока резистентність до несприятливих факторів властива збудникам африканської чуми свиней, ящуру, ентеровірусам, ротавірусам, що зумовлює їхнє тривале виживання в навколишньому середовищі.

СКАЗ

1. Стійкість вірусу

Строки збереження: у слині, що виділяється хворою твариною, – 24 год, у гниючому трупі – 2–3 тижні, в поверхневих шарах ґрунту – 2–3 міс. За 0–4°C – кілька діб, за –70°C і в ліофілізованому стані – кілька років. За 70–100°C – моментальна інактивація, 60°C – 5–10 хв, 50°C – 1 год, 23°C – 28–53 доби. Дія сонячних променів – від 40 год до 5–7 діб, ультрафіолетове випромінювання – 5–10 хв, висушування – 10–14 діб.

Швидко інактивується за рН 3,0–11,0. 1–5%-й розчин формаліну – 5 хв, 1%-й розчин перманганату калію – 20 хв, 3–5%-й розчин соляної кислоти – 5 хв, 10%-й розчин йоду – 5 хв.

2. Клінічні ознаки

Інкубаційний період – у середньому 2–8 тижнів. Хвороба має гострий перебіг. Розрізняють 2 форми сказу.

Буйна форма має 3 стадії. *Продромальна (початкова) стадія*: підвищення температури, зміна поведінка тварини, збочений апетит, свербіння в місці укусу, галюцинації, утруднене ковтання (внаслідок парезу м'язів глотки), посилена слинотеча. *Стадія збудження*: зникнення почуття страху, агресивність, напади буйства. *Паралітична стадія*: паралічі м'язів, повна втрата голосу (афонія), відвисання нижньої щелепи, косоокість. Загибель – через 8–11 діб.

Тиха (паралітична) форма трапляється в разі зараження собак від лисиць. Збудження незначне або взагалі відсутнє, утруднене

ковтання, слинотеча, відвисання нижньої щелепи, паралічі м'язів кінцівок та тулуба, загибель через 2–4 доби.

3. Патологоанатомічні зміни

Трупи тварин виснажені, на шкірі – сліди укусів, незагоєних ран, а в м'ясоїдних – травми губ, пошкодження зубів. Шерсть у ділянці нижньої щелепи і підгрудка змочена слиною. Застійне повнокров'я внутрішніх органів. Кров темно-червоного кольору, не згортається. Шлунок іноді містить неїстівні предмети. набряк і крововиливи на слизовій оболонці травного тракту і в головному мозку.

За гістологічного дослідження головного і спинного мозку виявляють дисемінований негнійний менінгоенцефаломієліт, а в цитоплазмі нейронів – тільця Бабеша–Негрі (у 65–85% випадків сказу). Вони зазвичай відсутні за сказу, що поширюється дикими м'ясоїдними, і у тварин, убитих на початку хвороби.

ХВОРОБА АУЄСКІ

1. Стійкість вірусу

Строки збереження: у сіні, зерні, ґрунті й тирсі в осінньо-зимовий період – 21–60 діб, навесні – 35 діб, влітку – 20 діб; на поверхні ґрунту – 2–5 діб, у скиртах сіна – 18–26 діб; у гниючих трупах – 10–28 діб, у висохлих трупах гризунів – 8–175 діб; за біотермічного знезараження гною – 8–15 діб.

За 56–60°C – 30–45 хв., 70°C – 15 хв, 1–4°C – від 130 діб до 4 років. Прямі сонячні промені – 6 год., розсіяні сонячні промені – 12–18 год, УФ-промені – 1 год. 3%-й розчин їдкового натру, 20%-ва суспензія свіжогашеного вапна, освітлений розчин хлорного вапна з 3% активного хлору – 5–20 хв.

2. Клінічні ознаки

Інкубаційний період – 1–8 діб, іноді до 15–20 діб.

У *дорослих свиней* хвороба протікає доброякісно: гарячка, пригнічення, зниження апетиту, кашель, риніт, кон'юнктивіт, іноді блювання, рідко – ураження ЦНС. У свиноматок – порушення лактації, аборти, мертвонародження і муміфікація плоду.

У *поросят-сисунів* – ознаки менінгоенцефаліту: загальна слабкість, нерухомість, судоми, загибель через 4–12 год.

У *поросят віком від 10 діб до 4 міс.* – ознаки септицемії та менінгоенцефаліту: гарячка, пригнічення, слабкість, сонливість, блювання, спрага; манежні рухи, судоми, паралічі кінцівок, м'язів гортані та глотки, афонія, сильна слинотеча; слизові витікання з носа,

прискорене дихання, набряк легень, повна прострація і загибель через 1–2 доби.

У *підсвинків* за нашаровування секундарних інфекцій – ознаки катаральної та крупозної пневмонії.

У *тварин інших видів* основні клінічні ознаки – сильне свербіння (крім норок і соболів), слинотеча, сильне збудження, судоми, паралічі та загибель через 1–2 доби.

3. Патологоанатомічні зміни

У всіх тварин, окрім свиней, норок і соболів, виявляють розчоси шкіри з набряком підшкірної клітковини, запалення мозку і мозкових оболонок, крововиливи. У свиней – набряк легень, катаральний гастроентерит, серозно-геморагічний риніт і гайморит, набряк гортані. У поросят у мигдаликах, легенях, печінці, селезінці – некротичні фокуси. У поросят до 2-міс. віку – запалення мозкових оболонок, набряк головного мозку. У м'ясоїдних у шлунку часто виявляють сторонні предмети; слизові оболонки шлунку і кишечника гіперемійовані та з крововиливами.

ЯЩУР

1. Стійкість вірусу

Строки збереження: в замороженому м'ясі – більше року, за дозрівання м'яса – 1–2 доби, у засоленому м'ясі за 1°C – 4 міс., у ковбасах – 2 міс.; у молоці за 65°C – 30 хв, 70°C – 15 хв, 80–100°C – кілька сек, в охолодженому молоці – 12 діб, у маслі – 45 діб. Швидко інактивується за скисання, пастеризації та кип'ятіння молока. У стінках афт – 67 діб, на шкірі тварин – 1 міс, у гною – 39 діб, у стічних водах у холодну пору – 103 доби, в скиртах сіна – 6 міс. За –40–70°C – кілька років.

Стійкий до ефіру, хлороформу, чутливий до кислого (<6,0) і лужного (>10,0) рН. Найбільш стабільний за рН 7,0–7,5. Дезінфікувальні розчини їдкового натру (2%-й), формальдегіду (2%-й), свіжогашеного вапна (20%-й) – інактивація за 10–30 хв.

2. Клінічні ознаки

Інкубаційний період – 1–7 (іноді – 14–21) діб. Найбільш характерні ознаки хвороби – у *ВРХ*: гарячка, пригнічення, відмова від корму, припинення жуйки, підвищена саливація; через 2–3 доби – поява афт на слизовій оболонці ротової порожнини, в деяких тварин – у міжкопитній щілині (кульгавість) і на вимені (мастит). Через добу афти розриваються й утворюються ерозії, які заживають через

2–3 тижні. У тільних корів можливі аборти, мертвонародження, тяжкі пологи, затримка посліду та різні післяродові ускладнення.

За незадовільних умов утримання нашаровується секундарна мікрофлора – ускладнення: некрози й абсцеси в ротовій порожнині, панариції та флегмони на кінцівках, ураження м'яких тканин копита аж до спадання рогового черевика.

У *молодняка* – злоякісний перебіг хвороби: гарячка, сильне пригнічення і слабкість, тахікардія, геморагічний гастроентерит, загибель від паралічу серця.

В *овець, кіз і свиней* афти з'являються частіше на кінцівках і вимені, рідше на слизовій оболонці ротової порожнини. У свиней також уражається «п'ятачок».

3. Патологоанатомічні зміни

Афти та ерозії в ротовій порожнині, іноді на слизовій оболонці стравоходу і передшлунків жуйних. У *молодняка* – геморагічний гастроентерит, дистрофічні зміни в серці («тигрове серце») і скелетних м'язах.

ПАРАГРИП ВРХ

1. Стійкість вірусу

Строки збереження: за 56–60°C – 30–60 хв, 37°C – 2–4 доби, 4°C – 4–5 міс., ліофілізовані препарати – 2–4 роки. Краще зберігається за 4°C, ніж за –20°C.

Чутливий до ефіру, хлороформу, дезоксихолату натрію, формальдегіду, УФ-променів, рН 3,0. Дезінфікувальні розчини формальдегіду (1–2%-й), їдкого натру (0,5%-й), хлорного вапна (1%-й) – інактивація за 5 хв.

2. Клінічні ознаки

Інкубаційний період – 1–5 діб.

Гострий перебіг: гарячка, пригнічення, зниження апетиту, прискорення пульсу і дихання, сухий кашель, хрипи; спочатку серозно-слизовий, потім гнійний ексудат із носової порожнини, слинотеча, слезотеча; в деяких тварин – діарея. За доброякісного перебігу видужання через 1–2 тижні.

За бактеріальних ускладнень – *підгострий* або *хронічний перебіг* з ураженням легень і плеври: сильний кашель, поява тягучого, густого ексудату з носової порожнини, схуднення, хронічна бронхопневмонія, плеврит; іноді – діарея та ерозії в ротовій порожнині.

У тільних корів можливі аборти і народження нежиттєздатних телят.

3. Патологоанатомічні зміни

Катаральне запалення слизових оболонок верхніх дихальних шляхів, скупчення тягучого слизу, іноді – поодинокі дрібні крововиливи. У легенях – гіперемія, ділянки ущільнення, альвеолярна та інтерстиціальна емфізема, червона або сіра гепатизація. У плевральній порожнині – серозно-фібринозний ексудат, нитки фібрину на плеврі. Гіперемія і набряк регіонарних лімфовузлів.

ІНФЕКЦІЙНИЙ РИНОТРАХЕЇТ ВРХ (інфекційний пустульозний вульвовагініт ВРХ)

1. Стійкість вірусу

Строки збереження: у замороженій спермі биків – 4–12 міс; сонячні промені – 2 доби; за 56°C – 20 хв, 37°C – 4–10 діб, 22°C – 50 діб, –60–70°C – 7–9 міс, ліофілізація – 8 міс.

Чутливий до ефіру, хлороформу, рН 3,0. Дезінфікувальні розчини їдкою натру (2%-й), формаліну (1–2%-й), фенолу (3%-й) – інактивація за 5–10 хв.

2. Клінічні ознаки

Найчастіше хвороба протікає в 2 формах: респіраторній і генітальній. У телят раннього віку, крім дихальних шляхів, уражається травний канал.

Респіраторна форма. Гарячка, пригнічення, гіперемія слизової оболонки верхніх дихальних шляхів, серозні витікання з носа, сухий, болючий кашель, пінисте слиновиділення. На носовому дзеркалі та слизовій оболонці носа – виразки, вкриті некротичними кірками. У деяких тварин – кон'юнктивіт, запалення суглобів, кульгавість. У телят можлива діарея. За доброякісного перебігу видужання через 7–10 діб, за бактеріальних ускладнень – бронхопневмонія, загибель.

Генітальна форма. У самок – пустульозний вульвовагініт, у самців – баланопостит. На слизовій оболонці вульви, вагіни і препуція – гіперемія, набряк, міхурці, заповнені прозорою рідиною, потім виразки, вкриті слизом і плівками фібрину. Зі статевих органів – слизово-гнійні виділення. За неускладненого перебігу через 10–14 діб видужання. У бугаїв часто буває латентна інфекція з виділенням вірусу зі спермою.

Кератокон'юнктивальна форма буває в телят 2-6-місячного віку в «чистому» вигляді або одночасно з респіраторною формою.

Запалення кон'юнктиви, рогівки і слизової оболонки третього віка; сльозотеча, світлобоязливість, утворення на поверхні ока некротичної плівки сірого кольору.

Нервова (енцефаломієлітна) форма хвороби трапляється в телят досить рідко. Порушення координації руху, збудження, пригнічення, загибель.

Шкірна форма буває частіше в бугаїв-плідників одночасно з ураженням статевих органів. На шкірі в ділянці ануса, основи хвоста, проміжності, ягідниць і мошонки – облісіння, екземоподібне висипання, крустозний і пустульозний дерматит.

Ерозійний стоматит проявляється в основному у телят до 3-тижневого віку. Гарячка, сильне пригнічення, інтенсивна слинотеча, запалення та ерозії на носовому дзеркалі. Пізніше – симптоми ураження респіраторного тракту: кашель, задишка, слизово-гнійні витікання з носа.

Інфекція тільних корів. Аборти реєструють частіше в нетелів, ніж у корів. За декілька тижнів до абортів тварини хворіють на респіраторну форму хвороби. Аборти часто супроводжуються затримкою посліду, некрозом плаценти, ендометритами, тривалим зниженням молочної продуктивності.

3. Патологоанатомічні зміни

Респіраторна форма. У верхніх дихальних шляхах – скопичення слизово-гнійного ексудату з домішками фібрину; набряк слизової оболонки з вогнищами некрозу, виразками і крововиливами; гіперемія регіонарних лімфовузлів; незначний набряк та гіперемія слизової оболонки шлунку і кишечника. За бактеріальних ускладнень – катаральна і гнійно-катаральна бронхопневмонія.

Генітальна форма. Набряк, везикули і виразки на слизових оболонках статевих шляхів; за ускладнень – ендометрити. Абортовані плоди набряклі, на шкірі та в печінці – вогнища некрозу, навколонирикова тканина просочена геморагічним ексудатом, на серозних оболонках крововиливи. За гістологічного дослідження в клітинах епітелію слизових оболонок – внутрішньоядерні тільця-включення.

Нервова форма: набряк мозкових оболонок і крововиливи.

ВІРУСНА ДІАРЕЯ ВРХ (хвороба слизових оболонок ВРХ)

1. Стійкість вірусу

Строки збереження: у патматеріалі за 4°C – 6 міс, за 37°C – 5 діб, 56°C – 1 год, –20–70°C – декілька років, –15°C – 1 рік.

Чутливий до ефіру, хлороформу, трипсину, дезоксихолату натрію, рН 3,0.

2. Клінічні ознаки

Інкубаційний період – 2–14 діб. Хвороба протікає в різних формах.

Діарея новонароджених телят виникає в поодиноких випадках у перші 24 год життя як результат внутрішньоутробного зараження. Хворі телята заражають контактувальних фекально-оральним шляхом, унаслідок чого в телят 8–10 денного віку розвиваються масові «пізні» діареї. *Специфічні ознаки:* гіперемія слизової оболонки ротової порожнини, гінгівіт, слинотеча, іноді крововиливи та ерозії на верхньому піднебінні. Захворювання часто закінчується летально або переходить у хронічну форму з ураженням дихальних шляхів.

Респіраторна форма розвивається в телят 20–60-денного віку на фоні імунодепресивної дії вірусу. Хронічна гнійна пневмонія, фібринозний плеврит і перикардит. *Специфічні ознаки:* 3–4-денна лейкопенія, розрідження калу, іноді короткочасні ремітивні проноси, гінгівіт, слинотеча, ерозійно-виразкове ураження слизової оболонки ротової порожнини, губ, носового дзеркала, носової порожнини.

Хвороба слизових оболонок (гостра, підгостра, рідко хронічна) проявляється частіше всього у віці від 6 місяців до 2 років як результат внутрішньоутробної інфекції, спричиненої нецитопатогенним штамом, і наступної реінфекції цитопатогенним штамом вірусу. Двохвильова температурна реакція з інтервалом 2–3 доби, лейкопенія, сильне пригнічення, анорексія. На 3–4-ту добу діарея різної тяжкості. Ерозійно-виразкові ураження слизової оболонки ротової порожнини, губ, ясен, носового дзеркала, носової порожнини, а також сосків вимені, вульви, міжкопитної щілини і кайми копита. У деяких тварин – помутніння рогівки ока. Прогресувальна дегідратація, виснаженням, загибель.

Вірусна діарея розвивається у тварин старше 2 років і в корів. Зниження апетиту і молочної продуктивності, лейкопенія, тривала діарея.

Генітальна форма виникає в корів, інфікованих контамінованою спермою. Запалення яєчників, порушення функції запліднення.

Інфекція тільних корів. Наслідки внутрішньоутробного інфікування плоду залежать від його віку і штаму вірусу. Цитопатогенні штами викликають аборти, конгенітальні дефекти (гіпоплазія мозочка, гідроцефалія, деформація м'язів, кривошиїсть, сліпота), а нецитопатогенні – народження мертвих або персистентно інфікованих телят. Ознакою внутрішньоутробної інфекції є наявність антитіл у новонароджених телят до випоювання молозива.

3. Патологоанатомічні зміни

Виснаження, зневоднення, ерозії та виразки на слизових оболонках шлунково-кишкового тракту. Слизові оболонки сичуга і тонкого кишечника набряклі, з крововиливами. У просвіті кишечника – кал із домішками слизу і крові. Лімфовузли гіперемійовані; печінка збільшена з вогнищами некрозу; нирки набряклі, з крововиливами під капсулою. Можливі ерозії та виразки на слизовій оболонці вагіни, носових ходів, у ніздрях і на шкірі міжкопитної щілини. Запалення верхівок легень.

КЛАСИЧНА ЧУМА СВИНЕЙ

1. Стійкість вірусу

Строки збереження: в охолоджених м'ясних тушах – понад 2–4 міс, у заморожених – кілька років; у солонині – понад 10 міс, у копченостях – понад 3 міс; у сироватці крові за 37°C – 18–20 діб, 2–4°C – 4–6 міс. У гною і трупах – 3–5 діб, у ґрунті – 1–2 тижні, у свинарниках (підлоги, стіни) – рік. Сонячні промені – інактивація за 5–9 діб, за 56°C – 60 хв, 60°C – 10 хв.

Чутливий до ефіру, хлороформу, дезоксихолату натрію, трипсину і ліпаз, стабільний в діапазоні рН 5–10. Найкращі дезінфектанти – 2–3%-й їдкий натр, 2,5%-й формальдегід і 15–20%-ва водна суспензія хлорного вапна – інактивація за 1 год.

2. Клінічні ознаки

Інкубаційний період – 3–9 діб, іноді – до 2–3 тижнів.

Надгострий перебіг хвороби буває нечасто в молодих тварин. Гарячка, пригнічення, блювання, прискорене серцебиття і дихання, яскраво-червоні плями на шкірі, прогресувальна загальна слабкість і загибель через 1–2 доби.

Гострий перебіг. Гарячка, пригнічення, слабкість, відмова від корму, блювання; слизово-гнійний кон'юнктивіт, опухання повік, слизово-гнійний риніт, іноді носові кровотечі. Запор змінюється проносом, іноді кривавим. Сечовивиділення утруднено, сеча темно-

червоного кольору. В окремих тварин – ознаки ураження ЦНС: порушення координації рухів, судоми і паралічі задніх кінцівок. Поросні свиноматки абортують. На шкірі – спочатку пустули, потім крапчасті крововиливи, темно-багрові плями, що не зникають за натискання. Прогресувальна слабкість, прискорене й утруднене дихання, серцева недостатність, ціаноз шкіри. Лейкопенія, зниження температури тіла нижче норми, загибель на 7–10-ту добу.

Підгострий перебіг спостерігають після гострого перебігу, хвороба триває 3 тижні й ускладнюється секундарними інфекціями. У разі ускладнень сальмонельозом розвивається *кишкова форма* чуми (крупозно-дифтеритичний коліт), за ускладнень пастерельозом – *легенева форма* чуми (крупозна пневмонія). Нерідко спостерігають *змішану форму* хвороби, коли чума ускладнюється одночасно сальмонельозом і пастерельозом. Тварини гинуть.

Хронічний перебіг триває кілька тижнів і навіть місяців. Крупозно-дифтеритичне ураження шлунково-кишкового тракту, пневмонія, плеврит.

Буває субклінічний і хронічний перебіг хвороби з порушенням функції відтворення (безпліддя, аборти, мертвонародження).

3. Патологоанатомічні зміни

Гострий перебіг. Геморагічний діатез. Лімфовузли збільшені, гіперемійовані, з крововиливами і мармуровим рисунком. Легені кровонаповнені, набряклі, з крововиливами і вогнищами фібринозно-геморагічної пневмонії. По краях селезінки – чорно-червоні інфаркти. Нирки анемічні, з крововиливами. У печінці – явища застійної гіперемії та дистрофії паренхіми. Катарально-геморагічний гастроентерит. Негнійний енцефаломієліт.

За *підгострого і хронічного перебігу* геморагічний діатез менш виражений. За *легеневої форми* виявляють у легенях гепатизовані ділянки з множинними вогнищами некрозу, а також серозно-фібринозний плеврит і перикардит. Для *кишкової форми* за підгострого перебігу властиві крупозно-геморагічний гастроентерит, а за хронічного – крупозно-дифтеритичні та виразково-некротичні ураження, особливо яскраво виражені в товстому відділі кишечника (чумні «бутони»).

ХВОРОБА ТЕШЕНА

1. Стійкість вірусу

Строки збереження: у солених і копчених продуктах – понад 3 тижні, у гною та інфікованих приміщеннях – 6–8 тижнів, за 60°C – 20 хв, 70°C – 10 хв, 37°C – 17 діб, висушування на сонці – 3 тижні, за 0–4°C – рік, –20–80°C – кілька років.

Стійкий до ефіру, хлороформу, трипсину, широкого діапазону рН (2,8–9,5). 0,5%-й фенол – інактивація за 18 год, 2%-й їдкий натр – 7 год, 2%-й формальдегід – 1 год, 5%-й хлороформ – 3 год.

2. Клінічні ознаки

Інкубаційний період – 1–4 тижні.

Надгострий перебіг: енцефаліт, загальний параліч і загибель упродовж 2 діб. *Гострий перебіг:* порушення координації рухів, судоми, збудження, гіперестезія шкіри, паралічі кінцівок, скреготіння зубами, ністагм (мимовільна рухливість очей), афонія. Через 1–2 доби повний параліч і загибель. *Підгострий перебіг:* ознаки ураження ЦНС менше виражені. *Хронічний перебіг:* енцефаліт не розвивається або проявляється слабо. Багато тварин видужує, але залишається кульгавість. Частина тварин гине від ускладнень (пневмонії).

3. Патологоанатомічні зміни

У головному мозку – гіперемія та набряк мозкових оболонок, крововиливи. Гіперемія слизових оболонок носової порожнини і кишечника. За хронічного перебігу – атрофія м'язів і пневмонія. За гістологічного дослідження – негнійний енцефаломієліт.

РИНОПНЕВМОНІЯ КОНЕЙ (вірусний аборт кобил)

1. Стійкість вірусу

Строки збереження: в патматеріалі за –18–20°C – 2 роки, в абортваному плоді за 4°C – тиждень, на шерсті коня – 6 тижнів, у темному приміщенні за 20–27°C – 2 тижні. За 56°C – 10 хв, 37°C – 1–7 діб, 18–20°C – 7–8 діб, 4°C – 7–8 міс, –18–20°C – 12–14 міс.

Чутливий до ефіру, хлороформу, дезоксихлорату натрію, 3%-го формальдегіду, 4%-го їдкого натру, рН 3,0.

2. Клінічні ознаки

Інкубаційний період – 3–4 тижні. Розрізняють 3 клінічні форми хвороби.

Респіраторна форма виникає на початку епізоотії найчастіше в лоша́т віком 6–9 міс. Гарячка, пригнічення, кон'юнктивіт, риніт, збільшення підщелепових лімфовузлів. Хвороба має доброякісний

перебіг, триває 10–15 днів і закінчується видужанням. За поганих умов утримання – пневмонія: кашель, утруднене дихання, тяжкий загальний стан і загибель.

Абортивна форма спостерігається в жеребних кобил після респіраторного захворювання або в «чистому» вигляді. Тварини абортують зазвичай через 10–150 днів після зараження на 8–11-му місяці жеребності, раптово без передвісників. Післяродових ускладнень немає. Кобили, заражені після 9-го місяця жеребності, можуть народити мертве або нежиттєздатне лоша.

Нервова форма трапляється в кобил після аборту як ускладнення у вигляді парезів та паралічів із летальним наслідком.

3. Патологоанатомічні зміни

Гіперемія та набряк слизових оболонок верхніх дихальних шляхів і легень. Крововиливи на слизових і серозних оболонках. Набряк селезінки і лімфовузлів. У кобил за нервової форми – менінгоенцефаломієліт.

В абортованих плодів – жовтяничність підшкірної клітковини, накопичення серозно-геморагічного ексудату в грудній і черевній порожнинах, набряк легень.

ЧУМА М'ЯСОЇДНИХ

1. Стійкість вірусу

Строки збереження: у носовому секреті та калі – 7–11 днів, у крові за 4°C – 2 тижні. За –20°C в органах собак – 6 міс., у крові – 3 міс., у носовому слизу – 1–2 міс., у ліофілізованому стані – не менше року, за 60°C – 30 хв. 1%-й розчин лізолу та УФ-промені – інактивація за 30 хв, 2%-й розчин їдкового натру – 60 хв, сонячні промені та 0,1–0,5%-ві розчини формаліну і фенолу – кілька год.

2. Клінічні ознаки

Інкубаційний період у собак – 2–3 тижні, в хутрових звірів – від 9 днів до 1 міс., іноді до 3 міс.

Легенева форма: гарячка, катаральне запалення слизових оболонок дихальних шляхів (кашель, чхання, фіркання, гнійні витікання з носа, закупорення носових ходів), катаральна пневмонія.

Кишкова форма: катаральне запалення шлунково-кишкового каналу (блювання, слизовий або кривавий пронос).

Шкірна форма: на внутрішній поверхні стегон, вушних раковин, черевної стінки, біля рота і носа – пустульозна висипка (спочатку червонуваті вузлики, заповнені ексудатом; потім міхурці лопаються, підсихають з утворенням бурих кірок).

Нервова форма: пригнічення, лякливність, порушення координації рухів, тонічні та клонічні судоми окремих груп м'язів, епілептичні напади, парези й паралічі задніх (іноді передніх) кінцівок, сфінктера сечового міхура, прямої кишки, лицевого нерва.

За всіх форм хвороби – ураження очей: гіперемія кон'юнктиви, світлобоязливність; спочатку прозорі, потім слизово-гнійні витікання, гіперемія та опухання повік, помутніння рогівки, кератит, можливі виразки.

Форма чуми – *hard-pad (тверда лапа)*: болючість та ороговіння шкіри кінцівок, нервові явища, загибель.

Абортивна форма: 1–2-денне нездужання.

Частіше спостерігається **змішана форма** хвороби.

Хвороба протікає гостро, підгостро і хронічно. *Гострий перебіг* буває рідко: гарячка, коматозний стан, загибель. Частіше реєструють *підгострий перебіг*. *Хронічний перебіг* властивий скоріше всього нервовій формі чуми. Тривалість хвороби – кілька тижнів або місяців. Нервові явища (паралічі й тіки) можуть залишитися на все життя.

Клінічні ознаки чуми в різних видів тварин дещо відрізняються. У *лисиць і песців* шкірна форма зазвичай не спостерігається, а нервова домінує наприкінці епізоотії. У *песців* катаральні явища виражені слабше, ніж у лисиць. У *норок* переважає шкірна форма: припухання лап, шкіри повік, носа, губ і вух; припухлі ділянки вкриваються ексудатом з утворенням кірок. У *тхорів* найбільш виражені явища катару та дегідратації, вип'ячування і набряк прямої кишки.

3. Патологоанатомічні зміни

Найчастіше зміни виявляють в *органах дихання*: слизова оболонка дихальних шляхів гіперемійована, набрякла, вкрита інтенсивним слизовим або слизово-гнійним ексудатом; у легенях – сіро-червоні або червоно-бурі вогнища ущільнення чи ателектазу.

Слизова оболонка шлунково-кишкового тракту катарально запалена з крововиливами, ерозіями і виразками. Лімфовузли грудної та черевної порожнини збільшені, соковиті на розрізі. Гіперемія та крововиливи в нирках і на слизових оболонках сечового міхура. Дистрофічні зміни і крововиливи в серці, набряк головного мозку, переповнення кров'ю мозкових судин.

МІКСОМАТОЗ

1. Стійкість вірусу

Строки збереження: у трупах кролів – тиждень; у висушеному патматеріалі – 20 діб; у ґрунті – 10 тижнів. У шкурках кролів, висушених за 15–20°C, – 10 міс., а за 70°C – 1,5 год. У вологому середовищі за 8–10°C – 3 міс, 26–30°C – 10 діб. За 55–60°C – 15 хв, у замороженому стані – понад 2 років.

Стійкий до широкого діапазону рН (4,0–12,0). Чутливий до ефіру, 3%-х розчинів їдконого натру і формальдегіду, просвітленого розчину хлорного вапна з 2% активного хлору.

2. Клінічні ознаки

Інкубаційний період – 3–7 діб. Перебіг хвороби гострий, підгострий і хронічний. Розрізняють 2 форми хвороби.

Класична (набрякова) форма. Набряки підшкірної клітковини і маленькі вузлики, переважно в ділянці голови, статевих органів та ануса. Сильна припухлість передньої частини голови (особливо на очах і вухах), валикоподібні складки шкіри («левова голова»). Серозно-гнійний кон'юнктивіт, потім гнійний блефароко'юнктивіт. Накопичення гнійних виділень між повіками та очним яблуком, втрата зору. Гнійний риніт, утруднене дихання. Загибель – через 5–6 діб у молодняка і через 10–14 діб у дорослих тварин.

Нодулярна (вузликова) форма хвороби протікає більш доброякісно. У ділянці спини, вушних раковин, носа, повік, лап, поміж кігтями і пальцями – вузлики (папули) різної величини, через 10–14 діб – вогнища некрозу, які загоюються впродовж 2–3 тижнів. Хвороба триває до 30–40 діб, закінчується частіше загибеллю.

3. Патологоанатомічні зміни

У ділянці голови, шиї, ануса та зовнішніх статевих органів – драглисті набряки підшкірної клітковини. На шкірі – вузликові розростання, вогнища некрозу. Лімфовузли та селезінка збільшені, гіперемійовані. Легені набряклі, іноді з вогнищами пневмонії, гостре запалення слизової оболонки дихальних шляхів.

АЛЕУТСЬКА ХВОРОБА НОРОК

1. Стійкість вірусу

Строки збереження: за 6°C – 11 міс., 56°C – 30 хв.

Стійкий до ефіру, дезоксихолату натрію, протеолітичних ензимів, рН 3,0. Інактивується під дією прямого сонячного проміння, 2–3%-го формальдегіду, 2%-го їдконого натру.

2. Клінічні ознаки

Інкубаційний період – від 1 міс. до 2 років. Перебіг хвороби гострий, підгострий і хронічний. Пригнічення, зниження апетиту, спрага, прогресувальне схуднення; періодичні кровотечі з рота і носа, на слизовій оболонці ротової порожнини – виразки; кал дьогтеподібний, із домішками крові; прогресувальна анемія, ниркова недостатність. У деяких норок – порушення координації рухів, парези і паралічі кінцівок. У вагітних самок можливі аборти, народження мертвих або нежиттєздатних щенят. Хвороба закінчується кахексією та загибеллю в коматозному стані.

3. Патологоанатомічні зміни

Труп виснажений. Збільшення печінки, селезінки, нирок і лімфовузлів. Ерозії на слизовій оболонці ротової порожнини і шлунка. За гістологічного дослідження – дифузний плазмоцитоз, гломерулонефрит, периартеріт.

ГРИП ПТИЦІ

1. Стійкість вірусу

Строки збереження: у замороженому м'ясі – 287 діб, в інкубованих яйцях – 120 діб, на пір'ї – 8–20 діб; у посліді за 4°C – 35 діб, 37°C – 6 діб; за –30°C і в ліофілізованому стані – 2 роки; за 4°C – кілька тижнів, 56°C – 1 год, 60°C – 10 хв, 65–70°C – 2–5 хв. Сонячні промені – 40 год.

Чутливий до рН 3,0. Розчини 5%-ї соляної кислоти, 4%-го фенолу, 3%-го хлорного вапна, 2%-го їдкого натру, 5%-ї карболової кислоти – інактивація за 5 хв.

2. Клінічні ознаки

Інкубаційний період – 1–5 діб. Перебіг хвороби гострий і підгострий.

Класична чума птиці. Пригнічення, скуйовдженість пір'я, зниження несучості; гіперемія та набряк видимих слизових оболонок; слизові витікання з дзьоба, чхання, утруднене дихання, хрипи, задишка; ціаноз гребеня і сережок; кон'юнктивіт, сльозотеча, діарея, зниження несучості. Можливі нервові явища: атаксія, тремор, манежні рухи, судоми. Летальність – 70–100%.

3. Патологоанатомічні зміни

Геморагічний діатез, набряк підшкірної клітковини, катарально-геморагічний гастроентерит, перитоніт, катаральне запалення слизових оболонок верхніх дихальних шляхів і легень, бронхіт, синюшність м'язів із крововиливами.

НЬЮКАСЛСЬКА ХВОРОБА

1. Стійкість вірусу

Строки збереження: у пташниках взимку – 140 діб, влітку – тиждень, у посліді – 20 діб, у трупах птиці – 1 міс., у заморожених тушках курей – понад 2 роки. За кип'ятіння тушок птиці – 1 год. У кліщах – 7 міс, на шкаралупі яєць під час інкубації – 1–2 тижні. Прямі сонячні промені – інактивація за 2 доби, розсіяне світло – 15 діб.

Стійкий у широкому діапазоні рН (2,0–10,0). 2%-й гарячий розчин їдкого натру, 2%-й розчин формальдегіду, освітлений розчин хлорного вапна (з 2% активного хлору) – інактивація за декілька хвилин.

2. Клінічні ознаки

Інкубаційний період – 2–15 діб.

Хвороба протікає гостро (1–4 доби), підгостро (до 10 діб) і хронічно (2–3 тижні). Розрізняють **5 форм** клінічного прояву хвороби (залежно від вірулентності штаму вірусу).

1) Велогенна вісцеротропна («псевдочума птиці», форма Дойля) – спричинюють велогенні (високовірулентні) штами вірусу. Підвищення температури, пригнічення, слабкість, втрата апетиту, скуйовдженість пір'я, діарея (послід водянистий, зеленувато-жовтого кольору, іноді з домішками крові), сильні виділення з рота і носа, утруднене дихання (з відкритим дзьобом), хрипи, кашель, чхання, ознаки ураження ЦНС (частіше в молодняка: порушення координації рухів, м'язовий тремор, парези і паралічі лап, крил, скручування шиї), геморагічні ураження травного тракту. Летальність – до 90%.

2) Велогенна нейротропна (пневмоенцефаліт, форма Біча) – спричинюють велогенні штами вірусу, реєструється рідко. Ураження органів дихання і ЦНС. Смертність від 10 до 50%, серед курчат – до 90%.

3) Пневмотропна мезогенна (форма Бодетта) – спричинюють мезогенні штами вірусу (середньої вірулентності). У дорослих курей – гостре респіраторне захворювання з незначним відходом, у молодняка – іноді летальне нервово захворювання.

4) Лентогенна (форма Хітчнера) – спричинюють лентогенні (слабовірулентні) штами вірусу. Незначні ураження респіраторного і гермінативного трактів: ооворити, сальпінгіти, припинення або зниження несучості.

5) Асимптоматична ентеротропна (безсимптомна форма) – спричинюють лентогенні (слабовірулентні) штами вірусу. Розлади

кишечника.

3. Патологоанатомічні зміни

За гострого перебігу найхарактерніші зміни – в *травному каналі*: множинні крововиливи на слизовій оболонці стравоходу, шлунка (у вигляді пояса на межі залозистого і м'язового шлунка) і кишечника, в кишечнику – катаральне запалення, гіперемія, вогнища некрозу, ерозії та виразки. Катаральне запалення слизової оболонки гортані й трахеї, пневмонія. Атрофія та некрози в селезінці, печінці, солітарних лімфовузлах і тимусі. Гіперемія яєчників. Крововиливи в серці. Гіперемія головного та спинного мозку.

ХВОРОБА МАРЕКА

1. Стійкість вірусу

Строки збереження: кров і пухлинний матеріал від хворої птиці тривало зберігається в парах рідкого азоту ($-170-196^{\circ}$), але за $-25-70^{\circ}\text{C}$ швидко втрачає інфекційність. У висохлих епітеліальних клітинах пір'яних фолікул, які потрапляють у послід, підстилку і повітря пташника, – 8 міс., у пилу пташника – 1 рік, у посліді – 4 міс. У лусочках шкіри (перхоті) та в подрібненому сухому пір'ї за $28-41^{\circ}\text{C}$ – 55 діб. За -20°C – понад 4 міс., 4°C – 2 тижні, $20-25^{\circ}\text{C}$ – 4–5 діб, 37 – 18 год, 60°C – 10 хв.

2. Клінічні ознаки

Інкубаційний період – від 2 тижнів до 5 міс. Розрізняють 2 форми хвороби.

Класична форма протікає підгостро або хронічно з ураженням центральної та периферійної нервової системи. Кульгавість, атаксія, парези, паралічі крил, шиї і хвоста. Ураження очей (іридоцикліт): зміна кольору райдужної оболонки (сіроокість), зміна форми зіниці (аж до повного зникнення), сліпоту. Загибель через 4–10 тижнів від дегідратації та виснаження.

Гостра форма. Депресія, відмова від корму, розлад травлення, атаксія, дегідратація, виснаження. Можливі ураження райдужної оболонки, парези і паралічі. Загибель зумовлена утворенням лімфоїдних пухлин у внутрішніх органах.

3. Патологоанатомічні зміни

За класичної форми – дифузні або вогнищеві потовщення нервових стовбурів, зміна їхнього кольору (жовте забарвлення). У ЦНС – негнійний енцефаліт. У 2–10% випадків виявляють лімфоїдні пухлини в основному в яєчниках і сім'яниках. За гострої форми –

лімфоїдні пухлини у внутрішніх органах, шкірі, м'язах.

Контрольні запитання

1. Назвіть види вірусів, які культивуються в організмі лабораторних тварин, методи зараження та ознаки розмноження вірусів. **2.** Назвіть види вірусів, які культивуються в курячих ембріонах, методи зараження та ознаки розмноження вірусів. **3.** Як готується посуд для культури клітин? **4.** Як виявляють у культурі клітин нецитопатогенні віруси? **5.** Якими методами виділяють у культурі клітин латентні віруси та віруси, що важко культивуються *in vitro*? **6.** Охарактеризуйте гемаглютинувальні властивості вірусів. **7.** Розкажіть суть РАЛ. **8.** Розкажіть суть ЗІЕФ. **9.** Розкажіть суть РРІД. **10.** Розкажіть суть РРГ. **11.** Розкажіть суть РІА. **12.** Розкажіть суть ІХА. **13.** Розкажіть суть РНФМ. **14.** Ознайомтеся зі стійкістю вірусів до фізико-хімічних факторів. Назвіть найбільш і найменш стійкі віруси. **15.** Охарактеризуйте основні клінічні ознаки та патологоанатомічні зміни за вірусних хвороб тварин, передбачених тематикою лабораторних занять:

1) Сказ. **2)** Хвороба Ауескі. **3)** Ящур. **4)** Парагрип ВРХ. **5)** Інфекційний ринотрахеїт ВРХ. **6)** Вірусна діарея ВРХ. **7)** Класична чума свиней. **8)** Хвороба Тешена. **9)** Ринопневмонія коней. **10)** Чума м'ясоїдних. **11)** Міксоматоз. **12)** Алеутська хвороба норок. **13)** Грип птиці. **14)** Ньюкаслська хвороба. **15)** Хвороба Марека.

Рекомендована література

Базова

1. Калініна О. С., Панікар І. І., Скибіцький В. Г. Ветеринарна вірусологія : підручник; 3-тє вид., перероб. і доп. Херсон: ОЛДІ-ПЛЮС, 2021. 416 с.
2. Скибіцький В. Г., Калініна О. С., Козловська Г. В. Спеціальна ветеринарна вірусологія : навч. посіб. Київ: ЦП Компринт, 2017. 451 с.

Допоміжна

1. Калініна О. С., Панікар І. І., Скибіцький В. Г. Ветеринарна вірусологія : Підручник. 2-ге вид., перероб. і доп. Київ: Нічлава, 2015. 262 с.
2. Скибіцький В. Г., Ташута С. Г., Козловська Г. В., Калініна О. С. Інфекціологія вірозів тварин : навчальний посібник. Київ: «ФОП Нагорна І. Л.», 2014. 378 с.
3. Козловська Г. В., Калініна О. С., Скибіцький В. Г. Ветеринарно-санітарна вірусологія : навчальний посібник. Херсон: ОЛДІ-ПЛЮС, 2022. 256 с.
4. Скибіцький В. Г., Калініна О. С., Козловська Г. В. Ветеринарно-санітарна вірусологія : підручник. Херсон: ОЛДІ-ПЛЮС, 2020. 416 с.

З М І С Т

Тема 1.	Організація та обладнання вірусологічної лабораторії. Техніка безпеки і правила роботи з вірусомісним матеріалом. Загальні принципи лабораторної діагностики вірусних хвороб тварин	5
	Природа вірусів	5
	Структура та режим роботи вірусологічної лабораторії	6
	Загальні принципи лабораторної діагностики вірусних хвороб тварин	8
Тема 2.	Відбір патологічного матеріалу від хворих і загиблих тварин для лабораторної діагностики вірусних хвороб. Підготовка вірусомісного матеріалу для дослідження	10
	Відбір клінічного і патологоанатомічного вірусомісного матеріалу	10
	Консервування і транспортування патматеріалу	11
	Підготовка вірусомісного матеріалу для дослідження	12
Тема 3.	Індикація вірусів у патологічному матеріалі за наявністю віріонів, тілець-включень і вірусних нуклеїнових кислот	15
	Морфологія вірусів	15
	Виявлення віріонів вірусів методом світлової мікроскопії (вірусоскопія)	16
	Електронна мікроскопія	17
	Виявлення тілець-включень вірусів	18
	Виявлення вірусних нуклеїнових кислот молекулярно-генетичними методами	20
Тема 4.	Культивування вірусів в організмі лабораторних тварин	21
	Біопроба на лабораторних тваринах	22
	Індикація вірусів у організмі лабораторних тварин ...	24
Тема 5.	Культивування вірусів у курячих ембріонах	26
	Біопроба на курячих ембріонах	26
	Індикація вірусів у курячих ембріонах	29

Тема 6.	Культивування вірусів у культурах клітин	32
	Класифікація тканинних культур і принцип їхнього отримання.	33
	Розчини і живильні середовища для культури клітин	37
	Виготовлення первинно-трипсинізованої культури клітин і субкультури клітин.....	38
	Індикація вірусів у культурі клітин	40
Тема 7.	Титрування вірусів	45
	Загальні принципи титрування вірусів	45
	Титрування вірусів за інфекційною активністю	45
	Титрування вірусів за гемаглютинувальною активністю	47
Тема 8.	Серологічні реакції	50
	Загальні принципи серологічних реакцій	50
	Реакція нейтралізації (РН)	51
	Реакція гальмування гемаглютинації (РГГА)	53
	Реакція непрямой гемаглютинації (РНГА)	56
	Реакція гальмування гемадсорбції (РГГАд)	58
	Реакція дифузійної преципітації (РДП)	60
	Реакція зв'язування комплементу (РЗК)	62
	Реакція імуофлуоресценції (РІФ)	67
	Імуоферментний аналіз (ІФА)	70
Тема 9.	Лабораторна діагностика вірусних хвороб тварин	73
	Сказ	73
	Хвороба Ауескі	75
	Ящур	76
	Парагрип-3 ВРХ	78
	Інфекційний ринотрахеїт ВРХ	79
	Вірусна діарея ВРХ	81
	Класична чума свиней	82
	Хвороба Тешена	84
	Ринопневмонія коней	85
	Чума м'ясоїдних	87
	Міксоматоз	88
	Алеутська хвороба норок	89
	Грип птиці	91
	Ньюкаслська хвороба	92
	Хвороба Марека	94

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

Кафедра мікробіології та вірусології

Навчально-методичне видання

Калініна Ольга Сергіївна

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

**Навчально-методичний посібник
для здобувачів вищої освіти
другого (магістерського) рівня спеціальності
Н6 «Ветеринарна медицина»,
які навчаються за скороченою програмою**