

**КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА**

ННЦ «Інститут біології та медицини»

**Робочий зошит з дисципліни
"МІКРОБІОЛОГІЯ, ВІРУСОЛОГІЯ ТА ІМУНОЛОГІЯ"
для студентів, що навчаються за спеціальністю "Медицина"
Частина II «ВІРУСОЛОГІЯ»**

Студента(-ки) 2-го курсу

Ім'я , прізвище

Номер групи

Київ 2023

Шевченко Т. П., Харіна А. В., Коротєєва Г. В., Шевченко О. В.
Будзанівська І. Г. Робочий зошит з дисципліни "Мікробіологія, вірусологія та імунологія" для студентів, що навчаються за спеціальністю "Медицина" (українська мова навчання). Частина II «Вірусологія» / Київський національний університет імені Тараса Шевченка, ННЦ «Інститут біології та медицини», кафедра вірусології. – Київ: 2023. - 100 с.

Рецензенти:

Хоперія В.Г. – д.м.н., завідувачка кафедри фундаментальної медицини ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка

Загородня С.Д. – к.б.н., старший дослідник, завідувачка відділу репродукції вірусів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України

Рекомендовано до друку вченою радою Навчально-наукового центру "Інститут біології та медицини" Київського національного університету імені Тараса Шевченка (протокол № 9 від 14 березня 2023 року)

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА 1

Загальна характеристика вірусів та будова вірусів

ПЕРЕЛІК ПИТАНЬ ДЛЯ ВИВЧЕННЯ

1. Сучасне визначення вірусів.
Місце вірусів у системі живого.
Морфологія та ультраструктура вірусів.
2. Типи симетрії вірусів. Хімічний склад, функції складових частин вірусів.
3. Трансмійна електронна мікроскопія

ТЕОРІЯ

Віруси - це інфекційні агенти, які розмножуються лише в живих клітинах. Вони настільки малі і прості за структурою, що кидають виклик нашим уявленням про життя і живі організми. Найменші віруси за розміром можна порівняти з великою молекулою.

Віруси бувають найрізноманітніших форм і розмірів. Розміри вірусів варіюють від 20 до 1500 нм. Більшість вірусів неможливо побачити за допомогою світлового мікроскопа, оскільки роздільна здатність світлового мікроскопа обмежена приблизно 200 нм, тому для вивчення більшості вірусів потрібен електронний мікроскоп.

Віруси не мають клітинної структури і складаються з нуклеїнової кислоти (РНК або ДНК) та білкової оболонки. Для багатьох вірусів характерна наявність додаткової ліпідвмісної оболонки. Білковий шар, який оточує і захищає нуклеїнові кислоти, називається **капсидом**. Вірусний капсид виконує декілька функцій:

- Захист вірусної нуклеїнової кислоти.
- Взаємодія з нуклеїновою кислотою для пакування.
- Взаємодія з вектором для реалізації передачі.
- Взаємодія з рецепторами хазяїна для проникнення в клітину і

вивільнення нуклеїнової кислоти.

Кожен капсид побудований з однакових субодиниць, які називаються **капсомерами, що складаються з білка**. Капсид разом з нуклеїновою кислотою називається **нуклеокапсидом**. Інфекційна вірусна частинка, яка знаходиться поза клітиною, називається **віріоном**. Форма та тип симетрії є визначальними характеристиками вірусів.

Ікосаедричні віруси на перший погляд мають сферичну форму, але при уважному вивченні виявляється, що вони мають форму ікосаедра (ікосаедричний тип симетрії). Ікосаедр складається з рівносторонніх трикутників, злитих разом у сферичну структуру. Це найоптимальніший спосіб формування закритої оболонки з використанням ідентичних білкових субодиниць. Генетичний матеріал повністю укладений всередині капсиду. Віруси з ікосаедричною структурою вивільняються у докільця під час лізису клітини. Прикладами вірусів з ікосаедричною структурою є **поліовірус, риновірус та аденовірус**.

Віруси зі **спіральною** структурою мають капсид з центральною порожниною або порожнисту трубку, яка утворена білками, розташованими по колу, створюючи форму диска (спіральний тип симетрії). Дискподібні форми прикріплені, утворюючи трубку з порожниною для нуклеїнової кислоти в середині. Всі нитчасті віруси мають спіральну форму. Зазвичай вони мають ширину 15-19 нм і довжину від 300 до 500 нм, залежно від розміру геному. Прикладом вірусу зі спіральною симетрією є **вірус тютюнової мозаїки**.

Суперкапсидні (оболонкові) віруси мають звичайну ікосаедричну або спіральну структуру, яка оточена ліпідною двошаровою мембраною. Оболонка вірусу формується, коли вірус виходить з клітини через брунькування, і інфекційність цих вірусів значною мірою залежить від оболонки. Найвідомішими прикладами суперкапсидних вірусів є вірус грипу, гепатиту С та ВІЛ.

Складні віруси характеризуються поєднанням компонентів з ікосаедричною та спіральною формами або також наявністю додаткових структур у складі віріона (змішаний тип симетрії). Для представників цієї

групи вірусів описано морфологічну структуру типу "голова-хвіст". Такий тип морфології є характерним для вірусів, які інфікують бактерії.

Поксвіруси є одними з найбільших вірусів за розміром і мають складну структуру з унікальною зовнішньою стінкою і капсидом. Одним з найвідоміших представників поксвірусів є вірус натуральної віспи.

Вивчення морфології вірусів. Електронна мікроскопія

Електронна мікроскопія є потужним інструментом для вивчення морфології та розмірів вірусів. Трансмісійна електронна мікроскопія (ТЕМ) базується на тих же принципах, що і світлова мікроскопія, але для "освітлення" зразка використовується пучок електронів, а не світло. Електронні мікроскопи зазвичай дуже великі і використовують електронну гармату для створення потоку електронів, які фокусуються в пучок за допомогою магнітів.

Біологічні макромолекули для того, щоб їх можна було досліджувати в електронному мікроскопі, розміщують на тонесеньких плівках-підкладках. Опорою для цих плівок слугують спеціальні сітки, виготовлені з золота, міді або нікелю. Матеріал плівки повинен бути механічно міцний, мати значну теплопровідність та стійкість до бомбардування електронами. Сітки можуть бути покриті вуглецевими, колодієвими, кварцевими або формваровими плівками (рис. 1.1), у залежності від зразка, який потрібно дослідити.

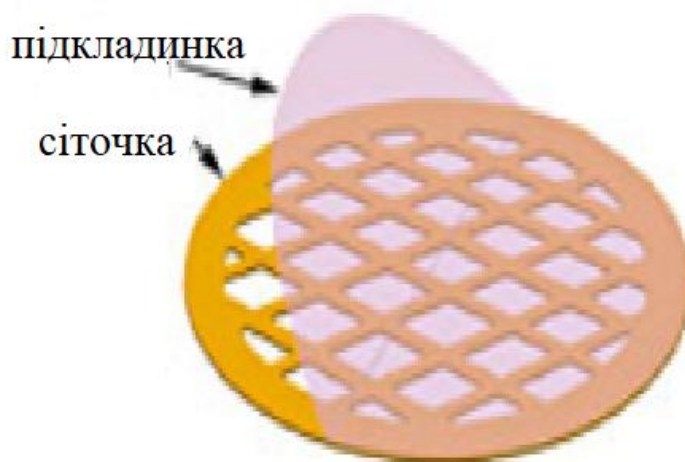


Рис. 1.1. – Сітки з формаваровою підкладкою для трансмісійної електронної мікроскопії (ТЕМ)

Для успішного приготування препаратів для електронної мікроскопії потрібні зразки, що містять високі титри вірусних частинок (10^7 /мл). Основне діагностичне застосування електронної мікроскопії полягає у виявленні деяких некультивованих вірусів, зокрема тих, що викликають гастроентерит (наприклад, каліцивірусів, астровірусів і ротавірусів).

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА

Протокол 1: Підготовка сіточок з формваровими плівками підкладками

Мета роботи: Підготувати сітки з формваровими підкладками для трансмісійної електронної мікроскопії.

Матеріали: 1% розчин формвару в хлороформі, широка ємність для води, предметні скельця, чашки Петрі, фільтрувальний папір, сітки, леза, тонкий загострений пінцет

Хід роботи:

1. Чисте знежирене предметне скельце занурити в розчин формвару, через 5-10 с скло витягти та підсушити (сушити слід 40-60 с до зникнення запаху розчинника).

2. Отриману плівку подрізати лезом бритви, потім зняти плівку на воду шляхом повільного занурення скла у воду під кутом 45° (рис. 1.2).

3. На плівку викласти сітки і зняти їх за допомогою фільтрувального паперу.

4. Сітки з плівкою висушити та зберігати в чашках Петрі.



Рис. 1. 2. – Приготування плівок-підкладинок з форм вару

Протокол 2: Підготовка зразка для ТЕМ. Нанесення зразків фагів для ТЕМ і контрастування уранілацетатом.

Мета роботи: Підготувати зразок фага для дослідження методом трансмісійної електронної мікроскопії

Матеріали: Фаговий лізат з високим титром, буферний розчин, мідні сітки з формваровими підкладками, фільтрувальний папір, стерильна відфільтрована вода, 1 % уранілацетат (відфільтровують безпосередньо перед використанням).

Хід роботи:

1. Підготувати робочу зону: одягнути свіжу пару рукавичок і застелити визначену робочу зону офісним папером або великою безворсовою серветкою, щоб створити чисту робочу поверхню.
2. За допомогою мікропіпетки нанести 5 мкл фаголізату на сітку, не торкаючись кінчиком до самої сітки.
3. Залишити зразок на сітці протягом 2 хвилини. За цей час фаг осяде і адсорбується на сітці.

4. Промити сітку один раз, використовуючи наступний метод:

- a) За допомогою пінцета повернути сітку під кутом 45°.
- b) Обережно нанести 60 мкл стерильної води на темну і блискучу поверхню сітки, щоб вона стікала з іншого боку в чашку Петрі. Знадобиться приблизно шість великих краплин.
- c) Повернути сітку назад так, щоб темна і блискуча сторона знову була звернена догори. Якщо необхідно, видалити надлишки водиза допомогою фільтрувального паперу.

5. Додати 5 мкл 1 % уранілацетату на сітку.

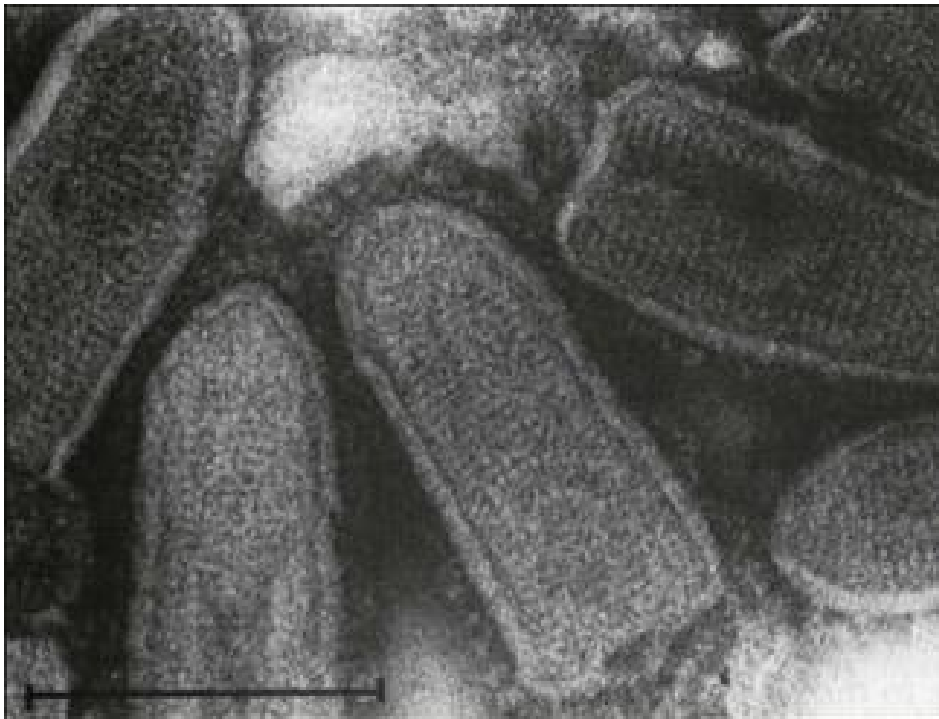
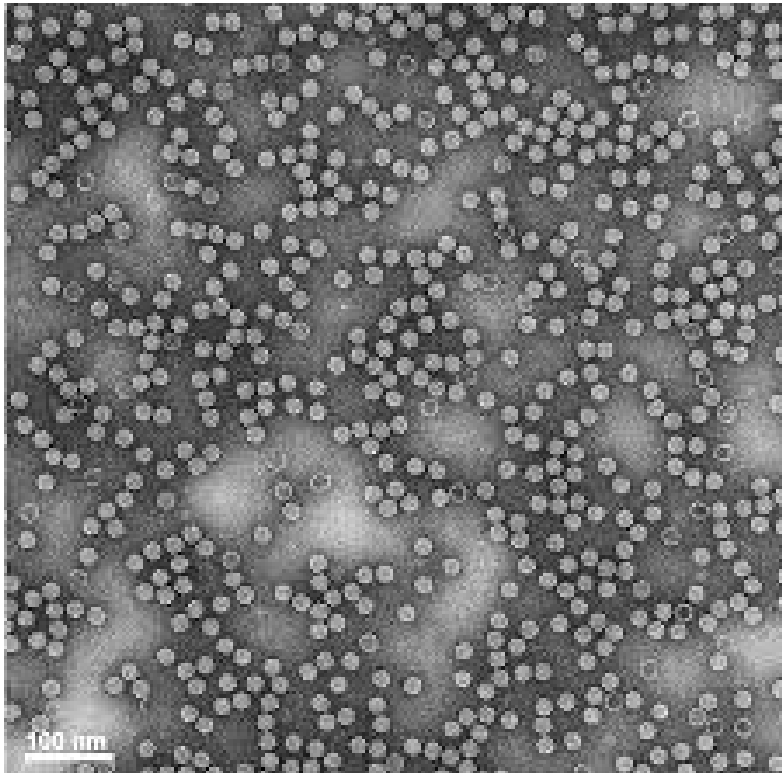
Важливо: Уранілацетат є дуже токсичною сполукою. Ви повинні носити рукавички протягом всієї процедури.

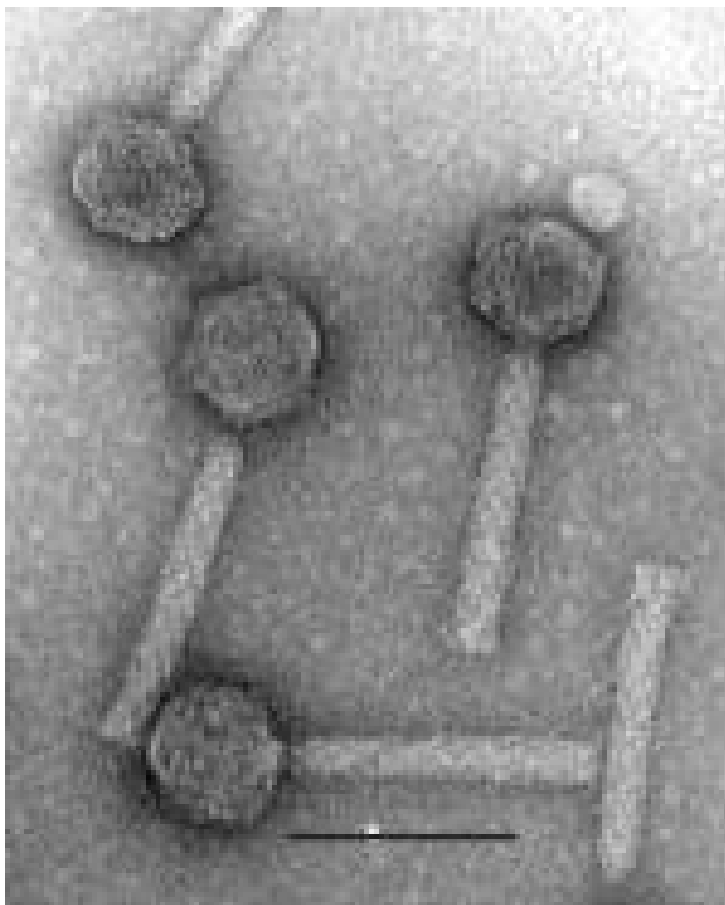
6. Надлишок контрастера видалити за допомогою фільтрувального паперу.
7. Помістити сітку в спеціальний контейнер та ретельно занотувати місце розташування сіточки в контейнері.
8. Проглянути сіточки зі зразком за допомогою електронного мікроскопу.
9. Розрахувати діаметр голівки та довжину хвостового відростку відносно розмірної лінійки:

- a) За допомогою лінійки виміряти довжину і ширину капсида і довжину хвоста (без урахування капсида і будь-яких видимих фібрил). Якщо можливо, виміряти кілька головок і хвостів фага та вирахувати їхні середні значення.
- b) Виміряти довжину розмірної лінійки за допомогою лінійки.
- c) Використовуючи відому та відносну довжину розмірної лінійки, обчисліть розміри голівка та хвостового відростку.

САМОСТІЙНА РОБОТА

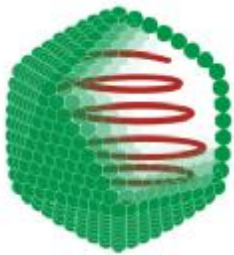
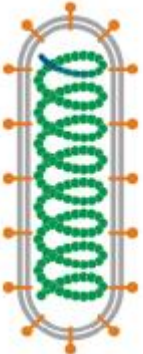
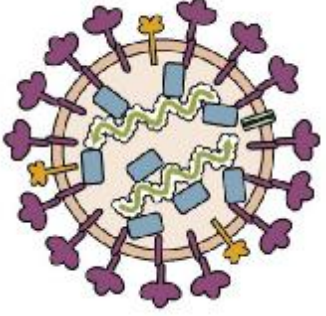
1. Обчислити розміри віріонів різних вірусів.





Масштабна лінійка - 100 nm

2. Опишіть основні структури (типи симетрії) вірусів .

	<p>Характеристика</p> <p>Приклади</p>
	<p>Характеристика</p> <p>Приклади</p>
	<p>Характеристика</p> <p>Приклади</p>

- як неживих об'єктів:

ПИТАННЯ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЮ

1. Перелічіть основні властивості вірусів.
2. Що таке віріон?
3. Опишіть загальну будову вірусів.
4. Опишіть чотири морфологічні класи вірусів.
5. Порівняйте розмір вірусів з розміром бактерій.
6. Поясніть, чому віруси не можуть реплікуватися на поверхнях докільця або в синтетичних лабораторних середовищах.
7. Яка функція вірусної оболонки?

Оцінка _____ Підпис викладача _____

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА 2

Методи культивування вірусів. Культивування вірусів в курячому ембріоні та організмі лабораторних тварин. Клітинні культури у вірусології

ПЕРЕЛІК ПИТАНЬ ДЛЯ ВИВЧЕННЯ

1. Проаналізувати особливості взаємодії вірусів у живих системах.
2. Оцінити результати розмноження вірусів у живих системах.
3. Проаналізувати лабораторні методи культивування вірусів з використанням лабораторних тварин, клітинних культур та курячих ембріонів.

ТЕОРІЯ

1. Як культивувати віруси?

Оскільки віруси не є клітинами, вони не можуть збільшуватися в розмірах або ділитися (відтворювати себе) поза клітинами. Отже, віруси не **можуть рости в поживному середовищі - на відміну від бактерій!!!**

Тому для накопичення вірусного матеріалу (для досліджень, створення вакцин тощо) потрібно обрати живу клітинну систему, здатну підтримувати репродукцію **інфекційного** вірусу.

Основна мета культивування вірусів полягає у:

- виділенні та ідентифікації вірусів у клінічних зразках;
- дослідженні структури, реплікації, генетики та впливу вірусу на клітину-хазяїна;
- підготовці вірусів для виробництва вакцин.

Для індикації вірусів у патологічному матеріалі, їх виділення та культивування використовують кілька різних клітинних систем: **культури клітин, курячі ембріони та лабораторні тварини.**

2. Лабораторні тварини

Першим логічним вибором дослідника може бути тварина, сприйнятлива до певного вірусу (наприклад, кріль – до вірусів міксоматозу,

курка – до вірусу пташиного грипу, корова – до ящуру і т.д.). Однак слід пам'ятати, що використання тварин може бути небезпечним (через їх агресивність, вірогідність інфікування дослідника, індивідуальні відмінності, тощо) та дорогим. Іншим питанням, яке слід враховувати, є дослідницька етика, що вимагає переконливих доказів, які підтверджують необхідність використання тварин для експериментів. Нижче наведено кілька важливих аспектів, які слід враховувати при роботі з лабораторними тваринами, що використовуються для культивування вірусів:

- Тварин використовують для вірусів, які **не можна культивувати** за допомогою курячих ембріонів чи культур клітин.
- Відібрані тварини повинні бути **здоровими** та вільними від інфекційних захворювань.
- Залежно від системи «вірус-тварина» та мети роботи віруси можуть вводитися різними шляхами (внутрішньовенним, внутрішньоочеревинним, інтраназальним, підшкірним, внутрішньомозковим і т.д.).
- Після інокуляції вірус розмножується в організмі хазяїна і **викликає захворювання**. За тваринами спостерігають для виявлення **симптомів** хвороби та/або її загибелі.
- Надалі вірус виділяють і очищають з тканин цих тварин.

Переваги та недоліки використання тварин у вірусологічних дослідженнях

Переваги:

- діагноз, патогенез і клінічні симптоми визначаються **на рівні цілого** організму;
- використовується для вивчення імунних реакцій (вироблення антитіл тощо), епідеміології (шляхів передачі) та онкогенезу;
- первинне виділення певних вірусів, які неможливо виділити в інший спосіб.

Недоліки:

- вартість (тварини, навчений персонал, безпечні приміщення);
- труднощі в утриманні тварин (включаючи ризик травм і передачі хвороб);

- складність у виборі тварин для конкретного (особливо невідомого) вірусу;
- деякі віруси людини не культивуються на тваринах або не викликають захворювання у них;
- результати дослідів на тваринах *не завжди корелюють з перебігом хвороби у людини*;
- питання біоетики, про які йшлося вище.

Іншими словами, не можна і не варто використовувати лабораторних тварин, якщо цього можна уникнути. Отже, двома найбільш поширеними і бажаними методами є *культури клітин* та *курачі ембріони*. Це дешевші, стабільніші, контрольовані та безпечні методи, успішно пристосовані для культивування широкого спектру вірусів.

3. Культури клітин

Культура клітин - одна з найбільш поширених штучних живих систем, що використовуються у вірусології для:

- 1) індикації та ідентифікації вірусів;
- 2) первинного виділення вірусів з патологічного матеріалу;
- 3) накопичення та/або підтримання вірусів для досліджень, створення вакцин, тощо;
- 4) вивчення механізмів/активності препаратів-кандидатів для противірусної терапії, тощо.

Виділення вірусів у клітинних культурах є «золотим стандартом» вірусної діагностики. Культури клітин є потужним, стабільним і генетично однорідним інструментом для вірусологічних досліджень. Відомо кілька тисяч різних сформованих клітинних ліній і щонайменше 3000 зберігаються в Американській колекції типових культур (ATCC) – найбільшій загальній колекції культур у світі, що забезпечує широкий вибір майже на всі випадки життя.

Переваги та недоліки використання культур клітин у вірусологічних дослідженнях

Переваги:

- більш стандартизовані умови завдяки генетичній однорідності та умовам *in vitro*;
- широкий вибір клітинних ліній, що підходять для більшості вірусів/цілей;
- швидке отримання результатів;
- набагато безпечніший і «чистіший» варіант порівняно з лабораторними тваринами;
- можливість автоматизації багатьох етапів (культивування клітин, тощо);
- нижча вартість.

Недоліки:

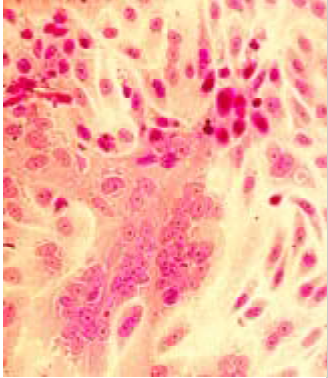
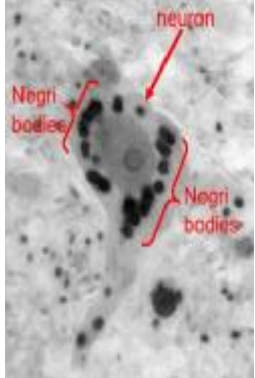
- відсутність культур клітин для деяких вірусів;
- зниження чутливості культур клітин до вірусів з часом;
- можливі неспецифічні реакції культур клітин на інокуляцію вірусами;
- вимагає обладнання та кваліфікованих працівників;
- реакція культур клітин на інокуляцію вірусами та антивірусну терапію суттєво відрізняється від реакції багатоклітинного організму-хазяїна.

Основною формою реакції клітин на ураження вірусами в умовах *in vitro* є **цитопатична дія (ЦПД)**, яка є наслідком реплікації вірусів. За сучасною класифікацією, прийнятою Американським мікробіологічним товариством, розрізняють 7 типів ЦПД, які представлені в **табл. 2.1**.

Таблиця 2.1

Типи цитопатичної дії з типовими прикладами вірусів

Цитопатичний ефект	Віруси	Морфологія
<p>Тотальна круглоклітинна дегенерація клітин моношару Повне руйнування шару клітин, Найбільш сувора форма ЦПД.</p>	<p>Ентеровіруси (поліовірус, вірус Коксакі, ЕСНО)</p>	 <p>ASM MicrobeLibrary.org Phalen</p>
<p>Субтотальна деструкція Відділення і загибель деяких, але не всіх, клітин моношару</p>	<p>Деякі тогавіруси, пікорнавіруси та параміксовіруси</p>	
<p>Вогнищева дегенерація Локалізоване пошкодження клітинного шару</p>	<p>Герпесвіруси, поксвіруси</p>	 <p>ASM MicrobeLibrary.org</p>
<p>Осередкові скупчення заокруглених клітин Клітини значно набрякають і злипаються в кластери («гроно винограду»)</p>	<p>Аденовіруси</p>	
<p>Пінна дегенерація (вакуолізація) Пов'язана з формуванням великих або численних цитоплазматичних вакуолей.</p>	<p>Деякі ретровіруси, параміксовіруси та флавівіруси</p>	 <p>ASM MicrobeLibrary.org S. Reichman and Blair</p>


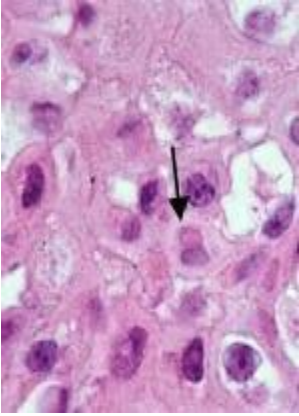
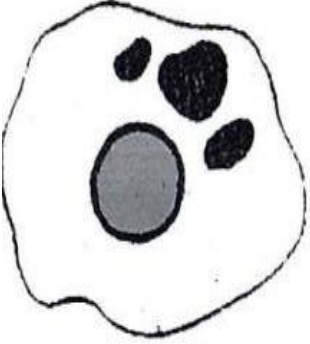
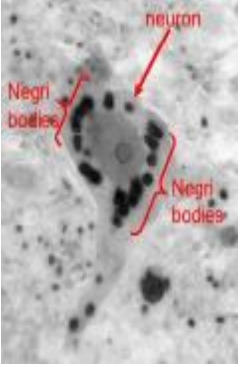

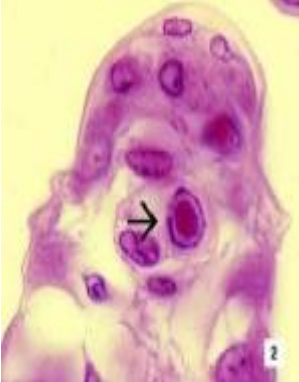
Цитопатичний ефект	Віруси	Морфологія
<p>Злиття клітин і утворення багатоядерних клітин (синцитіїв/симпластів, полікаріоцитів)</p> <p>Плазматичні мембрани чотирьох або більше клітин зливаються і утворюють гігантську клітину з принаймні чотирма ядрами.</p>	<p>Вірус кору Вірус вісповакцини Герпесвіруси Параміксовіруси РС-вірус</p>	
<p>Утворення включень</p> <p>Вірус-індуковані внутрішньоклітинні структури. Може бути одиночним або множинним, невеликим або великі, круглі або неправильної форми тощо.</p>	<p>Багато вірусів, якщо не всі</p> <p><u>Діагностичне значення:</u></p> <p>Вірус сказу Вірус віспи Герпесвіруси та ін.</p>	

Вірусні тільця-включення – утворення, що складаються із скупчень вірусних частинок, вірусних білків або ж з клітинного матеріалу. Можуть мати ядерну або цитоплазматичну локалізацію.

Для деяких вірусів включення мають діагностичну роль (табл. 2.2).

Таблиця 2.2

Типові діагностично важливі вірусні вclusions

Тип	Назва та типовий вірус	Схема	Зображення
Цитоплазматичні	Тільця Гварнієрі Вірус віспи віспи Великі перинуклеарні «фабрики віріонів»		
Цитоплазматичні	Тільця (Бабеша-) Негрі Вірус сказу		
Ядерні	Тільця Каудрі Герпесвіруси		

4. Курячі ембріони

Сьогодні курячі ембріони широко використовуються для виділення, культивування та накопичення багатьох різних (але не всіх!) вірусів людини і тварин. Курячі ембріони не мають імунної системи, а також містять велику кількість води в різних частинах тіла. Тому вони стали цінним

«інструментом» для масового виробництва вакцин проти таких вірусів, як грип, кір, коронавіруси тощо.

Переваги та недоліки використання курячих ембріонів у вірусологічних дослідженнях

Переваги:

- «золотий стандарт» для виділення та культивування деяких вірусів;
- ідеальний субстрат для росту та реплікації вірусів;
- ***надзвичайно економічне рішення***, простота роботи;
- ***доступність*** курячих ембріонів;
- мікробіологічна чистота (***природна стерильність***);
- відсутність імунної системи;
- широко використовується для ***виробництва*** деяких ***вакцин***.

Недоліки:

- можливе культивування незначної кількості вірусів;
- реакція на ***інокуляцію*** вірусу ***значно відрізняється від реакції організму хазяїна***.

Як показано на **рис. 2.1**, курячий ембріон складається з кількох органів:

- ембріон;
- амніотична порожнина (або мішок), що містить амніотичну рідину - служить для амортизації та плавучості;
- повітряна камера - служить джерелом повітря і газообмінником, а також для амортизації;
- жовтковий мішок - служить для живлення ембріона;
- альбумін (білок) - служить джерелом води для ембріона і забезпечує неспецифічний бактеріологічний захист;
- (хоріо)алантоїсна порожнина, що містить алантоїсну рідину - служить для виведення метаболітів.

Кожна порожнина оточена окремою мембраною, а все яйце захищене шкаралупою з підшкаралупною оболонкою.

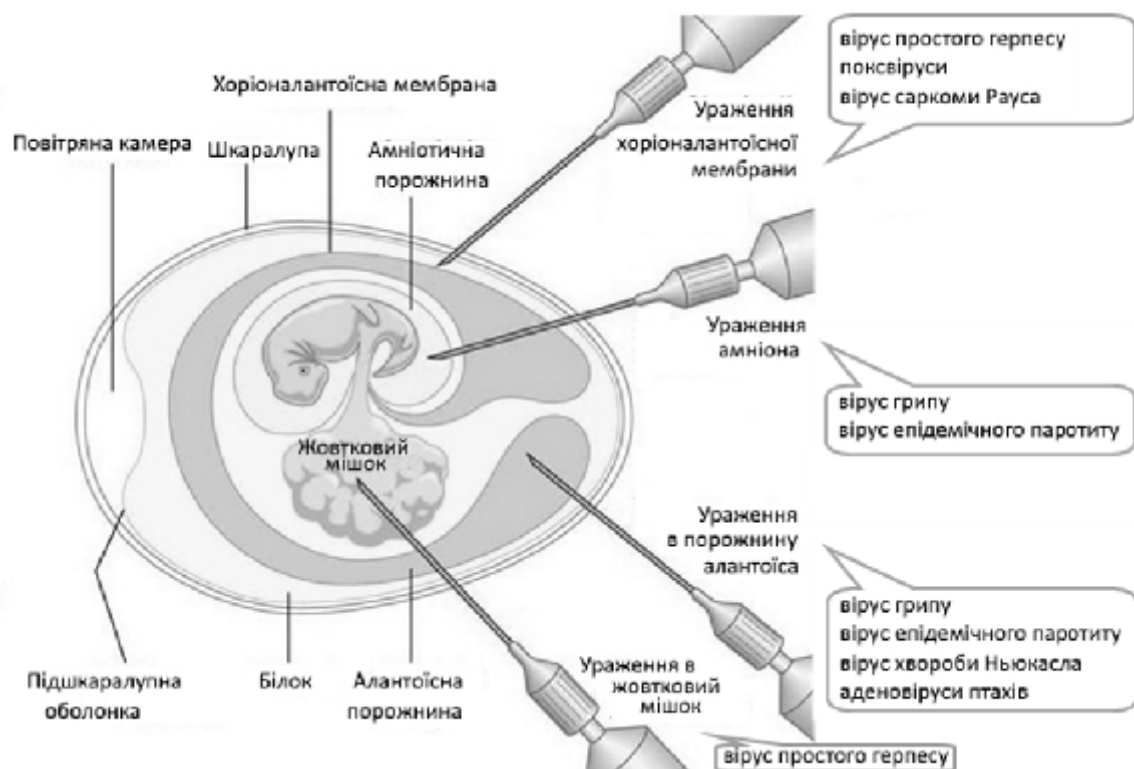


Рис. 2.1. – Анатомія курячого ембріона основні шляхи його інокуляції вірусами

Враховуючи анатомічну будову курячого яйця та специфіку вірусів, було розроблено декілька способів інокуляції для *різних вірусів та цілей* (див. рисунок та приклади вище). До них відносяться:

- інокуляція на хоріоалантоїсну оболонку (СAМ);
- інокуляція в амніотичну порожнину;
- інокуляція в жовтковий мішок;
- інокуляція в алантоїсну порожнину.

Інокуляція на хоріоалантоїсну оболонку (САМ) в основному використовується для *первинного виділення* вірусів, що інфікують епітеліальні клітини (поксвіруси, герпесвіруси та ін.). Після інокуляції та інкубації спостерігаються видимі ураження («бляшки»), що утворюють сіро-білу ділянку на прозорій оболонці. Такий спосіб інокуляції підходить для

кількісного визначення вірусу шляхом підрахунку «бляшок».

Інокуляція в амніотичну порожнину проводиться для **первинного виділення** вірусів грипу та епідемічного паротиту.

Інокуляція в жовтковий мішок – це простий спосіб **розмноження вірусів** (наприклад, герпесвірусів).

Інокуляція в алантоїсну порожнину часто використовується для **первинного виділення** багатьох вірусів птахів, а також є стандартизованим способом **виробництва вакцин** проти вірусу грипу, кору, жовтої лихоманки, сказу тощо.

Також слід враховувати вік ембріонів курячих яєць, які використовуються для інокуляції вірусами - він буде різним для різних вірусів. Загальна тривалість життя курячого ембріона становить близько 20 днів. **Для інокуляції вірусами використовуються курячі ембріони віком 5-12 днів** (табл. 2.3).

Таблиця 2.3

Культивування вірусів в курячих ембріонах та типові ознаки розмноження вірусу

Вік ембріона при інокуляції/ доба	Частина ембріона	Вірус	Ознаки розмноження вірусу
7-12	Жовтковий мішок	Вірус простого герпесу	Загибель
12	Хоріоалантоїсна оболонка (САН)	Вірус простого герпесу Поксвіруси Вірус саркоми Рауса	«Бляшки»
10	Алантоїсна порожнина	Вірус грипу	Затримка росту та пошкодження капілярів.

Вік ембріона при інокуляції/ доба	Частина ембріона	Вірус	Ознаки розмноження вірусу
			Гемаглютинація
7		Вірус епідемічного паротиту	Загибель
10	Амніотична порожнина	Вірус грипу	Гемаглютинація
7		Вірус епідемічного паротиту	Загибель

Перед інокуляцією вірусом важливо визначити положення повітряної камери та власне ембріона. Для цього використовується потужне джерело світла в темній камері – овоскоп, а сам процес називається *овоскопуванням*.

На цьому етапі важливо відбракувати непридатні ембріони, тобто такі, що фізично пошкоджені, не були запліднені або ж мертві ембріони.

Після даного підготовчого етапу можна переходити до інокуляції ембріонів вірусами. Ріст і розмноження вірусу в ембріоні можна виявити візуально, а також за допомогою реакції гемаглютинації та інших методів.

Типовими прикладами результатів розмноження вірусу в курячих ембріонах є потовщення і «бляшки» на САМ (вірус віспи), геморагічні симптоми (пошкодження кровоносних судин) (вірус грипу), затримка розвитку, геморагічні симптоми і загибель ембріона (вірус катаральної лихоманки) та ін.

Слід пам'ятати, що не існує універсальної модельної системи, яка може бути використана для будь-якого вірусу або для будь-якої дослідницької мети. Вибір правильної модельної системи є першим і найважливішим кроком у дослідженні вірусів і клініці.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА

Завдання, що виконуються під час заняття:

1. Провести інокуляцію вірусу та виявити репродукцію вірусу в курячих ембріонах.
2. Ідентифікувати репродукцію вірусу в культурах клітин за допомогою цитопатичної дії (ЦПД).

Протокол 1. Інокуляція вірусом та розтин курячого ембріона, і відбір вірусомісної алантоїсної рідини

Мета роботи: Інокуляція курячих ембріонів вірусом грипу в алантоїсну порожнину закритим та відкритим способами, вивчення індукованої патології та відбір алантоїсної рідини для проведення реакції гемаглютинації.

Практичне значення: Студенти знайомляться з виділенням, індикацією та культивуванням вірусів з використанням курячих ембріонів яєць для діагностики і досліджень вірусів, виробництва вакцин.

Матеріали: Ізолят вірусу грипу (імітаційний розчин для інокуляції), курячі ембріони, підставки для яєць, овоскоп, олівці, вата, 70% спирт, 5% йод, пробійник для ячної шкаралупи, ножиці, пінцети, шприци, скляні піпетки з пампом, чашки Петрі, канцелярський «скотч», рукавички, медичні маски, лоток для сміття.

Процедура (виконується в рукавичках і медичних масках):

1. Використовуючи овоскоп:
 - 1.1 Дослідіть структуру курячого ембріона (віком 8-11 днів) на наявність ознак життєздатності:
 - форма та активна рухливість ембріона,
 - наявність розвиненого судинного малюнка,
 - відсутність фізичних пошкоджень (тріщин, тощо).
 - 1.2 Позначте олівцем межі повітряної камери та ембріона.
2. Розмістивши ембріон вертикально повітряною камерою догори на підставці для яєць, обробіть шкаралупу (з боку повітряної камери):
 - 2.1 розчином 70% спирту;

- 2.2 розчином 5% йоду.
3. Інокулюйте курячий ембріон в алантоїсну порожнину:
 - 3.1 Протріть пробійник для ячної шкаралупи 70% спиртом. Помістіть використану вату в лоток для сміття.
 - 3.2 Зробіть отвір на кінці ембріона в позначеному місці для інокуляції.
 - 3.3 Приєднайте голку до стерильного шприца на 1 мл.
 - 3.4 Наберіть матеріал для інокуляції у шприц об'ємом 1 мл.
 - 3.5 Тримаючи шприц вертикально голкою донизу, введіть голку через отвір у шкаралупу яйця на глибину 15 мм, щоб досягти алантоїсної порожнини.
 - 3.6 Введіть 0,1 мл інокуляту в ембріон.
 - 3.7 Витягніть голку з ембріона.
 - 3.8 Заклейте отвір у шкаралупі канцелярським «скотчем» або розтопленим воском.
 - 3.9 Правильно утилізуйте використані голки та шприци.
 - 3.10 Помістіть інокульовані ембріони в інкубатор.
4. Відберіть алантоїсну рідину для реакції гемаглютинації:
 - 4.1 Повторіть етап 1.1 для підтвердження положення повітряної камери.
 - 4.2 Зніміть канцелярський «скотч» і продезінфікуйте ембріон 70% спиртом і 5% йодом.
 - 4.3 Введіть скляну піпетку через отвір в шкаралупі ембріона, щоб дістатися до алантоїсної порожнини.
 - 4.4 Відберіть алантоїсну рідину скляною піпеткою з ручним пампом (зазвичай 2-10 мл) у стерильну пробірку з кришкою, не допускаючи потрапляння рідини в памп чи пошкодження оболонок ембріона.
5. Відібравши алантоїсну рідину, дослідіть патологію інфікованих вірусом курячих ембріонів:
 - 5.1 Прогрійте ножиці та пінцет в полум'ї.
 - 5.2 Обережно видаліть шкаралупу, розташовану над повітряною камерою.
 - 5.3 Обережно розріжте і складіть хоріоалантоїсну оболонку, яку видно у вирізі.
 - 5.4 Розташуйте курячий ембріон над дном чашки Петрі.

- 5.5 Випорожніть ембріон в чашку Петрі, намагаючись не пошкодити його.
- 5.6 Перевірте вміст ембріона на наявність патологій (анатомічних відхилень), тобто пошкодження кровоносних судин, «бляшок» тощо.
- 5.7 Опишіть виявлені патології, запишіть висновки. Замалюйте вилучений курячий ембріон та позначте його частини та патології в робочому зошиті.

Протокол 2: Індикація репродукції вірусу в клітинних культурах

Мета: Виявити репродукцію вірусу в культурах клітин за допомогою цитопатичної дії (ЦПД).

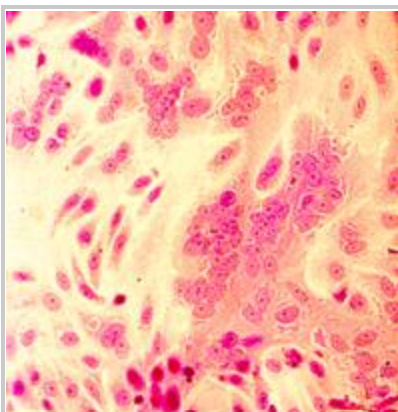
Практичне значення: Студенти знайомляться з індикацією вірусів у культурі клітин за допомогою вірусоспецифічної цитопатичної дії (ЦПД) для подальшої ідентифікації вірусів.

Матеріали: Роздаткові матеріали з лініями клітин, що демонструють типові типи ЦПД, характерні для різних вірусів (поксвірусів, аденовірусів, герпесвірусів тощо).

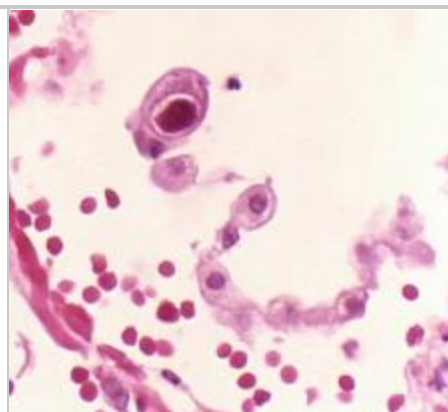
Процедура:

1. Ознайомтеся з роздатковими матеріалами.
2. Запишіть свої висновки в робочому зошиті нижче.

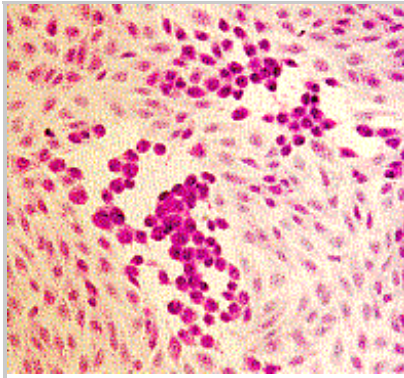
Роздаткові матеріали з вірус-індукованою ЦПД в культурі клітин:



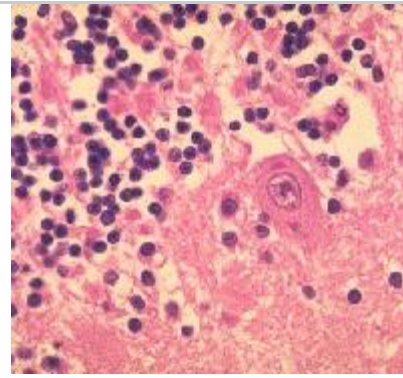
A



B



C



D

Були виявлені наступні патології, характерні для вірусу(ів):

- A**
- B**
- C**
- D**

САМОСТІЙНА РОБОТА

Ситуаційна задача. Пацієнта вкусив безпритульний собака в гомілку. Після цього собаку було спіймано. Зразок її спинномозкової рідини доставлено до вашої лабораторії для діагностики сказу.

1. Опишіть оптимальний спосіб індикації вірусу в зразку.
2. Опишіть інші методи для підтвердження діагнозу.
3. Якими будуть ваші дії по відношенню до пацієнта у випадку позитивного результату на сказ?

ПИТАННЯ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЮ

- 1) Віруси - це специфічні паразити клітин людини, тварин і рослин. Як ця особливість використовується для культивування вірусів *in vitro*?
- 2) Лабораторні тварини є основними моделями для культивування вірусів. Назвіть переваги та обмеження їх використання.
- 3) Що таке цитопатична дія і як її можна використовувати для індикації вірусів?

4) Віруси можна отримати у великих кількостях відносно легко і недорого за допомогою одного з методів культивування. Який це метод культивування вірусів? Чому його не можна вважати універсальним?

5) Порівняйте переваги лабораторних тварин, клітинних культур та курячих ембріонів, а потім оберіть економічно ефективну систему, яка підходить для БІЛЬШОСТІ вірусів. Аргументуйте свій вибір.

Оцінка _____ Підпис викладача _____

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА 3

Ортоміксовіруси та коронавіруси. Постановка реакції гемаглютинації для діагностики вірусів

ПЕРЕЛІК ПИТАНЬ ДЛЯ ВИВЧЕННЯ

1. Загальна характеристика ортоміксовірусів та коронавірусів (структура віріону, особливості геному, антигенна мінливість)
2. Патогенез, імунітет, діагностика
3. Специфічна профілактика та лікування

ТЕОРІЯ

Основні терміни, які студент повинен вивчити під час підготовки до заняття:

Термін	Визначення
Вірусні глікопротеїни	Вірусні глікопротеїни - це структурні поверхневі білки зовнішніх оболонок складних вірусів, які складаються із зовнішньої (гідрофільної) і зануреної гідрофобної частини в ліпідний шар. Вірусні глікопротеїни є специфічними антигенами. Основною функцією вірусних глікопротеїнів є взаємодія зі специфічними рецепторами на поверхні клітин, тобто специфічна адсорбція вірусу на клітинах. Інша функція - участь у злитті вірусу з клітинними мембранами, що призводить до проникнення вірусу у клітину та його розщеплення (вивільнення геномів).

Антигенний шифт	Антигенний зсув - це така мінливість вірусу грипу, яка призводить до появи штамів з новими поверхневими глікопротеїнами і призводить до радикального оновлення антигенів.
Антигенний дрейф	Антигенний дрейф - це часткова зміна гемаглютиніну при зміні однієї або декількох амінокислот внаслідок точкових мутацій. Це призводить до утворення штамів з дещо оновленими антигенними властивостями.

Родина *Coronaviridae*

Згальна характеристика: віріони плеоморфні або сферичні чрозміром близько 120 нм, мають суперкапсид, до складу якого входять: М глікопротеїн (мембранний), S глікопротеїн – білок шипа, що відповідає за адсорбцію до ACE2 рецепторів, мінорний білок суперкапсиду Е. Геном представлений одноланцюговою +РНК, несегментованою, яка в поєднанні з білком N-формує нуклеокапсид. Шляхи передачі вірусу - повітряно-крапельний та фекально- оральний. Чутливий до УФ та температури, 75% етанолу, хлорвмісних сполук, органічних розчинників. Симптоми включають лихоманку, задишку і кашель, можливі розлади ШКТ.

Діагностика здійснюється з використанням швидких імунофлюоресцентних, імунохроматографічних тестів та різних модифікацій ЗТ-ПЛР у зразках носоглоткових змивів.

Лікування та профілактика COVID-19

У цьому підпункті зазначено, препарати тільки з різними механізмами специфічної ативірусної дії відносно SARS-CoV-2:

- Бамланівімаб/етезевімаб — комбінований експериментальний лікарський препарат, який за своїм складом є комбінацією двох моноклональних антитіл бамланівімабу та етезевімабу, та застосовується внутрішньовенно для лікування коронавірусної хвороби. Обидва моноклональні антитіла спрямовані проти білків шиповидних відростків оболонки вірусу SARS-CoV-2. Механізм його дії полягає у блокуванні

прикріплення вірусу до мембрани клітини, що унеможлиблює потрапляння SARS-CoV-2 в клітини людини, що нейтралізовує дію вірусу.

- «Молнупіравір» – це противірусний препарат прямої дії, механізм його полягає у створенні помилок копіювання під час реплікації вірусної РНК. Це запобігає розмноженню вірусу та знижує ризик важкого перебігу захворювання, найбільш дієвим цей препарат є в перші кілька днів, навіть годин, відколи у пацієнта з'явилися перші симптоми недуги.

- «Паксловід»- противірусний препарат, розроблений компанією Pfizer, перорально активний інгібітор протеази 3CLpro.

Для профілактики COVID-19 існують декілька типів вакцини, що принципово відрізняються за способом виготовлення, складом та схемами вакцинації:

- цільновіріонна вакцина, що містить інактивованій вірус SARS-CoV-2 (Coronavac)

- вакцини на основі вірусних векторів (AstraZeneca (Covishield), Johnson & Johnson Ad26.COV2.S, Спутнік V)

- мРНК вакцини (Pfizer-BioNTech, Moderna)

- вакцини на основі білкових субодиниць (Novavax (Nuvaxovid, NVX-CoV2373))

Родина *Orthomyxoviridae*

Згальна характеристика: віріони сферичної форми чи плеоморфні, діаметром 80-120 нм. Оболонка віріонів походить з клітинної ліпідної мембрани, в яку вбудовано декілька вірусних глікопротеїнів та неглікозильованих білків. Вірусний нуклеокапсид спірального типу симетрії. Геном сегментований «-» олРНК містить 10 генів, кодованих на 8 окремих сегментах РНК. Існує три різних видів вірусів грипу: А, В, С. Тип А викликає більшість інфекцій.

Віруси грипу типу А поділяються на підтипи на основі рецепторних білків: **гемаглютиніну (H)** і **нейрамінідази (N)**. Гемаглютинін використовується для зв'язування з клітинами респіраторного тракту; існує **18** різних підтипів, це найважливіший фактор вірулентності. **Нейрамінідаза (11**

підтипів) - це фермент, який руйнує слиз у дихальних шляхах і сприяє брунькуванню і виходу вірусу.

Назаразі відомі такі підтипи вірусів грипу А, що зустрічаються у людей: **H1N1, H2N2 і H3N2**. Вірус прикріплюється і розмножується в клітинах дихальних шляхів.

Лікування та профілактика грипу

Для лікування грипу застосовують препарати різного механізму дії:

- М-блокатори (ремантадін, амантадін), нефективні проти сучасних штамів вірусу грипу!
- Інгібітори нейрамінідази: озельтамівір (Таміфлю), занамівір (Реленза)
- Інгібітор кеп-залежної ендонуклеази: балоксавір марбоксилу (Ксофлуза)

Для профілактики грипу існують спліт-вакцини та субодичні вакцини, які можуть бути як тривалентні так і чотирьохвалентні вакцини.

Методи ідентифікації вірусу грипу

Виділення вірусу в культурі клітин

Виділення вірусів у культурах клітин все частіше стає золотим стандартом вірусної діагностики. Однак лабораторія повинна підтримувати кілька клітинних ліній, щоб забезпечити виявлення різноманітних респіраторних патогенів. Оскільки стандартні процедури виділення вірусів займають кілька днів, вони зазвичай мають обмежене застосування в клінічних умовах для швидкої діагностики грипу.

Виділення вірусу на курячих ембріонах

В останні роки використання клітинних культур випередило використання курячих ембріонів для виділення та культивування вірусів грипу. Однак лише віруси, культивовані на курячих ембріонах, можуть бути використані як для виробництва більшості вакцин проти грипу. З цієї причини лабораторіям, які мають можливість культивувати вірус грипу на курячих ембріонах, рекомендується підтримувати цей потенціал.

Реакція гемаглютинації та реакція гальмування гемаглютинації:

Реакція гемаглютинації (РГА) - обумовлена взаємодією поверхневих вірусних білків (у простих вірусів це білки капсиду, у складних – білки суперкапсиду гліко- та ліпопротеїни) з рецепторами еритроцитів без участі специфічної антисироватки. Найбільш відомим вірусом з такою властивістю є вірус грипу.

Механізм гемаглютинації полягає в тому, що гемаглютиніни вірусу грипу взаємодіють з поверхневими білками еритроцита (глікопротеїнами) після чого відбувається адсорбція вірусу на еритроциті (рис.3.1.). Це приводить до утворення агрегату, який осідає на дно пробірки чи лунки планшета тонкою плівкою, що має вигляд «перевернутої парасольки» (повна аглютинація). Якщо ж реакція не відбулася, тобто в розчині відсутні гемаглютинуючі віруси, то еритроцити осідають на дно щільним осадом «п'ятчком». Зв'язок між вірусом та еритроцитами є зворотним, і може наступити фаза елюції (звільнення) вірусу за допомогою ферменту вірусу нейрамінідази, що дисоціює утворені зв'язки.

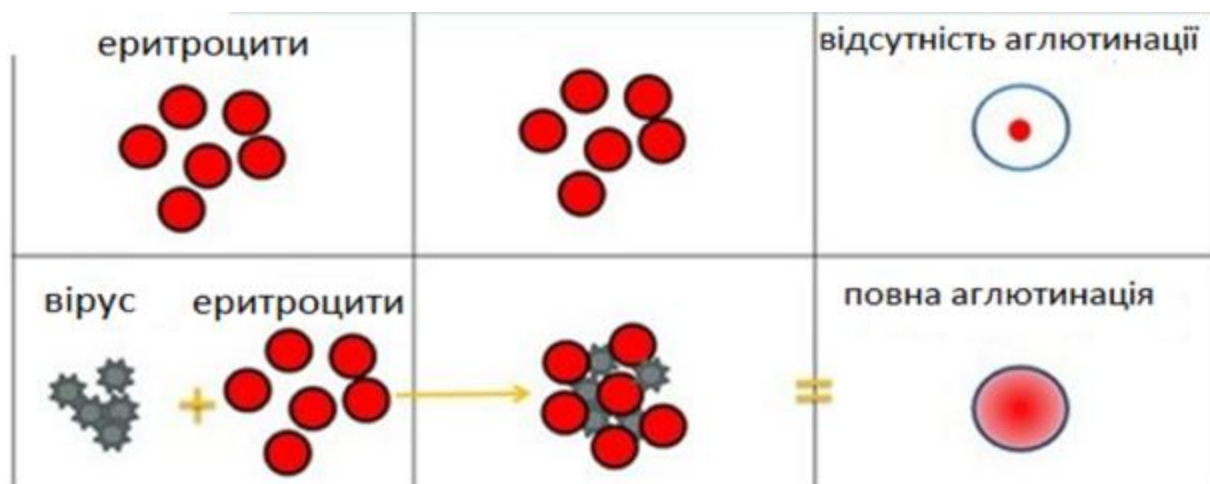


Рис. 3.1. – Схематичне зображення реакції гемаглютинації

Постановка реакції складається з приготування двократних розведень вірусу на фізіологічному розчині з додаванням до кожного розведення рівного об'єму завису еритроцитів. Усі компоненти реакції використовують у

рівних пропорціях 1:1. Оскільки гемаглютинацію можуть викликати деякі субстрати, що не містять вірусів (слина, сироватка), деякі бактерії, то РГА повинна супроводжуватись постановкою контролів. У деяких випадках тварина, від якої беруть кров, може бути латентно інфікована вірусами, саме тому в лунки вносять фізіологічний розчин та еритроцити. Планшет струшують і залишають при певній температурі (для вірусу грипу +22–37⁰С). Після певного часу експозиції вираховують результати. Позитивну реакцію оцінюють плюсами від одного до трьох відповідно, за інтенсивністю аглютинації (рис.3.2).

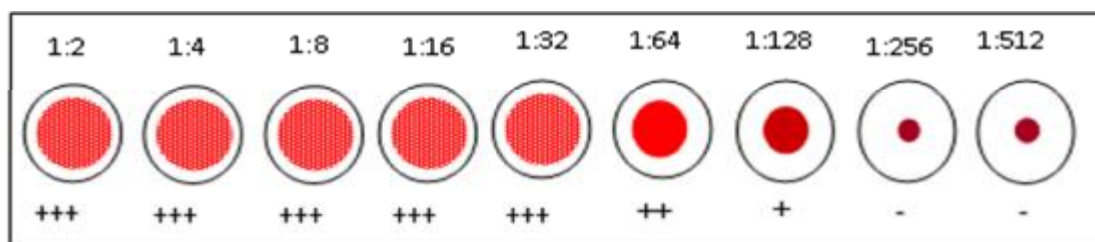


Рис. 3.2. – Оцінка результатів реакції гемаглютинації

Титр вірусу, встановлений за допомогою РГА, це те найбільше його розведення, при якому спостерігається аглютинація не менша, як на два плюси (тобто одна гемаглютинуюча одиниця – 1 ГАО). Показником гемаглютинуючого титру вірусу є число, обернено пропорційне його розведенню. Наприклад, якщо 1 ГАО міститься у розведенні вірусу 1:64, то його титр становить 64 ГАО.

Пригнічення або блокування гемаглютинуючої активності лежить в основі реакції гальмування гемаглютинації (РГГА). РГГА заснована на зв'язуванні стандартного вірусу антитілами сироватки хворого. Індикатором реакції слугують еритроцити, при позитивному результаті антитіла взаємодіють із вірусним антигеном і вільні (не зв'язані) еритроцити осідають на дно лунки як щільний осад. У разі, коли в реакції відсутні досліджувані антитіла, вірус взаємодіє з еритроцитами та формує ефект аглютинації (рис.3.3).

а швидкий характер результатів може значно полегшити розслідування спалахів респіраторних захворювань. Наприклад, генетичний аналіз генів вірусу грипу (особливо генів HA і NA) може бути використаний для ідентифікації невідомого вірусу грипу, коли неможливо визначити антигенні характеристики. Генетичний аналіз також може бути використаний для моніторингу еволюції вірусів грипу та визначення ступеня спорідненості між вірусами з різних географічних регіонів.

Швидкі тести для діагностики грипу - це імунохроматографічні тести, які дозволяють визначити наявність антигенів вірусних нуклеопротеїнів грипу А і В у зразках дихальних шляхів і показати результат у якісному вигляді (позитивний чи негативний) або дозволяють виявляти антивірусні антитіла IgM та IgG.

Таблиця 3.1.

Методи детекції вірусу грипу

Метод	Матеріал для аналізу	Тривалість тестування
Культивування на культурі клітин	Мазок з носоглотки або бронхів, назальний або ендотрахеальний аспірат, мокротиння	3-10 днів
Метод флюоресціюючих антитіл	Мазок з носоглотки або бронхів, назальний або ендотрахеальний аспірат, мокротиння	1-4 год
Молекулярні методи (ЗТ-ПЛР, одноплексна та мультиплексна; в реальному часі та інші модифікації для детекції РНК вірусу)	Мазок з носоглотки або бронхів, назальний або ендотрахеальний аспірат, мокротиння	Різноманітні (зазвичай 1-6 год)

Швидкі-тести діагностики вірусугрипу	для антигенів	Мазок з носоглотки або носоглоткові змиви	<30 хв
--	------------------	--	--------

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА

Визначення титру вірусу грипу за допомогою реакції гемаглютинації.

Мета роботи: визначити титр вірусу в гемаглютинуючих одиницях, використовуючи реакцію гемаглютинації.

Матеріали: вірусні ізоляти, еритроцити (еритроцити; курка або морська свинка), фізіологічний розчин (0,85% NaCl); мікротитровальний планшет.

Процедура (виконується в рукавичках):

1. Приготувати 2% завис еритроцитів на фізіологічному розчині.
2. Приготувати в планшеті двократні розведення матеріалу, що містить вірус, на фізіологічному розчині. Для цього до ряду лунок внести, наприклад, по 0,02 мл фізіологічного розчину. У першу лунку рядка додати 0,02 мл досліджуваного матеріалу (отримали розведення 1:2), перенести з неї 0,02 мл до другої (розведення 1:4), з неї стільки ж до наступної і т.д. З останньої лунки 0,02 мл розведеного матеріалу відібрати та перенести в дезінфікуючий розчин.
3. Для контролю до 4-5 лунок поруч з дослідним рядком внести по 0,02 мл фізіологічного розчину.
4. До кожного розведення вірусу і до контролю додати по 0,02 мл розчину еритроцитів.
5. Струснути планшет і залишити при 22-37⁰С приблизно на півгодини.
6. Запишіть висновки та намалюйте результати в робочому зошиті.

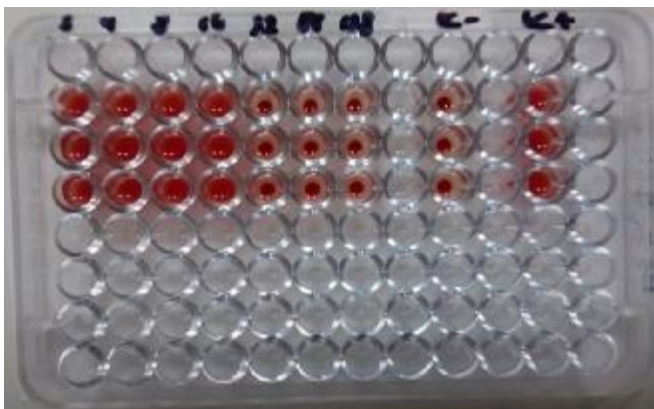
6.1. Намалюйте результати постановки реакції гемаглютинації:

○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

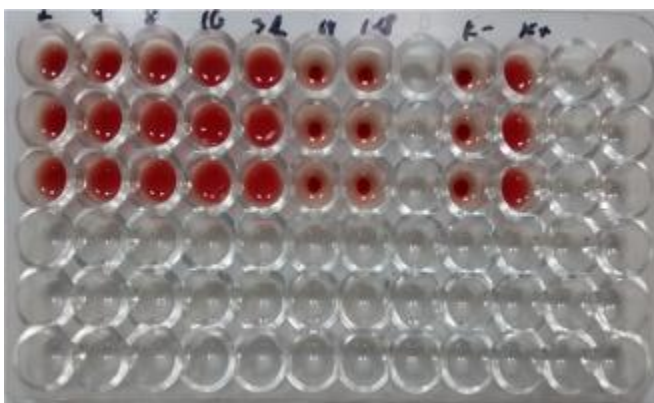
6.2. Зазначте визначений титр вірусу у гемаглютинуючих одиницях

САМОСТІЙНА РОБОТА

1. Провести облік результатів РГА у наступних планшетах та встановити титр в гемаглютинуючих одиницях

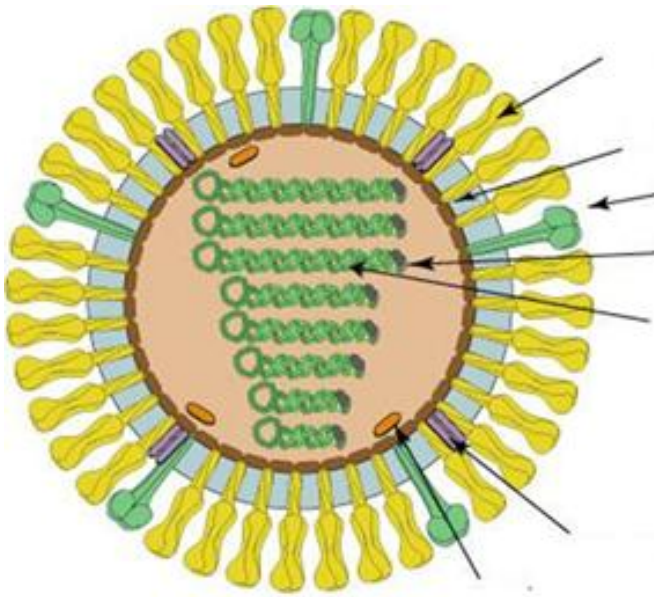


Титр вірусу становить _____

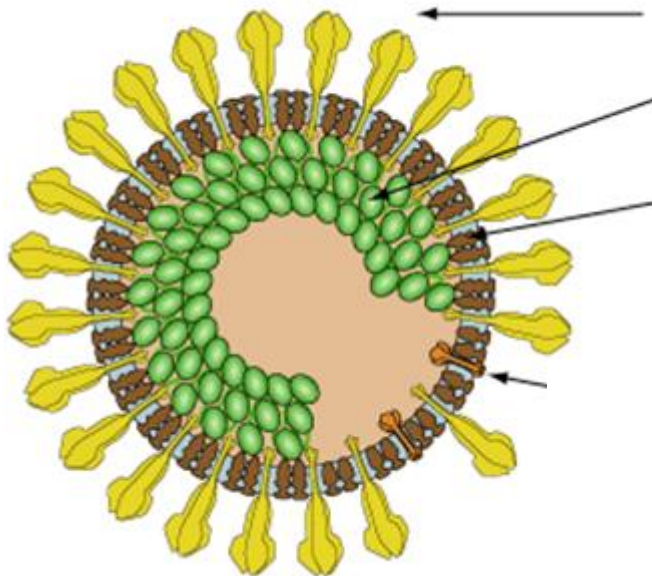


Титр вірусу становить _____

2. Підпишіть структурні компоненти вірусу грипу типу А



3. Підпишіть структурні компоненти SARS-CoV-2



ПИТАННЯ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЮ

1. Родина *Orthomyxoviridae*. Історія відкриття, біологічні властивості, класифікація.
2. Методи лабораторної діагностики грипу та їх оцінка.
3. Антигенна структура та типи антигенної мінливості вірусу грипу.

4. Патогенез та імунітет при грипі. Роль специфічних і неспецифічних механізмів імунітету до грипу.
5. Проблема специфічної профілактики та терапії грипу.
6. Родина *Coronaviridae*, загальна характеристика. Роль у розвитку патології людини.
7. Лабораторна діагностика коронавірусної інфекції.
8. Специфічна профілактика коронавірусної інфекції, типи противірусних вакцин.

Оцінка _____ Підпис викладача _____

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА 4

Пікорнавіруси. Лабораторна діагностика ентеровірусних інфекцій

ПЕРЕЛІК ПИТАНЬ ДЛЯ ВИВЧЕННЯ

1. Загальна характеристика родини Picornaviridae, класифікація.
2. Структура та хімічний склад ентеровірусів.
3. Чутливість ентеровірусів до фізичних та хімічних факторів.
4. Культивування та особливості розмноження в чутливих клітинах.
5. Патогенез, клінічні прояви та імуногенез поліомієліту, вірусу Коксакі та ЕСНО- інфекції.
6. Принципи та методи лабораторної діагностики ентеровірусних інфекцій.
7. Принципи специфічної профілактики ентеровірусних інфекцій.
8. Порівняння живих та інактивованих полівакцин.

ТЕОРІЯ

Пікорнавіруси є одними з найменших збудників хвороб хребетних і несуть відповідальність за багато важливих захворювань у людей і тварин (рис. 4.1).

Родина Picornaviridae

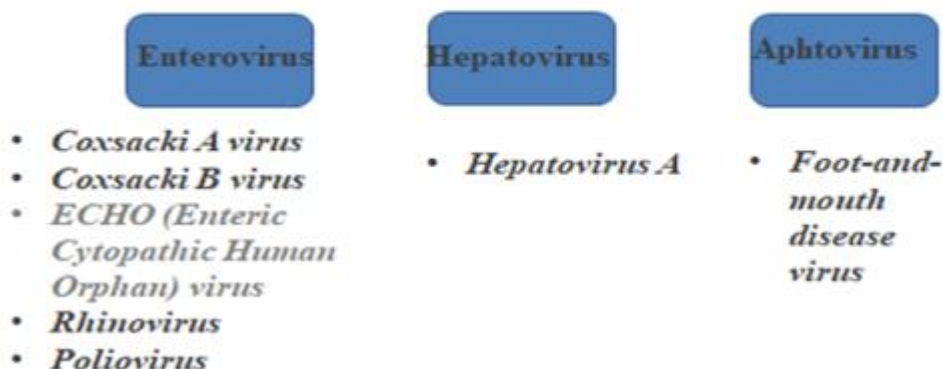
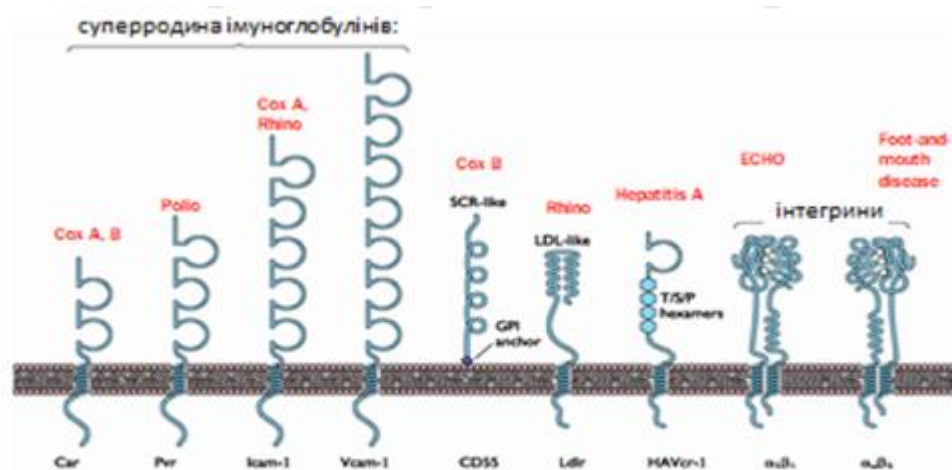


Рис 4.1. – Представники родини Picornaviridae

Пікорнавіруси є відповідальними за широкий діапазон клінічних захворювань, що спричинені численними факторами, такі як специфічність рецепторів, чутливість до тканини, вірулентність і механізми передачі. Пікорнавіруси зв'язуються із специфічними клітинними поверхневими рецепторами, і ця взаємодія є важливим фактором, що визначає специфічність вірусу (рис. 4.2).



Car – рецептор для Коксаки і аденовірусів,
Pvr (молекула CD155) – рецептор для поліовірусів,
ICAM (Inter-Cellular Adhesion Molecule) – рецептор для риновірусів;
LDR (low density lipoprotein) для риновірусів,
T/S/P threonine/serine/proline гексамер – рецептор для ВГА

Рис.4.2. – Рецептори для представників родини Picornaviridae

Ентеровіруси, разом з риновірусами і пареховірусами людини, належать до роду родини Picornaviridae пікорнавірусів. Всі ентеровіруси антигенно гетерогенні і мають широке географічне поширення. До ентеровірусів належать:

- Віруси Коксаки від А1 до А21, А24 і В1 до 6
- Еховіруси (ЕСНО (enteric cytopathic human orphan viruses - ентероцитопатичні орфанні віруси людини) 1-7, 9, 11-21, 24-27 і 29-33
- Ентеровіруси 68-71, 73-91 та 100-101
- Поліовіруси типів 1-3.

Ентеровіруси виділяються з респіраторними виділеннями і калом, а іноді присутні у крові та спинномозковій рідині інфікованих пацієнтів. Інфекція зазвичай передається при прямому контакті з респіраторними виділеннями

або випорожненнями, але може передаватися і через забруднені джерела навколишнього середовища (наприклад, воду). Ентеровірусні захворювання частіше трапляються влітку та восени. Інфекція, передана матір'ю під час пологів, може викликати важку дисеміновану неонатальну інфекцію, яка може включати гепатит або некроз печінки, менінгоенцефаліт, міокардит або їх поєднання, і може призвести до сепсису або смерті.

Пареховіруси людини типів 1 і 2 - це пікорнавіруси, які раніше називалися еховірусами 22 і 23. Однак пареховіруси були перекласифіковані в окремий рід, пареховіруси, які мають 2 види, А і В. Пареховірус А може інфікувати людину і має 16 типів; більшість з них викликають легкі шлунково-кишкові та респіраторні захворювання, подібні до ентеровірусів, але деякі типи, особливо тип 3, є поширеною причиною вірусного сепсису та/або менінгіту у немовлят.

Вірус поліомієліту

Захворювання: Паралітичний поліомієліт та асептичний менінгіт.

Характеристики: вірусні частки без суперкапсиду містять одноланцюгову «+» РНК. Існує три серотипи вірусу поліомієліту:

1. Серотип Брунгінда
2. Серотип Лансинга
3. Серотип Леон

Шляхи перенесення поліомієліту: Поліовірус поширюється від людини до людини через фекалії та слину, найчастіше — через брудні руки, заражену їжу та воду. Захворіти на поліомієліт може кожна невакцинована людина — і дитина, і дорослий.

Патогенез: Поліомієліт — це гостре інфекційне захворювання. Вхідні ворота інфекції-слизова оболонка носоглотки або кишечника. Під час інкубаційного періоду вірус розмножується у лімфатичному глотковому кільці (мигдалики) та кишечнику, регіонарних лімфатичних вузлах, проникає у кров та досягає нервових клітин в центральній нервовій системі, викликаючи її ураження. Більшість інфекцій протікають безсимптомно або в дуже легкій формі. Асептичний менінгіт зустрічається частіше, ніж

паралітичний поліомієліт. Параліч є результатом загибелі рухових нейронів, особливо клітин переднього рогу в спинного мозку.

Лабораторна діагностика: Виділення вірусу зі спинномозкової рідини вказує на інфекцію центральної нервової системи. Виділення вірусу з випорожнень вказує на інфекцію, але не обов'язково на хворобу.

Його можна знайти в шлунково-кишковому тракті безсимптомних носіїв. Вірус можна виявити в культурі клітин за допомогою РЗК та ідентифікувати шляхом нейтралізації типоспецифічною антисироваткою. Значне зростання титру антитіл у сироватці крові у фазі реконвалесценції також є діагностичним.

Поліовірус можна виявити в зразках з носоглоткових змивів, фекаліях, а іноді і спинномозкової рідини (СМР), шляхом виділення вірусу в культурі клітин або виявлення вірусу за допомогою полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією.

Виділення вірусу в культурі клітин є найбільш чутливим методом діагностики поліовірусної інфекції. Найчастіше поліовірус виділяють зі зразків випорожнень. Його також можна виділити з мазків із зіву. Виділення з крові або спинномозкової рідини є менш імовірним.

Щоб підвищити ймовірність виділення поліовірусу, у **пацієнтів** з підозрою на поліомієліт слід зібрати щонайменше **два зразки випорожнень з інтервалом у 24 години**. Ці зразки повинні бути зібрані якомога раніше на початку захворювання (в ідеалі - протягом 14 днів після його початку).

ПЛР зі зворотною транскрипцією в режимі реального часу використовується для диференціації можливих диких штамів від вакцинних штамів.

Часткове секвенування геному використовується для підтвердження генотипу поліовірусу та визначення його ймовірного географічного походження.

Серологічне тестування

Серологічні дослідження можуть бути корисними для підтвердження діагнозу паралітичного поліомієліту, особливо якщо відомо або підозрюється, що пацієнт не був вакцинований. Зразок сироватки від хворого

слід отримати якомога раніше на початку захворювання, а зразок реконвалесцентної сироватки - щонайменше через три тижні після одужання.

Лікування: Противірусної терапії не існує.

Профілактика: Захворювання можна попередити як за допомогою інактивованої (Salk), так і атенуйованої (Sabin) вакцини; обидві вакцини індукують гуморальні антитіла, які нейтралізують вірус у кровотоці. Оральна вакцина Сабіна використовується для планової дитячої імунізації, оскільки вона:

- індукує імунітет IgA в кишківнику, тим самим перешкоджаючи передачі інфекції;

- індукує імунітет більш тривалої тривалості;

- застосовується перорально.

Інактивована вакцина індукує антитіла, які можуть перешкоджати вірулентним ревертантам у живій вакцині викликати паралітичний поліомієліт.

Імунні глобуліни доступні, але використовуються не часто.

Віруси Коксакі та ЕСНО

Захворювання: Асептичний менінгіт, герпангіна, плевродинія, міокардит і перикардит є найбільш поширеними захворюваннями.

Характеристики: вірусні частки без суперкапсиду містять одноланцюгову «+» РНК. Поділ вірусів Коксакі на 2 підгрупи (А та В) пов'язаний з їх здатністю по-різному уражувати органи новонароджених мишей. Віруси Коксакі підгрупи А (24 серотипи) викликають в'ялі паралічі (тяжко протікають у дорослих), підгрупи В (6) – спастичні паралічі (небезпечні для дітей).

Передача: Фекально-оральний шлях.

Патогенез: Початкове місце інфікування - ротоглотка, але основне - шлунково-кишковий тракт. Вірус поширюється через кров до різних органів.

Деякі віруси Коксакі, деякі еховіруси та пареховіруси людини можуть викликати висипання, часто під час епідемій. Висипання зазвичай не сверблять, не лущаться і з'являються на обличчі, шиї, грудях та кінцівках. Іноді вони бувають макулопапульозними або морбілоподібними, але зрідка

геморагічними, петехіальними або везикулярними. Часто спостерігається лихоманка. Одночасно може розвиватися асептичний менінгіт.

Асептичний менінгіт найчастіше зустрічається серед немовлят і дітей. У немовлят та дітей раннього віку причиною найчастіше є один з наступних вірусів: вірус Коксакі групи А або В, еховірус або пареховірус людини. У дітей старшого віку та дорослих асептичний менінгіт можуть викликати інші ентеровіруси, а також інші віруси. Перебіг зазвичай доброякісний. Ентеровірусний асептичний менінгіт може супроводжуватися висипом. Рідко виникає енцефаліт, який може бути важким.

Герпангіна - це захворювання, спричинене численними вірусами Коксакі групи А та зрідка іншими ентеровірусами. Інфекція викликає ураження ротоглотки, слизових оболонок, везикулярні та виразкові ураження. Діагноз герпангіни ґрунтується на симптомах і характерних ураженнях ротової порожнини. Підтверджувальне тестування зазвичай не потрібне, але можливе Герпангіна має тенденцію до епідемій, найчастіше у немовлят і дітей.

Епідемічна міалгія (Борнгольмська хвороба, епідемічна плевродинія) — одна з клінічних форм ентеровірусних інфекцій, найчастіше спричинена вірусами Коксакі групи В та ентеровірусами. Інфекція викликає сильний плевритичний біль у грудях або животі, зазвичай пов'язаного з гарячкою, нездужанням і головним болем.

Міоперикардит, спричинений ентеровірусом, може виникнути в будь-якому віці, але більшість пацієнтів віком від 20 до 39 років. Пацієнти можуть скаржитися на біль у грудях, аритмію, серцеву недостатність або раптову смерть. Одуjuanня зазвичай повне, але у деяких пацієнтів розвивається дилатаційна кардіоміопатія. Для діагностики міоперикардиту може знадобитися ЗТ-ПЛР міокардіальної тканини.

Міокардит новонароджених (серцева інфекція при народженні) викликається вірусами Коксакі групи В, деякими еховірусами та пареховірусами людини. Він викликає лихоманку, серцеву недостатність і має високий рівень смертності.

Лабораторна діагностика: Вірус можна виявити за допомогою ПЛР у культурі клітин та ідентифікувати шляхом нейтралізації. Значне зростання

титру антитіл у сироватці крові у фазі реконвалесценції є діагностичним.

Лікування: Противірусної терапії не існує.

Профілактика: Вакцина не існує.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА

Визначення серотипу вірусу поліомієліту на культурі клітин

Мета роботи: за представленими результатами визначити серотип декількох ізолятів вірусу поліомієліту

1. На культурі клітин визначити серотип декількох ізолятів вірусу поліомієліту, при цьому (рис.4.3).

Polio pool – пул сироваток до трьох типів вірусу

P1+P2 – суміш сироваток до 1 та 2 типів

P1+P3 - суміш сироваток до 1 та 3 типів

P2+P3 - суміш сироваток до 2 та 3 типів

Virus control= клітини+вірус без сироватки

Cell control= клітини без вірусу та сироватки

Back titration = титрування вірусів від 10^{-3} до 10^{-7}

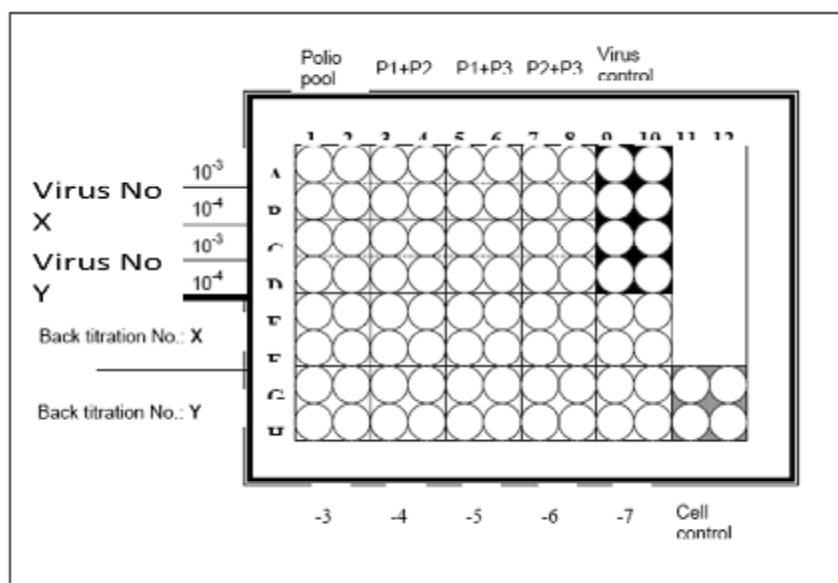


Рис. 4.3. – Схема нанесення зразків при постановки реакції нейтралізації на культурі клітин для визначення серотипів ізолятів X та Y вірусу поліомієліту

2. Результати реакції нейтралізації культури клітин представлені на рисунку 4.4. Клітинні контрольні лунки повинні мати повний моношар клітин. Контрольні лунки для вірусів повинні показувати повну ЦПД. Зворотне титрування повинно підтвердити, що кількість вірусу, використаного в тесті для одного з розведень, знаходиться в межах розведення, яке здатне викликати ЦПД на даній культурі клітин. Пули антисироваток, які запобігають розвитку ЦПД, вказують на ідентичність ізоляту вірусу або суміші вірусів. Нездатність вірусу реплікуватися в присутності пулу антисироваток пояснюється нейтралізацією інфекційності однією з антисироваток, присутніх у пулі.

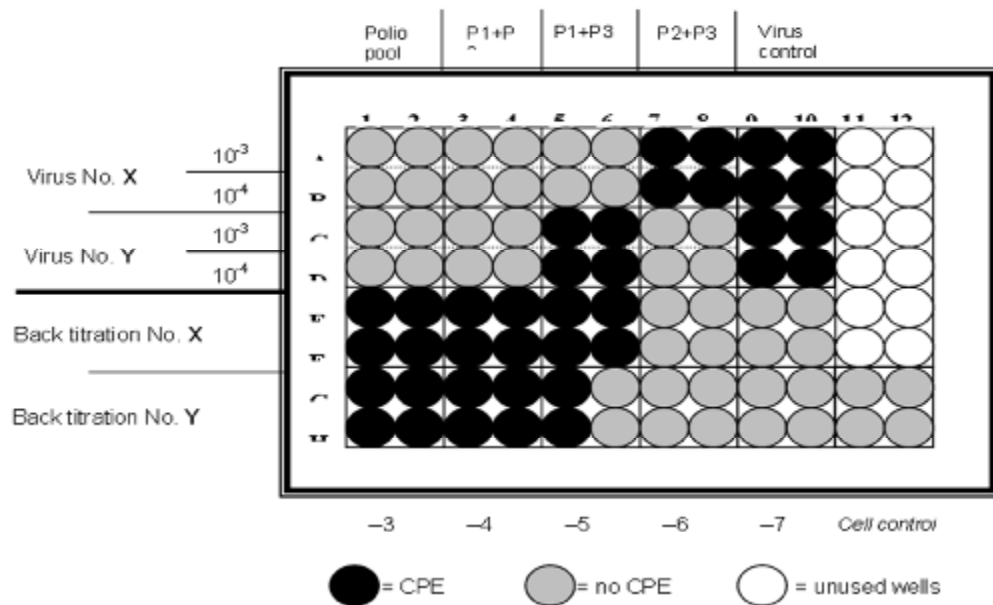


Рис. 4.4. – Результати постановки реакції нейтралізації на культурі клітин для визначення серотипів ізолятів X та Y вірусу поліомієліту

3. За результатами реакції заповнити таблицю 4.1 та зробити висновок про серотипи ізолятів X та Y.


Таблиця 4.1

Результати постановки реакції нейтралізації на культурі клітин

Сироватки P1+P2+P3	Сироватки P1+P2	Сироватки P1+P3	Сироватки P2+P3	Серотип вірусу

САМОСТІЙНА РОБОТА

1. **Вкажіть на схематичному зображенні структурні компоненти вірусу поліомієліту**

	<p>1- Капсид</p> <p>2- Геном</p> <p>3- VPg</p>
---	--

2. **Заповнити таблицю, зазначивши метод лабораторної діагностики вірусу поліомієліту в залежності від цілі.**

Ціль	Виділення вірусу	Ідентифікація серотипу	Диференційна діагностика ізолятів вірусу	Визначення антивірусного імунітету
Метод				

3. **Заповнити таблицю, зазначивши засоби профілактики та лікування ентеровірусів.**

Вірус	Профілактика	Лікування
Вірус поліомієліту		
Вірус Коксакі		
ЕCHO		

ПИТАННЯ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЮ

1. Який тип нуклеїнової кислоти мають представники родини Picornaviridae?
2. Яку будову мають пікорнавіруси?
3. Які особливості роду ентеровірусів є визначальними?
4. Які віруси належать до роду ентеровірусів?
5. Які методи культивування можна використовувати для ентеровірусів?
6. Які етапи взаємодії ентеровірусів з чутливими клітинами?
7. Скільки існує серологічних типів вірусів поліомієліту?
8. Який патогенез поліомієліту?
9. Які існують методи лабораторної діагностики поліомієліту?
10. Які вакцини можна використовувати для профілактики поліомієліту? Які позитивні та негативні властивості живих та інактивованих вакцин?
11. Які критерії диференціації між вірусами Коксакі А та Коксакі В?

Оцінка _____ Підпис викладача _____

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА 5

Лабораторна діагностика вірусних гепатитів

ПЕРЕЛІК ПИТАНЬ ДЛЯ ВИВЧЕННЯ:

1. Етіологічні агенти вірусних гепатитів, їх властивості та класифікація.
2. Вірусний гепатит А.
3. Вірусний гепатит В.
4. Вірусний гепатит С.
5. Вірусний гепатит D.
6. Вірусний гепатит E.

ТЕОРІЯ

Гепатит - запалення печінки, яке може бути викликане вірусом або іншими невірусними причинами. Запалення є природною реакцією організму на пошкодження і часто викликає набряк і відчуття болю. Цей стан може бути самообмежувальним або прогресувати до фіброзу (рубцювання), цирозу або раку печінки.

Віруси гепатиту є найпоширенішою причиною гепатиту в світі, але й інші інфекції, токсичні речовини (наприклад, алкоголь, певні ліки), опромінення та аутоімунні захворювання також можуть викликати гепатит.

Вірусні гепатити - вірусні інфекції печінки, які викликають запалення печінки з наступним розвитком симптомів жовтяниці та підвищенням рівня печінкових ферментів. Причиною вірусних гепатитів можуть бути щонайменше п'ять вірусів. Вірусні гепатити відрізняються за шляхами інфікування, клінічною картиною та патогенезом. Визначення типу гепатиту проводять за допомогою спеціальних лабораторних тестів.

Існує 5 основних вірусів гепатиту, які відносяться до типів А, В, С, D і E (таблиця 5.1). Ці 5 типів викликають найбільше занепокоєння через тягар хвороб і смертей, які вони спричиняють, а також потенціал для спалахів і поширення епідемій. Зокрема, типи В і С призводять до хронічних захворювань у сотень мільйонів людей і, є найпоширенішою причиною цирозу печінки та раку.

Нещодавні дослідження так званого вірусу гепатиту F дозволили підтвердити його гетерогенність, тому термін вірус гепатиту F більше не використовується. Участь вірусів TTV (Transfusion transmitted virus або Torque teno virus) і SEN (назва вірусу, як і у випадку TTV, походить від ініціалів пацієнта, в крові якого вперше було виявлено вірус), а також деяких вірусів тварин (пекінських качок, канадського лісового бабака та ін.) у патології людини і можливий ступінь ураження органів є предметом дискусій.

Відомо, що вірус гепатиту G (також відомий як вірус гепатиту GB) інфікує людей, але не викликає захворювання.

Основними шляхами передавання гепатиту A та E є вживання контамінованої їжі або води. Гепатити B, C і D зазвичай виникають внаслідок парентерального контакту з інфікованими біологічними рідинами. Поширеними шляхами передавання цих вірусів є отримання зараженої крові або продуктів крові, інвазивні медичні процедури з використанням зараженого обладнання, також передача гепатиту B відбувається від матері до дитини під час пологів, між членами родини, а також статевим шляхом.

Гепатит A - це завжди гостре, короткочасне захворювання, тоді як гепатити B, C і D, можуть викликати розвиток тривалого хронічного захворювання. Гепатит E зазвичай протікає гостро, але може бути особливо небезпечним для вагітних жінок.

Хоча всі віруси гепатиту викликають захворювання печінки, вони відрізняються за важливими ознаками.

Вірус гепатиту A (ВГА) - вид вірусу з порядку *Picornavirales* родини *Picornaviridae*, він є типовим представником роду *Hepatovirus*. Частка ВГА не має ліпідної оболонки. Геном – ол РНК, упакована в білковий капсид.

ВГА присутній у фекаліях інфікованих людей і найчастіше передається під час споживання забрудненої води або їжі. Певні сексуальні практики також можуть поширювати ВГА. У багатьох випадках інфекції протікають у легкій формі, більшість людей повністю одужують і залишаються імунними до подальшого ураження ВГА. Однак інфекції ВГА можуть мати тяжкий перебіг і загрожувати життю. Більшість людей у регіонах світу з поганими

санітарними умовами інфіковані цим вірусом. Для профілактики ВГА існують безпечні та ефективні вакцини.

Вірус гепатиту В (ВГВ) - ДНК-вмісний вірус роду *Orthohepadnavirus* родини *Hepadnaviridae*. Повноцінна вірусна частка, яка називається часткою Дейна, складається із зовнішньої ліпідної оболонки та ікосаедричного нуклеокапсиду, що, в свою чергу, складається з білка та дл ДНК. Білки оболонки (поверхневий антиген, HBsAg) сформовані трьома антигенними білковими групами. Нуклеокапсид містить вірусну ДНК і ДНК-полімеразу, яка має зворотну транскриптазну активність, подібну до ретровірусів. Геном представлений однією молекулою кільцевої дл ДНК (один ланцюг (негативної полярності) – повний, а другий (позитивної полярності) – неповний).

ВГВ передається при контакті з інфікованою кров'ю, спермою та іншими рідинами організму. ВГВ може передаватися від інфікованої матері до дитини під час пологів або від члена родини до дитини в ранньому дитинстві. Передавання також може відбуватися через переливання зараженої ВГВ крові та продуктів крові, при проведенні ін'єкцій під час медичних процедур, а також через вживання ін'єкційних наркотиків. ВГВ також становить ризик для медичних працівників, які отримують випадкові уколи голкою під час догляду за інфікованими ВГВ пацієнтами. Для профілактики вірусного гепатиту В існують безпечні та ефективні вакцини.

Вірус гепатиту С (ВГС) - позитивний одноланцюговий РНК-вірус з родини *Flaviviridae*. Віріон оточений ліпідною оболонкою. Частка вірусу гепатиту С має діаметр від 55 до 65 нм. У ліпідній оболонці виявлено два білка: Е1 і Е2. Вони беруть участь у прикріпленні вірусу до клітини та його проникненні всередину. Всередині віріону знаходиться ікосаедрична серцевина (нуклеокапсид) діаметром від 33 до 40 нм. Усередині нуклеокапсиду знаходиться РНК вірусу.

ВГС здебільшого передається через контакт з інфікованою кров'ю. Це може статися через переливання зараженої ВГС крові та продуктів крові, ін'єкції під час медичних процедур, а також через вживання ін'єкційних наркотиків. Статевим шляхом також можлива передача інфекції, але вона

зустрічається набагато рідше. Ймовірність передачі інфекції від жінки, у якої виявлені антитіла до ВГС, до новонародженої дитини, також низька. Вакцини від гепатиту С не розроблена.

Вірус гепатиту D (ВГD) - невеликий сферичний вірус діаметром 36 нм. Віріон має зовнішню ліпідну оболонку, що містить три види білків оболонки ВГВ - великі, середні та малі поверхневі антигени гепатиту В - і ліпиди хазяїна, що оточують внутрішній нуклеокапсид. Нуклеокапсид містить одноланцюгову кільцеву РНК довжиною 1679 нуклеотидів і близько 200 молекул антигену гепатиту D (HDAg) на кожен геном.

ВГD вважається субвірусним сателітом, оскільки він може розмножуватися лише в присутності вірусу гепатиту В. Тому інфекція, обумовлена ВГD, виникає лише у тих, хто інфікований ВГВ. Передача ВГD може відбуватися або під час одночасного інфікування з ВГВ (коінфекція), або в результаті «нашарування» на хронічний гепатит В чи стан носійства гепатиту В (суперінфекція).

Подвійне інфікування ВГD та ВГВ може призвести до більш серйозного перебігу захворювання та гіршого результату. Вакцини проти гепатиту В забезпечують захист від інфікування ВГD.

Вірус гепатиту E (HEV) – РНК-вмісний вірус, не оточений ліпідною оболонкою.

Раніше вірус був віднесений до роду *Orthohepevirus*, а тепер сформовано родину *Hepeviridae*.

Вірус гепатиту E найчастіше передається через споживання забрудненої води або їжі. ВGE є поширеною причиною спалахів гепатиту в країнах, що розвиваються, і все частіше визнається важливою причиною захворювання в розвинених країнах. Клінічно гепатит E можна порівняти з гепатитом А, але у вагітних жінок хвороба протікає важко і пов'язана з клінічним синдромом, який називається фульмінантною печінковою недостатністю. Вагітні жінки, особливо в третьому триместрі, мають вищий рівень смертності від цього захворювання - близько 20%. Безпечні та ефективні вакцини для профілактики інфікування вірусом гепатиту В розроблені у деяких країнах, але не є широкодоступними.

Таблиця 5.1.

Характеристика вірусів гепатиту

Характеристики вірусів	ВГА	ВГВ	ВГС	ВГД	ВГЕ	ВГГ
Тип нуклеїнової кислоти	олРНК (+)	дл ДНК, циркулярна, неповна	ол РНК (+)	ол РНК, дефектний вірус	олРНК (+)	ол РНК(+)
Класифікаційне положення	<i>Picornaviridae</i>	<i>Hepadnaviridae</i>	<i>Flaviviridae</i>	<i>Deltavirus</i>	<i>Hepeviridae</i>	<i>Flaviviridae</i>
Розмір віріонів, нм	27	40	80	36	32-34	60
Наявність оболонки	-	+	+	+	-	+
Культитивування в культурі клітин	Клітини гепатоми	Клітини гепатоми	Huh7.5.1	Клітини гепатоми	Модифіковані клітини гепатоми	?
Патогенність для тварин	Шимпанзе, бабаки	Шимпанзе	Шимпанзе	Шимпанзе	Шимпанзе	?
Реплікація в гепатоцитах	Цитоплазма	Ядро	Цитоплазма	Ядро	Цитоплазма	?
Антигенні варіанти	Вірусний специфічний антиген	HBsAg, HBcAg, HBeAg, HBxAg	Кілька підтипів	Дві форми: малий та, великий	гетерогенний	П'ять філогенетичних груп
Онкогенність	-	+	+	+	-	+
Зв'язок з іншими вірусами гепатиту	-	-	-	ВГВ	-	ВГС ВГВ
Механізм передавання	Фекально-оральний	Парентеральний, статевий	Парентеральний, статевий	Парентеральний	Фекально-оральний	Парентеральний
Фактори передачі	Вода, їжа	Кров, сперма, виділення з піхви	Кров	Кров	Вода, їжа	Кров

Групи ризику	Діти	Лікарі, реципієнти крові, споживачі наркотиків, статеві партнери, діти ВГВ-позитивних матерів	Лікарі, реципієнти крові, споживачі наркотиків, статеві партнери, пацієнти гемодіалізу	Пацієнти з гепатитом В, лікарі, реципієнти, споживачі наркотиків	Молодь Азії, Африки	Лікарі, реципієнти крові, споживачі наркотиків, статеві партнери, пацієнти гемодіалізу
Профілактика	Інактивована та жива вакцина	1. Плазмозна вакцина (з крові носіїв HBsAg) 2. Генетично модифіковані 3. Рекombінантні з поксвірусу	Інтерферон Інгібітор протеази Інгібітор полімерази	Вакцинація проти гепатиту В	Не розроблено	Не розроблено

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА

На практиці студенти знайомляться з сучасними методами лабораторної діагностики вірусних гепатитів; знайомляться з експрес-тестом для виявлення поверхневого антигену гепатиту В. Заповнені протоколи підписуються викладачем.

Протокол 1.

Швидкий тест на HBsAg - це тест прямого зв'язування для візуального виявлення поверхневого антигену гепатиту В (HBsAg) в сироватці, плазмі або цільній крові.

Використовується як допоміжний засіб для діагностики гепатиту В. Тест заснований на принципі імуноферментного аналізу для визначення HBsAg в сироватці або цільній крові. Для специфічного виявлення HBsAg використовуються моноклональні та поліклональні антитіла. Цей однокроковий тест є дуже чутливим і займає всього 10 хвилин. Результати тесту можна виявити візуально без будь-яких додаткових приладів.

Мета: Виявити поверхневий антиген гепатиту В (HBsAg) у цільній крові.

Матеріали: експрес-тест для скринінгу та діагностики гепатиту В, дистильована вода, чашки Петрі, фільтрувальний папір.

Процедура:

1. Тест-смужка містить мембранну смужку, яка попередньо покрита мишачими моноклональним анти-НВs антитілами для захоплення антигену вірусу гепатиту В в області тест-смужки. Кон'югат мишачого моноклонального анти-НВs антитіла з колоїдним золотом і зразком переміщується вздовж мембрани хроматографічно до тестової області (Т) і утворює видимі лінії в міру формування комплексу антитіло-антиген-антитіло з частинками золота. Як тестова лінія, так і контрольна лінія невидимі до нанесення зразків. Контрольна лінія використовується для процедурного контролю. Контрольна лінія завжди повинна з'являтися, якщо процедура тестування виконана правильно і реагенти контрольної лінії працюють.
2. Забір зразків: кров із пальця або венозна.
3. Розподіліть 75 мкл цільної крові.
4. Видавіть 1 краплю буфера.
5. Проаналізуйте результат через 30 хвилин.

Примітка: Для більшості позитивних зразків лінія в тестовій області (Т) може з'явитися раніше, ніж через 30 хвилин. Однак виявлення та інтерпретацію результатів тесту слід проводити лише через 30 хвилин після внесення зразка.

САМОСТІЙНА РОБОТА

1. Вказати таксономічне положення вірусів гепатитів А, В, С, D, E, G

Вірус	ВГА	ВГВ	ВГС	ВГD	ВГE	ВГG
Родина						
Рід						

2. Намалюйте вірусну частку із зазначенням окремих компонентів

	Вірус гепатиту А

	Вірус гепатиту В

	Вірус гепатиту С

3. Заповніть таблицю

Вірус	Джерело інфекції	Механізм передавання	Основні симптоми
Вірус гепатиту А			
Вірус гепатиту В			
Вірус гепатиту С			
Вірус гепатиту D			
Вірус гепатиту E			
Вірус гепатиту G			

4. Заповніть таблицю

Типові поєднання маркерів гепатиту В та відповідне клінічне значення (діагноз)

HBsAg	Анти-HBs	Анти-HBc	HBeAg	анти-HBe	Діагноз
+	-	IgM	+	-	
+	-	IgG	+	-	
+	+	IgG	-	+	
+	+	+	+/-	+/-	
-	-	IgM	+/-	+/-	
-	-	IgG	-	+/-	
-	+	IgG	-	+/-	
-	+	-	-	-	

5. Профілактика та терапія вірусних гепатитів

Вірусний гепатит	Профілактика	Терапія
Вірусний гепатит А		
Вірусний гепатит В		
Вірусний гепатит С		

Вірусний гепатит D		
Вірусний гепатит E		
Вірусний гепатит G		

ПИТАННЯ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЮ

1. Вкажіть, які антигени вірусу гепатиту В можна виявити в сироватці крові хворих на вірусний гепатит В. Які антигени вірусу гепатиту В можна виявити тільки в гепатоцитах?
2. Які маркери гострого гепатиту В можна виявити в крові пацієнта?
3. Які маркери гострого гепатиту А можна виявити в крові пацієнта?
4. Який маркер можна виявити в крові після вакцинації проти гепатиту В?
5. Які препарати використовуються для специфічної профілактики гепатиту В?
6. Яка мінімальна інфекційна доза вірусу гепатиту В при парентеральному зараженні?
7. Які віруси гепатиту можуть викликати розвиток первинної гепатоцелюлярної карциноми?
8. Які причини високого відсотка хронічних випадків та резистентності до противірусної терапії при вірусному гепатиті С?
9. Які заходи використовуються для профілактики гепатиту В?
10. Які вірусні гепатити можна діагностувати в Україні? Які методи лабораторної діагностики слід використовувати?
11. Які віруси є збудниками вірусних гепатитів TTV та Sen? Чи зареєстровані в Україні випадки цих захворювань?

Оцінка _____ Підпис викладача _____

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА 6

Герпесвіруси. Аденовіруси.

Лабораторна діагностика герпесвірусних та аденовірусних інфекцій

ПЕРЕЛІК ПИТАНЬ ДЛЯ ВИВЧЕННЯ

1. Родина *Herpesviridae*. Морфологія, особливості репродукції та культивування герпесвірусів. Патогенез, клінічні симптоми та імуногенез герпесвірусних інфекцій. Принципи та методи лабораторної діагностики, лікування та профілактики герпесвірусної інфекції.
2. Родина *Adenoviridae*. Морфологія, особливості репродукції та культивування аденовірусів. Патогенез, клінічні симптоми та імуногенез аденовірусної інфекції. Принципи та методи лабораторної діагностики, лікування та профілактики аденовірусної інфекції.

ТЕОРІЯ

Герпесвіруси

Герпесвіруси широко поширені в природі та здатні викликати ураження у широкого спектру хребетних тварин. Натепер відомо близько 100 герпесвірусів, які класифікуються на три підродини у родині *Herpesviridae*: *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* та *Gammaherpesvirinae*. Серед цих вірусів дев'ять видів патогенні для людини. Вірус герпесу людини 1-го типу (ВГЛ 1, вірус простого герпесу 1-го типу, ВПГ 1) є причиною так званих рецидивуючих "застуд", везикулярних уражень слизової оболонки рота і губ. Генітальний герпес (викликається вірусом герпесу людини 2-го типу, ВГЛ 2) є поширеним захворюванням, що передається статевим шляхом. Вітряна віспа, збудником якого є вірус вітряної віспи/оперізуючого лишая (ВГЛ 3) - дитяча хвороба, яка може призводити до серйозних наслідків, особливо при первинному зараженні у дорослому віці. Серед дітей раннього віку зустрічається так звана, дитяча розеола, обумовлена переважно ВГЛ 6, рідше ВГЛ7. Досить розповсюдженою в людській популяції є цитомегаловірусна

інфекція, викликана герпесвірусом людини 5-го типу, перебіг якої в звичайних умовах легкий. При зниженій імунній відповіді, що спостерігається в новонароджених та пацієнтів з імунодефіцитними станами різного генезу (наприклад, у реципієнтів трансплантатів та ВІЛ-інфікованих) герпесвіруси можуть викликати серйозні і часто смертельні захворювання, включаючи енцефаліт, пневмонію та гепатит. До того ж з певними герпесвірусами (вірус Епштейна-Барр (ВГЛ4) та вірус саркоми Капоші (ВГЛ 8)) пов'язують розвиток злоякісних новоутворень.

До складу родини Herpesviridae входить три підродини, представники яких відрізняються на основі біологічних властивостей, включаючи клітинний тропізм і організацію генома. Усі герпесвіруси містять дволанцюговий лінійний ДНК-геном, розміром від 120 до 230 тис. п.о., залежно від виду вірусу. Віріони герпесвірусів сферичні або плеіоморфні, діаметром 100-300 нм. Вони вміщують 100-нм ікосаедричний нуклеокапсид (T=16), оточений ліпідною оболонкою. До складу нуклеокапсиду входить щонайменше шість білків і вірусна ДНК. Між нуклеокапсидом та ліпідною оболонкою знаходиться структура, відома як тегумент. Тегумент складається щонайменше з 20 різних білків, що кодуються вірусом, і його розмір може варіювати навіть у межах одного віріону. До складу ліпідної оболонки входить близько десяти вірусних глікопротеїнів.

Однією з особливих властивостей герпесвірусів є їхня здатність викликати латентні інфекції. Після первинного інфікування вірусна ДНК зберігається в латентному стані в нейронах, В- або Т-лімфоцитах чи інших типах клітин. У латентно інфікованих осіб симптоми можуть бути відсутні протягом місяців, років або навіть усього життя. Реактивація латентного вірусу може призвести до рецидивуючих захворювань, таких як повторні рецидиви лабіального або генітального герпесу, або оперізуючого герпесу (оперізуючий лишай) - локального висипу, який може з'явитися через роки після первинного зараження вітряною віспою. Люди з ослабленою імунною системою можуть страждати від реактивації цитомегаловірусу або вірусу саркоми Капоші з жахливими наслідками.

Таблиця 6.1

Класифікація герпесвірусів людини

Підродина	Рід	Назва	Патофізіологія
<i>Alfaherpesvirinae</i>	<i>Simplexvirus</i>	Вірус герпесу людини 1-го типу (ВГЛ 1) / Вірус простого герпесу 1-го типу (ВПГ1)	Ураження: шкіри, слизової оболонки ротової порожнини, кон'юнктиви чи рогівки ока енцефаліт
		Вірус герпесу людини 2-го типу (ВГЛ 2) / Вірус простого герпесу 2-го типу (ВПГ2)	Ураження слизових оболонок геніталій, у новонароджених - ЦНС
	<i>Varicellovirus</i>	Вірус герпесу людини 3-го типу (ВГЛ 3) / Вірус вітряної віспи/оперізуючого лишая/ <i>Varicella zoster virus</i> (VZV)	Вітряна віспа, оперізуючий лишай та ін.
<i>Bethaherpesvirinae</i>	<i>Cytomegalovirus</i>	Вірус герпесу людини 5-го типу (ВГЛ 5) Цитомегаловірус (ЦМВ)	Патології новонароджених; ускладнення після трансплантації органів та кісткового мозку; інтерстиціальна пневмонія, та ін.
	<i>Roseolovirus</i>	Вірус герпесу людини 6-го типу (ВГЛ6): 6А та 6В	Пневмонії та роzeоли новонароджених, неврологічні ускладнення та ін.
		Вірус герпесу людини 7-го типу (ВГЛ7)	Роzeоли новонароджених, синдром хронічної втоми, неврологічні ускладнення та ін.
<i>Gammaherpesvirinae</i>	<i>Lymphocryptovirus</i>	Вірус герпесу людини 4-го типу (ВГЛ 4) / Вірус Епштейна-Барр (ВЕБ)	Інфекційний мононуклеоз, лімфома Беркіта, назофарингіальна карцинома, лімфома ЦНС у хворих на СНІД, посттрансплантаційний лімфопроліферативний синдром, волосиста лейкоплакія (пов'язана з ВІЛ-інфекцією)
	<i>Rhadinovirus</i>	Вірус герпесу людини 8-го типу (ВГЛ8)	Саркома Капоші, лімфопроліферативні захворювання, хвороба Кастельмана

Основні властивості герпесвірусів

1. Нуклеокапсид ікосаедричної симетрії;
2. Великі віріони діаметром 150-250 нм, оточені ліпідною двошаровою мембраною;
3. Лінійні геноми ДНК, що кодують 100-200 генів; молекулярна маса 54-94 млн. дальтон;
4. Капсид складається з 162 капсомерів: 150 гексонів та 12 пентонів на вершинах ікосаедра;
5. Капсид герпесвірусу оточений аморфним шаром під назвою "тегумент", який містить численні вірусні білки, що функціонують після проникнення віріону в клітину;
6. Більшість герпесвірусів після закінчення первинної інфекції переходять у латентний стан. Латентні герпесвіруси можуть регулярно реактивуватися, як при застуді, або лише через багато років, як при оперізувальному лишаї;
7. Три підродини: альфа-, бета- та гаммагерпесвіруси.
8. Відомо дев'ять герпесвірусів людини, включаючи вірус простого герпесу, вітряної віспи/оперізуючого лишаю, вірус Епштейна-Барр, цитомегаловірус. Натепер відомо понад 100 герпесвірусів, що інфікують багато видів тварин.

Вірус герпесу людини 1 типу (ВГЛ1, вірус простого герпесу 1-го типу)

Захворювання: *Herpes labialis* (гарячкові пухирці або простудні виразки), кератит, енцефаліт.

Характеристика: Оболонковий вірус з ікосаедричним нуклеокапсидом і лінійною дволанцюговою ДНК. Полімераза у складі вірусної частки відсутня. Відомий один серотип; проте відбувається перехресна реакція з ВГЛ2. Відсутній груповий антиген, специфічний для герпесвірусів.

Передача: Через слину або внаслідок прямого контакту з вірусом із везикул.

Патогенез: Початкові везикулярні ураження виникають у ротовій порожнині або на обличчі. Потім вірус просувається висхідним шляхом по аксону і переходить у латентний стан у чутливих (трійчастих) гангліях.

Рецидиви виникають на шкірі, що інервується ураженим чутливим нервом, і провокуються гарячкою, сонячним світлом, стресом тощо. Дисемінація відбувається у пацієнтів з пригніченим клітинним імунітетом.

Лабораторна діагностика: У культурі клітин вірус викликає цитопатичну дію (ЦПД). Його ідентифікують за допомогою реакції нейтралізації (РН) антитіл або методу флуоресціюючих антитіл (МФА).

Мазок за Цанком – мікроскопічне дослідження клітин з основи везикули, дозволяє виявити багатоядерні гігантські клітини з внутрішньоядерними еозинофільними включеннями. Ці гігантські клітини не є специфічними для тільки ВГЛ1; вони також спостерігаються у везикулярних ураженнях, спричинених ВГЛ2 та вірусом вітряної віспи/оперізуючого лишая (ВГЛ5).

Для діагностики первинної інфекції, але не рецидивів можна використовувати виявлення підвищення титру антитіл в парних сироватках крові.

Герпетичний енцефаліт можна діагностувати за допомогою ПЛР – виявлення ДНК ВПГ1 проводять у спинномозковій рідині.

Лікування: Ацикловір при енцефаліті та дисемінованих захворюваннях. Ацикловір не впливає латентну інфекцію, обумовлену ВГЛ 1. При кератитах застосовують трифлюоротимідин або відарабін.

Первинні інфекції та локальні рецидиви є самообмежувальними. Для прискорення загоєння можна використовувати різноманітні безрецептурні підсушувальні засоби.

Профілактика: Рецидивам можна запобігти, уникаючи специфічних провокуючих факторів, таких як інтенсивне сонячне світло. Ацикловір може зменшити кількість рецидивів.

Вакцини не існують.

Вірус герпесу людини 2-го типу (ВГЛ 2, вірус простого герпесу 2-го типу)

Хвороби: Генітальний герпес, асептичний менінгіт та неонатальна інфекція.

Характеристика: Оболонковий вірус з ікосаедричним нуклеокапсидом і лінійною дволанцюговою ДНК. Полімераза у складі вірусної частки відсутня. Відомий один серотип; проте відбувається перехресна реакція з ВГЛ2. Відсутній груповий антиген, специфічний для герпесвірусу.

Передача: У дорослих зараження відбувається під час статевого контакту, а у новонароджених - під час проходження через родові шляхи.

Патогенез: Початкові везикулярні ураження виникають на статевих органах. Потім вірус рухається висхідним шляхом по аксону і переходить у латентний стан у чутливих (поперекових або крижових) гангліях. Рецидиви можуть бути спровоковані стресом.

Лабораторна діагностика: Вірус викликає ЦПД в культурі клітин. Ідентифікацію проводять за допомогою реакції нейтралізації антитіл або флуоресціюючих антитіл. Мазок Цанка виявляє багатоядерні гігантські клітини, але вони не є специфічним для ВГЛ 2. Для діагностики первинної інфекції, але не рецидивів можна використовувати встановлення підвищення титру антитіл.

Лікування: Ацикловір ефективний при лікуванні як первинної, так і рецидивуючої форми захворювання. Проте, ацикловір не впливає на латентну інфекцію.

Профілактика: Первинному захворюванню можна запобігти шляхом захисту від контакту з вмістом везикул. Ймовірність рецидивів можна зменшити шляхом тривалого застосування перорального ацикловіру. Вакцини не існують.

Вірус герпесу людини 3-го типу (ВГЛ 3, вірус вітряної віспи/оперізуючого лишая)

Захворювання: Вітряна віспа у дітей та оперізуючий лишай у дорослих.

Характеристика: Оболонковий вірус з ікосаедричним нуклеокапсидом і лінійною дволанцюговою ДНК. У складі віріону полімераза відсутня. Існує один серотип вірусу.

Передача: Вітряна віспа передається переважно повітряно-крапельним шляхом. Оперізуючий лишай (зостер) виникає внаслідок реактивації

латентного вірусу.

Патогенез: Початкове зараження відбувається в дихальних шляхах. У подальшому вірус потрапляє в кров (вірусемія). Володіючи дерматропністю вірус проникає до епітеліальних клітин шкіри, викликаючи характерні зміни. У процесі генералізації вірус можуть проникати у внутрішні органи.

Вірус має тропність і до нервової тканини. Після гострого епізоду вітряної віспи вірус залишається у латентному стані у чутливих гангліях. Через роки у людей похилого віку та осіб з ослабленим імунітетом вірус може реактивуватися, викликаючи оперізуючий лишай.

Лабораторна діагностика: Вірус викликає ЦПД в культурі клітин і може бути ідентифікований за допомогою методу флуоресціюючих антитіл.

У мазках з основи везикули виявляються багатоядерні гігантські клітини. В інфікованих клітинах присутні внутрішньоядерні включення.

Діагностичним є 4-кратне підвищення титру антитіл у сироватці крові на стадії реконвалесценції.

Лікування: Для імунокомпетентних пацієнтів при вітряній віспі або оперізуючому лишаї противірусна терапія не показана. У пацієнтів з ослабленим імунітетом ацикловір може запобігти дисемінації.

Профілактика: Вакцина містить живий ослаблений вірус. Пацієнти з ослабленим імунітетом, раніше інфіковані вірусом вітряної віспи, для запобігання дисемінованого перебігу хвороби повинні отримати пасивну імунізацію імуноглобуліном проти вітряної віспи (VZIG) та ацикловір.

Вірус Епштейна-Барр (ВГЛ4)

Характеристика: Оболонковий вірус з ікосаедричним нуклеокапсидом і лінійною дволанцюговою ДНК. Віріонна полімераза відсутня. Один серотип.

Передача: Вірус міститься в ротоглотці та В лімфоцитах людини. Передається переважно через слину.

Патогенез: Інфекція починається в епітелії глотки, поширюється в шийні лімфатичні вузли, потім за допомогою крові потрапляє в печінку і селезінку.

Лабораторна діагностика: Вірус рідко виділяється. Виникає лімфоцитоз, включаючи атипові лімфоцити.

Серологічні методи базуються на виявленні антитіл до антигенів вірусу (EA, MA, VCA, NA), самих антигенів та гетерофільних антитіл.

Значне підвищення рівня специфічних антитіл до капсидного антигену ВЕБ (VCA) є діагностичним.

Моноспот-тест - швидкий тест, що базується на визначенні гетерофільних антитіл при інфекційному мононуклеозі в цільній крові, сироватці або плазмі крові.

Лікування: Ефективних ліків не існує.

Профілактика: Специфічна терапія та вакцини не розроблені.

Вірус герпесу людини 5-го типу (ВГЛ 5, цитомегаловірус)

Захворювання: Цитомегалічна хвороба у немовлят. Мононуклеоз у реципієнтів трансфузійних препаратів. Пневмонія та гепатит у пацієнтів з ослабленим імунітетом.

Характеристика: Оболонковий вірус з ікосаедричним нуклеокапсидом і лінійною дволанцюговою ДНК. Віріонна полімераза відсутня. Один серотип.

Передача: Вірус міститься в багатьох рідинах людського організму, включаючи кров, слину, сперму, цервікальний слиз, грудне молоко та сечу. Він передається через ці рідини, через плаценту або при трансплантації органів.

Патогенез: Первинна інфекція виникає зазвичай в ротоглотці. При внутрішньоутробному інфікуванні вірус поширюється у багато органів, наприклад, центральну нервову систему та нирки.

У дорослих часто в інфекційний процес залучені лімфоцити. Латентна інфекція встановлюється у лейкоцитах. Дисемінована інфекція у пацієнтів з ослабленим імунітетом може бути наслідком як первинної інфекції, так і реактивації латентної інфекції.

Лабораторна діагностика: Вірус викликає ЦПД в культурі клітин і може бути ідентифікований за допомогою методу флуоресціюючих антитіл.

В уражених клітинах присутні ядерні включення у вигляді "совиного ока".
Діагностичним є 4-кратне зростання титру антитіл у сироватці крові на стадії реконвалесценції.

Лікування: Ганцикловір є ефективним при лікуванні пневмонії та ретиніту. Ацикловір неефективний.

Профілактика: Вакцина не розроблена. Ганцикловір пригнічує ретиніт. Забороняється переливати кров, позитивну за наявністю антитіл до ЦМВ, негативним відносно антитіл до ЦМВ реципієнам - новонародженим або пацієнтам з ослабленим імунітетом.

Вірусологічна діагностика герпетичної інфекції

Рання діагностика: морфологічне дослідження пошкоджених тканин та виділення вірусу.

Матеріалом слугують зіскрібки та мазки з елементів висипу.

Мазки зазвичай фарбують за методом Гімза або гематоксилін-еозином. Для герпетичної інфекції характерне утворення гігантських клітин і розвиток ядерних включень.

Мазки можуть бути забарвлені флуоресціюючими антитілами (МФА). Антигени герпесу виявляють в багатоядерних, гігантських і незмінених клітинах. Метод дозволяє у летальних випадках встановити герпетичну інфекцію в головному, спинному мозку та інших тканинах (печінка).

Вірус можна виділити за допомогою інокуляції 12-денних курячих ембріонів. Матеріал наноситься на хоріоалантоїсну оболонку. Ембріон інкубують протягом 48 годин при 35°C. Спостерігаються пошкодження оболонки алантоїсу. При мікроскопії виявляють гігантські та багатоядерні клітини з ядерними включеннями.

Зараження клітинних культур. Типова ЦПД включає утворення багатоядерних клітин з ядерними включеннями та круглоклітинну дегенерацію клітин;

Щеплення мишенят-сисунців. Мишей заражають у головний мозок або в черевну порожнину. Хвороба проявляється через 3-4 дні й завершується загибеллю тварин;

Щеплення кролів. Кроликів заражають у скарифіковану рогівку або мозок: розвивається специфічний кератит або летальний енцефаліт, відповідно.

Ідентифікація виділених вірусів здійснюється за допомогою МФА або РН.

Вірусологічна діагностика вітряної віспи

Рання діагностика: мікроскопія матеріалу з осередків ураження, визначення вірусних антигенів, виявлення ДНК або виділення вірусу в культурі клітин.

Найкращі результати одержують при мікроскопії матеріалу зі свіжих везикул: характерні багатоядерні гігантські клітини з ядерними включеннями.

Для швидкої ідентифікації зазвичай використовують МФА. Специфічний антиген може виявлятися позаклітинно у вигляді яскравих зерен або внутрішньоклітинно.

Вірус можна **виділити** в культурі клітин. Характерна ЦПД - розвиток гігантських багатоядерних клітин або круглоклітинна дегенерація. Еозинофільні ядерні включення часто відсутні.

Ідентифікацію виділених вірусів проводять за допомогою МФА або РН.

Ретроспективна діагностика: специфічні антитіла виявляються в ІФА, реакції зв'язування комплементу (РЗК) або РН в парних сироватках.

Для серологічної діагностики використовують РЗК або ІФА в парних сироватках.

Вірусологічна діагностика ВЕБ-інфекції

Виявлення гетерофільних антитіл - природних антитіл (IgM), які аглютинують еритроцити неспоріднених видів (вівці, бика, коня тощо). Це явище спостерігається приблизно у 90% пацієнтів з ВЕБ. Гетерофільні антитіла іноді присутні в крові здорових людей у низькому титрі.

а. Реакція Пауля-Буннеля - стандартний метод діагностики інфекційного мононуклеозу. Заснований на аглютинації еритроцитів вівці

сироваткою крові пацієнта. Діагностичний титр становить 1:128-1:256. Гетерофільні антитіла виявляються на 3-4 тижні хвороби. Реакція Пауля-Буннеля позитивна при лейкозі, вірусному гепатиті, ЦМВ-інфекції, лімфомі Беркітта, ревматоїдному артриті, сироватковій хворобі. Титр антитіл не відображає тяжкості захворювання.

б. Моноспот-тест - це швидкий тест на інфекційний мононуклеоз, спричинений ВЕБ. Тест чутливий до гетерофільних антитіл, які аглютинують еритроцити коней. Комерційно доступні тест-набори мають 70-92% чутливість і 96-100% специфічність. Зазвичай тест не буде позитивним протягом 4-6 тижнів інкубаційного періоду до появи симптомів. Він також, як правило, не буде позитивним після припинення активної інфекції, навіть якщо вірус зберігається в одних і тих же клітинах організму до кінця життя носія.

Серологічна діагностика. Тести на гетерофільні антитіла відносно не чутливі і в разі негативного результату не можуть виключити ВЕБ-інфекцію. У цьому випадку корисними є інші серологічні тести (табл.8.2):

а) **ІФА на наявність IgM та IgG до капсидного антигену ВЕБ.** Його концентрація досягає максимуму через 2 тижні і знижується протягом 2-3 місяців. IgM до капсидного антигену ВЕБ свідчить про нещодавнє інфікування, IgG - про інфікування в минулому.

б) **ІФА на наявність антитіл до раних антигенів ВЕБ.** Їх концентрація досягає максимуму на 2 тижні хвороби.

в) **ІФА на наявність антитіл до ядерного антигену ВЕБ.** Вони з'являються приблизно через 4 і зберігаються впродовж усього життя.

Таблиця 8.2

Антитіла до антигенів ВЕБ

Антитіла		Період захворювання	Наполегливість	Специфіка, %
Капсидні антигени	IgM	Початок	4-8 тижнів	100
	IgG			

			на все життя	100
Ранні антигени	Anti-R	3-5 тижнів	3-6 місяців	70
	Анти-D	2 тижні – 4 місяці	2 місяці - роки	низький
Ядерний антиген		3-4 тижні	на все життя	100

Препарати для лікування та профілактики герпесу:

1. -модифіковані нуклеозиди, які пригнічують реплікацію вірусу (ацикловір);
2. - гамма-глобуліни проти вірусу вітряної віспи;
3. - індуктори інтерферону та імуномодулятори (Левамізол).
4. вакцини:
 - інактивована вакцина з штамів вірусу герпесу людини 1-го та 2-го типів;
 - жива атенуйована вакцина проти вірус герпесу людини. 3-го типу.

Аденовіруси

Вперше аденовіруси були виділені в 1953 році Уоллесом Роу з клітинних ліній, отриманих з мигдаликів і аденоїдів хворих дітей. Тому аденовіруси були названі у відповідності з місцем виділення - аденоїдами - залозоподібними скупченнями лімфоїдної тканини в носоглотці. Багато аденовірусів людини викликають персистентну інфекцію в цій тканині, саме тому і вдалося їх виділити з аденоїдів людини.

Аденовіруси - широко розповсюджені віруси ссавців і птахів, проте деякі з аденовірусів здатні інфікувати рептилій та жаб.

Віріон аденовірусів - ікосаедр з $T=25$, діаметром 70-90 нм. У віріоні виявлені фібри довжиною від 9 до 77 нм, що відходять від 12 п'ятикратних вершин ікосаедра (рис. 2.1 та 2.12).

До складу ікосаедричного віріону входить близько 10 білків, 4 з яких присутні в серцевині. Основними структурними білками є білок гексону II, три копії якого утворюють гексон, яких у віріоні 240, і білок пентону III,

п'ять копій якого утворюють основу пентону. У віріоні наявно 12 пентонів.

Геном аденовірусів є лінійною длДНК розміром від 26 до 45 тис. п.о. У геном закодвано близько 30 генів.

Термінальний білок, який слугує праймером під час реплікації ДНК, ковалентно приєднується до 5' - кінця обох ланцюгів ДНК.

Усі відомі натепер аденовіруси людини були виділені на основі серологічної реактивності - аденовірус вважається окремим видом, якщо він витримує нейтралізацію антисироваткою проти інших відомих аденовірусів. Усі аденовіруси людини належать до роду *Mastadenovirus* і мають розмір геному 30-36 тис.п.о. Людські аденовірус (57 типів) пронумеровані в порядку їх виділення і позначаються як Ad1, Ad2 і т.ін., або більш формально HAdV-1 і т.ін. (щоб відрізнити їх від аденовірусів, які інфікують інші види тварин). Спочатку віруси людини були розділені на шість підгруп на основі серологічних перехресних реакцій в аналізі гальмування гемаглютинації. Проте таке групування корелювало з низкою інших властивостей вірусів, наприклад, їхньою здатністю утворювати пухлини у гризунів. Зараз ці початкові підгрупи вважаються різними видами аденовірусів, аденовірусами людини від А до G, причому розподіл на групи ґрунтується на ідентичності послідовностей геному.

Оскільки аденовіруси добре культивуються до високих титрів у культурах клітин людини, кілька аденовірусів людини були детально вивчені, зокрема Ad2, Ad5 і Ad12.

Аденовіруси людини реплікуються переважно у верхніх дихальних шляхах або в шлунково-кишковому тракті. Деякі з них добре реплікуються в обох органах, тоді як інші виявляють тропність лише до одного з них. При ГРВІ, спричинених аденовірусами, також відмічають ураження очей та лімфоїдних тканин.

Віруси поширюються респіраторним або фекально-оральним шляхом.

Перебіг багатьох аденовірусних інфекцій безсимптомний або з мало вираженою симптоматикою. Проте у дітей віком до 5 років близько 5% гострих респіраторних захворювань, спричинені аденовірусною інфекцією, середньої тяжкості та тяжкі. Деякі серотипи (40, 41) також можуть

викликати гастроентерит.

Аденовіруси - найпоширеніші віруси, що зустрічаються в людській популяції, і антитіла до них присутні приблизно у 30-60% дітей раннього віку. Ad7, а також певною мірою Ad3 і Ad4 - це аденовіруси, які найчастіше асоціюються з важкими захворюваннями, і на Ad7 припадає близько 20% аденовірусних інфекцій, про які повідомляють у Всесвітню організацію охорони здоров'я.

Аденовіруси також викликають респіраторні захворювання у дорослих і, ймовірно, становлять причину близько 3% таких захворювань. Захворювання зазвичай протікають в легкій формі, але Ad4 і Ad7 можуть викликати епідемії більш серйозних респіраторних захворювань у військовослужбовців-новобранців.

На основі аденовірусів розробляються вектори для імунізації людей проти інших вірусів і для генної терапії.

Основні властивості аденовірусів.

1. Ікосаедричний капсид. Ліпідна оболонка відсутня. Діаметр 70-90 нм;
2. Капсид складається з 252 капсомерів: 240 гексомерів і 12 пентонів з фібрами, пов'язаними з кожним пентоном. Одинадцять білків входять до складу віріону;
3. Лінійна, дволанцюгова ДНК, 30-36 тис.п.о. кодує 30 генів.
4. П'ятдесят сім серотипів аденовірусів людини згруповано у сім підгруп (від А до G). Інші відомі аденовіруси – аденовіруси великої рогатої худоби, мишей, птахів тощо.
5. Захворювання: респіраторні синдроми, включаючи пневмонію. Очні та шлунково-кишкові інфекції.
6. Деякі аденовіруси можуть викликати появу злоякісних пухлин у піддослідних тварин, але не у людей.
7. Аденовіруси широко використовуються як вектори генної терапії та в терапії пацієнтів з онкологічними захворюваннями.

Вірусологічна діагностика аденовірусної інфекції

1. Матеріал для досліджень: змиви та зішкріб з носоглотки і

кон'юнктиви, кал, сеча, біопсія і аутопсія.

2. Швидкі методи включають виявлення вірусних антигенів і ДНК в матеріалі: зазвичай використовують МФА або ПЛР, відповідно.

3. Ізоляція вірусу: використовуються різні епітеліальні клітинні лінії (НЕК, HELA, A-549).

4. Характерна ЦПД: скупчення округлених клітин; цитоплазматичні та ядерні включення, загибель клітин;

5. Ідентифікація вірусів здійснюється за допомогою РН, МФА, РЗК, ПЛР, ЕМ та ІЕМ.

6. Ретроспективна діагностика (для епідеміологічних цілей) включає ІФА, РГГА, РЗК у парних сироватках.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА

Лабораторна діагностика герпесвірусної та аденовірусної інфекції.

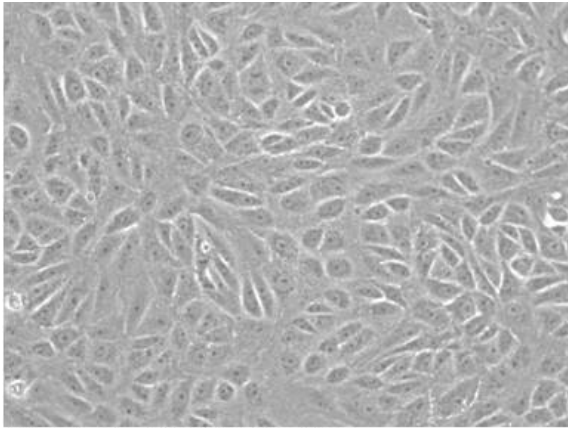
На практичних заняттях студенти вивчають класифікацію герпесвірусів та аденовірусів, їх морфологічну будову, культивування, особливості розмноження; роль аденовірусів та герпесвірусів в патології людини, патогенез та імуногенез захворювань; методи лабораторної діагностики аденовірусної та герпесвірусної інфекції; принципи лікування, профілактики аденовірусної та герпесвірусної інфекції; вивчають особливості ЦПД, викликані герпесвірусами (утворення симпластів); оцінюють реакцію непрямой гемаглютинації, що проводиться з метою серологічної діагностики аденовірусних інфекцій; знайомляться з лікарськими препаратами, що використовуються для діагностики та специфічної профілактики аденовірусних інфекцій та герпесвірусів. Виконані завдання студенти заносять до протоколу, а потім надають протокол викладачу для оцінювання.

Мета: Вивчити цитопатичну дію герпесвірусів та аденовірусів. Оцінити реакцію непрямой гемаглютинації, що проводиться з метою серологічної діагностики аденовірусних інфекцій (визначення титру вірусу).

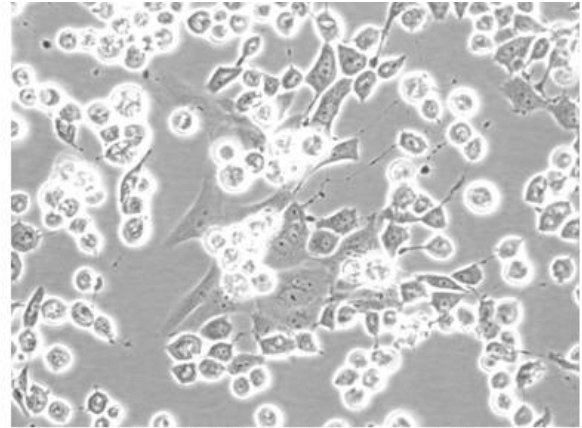
Протокол 1.

Опишіть морфологію неінфікованих клітин (контроль) та

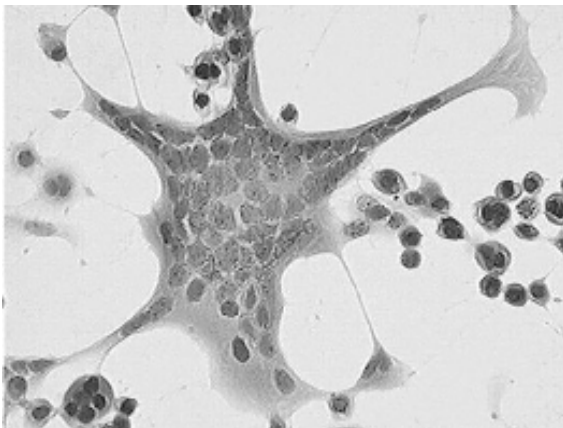
цитопатичну дію герпесвірусу людини 1-го типу на демонстраційних мікроскопічних препаратах.



Інтактна культура клітин

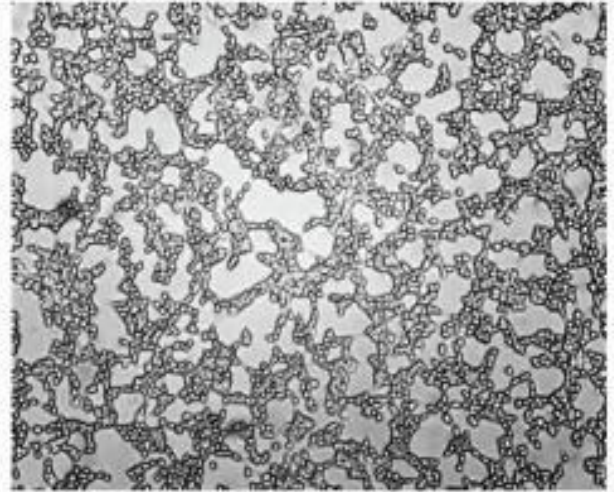
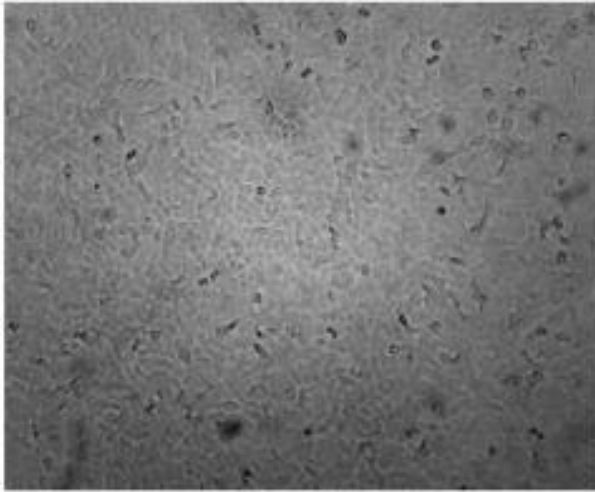


Інфікована культура клітин, що демонструє ЦПД



Інфікована культура клітин, що демонструє ЦПД

Опишіть морфологію неінфікованих клітин (контроль) та цитопатичну дію аденовірусу людини 1-го типу на демонстраційних мікроскопічних препаратах.



Культура неінфікованих клітин

Культура клітин, уражена аденовірусом, що демонструє ЦПД

Протокол 2. Оцінка результатів реакції непрямой (пасивної) гемаглютинації, проведеної з метою серологічної діагностики аденовірусних інфекцій.

	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	C (ED)
First serum (w/d 1:10)						
Second serum (w/d 1:10)						

Примітки: w/d - робоче розведення, C (ED) - контроль еритроцитарного діагностикуму.

Зробіть висновок. **T=** _____

САМОСТІЙНА РОБОТА

1. Заповніть таблицю.

Вкажіть таксономічне положення зазначених вірусів

Таксономічне положення	Вірус простого герпесу 1-го типу	Вірус вітряної віспи / оперізуючого лишая	Вірус Епштейна-Барр	Цитомегаловірус
Родина				
Підродина				
Рід				

2. Заповніть таблиці.

Класифікація герпесвірусів людини

Види		Підродина	Цитопатологія	Місце встановлення латентної інфекції
Офіційна назва	Загальна назва			
ВГЛ 1				
ВГЛ 2				
ВГЛ 3				
ВГЛ 4				
ВГЛ 5				
ВГЛ 6				
ВГЛ 7				
ВГЛ 8				

Назвіть морфологічні властивості вірусів.

Характеристики	Вірус простого герпесу	Вітряна віспа	Вірус Епштейна-Барр
Геном			
Морфологія			
Розмір віріону			
Компартменти клітини, де відбувається реплікація			
Антигенна стабільність			

3. Заповніть таблицю

Лабораторна діагностика вітряної віспи, оперізуючого лишая, простого герпесу, інфекційного моновірусозу

Вірус	Матеріал	Модельний об'єкт для культивування вірусу	Індикація вірусу	Ідентифікація вірусу
Простий герпес				
Вітряна віспа				
Оперізуючий лишай (зостер)				
Інфекційний моновірусоз				

4. Заповніть таблиці.

Зазначте таксономію аденовірусів.

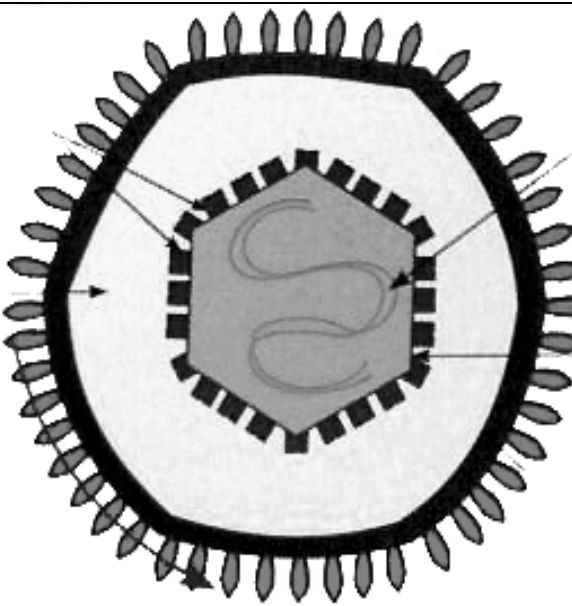
Таксономічне положення	Види аденовірусів	Види тварин, що уражуються
Родина		

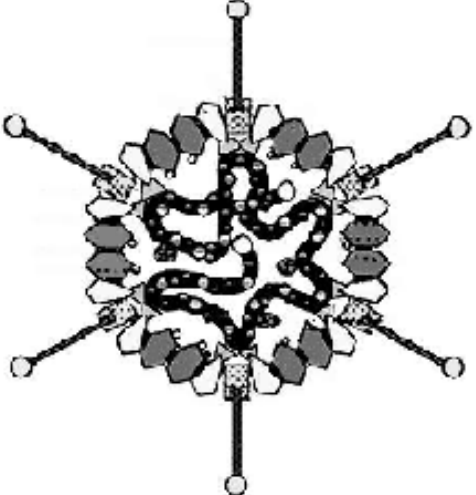
Рід		
Рід		
Рід		
Рід		
Рід		

Вірусологічні дослідження аденовірусних інфекцій.

	Зразки, що досліджуються	Модельний об'єкт для культивування вірусу	Індикація вірусу	Ідентифікація вірусу
Аденовірусна інфекція				

5. Впишіть назву родини вірусів, вкажіть відповідні структурні елементи віріону

Структура віріону _____ вірусу.	
	<ol style="list-style-type: none"> 1. Суперкапсид 2. Глікопротеїни 3. Ікосаедричний капсид 4. Капсомери 5. Тегумент 6. ДНК

Структура віріону _____ вірусу.	
	<ol style="list-style-type: none"> 1. Гексон. 2. Пентон. 3. Фібри 4. Булавоподібне потовщення. 5. Білок рVI 6. ДНК 7. Грунтовка рTr 8. Протеаза р23

ПИТАННЯ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЮ

1. Морфологія та особливості розмноження герпесвірусів та аденовірусів.
2. Культивування герпесвірусів та аденовірусів.
3. Патогенез, клінічні симптоми та імуногенез герпесвірусної та аденовірусної інфекції.
4. Принципи та методи роботи лабораторної діагностики герпесвірусної та аденовірусної інфекції.
5. Принципи лікування та профілактики аденовірусних та герпесвірусних інфекцій.
6. Родина *Herpesviridae*. Біологічні властивості, значення в розвитку патології людини. Лабораторна діагностика захворювань. Генетичні методи діагностики.
7. Родина *Adenoviridae*. Біологічні властивості. Антигенна структура. Культивування. Патогенез і лабораторна діагностика інфекцій, викликаних аденовірусами. Імунітет. Специфічна профілактика.

Оцінка _____ Підпис викладача _____

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА 7

Ретровіруси. Віл. Лабораторна діагностика віл-інфекції

ПЕРЕЛІК ПИТАНЬ ДЛЯ ВИВЧЕННЯ

1. Морфологія та хімічний склад вірусу імунодефіциту людини. Типи ВІЛ-інфекції.
2. Походження та еволюція ВІЛ. Особливості геному.
3. Культивування ВІЛ, етапи взаємодії вірусу з сприйнятливими клітинами.
4. Клітини-мішені для ВІЛ у людини, характеристика поверхневих рецепторів вірусу.
5. Механізм розвитку імунодефіциту. СНІД-асоційовані патології (опортуністичні інфекції та пухлини).
6. Методи лабораторної діагностики ВІЛ інфекції.
7. Перспективи специфічної профілактики та терапії ВІЛ-інфекції.

ТЕОРІЯ

Характеристика ВІЛ: Складний вірус містить дві копії одноланцюгової РНК позитивної полярності.

РНК-залежна ДНК-полімераза (зворотна транскриптаза) створює ДНК-копію геному, яка інтегрується в ДНК клітини-хазяїна.

Віріони мають діаметр приблизно 120 нм. РНК ВІЛ-1 міцно зв'язана з нуклеокапсидними білками р6 і р7, які захищають її від руйнування нуклеазами. Вірусне ядро також містить зворотну транскриптазу, інтегразу та протеазу. Весь комплекс оточений капсидом (р24). Капсид оточений матричним білком (р17). Також всередині віріона знаходяться білки Vif, Vpr і Nef. Оболонка формується, коли капсид брунькується з клітини-хазяїна, забираючи з собою частину мембрани клітини-хазяїна. У ліпідний бішар вбудовуються глікопротеїни вірусної оболонки, які формують шипи ВІЛ-1: зовнішній поверхневий глікопротеїн (gp120) і трансмембранний глікопротеїн (gp41).

Хвороба: Синдром набутого імунodefіциту (СНІД).

Передача ВІЛ: Рідинами організму, наприклад, через кров та сперму. Також можлива трансплацентарна та перинатальна передача.

Зараження ВІЛ відбувається тільки від інфікованої людини. Існують три основні шляхи передачі ВІЛ: статевий, гемоконтактний (через кров та інші біологічні рідини, забруднені ними голки й інструменти, при трансплантації органів) та перинатальний (від матері дитині під час вагітності і пологів (вертикальний) і при грудному вигодовуванні (горизонтальний)).

Патогенез ВІЛ: Для проникнення ВІЛ у клітини необхідні як рецептори так і корецептори. Один рецептор - це білок CD4, який міститься переважно на Т-лімфоцитах-хелперах. ВІЛ інфікує і вбиває Т-лімфоцити-хелпери, що призводить до розвитку опортуністичних інфекцій. Інші клітини, що мають на поверхні білки CD4, наприклад, астроцити, також інфікуються. Для ВІЛ корецепторами є хемокінові рецептори клітини (CCR5 (макрофаги) та CXCR4 (Т-х)).

Білок Nef є важливим фактором вірулентності. Він знижує синтез білка МНС класу I, тим самим зменшуючи здатність цитотоксичних Т-лімфоцитів вбивати ВІЛ-інфіковані клітини. Цитотоксичні Т-лімфоцити є основним захистом організму від ВІЛ.

Клінічні стадії ВІЛ-інфекції за класифікацією ВООЗ:

Перша клінічна стадія характеризується відсутністю клінічних проявів хвороби та вимагає спостереження. Наявність у хворого персистуючої генералізованої лімфаденопатії є приводом до поглибленого обстеження та своєчасного встановлення інших можливих проявів ВІЛ-інфекції. Кількість клітин $CD4 \geq 500$ клітин/мм³

Другій клінічній стадії притаманні легкі клінічні прояви. Зазвичай такі хворі потребують амбулаторного супроводу. Серед спеціалістів існує думка про можливість об'єднання хворих з першою та другою клінічною стадією в одну групу. Кількість клітин $350 \text{ клітин/мм}^3 \leq CD4 \leq 500$ клітин/мм³

Третя клінічна стадія відповідає середньо важким і важким

клінічним проявам, які вимагають спеціалізованих досліджень. Обстеження та лікування таких хворих потребує госпіталізації. Кількість клітин $200 \text{ клітин/мм}^3 \text{ CD4} \leq 350 \text{ клітин/мм}^3$

Четверта клінічна стадія хвороби (СНІД) супроводжується важкими ураженнями внутрішніх органів та потребує термінового інтенсивного лікування. Наявність у будь-яких хворих патологічних станів, що входять до переліку, зазначеному в класифікації, є показом для обстеження на ВІЛ. Кількість клітин $\text{CD4} \leq 200 \text{ клітин/мм}^3$

Лабораторна діагностика: Вірус можна виділити з крові або сперми, але ця процедура не є рутинною. Діагноз зазвичай ставиться

"Вірусне навантаження", тобто кількість ВІЛ у плазмі крові, визначається за допомогою ПЛР-тестів. Аналізи на основі ПЛР також можуть виявляти вірусну РНК в інфікованих клітинах, що корисно для виявлення ранніх стадій інфекції.

Методи лабораторної діагностики ВІЛ-інфекції поділяють на:

1. Методи діагностики інфекції шляхом виявлення антитіл за допомогою ІФА в т.ч. швидкі тести як скринінгового тесту і Вестерн-блотингу як підтверджуючого тесту.

2. Методи контролю перебігу інфекції: кількісна ПЛР (ЗТ-ПЛР для визначення вірусного навантаження) в плазмі. Тестування з визначення резистентності ВІЛ до антиретровірусних препаратів системою генотипування ВІЛ-1 ViroSeq™ HIV-1. Визначення імунного статусу за кількістю CD4 клітин.

Лікування: Показанням до високоактивної антиретровірусної терапії є:

- Кількістю клітин $\text{CD4} \leq 500 \text{ клітин/мм}^3$, незалежно від симптомів захворювання
- Кількість CD4 -лімфоцитів $\text{CD4} \leq 350 \text{ клітин/мм}^3$
- Будь-яке ВІЛ-індикаторне захворювання
- Вагітність, незалежно від вірусологічних чи імунологічних показників
- Ко-інфекція ВІЛ/ВГВ при наявності показань до лікування ВГВ

Антиретровірусна терапія (АРТ) складається з двох нуклеозидних інгібіторів та одного інгібітора протеази. Ненуклеозидні інгібітори, такі як невірапін, також корисні.

АРТ регламентує одночасне введення 2 нуклеозидних інгібіторів та інгібітора протеази наприклад - AZT, lamivudine та indinavir.

Азидотимідин (AZT), ЗТС, d4T, ddl та ddC пригнічують реплікацію ВІЛ шляхом інгібування зворотної транскриптази. Інгібітори протеази, наприклад, індинавір, запобігають розщепленню поліпептидів-попередників.

Клінічне покращення настає, але вірус персистує в організмі. Лікування опортуністичних інфекцій залежить від особливостей організму пацієнта.

Контроль розвитку та лікування ВІЛ-інфекції включає:

- Моніторинг вірусного навантаження проводять через 6 місяців та 12 місяців після початку АРТ, а потім кожні 12 місяців, якщо у особи спостерігаються стабільні показники під час АРТ.
- Якщо вірусне навантаження не завжди доступне, для оцінки неефективності лікування слід використовувати CD4-клітини та клінічний моніторинг.
- Крім того, для визначення вірусного навантаження можна використовувати зразки сухої краплі венозної або капілярної цільної крові.
- Поріг в 1000 копій/мл має використовуватись для визначення неефективності лікування при використанні зразків сухої краплі крові, як аналогічно визначено для тестування з використанням плазми.
-

Принципи профілактики ВІЛ-інфекції:

Доконтактна профілактика ВІЛ (ДКП) — прийом антиретровірусних препаратів для зниження ризику інфікування ВІЛ. ДКП є додатковим до бар'єрної контрацепції методом профілактики для людей, які мають високий ризик інфікування ВІЛ. ДКП приймають перорально щодня по одній таблетці.

Постконтактна профілактика ВІЛ— націлена на попередження розвитку ВІЛ-інфекції після імовірного контакту.

Постконтактну профілактику ВІЛ необхідно розпочати якомога швидше протягом перших годин та не пізніше 72 годин після контакту. Зазвичай курс постконтактної профілактики ВІЛ триває 28 днів.

Лікування ВІЛ як профілактика – людина, яка має вірусне навантаження менше 40 копій РНК/мл, не може інфікувати іншу людину принцип Н=Н: «не визначається, значить не передається»

Профілактика у немовлят- профілактика передачі ВІЛ-інфекції від матері до дитини

АЗТ з інгібітором протеази або без нього слід призначати ВІЛ-інфікованим матерям та їхнім новонародженим. АЗТ, ЗТК та інгібітор протеази слід призначати після уколу голкою. Існує нова вакцина.

Таблиця 7.1.

Класифікація ретровірусів (родина *Retroviridae*)

Рід	Представники
Альфаретровірус	Вірус саркоми Руссу, вірус лейкозу птиці та вірус мієлобластозу птиці.
Бета-віруси	Вірус пухлин молочної залози мишей, вірус мавп Мейсона-Пфайзера
Гамма-віруси	Вірус котячої лейкемії, вірус мишачої лейкемії
Дельта-вірус	Вірус лейкозу великої рогатої худоби, Т-лімфотропний вірус людини (HTLV-1, HTLV-2)
Епсилонретровірус	Вірус епідермальної гіперплазії морської миші
Лентівірус	ВІЛ, вірус імунодефіциту симу, вірус імунодефіциту котів, лентівірус пум, інфекційна анемія коней, вірус імунодефіциту великої рогатої худоби, вірус Меді-Вісна
Спумавірус	Пінний вірус людини

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА

Мета роботи: На практиці студенти знайомляться з основами класифікації та біологічними властивостями ретровірусів, морфологічними, фізико-хімічними властивостями, ультраструктурою та антигенною структурою ВІЛ, лабораторною діагностикою та перспективами специфічної профілактики і лікування ВІЛ-інфекції. Студенти розглядають та аналізують схему полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з метою лабораторної діагностики ВІЛ/СНІДу, а також її модифікацію, яка забезпечує кількісне визначення РНК ВІЛ у крові пацієнтів. Ознайомитися з принципами вестерн-блоту. Оцінювати результати лабораторної діагностики ВІЛ-інфекції методом ІФА.

Під час складання схеми лабораторної діагностики ВІЛ-інфекції та СНІДу студенти використовують знання, набуті під час самопідготовки та в процесі розгляду теми на занятті. Крім того, студенти знайомляться з препаратами, що використовуються для лабораторної діагностики ВІЛ-інфекції. Заповнені протоколи підписуються викладачем.

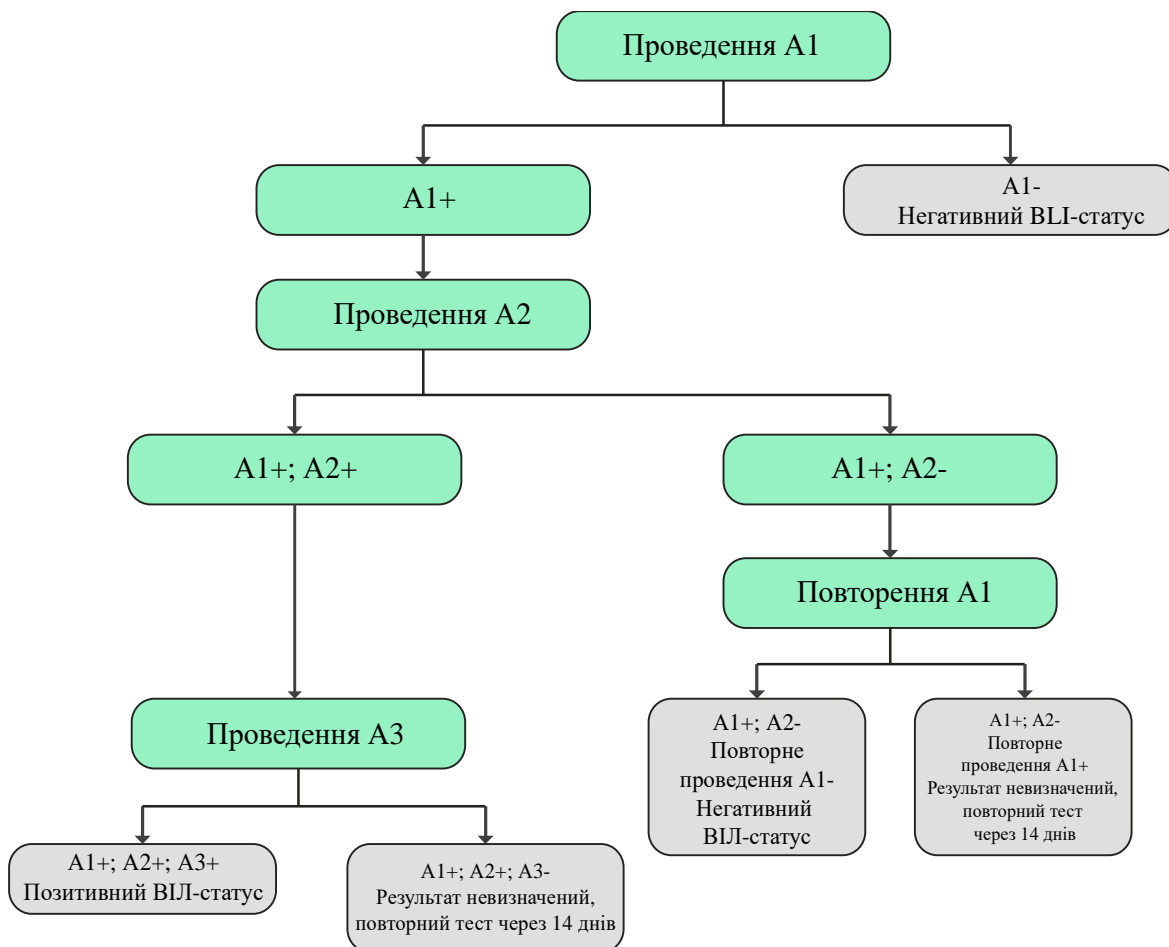
Рекомендації щодо оформлення протоколу:

- Студенти вивчають та вносять до протоколу класифікацію ретровірусів;
- Студенти вивчають та заносять до протоколу схему лабораторної діагностики ВІЛ/СНІДу;
- Студенти оцінюють результати лабораторної діагностики ВІЛ-інфекції методом ІФА;
- Студенти характеризують та додають до протоколу основні препарати, що використовуються для лікування ВІЛ/СНІДу.

Протокол 1.

1. Записати в протокол схему лабораторної діагностики ВІЛ для пацієнта, який отримав позитивний результат при проведенні першого аналізу на ВІЛ (А+) та негативний результат при проведенні другого аналізу на ВІЛ (А2-) та зазначити можливі варіанти діагнозу.

Схема лабораторної діагностики ВІЛ



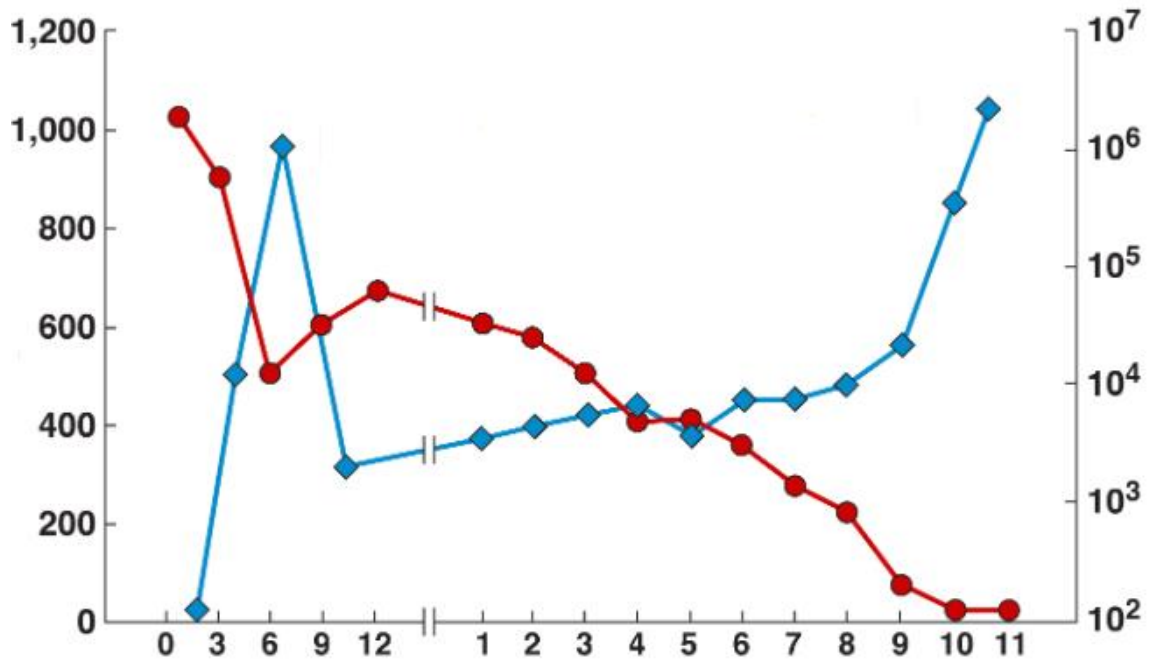
Примітка. А1: Аналіз 1 (перший тест); А2: Аналіз 2 (другий тест); А3: Аналіз 3 (третій тест). Аналіз: швидкий діагностичний тест на ВІЛ або ІФА.

2. Оцінити результати лабораторної діагностики ВІЛ - інфекції методом ІФА. Які зразки є серопозитивними? Висновок запишіть

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
B	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
C	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
D	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
E	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
F	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
G	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
H	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

Протокол 2.

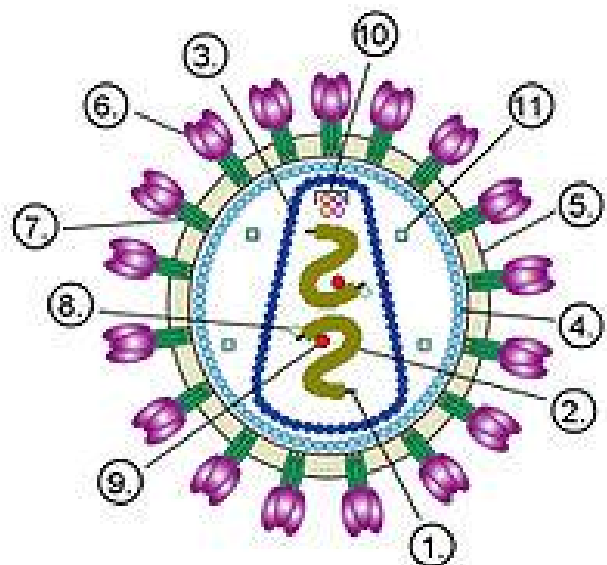
1. На графіку підписати вісі та за результатами вірусного навантаження та к-стю CD4 клітин підписати клінічні стадії ВІЛ інфекції.



САМОСТІЙНА РОБОТА

Підпишіть компоненти структури ВІЛ.

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



8-

9-

10-

11-

2. Назвіть морфологічні особливості ВІЛ

	Вірус імунодефіциту людини
Геном	
Морфологія	
Розмір віріона	
Місце синтезу рибонуклеопротейну	
Тип симетрії віріону	

3. Заповніть таблицю

Медицина	Механізм дії
Абакавір (ABC)	
Диданозин (ddI)	
Ламівудин (ЗТС)	
Ставудин (d4T)	
Зидовудин (ZDV або AZT)	
Абакавір (ABC)	
Ефавіренц (EFV або EFZ)	
Невірапін (NVP)	
Індінавір (IDV)	
Лопінавір+ритонавір (LPV/r)	
Нелфінавір (NFV)	

Enfuvirtide	
Зидовудин/ламівудин	
Долутегравір	

ПИТАННЯ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЮ

1. Яка структура вірусу імунодефіциту людини?
2. Які ферменти має ВІЛ?
3. Який клітинний рецептор взаємодіє з ВІЛ?
4. Які фізичні фактори є шкідливими для ВІЛ?
5. Які порушення клітинного імунітету спостерігаються у хворих на СНІД?
6. Які механізми передачі ВІЛ?
7. В яких біологічних рідинах можуть бути антитіла до ВІЛ?

Оцінка _____ Підпис викладача _____

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА 8

БАКТЕРІОФАГИ

ПЕРЕЛІК ПИТАНЬ ДЛЯ ВИВЧЕННЯ

1. Загальна характеристика бактеріофагів.
2. Типи життєвих циклів фагів
3. Методи титрування бактеріофагів.
4. Застосування бактеріофагів у медичній практиці.

ТЕОРІЯ

Бактеріофаги - це віруси, які інфікують бактерії. Бактеріофаги є одними з найпоширеніших і найрізноманітніших істот у біосфері. Бактеріофаги - це усюдисущі віруси, які зустрічаються скрізь, де є бактерії. За оцінками, на планеті існує понад 10^{31} бактеріофагів - більше, ніж будь-яких інших організмів на Землі, включаючи бактерії. Як і інші типи вірусів, бактеріофаги дуже різняться за своєю формою та генетичним матеріалом. Геноми фагів можуть складатися як з ДНК, так і з РНК. Капсид бактеріофага може бути ікосаедричним, ниткоподібним або мати форму "голова-хвіст". Структура "голова-хвіст" є унікальною для фагів і не зустрічається у еукаріотичних вірусів. Фаги реплікуються всередині бактерії після введення свого геному в її цитоплазму. Етапи, з яких складається процес інфікування, називаються **життєвим циклом фага**.

Деякі фаги (**літичні фаги**) можуть розмножуватися лише за допомогою **літичного життєвого циклу**, під час якого вони лізуть бактеріальні клітини хазяїв. Інші фаги (**помірні фаги**) можуть чергувати літичний життєвий цикл з **лізогенним**, в якому вони не вбивають клітину-хазяїна (а натомість вбудовуються в ДНК хазяїна та копіюються разом з ним при кожному поділі клітини). Багато (але не всі) помірних фагів можуть інтегрувати свої геноми в хромосому бактерії-хазяїна, разом стаючи **лізогеном**, коли геном фага стає **профагом**. Деякі патогени людини, такі як дифтерійна паличка, лізогенізуються вірусами, ДНК яких спрямовує синтез токсинів, які є шкідливими для людини.

Бактеріофаги можна ефективно використовувати для лікування

бактеріальних інфекцій. Нещодавнє відновлення інтересу до **фаготерапії** продиктоване її перевагами, головною з яких є специфічність бактеріофагів щодо бактеріальних мішеней. Це запобігає таким ускладненням як дисбактеріоз, спричинений антибіотиками, та вторинні інфекції.

Обмежений спектр хазяїв для багатьох фагів робить їх корисними для розрізнення різних штамів в межах одного виду бактерій. Великою перевагою фагового типування бактерій є те, що воно дозволяє виявити відмінності між штамми, які ідентичні за результатами серологічних та інших тестів, що дає змогу проводити точні дослідження розподілу і поширення певного фагового типу збудника в межах певної спільноти. **Типування фагів** в епідеміологічних цілях було особливо успішним при кишкових інфекціях, зокрема черевному тифі, а також при стафілококових інфекціях у лікарнях.

Бактеріофаги специфічні у своїй дії. Окремий фаг може бути дуже специфічним, тобто інфікувати лише кілька штамів певного виду бактерій. З іншого боку, інший фаг може інфікувати штами двох або більше видів певного роду. Здатність до лізису певним фагом може бути єдиною очевидною фенотипічною відмінністю між двома бактеріальними штамми і може бути єдиним засобом, за допомогою якого можна розпізнати штам, що викликає спалах захворювання. Це спостереження лежить в основі фагового типування - процедури виявлення та ідентифікації штамів бактерій за їхньою реакцією (чутливістю або резистентністю) до різних відомих штамів фагів (**рис. 8. 1**).

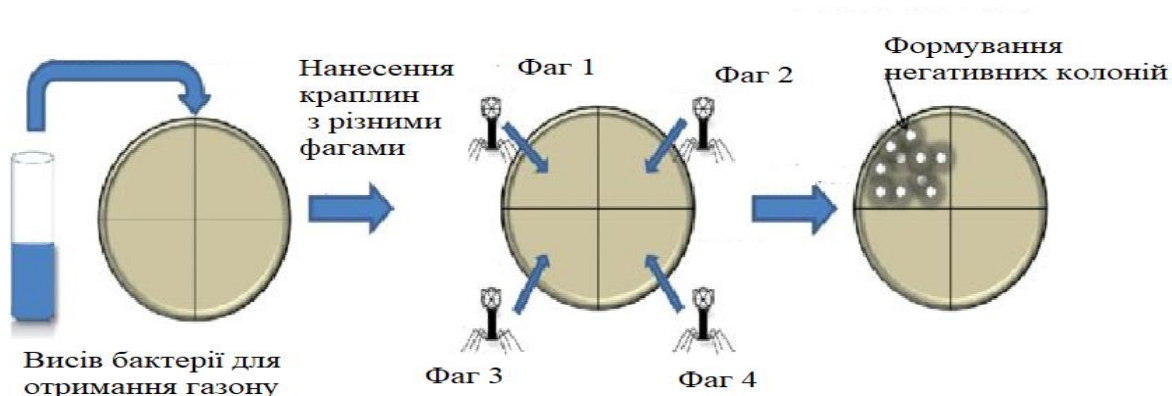


Рис. 8.1. – Процедура фаготипування.

Зразок бактерій, що досліджується на предмет чутливості до бактеріофагів, висівають у чашки Петрі суцільним газоном разом із серією бактеріофагів. Формування прозорих зон лізису на фоні газону свідчить про реплікацію бактеріофага, та сприйнятливість хазяїна до конкретного бактеріофага.

Процедура фаготипування іноді застосовується в епідеміології для ідентифікації та відстеження походження інфекційного агента. Це стандартна процедура для штамів золотистого стафілокока, причетних до спалахів харчових отруень або інших інфекцій. Видоспецифічний фаг регулярно використовується для ідентифікації *Bacillus anthracis*, збудника сибірської виразки.

Для кількісного визначення бактеріофагів у зразку застосовують **метод подвійних агарових шарів за Грація**. Постановка експерименту здійснюється за описаною нижче схемою. До бактеріальної культури у “м’якому” (0.7%) агарі при 46°C додають відповідне розведення бактеріофагу. Далі суміш нашаровують на поверхню заохололого 1.4% поживного агару, дають заохолонути верхньому шару агару і ставлять на інкубацію у термостат. Впродовж 6-12 годин бактерії розмножуються всередині верхнього шару агару. Низька концентрація верхнього шару сприяє дифузії фагових частинок. У результаті фагові частинки заражають бактеріальні клітини, які є по сусідству з ними, розмножуються та лізують їх. Фагове потомство інфікує надалі сусідні бактерії, які, в свою чергу, піддаються лізису в результаті появи другого покоління фага, і так далі. В результаті на бактеріальному газоні утворюються прозорі зони відсутності росту бактерій – негативні колонії або пляшки. Утворення кожної пляшки викликається однією пляшкоутворюючою одиницею (БУО). Титр вірусу в даному випадку – це кількість БУО в 1 мл досліджуваного зразку.

Протокол 1. Метод подвійних агарових шарів за Грація

Мета: Продемонструвати здатність бактеріофага реплікуватися всередині чутливої клітини-хазяїна та визначити титр фага методом

подвійних агарових шарів.

Матеріали:

Нічна культура *Escherichia coli* штаму В, бактеріофаг Т4, агаризовані середовища LB (0,7% та 1,4%), фіз. розчин, стерильні піпетки на 1,0 та 5,0 мл (або кінцівки для автоматичного дозатора), піпетки або інший пристрій для дозування, стерильні чашки Петрі, стерильні пробірки, водяна баня.

Хід роботи:

1. 1,4% агар залити в чашки Петрі по 2,5–3,0 мл, підсушити.
2. Приготувати серійні розведення фагового препарату як показано на рисунку 8. 2.

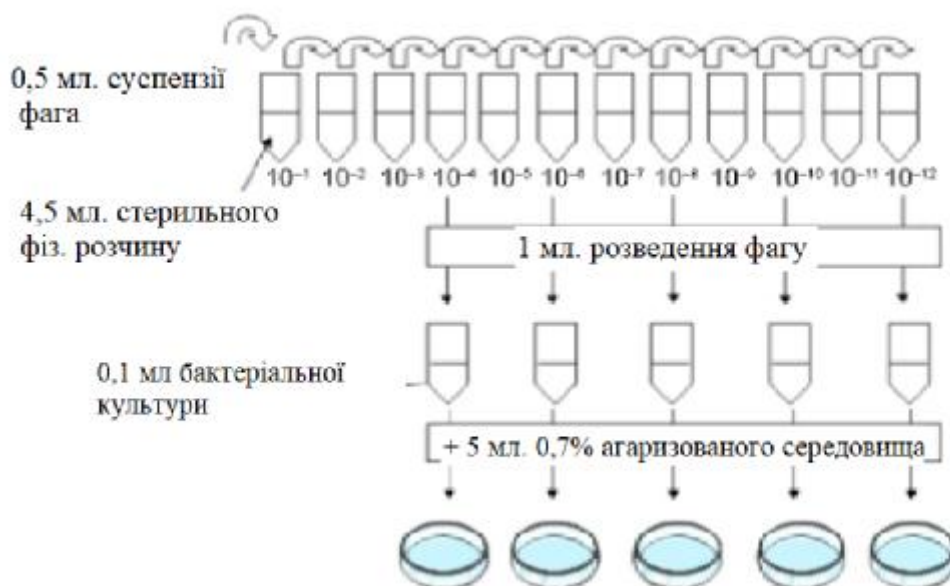


Рис. 8.2. – Схема виконання дослідження за методом агарових шарів

3. В пробірку додати 2,5 мл. розплавленого 0,7% агару та охолодити до 46°C.
4. До 0,7% агару додати 1мл бактеріофагу (попередньо розведеного у фіз. розчині) і 0,2 мл бактеріальної культури. Вміст пробірки ретельно перемішати і вилити в чашки Петрі на нижній агар, дати застигнути верхньому шару

5. Чашки Петрі інкубувати протяго 12 годин за температури 37°C.
6. Провести облік результатів шляхом підрахунку негативних колоній на газоні цільового мікроорганізму. Для статистичної достовірності кожен дослід проводити в трьох повторностях. Результати титрування занести до таблиці.

№	Розведення зразку	Кількість негативних колоній

Протокол 2. Фаготипування

Мета: Визначити чутливість досліджуваної культури бактерій до набору бактеріофагів методом спот-тесту.

Матеріали:

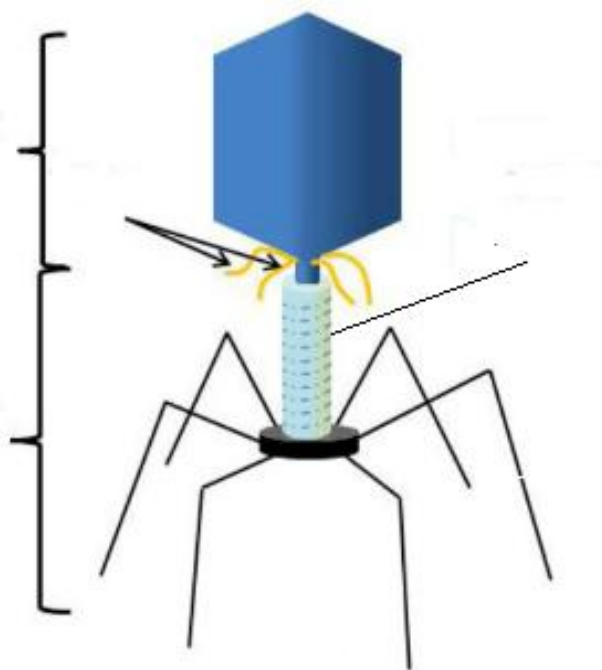
Нічна культура досліджуваних ізолятів бактерій, штами фагів (кожен з яких відповідно розведений), агаризовані середовища LB (0,7% та 1,4%), стерильні піпетки на 1,0 та 5,0 мл (або кінцівки для автоматичного дозатора), піпетки або інший пристрій для дозування, стерильні чашки Петрі, стерильні пробірки, водяна баня.

Хід роботи:

1. Нижній (1,4%) агар залити в чашки Петрі по 2,5–3,0 мл, підсушити.
2. В пробірку внести 2,5 мл верхнього (0,7%) агару та 0,2 мл відповідної бактеріальної культури і нашарувати на поверхню агару в чашці Петрі, підсушити.
3. Розмежувати чашки Петрі на сектори і в кожний сектор внести по 0,005мл фаговмісного матеріалу. Залишити чашки на 30 хвилин.
4. Чашки Петрі перевернути та інкубувати в термостаті протягом 12 годин за температури 37 °C.

САМОСТІЙНА РОБОТА

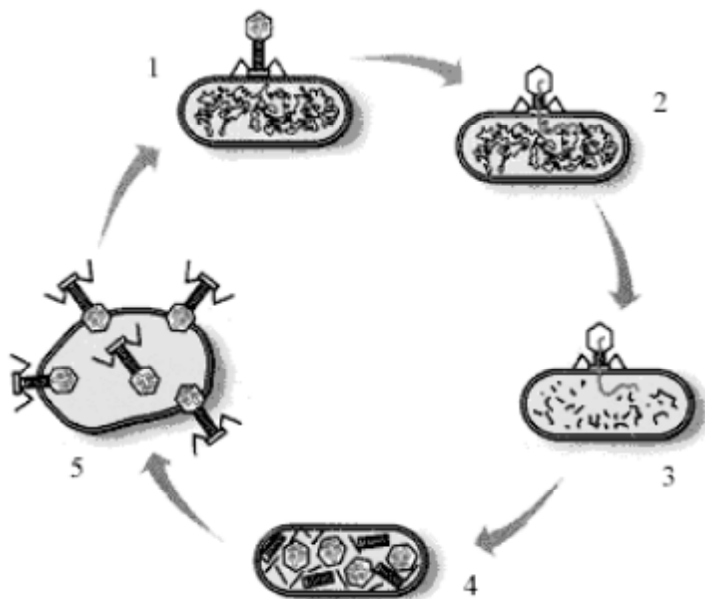
1. Визначте структурні компоненти бактеріофага Т4



2. Опишіть основні етапи реплікативного циклу вірулентних бактеріофагів

- 1.
- 2.
- 3.
- 4.
- 5.

2. Заповніть схему життєвого циклу фага λ



ПИТАННЯ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЮ

1. Що таке бактеріофаг?
2. Що таке вірулентний бактеріофаг?
3. Що таке лізогенний бактеріофаг?
4. Чому лізогенні бактеріофаги важливі при деяких захворюваннях?
5. Як можна виявити бактеріофаги у зразку?
6. Що таке бляшка і яким чином вона утворюється?
7. Яка функція капсиду бактеріофага?
8. Що таке специфічність хазяїна для бактеріофага?
9. Як бактеріофаги можуть застосовуватися в медицині?
10. З метою профілактики післяопераційних ускладнень в черевну порожнину пацієнтки введено 50 мл полівалентного стафілококового бактеріофагу. Який механізм дії цього препарату?

Оцінка _____ Підпис викладача _____