

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
«ДНІПРОВСЬКА ПОЛІТЕХНІКА»



НАВЧАЛЬНО-НАУКОВИЙ ІНСТИТУТ ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ
Кафедра екології та технологій захисту навколишнього середовища

О.І. Сідашенко

**МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ ДО ВИКОНАННЯ
ЛАБОРАТОРНИХ РОБІТ
з дисципліни «Мікробіологія та вірусологія»
Частина II «Вірусологія»**

для студентів освітньо-професійної програми «Біологія»
спеціальності 091 Біологія та біохімія
першого (бакалаврського) рівня вищої освіти

Дніпро
НТУ «ДП»
2023

Сідашенко О.І.

Методичні рекомендації до виконання лабораторних робіт з дисципліни «Мікробіологія та вірусологія». Частина II «Вірусологія» для студентів освітньо-професійної програми «Біологія» спеціальності 091 «Біологія та біохімія» / О.І. Сідашенко ; М-во освіти і науки України, НТУ «Дніпровська політехніка». – Дніпро : НТУ «ДП», 2023. – 31 с.

Автор:

О.І. Сідашенко, канд.біол. наук, доц.

Затверджено науково-методичною комісією зі спеціальності 091 Біологія та біохімія (протокол № 7 від 17.11.2023 р.) за поданням кафедри екології та технологій захисту навколишнього середовища (протокол № 4 від 17.11.2023 р.).

Методичні рекомендації призначені для виконання лабораторних робіт з дисципліни «Мікробіологія та вірусологія». Частина II «Вірусологія» студентами освітньо-професійної програми «Біологія» спеціальності 091 Біологія та біохімія першого (бакалаврського) рівня вищої освіти.

Відповідальна за випуск завідувачка кафедри екології та технологій захисту навколишнього середовища Борисовська О.О., канд. техн. наук, доц.

ЗАГАЛЬНІ ПОЛОЖЕННЯ

Лабораторні заняття з курсу «Мікробіологія та вірусологія». Частина II «Вірусологія» є одним із найважливіших видів підготовки біологів. Вони сприяють закріпленню теоретичних знань та набуттю навичок лабораторної роботи з вірусами, вірусологічним матеріалом і культурами клітин тканин; сприяють засвоєнню специфічних вірусологічних прийомів і методів, пов'язаних з особливостями будови вірусів, розвивають навички самостійної практичної роботи, а також формують вміння грамотно аналізувати отримані результати.

Лабораторні заняття описані за єдиною схемою: назва теми лабораторної роботи, мета, матеріали та обладнання, коротка теоретична частина, завдання та методика їх виконання, контрольні запитання.

Керуючись методичними вказівками, кожний студент зобов'язаний завчасно до лабораторних занять вивчити принцип проведення роботи і переписати тему, мету та порядок виконання роботи у свій робочий зошит. Після виконання роботи студенти повинні скласти протокол роботи, зробити необхідні записи, рисунки, розрахунки, вміти відповісти на теоретичні питання стосовно даної роботи та підписати її у викладача.

На першому занятті, перед виконанням лабораторних робіт студенти мають повторити правила техніки безпеки у мікробіологічній та вірусологічній лабораторіях та згадати першу медичну допомогу при нещасних випадках.

Виконання лабораторних робіт спрямовано на досягнення таких дисциплінарних результатів навчання.

❖ Знати методи виявлення, культивування та ідентифікації вірусів у культурах клітин тканин і курячих ембріонах;

❖ Знати та розуміти взаємодію між вірусами як неклітинною формою життя та клітинами рослин, тварин, людини та бактерій;

❖ Знати та розуміти особливості вірусів як неклітинної форми життя, їх властивості й застосування.

ЗАГАЛЬНІ ПРИНЦИПИ ОРГАНІЗАЦІЇ ВІРУСОЛОГІЧНОЇ ЛАБОРАТОРІЇ:

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

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

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

Основні правила:

1. У лабораторії повинна дотримуватися ідеальна чистота.
2. Забороняється входити у верхньому одязі та класти на робочі столи сторонні предмети (сумки та інші особисті речі).
3. У вірусологічній лабораторії дозволяється працювати тільки у спеціальному одязі, додатково (за необхідністю) – мають бути рукавички, маска для обличчя, захисні окуляри.
4. Необхідно чітко виконувати інструкції до лабораторних занять. Роботу з біологічним матеріалом проводити тільки інструментами.
5. Робоче місце, де безпосередньо проводиться робота з вірусологічним матеріалом, вимагає особливо ретельного дотримання правил стерильності. Стіл перед початком роботи варто дезінфікувати.
6. Під час виконання робіт з вірусологічним матеріалом, зберігати тишу, зайвого ходіння, відкривання та закривання дверей, що посилює рух повітря.
7. Дотримуватись правил особистої гігієни та профілактики.
8. Для уникнення випадкових уколів уміло та обережно користуватися шприцами та голками під час зараження курячих ембріонів.
9. Не можна виносити за межі лабораторії/кафедри будь-які матеріали.
10. **УВАГА!!!** У лабораторії категорично забороняється вживати їжу, пити воду, тощо.
11. Металеві предмети (бактеріологічні петлі, голки, металеві шпателя після кожного використання пропалюють у полум'ї спиртівки (пальника).
12. Забруднені патологічним матеріалом градуйовані та пастерівські піпетки, дозатори, скляні шпателі й металеві інструменти тощо після використання опускають у ємкості з дезінфікуючим розчином.

За ступенем небезпеки для людини збудників вірусних інфекцій розподіляють на чотири групи:

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

II група – арбовіруси: віруси енцефаломієлітів коней, лісу Семліки, Чикунгунья, О'ньонг-ньонг та ін. (родина *Togaviridae*), віруси комплексу кліщового енцефаліту, японського енцефаліту, жовтої гарячки, Зіка, гепатиту С та ін. (родина *Flaviviridae*), віруси комплексу Каліфорнійського енцефаліту, москітних гарячок, геморагічних гарячок з нирковим синдромом та ін. (родина *Bunyaviridae*); віруси лімфоцитарного хоріоменінгіту, Такарібе, Пічінде (родина

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

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

IV група – збудники вірусних септицемій, менінгітів, ентеритів, пневмоній. До них належать: аденовіруси, реовіруси, ентеровіруси, пікорнавіруси, коронавіруси, каліцівіруси, віруси парагрипу, епідемічного паротиту, кору, червоної висипки, везикулярного стоматиту, віспи корів, контагіозного молюска та ін. Дані віруси мають низький рівень ризику для індивідуума та суспільства.

Типи вірусологічних лабораторій:

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

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

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

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 1

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТОДІВ КУЛЬТИВУВАННЯ ВІРУСІВ. ВИКОРИСТАННЯ КУЛЬТУР КЛІТИН У ВІРУСОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕННЯХ

Мета: ознайомитися з морфологічними особливостями та класифікацією культур клітин тканин; набуття навичок визначати тип цитопатичної дії вірусів у культурі клітин.

Матеріали та обладнання: фіксовані забарвлені препарати культур клітин, дезінфекційний розчин, мікроскопи, поживні середовища, ілюстративний матеріал.

У результаті виконання даної лабораторної роботи будуть сформовані наступні **результати навчання:**

- Знати методи виявлення, культивування та ідентифікації вірусів у культурах клітин тканин і курячих ембріонах;
- Знати та розуміти взаємодію між вірусами як неклітинною формою життя та клітинами рослин, тварин, людини та бактерій.

1.1. ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Не зважаючи на велике різноманіття експериментальних об'єктів, головними серед них у вірусології залишаються лабораторні тварини, курячі ембріони, культури тваринних та рослинних клітин, рослини-індикатори та бактеріальні культури. Відповідно, при дослідженні вірусів людини та тварин найчастіше застосовуються модельні системи із залученням лабораторних тварин, курячих ембріонів та культур тваринних клітин (1.1).

Модельними об'єктами (експериментальними або тест-об'єктами) називаються макроорганізми або культури клітин (у тому числі, мікроорганізмів), властивості яких є відомими та постійними для представників одного виду (у випадку культури клітин – штаму, популяції або лінії), що дозволяє їх використовувати для дослідження особливостей патогенів невідомої природи.

1.1.1 Типи культур клітин

Первинні культури клітин – одержують із тканин людини або тварини шляхом їх ферментативної дезінтеграції з використанням холодного або теплого трипсину.

Метод з використанням **теплого трипсину**: шматочки тканини або цілі органи ембріона поміщують у 0,25 %-й розчин трипсину за температури 37 °С. Під час піпетування або перемішування шматочків тканин у теплому трипсині на магнітній мішалці відбувається відокремлення клітин. Порції клітин збирають у міру їх відділення, центрифугують, трипсин зливають, вносять середовище вирощування та суспендують у ньому клітини.

Принцип методу використання *холодного трипсину*: шматочки тканин заливають 0,25 %-м розчином трипсину і залишають на ніч за температури +4 °С. Потім розчин трипсину зі шматочками тканин підігрівають до +37 °С, витримують кілька хвилин і швидко піпетують; суспензію центрифугують, трипсин зливають, клітини повільно піпетують у середовищі вирощування і визначають їх кількість у лічильній камері Горяєва.

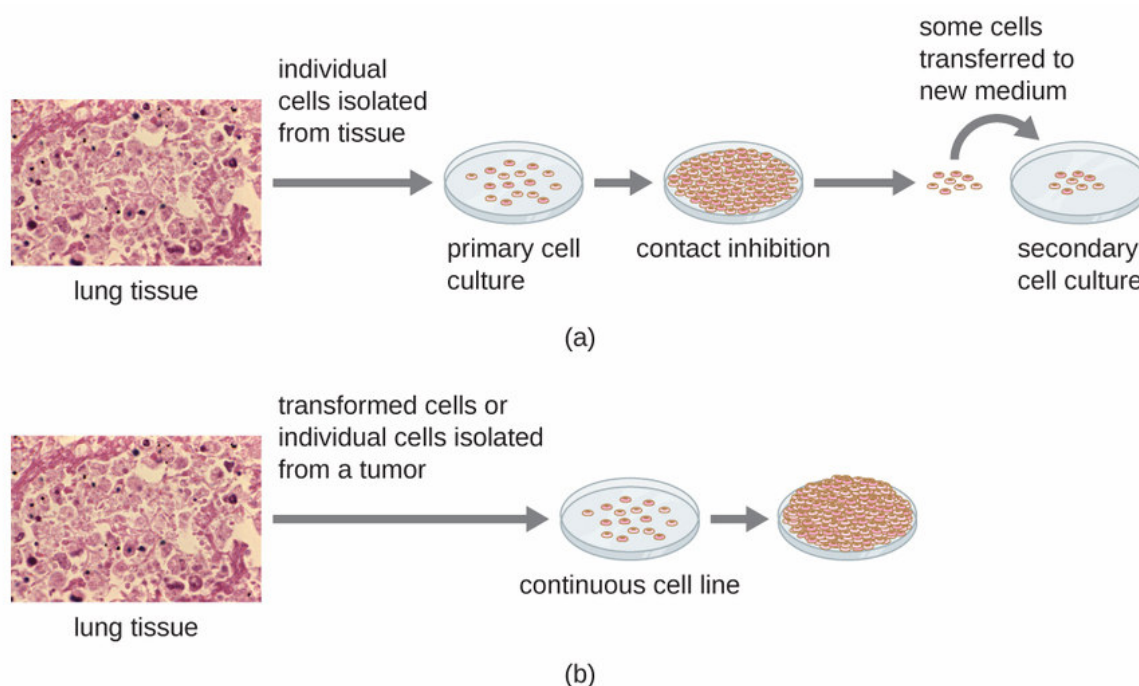


Рис. 1.1. Клітини для культури готують шляхом відділення їх від їх тканинного матриксу: (а) Первинні культури клітин ростуть прикріпленими до поверхні контейнера для культури. Контактне гальмування уповільнює ріст клітин, як тільки вони стають занадто щільними і починають торкатися один одного. На цьому етапі, зростання можна підтримувати лише шляхом створення вторинної культури. (б) Безперервні культури клітин не піддаються впливу контактної інгібування. Вони продовжують рости незалежно від щільності клітин.

Перещеплювальні культури клітин – це клітини одного типу, що набули здатності до необмеженого росту. Вони, як правило, походять із пухлин (рис. 1.2) або нормальних тканин людей або тварин, які мають змінений каріотип. Перещеплювальні культури клітин вирощують у вигляді суспензій (зі стаціонарною чи проточною системою подавання поживного середовища) або одношарових культур на поверхні скла у колбах, матрацах, пробірках, панелях.

В останньому випадку необхідне систематичне проведення пасажів (пересівів) клітин із використанням для цього культури попереднього пасажу або музейних законсервованих клітин. Повноцінну популяцію клітин можна одержати лише за умови застосування життєздатних клітин.

Відібрану для пересівання культуру клітин відокремлюють від скла за

допомогою трипсину (0,25 %), інших хімічних речовин або механічно, зішкрібаючи та подрібнюючи одержані клітини за допомогою багаторазового піпетування.

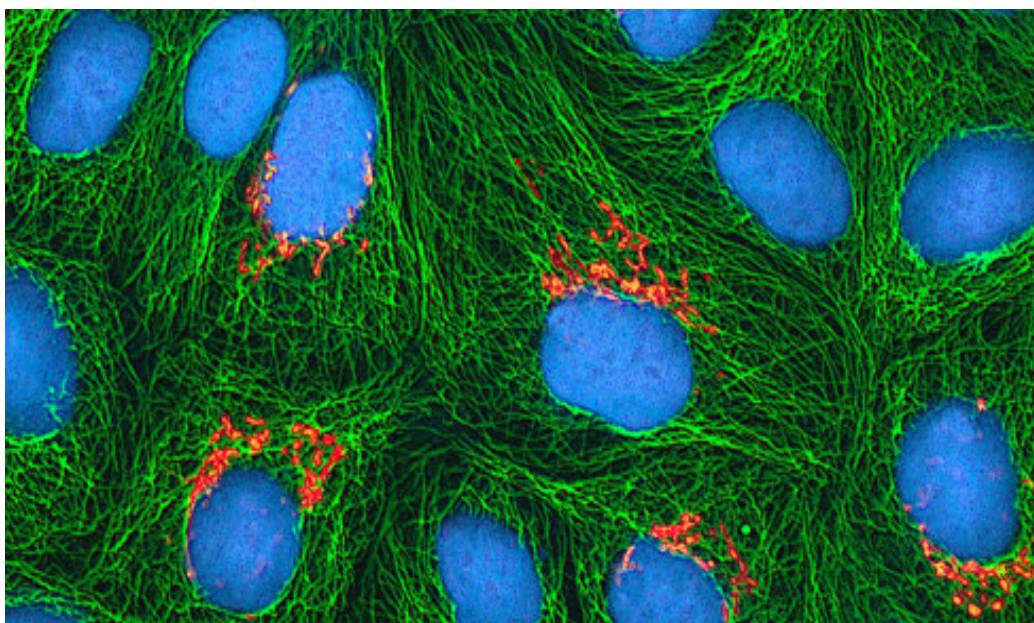


Рис. 1.2. Багатофотонне флуоресцентне зображення клітин HeLa у культурі. Флуоресцентні плями: блакитним кольором – ДНК; зеленим – мікротрубочки; помаранчевий – апарат Гольджі.

Якщо шар клітин пухкий і добре відокремлюється від скла, розчин зливають, а в матраці додають середовище вирощування. Даним середовищем старанно змивають клітини зі скла посудини. Одержану суспензію клітин після підрахунку в лічильній камері Горяєва розводять середовищем вирощування до концентрації, необхідної для посіву. Наприклад, у флакони місткістю 100 мл розливають по 20 мл суспензії, що містить 40-60 тис. клітин у 1 мл. Формування моношару клітин відбувається за 48 год.

Культури диплоїдних клітин – це клітини одного типу, здатні витримувати *in vitro* близько 100 поділів, зберігаючи при цьому вихідний диплоїдний набір хромосом. Диплоїдні штами фібробластів, одержані з ембріона людини, використовують у діагностиці вірусних інфекцій та виробництві вакцин. Ці культури надзвичайно вибагливі до умов культивування, тому їх рідко застосовують у практиці вірусологічних лабораторій.

1.1.2 Методи виявлення та ідентифікації вірусів у культурі клітин

Зараження культур клітин. Найчастіше для зараження використовують моношарові культури. Для цього культури клітин перед зараженням розглядають під мікроскопом, а потім відбирають пробірки з добре сформованим моношаром.

Для дослідження однієї клінічної проби використовують 4-8 пробірок,

таку саму кількість пробірок залишають для контролю клітин. Перед внесенням вірусомісного матеріалу ростове середовище зливають, моношар промивають розчином Хенкса, пробірки маркують.

У кожену пробірку вносять по 0,2 мл досліджуваного матеріалу і витримують у термостаті за температури 37°C протягом 1 год (для деяких вірусів – 2 год) для адсорбції вірусу на клітинах. Після 1–2 год контакту матеріал зливають, моношар промивають розчином Хенкса для видалення токсичних компонентів, заливають підтримувальним середовищем і ставлять у термостат за температури 37 °C на 7–14 днів до визначення результатів.

Для підтримання життєздатності клітин використовують середовище 199 із 2 % сироватки крові великої рогатої худоби (для ротавірусів – середовище 199 на розчині Ерла без сироватки), середовище Ігла з 2 % сироватки, розчин Ерла з 0,5 %-м гідролізатом лактальбуміну та 1-2 % сироватки крові.

У заражених культурах клітин рН (6,9–7,4) підтримують за допомогою 7,5 %-го стерильного розчину натрію гідрокарбонату. Якщо культивування заражених культур тривале, то можна підтримувальне середовище замінити на свіже.

Цитопатична дія вірусів у культурах клітин. Різні віруси неоднаково впливають на клітини. Морфологічні зміни клітини у результаті її взаємодії з вірусом називають цитопатичною дією (ЦПД), а віруси, які стають причиною вказаних змін – *цитопатогенними*.

Період розвитку і характер цитопатичних змін, спричинених цитопатогенними вірусами у інфікованих культурах клітин, залежить від наступних показників:

- 1) властивості вірусу;
- 2) доза вірусу;
- 3) властивості клітин та умови їх культивування.

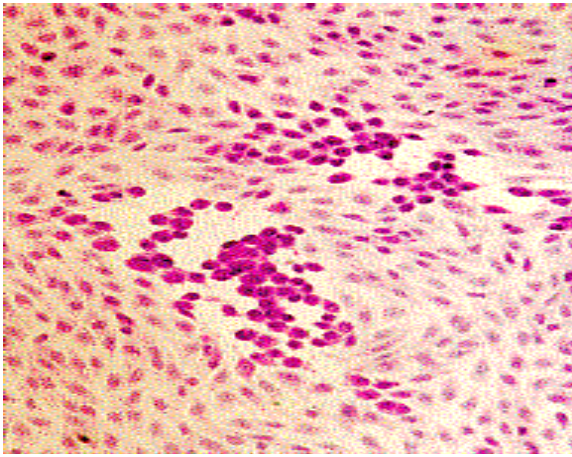
Характерні для кожного вірусу цитопатичні зміни розвиваються у культурах клітин, заражених середніми дозами вірусу, – 1000–10000 ЦПД₅₀, за умови яких процес загибелі клітин стає тривалішим у часі. При цьому, ЦПД₅₀ – цитопатична доза вірусу, яка спричиняє дегенерацію у 50 % пробірок із зараженою культурою клітин.

Для характеристики деструктивних змін одношарових культур клітин, заражених різними вірусами, застосовують класифікацію ЦПД:

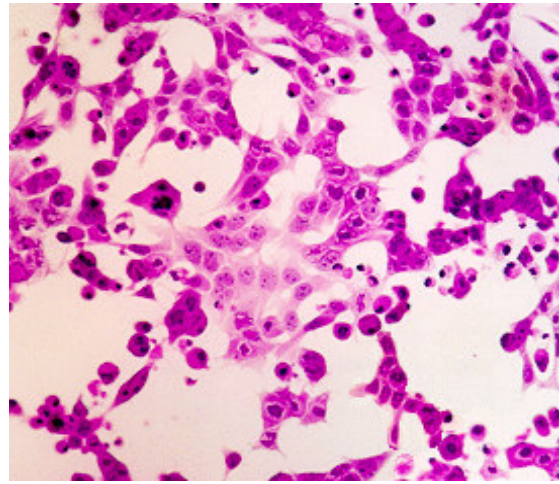
1 група – рівномірно розподілена дрібнозерниста деструкція клітин внаслідок ураження клітин вірусами поліомієліту, Коксакі, віспи та ін.;

2 група – вогнищева дрібнозерниста деструкція клітин з тяжами незмінних клітин між ними через ураження клітин вірусами весняно-літнього енцефаліту, вірусом хвороби Ауески, грипу та ін.;

3 група – вогнищеві скупчення заокруглених клітин, що нагадують грона винограду, які утворюються у результаті ураження клітин аденовірусом (рис. 1.3 Б);



А



Б

Рис. 1.3. Заокруглення клітин у випадку зараження культури клітин:
А – герпесвірусом Б – скупчення заокруглених клітин у випадку зараження культури клітин аденовірусом

4 група – рівномірно розподілена крупнозерниста деструкція клітин (клітини збільшені у розмірі, заокруглені) внаслідок ураження клітин вірусом простого герпесу (рис. 1.3 А), мавпячим вірусом В та ін.;

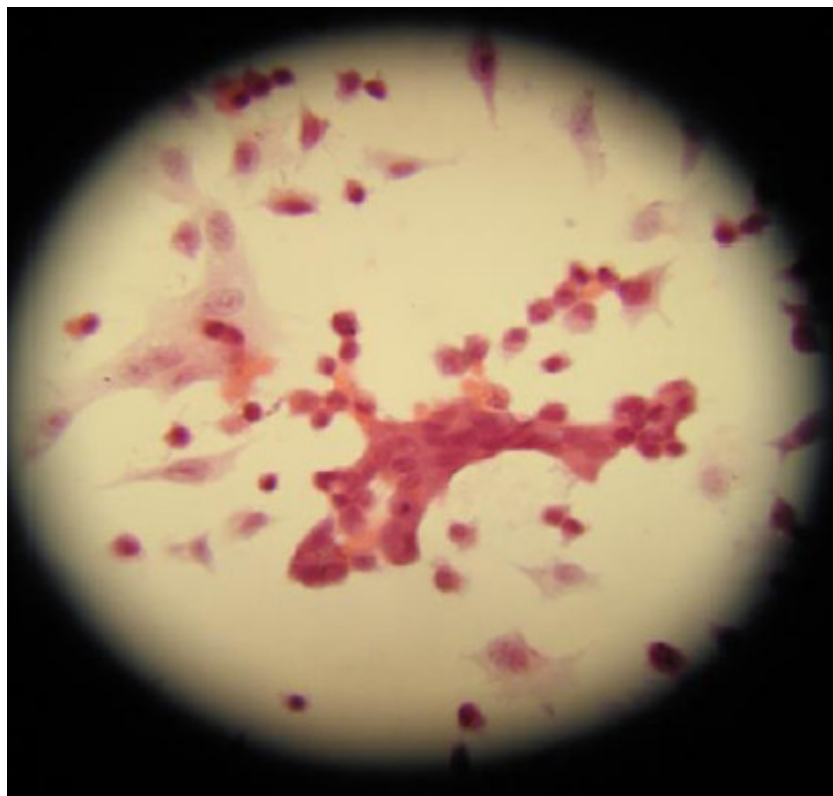


Рис. 1.4. Формування симпласту у культурі клітин, інфікованій вірусом кору

5 група – утворення гігантських багатоядерних клітин – симпластів (рис. 1.4) та синцитіїв – має місце через ураження клітин вірусами кору,

вісповакцини, герпесу та ін. За цього типу ЦПД відбувається розчинення клітинних оболонок, внаслідок чого цитоплазма сусідніх клітин зливається, утворюючи єдине ціле, у якому (в основному по периферії) розташовані ядра клітин.

Синцитії – це група клітин, з'єднаних між собою протоплазматичними відростками; вони виникають у результаті часткового злиття цитоплазматичної мембрани клітин. Симпласти мають загальну масу протоплазми, у якій міститься багато ядер, вони утворюються внаслідок повного злиття мембрани.

Ступінь дегенерації клітин оцінюють знаком плюс: (++++) – деструкція всіх клітин (100%); (+++) – більшості клітин (75%); (++) – половини клітин (50%).

Враховуючи ЦПД вірусів, слід пам'ятати про неспецифічну «вікову» дегенерацію клітин, яка має місце у «старих» культурах, а також про дегенерацію, зумовлену токсичною дією інокульованого матеріалу.

Для виключення токсичної дегенерації клітин проводять додатковий пасаж: по 0,2 мл культуральної рідини з пробірок з дегенерованими клітинами вносять у пробірки зі свіжими культурами клітин. Якщо дегенерація була зумовлена токсичним фактором випробуваного матеріалу, то ЦПД у культурі клітин не розвивається.

Внутрішньоклітинні включення. Для ЦПД багатьох вірусів характерне формування внутрішньоядерних і цитоплазматичних включень. Динаміка їх утворення, форма, розмір, субклітинна організація, наявність у них вірусоспецифічних нуклеїнових кислот і білків мають важливе діагностичне значення, оскільки відрізняються у вірусів різних таксономічних груп (рис. 1.5).

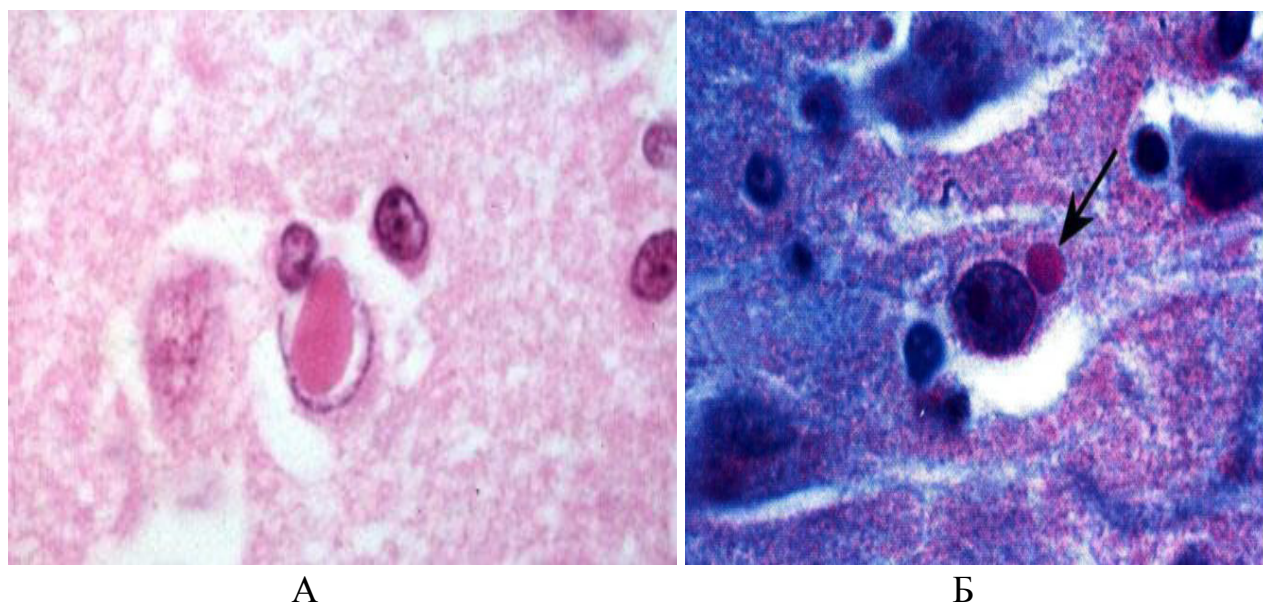


Рис. 1.5. Вірусні включення: А – типові внутрішні ядерні включення при герпесвірусній інфекції у гліальних клітинах, Б – цитоплазматичні включення Бабеша-Негрі при сказі

Забарвлення за Романовським – Гімзою універсальне, оскільки допомагає виявити всі види вірусних включень. Забарвлені за цим методом препарати фіксують у суміші Дюбоска – Бразіля – Буена (пікринова кислота – 1 г, 4 %-й формалін – 60 мл, 80%-й етиловий спирт – 150 мл, льодяна оцтова кислота – 15 мл). Препарати опускають у нерозведений розчин барвника Романовського – Гімзи на 10 хв, промивають дистильованою водою та висушують на повітрі. Після забарвлення за цим методом вірусні включення рожеві або рожево-бузкові.

1.2 ПОРЯДОК ВИКОНАННЯ РОБОТИ

1. Розглянути під світловим мікроскопом неінфіковані вірусом культури клітин (первинних, перещеплювальних, диплоїдних). Визначити їх:

- ❖ морфологію;
- ❖ тип клітин;
- ❖ вказати густоту популяції клітинного моношару.

2. Ознайомитися зі складом поживних середовищ, що застосовують для культивування різних культур клітин тканин.

3. Дослідити фіксовані забарвлені препарати інфікованих вірусами культур клітин для виявлення ознак ЦПД, описати їх.

4. Знайти внутрішньоклітинні включення, зумовлені різними вірусами.

5. Зарисувати препарати здорових та інфікованих вірусом культур клітин.

6. Порівняти морфологію неінфікованих та інфікованих вірусами культур клітин.

7. Заповнити таблицю:

Таблиця 1 – Цитопатична дія вірусу на клітини

Родина вірусу	ЦПД на клітини	Зображення

Контрольні питання

1. Охарактеризуйте поняття «культура клітин» та її використання у вірусології.

2. Які культури клітин і чому називають первинними та одношаровими?

3. Охарактеризуйте метод трипсинізації та техніку його застосування.

4. Які основні типи культур клітин тварин ви знаєте? Чим вони відрізняються?

5. Назвіть методи зараження культур клітин вірусами.

6. Укажіть типи взаємодії вірусу з клітиною. Опишіть ЦПД вірусів та її прояви.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 2 КУЛЬТИВУВАННЯ ВІРУСІВ У КУРЯЧИХ ЕМБРІОНАХ

Мета: оволодіти методом зараження та розтину курячих ембріонів.

Матеріали та обладнання: курячі ембріони, вірусомісний матеріал (вірус вакцини Ньюкасла), інструменти (ножиці, пінцети), склянки для інструментів, лабораторний посуд (піпетки об'ємом 1, 2, 5 мл, пробірки, колби, чашки Петрі), мікроскоп, лоток, ступка, центрифуга, склянки з ватою, штатив, овоскоп, олівець, підставки для ембріонів, 96 %-й етиловий спирт, 2 %-й спиртовий розчин йоду, ізотонічний розчин (0,9% NaCl), стерильний парафін, дезінфекційний засіб, ілюстративний матеріал (таблиці, фотографії, рисунки).

У результаті виконання даної лабораторної роботи будуть сформовані наступні **результати навчання**:

- Знати методи виявлення, культивування та ідентифікації вірусів у культурах клітин тканин і курячих ембріонах.

1.1. ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

У вірусологічній практиці курячі ембріони використовують для:

- 1) виділення вірусів із клінічного та секційного матеріалу;
- 2) культивування лабораторних штамів збудників;
- 3) приготування діагностичних препаратів і первинно-трипсинізованої культури клітин;
- 4) з метою одержання вакцин.

Переваги курячих ембріонів (рис. 2.1) порівняно з лабораторними тваринами полягають у доступності їх для будь-якої вірусологічної лабораторії, відносній дешевизні, простоті у роботі тощо.

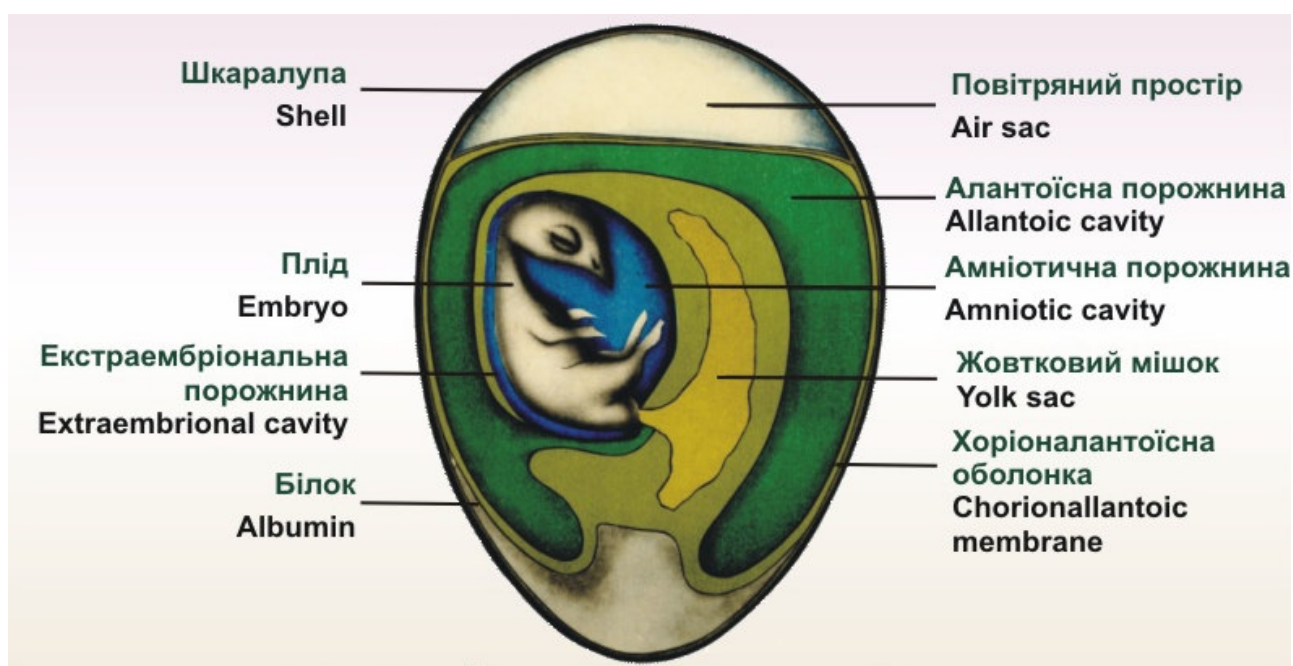


Рис. 2.1. Будова курячого ембріону

Для виділення вірусів застосовують курячі ембріони віком від 5 до 14 днів. При цьому вік ембріонів, спосіб їх зараження та строки одержання результатів можуть варіювати залежно від потреб експерименту.

Максимальна кількість вірусів (час інкубації) залежить від біологічних особливостей культивованих вірусів та їх *тропізму*. Під час пасирування лабораторних штамів вірусів на курячих ембріонах важливо дотримуватися оптимальної дози збудника. Так, для вірусу грипу вона коливається у межах 100 – 1000 ЕІД₅₀, для вірусу паротиту – 10–100 ЕІД₅₀ і т. д.

ЕІД₅₀ – ембріональна інфекційна доза з 50 %-м ефектом, вона дорівнює найменшій кількості вірусних частинок, що репродукується у 50 % узятих для зараження курячих ембріонах.

Зараження курячих ембріонів

Способи зараження курячого ембріона:

- 1) у порожнину амніона й алантоїса,
- 2) на хоріоалантоїсну оболонку,
- 3) у жовтковий мішок.

Зараження шляхом введення вірусомісного матеріалу у порожнину алантоїса. Порожнина алантоїса – орган виділення ембріона, заповнений рідиною, що містить ізотонічний розчин різних солей. Алантоїс оточує ембріон і жовтковий мішок, розташовуючись на внутрішній поверхні шкаралупи, під хоріоном. З розвитком ембріона алантоїс значно збільшується, досягаючи максимуму за об'ємом алантоїсної рідини (до 7–10 мл) на 11–13-ту добу.

Техніка зараження курячого ембріона досить проста. У центрі тупого кінця вертикально розміщеного яйця, над повітряним мішком, проколюють шкаралупу, вводять голку для внутрішньом'язових ін'єкцій на 2–3 мм нижче за межу повітряного мішка і туберкуліновим шприцом вносять досліджуваний матеріал.

У разі зараження у *порожнину алантоїса* – матеріал вводять у бічну частину ембріона, розмістивши яйце горизонтально. При цьому шкаралупу проколюють двічі: у ділянці повітряного мішка і на бічній поверхні ембріона, де в алантоїсі немає великих кровоносних судин. У місце бічного проколу вводять голку туберкулінового шприца на глибину 2-3 мм. Після закінчення роботи проколи в шкаралупі закривають розплавленим парафіном або лейкопластирем.

Зараження у порожнину амніона. У порожнині амніона знаходиться тіло ембріона. Вірусомісний матеріал, уведений у цю порожнину, потрапляє у дихальні шляхи ембріона. Амніотична рідина – це ізотонічний розчин солей, який у процесі розвитку ембріона збагачується білком, її об'єм – близько 1 мл.

Відкритий спосіб зараження ембріона у порожнину амніона – над повітряним мішком вертикально розміщеного яйця прорізують віконце розміром 1×1 см і обережно знімають частину хоріоалантоїсної оболонки над тілом ембріона. Потім пінцетом, мінімально травмуючи тканини, захоплюють

амніон і підтягують його вгору. Після цього амніон перехоплюють пінцетом з плоскими браншами лівою рукою, а правою туберкуліновим шприцом уводять досліджуваний матеріал. Після зараження ембріона інструменти забирають (при цьому амніон перебуває в тому самому положенні), а отвір у шкаралупі закривають стерильною поліетиленовою плівкою або годинниковим склом за допомогою парафіну. З цією метою можна також використати медичний лейкопластир.

Закритий спосіб зараження амніона – здійснюють під контролем овоскопа у затемненому боксі. Матеріал уводять через прокол у шкаралупі тупого кінця вертикально розміщеного яйця. При цьому голку спрямовують на «темне око» ембріона, відхиляючи її від центральної осі яйця, або, якщо є прокол над повітряним мішком, уводять у бічну поверхню горизонтально розміщеного яйця в напрямку до тіла ембріона. Якщо матеріал уведено правильно, тільце ембріона зміщується. Отвори закривають.

Зараження шляхом введення вірусомісного матеріалу у хоріонантоїсну оболонку. Спосіб зараження передбачає створення штучного повітряного мішка на бічній поверхні яйця, де у хоріонантоїсній оболонці немає великих кровоносних судин (його позначають олівцем). Для цього на позначеній ділянці шкаралупи випилюють щілину довжиною 6-8 мм і шириною – 2 мм так, щоб оболонка під шкаралупою залишилася неушкодженою. На тупому кінці яйця, над природним повітряним мішком роблять прокол.

На оголену оболонку під шкаралупою наносять краплю стерильного ізотонічного розчину натрію хлориду (кімнатної температури) і через неї здійснюють в оболонці розрив інструментом для взяття крові або спеціальною голкою із загнутим кінцем. Розривати оболонку під шкаралупою треба обережно, щоб не травмувати хоріонантоїсну оболонку, яка щільно прилягає до неї.

Під час розриву оболонки під шкаралупою крапля ізотонічного розчину потрапляє всередину, оскільки хоріонантоїсна оболонка відшаровується і опускається, формуючи новий повітряний мішок. Утворення штучного повітряного мішка контролюють за допомогою овоскопа.

На хоріонантоїсну оболонку повітряного мішка рівномірно наносять досліджуваний матеріал, отвір заклеюють лейкопластирем. Прокол на тупому кінці яйця закривають парафіном. Яйця інкубують так, щоб штучний повітряний мішок був зверху.

Зараження у жовтковий мішок. Яйце кладуть горизонтально на підставку так, щоб тіло ембріона знаходилося внизу, а жовток – над ним. Голкою для внутрішньом'язових ін'єкцій у ділянці повітряного мішка здійснюють прокол по центральній осі яйця (глибина проникнення 2/3 довжини голки). Шприцом уводять досліджуваний матеріал. Отвір закривають парафіном або лейкопластирем.

1.2 ПОРЯДОК ВИКОНАННЯ РОБОТИ

1.2.1 Підготовка та зараження курячих ембріонів

1. Ознайомитися з будовою курячого ембріона та способами його зараження (рис. 2.2), замалювати його у зошит та позначити основні складові.

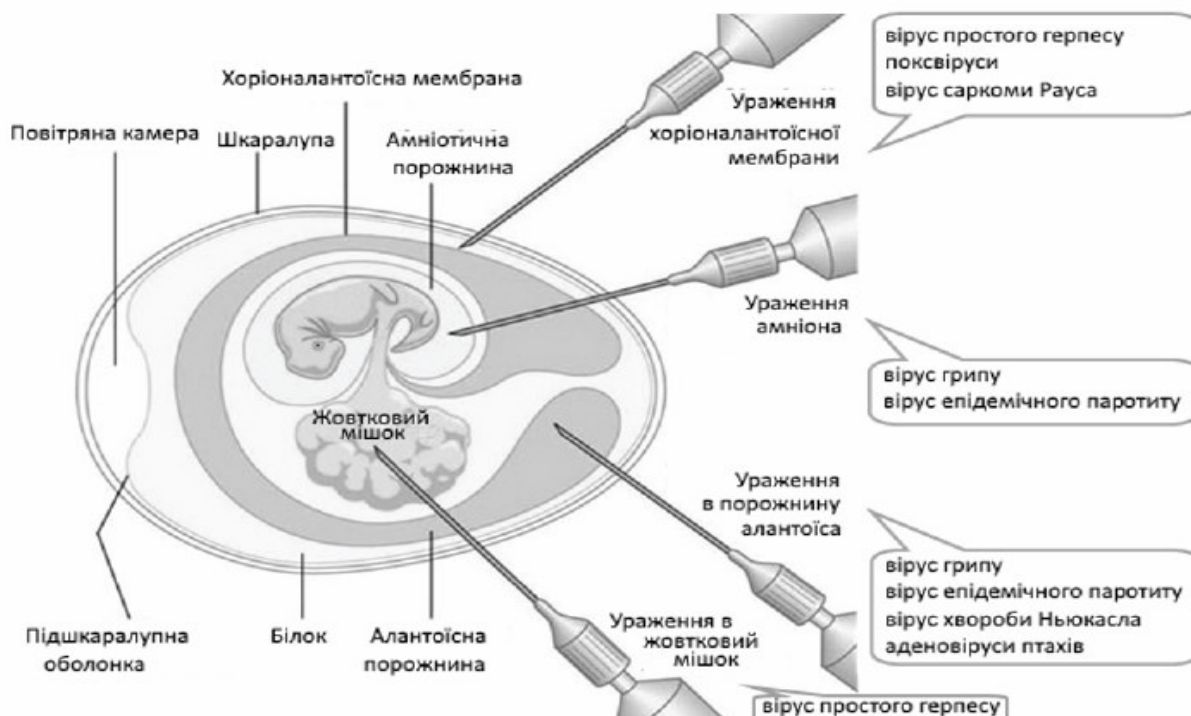


Рис. 2.2. Будова курячого ембріона та способи його зараження

2. Перед зараженням курячі ембріони просвічують, щоб визначити їх життєздатність. Ознаки живого ембріона – наявність самостійних рухів, добре виражений судинний рисунок, пульсація судин.

Підготувати курячий ембріон до зараження: за допомогою овоскопа визначити місце розміщення повітряної камери (позначити місце за допомогою маркеру), великих кровоносних судин, тіла ембріона («темне око»); з метою дезінфекції – ообробити шкаралупу йодом.

Увага! Перед роботою курячі ембріони витримують у термостаті за температури 37 °С та відносної вологості 60–70%, яку підтримують, розміщуючи у термостаті лотки з водою. Щоб ембріональні оболонки не злипались, кілька разів на день яйця вручну перевертають у термостаті.

3. Підготувати шприц з вірусомісним матеріалом для ін'єкцій. Об'єм досліджуваного матеріалу, який вводять в ембріон 0,1–0,2 мл. Для виділення вірусу з одного виду матеріалу використовують не менше ніж чотири курячі ембріони.

Роботу з курячими ембріонами проводять у стерильних умовах (бажано у боксі), стерильними інструментами. Після виконання кожного етапу роботи інструменти занурюють у 70 %-й етиловий спирт і перед наступною маніпуляцією обпалюють. Перед зараженням шкаралупу курячого ембріона

протирають запаленим спиртовим тампоном і 2 %-м спиртовим розчином йоду.

4. Виконати зараження курячих ембріонів вірусом: у порожнину алантоїса, амніона, хоріоалантоїсну оболонку, жовтковий мішок, застосовуючи послідовність дій, що описано вище у теоретичній частині.

5. Після зараження ембріони інкубують у термостаті, розміщуючи їх тупим кінцем догори. Температура і тривалість інкубації залежать від біологічних властивостей ізольованого вірусу. Після інкубації ембріони охолоджують до максимального звуження кровоносних судин (за температури - 10... -18 °С – 2 год, +4 °С – 16 – 18 год).

6. Здійснити розтин уражених курячих ембріонів. Вказати патолого-анатомічні зміни у різних структурах ембріона.

1.2.2 Розтин курячих ембріонів

Відбір хоріоалантоїсної оболонки:

1) Стерильними ножицями підрізають оболонку на межі з повітряною камерою та переносять весь матеріал у чашку Петрі, а хоріоалантоїсну оболонку поміщають у стерильну чашку.

2) Проводять мікроскопічне дослідження на темному фоні оболонки, виявляючи цитопатичну дію вірусів грипу А.

3) Для виявлення виду та титру вірусних частинок з хоріоалантоїсної оболонки готують гомогенну масу (оболонку перетирають у ступці з піском 1:3).

Ізотонічний розчин додають за вагою (до 20% суміші). Після центрифугування (3000 об/хв протягом 20 хв) рідину, що утворилася над осадам, використовують для подальших досліджень.

Відбір алантоїсної рідини:

1) Курячі ембріони перед розтином тримають у холодильнику протягом 3 год. При цьому кровоносні судини звужуються, тому кровотечі під час розтину курячого ембріона не буде.

2) Дезінфікують шкаралупу, стерильними ножицями зрізають її на відстані 3 мм від межі повітряної камери. Яйце нахиляють та роблять прокол хоріоалантоїсної оболонки. Через прокол пастерівською піпеткою відбирають алантоїсну рідину, яку зберігають за температури 4 °С або у замороженому стані.

Відбір амніотичної рідини:

1) Розтинають амніон та відбирають алантоїсну рідину.

2) Пінцетом захоплюють ембріон, пастерівською піпеткою проколюють амніотичну оболонку та, злегка нахиляючи ембріон, відбирають амніотичну рідину.

7. Отримати вірусовмісний матеріал з органів інфікованих курячих ембріонів і виокремити ембріон з яйця.

Контрольні питання:

1. З якою метою використовують курячі ембріони у вірусологічних дослідженнях?
2. Опишіть особливості анатомії та фізіології курячого ембріону.
3. Назвіть методи зараження курячих ембріонів. Від чого залежить обраний метод зараження курячого ембріона?
4. Чим пояснюється той факт, що у вірусологічних експериментах використовуються ембріони різного віку?
5. У чому полягає методика отримання вірусовмісного матеріалу із органів і тканин інфікованих курячих ембріонів?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 3

ВИЗНАЧЕННЯ ТАКСОНОМІЧНОГО ПОЛОЖЕННЯ ВІРУСІВ ТА ЇХ ІДЕНТИФІКАЦІЯ ЗА ДОПОМОГОЮ СУЧАСНИХ ІМУНОЛОГІЧНИХ ТА МОЛЕКУЛЯРНО-БІОЛОГІЧНИХ МЕТОДІВ

Мета: ознайомитись із сучасними імунологічними та молекулярно-біологічними методами дослідження вірусів; визначити наявність та концентрацію вірусу вакцини Ньюкасла в алантоїсній рідині.

Матеріали та обладнання: вірусовмісний матеріал (алантоїсна рідина), 2 %-на суміш еритроцитів, ізотонічний розчин; антисироватка проти вірусу вакцини Ньюкасла; пробірки; піпетки об'ємом 1 мл; пластиковий планшет для вірусологічних досліджень, термостат.

У результаті виконання даної лабораторної роботи будуть сформовані наступні **результати навчання:**

- Знати методи виявлення, культивування та ідентифікації вірусів у культурах клітин тканин і курячих ембріона.

1.1. ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Реакцію гемаглютинації (рис. 3.1) широко застосовують у вірусологічній практиці як швидкий та надійний метод виявлення вірусів у дослідному матеріалі, а також для титрування вірусних гемаглютининів.

Принцип реакції гемаглютинації полягає в адсорбції вірусних частинок на поверхневих рецепторах еритроцитів. Ця властивість зумовлена взаємодією поверхневих вірусних білків – гемаглютининів (у простих вірусів – білки капсиду, у складних – гліко- та ліпопротеїни суперкапсиду) з поверхневими білками еритроцитів (глікопротеїнами). У результаті адсорбції еритроцити склеюються один із одним, що зумовлює утворення агрегату, який осідає на дно пробірки або лунки планшета.

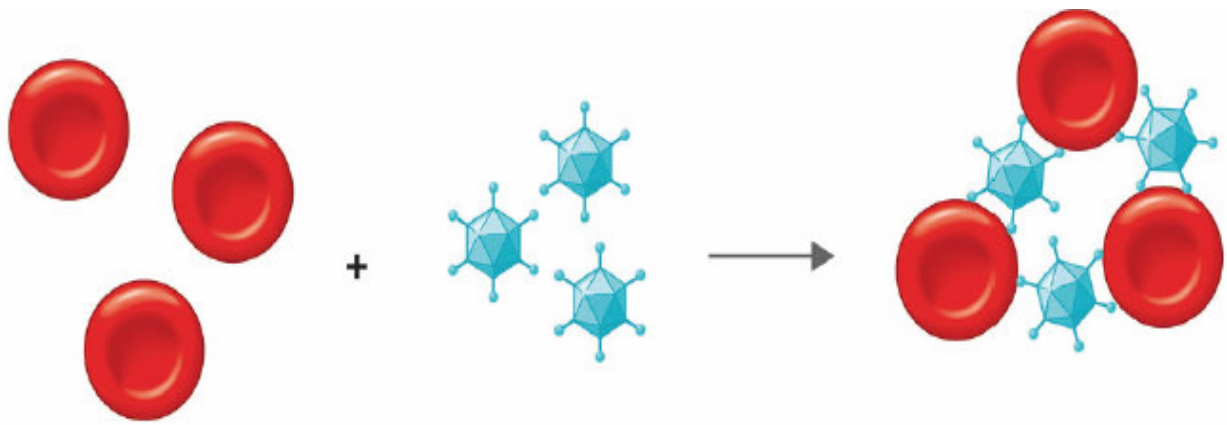


Рис. 3.1. Схематичне зображення реакції гемаглютинації

Позитивну реакцію (рис. 3.2) оцінюють плюсами (від одного до трьох). Рівномірний шар еритроцитів на вигнутому дні пробірки або імунологічного планшету з хвилястою крайовою зоною (вигляд перевернутої парасольки) – **ознака повної аглютинації (+++)**.



Рис. 3.2. Врахування результатів гемаглютинації у плюсах

Рівномірне осадження еритроцитів інколи з рівним краєм та кільцевою зоною на дні пробірки – **помірна аглютинація (++)**. Значне осадження еритроцитів суцільним, компактним шаром із зернистим краєм – **слабка аглютинація (+)**. Осадження еритроцитів суцільним диском з рівними краями – **негативна реакція (-)**. Титром вірусу вважають те найбільше його розведення, за якого відбувається аглютинація еритроцитів не менше ніж із двома плюсами.

Реакція гальмування гемаглютинації – процес за якого, блокований антитілами вірус не може аглютинувати еритроцити. (рис. 3.3)

Переваги реакції – специфічність, простота техніки, швидкість, вона не потребує стерильності. Недоліки – можлива тільки з гемаглютинуючими вірусами. Реакцію дуже широко застосовують для діагностики вірусних захворювань, виявлення антитіл у сироватці хворих та вивчення антигенної структури вірусів. За титр антитіл беруть найбільше розведення сироватки, яке дає повну затримку гемаглютинації. Типову належність вірусу в алантоїсній рідині визначають за реакцією з імуноспецифічною сироваткою. Таким чином, використовуючи відомі імунні сироватки, встановлюють невідомий компонент

реакції – вірусний антиген.

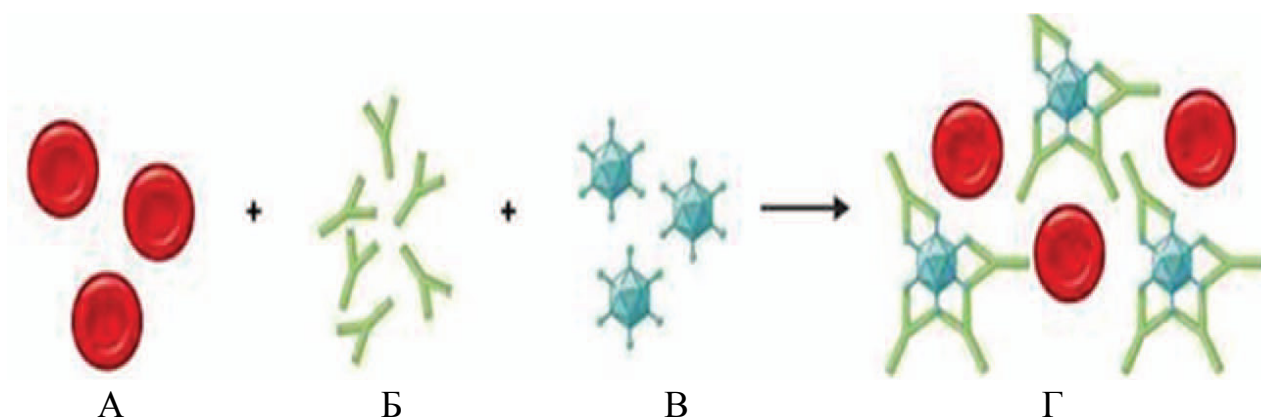


Рис. 3.3 Визначення вірусних антигенів реакцією гальмування гемаглютинації еритроцитів: А – еритроцити; Б – антитіла; В – вірус; Г - віруси нейтралізовані та гемаглютинація пригнічена

Імуноферментний аналіз (ІФА) відрізняється від традиційних серологічних реакцій високою чутливістю, економічністю, дозволяє дослідити велику кількість зразків за короткий час. Принцип методу полягає у іммобілізації одного із компонентів (антигену або антитіла) на носії (рис. 3.4, 3.5).

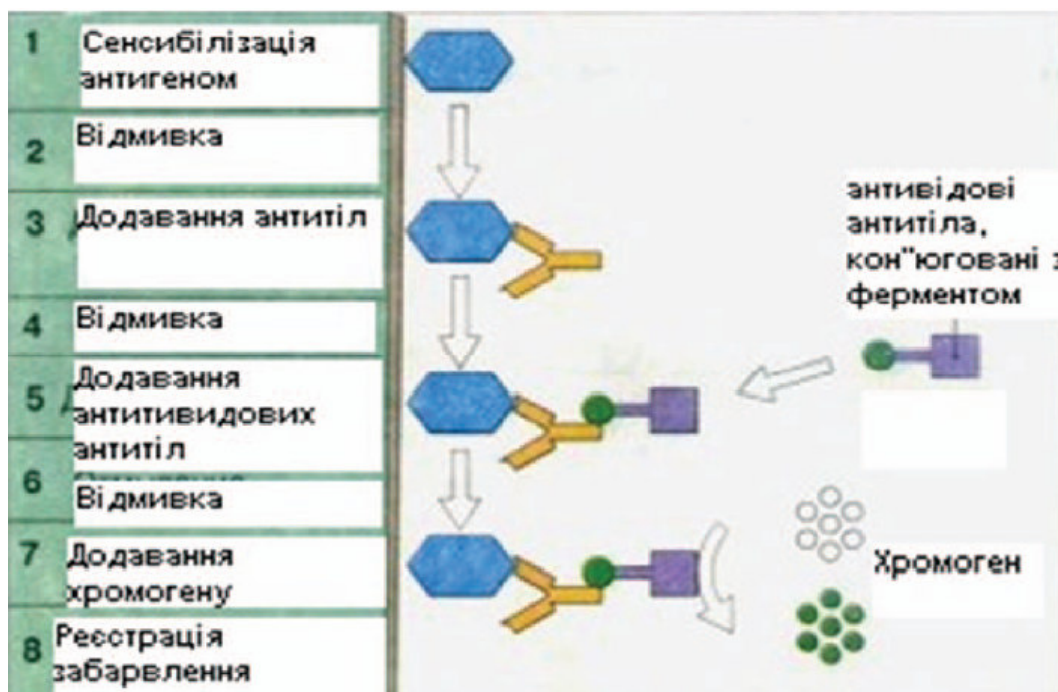


Рис. 3.4. Основні етапи ІФА

За допомогою імуноферментного аналізу можна визначити антигени будь-якого збудника і антитіла до них у крові хворих. У ході виявлення антитіл реакцію проводять таким чином: спочатку до антигенів, адсорбованих у лунках планшета, додають досліджувану сироватку.



Рис. 3.5. Варіант проведення ІФА: сендвіч-ІФА

Далі в лунки вносять антивидові антитіла, кон'юговані з ферментом пероксидазою, які зв'язуються з антитілами сироватки тільки в складі комплексу «антиген-антитіло». Після відмивання незв'язаних кон'югованих антитіл до системи додають хромогенний субстрат пероксидази, який під впливом ферменту набуває жовтого кольору. Врахування результатів реакції проводять з допомогою приладів – абсорбціометрів, які дозволяють вимірювати оптичну густину продукту ферментативної реакції безпосередньо в лунках планшету.

Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) широко використовується для детекції вірусів і являє собою багатократне збільшення числа копій (ампліфікацію) специфічної ділянки ДНК, що каталізується ферментом термостабільною ДНК-полімеразою (*Tag-полімераза*).

Для проведення ампліфікації потрібні такі компоненти: ДНК-матриця (ДНК або її частина, що містить специфічний фрагмент); праймери – синтетичні олігонуклеотиди (20-30 нуклеотидних пар), комплементарні послідовностям ДНК на межах специфічного фрагмента та *Tag-полімераза*. Процес ампліфікації складається з повторюючих циклів температурної денатурації ДНК (93-95°C), приєднання праймерів до комплементарних послідовностей одноланцюгової ДНК на межах специфічної ділянки (за температури 50-60°C) та добудовування полінуклеотидних ланцюгів *Tag-полімеразою*, яке відбувається від 5'-кінця до 3'-кінця ланцюга в протилежних напрямках, починаючи з ділянок приєднання праймерів (за температури 70-72°C).

У наступних циклах ампліфікації, амплікони являють собою матриці для синтезу нових ланцюгів. Таким чином відбувається нагромадження ампліконів

у розчині за формулою 2^n , де n – число циклів ампліфікації. Для швидкої візуалізації результатів ПЛР використовують гель-електрофорез в агарозному гелі.

1.2 ПОРЯДОК ВИКОНАННЯ РОБОТИ

1. Визначити титр вірусу за допомогою реакції гемаглютинації.

Готують початкове розведення алантоїсної рідини 1:10, далі із нього готують послідовні двократні розведення:

а) у 10 пробірок наливають ізотонічний розчин (0,9 % NaCl): у першу пробірку вносять 0,9 мл, у інші – по 0,5 мл.

б) у першу пробірку додають 0,1 мл алантоїсної рідини (розведення 1:10), перемішують та переносять 0,5 мл у другу пробірку, 0,5 мл з другої пробірки переносять у третю і т.д.

в) з останньої пробірки 0,5 мл виливають у посуд з дезінфекційним розчином. Останнє розведення – 1:2560.

г) у кожен пробірку, окрім першої, додають по 0,5 мл еритроцитів. Пробірки струшують та залишають за кімнатної температури на 45 хв.

Результати реакції гемаглютинації занести до табл. 3.1 та визначити титр вірусу в алантоїсній рідині.

Таблиця 3.1 – Схема проведення реакції гемаглютинації

№ пробірки	Алантоїсна рідина, мл	Ізотонічний розчин, мл	Розведення	2%-на суміш еритроцитів	Результати реакції
1	0,1	0,9	1:10	-	
2	0,5	0,5	1:20	0,5	
3	0,5	0,5	1:40	0,5	
4	0,5	0,5	1:80	0,5	
5	0,5	0,5	1:160	0,5	
6	0,5	0,5	1:320	0,5	
7	0,5	0,5	1:640	0,5	
8	0,5	0,5	1:1280	0,5	
9	0,5	0,5	1:2560	0,5	
10	-	-	-	0,5	

Примітка: 1-ша пробірка – контроль алантоїсної рідини, 10-та пробірка – контроль еритроцитів

2. Ідентифікувати вірус в алантоїсній рідині за допомогою реакції гальмування гемаглютинації.

Для приготування робочої дози антигену алантоїсна рідина береться у розведенні, у 4 рази більшому, ніж титр вірусу. Наприклад, якщо в реакції гемаглютинації виявлено, що титр вірусу 1:160, то для реакції гальмування гемаглютинації треба взяти розведення 1:40.

Із вихідного розведення сироватки (1:10) готують двократні розведення до 1:1280 (табл. 3.2).

Порядок проведення реакції:

а) у ряд пробірок поміщають по 0,25 мл ізотонічного розчину (0,9 % NaCl). У першу пробірку додають 0,25 мл вихідного розведення сироватки, перемішують та відбирають із неї 0,25 мл у другу пробірку і т.д. Із останньої пробірки 0,25 мл забирають.

б) до кожної пробірки із розведеною сироваткою додають по 0,25 мл робочої дози антигену. Суміш перемішують та залишають на 45 хв за кімнатної температури, після чого до всіх пробірок додають по 0,5 мл 2 %-ї суміші еритроцитів.

в) готують два контролі: контроль антигену – 0,25 мл ізотонічного розчину (0,9 % NaCl), 0,25 мл робочого розведення алантоїсної рідини, 0,5 мл суміші еритроцитів); контроль еритроцитів – 0,5 мл фізіологічного розчину, 0,5 мл еритроцитів. Пробірки залишають на 30 хв за кімнатної температури.

Провести облік результатів реакції гальмування гемаглютинації. Ідентифікувати вірус в алантоїсній рідині та вказати титр антитіл у сироватці.

Таблиця 3.2 – Реакція гальмування гемаглютинації

№ пробірки	Розведення сироватки	Результати
1	1:10	
2	1:20	
3	1:40	
4	1:80	
5	1:160	
6	1:320	
7	1:640	
8	1:1280	
9	Контроль антигенів	
10	Контроль еритроцитів	

Примітки: 9-та і 10-та пробірки не містять сироватки.

3. Врахувати результати проведених досліджень та оформити висновки.

Контрольні питання:

1. Як виявляють титр вірусу в реакції гемаглютинації?
2. Опишіть механізм проведення та діагностичне застосування реакції гальмування гемаглютинації.
3. Яка принципова відмінність методу ІФА від інших серологічних методів?
4. Що таке антивидові антитіла та з якою метою вони використовуються у ІФА?
5. З якою метою використовують ПЛР у вірусологічних дослідженнях?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 4

МЕТОДИ ВИЗНАЧЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЇ ВІРУСІВ. ТИТРУВАННЯ БАКТЕРІОФАГІВ

Мета: опанувати метод подвійних агарових шарів за Грація.

Матеріали та обладнання: колби, чашки Петрі, піпетки об'ємом 1 мл, пробірки, МПА, стерильний ізотонічний розчин (0,5% NaCl), термостат, добові культури *Bacillus megaterium*, *B. mycoides*, *B. subtilis*, *B. mesentericus*, *B. thuringiensis*, *B. brevis* тощо.

У результаті виконання даної лабораторної роботи будуть сформовані наступні **результати навчання**:

- Знати методи виявлення, культивування та ідентифікації вірусів у культурах клітин тканин і курячих ембріонах.

1.1. ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Метод титрування вірусів бактерій на агаризованих середовищах запропонував бельгійський вчений Андре Грація для визначення кількості активних фагових частинок у одиниці об'єму вихідного фаголізату. Такий метод дозволяє зробити точний підрахунок інфекційно-активних одиниць бактеріофага за утворенням **негативних колоній** на газоні чутливої культури-хазяїна у результаті лізису бактеріальних клітин після розмноження вірусів всередині них (4.1).

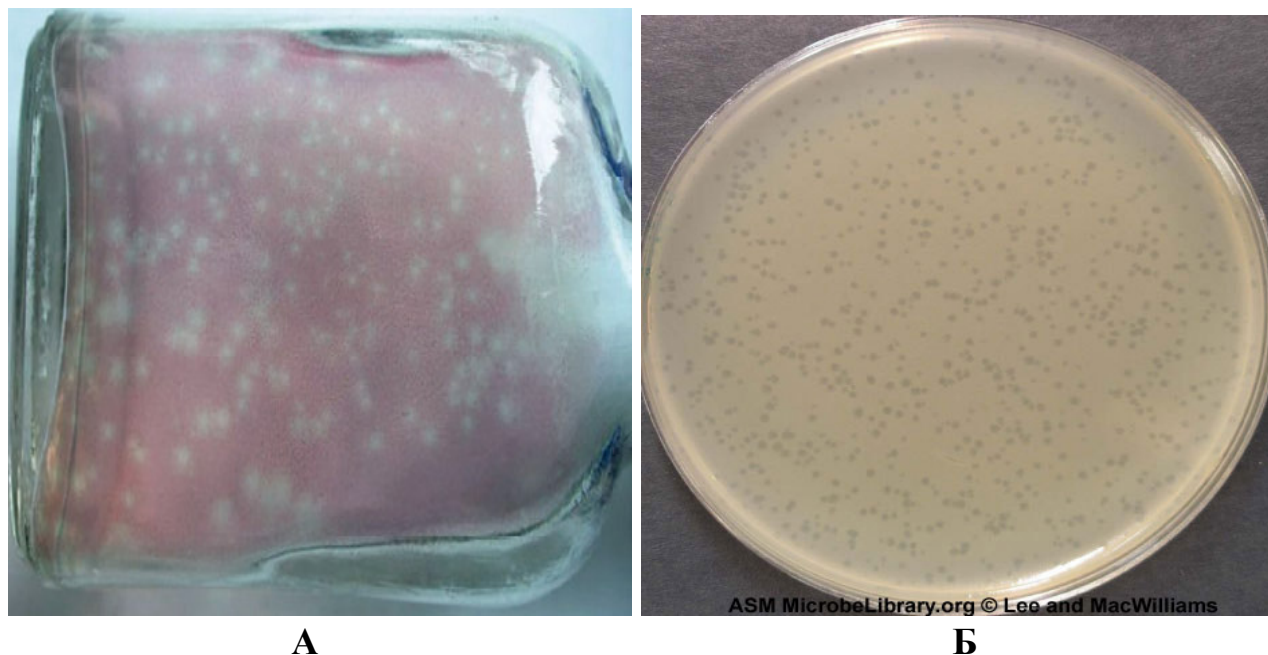


Рис. 4.1. Утворення бляшок (БУО): А – у культурі клітин, уражених вірусом; Б – метод подвійних агарових шарів з виявленням БУО: Бактеріофаг M13mp18 внесений на чутливий штам *Escherichia coli* XL1Blue

Метод полягає у використанні нижнього щільного шару агару (1,5%) для живлення бактерій та верхнього м'якого шару агару (0,7%) – для розвитку інфекційної системи «*фаг – бактерія*». Полегшена дифузія фагових частинок завдяки зниженій концентрації агару забезпечує циклічність інфекційного процесу, коли кожна генерація фагового потомства після лізису клітини-хазяїна здатна інфікувати сусідні клітини. У результаті цього від одного віріона утворюється одна прозора зона відсутності росту бактерій – негативна колонія.

1.2 ПОРЯДОК ВИКОНАННЯ РОБОТИ

Визначення титр фагу за допомогою подвійних агарових шарів методом Грація (рис. 4.2):

1) У чашки Петрі розливають по 25-30 мл 1,5%-й МПА. Для запобігання контамінації сторонньою мікрофлорою, до розплавленого поживного середовища, перед розливанням, вносять 0,004%-й спиртовий розчин генціанового фіолетового з розрахунку 0,1 мл барвника на кожні 100 мл МПА.

2) Чашки Петрі із середовищем накривають стерильним фільтрувальним папером і підсушують 30 хв у термостаті або протягом 2-3 год за кімнатної температури.

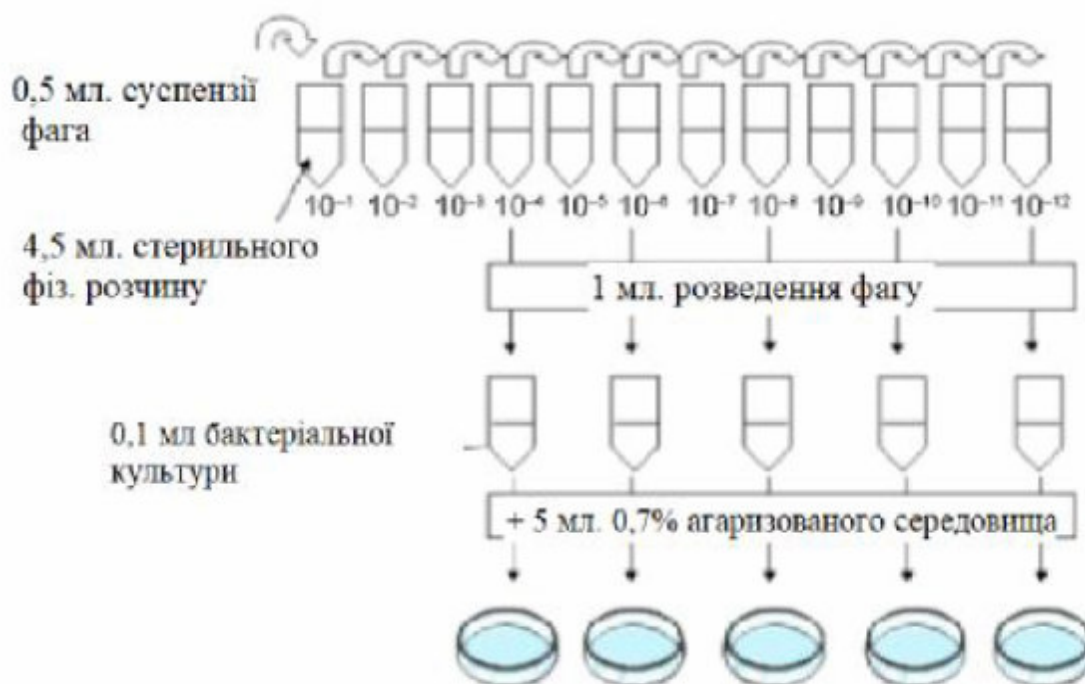


Рис. 4.2. Схема проведення методу подвійних агарових шарів за Грація для визначення титру вірусу

3) Окремо розплавляють та витримують на водяній бані за температури +45°C напіврідкий 0,7%-й МПА, розлитий у пробірки по 2,5 мл.

4) У ряді пробірок готують послідовні десятикратні розведення фага у

стерильному ізотонічному розчині (0,5%-му розчині NaCl.)

5) У пробірки з 0,7%-м МПА, розплавленим на водяній бані та охолодженим до температури 40-45°C, вносять по 0,1 мл розведень титрованого фага та по 0,1 мл гомологічної до фага культури, ретельно перемішують вміст пробірки і виливають на чашки Петрі із шаром агару, рівномірно розподіляючи суміш по його поверхні.

Для достовірності отриманих результатів потрібно засівати не менше двох чашок фагом одного й того ж розведення.

6) Після охолодження середовища чашки інкубують за температури 29°C протягом 18-20 год.

Титр фага визначають шляхом підрахунку кількості негативних колоній на паралельних чашках та перемножують середні значення на показники розведення. Наприклад, якщо на чашці Петрі утворилось 150 бляшкоутворюючих одиниць (БУО) за умов внесення 0,1 мл фагової суспензії із розведення 10^{-7} , то титр фаголізату буде дорівнювати $150 \times 10 \times 10^7 = 1,5 \cdot 10^{10}$ фагових частинок у 1 мл.

Контрольні питання:

1. Надати загальну характеристику фагам і визначити їх роль у сучасній біології.
2. Охарактеризуйте титрування фагів за методом Грація.
3. Чому титрувати фаги потрібно у стерильних умовах?
4. Що таке негативна колонія і яким чином вона утворюється?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 5

МЕТОД ПРИГОТУВАННЯ СТЕРИЛЬНИХ ФАГОЛІЗАТІВ. ФАГОТИПУВАННЯ

Мета: оволодіти методом приготування стерильних препаратів бактеріофагів із застосуванням нітроцелюлозних мембранних фільтрів.

Матеріали та обладнання: суспензія досліджуваного бактеріофагу, бульйонна культура чутливих бактерій, 1,5% і 0,7% м'ясопептонний агар, 96% етиловий спирт, ізотонічний розчин, нітроцелюлозні мембранні фільтри (d пор 0,45мкм), шприци на 10-20мл, центрифужні пробірки, лабораторна центрифуга, спеціальні насадки для встановлення мембранних фільтрів.

У результаті виконання даної лабораторної роботи будуть сформовані наступні **результати навчання:**

- Знати та розуміти особливості вірусів як неклітинної форми життя, їх властивості й застосування.

1.1. ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Можливість приготування високоспецифічних препаратів бактеріофагів по відношенню до патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів представляє великий інтерес для діагностики, терапії та профілактики захворювань інфекційної етіології. У науково-дослідницькій та виробничій практиці одержання високоактивних фаголізатів сприяє вирішенню проблем ідентифікації бактерій, визначення їх видових і штамових відмінностей, створення рекомбінатних молекул нуклеїнових кислот та ін., що необхідно для сучасного розвитку різних галузей науки і народного господарства. Принциповою умовою створення високоякісних препаратів бактеріофагів є отримання чистих культур вірусів бактерій, які відповідають критеріям стерильності, тривалого зберігання і високої активності по відношенню до чутливих бактерій-хазяїв.

1.2 ПОРЯДОК ВИКОНАННЯ РОБОТИ

1. Приготування стерильних препаратів бактеріофагів:

а) Досліджений бактеріофаг розмножують на чутливих бактеріях методом агарових шарів.

б) Стерилізують центрифужні пробірки. Для цього їх витримують у 96% етиловому спирті протягом 30 хвилин та висушують на стерильній підложці або у чашці Петрі.



Рис. 5.1. Фільтрування супернатанту для отримання фаголізату через фільтр

в) У чашки Петрі з розмноженим бактеріофагом наливають по 7-10 мл стерильного ізотонічного розчину (0,5 % NaCl) та стерильним шпателем гомогенізують верхній шар агару для виходу частинок бактеріофага у розчин.

г) За допомогою шпателя гомогенат переносять у стерильні центрифужні пробірки та врівноважують їх. Гомогенат центрифугують на лабораторній центрифугі в режимі 3-5 тис.об/хв. протягом 20 хвилин для відокремлення розчину з вірусними частками від осаду, який містить залишки агару і бактеріальні клітини.

д) У стерильних умовах встановлюють тубуси шприців у насадки з мембранними фільтрами, розташованими на стерильних пробірках або колбах. Повільно продавлюючи поршнем шприца, пропускають супернатант із кожної проби через мембранний фільтр у пробірку. Одержаний стерильний фаголізат (абсолютно прозорий) при необхідності консервують та щільно закривають стерильними гумовими пробками (рис. 5.1).

2. Перевірити титр одержаних фаголізатів методом Грація.

3. Провести фаготипування отриманих зразків вірусів за допомогою діагностичних препаратів.

4. Врахувати результати проведених досліджень та сформулювати висновки.

Контрольні питання:

1. Яких умов необхідно дотримуватись при приготуванні стерильних препаратів із біологічних об'єктів?

2. Чим обумовлена специфічність взаємодії вірусів бактерій з клітинами-хазяїна?

3. Які етапи у технології приготування препаратів бактеріофагів?

4. Які способи зберігання препаратів фаголізатів вам відомі?

5. Що таке метод фаготипування? Для чого його застосовують?

СПИСОК РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Андрійчук О. М. Вірусні інфекції людини та тварин: епідеміологія, патогенез, особливості протівірусного імунітету, терапія та профілактика: навч. посіб. / О. М. Андрійчук, Г. В. Коротєєва, О. В. Молчанець, А. В. Харіна. – К.: Видавничо-поліграфічний центр "Київський університет", 2014. – 415 с.
2. Будзанівська І.Г. Вірусологія: підручник / І.Г. Будзанівська, Т.П. Шевченко, Г.В. Коротєєва та ін. – К.: ВПЦ «Київський університет», 2019. – 351 с.
3. Вірусологія. Навчальний посібник для лабораторних занять / В.П. Поліщук, І.Г. Будзанівська, Т.П. Шевченко, О.М. Андрійчук, Т.А. Компанець, О.А. Кондратюк, Г.В. Коротєєва, О.В. Молчанець, А.В. Харіна, О.В. Шевченко. – К.: ЦП «Компринт», 2017. – 242 с.
4. Люта В. А. Мікробіологія з технікою мікробіологічних досліджень, вірусологія та імунологія. Друге видання / В.А. Люта, О.В. Кононов. – К.: ВСВ «Медицина», 2018. – 576 с
5. Практична мікробіологія: навчальний посібник / С.І. Климнюк, І.О. Ситник, В.П. Широбоков; за заг. ред.: В.П. Широбокова, С.І. Климнюка. – Вінниця : Нова книга, 2018. – 576 с.
6. Шевченко Т.П. Віруси мікроорганізмів. Курс лекцій: Навчальний посібник / Т.П. Шевченко, І.Г. Будзанівська, В.П. Поліщук. – К.: Глобус, 2013. – 150 с.

ЗМІСТ

ЗАГАЛЬНІ ПОЛОЖЕННЯ	3
ЗАГАЛЬНІ ПРИНЦИПИ ОРГАНІЗАЦІЇ ВІРУСОЛОГІЧНОЇ ЛАБОРАТОРІЇ	3
Лабораторна робота № 1. Загальна характеристика методів культивування вірусів. Використання культур клітин у вірусологічних дослідженнях.	6
Лабораторна робота № 2. Культивування вірусів у курячих ембріонах.	13
Лабораторна робота № 3. Визначення таксономічного положення вірусів та їх ідентифікація за допомогою сучасних імунологічних та молекулярно-біологічних методів.	18
Лабораторна робота № 4. Методи визначення концентрації вірусів. Титрування бактеріофагів.	24
Лабораторна робота № 5. Метод приготування стерильних фаголізатів. Фаготипування.	26
СПИСОК РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	29

СІДАШЕНКО Ольга Ігорівна

**МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ ДО ВИКОНАННЯ
ЛАБОРАТОРНИХ РОБІТ
з дисципліни «Мікробіологія та вірусологія»
Частина II «Вірусологія»**

для студентів освітньо-професійної програми «Біологія»
спеціальності 091 Біологія та біохімія
першого (бакалаврського) рівня вищої освіти

Видано в авторській редакції

Національний технічний університет «Дніпровська політехніка»
49005, м. Дніпро, просп. Д. Яворницького, 19