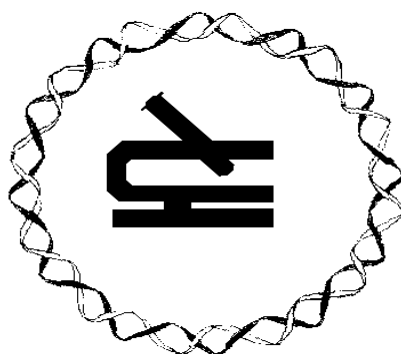


МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ І. І. МЕЧНИКОВА
БІОЛОГІЧНИЙ ФАКУЛЬТЕТ

ЗАГАЛЬНА ВІРУСОЛОГІЯ

***МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ
ДО ПРОВЕДЕННЯ ЛАБОРАТОРНИХ ЗАНЯТЬ З КУРСУ***



ОДЕСА
ОНУ
2018

УДК 578(072)
М545

Рекомендовано до друку Вченою радою біологічного факультету
ОНУ імені І. І. Мечникова.
Протокол № 7 від 19.04.2018 р.

Рецензенти:

С. Л. Міресь, кандидат біологічних наук, доцент кафедри генетики ОНУ імені І. І. Мечникова;

С. Я. Підгорна, кандидат біологічних наук, доцент кафедри зоології ОНУ імені І. І. Мечникова.

Загальна вірусологія : метод. вказівки до проведення лаб.
М545 **занять з курсу / Т. В. Гудзенко, Т. В. Іваниця, М. Б. Галкін,**
Г. І. Жумінська, О. Ю. Зінченко. – Одеса : Одес. нац. ун-т ім.
І. І. Мечникова, 2018. – 74 с.

Методичні вказівки до проведення лабораторних занять присвячені розгляду основних вірусологічних методів. Вони містять детальні плани організації лабораторних занять студентів для ознайомлення їх з основними методами діагностичної вірусології.

Рекомендовано для студентів біологічного факультету, що отримують освітній рівень «бакалавр» за спеціальностями «біологія» та «біотехнологія».

УДК 578(072)

ЗМІСТ

Список скорочень	4
Вступ	5
Правила роботи в начальних вірусологічних лабораторіях	6
Заняття 1. Методи вірусологічних досліджень на тваринах	7
Заняття 2. Культивування вірусів на курячих ембріонах	19
Заняття 3. Титрування вірусу за цитопатичною дією в культурі клітин	24
Заняття 4. Визначення присутності вірусного антигену у досліджуваному матеріалі методом гемадсорбції в культурі клітин	29
Заняття 5. Типування вірусів у реакції нейтралізації і гальмування гемадсорбції в культурі клітин	31
Заняття 6. Титрування вірусу методом бляшкоутворення по Дюльбекко і Фогт у культурі клітин	34
Заняття 7. Вивчення морфологічних ознак вірусної цитопатології в мазках-відбитках, гістологічних зрізах, постійних пофарбованих препаратах вірусінфікованих культур клітин	37
Заняття 8. Виявлення антигенів вірусів і противірусних антитіл методом імуноферментного аналізу (ІФА)	39
Заняття 9. Виявлення вірусних антигенів і антитіл до вірусу методом радіоімунологічного аналізу (RIA)	45
Заняття 10. Виявлення антигенів вірусів методом флюоресцуючих антитіл (МФА)	56
Заняття 11. Бактеріофаги як автономні генетичні елементи бактерій. Лізис як стратегія розвитку бактеріофага T7 <i>Escherichia coli</i> .	65
Список рекомендованої літератури	72

СПИСОК СКОРОЧЕНЬ

АГ	- антиген;
АТ	- антитіло;
Гем.	-гемолітична сироватка (гемолізін);
КАГ	- контроль антигену;
КВ	- контроль вірусу;
КЕ	- контроль еритроцитів;
КС	- контроль сироватки;
Комп.	- комплемент;
РА	- реакція аглютинації;
РГГА	- реакція гальмування гемаглютинації;
РНГА(РПГ)	- реакція непрямой (пасивної) гемаглютинації;
Р-н	- розчин;
Сиров.	- сироватка;
5-АСК	- кислота 5-аміносаліцилова;
С	- концентрація;
Т	- температура

ВСТУП

В даний час вірусологія займає одне з ведучих місць серед медико-біологічних наук.

Основу професійної підготовки кваліфікованих кадрів за фахом “Мікробіологія і вірусологія” в Одеському національному університеті ім.

І.І. Мечникова складають не тільки цикли фундаментальних природничих, але і спеціальних дисциплін, які забезпечують оволодіння студентами методологією дослідницької і практичної діяльності в області вірусології: “Вірусологія”, “Молекулярно-генетичні основи вірусології”, “Санітарна вірусологія”, “Віруси - збудники захворювань”, “Епідеміологія” та інші.

Загальна професійно-функціональна спеціалізація згідно рівня кваліфікації – «спеціаліст» і «магістр» передбачає оволодіння навиками та вміннями лабораторної діагностики вірусних захворювань, санітарно-вірусологічного обстеження навколишнього середовища (води, ґрунту та ін.), практичної діяльності по виконанню комплексу різних науково-дослідних вірусологічних лабораторних досліджень.

Задача практикуму з вірусології - допомогти студентам опанувати традиційні класичні і сучасні вірусологічні методи, відпрацювати методичні навички, поглибити їх та закріпити отримані теоретичні знання.

Мета занять: ознайомити студентів із застосуванням вірусологічних методів для діагностики інфекційних захворювань і санітарно-вірусологічного обстеження навколишнього середовища та навчити постановці реакцій, що мають широке застосування в лабораторній вірусологічній практиці.

Методичні вказівки складені для студентів IV курсу денної форми навчання біологічного факультету, можуть бути використані при виконанні курсових та дипломних робіт.

ПРАВИЛА РОБОТИ В НАВЧАЛЬНИХ ВІРУСОЛОГІЧНИХ ЛАБОРАТОРІЯХ

1. Вхід у вірусологічну лабораторію дозволяється лише особам, які пройшли інструктаж по техніці безпеки.
2. Працювати дозволяється лише в спецодязі.
3. Не дозволяється ходити і розмовляти під час роботи з вірусним матеріалом.
4. Забороняється приносити особисті речі, палити, приймати їжу та зберігати продукти і воду, а також користуватися косметикою.
5. Відбирати інфекційний матеріал слід тільки автоматичними або напіваавтоматичними піпетками.
6. Вміло та обережно користуватися шприцами та голками під час зараження курячих ембріонів та лабораторних тварин.
7. Після закінчення роботи використані предмети (шпателі, піпетки, предметні та покривні скельця) слід помістити у дезінфікуючий розчин на 24 год., потім промити та прокип'ятити.
8. Посуд з використаними живильними середовищами, кров'ю та іншим інфекційним матеріалом зібрати в банки і продезінфікувати автоклавуванням (протягом 30 хв. при 1,5 атм) або обробити дезінфікуючим розчином, прокип'ятити та спалити.
9. Після заняття обов'язково вимити руки чи продезінфікувати їх.
10. Забороняється викидати та виливати відходи у каналізаційну мережу.
11. При аварії під час роботи з вірусним матеріалом обов'язково звернутися до викладача або лаборанта.
12. На робочому місці підтримувати чистоту.
13. Дотримуватися тиші.
14. По закінченню заняття робоче місце привести до порядку,

При виконанні робіт з кожного розділу практикуму студент зобов'язаний:

- працювати відповідний розділ курсу “Загальна вірусологія”;

- виявити максимум самостійності у виконанні експериментальної частини роботи;
- представити викладачеві оформлений звіт (методика експерименту, таблиці, малюнки, схеми, обробка результатів, висновки).

ЗАНЯТТЯ 1. МЕТОДИ ВІРУСОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ НА ТВАРИНАХ

Мета заняття: ознайомити студентів з основними видами лабораторних тварин, які використовуються для проведення експериментів, засобами їх утримання, підготовкою до досліду і експериментального зараження. Методи дослідження на тваринах називають також біологічними методами. Вони незамінні тоді, коли збудник не може бути виділений іншими способами.

Види лабораторних тварин

При виборі лабораторної тварини необхідно враховувати міру її сприйнятливості до інфекції, що вивчається, і встановити, чи не викликає у дослідної тварини цей збудник захворювання в природних умовах. Для вірусологічних досліджень використовують різні види тварин. Найчастіше білих мишей, щурів, морських свинок та кроликів. Для деяких спеціальних досліджень використовують мавп, собак, кішок, коней, баранів та свиней. З птахів частіше використовують курей, голубів, гусей та качок. Для експериментів необхідно відбирати добре розвинених здорових тварин і птахів.

Миші. Для вірусологічних дослідження дуже широко використовують білих комерційних мишей. Їх використовують для виділення і пасування ентеровірусів (Коксакі, ЕКХО, поліомієліту), вірусів грипу, енцефаліту, онковірусів.

Щури - дуже цінні лабораторні тварини, стійкі до інфекційних захворювань. Для вірусологічних досліджень білих щурів використовують частіше, ніж чорних. За допомогою щурів вивчають латентне носійство вірусів, відтворюють вірусні захворювання, наприклад грип, лейкоз та ін.

Морські свинки. Для лабораторних досліджень найбільш цінними є короткошорстні породи морських свинок. Їх використовують для досліджень в області вірусології, мікробіології, імунології, патологічної фізіології і анатомії, хірургії та ін. Вони незамінні при постановці реакції зв'язування комплементу, в якій застосовується їх нативна сироватка (комплемент), що отримується з крові. Еритроцити морських свинок, відмиті у фізіологічному розчині, використовують разом з курячими - для лабораторної діагностики грипу постановкою реакції гемаглютинації. Морських свинок використовують для лабораторної діагностики рикетсіозів, висипного тифу, для експериментальних робіт з вірусом ящура та ін. При нанесенні вірусу ящура на скарифіковану поверхню задніх кінцівок викликають захворювання, яке протікає подібно до природної інфекції ящура парнокопитних тварин з розвитком первинних афт на місці нанесення вірусу. При генералізації інфекції з'являються вторинні афти на незаражених кінцівках і в ротовій порожнині.

Кролики. Кроликів найчастіше застосовують в імунологічних дослідженнях, наприклад, для отримання гемолітичної сироватки, яку використовують при постановці реакції зв'язування комплементу. На них відомий французький вчений Луї Пастер розробив метод вакцинації проти сказу і отримання антирабічної вакцини. Кролики широко використовуються для отримання різних діагностичних сироваток; для створення моделей вірусних і бактерійних захворювань (псевдотуберкульозу, сифілісу, сальмонельозу, карцином тощо). Залежно від цілей досвіду до тварин пред'являються певні вимоги. Наприклад, для контролю віспяної вакцини кролики мають бути хорошої угодованості, вагою не менше 3 кг

Собаки. На собаках відтворюються такі інфекційні захворювання як сказ, кір, коклюш, лептоспіроз та чума собак.

Кішки для вірусологічних досліджень використовуються рідко. Якщо ж використовують, наприклад при енцефаломієліті, то відбирають кішок короткошорстної породи.

Мавпи - дуже цінні лабораторні тварини для вирішення низки теоретичних і практичних запитань вірусології. Використовують наступні види мавп: макака резус, макак яванець, заленая мавпа, павин гамартрома, шимпанзе.

Утримання лабораторних тварин. Для експериментів тварин розводять в спеціальних розплідниках в умовах, наближених до природних, а містять у віваріях. Тварин, що поступають з розплідника, заздалегідь поміщають в карантинне відділення не менше, ніж на 14 днів. У цей період у них проводять мікроскопічні дослідження на виявлення бацилоносійства і гельмінтів. Якщо останні виявлені, проводять дегельмінталізацію. Коли потрібна невелику кількість тварин, їх можна розводити у віварії. У віварії мають бути кімнати для утримання тварин (основне відділення); карантинне відділення, ізолятор, кухня і комори для корму; камера для дезинфекції клітин, інвентаря і спецодягу; місце для розтину тварин і крематорій для спалювання трупів, калу; маніпуляційна для роботи з піддослідними тваринами. Кімнати віварію мають бути сухі, світлі, добре вентилявані (припливно-витяжна вентиляція), температура в них від 12 до 20 °С. Підлогу віварію бетонують або асфальтують під нахилом до каналізації (щоб мити її водою з шланга). Панелі в кімнатах покривають масляною фарбою або облицьовують кахельними плитками. Лабораторних тварин містять в спеціальних клітинах або скляних банках, встановлених на стелажах. Кожен вид лабораторних тварин міститься окремо. Особлива увага звертається на чистоту приміщення, клітин, посуду. Не можна переносити інвентар з одного приміщення в інше і напувалки з однієї клітини в другу. Перед входом у відділення віварію лежать килимки для дезинфекції взуття, змочені дезрозчином (3-5 %-ним розчином фенолу, лізолу або хлораміну). Після прибирання приміщень і кліток і перед роздачею корму тваринам миють руки милом або дезрозчином.

Живлення лабораторних тварин має бути повноцінним. Їжа повинна містити білки, жири, вуглеводи, мінеральні солі і воду. Кількість і характер продуктів залежать від виду тварини і мети досвіду. Необхідно строго дотримуватися режиму харчування тварин. Поганий вміст і неправильне харчування тварин

призводять до зниження їх стійкості до інфекцій, що позначається на результаті досліджу.

Відбір тварин і підготовка їх до досліджу. Кожен вид тварин краще отримувати з одного розплідника. Для досліджу відбирають тварин певної породи, однакової ваги, віку, статі. Перед дослідом кожен тварину зважують і маркують. Для проведення деяких дослідів тварин щодня термометрують, шляхом введення спеціального ртутного термометра в просвіт прямої кишки. Вимір температури проводять впродовж 5 хвилин. Для більшості тварин нормальна температура тіла коливається в межах 37-39 °С. Відібраних тварин розсаджують в чисті клітки. Дрібних тварин, наприклад білих мишей, можна саджати по 5-8 штук.

Маркування тварин. Кожну тварину, узятую в дослід, маркують. Засіб маркування залежить від виду тварини. Найчастіше використовують мічення фарбами на певні ділянки тіла. Найкращою фарбою вважається пікринова кислота (насичений водний розчин), яка утримується на шерсті 2-3 місяці. Для мітки застосовують 0,5 %-ний розчин генціанфіолета, фуксину, еозину і інші фарби. Зручно для забарвлення застосовувати певну схему, що дозволяє однією фарбою помітити 9 тварин, а двома - до ста тварин. Існують і інші методи маркування тварин. Наприклад, нанесення надрізів на вушні раковини за допомогою щипців компостерів; вистригання шерсті; використання металевих бляшок і номерів; мітка описом для тварин, що мають характерне забарвлення шкірних покривів. Відбір вірусемічного матеріалу і підготовка його до зараження. Правильний відбір і обробка матеріалу мають дуже велике значення для успішного виявлення вірусу. Матеріал для дослідження слід збирати якомога раніше: в гострому періоді захворювання. Так, вірус грипу може бути виявлений в змивах із зіву хворих в перші 2-3 дні захворювання, в наступні дні він виділяється дуже рідко. Матеріал слід відбирати асептично, щоб не внести в нього інфекції. При розкритті трупа матеріал береться нестерильний, але надалі його обробка в лабораторії має бути стерильною. Кал, ректальні тампони

обробляються стерильно, щоб уникнути перехресного інфікування матеріалів для аналізів і для захисту персоналу.

Для узяття крові з вени користуються шприцом. Кров, узяту у кількості 2-10 мл, зливають в стерильну ємність з намістинами і дефібрують струшуванням впродовж 15-20 хвилин. Для виділення вірусу можна також використати кров, що згорнулася. Перед введенням тваринам її розтирають в ступці, додаючи фізіологічний розчин в співвідношенні 1: 1 або 1: 2.

Спинномозкову рідину для дослідження отримують за допомогою люмбальної пункції шприцом з голкою.

Змив із зіву і носоглотки можна отримати різними способами. Один з них полягає в наступному. Заздалегідь заготовлюють баночки із стерильним фізіологічним розчином або мясо-пептоним бульйоном з 10% нормальною кінською, баранячою сироваткою, або сироваткою кролика. Хворий повинен не менше однієї хвилини ретельно прополоскати однією з цих рідин рот і носоглотку і сплюнути в ту ж баночку. У важко хворих зів протирають стерильними ватними тампонами з подальшим полосканням в 2-3 мл однієї з вказаних рідин.

Сечу забирають катетером в закритий стерильний посуд. Перед зараженням тварин в сечу додають антибіотики для пригнічення бактерійної мікробіоти (з розрахунку 1000 одиниць пеніциліну і 1000 мг стрептоміцину на 1 мл сечі).

Кал збирають в стерильний посуд і перед дослідженням спеціально обробляють. Готують 10%-ну суспензію на фізіологічному розчині, відстоюють впродовж 1 години при температурі не вище 5 °С або центрифугують впродовж 10 хвилин при 3000 об/хв для звільнення від великих часток. Надосадову рідину піддають антибактеріальній обробці або фільтрацією через бактерійні фільтри, або введенням антибіотиків і використовують для дослідження.

Органний або тканинний секційний вірусомісний матеріал перед введенням тварині також піддається спеціальній обробці для очищення його від грубих часток. Шматочки мозку і органів попередньо подрібнюються в гомогенізаторах, у банках з намістами, в ступках (фарфорових, скляних). З

розтертих органів готують 10%-ну суспензію на фізіологічному розчині з додаванням нормальної сироватки до 10% або без неї, на бульйоні або буферному розчині. Приготовану суспензію тканини центрифугують 10-15 хвилин при 3,5 тис об/мхв, і надосадову рідину використовують для зараження тварин. При внутрішньовенному введенні вірусовмісний матеріал зазвичай розводять ще в 10 разів, оскільки наявність більшої кількості корпускулярних часток може викликати емболію кровоносних судин і загибель тварини. При бактерійному забрудненні матеріал фільтрують через фільтри або обробляють антибіотиками. Відібраний матеріал рекомендується негайно використати для виділення вірусу. Якщо це зробити неможливо секційний матеріал консервують або охолодженням або гліцерином (50%-ний гліцерин на буферному розчині кухарської солі з рН 7,4-7,6).

Вірус в початковому матеріалі часто міститься в невеликих кількостях, тому бажано його концентрувати. Проте це складний процес і його легко виконати тільки відносно деяких вірусів. Так, для концентрації вірусу грипу змиви носоглотки хворого фільтрують через вату і змішують з рівною кількістю 20%-ної суспензії еритроцитів курей або морських свинок. Суміш 20 хвилин витримують при температурі 4 °С, потім еритроцити осаджують центрифугуванням при 2,5 тис. об/хв впродовж 10 хвилин. До осаду еритроцитів з адсорбованим вірусом додають фізіологічний розчин у кількості однієї десятої об'єму і антибіотики. Таким чином, отримують концентрацію вірусу що в 10 разів перевищує початкову, цей матеріал використовують для зараження.

Методи експериментального зараження тварин. Для виділення вірусів на чутливих до них тваринах вибирають найбільш ефективний метод зараження, враховуючи при цьому вибірковість вірусу до певної тканини. Так, для виділення нейротропних вірусів матеріал вводять в мозок; для виділення респіраторних - в носову порожнину, трахею; при дослідженні екзантематичних - на шкіру або підшкірно і так тощо.

Перед дослідом тварину треба вийняти з клітки. Щоб тварина не укусила і не подряпала експериментатора, існують різні прийоми: мишей і щурів беруть за кінець хвоста, кроликів - за обидва вуха, морських свинок - за шкіру спини.

Потім тварину фіксують, тобто обмежують її рухливість і створюють найбільш зручне положення для проведення маніпуляції.

Для фіксації (імобілізації) тварин існують різні пристосування: ящики-бокси, пластинки, верстати і т.д. Застосовують і простіші методи імобілізації: тварину можна щільно сповити в рушник або халат, або тримати в положенні, що обмежує рухи. Вид використовуваної фіксації залежить від характеру маніпуляції.

Шприци, голки, пінцети, скальпелі, призначені для зараження тварин, стерилізують кип'ятінням впродовж 20-30 хвилин. При зараженні тварин необхідно суворо дотримуватися усіх правил роботи із заразним матеріалом.

При виділенні вірусу рекомендується відразу заражати декілька видів тварин різними способами, але з урахуванням виборчої локалізації вірусу в тій або іншій тканині. При первинному зараженні тварини можуть не захворіти, тому через 5-7 днів здорових тварин забивають, і їх органи є матеріалом для зараження наступних партій тварин. Ці подальші зараження називають пасажами. Зазвичай проводять три безсимптомних, так званих "німих", пасажу. Від кожного пасажу беруть матеріал для гістологічного дослідження, враховуючи можливість безсимптомної інфекції у тварин. Результати виділення вірусу вважають позитивними, коли після відповідного інкубаційного періоду розвиваються характерні симптоми хвороби і коли це захворювання можна відтворити на тваринах повторно.

Існують різні способи зараження лабораторних тварин.

Підшкірний спосіб зараження. Місце введення матеріалу вибирають залежно від виду тварини. Перед зараженням на шкіру, під шкіру і в шкіру, в місці введення матеріалу її звільняють від шерсті, вистригаючи ножицями, вищипуючи або обробляючи хімічними сполуками, наприклад сумішшю з 35 частин *Natrium sulfuratum* з 65 частинами дистильованої води. Суміш

розмішують паличною і накладають на ділянку шкіри, через 3-5 хвилин її змивають, і волосся легко віддаляється; шкіру дезинфікують розчином йоду, спиртом або ефіром. Зараження під шкіру може проводити один дослідник. При цьому місцем введення матеріалу є шкіра спини у потилиці. Тварину фіксують, захоплюючи четвертим і п'ятим пальцем лівої руки хвіст, середнім злегка притискають до столу, великим за допомогою другого відтягують складку шкіри на шиї, а правою рукою за допомогою шприца вводять матеріал: мишам - не більше 1 мл, щурам - до 10 мл.

Кроликам підшкірне введення краще робити у бічну поверхню або в ділянку спини. Шкіру тварини захоплюють в складку, голку уколюють біля основи складки, що утворилася, повільно вводять її до половини, трохи відхиляючи убік, щоб не вилився матеріал, що вводився, потім відпускають складку, накладають на голку вату, змочену спиртом або йодом, і швидко витягають голку. Об'єм матеріалу, що вводиться, до 30 мл внутрішньошкірний спосіб зараження. Місце для введення готують також, як і при підшкірному введенні. Для внутрішньошкірного введення потрібні дуже тонкі голки. Голку зрізом вгору вводять в товщу шкіри майже паралельно її поверхні так, щоб вона просвічувала крізь епідерміс. Об'єм матеріалу, що вводиться, 0,1-0,2 мл. Досліджуваний матеріал вводять повільно, на місці введення утворюється бульбашка, що називається "лимонна кірка", яка швидко розсмоктується.

Зараження скарифіковану шкіру. Цей метод широко використовується при роботі з вірусами віспяної групи, при виготовленні за допомогою тварин (великої рогатої худоби) противіспяної вакцини. Поверхню шкіри після видалення шерсті скарифікують. Скарифікацією називають ушкодження поверхні шкіри, яке роблять будь-яким загостреним інструментом скальпелем, голкою або спеціальним скарифікатором. Досліджуваний матеріал наносять на ділянку, яка скарифікована, і втирають шпателем або стерильною паличкою. Тварина має бути фіксована до тих пір, поки нанесений матеріал не підсохне.

Внутрішньом'язове (інтрамускулярне) зараження. Тваринам при цьому способі матеріал зазвичай вводять в м'язи стегна, птахам - в грудний м'яз. Місце

введення обробляють як і при підшкірному введенні. Об'єм матеріалу, що вводиться, для мишей- 0,25-0,5 мл; для щурів - 0,5-1,0 мл (інколи до 3-5 мл); для морських свинок 2-3 мл; для кроликів - 5-8 мл.

Внутрішньоочеревне (інтраперитональне) зараження. При цьому методі введення тварину тримають або підвішують вниз головою, щоб внутрішні органи і кишечник змістилися до діафрагми. Місце уколу вибирають в задній третині живота вище за симфіз, дещо відступивши від серединної лінії. Місце ін'єкції обробляють як і при вищезгаданих введеннях. У місці уколу стінку живота захоплюють великим і вказівним пальцями в складках, біля основи якої водять голку. Для попередження поранення кишечника і внутрішніх органів кінець голки має бути тупим (сточеним) або застосовують голки з короткою борідкою. Спочатку проколюють шкіру і м'язи живота, а потім, натискаючи на голку шприца, очеревину. При цьому чутний характерний потріскуючий звук, і опір очеревини зникає. Мишам вводять не більше 2 мл матеріалу, щурам та морським свинкам - до 5 мл, кроликам - до 30 мл. Після видалення шприца шкіра зміщується на колишнє місце, закриваючи отвір в черевну порожнину. Після введення матеріалу при будь-якому способі рекомендується повторно дезинфікувати місце уколу. Внутрішньовенне (інтравенозне) зараження. При цьому методі вибір вени залежить від виду тварини : кроликам матеріал вводять в крайову вену вуха, мишам і щурам - у вену хвоста, морським свинкам - безпосередньо в серце, оскільки їх вени малодоступні для ін'єкцій. Для внутрішньовенних ін'єкцій використовують голки з довгою борідкою. Тварини мають бути іммобілізовані. Після фіксації тварини для кращого виявлення вени шкіру протирають ватою, змоченою ксилолом або теплою водою. Можна також поклацувати ділянку шкіри, де розташована вена, кінчиками пальців і притиснути вену біля кореня хвоста або вуха - ці маніпуляції сприяють набряканню вени. Для розширення вен хвоста також можна його заздалегідь витримати декілька хвилин в теплій воді (50-55 °C). Потім експериментатор лівою рукою фіксує місце введення, шприцом, що знаходиться в правій руці проколює шкіру і під дуже гострим кутом, майже паралельно вені, вводять

голку зрізом вгору. Якщо голка не потрапила у вену, то при натисканні поршня відчувається утруднення і в місці введення з'являється біла бульбашка, утворена рідиною, що потрапила в тканину. В цьому випадку голку витягають і роблять новий укол. При попаданні голки у вену рідина вільно проходить в посудину. Після того, як матеріал введений вену притискують трохи нижче місця уколу, накладають шматочок стерильної вати на кінчик голки, що знаходиться ще у віні, після чого голку витягають. Місце ін'єкції протирають спиртом або йодом.

При ін'єкціях рідина, що вводиться, має бути вільна від бульбашок повітря, які можуть викликати газову емболію. Мишам і щурам матеріал найчастіше вводять у бічну вену хвоста у кількості 0,04 - 1 мл і 6 мл відповідно. Морським свинкам матеріал вводять в серце, кроликам - у вушну вену, що проходить по тонкому краю вуха на зовнішній поверхні.

Введення досліджуваного матеріалу через травний тракт (оральне зараження, пероральне зараження або зараження per os). При цьому способі зараження тварині за добу до введення не дають їжі. Існує декілька способів перорального зараження. Найпростіший, коли досліджуваний матеріал домішують до їжі тварини. Цей спосіб хороший тим, що близький до природного, проте в таких випадках важко врахувати кількість матеріалу, що вводиться. Другий спосіб - введення матеріалу в шлунок за допомогою зонду, діаметр якого залежить від виду тварини. Заздалегідь зонд змащують вазеліном. Коли введений зонд досягає носоглотки, в рот виливають декілька крапель води і у момент ковтання просувають зонд. Правильно вставлений зонд повинен рухатися легко і вільно. Після того, як трубка досягла шлунку, через зовнішній її кінець шприцом без голки вводять потрібну кількість досліджуваного матеріалу. Орально мишам вводять до 1 мл матеріалу.

Зараження через дихальні шляхи (інтраназальне зараження або зараження через ніс). Проводять також двома різними способами. Найпростішим є закапування досліджуваного матеріалу через ніс шприцом (щоб не поранити слизову оболонку, користуються тупою голкою). Зараження

здійснюють під легким ефірним наркозом; до носа прикладають вату, змочену ефіром, під дією якого тварина починає глибоко дихати, втягуючи матеріал, що при цьому вводиться.

Другий спосіб - закапування досліджуваного матеріалу в ніздрі піпеткою (по краплях); при цьому способі тварину фіксують в горизонтальному положенні черевцем вгору. Матеріал слід використати в слабких концентраціях, щоб не викликати токсичних явищ у тварини. При цьому способі зараження мишам вводять 0,03-0,05 мл, щурам - 0,05-0,1 мл, морським свинкам і кроликам - до 2 мл.

Існують і інші способи зараження тварин, наприклад, зараження в передню камеру ока, зараження на скарифікує рогівка око, зараження в мозок (інтрацеребральне), зараження в нерв та ін.

Умертвіння тварин. Тварин вбивають хлороформом або ефіром, поміщаючи їх в невеликий закритий посуд, а потім спалюють в крематорії.

Титрування вірусів на тваринах. Для виділення вірусів на сприйнятливих тваринах або курячих ембріонах часто одного зараження буває недостатньо. Тоді проводять повторні зараження (пасажі) тварин (курячих ембріонів), використовуючи для цього матеріал від первинно заражених тварин. Під час пасування кількість вірусу і його патогенність для цього виду тварин збільшується, хоча це збільшення має свою межу. Тому необхідно час від часу визначати кількість вірусу - його титр.

Титром вірусу називається найменша його доза, яка викликає захворювання або загибель тварини (курячого ембріона) або руйнування (цитопатична дія) клітин культури тканин. Титр сильно варіює залежно від індивідуальної чутливості тварини, її віку і так далі і його практично важко визначити. Тому за титр вірусу приймають ту його кількість, яка викликає загибель 50% піддослідних тварин і називають летальною дозою, - LD50 . Для титрування вірусовмісний матеріал розводять з постійним коефіцієнтом розведення, частіше 10, наприклад від 10^{-1} до 10^{-10} . У стерильні пробірки розливають фізіологічний розчин або бульйон по 9 мл 3 початкової суспензії стерильною

піпеткою забирають 1 мл і вносять в першу пробірку (10^{-1}). Піпеткою не можна торкатися рідини, щоб не змінити істинного розведення вірусу. Іншою піпеткою змішують рідину і 1 мл вмісту першої пробірки (10^{-1}) переносять в другу (10^{-2}) і так далі до останньої пробірки (10^{-10}). Кожним розведенням вірусу заражають групу тварин (не менше 44) в дозах, загальноприйнятих для цього способу введення. Шлях введення вірусу вибирають з урахуванням вибіркової до цієї або іншої тканини. Так, при титруванні вірусу грипу тварин заражають інтраназально; при титруванні нейротропних вірусів - в мозок; дермотропних - в шкіру тощо.

Заняття проводиться в віварії ОНУ імені І.І. Мечникова з використанням лабораторних щурів.

Контрольні запитання

1. З якими цілями використовують лабораторних тварин у вірусологічних дослідженнях ?
2. Які недоліки застосування лабораторних тварин у порівнянні з іншими модельними об'єктами вам відомі ?
3. Чому у конкретному вірусологічному експерименті використовується не одна

Лабораторна тварина, а не менше трьох ?

4. Що таке модельні об'єкти?
5. Які модельні об'єкти ви можете назвати?
6. Чим індикація вірусу у патологічному матеріалі відрізняється від ідентифікації збудника
7. Для чого здійснюється титрування вірусного матеріалу ?
8. Чим пояснюється різноманіття видів лабораторних тварин?
9. Яким вимогам повинні відповідати тварини, яких відбирають для вірусологічних досліджень?
10. Дати характеристику умовам утримання лабораторних тварин.
11. Охарактеризувати карантин, його суть, причини, заходи реалізації?

12. Охарактеризуйте етапи роботи з тваринами при проведенні вірусологічного експерименту
13. Які прийоми маркування лабораторних тварин знайшли використання у вірусологічних дослідженнях ?
14. Що таке тропізм вірусу?
15. Які методи експериментального зараження лабораторних тварин вам відомі?
16. Які ознаки розмноження вірусу в організмі заражених лабораторних тварин.

ЗАНЯТТЯ 2. КУЛЬТИВУВАННЯ ВІРУСІВ НА КУРЯЧИХ ЕМБРІОНАХ

Мета роботи. Ознайомитися з будовою курячого ембріона, провести зараження курячого ембріона вірусом грипу; визначити титр і тип вірусу грипу.

Уперше культивування вірусу на курячих ембріонах здійснив Раус в 1911 році, за що в 1966 р. став лауреатом Нобелівської премії. У його честь вірус згодом був названий вірус саркоми Рауса. Широкий розвиток метод культивування вірусів на курячих ембріонах, що розвиваються, отримав після того, як Вудруфф і Гудпасчур в 1931 р. описали зараження хоріоналантоїсної оболонки курячого ембріона вірусом курячої віспи. Культивування вірусів на курячих ембріонах має ряд переваг в порівнянні з культивуванням на лабораторних тваринах. По-перше, простота і дешевизна. По-друге, ембріон - закрита система, у зв'язку з чим віруси не потрапляють в довкілля. У третіх - курячі ембріони чутливі до великого числа вірусів. Ембріони використовують:

- для культивування вірусів;
- титрування вірусів;
- отримання великої кількості сироваток.

Короткі дані по анатомії і фізіології курячого ембріона. Куряче яйце поміщене в шкаралупу, через пори якої здійснюється газообмін. Під шкаралупою лежить перепончста оболонка (підшкарлупна). Власне яйце - це жовток, покритий двома ніжними яєчними оболонками, через які під час

запліднення проникають сперматозоїди. У заплідненому яйці поділ починається ще під час проходження його по яйцепроводу. До моменту відкладення яйця утворюється зародковий диск у вигляді багатоклітинної пластинки, розпластаній на жовтку. В результаті поділу при переміщенні яйця в сприйнятливій температурній умові утворюється три зародкові шари: ектодерма, мезодерма і ентодерма, з яких розвиваються тканини і органи курячого ембріона. Одночасно з розвитком тіла ембріона розвиваються і екстраембріональні оболонки з ектодерми: амніон і хоріон (або серозна оболонка). Амніон знаходиться у безпосередній близькості до зародка і є мішком, наповненим рідиною, в якій знаходиться тіло ембріона.

Амніотична оболонка є самою внутрішньою первинною оболонкою. Внутрішній її шар складається з епітеліальних клітин ектодермального походження, зовнішній - з мезодерми. Амніотична рідина на початку розвитку ембріона представляє фізіологічний розчин солей. Який згодом збагачується білком, і після 12 днів розвитку ембріона білок проникає в порожнину амніона. Кількість амніотичної рідини до 10-11 дня розвитку ембріона складає в середньому 1 мл.

Хоріон (серозна оболонка) прилягає до підшкарлупної оболонки. Через її пори і пори шкаралупи здійснюється газообмін. Зовнішній шар хоріону складається з одношарового ектодермального епітелію, під ним знаходиться мезодермальна тканина.

У ранній стадії розвитку ембріона з його задньої стінки кишки виділяється вирощування - алантоїс, що є порожнинним органом (мішок). Його зовнішній шар складається з мезодермальної тканини, а внутрішній - з кишкової ентодерми. При виході з тіла ембріона алантоїс вростає в екстраембріональну порожнину (екзоцелом), проходить між амніоном і хоріоном і оточує зародок разом з жовтком, утворюючи вторинну зародкову оболонку. Алантоїс розвивається дуже швидко. Його максимальне зростання відбувається з 4-го по 13-й день розвитку ембріона. За цей час алантоїс з дивертикла кишки перетворюється на добре розвинену оболонку, що поширюється по усій

поверхні шкаралупи. Алантоїсна оболонка з одного боку зростається з мезодермальною поверхнею амніотичного і жовткового мішків, а з іншої - зовнішньою стінкою (мезодермою) зрощується з мезодермою хоріону. Ця зрощена частина алантоїсної оболонки і хоріону називається хоріоналантоїсною оболонкою. Вона складається з трьох шарів: внутрішнього, оберненого в алантоїсну порожнину і такого, що складається з шару епітеліальних кубічних клітин ентодерми; середнього - з мезодермальної тканини хоріону і алантоїса, в якому розвивається густа мережа кровоносних і лімфатичних судин; зовнішнього - покритого щонайтоншим шаром плоских клітин ектодермального епітелію. Місцями капіляри мезодермального шару хоріоналантоїсної оболонки безпосередньо прилягають до подшкорлупної оболонки.

Хоріоналантоїсна оболонка є органом дихання ембріона.

Кисневий обмін здійснюється в кровоносних судинах оболонки через пори шкаралупи. У останні дні розвитку ембріона хоріоналантоїсна оболонка атрофується, повітря виходить через пори шкаралупи, і курча починається дихати легеньми за 1-2 дні до виходу зі шкаралупи.

Алантоїсний мішок є видільним органом ембріона. На початку розвитку ембріона він наповнений прозорою рідиною, що є фізіологічним розчином солей. Надалі алантоїсна рідина збагачується уратами і речовинами, що містять фосфор і азот. З 12-13-го дня розвитку ембріона рідина стає каламутною, а при охолодженні з неї випадає осад, що складається головним чином з солей сечової кислоти. Кількість алантоїсної рідини досягає 6-7 мл на 11-13-й день розвитку ембріона, потім поступово зменшується і до моменту вилуплення курчати її зовсім не залишається в яйці. Реакція алантоїсної рідини в період з 7 по 12-й день розвитку ембріона злегка лужна, пізніше зі зменшенням її кількості і накопичення уратів переходить в кислу (до рН 6,0). Істотну роль для культивування вірусів і деяких бактерій (рикетсій) грає жовткова оболонка, що оточує жовток. Жовтковий мішок утворюється з ентодерми з мезодермальним зовнішнім шаром. Він з'єднується з тілом зародка вузьким жовтковим стеблом

(пупковим канатиком), усередині якого проходить ентодермальний канал, що сполучає жовткову ентодерму з кишковою ентодермою ембріона. В період розвитку ембріона жовток з поверхні поступово резорбується діяльністю жовткової ентодерми. Продукти асиміляції поступають в кров жовткових посудин, а по них - в тіло ембріона. В результаті резорбції жовток зменшується в об'ємі, жовтковий мішок стискається, що оточує його, утворюючи ентодерму (ворсинки), що входить в глиб жовтка складки, через яку всмоктуються центральні частини жовтка. До закінчення розвитку ембріона жовткова оболонка стає крихкою і атрофується, а жовток перетворюється на маленьку кульку, яка втягується всередину тіла ембріона, будучи запасом поживних речовин в перші дні життя курчати.

Ембріональна тканина з великою кількістю клітин, що розмножуються, швидко діляться, з високим обміном речовин є сприятливим середовищем для культивування багатьох вірусів. Особливо це відноситься до оболонок ембріона, багатих тканинами зародкового епітелію.

Методи зараження курячих ембріонів. При виділенні вірусів на курячих ембріонах вірусовмісний матеріал обробляють так само як і при культивуванні на тваринах. Залежно від способу зараження, чутливості тканин ембріона до того або іншого вірусу використовують ембріони різного віку. Наприклад, для культивування вірусів віспи – 11 - 14-добові. Для вірусів грипу – 10 - 11 добові, для вірусів енцефаліту – 7 - 8 добові і так далі. Після зараження ембріони знову інкубують і впродовж різного терміну (від декількох годин до декількох днів залежно від швидкості розвитку вірусу в тканинах ембріона). Так, адаптований до ембріона вірус грипу розмножується 48 - 72 години, а неадаптований може досягти оптимального розвитку і в пізніші терміни. Вірус осповакцини викликає специфічні поразки на хоріонантоїсній оболонці курячого ембріона на 3 - 4 доби після зараження.

Зараження на поверхню хоріонантоїсної оболонки. Цей метод застосовується в тих випадках, коли вірус добре розмножується в клітинах ектодермального епітелію, що покриває оболонку зовні. Для зараження на

хоріоналантаїсну оболонку користуються 11 - 14 добовими ембріонами (у цей період інкубації оболонка максимально розвинена). При цьому розмноження ряду вірусів (віспа, осповакцини) супроводжується утворенням видимих осередків ураження. Техніка зараження ембріона на поверхню хоріоналантаїсної оболонки полягає в наступному. Перед зараженням визначають (просвічуванням в овоскопі в темній кімнаті) положення ембріона і межі поширення хоріоналантаїсної оболонки (по розгалуженню судин), щоб не пошкодити судини при зараженні через отвори в шкаралупі. Зараження на поверхню хоріоналантаїсної оболонки проводять відкритим і закритим способом.

Закритий спосіб. Стерильним списом роблять прокол шкаралупи між кровоносними судинами на бічній поверхні і в отвір вносять матеріал із шприца (1-2 краплі). Отвори закривають стерильним парафіном, розплавленим над вогнем. І ембріони у бічному положенні поміщають в термостат для подальшої інкубації.

Відкритий спосіб. При відкритому способі шкаралупу над мішком обробляють спиртом і розчином йоду, за допомогою гострих ножиць зрізають шкаралупу, знімають верхній листок оболонки повітряного мішка і проводять зараження. Отвір закривають спеціальною скляною кришкою або шкаралупою і герметизують стерильним розтопленням парафіном.

Ознаки розмноження вірусу в курячому ембріоні.

Показником ураження ембріона вірусом є його загибель у характерні для даного вірусу строки. Друга ознака розмноження вірусу – патологоанатомічні зміни, що з'являються у різних структурах ембріону. Наприклад, ХАО може мати набряк, крововиливи, вузли. Такі зміни спостерігаються при ураженні курячих ембріонів вірусами віспи птахів, інфекційного ларинготрахеїту птахів, хвороби Ауески та іншими. Сам зародок при цьому може відставати у рості і розвитку, тобто з'являється феномен карликовості. Внутрішні органи також можуть мати ознаки розмноження вірусу. Наприклад, набрякла жовто-

зеленогоаботемно-зеленогокольору печінка курячого ембріону є ознакою розмноження в ньому вірусу гепатиту гусей.

Зустрічаються такі віруси (наприклад, штам В1 вірусу н'юкаслської хвороби), які, розмножуючись у курячих ембріонах, не викликають ні їх загибелі, ні патологоанатомічних змін. Виявити такий вірус можливо за рахунок реакції гемаглютинації або імуноферментного аналізу.

Інколи при розтині ембріону не вдається виявити ознаки розмноження вірусу, хоча він і знаходиться у досліджуваному матеріалі. Такий пасаж називають "сліпим".

Контрольні запитання

1. Використання курячих ембріонів у вірусології. Мета використання.
2. Опишіть особливості анатомії та фізіології курячого ембріону.
3. Назвіть методи зараження курячих ембріонів. Від чого залежить 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 ?
6. Які ви знаєте типи патологічних змін в органах і тканинах курячих ембріонів при вірусних інфекціях? Наведіть приклади вірусів.

ЗАНЯТТЯ 3. ТИТРУВАННЯ ВІРУСУ ЗА ЦИТОПАТИЧНОЮ ДІЄЮ В КУЛЬТУРІ КЛІТИН

Мета заняття: Ознайомитися з принципом методу титрування вірусу за цитопатичною дією в культурі клітин. Визначити тканеву цитопатичну дозу (ТЦД₅₀) вірусів грипу.

Принцип методу. Методи титрування вірусів на культурі клітин є незамінними при роботі як з вірусами, непатогенними для лабораторних тварин, так і з вірусами, патогенними для тварин і клітинних культур.

Важливою для деяких вірусів є можливість індикації на клітинних культурах у ранній термін, що скорочує термін проведення досліджень.

Титрування виділених вірусів проводиться з ціллю кількісного визначення вірусних часток в одиниці об'єму досліджуваного матеріалу.

Титрування є обов'язковим етапом як для виділення вірусів із клінічного матеріалу, так і для їх наступного типування і вивчення біологічних властивостей збудника.

Існують різні методи титрування вірусів з використанням клітинних культур:

- титрування по ЦПД;
- титрування методом кольорової проби;
- титрування методом бляшок по Дюльбекко і Фогту;
- титрування методом нейтралізації.

Цитопатична дія виявлена у багатьох вірусів. Причому виявилось, що ступінь розмноження вірусу і характер ушкодження клітин обумовлені декількома факторами, найважливішими з яких є:

- властивості вірусу;
- властивості клітин;
- доза вірусу;
- умови культивування.

Властивості вірусу – різні штами одного вірусу, в залежності від вірулентності й адаптації до культури клітин виявляють індивідуальну інтенсивність розмноження і ЦПД. Особливо чітко це виявляється у респіраторних і кишкових вірусів.

Властивості клітин – по ходу реакцій клітин на вплив вірусу тканеві культури поділяють на три групи:

- 1 – проявляючі виразну дегенерацію, що супроводжується розмноженням вірусу;
- 2 – культури, що не показують видимих морфологічних змін, незважаючи на розмноження вірусу;
- 3 – культури зовсім нечутливі до впливу даного вірусу.

Доза вірусу – відіграє вирішальну роль у швидкості настання дегенеративних змін і, у меншому ступені, впливає на інтенсивність розмноження вірусів.

Великі дози викликають швидку загибель клітин, що не дозволяє виявити морфологічні зміни, які відбуваються в клітинах під впливом вірусу.

Умови культивування. При використанні кожного з методів титрування необхідно дотримуватися наступних умов:

- 1 – застосовувати тканеві культури, з відомим ступенем чутливості до даного вірусу, при відсутності в них ознак неспецифічної дегенерації;
- 2 – проводити попереднє очищення вірусвміщуючого матеріалу від клітинного детриту шляхом триразового заморожування і відтавання з наступним низькошвидкісним центрифугуванням;
- 3 – перебачати відсутність у живильних середовищах речовин, що придушують ріст клітин та репродукцію вірусів;
- 4 – суворо дотримуватися всіх умов досліду. Особливу увагу варто приділяти точності дозування всіх інгредієнтів реакції;
- 5 – випробувати кожне розведення матеріалу не менш ніж у трьох культурах;
- 6 – важливою умовою правильної оцінки результатів титрування є наявність усіх необхідних контролів.

Метод титрування вірусів по ЦПД заснований на визначенні того найбільшого розведення вірусвміщуючого матеріалу, у якому вірус здатний викликати ЦПД у 50% інфікованих культур клітин. Ця величина називається 50%-ною тканиною цитопатичною дозою (ТЦД₅₀).

Її підраховують за методом Ріда і Менча, заснованому на тій логічній передумові, що культура клітин уражена і при інфікуванні кожним більш низьким розведенням.

Практичне завдання. Провести титрування вірусу грипу на культурі клітин HeLa за ЦПД.

Методика постановки титрування вірусу грипу по ЦПД

1 – посів, вирощування і добір клітинних культур з сформованим моношаром. Відбирають клітинні культури, переглядаючи флакони під малим збільшенням (10*10) мікроскопу.

2 – приготування 10-кратних розведень вірусвміщуючого матеріалу (табл. 1): у ряд пробірок вносять по 1,8 мл розчину Хенкса. Потім стерильною кінцевою піпеткою вносять у 1 пробірку 0,2 мл вірусвміщуючого матеріалу (розведення 1:10) і так далі до розведення 1:10 000.

Таблиця 1

Схема титрування вірусів за цитопатичною дією

Компоненти	Розведення вірусу				Конт- роль
	1:10	1:100	1:1000	1:10000	
Розчин Хенкса	1,8	пробірки 1,8	1,8	1,8	-
Вірусвміщуючий матеріал	→ 0,2	→ 0,2	→ 0,2	→ 0,2	-
Вірусвміщуючий матеріал	0,1	флакони 0,1	0,1	0,1	-
Підтримуюче середовище	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9

3 – інфікування клітинної культури вірусом (табл. 1): перед інфікуванням з флаконів з культурами клітин відбирають ростове середовище і вносять по 0,1 мл вірусу. На одне розведення вірусу використовують 3 – 5 флаконів з культурою клітин. Потім у кожен флакон додають по 0,9 мл підтримуючого середовища (середовище 199). У контрольні флакони вірус не вносять, а змінюють тільки середовище росту на підтримуюче.

4 – інкубація культур клітин у термостаті при температурі 37°C до 7 діб.

5 – облік і статистична обробка результатів.

Цитологічне дослідження нативних препаратів культур клітин, вирощених на внутрішній поверхні флакону здійснюють під малим збільшенням мікроскопу (10*10).

Результати ЦПД оцінюють за системою чотирьох балів:
дегенерація на 75 – 100% оцінюється як реакція на «++++»;
від 50 до 75% - “+++”;
від 25 до 50% - “++”;
менш ніж 25% (зміна морфології окремих клітин) – “+”;
нормальний клітинний моношар оцінюється як “–”.

Матеріали і устаткування.

- 1.Флакони з добовою культурою клітин HeLa
- 2.Середовище 199
- 3.Вірусвміщуючий матеріал
4. Стерильні пробірки
5. Стерильні піпетки V = 1 мл
- 6.Розчин Хенкса
7. Фізіологічний розчин (0,85% р-н NaCl)
8. Пробки гумові стерильні різного діаметру
9. Лотки
10. Спиртівки
11. Мікроскопи
12. Містки
13. Олівці по склу
14. Термостат.

Контрольні запитання

1. Для чого використовують клітинні культури у вірусології?
2. Назвіть типи клітинних культур.
3. Охарактеризуйте кожен із них.

4. Які розчини і поживні середовища використовують для культивування клітин?
5. Який компонент додають у сольові розчини як індикатор зміни їх рН?
6. Які основні методи виявлення та індикації вірусів у культурі клітин ви знаєте?
7. Які причини виникнення ЦПД?
8. Класифікація ЦПД.
9. Що таке внутрішньоклітинні включення?
10. Які способи визначення титру вірусу ви знаєте?

ЗАНЯТТЯ 4. ВИЗНАЧЕННЯ ПРИСУТНОСТІ ВІРУСНОГО АНТИГЕНУ У ДОСЛІДЖУВАНОМУ МАТЕРІАЛІ МЕТОДОМ ГЕМАДСОРБЦІЇ В КУЛЬТУРІ КЛІТИН

Мета заняття: Ознайомитися з принципом, деякими характеристиками й областю застосування реакції гемадсорбції; опанувати методику постановки реакції в культурі клітин.

У 1957 році Фогель і Шелоков встановили, що еритроцити курей і морських свинок адсорбуються на клітинах нирок мавп, заражених вірусом грипу. При цьому дегенеративні зміни виявляються при малому збільшенні мікроскопа. Надалі було встановлено, що це явище можна спостерігати і з іншими вірусами, що володіють гемаглютинуючими властивостями.

Для постановки реакції гемадсорбції можна використовувати еритроцити різних видів тварин: мавп, барана, курей, морських свинок, а також людини 0-групи.

Особливо широко реакція гемадсорбції застосовується при вивченні респіраторних вірусів, зокрема, парагрипозних. Реакцію гемадсорбції можна використовувати для виявлення, титрування і типування вірусів, а також для виявлення антитіл.

Через те, що реакція спостерігається до появи дегенеративних змін у клітинах, її можна застосовувати для раннього виявлення вірусу в зараженій культурі.

Принцип методу: Феномен гемадсорбції полягає в здатності вірусів, що володіють гемаглютинуючими властивостями, адсорбуватися на поверхні еритроцитів, утворювати при цьому скупчення різного характеру: грона, розетки, ланцюги, стрічки і т.д.

Реакція гемадсорбції протікає в два етапи:

1. Зараження культури клітин вірусом (за схемою ЦПД);
2. Безпосередньо реакція гемадсорбції.

Умови проведення реакції

1. Культура клітин повинна бути чутлива до обраного вірусу;
2. Вірус повинен володіти гемаглютинуючими властивостями;
3. Для зараження культури клітин використовуються флакони з добре сформованим моношаром.

Практичне завдання: провести титрування вірусу грипу в реакції гемадсорбції.

1. Заразити культуру клітин вірусом грипу;
2. Визначити титр вірусу грипу в реакції гемадсорбції.

Методика постановки реакції: заразити культуру клітин вірусом грипу (за схемою ЦПД). Після 5-7 днів інкубації вірусу грипу в культурі клітин у кожен флакон внести по 0,2 мл 0,4 - 0,5% суспензії відмитих еритроцитів курей чи людини 0-групи крові. Після додавання еритроцитів флакони протягом деякого часу залишити при кімнатній температурі.

Тривалість контакту еритроцитів із клітинами залежить від властивостей вірусу:

- для респіраторних – 3-5 хв.
- для вірусу кліщового енцефаліту – 10-15 хв.
- для вірусу вакцини натуральної віспи – 20-30 хв.

Результати реакції враховують шляхом перегляду флаконів під малим збільшенням мікроскопа. Перед цим для видалення не адсорбованих еритроцитів флакони обережно струшують кілька хвилин чи центрифгують.

При позитивній реакції гемадсорбції еритроцити в помітних кількостях адсорбуються на уражених клітинах, утворюючи скупчення різного характеру.

Інтенсивність адсорбції еритроцитів на моношарі клітинної культури залежить від ступеня виразності цитопатогених змін: чим більше ЦПД, тим більша кількість еритроцитів адсорбується на поверхні клітин.

При відсутності гемадсорбції моношар цілком вільний чи містить одиничні еритроцити, що осіли на клітинах; еритроцити виявляються тільки в рідкій фазі, у якій вони вільно плавають – така картина повинна бути в контролі, що не інфікований вірусом.

Контрольні запитання

1. Охарактеризуйте принцип методу гемадсорбції.
2. При вивченні яких захворювань використовується метод гемадсорбції?
3. Вкажіть умови проведення реакції гемадсорбції.

ЗАНЯТТЯ 5. ТИПУВАННЯ ВІРУСІВ У РЕАКЦІЇ НЕЙТРАЛІЗАЦІЇ І ГАЛЬМУВАННЯ ГЕМАДСОРБЦІЇ В КУЛЬТУРІ КЛІТИН

Мета заняття: Ознайомитися з принципом постановки реакції нейтралізації й областю її застосування.

Реакція нейтралізації застосовується для ідентифікації виділених вірусів, тобто їх типування і для серодіагностики. При ідентифікації вірус визначається по взаємодії з відомою специфічною імунною сироваткою (діагностичною), що запобігає появі цитопатогеної дії (у культурі клітин),

загибель сприйнятливих тваринних чи курячих ембріонів, чи ж розвиток у них визначених ознак ураження.

У серодіагностиці реакція нейтралізації застосовується для виявлення наростання титру нейтралізуючих антитіл до визначеного (відомого) вірусу в парних сироватках.

Принцип методу: Реакція нейтралізації заснована на властивості імунної сироватки при додаванні до відповідного вірусу блокувати його здатність до репродукції в чутливій біологічній системі. Здатність імунної сироватки інактивувати інфекційну активність вірусу є наслідком взаємодії нейтралізуючих антитіл з визначеними антигенними детермінантами поверхневих вірусних білків.

У лабораторній діагностиці вірусних інфекцій як чутливі системи, використовуються культури клітин, організм сприйнятливих тварин і курячі ембріони.

Реакція нейтралізації проводиться в два етапи:

1. Зараження культури клітин вірусом для визначення 100 ТЦД₅₀ (за схемою ЦПД);
2. Постановка реакції нейтралізації.

Умови проведення реакції:

1. Культура клітин повинна бути чутливою до дії обраного вірусу;
2. Для зараження культури клітин використовуються флакони з добре сформованим моношаром.

Практичне завдання:

1. Заразити культуру клітин вірусом грипу для визначення 100 ТЦД₅₀;
2. Визначити титр вируснейтралізуючих антитіл у реакції нейтралізації.

Методика постановки реакції: При постановці реакції нейтралізації з метою серодіагностики беруть постійну дозу вірусу – 100 ТЦД₅₀ і послідовні дворазові розведення сироватки. Тому на першому етапі необхідно провести титрування вірусу грипу (за схемою ЦПД), а потім титрування сироватки.

Для постановки реакції нейтралізації в культурі клітин, необхідно провести ряд підготовчих дій у пробірках з метою одержання дворазових розведень сироватки і взаємодії сироватки з вірусом. Для цього в 6 пробірок вносять, починаючи з першої, 0,6 мл і в наступні по 0,4 мл середовища 199. Потім методом перекатки готують дворазові розведення сироватки від 1:4 до 1:128. Після цього в кожную пробірку додають по 0,4 мл 100 ТЦД₅₀ вірусу грипу.

Для контакту АГ з АТ залишають пробірки на 1-2 години при 37 °С в термостаті. Потім для постановки реакції у флаконах з добре сформованим клітинним моношаром беруть розведення сироватки від 1:16 до 1:128. Для кожного розведення використовують не менше п'яти флаконів. Крім цього, ставлять два контролю: контроль клітин і контроль вірусу.

У контроль клітин вносять 1 мл середовища 199, а в контроль вірусу 0,1 мл вірусу і 0,9 мл середовища 199. Крім того, в дослідні флакони вносять по 0,2 мл суміші вірусу із сироваткою і по 0,8 мл середовища 199. Флакони інкубують у термостаті при 37 °С на 5-7 днів.

Таблиця 2

СХЕМА ПОСТАНОВКИ РЕАКЦІЇ НЕЙТРАЛІЗАЦІЇ

Компонент	Розведення сироватки						До клітин	До вірусу
	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128		
У пробірках								
Середовище 199	0,6	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	-	-
Досліджувана сироватка	0,2 →	0,4 →	0,4 →	0,4 →	0,4 →	0,4↘	-	-
Вірус 100 ТЦД ₅₀	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	-	-
Контакт 1-2 години при 37 ⁰ С								

У флаконах								
Середовище 199	-	-	0,2	0,2	0,2	0,2	-	-
Суміш вірусу і сироватки	-	-	0,8	0,8	0,8	0,8	1	0,9
Вірус 100 ТЦД ₅₀	-	-	-	-	-	-	-	0,1

Облік результатів проводять, починаючи з контролів:

1. Контроль вірусу – 50-100% дегенерації клітинного моношару;
2. Контроль клітин – клітинний моношар має вид луски цибулі.

Титр віруснейтралізуючих антитіл відповідає граничному розведенню сироватки, що запобігає дегенерації клітинного моношару не менш ніж у половині флаконів, до яких вона була додана.

Контрольні запитання

1. Охарактеризуйте принцип методу реакції нейтралізації.
2. В яких випадках використовують реакцію нейтралізації?
3. Які етапи включає реакція нейтралізації?
4. Опишіть умови проведення реакції нейтралізації.

ЗАНЯТТЯ 6. ТИТРУВАННЯ ВІРУСУ МЕТОДОМ БЛЯШКОУТВОРЕННЯ ПО ДЮЛЬБЕККО І ФОГТ У КУЛЬТУРІ КЛІТИН

Мета заняття: Ознайомитися з принципом постановки реакції Дюльбекко і Фогт й областю її застосування.

Принцип методу: У 1954 р. Дюльбекко і Фогт, застосувавши одношарові культури тканин нирок мавп, розробили методику титрування і виділення варіантів-штамів вірусів поліомієліту. Через те, що в основі методу лежить утворення в місцях цитопатичної дії вірусу (ЦПД) знебарвлених плям

(бляшок), цей метод отримав назву методу плям або бляшок. У наступному цей метод був використаний при роботі з різними вірусами.

Методика одержання бляшок за Дульбекко складається з наступних основних етапів:

1. Готування одношарової культури з добрим моношаром у чашках Петрі, матрацах або інших судинах, що мають рівну плоску поверхню;
2. Видалення живильного середовища і дворазове промивання клітинного моношару фосфатно-буферним розчином;
3. Зараження клітин 0,2 – 0,5 мл вірусу і його адсорбція протягом 1 години;
4. Готування окремих частин агарової суміші і їхнє об'єднання при температурі 42-43 °C;
5. Покриття моношару агаровою сумішшю й охолодження її при кімнатній температурі протягом 10-15 хв до застигання агару;
6. Інкубація заражених культур у термостаті при 37° C агаровим покриттям догори, у темряві;
7. Підрахунок бляшок у проникаючому світлі на темному фоні. Бляшки видні у вигляді круглих світлих ділянок на загальному червоному тлі при житті пофарбованих нейтральротом клітин.

Терміни появи бляшок залежать від виду вірусу і типу тканини. Велике значення в одержанні бляшок має підбір відповідного середовища покриття. До складу кожного середовища входить агар у кінцевій концентрації 1,0 – 1,5%, який локалізує вірус у ділянках, де відбулося зараження окремих клітин.

Агар напередодні досліду, звичайно за 24 години, готується в 2,6 – 3% - ній концентрації й автоклавується при 1 атм. Повторне автоклавування агару не рекомендується, тому що він при цьому стає токсичним. Перед вживанням агар розплавляють у водяній лазні, охолоджують до 43 ° C і до нього додають живильне середовище.

Для різних, як первинно-трипсинізованих, так і перещеплюваних ліній клітин, широко застосовується агарова суміш, яка складається з рівних частин (по 90 мл) живильного середовища та 3%-ного агару на дистильованій воді.

До складу живильного середовища входить 18 мл розчину Ерла, концентрованого в 10 разів, 3,6 мл телячої сироватки, 3 мл розчину нейтральроту (1:1000), 60 мл дистильованої води і 5,4 мл 7,5%-ного розчину бікарбонату натрію. Розчини Ерла і соди, що входять до складу середовища, стерилізуються фільтрацією, а не автоклавуванням.

Методика титрування вірусу складається в нанесенні на клітинний моношар не менш ніж двох культур по 0,2 мл різних розведень вірусу і наступного покриття заражених клітин живильним агаром. Тривалість адсорбції до внесення агарової суміші складає для різних вірусів від 1 до 3 годин.

Облік результатів проводять через 5 – 10 днів інкубації, кількість вірусу, здатного утворювати одну бляшку, позначають як одну бляшкоутворюючу дозу. Титр вірусу виражається в бляшкоутворюючих дозах, що містяться в 1 мл.

Контрольні запитання

1. Охарактеризуйте принцип постановки реакції Дюльбекко і Фогт й область її застосування.
2. Опишіть етапи одержання бляшок за Дульбекко і Фогт.

ЗАНЯТТЯ 7. ВИВЧЕННЯ МОРФОЛОГІЧНИХ ОЗНАК ВІРУСНОЇ ЦИТОПАТОЛОГІЇ В МАЗКАХ-ВІДБИТКАХ, ГІСТОЛОГІЧНИХ ЗРІЗАХ, ПОСТІЙНИХ ПОФАРБОВАНИХ ПРЕПАРАТАХ ВІРУСІНФІКОВАНИХ КУЛЬТУР КЛІТИН

Мета заняття: ознайомитися з основними реакціями клітин на різні групи вірусів.

Принцип методу: Результати взаємодії вірусів із клітиною можна розподілити на кілька типів:

- ушкодження клітин, що призводить до їхньої загибелі, яка морфологічно виражається в лізисі клітин, або процесами тотальної, субтотальної чи осередкової деструкції культури клітин, яка настає в різний

термін в залежності від дози вірусів, складу живильного середовища, умов культивування;

- утворення багатоядерних клітин – симпластів (це ушкодження є характерною ознакою ЦПД вірусів вісповакцини, мавпячих вірусів та ін.);
- трансформація клітин під дією вірусів, які мають онкогенну активність;
- формування внутрішньоклітинних включень, різних за формою і хімічним складом;
- латентна (хронічна) вірусна інфекція.

У 1965 році І.А. Алов запропонував класифікацію патологічних мітозів, у якій враховувалися не тільки морфологічні ознаки, але і цитофізіологічні механізми їхнього утворення. Відповідно до цієї класифікації всі аномальні форми розподілу клітин розподілені на три основні групи:

1. Патологія мітозу, зв'язана з ушкодженням хромосом:

- а) затримка мітозу в профазі;
- б) раній поділ хроматид у профазі;
- в) одиночні, парні і множинні ацентричні фрагменти хромосом (їхнє відставання в мітокінезі, при розбіжності хромосом до полюсів, розтягування фрагментів у метафазі);
- г) хромосомні і хроматидні мости (одиночні, парні, множинні);
- д) відставання цілих хромосом у метафазі при розбіжності їх до полюсів, утворення мікроядер;
- е) набрякання і склеювання хромосом.

2. Патологія мітозу, зв'язана з ушкодженням мітотичного апарату:

- а) затримка мітозу в метафазі;
- б) розсіювання хромосом у метафазі, дезорганізація мітотичного веретена;
- в) багатополюсний мітоз;
- г) моноцентричний мітоз;
- д) асиметричний мітоз;
- е) трьохгрупова метафаза;

ж) пола метафаза.

3. Порушення процесу цитотомії:

а) запізнення або відсутність цитотомії;

б) передчасна цитотомія (табл. 3).

Таблиця 3

Основні типи патологічних мітозів

Нормальний мітоз	Профаза	Метафаза	Анафаза	Телофаза	Два диплоїдних ядра
Патологія мітозів, зв'язана з ушкодженням хромосом	Розсіювання фрагментів хромосом	Відставання поодиноких хромосом у метакинезі	Множинне відставання хромосом і фрагментів	Відставання хромосом і фрагментів у телофазі	Утворення мікроядер
Патологія мітозів, зв'язана з ушкодженням мітотичного апарату	Раннє роз'єднання хроматид	Множинне відставання хромосом і фрагментів	Мости в анафазі	Мости в телофазі	Можуть зберігатися в ряді клітинних циклів
Патологія мітозів, зв'язана з ушкодженням мітотичного апарату	К-мітоз зі злипанням хромосом	Трьохполюс на метафаза	Трьохполюсний мітоз		Три гіпо-диплоїдних ядра
	К-мітоз з розсіюванням хромосом	Пола метафаза	Асиметричний мітоз		Гіпо- і диплоїдні ядра (анеуплоїдія)
		Трех-групова метафаза	Моноцентричний мітоз		Поліплоїдія

Практичне завдання

1. Визначити, використовуючи постійні препарати, мітотичний індекс – число клітин, що поділяються мітозом, на 1000 підрахованих; виражають у проміллі (‰), або в %.

2. Підрахувати загальне число патологічних мітозів, відповідно до класифікації І.А.Алова (1965), виражають у % до загального числа мітозів.

3. Підрахувати число симпластів, виражають у % до загального числа (1000) клітин.

Облік здійснюється при мікроскопічному вивченні постійних препаратів у імерсійній системі при великому збільшенні мікроскопу (10*90).

Матеріали й устаткування

1. Постійні препарати культур клітин
2. Мікроскопи
3. Імерсійна олія

Контрольні запитання

1. Які зміни в клітині може викликати вірус?
2. Вкажіть основні патології мітозу при вірусній інфекції.
3. Дайте визначення поняттю мітотичний індекс.

ЗАНЯТТЯ 8. ВИЯВЛЕННЯ АНТИГЕНІВ ВІРУСІВ І ПРОТИВІРУСНИХ АНТИТІЛ МЕТОДОМ ІМУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛІЗУ (ІФА)

Мета заняття: Ознайомитися з принципом, методичними варіантами та галуззю застосування імуноферментного аналізу; опанувати непрямий метод імуноферментного аналізу ELISA.

На початку 70-х років XX сторіччя пошуки простих чутливих методів виявлення і кількісного визначення антигенів та антитіл привели до розробки твердофазного імуноферментного аналізу ELISA (від англ. enzyme-linked immunosorbent assay) - виявлення з використанням імуносорбентів, зв'язаних з ферментами. Таким чином, особливістю методів ІФА являється використання функціонально активної біологічної молекули фермента.

Основні принципи твердофазного ІФА (ELISA).

Можливість проведення твердофазного ІФА, незалежно від модифікації, ґрунтується на 4-х принципах:

1. Різні ферменти, найпоширеніші з яких пероксидаза хрину та лужна фосфатаза, можна ковалентно приєднувати до антигенів або антитіл різними хімічними методами за таких умов, коли обидва компоненти кон'югату зберігають свою біологічну активність (здатність до взаємодії з субстратом, антигенність, антигенв'язуючу активність).

2. Більшість антигенів, у тому числі білки, ліпополісахариди та бактеріальні ліпополісахариди, самочинно сорбуються на поверхні пластику (наприклад, у виямках полістиролової панелі для мікротитрування). Антитіла, що мають білкову природу, також сорбуються на пластику, зберігаючи при цьому антигензв'язуючу активність. Саме на цьому принципі ґрунтується перший етап реакції, що полягає у іммобілізації панелей антигенами або антитілами. Адсорбовані на твердій фазі антигени або антитіла уже не змочуються буфером, який містить детергент, тоді як реагенти, що не зв'язалися легко видаляються відмиванням.

3. При інкубації на другому етапі в іммобілізованих виямках досліджуваного зразка та стандартних реагентів на поверхні твердої фази формуються імунні комплекси, що складаються з одного або кількох шарів. Компоненти, що не зв'язалися, на кожному етапі видаляються відмиванням, що дає можливість добитися високої специфічності аналізу у реакції фермента, який входить до складу кон'югату з індикаторним субстратом.

4. При зв'язуванні кон'югату антитіло-фермент або антиген-фермент з іммобілізованим імунним комплексом активний центр фермента залишається доступним для взаємодії з субстратом.

Інкубація субстрата з іммобілізованим кон'югатом, як правило, приводить до розвитку кольорової реакції. На певній стадії реакцію зупиняють, а чіткість забарвлення оцінюють візуально, порівнюючи із стандартом, або за оптичною густиною (фотометрія за певної довжини хвилі). Деякі варіанти методу припускають забарвлення самої твердої фази. У цих випадках використовують хромогенні субстрати, що дають продукти у вигляді нерозчинних, іммобілізованих на твердій фазі забарвлених преципітатів.

Реакція характеризується високою специфічністю, яка властива імунореагентам і чутливістю, що забезпечується діями фермента.

Всього декілька молекул кон'югованого фермента, який присутній у системі, здатні розщепити безліч молекул субстрату з утворенням продуктів, які легко виявляються, що дає можливість, в решті решт, реєструвати та обчислювати кількісно взаємодію всього декількох молекул імунореагента, наприклад, антитіл з гомологічним антигеном.

Матеріали та методичні заходи, які використовуються в ІФА. Як тверду фазу використовують речовини різного хімічного складу: полістирен, поліпропілен, полівініл, гелі декстрина, агарози, поліакриламід, целюлозу, нітроцелюлозу, нейлон. За фізичними ознаками це можуть бути гелі, кульки, листи, диски, спеціальні титраційні панелі. Зв'язуюча поверхня панелей покрита спеціальними реагентами, що сприяють адсорбції антигенів і антитіл.

Зв'язування речовин та клітин з твердою фазою відбувається нековалентно (адсорбція), завдяки утворенню гідрофобних або йонних зв'язків, або ковалентно (кон'югація) ціанбромідом, глутаровим альдегідом, полілізином. Ступінь адсорбції залежить від фізико-хімічних властивостей молекул: ізоелектричної точки, рН, молекулярної маси, конформації, а також від концентрації в розчині, терміну та температури інкубації тощо. Оптимальна концентрація чистих білкових агентів складає 1-10 мкг/мл; полісахаридних - близько 500 мкг/мл.

Ферменти для ІФА повинні задовольняти низку вимог: утримувати в структурі реакційні групи, завдяки яким можливе зв'язування їх з імунореагентами; зберігати високу ферментативну активність у кон'югованому стані протягом тривалого терміну; бути чистими, стабільними в реакційній суміші. Застосовують тільки ті ферменти, котрі розщиплюють субстрати з утворенням продуктів, легко визначаються тим або іншим способом.

Методи ТФ ІФА адаптовані для роботи з корпускулярними агентами-хромосомами, вірусами, бактеріями (bacto-ELISA), клітинами еукаріот (cell-

ELISA). Клітини бактерій можна прикріпити до поверхні пластикових платівок висушуванням.

Після зв'язування будь-якого імунореагента вільні місця на ТФ блокують, щоб відвернути неспецифічне зв'язування з нею імунореагентів на подальших етапах аналізу. Застосовують різноманітні білки та нейонні детергенти: бичачий сироватковий альбумін (1% розчин), желатин (0,2-0,5%-ні розчини), нормальні сироватки (1-5%-ні розчини), бичачий γ -глобулін (1%-ний розчин), тритон X-100 та твін 20) 0,05-0,5 %- ні розчини).

Методичні варіанти ТФ ІФА:

- ELISA. Прямий варіант, що передбачає утворення двошарових імунних комплексів.

При здійсненні цієї найпростішої модифікації ІФА виямки панелей сенсibiliзують (іmobілізують) антигенами (антитілами), а потім інкубують антитілами (антигенами) з міченим ферментом. Зв'язування кон'югату, що містить фермент з твердою фазою відбувається лише у тому разі, коли обидва компоненти системи взаємно комплементарні.

Модифікацією цього варіанту є конкурентний аналіз, у якому $Ag(At)$, мічений ферментом, конкурує з неміченим $At(Ag)$. У цьому випадку ферментативна активність утвореного комплексу $At-Ag-F$ ($Ag-At-F$) обернено пропорційна кількості $Ag(At)$ у досліджуваному зразку.

Наприклад, виявлення сироваткових антитіл до чітко визначеного епітопу антигена по конкуренції з міченими стандартними антитілами, специфічними до цього ж епітопу.

- "Сендвіч"-варіанти ELISA. Відповідно до схеми даного варіанту аналізу антитіла (звичайно моноклональні або високо афінні), адсорбовані на твердій фазі, інкубують з досліджуваним зразком. Після відмивання у виямки вносять мічені ферментом антитіла до того ж антигена і далі проводять усі наступні етапи реакції так само, як і при відтворенні інших описаних модифікацій.

Єдине обмеження цього варіанту полягає у тому, що досліджуваний антиген повинен мати декілька епітопів, які зв'язують антитіла.

- Непрямий ELISA для виявлення антитіл та антигенів. Це варіант найзручніший для повсякденного аналізу сироваток на наявність специфічних антитіл. Найбільше поширення він має в епідеміології інфекційних захворювань. Для проведення реакції у виямках панелей адсорбують антиген (звичайно екстракт з бактерій, паразитів та вірусів) і інкубують із зразками сироватки або іншого матеріалу (спинномозкової рідини, молока, слюни, витяжки фекалій).

Специфічні до антигенів антитіла виявляють за допомогою антиглобулінового кон'югату. Основна перевага методу в "універсальності" кон'югату.

Наприклад, один і той самий кон'югат, специфічний до імуноглобулінів людини, може слугувати для виявлення антитіл людини до найрізноманітніших антигенів у будь-яких зразках. Оскільки обидва реагенти, які застосовуються у цьому варіанті ІФА, можуть бути стандартизовані, реакція методично проста і легко контролюється.

Практичне завдання: Провести серодіагностику вірусного гепатиту В.

Визначити наявність антитіл до вірусу гепатиту В у сироватці крові людини непрямим методом ELISA.

Облік результатів: результати реакції обліковують за забарвленням субстратної суміші інструментально, визначаючи поглинання при довжині хвилі 450 нм.

1. Візуальний облік реакції:

- у лунках, в котрі вносили розчин № 3 з детергентом, субстратна суміш має бути безкольоровою або світло-бежевою;
- у лунках, в котрі вносили негативну контрольну сироватку у розбавленні 1:200 (розчин №4а), субстратна суміш забарвлюється у світло-бежевий колір;
- у лунках, у котрі вносили позитивну контрольну сироватку в розбавленні 1:200 (розчин №4), реакція має бути чітко вираженою, субстратна суміш забарвлюється інтенсивно, набуваючи забарвлення від коричневого до темно-коричневого.

Світло-бежевий колір відповідає заперечним результатам, бежевий - 1 плюсу, темно-бежевий - 2 плюсам, світло-коричневий - 3 плюсам, коричневий та темно-коричневий - 4 плюсам.

2. Облік реакції за допомогою вертикального спектрофотометра (рідера) типу “Мультискан” або “Уніскан”:

- оптична густина (ОГ) субстратної суміші у виямках, у котрі вносили розчин № 3 з детергентом, має бути не більше 0,25;

- ОГ субстратної суміші у лунках, у котрі вносили розчин №6, має бути не більше 0,25;

- ОГ субстратної суміші у лунках, у котрі вносили негативну контрольну сироватку (розчин; 4а), має бути не більше 0,35;

- ОГ субстратної суміші у лунках, у котрі вносили позитивну контрольну сироватку (розчин № 4), має бути не більше 0,9.

Показники рідера відповідають: до 0,35 - заперечним результатам; 0,36 - 0,45 - 1 плюсу; 0,46 - 0,65 - 2 плюсам, 0,66 - 0,89 - 3 плюсам, 0,9 та вище - 4 плюсам.

Як при візуальній, так і при інструментальній оцінці, негативними вважають результати до 1 плюса включно, 2 плюси - слабкопозитивна, 3 плюси - позитивна та 4 плюси - різкопозитивна.

Систему вважають специфічно активною при наявності виразної реакції з позитивною контрольною сироваткою крові та відсутністю реакції із заперечними контролями (розчин № 3 з детергентом, розчин № 6, негативна контрольна сироватка).

Матеріали й устаткування

Тест-система являє собою набір інгредієнтів для проведення імуноферментного аналізу (ІФА) з метою виявлення специфічних антитіл до збудника гепатиту В у сироватці крові людини.

Контрольні запитання

1. Які преципітаційні тести вам відомі?
2. В чому переваги та недоліки імунодифузійних тестів?

3. Характеристика методу dot-ELISA та його використання.
4. Що таке антивидові антитіла і з якою метою вони використовуються в ІФА?
5. Чи можливе кількісне визначення антигену за допомогою імуноферментного аналізу?
6. Застосування різних ферментних міток в ІФА.

ЗАНЯТТЯ 9. ВИЯВЛЕННЯ ВІРУСНИХ АНТИГЕНІВ І АНТИТІЛ ДО ВІРУСУ МЕТОДОМ РАДІОІМУНОЛОГІЧНОГО АНАЛІЗУ (РІА)

Мета заняття: Ознайомитися з принципом і областю застосування радіоімунологічних методів; опанувати методикою постановки IPMA-HBsAg – ^{125}I

Радіоімунологічний аналіз (РІА) вперше був описаний Ялоу і Берсон (Yalow, Berson, 1960) у США. За розробку цього методу Розалін Ялоу була визнана гідною Нобелівської премії в 1977 р. У 1958 р. Фарр запропонував методику визначення єднальної здатності антисироваток, у принципі застосовну до усіх Аг. Надалі широке застосування метод знайшов для підтвердження діагнозу системного червоного вовчка. Для його постановки необхідна наявність радіоактивно мічених Аг (ДНК).

Для радіоімунологічних методів характерна висока специфічність, так можливо виявити в 1 мл аналізованих зразків 10^{-9} - 10^{-12} м тестованої речовини. За допомогою набору IPMA-HbsAg – ^{125}I мінімальна обумовлена концентрація HbsAg, складає 5×10^{-9} г/мл. Також відсутня необхідність оцінювати реакцію, що протікає, по вторинних проявах: аглютинація, преципітація і лізис еритроцитів.

Крім того, методи РІА придатні для виявлення практично будь-яких речовин, до яких можуть бути отримані Ат. У лабораторній діагностиці одержали широке поширення: радіоімунологічний аналіз у рідкій фазі,

радіоалергосорбентний тест (RAST), радіоімунологічний сорбентний тест (RIST і PRIST), імунорадіометричний аналіз (IPMA) і ін.

РІА широко застосовується при вивченні і визначенні:

- бактеріальних, вірусних (гепатиту В) і пухлинних Аг (канцероембріонального);
- противірусних Ат і асоційованих з пухлинами Ат;
- у діагностиці аутоімунних захворювань (системний червоний вовчок, ревматоїдний артрит, міастенія, Синдром Гудпасчера);
- циркулюючих імунних комплексів;
- канцерогенних похідних ДНК;
- кількісного визначення гормонів, простагландинів, ферментів, тканинних і плацентарних поліпептидів, циклічних полінуклеотидів і фармацевтичних препаратів.

Один з недоліків полягає в тому, що дані методи не дозволяють розрізняти активні білкові молекули і біологічно неактивні фрагменти, які проте зберегли антигенні детермінанти. Крім того, важливим фактором, що обмежує застосування РІА, є нестабільність радіоізотопів – напіврозпад, наприклад ^{125}I – 60,04 доби і дотримання спеціального режиму безпеки експлуатації і збереження, використання дорогих лічильників. Проте інші методи поки не можуть витиснути РІА.

Принцип методу. Метод ґрунтується на виявленні і кількісному визначенні антигену чи антитіл шляхом радіоактивного маркірування одного з двох компонентів. У якості мітки використовують радіоактивні ізотопи β -часток (^3H чи ^{14}C), або γ -промені (^{125}I чи ^{131}I).

Найчастіше застосовують ізоотп йоду ^{125}I . Радіоактивність Аг, використовуваних у РІА, звичайно складають 100-200 мкКи/мкг, радіоактивність Ат – 20 мкКи/мкг, а для модифікації РІА з подвійними АТ - 0,1 мкКи/мкг*. У залежності від умов експерименту розрізняють РІА конкурентний і не конкурентний у рідкій чи на твердій фазі.

* - 1 мікрорюрі (мкКи) = $3,7 \times 10^4$ розп./с

Класичний радіоімунологічний аналіз заснований на принципі конкурентного гальмування з використанням рідкої фази, тобто зв'язування відомого міченого радіоактивною речовиною антигену (Аг*) специфічними антитілами (Ат) залежить від концентрації досліджуваного неміченого антигену (Аг) (рис. 1). Чим більше зв'язується немічених антигенів у комплекс [Аг-Ат], тим менше радіоактивність комплексу [Аг*-Ат].

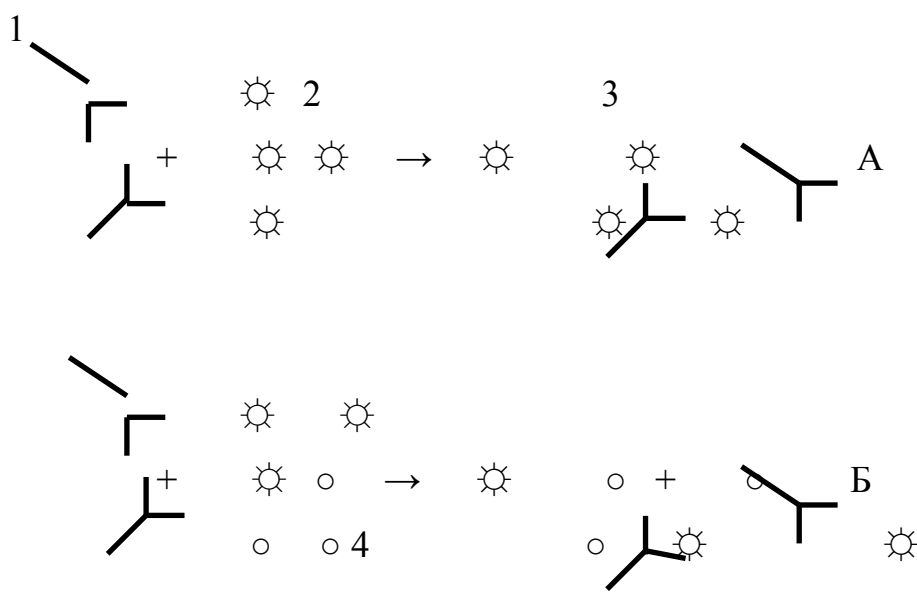


Рис. 1. Принцип РІА з використанням рідкої фази

1 - антитіло; 2 - радіоактивний антиген; 3 – комплекс [Аг*-Ат];

4 – обумовлений антиген;

Реакція проходить за наступною схемою:



Таким чином, співвідношення вільної і зв'язаної радіоактивності залежить від кількості доданого неміченого Аг і тому можна побудувати калібровану криву, де на осі ОХ відкладені значення концентрації досліджуваного антигену, а на осі ОУ відкладений відсоток зв'язаної радіоактивності.

Після встановлення рівноваги в системі відокремлюють комплекс [Аг*-Ат] + [Аг-Ат] від вільних Аг* і Аг. Для того щоб процес поділу відповідав вимогам, під час аналізу повинні дотримуватися наступні умови:

- 1) не повинно виявлятися впливу на стан рівноваги;

- 2) відділення зв'язаних Ат від незв'язаних повинно носити кількісний характер;
- 3) витрата часу і вартість процесу повинні бути незначними.

Використовують наступні способи для поділу: розходження в заряді і відносній молекулярній масі дозволяють проводити електрофорез чи гель-хроматографію; селективна адсорбція Аг на тальку, кварці, целюлозі, з'єднаних з активованим вугіллям; поділом у магнітному полі кон'югованих Ат із залізовмісними частками ензакріла.

Осадження комплексу здійснюють також за допомогою 50% розчину амонію сульфату (метод Фарра) або шляхом преципітації його з відповідною антисироваткою (метод подвійних антитіл). У сучасних модифікаціях РІА не обов'язково проводити поділ вільного і зв'язаного антигену, через істотні відмінності вільної і зв'язаної з антитілами мітки Аг*.

Потім вимірюють радіоактивність обложеного комплексу і по кривій простою екстраполяцією встановлюють кількість антигену.

Твердофазний радіоімунологічний аналіз використовується для більш простого відділення комплексу [Аг-Ат] від вільного компонента реакції. Для цього один із двох компонентів реакції фіксується на твердій основі (частки сефадекса, сефарози, целюлози, полістиролу, поліпропілену). Якщо адсорбувати на носії Аг, то зміст Ат у досліджуваній сироватці можна визначити, додавши мічені анти-Ig, отримані від тварини.

Визначення антитіл:

1. Метод визначення аутоантитіл до ДНК при системному червоному вовчку. У мікропанель, на стінках лунок якої раніше адсорбований антиген (ДНК), додають сироватку хворого. Аутоантитіла зв'язуються з антигеном, інші білки сироватки видаляються промиванням. Потім додають мічені ¹²⁵I очищені антитіла кролика до Ig людини. Після промивання оцінюють рівень радіоактивності і роблять висновок про кількість аутоантитіл у сироватці хворого.

2. Радіоалергосорбентний тест (radioallergosorbent test – RAST). Застосовується для визначення специфічних антитіл класу Ig у страждаючих алергією. Алерген (екстракт пилка), приєднаний ковалентно до носія (паперовий диск), інкубують із сироваткою хворого, промивають і з'єднують з міченою радіоактивною речовиною анти-Ig. Ступінь радіоактивності пропорційний вмісту Ig у сироватці хворого.

3. Радіоімунологічний сорбентний тест (radioimmunosorbent test – RIST) застосовується для визначення Ig. Кролячі анти-IgE-антитіла фіксують на твердій фазі мікрокристалічної целюлози за допомогою цианогенброміда і проводять реакцію з розведеннями стандартної сироватки (вміщуючої мічений Ig) і досліджуваною сироваткою хворого.

Визначення антигену:

1. Радіоімунологічний сорбентний тест на папері (paper radioimmunosorbent test – PRIST). Застосовується для виявлення антигенів гепатиту У в сироватці хворого. Специфічні антитіла фіксуються на смужці паперу, потім послідовно інкубуються із сироваткою хворого і зі специфічними антитілами, міченими радіоактивною речовиною. Радіоактивність смужки паперу пропорційна концентрації антигенів.

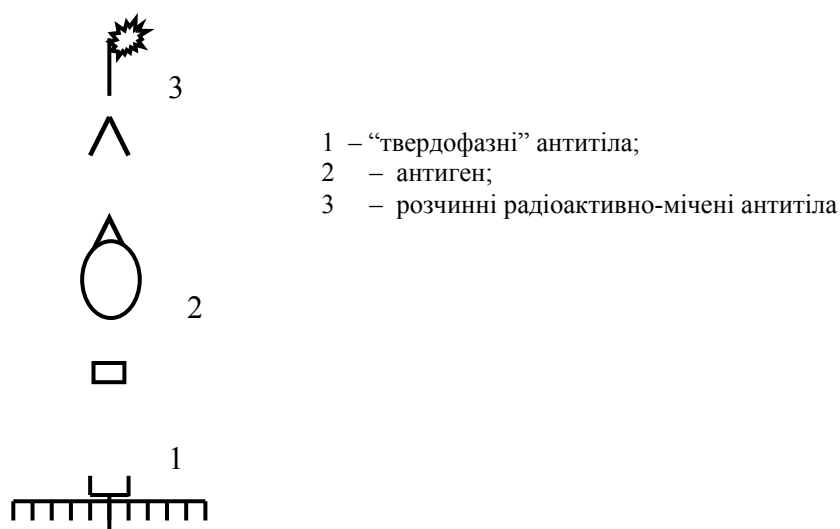


Рис. 2. Твердофазне імунорадіометричне визначення антигену

2. Імунорадіометричний аналіз відрізняється від класичного радіоімунологічного тим, що використовується надлишок міченого реагенту. Тверду фазу, наприклад пластик, навантажують Ат і додають досліджуваний розчин, у якому необхідно визначити Аг (рис. 2).

Потім промиванням видаляють не зв'язані Аг і додають надлишок радіоактивно мічених Ат. Специфічність методу збільшується при використанні “твердофазних” і мічених антитіл, спрямованих до різних ділянок антигену. Метод використовується для визначення наявності поверхневого антигену гепатиту В в сироватці і плазмі крові людини.

Умови проведення імунорадіометричного аналізу HbsAg:

- 1) досліджувана сироватка від донора чи від хворого з підозрою на гепатит У;
- 2) Ат до HbsAg, іммобілізовані на внутрішній поверхні пластмасових пробірок;
- 3) наявність ^{125}I -Ат до HbsAg;
- 4) температура 18-25 °C;

Практичне завдання: Провести лабораторну діагностику гепатиту В.

1. Виконати імунорадіометричний аналіз з метою виявлення поверхневого антигену гепатиту В в сироватці крові людини.
2. Зробити висновок про контамінацію вірусом гепатиту В донорській крові.

Методика постановки імунорадіометричного аналізу HbsAg з використанням радіонукліда ^{125}I :

Перед початком аналізу, витягають з набору реактивів ИПМА-HBsAg – ^{125}I флакони з позитивним і негативним контрольними зразками і пробірки, витримують при температурі 18-25 °C протягом 30-40 хвилин, тому що тест-система зберігалася в холодильнику при температурі 4-6 °C.

Маркують пробірки з розрахунку, що для позитивного контрольного зразка ДО(+) використовується 3 пробірки (N1-3), на негативний контрольний зразок ДО(-) - 7 пробірок (N4-10) і на кожну досліджувану сироватку по 2 пробірки (N 11 і 12).

У пробірки, розміщені в штативі, дозатором додають реактиви: ДО(+), ДО(-) і досліджувану сироватку в об'ємі 0,1 мл відповідно до схеми, представленої в табл. 4.

Розчини з флаконів вносять таким чином, щоб наконечник насадки дозатора доторкався до внутрішньої поверхні стінки пробірки в самого дна. Горизонтального положення рівня рідини на дні домагаються легким постукуванням по пробірках. Для запобігання висихання реагенту, пробірки закривають поліетиленовою стрічкою з липким шаром чи поліетиленовою плівкою.

Таблиця 4

**Схема постановки імунорадіометричного аналізу HbsAg
з використанням радіонукліда ^{125}I**

Компоненти	Номера контрольних і дослідних пробірок											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
+ контрольний зразок, мл	0,1	0,1	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
- контрольний зразок, мл	-	-	-	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	-	-
Досліджуван-ний біоматеріал, мл	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1	0,1
Експозиція 12-16 год при $t = 18-25^{\circ}$												
Промивання D_2O , мл (3 рази)	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
HbsAg – ^{125}I , мл	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Експозиція 4-6 год при $t = 18-25^{\circ}$												
Промивання D_2O , мл (6	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5

разів)												
Вимір активності ^{125}I , хв.	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Кількість Зареєстрованих імпульсів	5061	4497	4923	565	525	436	489	416	479	518	2052	2793
Облік результату: Наявність HbsAg	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+

Перша експозиція проводиться протягом 12-16 годин при температурі 18-25°C. Потім, використовуючи водоструминний насос з пасткою для збору рідини, видаляють вміст пробірок. Після цього проводиться промивання, дистильована вода (d_2O) порціями по 1,5 мл три рази зі скрупульозним видаленням рідини наприкінці кожної серії.

Флакони з реактивом ^{125}I -Ат до HbsAg витримують 30 - 40 хвилин при температурі 18-25 °C, після виймання з холодильника. При роботі з джерелом м'якого γ -випромінювання повинні дотримуватися правила безпеки (активність препарату знаходиться в межах 85-185 кБк).

У кожен пробірник вносять по 0,1 мл реактиву таким чином, щоб весь реактив горизонтально розподілився на дні пробірки. Закривають пробірки поліетиленовою стрічкою з липким шаром чи поліетиленовою плівкою і витримують протягом 4-6 годин при температурі 18 - 25 °C.

По закінченні другої експозиції видаляють реактив із пробірок і промивають d_2O порціями по 1,5 мл шість разів з добором рідини наприкінці кожної серії. Останню порцію d_2O видаляють найбільш ретельно. За допомогою γ -лічильника вимірюють протягом 1 хвилини активність ^{125}I у кожній пробірці.

Облік і оцінку результатів аналізу починають з визначення кількості фонових імпульсів N_{ϕ} , зареєстрованих лічильником за 1 хв. З цією метою на γ -встановлюють режим роботи “Вимір” 5 хв (3) і без внесення радіоактивного зразка проводять визначення. Тло лічильника (N_{ϕ}) обчислюють по формулі:

$$N_{\phi} = \frac{C}{5}. \quad (1)$$

Після цього проводять вимір активності позитивних контрольних зразків

$$K(+) = \frac{N_1 + N_2 + N_3}{3} - N_{\phi}. \quad (2)$$

у пробірках 1 - 3. Середнє значення (ДО+) кількості зареєстрованих імпульсів обчислюють по формулі:

Потім одержують результати активності негативних зразків у пробірках 4-10. Середнє значення ДО(-) кількості зареєстрованих імпульсів обчислюють по формулі:

$$K(+) = \frac{N_1 + N_2 + N_3}{3} - N_{\phi}.$$

$$K(-) = \frac{N_4 + N_5 + \dots + N_9 + N_{10}}{7} - N_{\phi}.$$

Для підтвердження правильності постановки аналізу обчислюють значення відношення ДО(+) / ДО(-). При цьому відношення повинне бути не менш 5. Якщо отриманий результат відношення відповідає установленій величині, тоді приступають до розрахунку нижньої межі позитивних результатів (N_m) для досліджуваних проб з використанням формули:

$$N_m = 2,1 K(-) + N_{\phi}.$$

При інтерпретації отриманих результатів враховують, що якщо кількість зареєстрованих лічильником імпульсів при вимірі активності ^{125}I у

досліджуваній пробі перевищує величину N_m , то дана біопроба (чи сироватка, плазма) розглядається як вміщуюча HBsAg.

У правильно експлуатованому кристалічному сцинтиляційному лічильнику тло не повинне перевищувати 100 імп/хв. Високе тло (100 імп/хв чи більше) може виникати з кількох причин:

- 1) неправильне налаштування електричної схеми;
- 2) забруднення кристала ізотопом;
- 3) забруднення гнізда для проб;
- 4) наявність джерела сильного випромінювання, розташованого неподалеку від кристала. Шляхи усунення перешкод складаються в багаторазовому промиванні детергентом і етанолом кристалу і гнізда й усунення сильного джерела випромінювання від γ -лічильника.

Помилка рахунка радіоактивності зразків приблизно пропорційна квадратному кореню з загального числа імпульсів. Так для 100 імпульсів помилка складає 10 імпульсів, чи 10%.

Розглянемо приклад обробки результатів аналізу. Допустимо кількість фонових імпульсів, зареєстрованих γ -лічильником за 5 хвилин, склало 490. Тоді використовуючи формулу (1) одержимо, що $N_{\phi} = 98$ імп. При виї активності позитивних контрольних зразків кількість зареєстрованих

$$K(+) = \frac{5061 + 4497 + 4923}{3} - 98.$$

імпульсів для номерів проб 1, 2, 3 склало відповідно 5061, 4497, 4923. Використовуючи формулу (2), одержуємо середні значення $DO(+) = 4729$

$$K(-) = \frac{565 + 525 + 436 + 489 + 416 + 479 + 518}{7} - 98.$$

імпульсів. При вимірі активності негативних контрольних зразків кількість зареєстрованих імпульсів склало для номерів проб: 4 - 565; 5 - 525; 6 - 436; 7 - 489; 8 - 416; 9 - 479; 10 - 518, використовуючи формулу (3) одержуємо середню величину $DO(-) = 392$ імпульсів. Значення відношення $DO(+) / DO(-) = 4729/392$, склало $DO(+) / DO(-) = 12,1$, тобто > 5 , що підтверджує

$$N_m = 2,1 \times 392 + 98 .$$

правильність постановки досліду. Нижня межа позитивних результатів визначається за допомогою формули (4).

При підстановці значень у формулу одержуємо результат $N_m=921$ імпульсів. Таким чином, усі значення зареєстрованих імпульсів при вимі у біопробах, перевищуючі величину N_m , розглядаються як вміщуючі Hb_sAg .

Усі негативні результати, отримані за допомогою набору, є істинно негативними. Серед отриманих позитивних результатів, можливо, будуть представлені і “невірнопозитивні”. Ймовірні причини розбіжностей можуть бути зв'язані з:

- забрудненням проб матеріалом позитивних зразків;
- радіоактивне забруднення пробірок;
- недостатнє промивання пробірок з $^{125}I-Hb_sAg$ після інкубації;

Усі випадки відмінності результатів у дублікатах рекомендується перевіряти ще раз повторною постановкою аналізу.

Якщо позитивні результати підтверджуються, то їх варто вважати істинно позитивними, а якщо не підтверджуються - “невірнопозитивними ” і розцінювати як негативні.

Матеріали й устаткування:

1. Досліджуваний біоматеріал: сироватка чи плазма, що містить вірус.
2. Піпетки на 1 мл із грушами, чи дозатори на 0,1 мл.
3. γ -лічильник для виміру активності радіонукліда ^{125}I .
4. Водоструминний насос з пасткою для збору рідини.
5. Стрічка поліетиленова з липким чи шаром плівка поліетиленова.
6. Пробірки пластмасові з імобілізованими Ат до Hb_sAg .
7. Штатив для пробірок.
8. Вода дистильована.
9. Воскові олівці.

Контрольні запитання

1. Охарактеризуйте принцип класичного методу РІА.
2. Використання РІА.
3. Опишіть принцип методу РІА з використанням рідкої фази.

ЗАНЯТТЯ 10. ВИЯВЛЕННЯ АНТИГЕНІВ ВІРУСІВ МЕТОДОМ ФЛЮОРЕСЦУЮЧИХ АНТИТІЛ (МФА)

Мета заняття: Познайомитися з принципом і використанням методів імунофлуоресценції; опанувати методикою постановки прямої реакції імунофлуоресценції для виявлення *Rickettsia prowazekii*.

Пряма реакція імунофлуоресценції була запропонована А. Кунсом (Coons), Х. Кричем і Р. Джонсом у 1941 р. Надалі Р. Меллорс, Уілер і Кунс описали модифікацію методу - непряму реакцію імунофлуоресценції в 1954 р.

Третім основним варіантом реакції імунофлуоресценції (РІФ) є метод сендвіча. Варіанти методу РІФ не є кількісними. Д. Парк, Р. Харді і Л. Герценберг розробили проточний цитофлуориметр системи FACS у 1983 р. З його допомогою флуоресцуючі антитіла, зв'язані з поверхнею одиночних кліток, наприклад лімфоцитів, можуть бути визначені кількісним методом.

Проточний цитофлуориметр складається з лазерного сортувальника клітин, з'єднаного з комп'ютером. РІФ міцно увійшла в лабораторну практику. Безсумнівними перевагами є простота методу, мала витрата часу і реагентів, висока чутливість і гнучкість аналізу. Для РІФ досить 10^5 мікробних клітин у 1 мл, тоді як для реакції аглютинації 10^7 - 10^8 кл/мл. При діагностиці рикетсійних захворювань чутливість методу вище традиційних у 100-1000 разів. Метод дозволяє також виявити близько 10^5 молекул антигену при розподілі на клітині радіусом 12 мкм.

Подальший розвиток методу спрямований на приєднання Аг до твердої фази (сефадекс, пластикові поверхні), що дозволяє поліпшити кількісну оцінку

методу і підвищення чутливості методу без посилення неспецифічних реакцій. Наприклад, приєднання Ат до ліпосом (флуоресцуючих часток).

РІФ широко застосовується при виявленні й ідентифікації:

- бактеріальних інфекцій (шигелльозів, колієнтеритів, черевного тифу, дизентерії, гонореї, сифілісу), хламідіоза, рикетсіозів;
- інфекцій, викликаних вірусом грипу, респираторно-синцитіальним вірусом, вірусом Епштейна-Барр, цитомегаловірусом;
- зовнішніх структур мікроорганізмів (жгутиків, пилів, капсул);
- ізоантигенних варіантів у популяції соматичних клітин; рецепторів і антигенів тваринних клітин, Т- і В- лімфоцитів;
- злоякісних новоутворень на клітинному рівні;
- аутоантитіл (антиядерного фактору, антимитохондріального фактору, до щитовидної залози, при міхурчатці і пемфігоїді), аналізі Аг, що викликають утворення аутоантитіл;
- вивчення біосинтезу Ig, транспорту, шляхів проникнення через слизові оболонки, протитрепонемних Ат у сироватці крові і спинномозкової рідини, Ат до правцевого анатоксину.

Для реакції імунофлуоресценції характерні недоліки, що полягають у власній флуоресценції бактерій, вірусів, клітин тварин і рослин в УФ і синіх променях, перехресних імунологічних реакціях, неспецифічному фарбуванні матеріалу міченими імунореагентами.

Уникнути помилкових результатів вдається шляхом постановки відповідних контролів, адсорбції гомогенатом органів, заморожування і відтавання, промивання і цілого ряду інших методик

Принцип методу. Метод ґрунтується на візуальному спостереженні реакції антиген – антитіло, шляхом маркірування одного з двох компонентів флуорохромом без зміни його імунологічних властивостей. Реакцію відзначають, використовуючи флуоресцентний мікроскопом.

Не зв'язану мічену сироватку видаляють промиванням. У якості мітки застосовують флуоресцеїнізотіоціанат (ФІТЦ) - зелене світіння (520 нм) в УФ - світлі і тетраметилродамінізотіоціанат (ТРІТЦ) – оранжево-червоне світіння.

Мічені антитіла повинні володіти фізико-хімічною гомогенністю, тому найбільше часто використовують моноклональні антитіла. Ig баранів чи кози забарвлюються більш інтенсивно, чим кролячі, тому їх мітить ФІТЦ (1 молекула Ig приєднує 2-5 молекул барвника), а білки кролика – ТРІТЦ (1 молекула зв'язується з молекулою Ig).

Застосування методу дозволяє установити наявність антигену і знайти антитіла. У залежності від умов експерименту розрізняють наступні варіанти постановки РІФ:

Пряма реакція імуофлуоресценції ґрунтується на взаємодії антитіл, мічених флуорохромом, з гомологічним антигеном, локалізованим в клітині чи на клітині, зрізах тканин, мікробах і вірусах (рис. 3).

Використання антисироваток (суміш анти-Ig і анти-Ig), з'єднаних із флуорохромами (ФІТЦ і ТРІТЦ) при різних довжинах хвиль, можна одночасно на тому самому препараті виявляти 2 різних антигени.

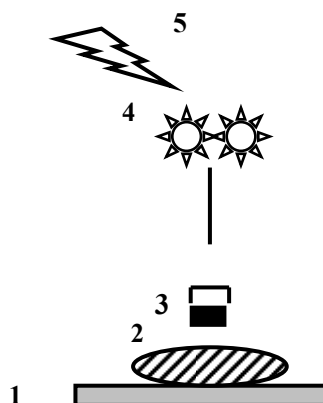


Рис. 3. Принцип прямої реакції імуофлуоресценції:

предметне скло (1); мікроорганізм (2); Про-антиген (3); мічене флуоресцеїном антитіло (4); УФ-промені (5).

Метод досить простий, однак вимагає мічення антитіл, специфічних до кожного нового антигену. Широке поширення одержало також маркування антитіл біотином і наступне виявлення їх за допомогою флуоресцентно міченого авидина.

- Метод гальмування флуоресценції, заснований на конкурентному зв'язуванні антигену немаркованими і маркованими флуорохромом антитілами, що обумовлює зменшення флуоресценції в залежності від концентрації.

Непряма реакція імунофлуоресценції, ґрунтується на тому, що спочатку одержують антитіла першого порядку (Ат1), імунізуючи антигеном, наприклад, кроликів. У той же час отримують антитіла проти імуноглобулінів кроликів, імунізуючи ними барана (Ат2).

Антитіла другого порядку (Ат2) – мітять флуорохромом і одержують імунореагенти, за допомогою яких можна виявити локалізацію і кількість кролячих Ат1, що зв'язалися з гомологічним антигеном (рис. 4).

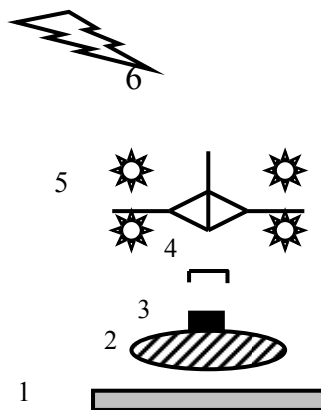


Рис. 4. Принцип непрямої реакції імунофлуоресценції:

предметне скло (1); мікроорганізм (2); Про-антиген (3); немічене антитіло Ат1 (4); мічене флуоресцеїном анти-Ig Ат2 (5); Уф-промені (6).

Метод дозволяє використовувати обмежений набір мічених антисироваток. Наприклад, кролячі Ат1 різної специфічності можна визначати за допомогою мічених флуорохромом Ат2 до імуноглобулінів кролика. З

одним Ат1 може одночасно зв'язатися трохи мічених Ат2, що забезпечує більш інтенсивне світіння.

Максимальне молярне співвідношення Ат1 до Ат2 – від 1:4 до 1:12. Застосування кон'югатів антисироваток до індивідуальних важких ланцюгів Ig, дозволяє напівкількісно оцінити розподіл антитіл по класах і підкласах. Метод найбільш адекватний при визначення наявності Ат (Ig, Ig і Ig) до протеїнів вірусу Епштейна-Барр.

- Непрямий метод гаптенізованих антитіл ґрунтується на тому, що до молекул Ат1 (антиаллотипічної чи іншої специфічності) ковалентно приєднують трохи гаптенних угруповань (рис. 5).

Після приєднання специфічність і активність антитіл не змінюється. Гаптенні залишки кон'югують з антитілом, що не має загальних антигенних детермінант з Ат1. Потім проводять імунізацію тварин і одержують антитіла до гаптенних епітопів, що маркують флуорохромом (ФІТЦ чи ТРІТЦ) і використовують у якості Ат2.

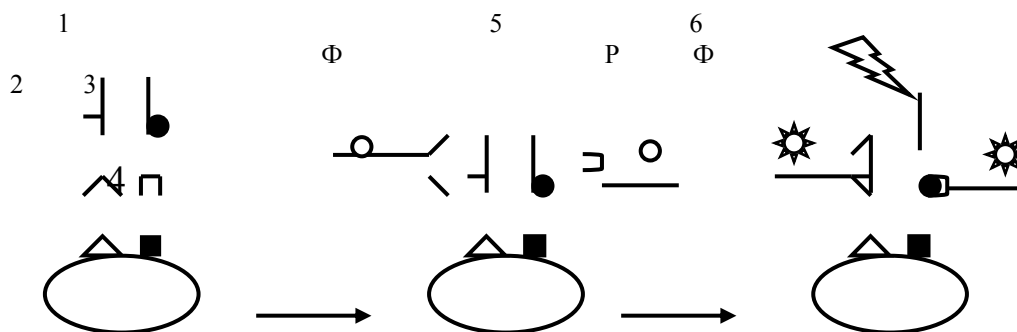


Рис. 5. Принцип непрямого методу гаптенізованих антитіл:

гаптенізовані антитіла Ат1 (1); поверхневі антигени клітини (2 і 3); В-клітина (4); вторинні антитіла Ат2 (5), мічені ФІТЦ (Ф) чи ТРІТЦ (Р); УФ-промені (6)

За допомогою методу можна виявити антигени двох специфічностей на одній клітині. У лабораторній практиці використовується для дослідження рецепторів і аллоантигенів лімфоцитів, наприклад, диференціровочних Ia, H-2K^K, Thy-1,2 аллоантигенів мишачих лімфоцитів.

- Непряма антикомплементарна реакція імуофлуоресценції ґрунтується на індикації зв'язування комплексу. Для проведення реакції антиген обробляють імунною сироваткою і компліментом морської свинки. Потім промивають і наносять антикомплементарну сироватку, мічену ФІТЦ.

Використовуючи люмінесцентний мікроскоп, відзначають пофарбований у жовто-зелений чи насичено-зелений колір імунний комплекс із комплементом.

Труднощі, зв'язані з одержанням антикомплементарної сироватки і її мічення обмежують використання цього методу. Метод розроблений на моделі рикетсій Гольдвассером і Шепардом у 1958 р.

- FTA-200 тест чи флуоресцентний тест виявлення антитіл проти *Treponema pallidum*. Убиті і фіксовані на носії трепонеми інкубують із сироваткою хворого, а потім з маркованим антигамаглобуліном. Результат оцінюють за допомогою флуоресцентного мікроскопа.

Чутливість непрямої реакції імуофлуоресценції ще більше підвищується при використанні третіх антитіл. Однак, якщо збільшується чутливість, то зменшується специфічність, і тому потрібно ретельна постановка контролів. Непрямі методики більш трудомісткі, вимагають більше часу і більшої кількості контрольних експериментів.

Метод сендвіча розроблений для виявлення специфічних антитіл, наприклад, до полісахариду пневмокока (рис. 6.)

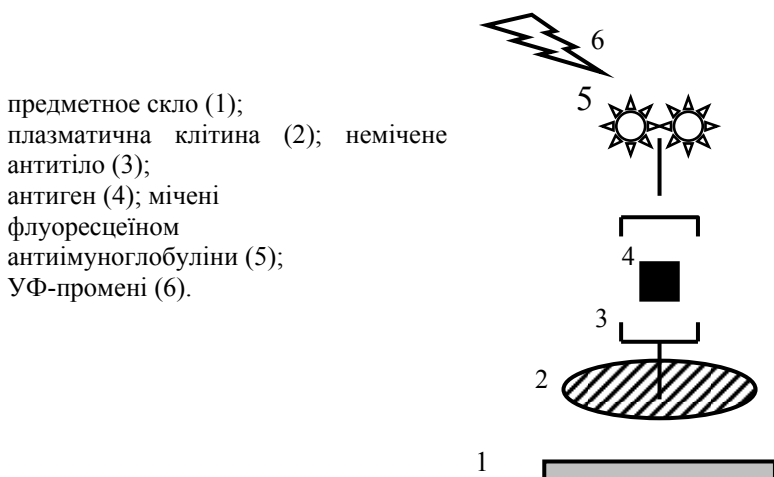


Рис. 6. Принцип методу сендвіч

Молекули антигену розташовуються між антитілами, утвореними в клітинах, і тими, котрі додані як другий шар. Антитіла другого шару мічені флуоресцеїном.

Умови проведення прямої реакції імунофлуоресценції:

- 1) досліджуваний біоматеріал з підозрою на вміст рикетсій;
- 2) люмінесцуючі антитіла до *Rickettsia prowazekii*;
- 3) температура 18-25 °С.

Практичне завдання: Провести лабораторну діагностику рикетсій.

- виявити *Rickettsia prowazekii* прямим імунофлуоресцентним методом у рідкому матеріалі (суспензії).

Методика постановки прямої реакції імунофлуоресценції:

Діагностикум рикетсійний Провачека являє собою ліофілізовані рикетсії Провачека, інактивовані формаліном і очищені методом диференціального центрифугування в сполученні з ефірною обробкою. У день постановки РІФ діагностикум розчиняють у 2 мл 0,9% розчину NaCl. Час розчинення не повинен перевищувати 2 хвилини.

Мазки для дослідження готують на ретельно знежирених предметних стеклах. Рідкий матеріал (суспензію діагностикуму) наносять на скло у виді краплі і розподіляють тонким рівним шаром. Після висушування на повітрі всі препарати фіксують протягом 15-20 хвилин етиловим спиртом 96° і потім промивають водопровідною водою.

Приготовлені препарати фарбують флуоресцуючими антитілами. У виді пофарбованої таблетки Ig укладені в ампулу. Вони являють собою висушену ліофільним способом глобулінову фракцію імунної сироватки, до якої хімічним шляхом приєднаний флуоресцуючий барвник (ФІТЦ).

Перед використанням сухі люмінесцуючі антитіла розчиняють у 0,5 мл дистильованої води, а потім розводять 0,9% NaCl (р 7,2-7,4) до робочого розведення. Тому що робоче розведення може відрізнятися від зазначеного в паспорті, рекомендується визначити барвний титр заздалегідь.

За барвний титр сироватки приймають те максимальне розведення, що ще забезпечує флуоресцентне фарбування препарату з яскравістю на 3-4 хреста (критерій обліку дивися нижче).

Робоче розведення в 2 рази менше барвного титру. Для визначення барвного титру і робочого розведення, оброблені мазки поміщають у вологу камеру, а потім пастерівською піпеткою наносять на них краплі флуоресцуючої сироватки в різних розведеннях.

Час фарбування повинен бути відпрацьований експериментально, при фарбування мікроорганізмів звичайно застосовують 15 хвилинну експозицію у вологій камері.

Після цього мазки ретельно тричі промивають розчином фізіологічного розчину по 10 хвилин чи проточною водопровідною водою і підсушують на повітрі. На мазок наносять краплю суміші (9 частин гліцерину + 1 частина 0,9% NaCl) і покривають покривним склом.

Наприклад, якщо паспортне значення титру антитіл складає 1:32, тоді готують ряд розведень 1:16; 1:8; 1:4; 1:2. У ході аналізу було встановлено, що інтенсивність флуоресценції на 4 плюси зареєстрована для барвного титру 1:8, тоді робоче розведення складає в цьому випадку 1:4. Розчин робочого розведення флуоресцентної сироватки можна зберігати при температурі +2 °C - +6 °C протягом 2-х тижнів.

Обов'язковою умовою є наявність трьох контролів. Обробляються флуоресцуючими антитілами суспензії:

- 1) гомологічних бактерій: “+” контроль;
- 2) гетерологічної культури: “-” контроль;
- 3) незараженого матеріалу: “-” контроль.

Облік і оцінку результатів аналізу починають з перегляду препаратів у падаючому світлі. Для цього використовують флуоресцентні мікроскопи будь-яких систем з порушенням світіння з синьо-фіолетовою областю спектра.

Для одержання яскравого світіння рикетсій необхідно ретельно центрувати освітлювальну систему мікроскопа і підібрати відповідні фільтри.

При роботі на люмінесцентному мікроскопі (МЛ-2) використовують фільтри: ФС-1-2; СС-15-2; Б-С-82. Замикаючий фільтр Т-2-Н; об'єктив 90^x, апертура 1,25; окуляр 10^x, сила струму при мікроскопії 4,5А.

На предметне скло фіксованого препарату наносять краплю високоякісної не флуоресцуючої імерсійної олії чи х. ч. диметилфталат.

У позитивних випадках *Rickettsia prowazekii* мають чітке жовто-зелене світіння, що може локалізуватися по периферії клітини на темному тлі препарату.

При роботі з досліджуваними суспензіями необхідно мати як контроль мазок з корпускулярного антигену *Rickettsia prowazekii*, оброблений розведенням флуоресцуючих рикетсійних антитіл.

Інтенсивність світіння оцінюють з використанням чотири хрестової системи:

“++++” – дуже яскрава флуоресценція по периферії мікробної клітини, чітко контрастуюча з тілом клітини,

“+++” – яскрава флуоресцуюча периферія клітини,

“++” – слабке світіння периферії клітини,

“+” – дуже слабке світіння периферії клітини,

“–” – флуоресценція клітин відсутня.

Позитивними можуть вважатися препарати зі світінням рикетсій не нижче ніж на “++”. Для підтвердження отриманих результатів препарати переглядають методом фазово-контрастної мікроскопії.

Найбільш часто зустрічаються наступні варіанти помилок:

- кон'югат, що довго зберігався, викликає випадання по всьому субстраті.
- при недоліку рідини чи при її випаровуванні з камери спостерігається крайовий ефект.
- присихання сироваток чи кон'югата викликає неспецифічну флуоресценцію.
- при роботі з іншими флуорохромами в лабораторії можливе забруднення препарату.

- використання при мікроскопії різних об'єтивів приводить до суб'єктивного сприйняття інтенсивності флуоресценції, зв'язане з різною апертурою об'єтивів.
- суміші антитіл до різних антигенів препарату приводять до перекручувань у зв'язку з взаємним впливом антитіл.

Матеріали й устаткування:

1. Діагностикум рикетсійний Провачека корпускулярний сухий.
2. Піпетки на 1 мл із грушами, чи дозатори на 0,1 мл.
3. Фізіологічний розчин.
4. Люмінесцуючі антитіла до *Rickettsia prowazekii*.
5. Дистильована вода.
6. Пробірки.
7. Предметні стекла.
8. Водопровідна вода.
9. Етиловий спирт 96°.
10. Волога камера.
11. Покривні стекла.
12. Гліцерин.
13. Люмінесцентний мікроскоп (МЛ-2).
14. Не флуоресцуюча олія чи х.ч. диметилфталат.

Контрольні питання

1. Опишіть принцип методу прямої і непрямой реакції імунофлуоресценції.
2. Опишіть принцип непрямого методу гаптенізованих антитіл.
3. Опишіть принцип методу сандвіч.

ЗАНЯТТЯ 11. БАКТЕРІОФАГИ ЯК АВТОНОМНІ ГЕНЕТИЧНІ ЕЛЕМЕНТИ БАКТЕРІЙ. ЛІЗИС ЯК СТРАТЕГІЯ РОЗВИТКУ БАКТЕРІОФАГА T7 *ESCHERICHIA COLI*.

Мета заняття: встановити морфологію негативних колоній (БУО) бактеріофага T7, встановити титр фага T7, препаративно одержати фаг T7

методом зливного лізису, ознайомитися з методикою концентрування часток фага Т7 методом ПЕГ-преципітації (процедура Ямамото).

Причетність таких автономних генетичних елементів (АГЕ) як плазмід, бактеріофаги і транспозони до формування нових варіантів бактерій, більш адаптованих до умов оточуючого середовища, за рахунок горизонтального перенесення генів патогенності є безперечним науковим фактом сучасної бактеріології, а також одним з аспектів загальнобіологічної проблеми, безпосередньо пов'язаної з горизонтальним потоком генів у бактеріальних популяціях і асоціаціях. Завдяки перенесенню генів між спорідненими бактеріями, які заселяють певну екологічну нішу розширюються їх адаптивні можливості, а також з'являються нові штами і формується біорізноманіття.

Відомо, що прояв патогенності у ентеробактерій має безпосереднє відношення до автономних генетичних елементів. На теперішній час найбільш ґрунтовно досліджено АГЕ інфекційно небезпечних бактерій, де їх причетність до патогенних процесів не викликає ніякого сумніву.

Бактеріофаг Т7 є типовим представником родини фагів Т7 і звичайно вважається облігатно вірулентним фагом. Генетичну карту фага Т7 було побудовано у 1969 році. В цей час також було виявлено і досліджено декілька фагових ферментів, які приймають участь у реплікації і транскрипції ДНК. Завдяки цьому Т7 швидко зосередив на собі увагу вчених. З бактеріофагом Т7 досить легко працювати у лабораторії, він швидко росте і зараз є добре дослідженим. Усі ці переваги зробили Т7 провідною модельною системою для експериментальної молекулярної еволюції і еволюційної генетики.

Бактеріофаг Т7 дає великі зони лізису на газоні *E. coli*, які продовжують зростати зі збільшенням терміну інкубації. Т7 не спричиняє постійної контамінації в лабораторних умовах через те, що швидко гине при висиханні.

Геном фага Т7 має 39 937 п.н. і складається з 56 відомих або потенційних генів. На кінцях генома Т7 існують прямі півтори розміром 160 п.н. Також встановлено, що *in vitro* після рестрикції ендонуклеазами можуть утворюватись кільцеві форми, які не були виявлені *in vivo*.

1-й день

Приготування нічної культури *E. coli* BE

Хід роботи

Бактеріальною культурою *E. coli* BE, яка виросла на твердому МПА, інокулюємо 3 мл МПБ. Інкубуємо 8 – 12 годин при 37 °С.

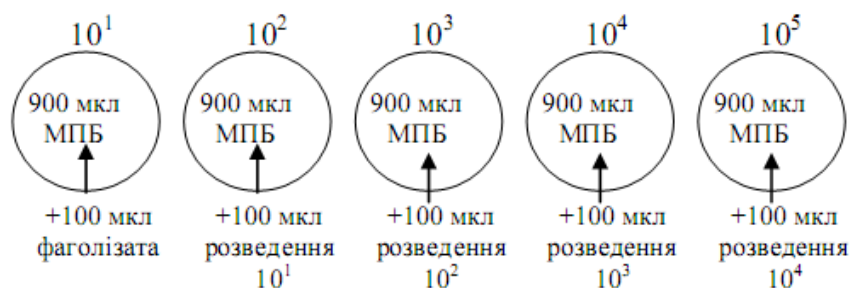
2-й день

Титрування фага T7

Хід роботи

1. Нічну культуру *E. coli* BE розводимо 1:50. Для цього до 3 мл МПБ додаємо 60 мкл нічної культури. Інкубуємо 2 години при 37 °С до концентрації 2×10^8 кл/мл.
2. Титрування бактеріофага T7 здійснюємо методом серійних десятикратних розведень.

Для цього з вихідного штока фага T7 відбираємо 100 мкл фаголізата і вносимо у 900 мкл стерильного МПБ. Отримуємо перше десятикратне розведення, де ступінь вмісту фагових часток складає 10^{-1} відносно вихідного фаголізата, а кратність розведення 10^1 .



Новим наконечником відбираємо 100 мкл з отриманого першого розведення і вносимо у 900 мкл стерильного МПБ. Отримуємо друге десятикратне розведення, кратність розведення фаголізата в якому складає 10^2 відносно вихідного фаголізата і т.д. У наступні 900 мкл бульону додаємо 100 мкл попереднього розведення. Готуємо таким чином 5 розведень. Наприкінці усі

розведення будуть мати об'єм по 900 мкл, а останнє - 1000 мкл. Розведення зберігаємо у холодильнику.

3. Фагові розведення наносимо на чашки з двошаровим агаром. Для цього стовпчик з напіврідким МПА (вміст агара 0,5%) об'ємом 5 мл розтоплюємо на водяній бані (воду доводимо до кипіння). Охолоджуємо водяну баню зі стовпчиком до 55 °С.
4. В охолоджений стовпчик з м'яким МПА додаємо 500 мкл двогодинної культури *E. coli* ВЕ, трохи збовтуємо і акуратно виливаємо на чашку з шаром твердого МПА (вміст агара 1,5%). Даємо застигнути при кімнатній температурі.
5. Наносимо 5 мкл певного розведення фага у вигляді чотирьох і більше краплин на один з 4-8 секторів чашки. Залишаємо на 5-10 хвилин до повного вбирання рідини.
6. Двошарові чашки інкубуємо 18 – 20 годин при 37 °С.
7. Готуємо нічну культуру *E. coli* ВЕ (див. День 1).

3-й день

Титрування фага Т7 (продовження)

Титр фагових часток підраховуємо за формулою

$$\underline{T = (n/m) \times R, \text{ де}}$$

T – титр фага;

n – кількість негативних колоній;

m – об'єм суспензії, що висівається на чашку, в мл – 0,005

R – кратність розведення.

Препаративне отримання фага Т7 методом зливного лізису

Підходящим розведенням фаголізата для накопичення фагових часток у препаративних кількостях буде те розведення, яке дає зливний лізис при висіванні його на чашку з чутливою культурою. Зливний лізис утворюється тоді, коли фагові бляшки розташовуються щільно одна до одної по усій поверхні агарового шару. При цьому можуть бути помітними межі бляшок, але культура чутливої бактерії у газоні відсутня.

Хід роботи

1. Готуємо двогодинну культуру *E. coli* BE (див. День 2, п.1).
2. Після підрощування культури висіваємо на чашки розведення фага, яке дає злитний лізис методом двошарових агарових чашок (див. День 2, п. 2,3,4). В охолоджений стовпчик з м'яким МПА крім 500 мкл двогодинної культури *E. coli* BE також додаємо 100 мкл фагового розведення, трохи збовтуємо і акуратно виливаємо на чашку з шаром твердого МПА (вміст агара 1,5%).
3. Готуємо нічну культуру *E. coli* BE (див. День 1).

4-й день

Концентрування часток фага T7 методом ПЕГ-преципітації (процедура Ямамото)

Хід роботи

1. Чашку Петрі зі злитним лізисом чутливої культури заливаємо 10 мл МПБ і шпателем Дригальського знімаємо шар верхнього агара у стерильну колбу.
2. До суспензії додаємо приблизно 1 мл хлороформа.
3. Агар розбиваємо на магнітній мішалці при 4 °С 1,5-2 години.
4. Отриману суспензію центрифугуємо 45 хвилин при 5000 об/хв (2200 g) при +10 °С.
5. Після центрифугування надосадову рідину зливаємо у стерильну колбу, а осад повторно відмиваємо половинним об'ємом МПБ. Супернатант після відмивання з'єднуємо з попереднім та зберігаємо при +4 °С. Стерилізуємо хлороформом.

Процедура Ямамото

1. У стерильний пеніциліновий флакон переносимо 5 мл отриманого фаголизата.
2. До нього додаємо 10% поліетиленгліколя 6 000 (ПЕГ) – 500 мг, залишаємо у холодильнику для розчинення.

3. Після розчинення ПЕГ додаємо 292 мг NaCl. Кінцева концентрація NaCl може складати від 1 до 0,5 М. Залишаємо у холодильнику на ніч.

5-й день

Концентрування часток фага Т7 методом ПЕГ-преципітації (продовження)

1. Центрифугуємо 5 мл фаголізата 15 хвилин при 5 000 об/хв (2200 g).
2. Осад ресуспендуємо в 0,5 мл буфера для концентрування (10 mM тріс HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl).
3. Отриману суспензію переносимо у пробірку Епендорфа і додаємо 0,3 мл хлороформа. Струшуємо приблизно 5 хв.
4. Центрифугуємо 5 хвилин при 11 000 об/хв (8800 g) на мікроцентрифузі.
5. Супернатант переносимо у стерильну пробірку Епендорфа і додаємо 200 мкл хлороформа. Струшуємо 5 хв.
6. Центрифугуємо 5 хвилин при 11 000 об/хв на мікроцентрифузі.
7. Супернатант (фаголізат) відбираємо у стерильну пробірку Епендорфа і зберігаємо у холодильнику при + 4 °C.

Матеріали й устаткування:

1. Чашки Петрі
2. Пеніцилінові флакони
3. Мікробіологічні петлі
4. Автоматичні дозатори
5. Імунологічні планшети на 24 лунки стерильні для приготування розведень бактеріофага
6. МПБ, МПА (з 0,7 і 1,5 % вмістом агару)
7. Пробірки
8. Термостат
9. Шейкер-інкубатор
10. pH метр

- 11.Центрифуги (мікроцентрифуга фірми Eppendorf і центрифуга з охолодженням Sigma).
12. Етиловий спирт 96 %
13. Мікропробірки типу еппендорф стерильні.
- 14.Хлороформ.

Контрольні запитання

1. Охарактеризуйте автономні генетичні елементи бактерій.
2. Опишіть основні етапи методу титрування вірусів бактерій.
3. Перерахуйте всі етапи методу концентрування ПЕГ-преципітації бактеріофагів.
4. В якій фазі росту використовується бактеріальна культура при роботі з бактеріофагами.
5. За якою формулою здійснюється підрахунок титру бактеріофага.

СПИСОК РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Букринская А. Г. Вирусология. М., 1986. – 336 с.
2. Вирусология. Методы / Под ред. Б. Мейхи. – М. : Мир. – 1988. С. 309-310.
3. Девис Р., Бодстайн Д., Рот Дж. Методы генетической инженерии. Генетика бактерий. – М. :Мир,1984. – 176 с.
4. Дреслер К. Иммунология: Словарь. / Под ред. проф. А. Е. Вершигоры. – К. : Выща шк. – 1988. – 224 с.
5. Жумінська Г. І., Коротаєва Н. В., Товкач Ф. І. – Одеса : Одеський національний університет імені І. І. Мечникова, 2016. - 62 с.
6. Иммунологические методы / Под ред. Г. Фремеля. – М. : Медицина. – 1987. - С. 148-161.
7. Иммунология: Практикум / Е. У. Пастер, В. В. Овод, В. К. Позур, Н. Е. Вихоть. – К. : Выща шк. – 1989. – С. 153-155.
8. Инструкция по применению набора реактивов для иммунорадиометрического анализа поверхностного антигена гепатита В с использованием радионуклида ^{125}I (ИРМА-НВ_sAg - ^{125}I). – Ташкент : Фан. – 1989. – 8 с.
9. Коротяев А. И., Бабичев С. А. Мед. микробиол., иммунол. и вирусология. СПб., 1998. 2000, 2001.
10. Лабораторний практикум з молекулярної біотехнології і біоінформатики: методичний посібник. / Ж. Ю. Сергєєва, Н. В. Ліманська, Т. В. Іваниця та ін.
11. Лурия С., Дарнелл Дж., Б. Балтимор, Э. Кэмпбелл Общая вирусология. М., 1981. – 600 с.
12. Павлович С. А. Основы иммунологии. – Минск : Высшая шк. – 1997. – С. 106-108.
13. Посібник з медичної вірусології / Під ред. В. М. Гиріна. – К.: Здоров'я, 1995. – 367 с.

14. Практикум із загальної вірусології / за ред.. А.Л. Бойка. – К.: Видавничий центр «Київський університет», 2000. – 269 с.
15. Ройт А. Основы иммунологии. – М.: Мир. – 1991. – 327 с.
16. Руководство по лабораторной диагностике вирусных и риккетсиозных болезней / Под ред. В. И. Гаврилова, Н. К. Кекчеева. – М. : Медицина. – 1965. - С. 544-553.
17. Троценко Н. И., Белоусова Р. В., Преображенская Э. А. Практикум по ветеринарной вирусологии. - М. : Агропромиздат, 1989. – 287 с.
18. Чард Т. Радиоиммунологические методы / Под ред. Я. М. Варшавского. – М. : Мир. – 1981. – 248 с.
19. Cann A. J. (2005). Principles Of Molecular Virology. // 4th edition, Elsevier Academic Press. — 332 p.

Навчальне видання

Гудзенко Тетяна Василівна
Іваниця Тетяна Володимирівна
Галкін Микола Борисович
Жумінська Ганна Іванівна
Зінченко Оксана Юріївна
Лісютін Геннадій Вікторович

ЗАГАЛЬНА ВІРУСОЛОГІЯ

МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ
ДО ПРОВЕДЕННЯ ЛАБОРАТОРНИХ ЗАНЯТЬ З КУРСУ
для студентів біологічного факультету
ОНУ імені І. І. Мечникова

В авторській редакції

Підп. до друку 20.12.2018. Формат 60х84/16.
Ум.-друк. арк.2,33. Тираж 20 пр.
Зам. № 1826.

Видавець і виготовлювач
Одеський національний університет
імені І. І. Мечникова

Україна, 65082, м. Одеса, вул. Єлісаветинська, 12
Тел.: (048) 723 28 39. E-mail: druk@onu.edu.ua
Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 4215 від 22.11.2011 р. Р 51