

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
імені О. О. БОГОМОЛЬЦЯ**

КАФЕДРА МИКРОБІОЛОГІЇ, ВІРУСОЛОГІЇ ТА ІММУНОЛОГІЇ

**МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ ДЛЯ ПРАКТИЧНИХ ЗАНЯТЬ З
МИКРОБІОЛОГІЇ, ВІРУСОЛОГІЇ ТА ІММУНОЛОГІЇ**

Частина III

Київ - 2020 рік

Зміст

Практичне заняття	ТЕМА	Сторінка
№16	Морфологія і ультраструктура вірусів. Культивування вірусів (1-е заняття)	3
№17	Культивування вірусів. Індикація вірусної репродукції	12
№18	Серологічні реакції, які використовуються у вірусології	18
№19	Ортоміксовіруси. Лабораторна діагностика грипу	24
№20	Параміксовіруси. Лабораторна діагностика параміксовірусів	29
№21	Пікорнавіруси. Лабораторна діагностика ентеровірусних інфекцій	33
№22	Герпесвіруси, аденовіруси. Лабораторна діагностика герпесу та аденовірусних інфекцій	38
№23	Збудники вірусних гепатитів. Лабораторна діагностика вірусних гепатитів	43
№24	Ретровіруси. ВІЛ. Лабораторна діагностика ВІЛ-інфекції	48
	Рекомендована література	52

Практичне заняття № 16

Тема: «Морфологія і ультраструктура вірусів. Культивування вірусів (1-е заняття)»

Актуальність теми:

Віруси є етіологічним чинником великої групи інфекційних захворювань, різноманітних за клінічними проявами та перебігом, які характеризуються високою контагіозністю та здатністю викликати епідемії та пандемії. На даний час вірусологія, ще нещодавно будучи вузькою дисципліною, є однією з медико-біологічних дисциплін, що інтенсивно розвиваються.

Важливість вірусології зумовлена, насамперед, провідною роллю вірусів в інфекційній патології людини. Їх питома вага зростає по мірі зниження захворюваності бактеріальними, грибовими та протозойними інфекціями на фоні обмеженості засобів специфічної хіміотерапії. По-друге, на моделях вірусів (як найбільш просто організованих форм життя) вирішують багато фундаментальних питань біології та молекулярної генетики (наприклад, вчення про інтрони, сплайсинг та онкогени). Одним з найбільших вкладів вірусології в сучасну науку вважають відкриття зворотної транскриптази, використання якої лежить в основі генної інженерії.

Знання даної теми є необхідним для розуміння патогенезу вірусних захворювань на клінічних кафедрах. В практичній роботі лікаря це є важливим для клініко-морфологічної диференційної діагностики вірусних і інших інфекційних захворювань. На занятті студентам надається можливість оволодіти методами культивування культур клітин, методом інфікування культур клітин вірусомісним матеріалом, що є необхідним для формування у студентів уявлення про методи діагностики вірусних захворювань.

Конкретні цілі:

- Тракувати морфологію і ультраструктуру вірусів.
- Аналізувати особливості взаємодії вірусів з живими системами.
- Аналізувати методи культивування вірусів в лабораторних умовах.

Базові знання, вміння, навички, необхідні для вивчення теми (міждисциплінарна інтеграція)

Назви попередніх дисциплін	Отримані навички
Анатомія людини	Аналізувати інформацію про будову тіла людини, системи, що його складають, органи і тканини
Гістологія, цитологія, ембріологія	Інтерпретувати мікроскопічну та субмікроскопічну структуру клітин
Медична і біологічна фізика	Тракувати загальні фізичні та біофізичні закономірності, що лежать в основі біологічних процесів.
Медична біологія	Пояснювати на молекулярно-біологічному та клітинному рівні закономірності біологічних процесів

Медична хімія	Трактувати загальні фізико-хімічні закономірності, що лежать в основі процесів розвитку клітин
---------------	--

Перелік основних термінів, параметрів, характеристик, які повинен засвоїти студент при підготовці до заняття:

Термін	Визначення
Вірус	Неклітинна форма живих істот, яка характеризується малими розмірами, відсутністю власних білоксинтезуючих та енергієгенеруючих систем, а також облігатним внутрішньоклітинним паразитизмом. Віруси існують у двох якісно різних формах: позаклітинній – віріон та внутрішньоклітинній – вірус.
Нуклеокапсид	Білковий футляр (капсид), що оточує одну молекулу нуклеїнової кислоти (ДНК або РНК), разом формують нуклеокапсид. Капсиди утворені з білкових субодиниць (поліпептидів), які називають капсомерами.
Суперкапсид (пеплос)	Зовнішня оболонка складних вірусів, що містить ліпіди та пронизана вірусоспецифічними білками глікопротеїдами. Структурною субодиницею суперкапсидної оболонки є пепломер.
Продуктивна інфекція	Тип взаємодії вірусу і клітини, при якому вірус функціонує в клітині автономно, а його репродукція відбувається незалежно від репродукції клітинного генетичного апарата. При цьому утворюється нове покоління інфекційних вірусів.
Абортивний тип взаємодії вірусу з клітиною	Тип взаємодії вірусу і клітини, при якому цикл репродукції вірусів блокується на одній із стадій, а інфекційні віріони не утворюються.
Інтегративний тип взаємодії вірусу з клітиною	Тип взаємодії вірусу і клітини, при якому з клітиною взаємодіють онкогенні РНК- та ДНК-геномні віруси, а нуклеїнова кислота інтегрується в клітинну хромосому та існує там у вигляді провірусу. В результаті може спричинитися зміна спадкових властивостей клітини. Такий процес об'єднання вірусної нуклеїнової кислоти з хромосомою клітини-хазяїна має назву вірогенії.
Дефектні віруси	Віруси, що втратили в процесі репродукції частину свого геному. Їх поділяють на 4 групи: дефектні інтерферуючі частинки, інтегровані геноми, віруси-супутники та псевдовіріони.

Теоретичні питання до заняття:

- Сучасне визначення вірусів, погляди на природу і походження вірусів. Місце вірусів у системі живого.
- Історія відкриття і головні етапи розвитку вірусології. Внесок вітчизняних вчених.
- Принципи класифікації вірусів. Основні властивості вірусів людини і тварин.
- Морфологія і ультраструктура вірусів. Типи симетрії вірусів. Хімічний склад, функції складових частин вірусів.
- Репродукція вірусів. Етапи та види взаємодії вірусів з чутливими клітинами.
- Бактеріофаг, історія вивчення. Структура, класифікація фагів за морфологією. Методи якісного і кількісного визначення бактеріофагів. Практичне використання бактеріофагів.
- Форми взаємодії бактеріофагів з бактеріальною клітиною. Вірулентні і помірні фаги. Характеристика продуктивної взаємодії. Лізогенія і фагова конверсія.

Практичні завдання, які виконуються на занятті:

- Вивчити морфологічні та структурні особливості вірусів, їх взаємодію з клітинами.
- Охарактеризувати методи культивування вірусів.
- Дослідити клітинні культури, їх використання у вірусології, а також поживні середовища для вирощування клітин.
- Здійснити інфікування клітинних культур вірусомісним матеріалом. Методи підготовки матеріалу для вірусологічного дослідження.

Зміст теми:

На практичному занятті студенти знайомляться з методикою забору, обробки та транспортування матеріалу для вірусологічного дослідження, приготуванням матеріалу для інфікування живих систем; вивчають зразки живильних середовищ, розчинів та сироваток, що використовуються при роботі з клітинними культурами; вивчають на демонстраційних препаратах різні види культур клітин, які використовуються у вірусології; порівнюють методи культивування вірусів у різних чутливих системах (клітинних культурах, курячих ембріонах, чутливих лабораторних тваринах); проводять інфікування культури клітин вірусомісним матеріалом, інфікування курячих ембріонів та лабораторних тварин. Виконані завдання студенти записують у протокол та підписують його у викладача.

Рекомендації для оформлення протоколу

Представники основних родин вірусів і тварин

Родина	Найважливіші представники	Будова, «+» або «-» нитка нукл. к-ти
РНК-вмісні віруси		
Пікорнавіруси	Ентеровіруси (віруси поліомієліту, Коксакі, ЕСНО, серотипів 68-71,	проста будова, + нитка

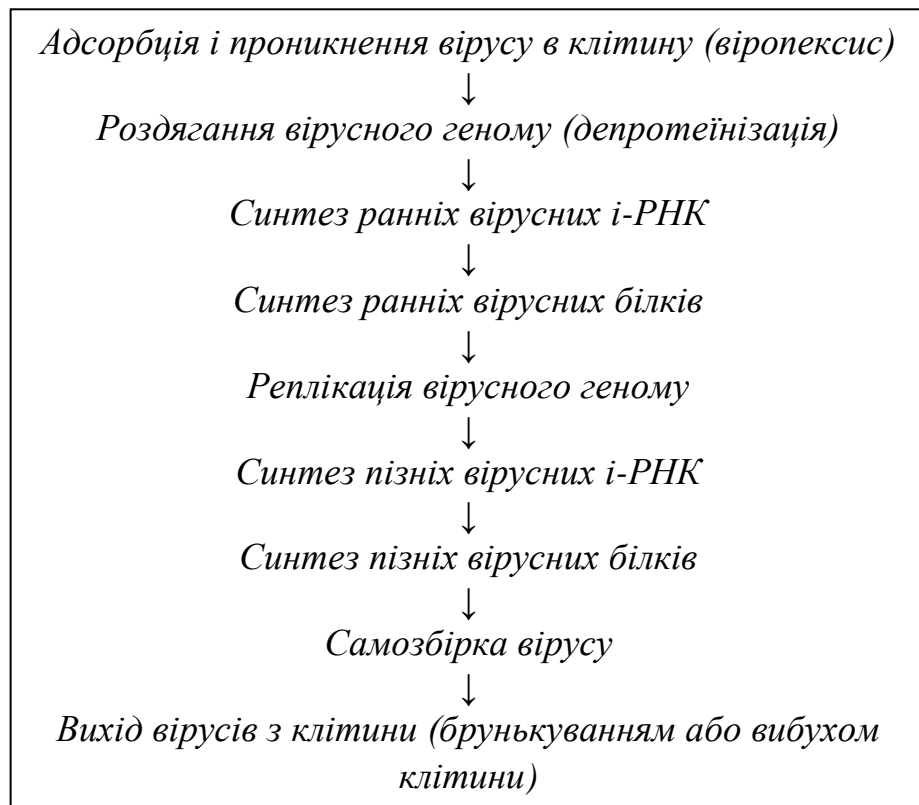
	гепатиту А), риновіруси, афтовіруси (віруси ящуру), кардіовірус	
Каліцивіруси	Віруси гастроентериту (Норфолк)	проста будова, + нитка
Реовіруси	Реовіруси, ротавіруси, орбівіруси	проста будова, 2-ниткова
Ретровіруси	Вірус імунодефіциту людини (ВІЛ), вірус Т-клітинного лейкозу, онковіруси	складна будова, + нитка
Тогавіруси	Альфавіруси, вірус краснухи	складна будова, + нитка
Флавівіруси	Віруси кліщового енцефаліту, японського енцефаліту, пропасниці Денге, жовтої пропасниці	складна будова, + нитка
Буньявіруси	Вірус кримської геморагічної пропасниці	складна будова, - нитка
Аренавіруси	Вірус лімфоцитарного хориомеїнігїту (ЛХМ), хвороба Ласса	складна будова, - нитка
Філовіруси	Віруси Магбург, Ебола	складна будова, - нитка
Рабдовіруси	Віруси сказу, везикулярного стоматиту	складна будова, - нитка
Коронавіруси	коронавіруси	складна будова, + нитка
Параміксовіруси	Віруси парагрипу людини (ВПГЛ), паротиту, кору, респіраторно-синтиціалний (РС) вірус	складна будова, - нитка
Ортоміксовіруси	Віруси грипу	складна будова, - нитка
ДНК-вмісні віруси		
Аденовіруси	Аденовіруси	проста будова
Парвовіруси	Вірус В-19	проста будова
Герпесвіруси	<i>Альфа-герпесвіруси</i> (вірус простого герпесу 1 і 2 типів (ВПГ-1, ВПГ-2), вірус вітряної віспи, оперізуючого лишая), <i>бета-герпесвіруси</i> (цитомегаловірус (ЦМВ)), <i>гамма-герпесвіруси</i> (віруси Епштейна-Барр (ВГЛ-4))	складна будова
Поксвіруси	Вірус натуральної віспи (ВНВ), вірус віспи корів (вісповакцини)	складна будова
Гепаднавіруси	Вірус гепатиту В (ВГВ)	складна будова

Основні методи культивування вірусів:

- 1- зараження лабораторних тварин
- 2- зараження курячих ембріонів
- 3- зараження клітинних культур

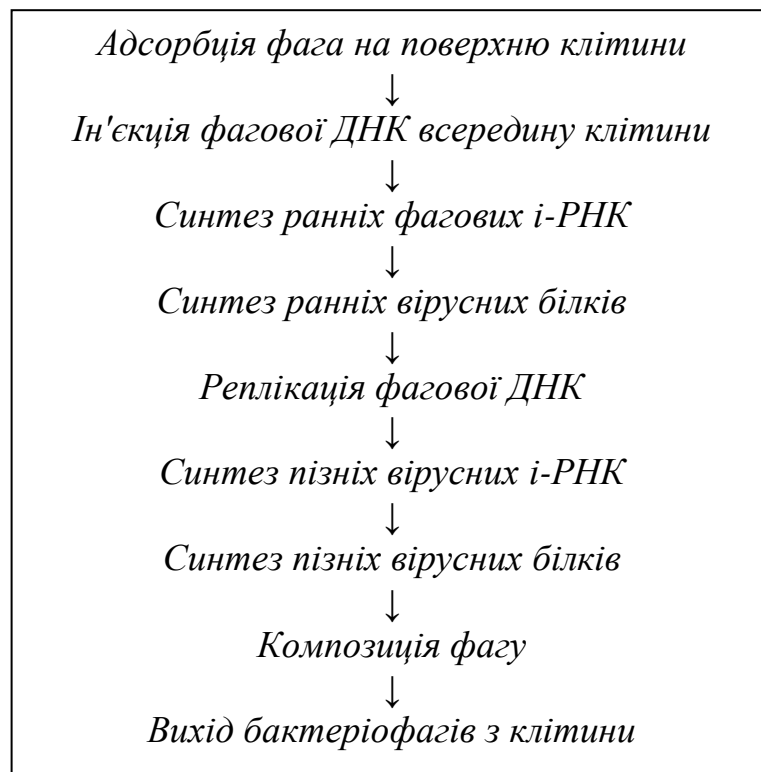
Типи вірусної інфекції: проуктивний, абортивний, вірогенія

Етапи репродукції вірусу в чутливій клітині:



Типи взаємодії фага з клітиною: продуктивний, абортивний, лізогенія

Фази взаємодії бактеріофага з бактеріальною клітиною:



Класифікація культур тканин і клітин, які застосовуються у вірусології

1. Тканинні або органі культури			
Тканини зародкового органу або його частини, які підтримуються <i>in vitro</i> і зберігають диференціацію клітин і їх функції			
2. Клітинні культури			
Характеристики	Первинно-трипсинізовані культури клітин	Перещеплювані культури клітин	Диплоїдні культури клітин
Морфологія клітин порівняно з вихідною тканиною	Не відрізняється	Відрізняється	Відрізняється
Набір хромосом	Диплоїдний	Гетероплоїдний	Диплоїдний
Тривалість життя	Обмежена 1-3 пасажами	Не обмежена кількістю пасажів	Обмежена 20-100 пасажами
Ріст в суспензії	Не можливий	Можливий	Не можливий
Ознаки малігнізації	Відсутні	Завжди є	Відсутні
Період генерації	3-7 днів	2/3-1 дні	1-15 днів
Контактне пригнічення при вирощуванні на склі	Є	Відсутнє	Є
Приклади	1. Культура клітин нирок мавп 2. Культура клітин фібробластів ембріона людини 3. Культура клітин фібробластів курячого ембріона	1. HeLa (з карциноми шийки матки) 2. KB (з карциноми ротової порожнини людини) 3. HEp-2 (карцинома гортані людини) 4. Vero (з нирки зеленої мавпи)	Лінії клітин фібробластів ембріона людини (WI-38, MRC-5, MRC-9, IMR-90), корів, свиней, овець

Класифікація поживних середовищ для культур клітин

Природні	Ферментативні гідролізати	Синтетичні
Середовище Ендерса: 85-90% коров'ячої амніотичної рідини; 5-10% коров'ячого ембріонального екстракту, 5% кінської сироватки	Амінопептид Гемогідролізат Гідролізат лактальбуміну	Збалансовані сольові розчини: розчин Ерла, розчин Хенкса, розчин Дульбекко і Фогта Підтримуючі середовища: середовище 199, середовище Ігла, ДМЕМ (середовище Ігла, модифікована Дульбекко), MEM (середовище Мельника-Ігла)

Середовища для культури клітин, що застосовують в вірусології, поділяють на 2 основні категорії – **ростові** та **підтримуючі**.

Ростові середовища (РС) завдяки високому вмісту сироватки, сприяють швидкому клітинному росту. Після формування моношару та перед інокуляцією вірусу ростове середовище видаляють та замінюють підтримуючим середовищем. Для приготування ростового середовища до поживного середовища (наприклад, ДМЕМ), додають 5-10% сироватки великої рогатої худоби (ВРХ) або ембріональної телячої сироватки (ЕТС) і антибіотики (пеніцилін і стрептоміцин).

Підтримуючі середовища (ПС) з низьким вмістом сироватки дозволяють зберегти культури клітин в стані повільного стійкого метаболізму в період розмноження вірусу.

Завдання №1. На демонстраційних препаратах ознайомитись з різними розчинами, поживними середовищами та сироватками, які використовуються у вірусології.

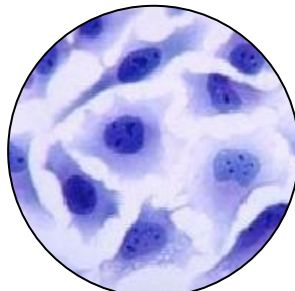
Середовище 199	Включає понад 60 компонентів, в тому числі: повний набір амінокислот, 16 вітамінів, коферментів, азотисті основи, мінеральні солі, глюкозу та інші компоненти.
Середовище Ігла	Містить 13 амінокислот, 8 вітамінів. Мінеральні солі, глюкозу
Середовище Ігла ДМЕМ (подвійне)	Містить амінокислоти, вітаміни. Мінеральні солі, глюкозу та інші компоненти. Використовують для культивування вимогливих до поживних речовин клітин
Гідролізат лактальбуміну 0,5%	Природне поживне середовище, яке містить продукти ферментації лактальбуміну і стимулятори росту
Примітка	Середовище 199, Ігла, гідролізат лактальбуміну готуються на збалансованих сольових розчинах. Названі середовища можуть бути використані як ростові середовища (РС) та як підтримуючі середовища (ПС). Для одержання РС необхідно додати антибіотики (до концентрації 100 ОД пеніциліну та 100 мкг стрептоміцину в 1 мл) та 5-15 % сироватки крові, що забезпечує ріст та розмноження клітин та запобігає бактеріальній контамінації. Для отримання ПС додають антибіотики та не більше 2 % сироватки крові, що забезпечує лише виживання клітин в сформованому моношарі.
Розчин Хенкса, Ерла (збалансовані сольові розчини)	Мають певний хімічний склад, рН, буферність, ізотонічність, містять глюкозу. Вони використовуються при виготовленні поживних середовищ, промиванні культур клітин та при створенні спеціального поживного покриття для виявлення бляшок на моношарі клітин.

Розчин Версену 0,02 %	Використовують для знімання клітин зі скла. Версен – це комплексон, який зв'язує йони двохвалентних катіонів (Mg^{++}), які забезпечують зв'язок клітини між собою та склом.
Розчин трипсину 0,25 %	Застосовують для роз'єднання тканини на окремі клітини при виготовленні первинно-трипсинізованих культур та для знімання клітин зі скла.
Розчин натрію гідрокарбонату 7,5%	Використовують для встановлення рН в живильних середовищах та сольових розчинах.
Сироватка крові великої рогатої худоби (новонароджених телят, ембріональна сироватка)	Використовують без консервантів як джерело білку та факторів росту під час приготування середовищ росту та підтримки.

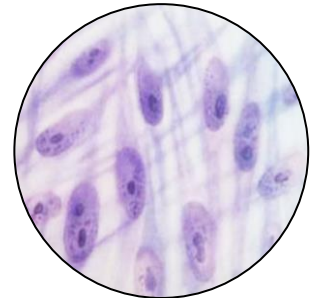
Завдання №2. На демонстраційних препаратах ознайомитись з різними видами моношарових клітинних культур, які використовуються у вірусології, замалювати в протокол.



Первинні



Перещеплювані



Диплоїдні

Питання для самоконтролю

- Які ознаки покладені в основу сучасної класифікації вірусів?
- Властивістю усього живого є здатність до самовідтворення. Для вірусів існує один тип розмноження. Як він називається? У чому його суть?
- Які особливості репродукції РНК- та ДНК – геномних вірусів? В чому полягає роль зворотної транскриптази при репродукції ретровірусів?
- Віруси є досить стійкими в довкіллі, до дії стерилізуючих та дезінфікуючих факторів та засобів. Які особливості структури вірусів зумовлюють цю властивість і сприяють розвитку вірусних епідемій та пандемій?
- Первинною моделлю для культивування вірусів були лабораторні тварини. Назвіть їх, вкажіть переваги та обмеження їх застосування.

- Віруси відносно просто можна отримати у великій кількості одним з методів культивування. Про яку систему культивування вірусів йдеться? Чому її не можна вважати універсальною?
- Віруси є особливими паразитами клітин людини, тварин і рослин. Як цю особливість вірусів було використано для культивування вірусів *in vitro*?
- Яка відмінність дії помірних та вірулентних бактеріофагів? Яке їх практичне використання?

Практичне заняття №17

Тема: «Культивування вірусів. Індикація вірусної репродукції»

Актуальність теми:

Діагностика вірусних інфекцій в більшості випадків базується на виділенні вірусу з інфекційного матеріалу та його подальшій ідентифікації. Правильне взяття матеріалу для дослідження, своєчасна доставка його в лабораторію з дотриманням умов для збереження збудника, вірне обрання методів культивування та ідентифікації вірусів дозволить своєчасно встановити діагноз вірусного захворювання. Метою даного заняття є навчитися проведенню індикації вірусної репродукції. Для досягнення цієї мети необхідно вміти виявляти віруси у різних чутливих системах (клітинних культурах, курячих ембріонах, чутливих лабораторних тваринах); розрізняти різні види ЦПД у культурі клітин; знати методiku постановки реакцій бляшкоутворення під агаровим та бентонітовим покриттям; проводити облік “кольорової проби”, що поставлена з метою індикації вірусів у культурі клітин, облік реакції гемадсорбції та реакції гемаглютинації. На практичному занятті студенти мають можливість ознайомитись з різними методами індикації вірусів, навчитися інтерпретувати отримані результати.

Конкретні цілі:

- Аналізувати особливості взаємодії вірусів з живими системами.
- Оцінювати результати розмноження вірусів в живих системах.
- Аналізувати методи культивування вірусів в лабораторних умовах.

Базові знання, вміння, навички, необхідні для вивчення теми (міждисциплінарна інтеграція). Дивись практичне заняття №16.

Перелік основних термінів, параметрів, характеристик, які повинен засвоїти студент при підготовці до заняття:

Термін	Визначення
Цитопатична дія вірусу (ЦПД)	Видимі під мікроскопом морфологічні зміни клітин, що виникають в результаті внутрішньоклітинної репродукції вірусів.
Включення	Скупчення віріонів чи окремих їх компонентів в цитоплазмі чи ядрі клітин, що виявляються під мікроскопом при спеціальному забарвленні. Вірус натуральної віспи утворює цитоплазматичні включення - тільця Гварнієрі. Віруси герпесу та аденовіруси утворюють внутрішньоядерні включення.
Бляшки	Обмежені ділянки зруйнованих вірусами клітин, культивованих на поживному середовищі під агаровим чи бентонітовим покриттям, що видно як світлі плями на фоні забарвлених або покритих бентонітом живих клітин. Один віріон утворює потомство у вигляді однієї бляшки.

Реакція гемаглютинації (РГА)	Реакція, що заснована на здатності деяких вірусів викликати аглютинацію (склеювання) еритроцитів за рахунок вірусних глікопротеїнових шипів – гемаглютининів.
Реакція гемадсорбції	Здатність культур клітин, інфікованих гемаглютинуючими вірусами, адсорбувати на своїй поверхні еритроцити.
Кольорова реакція	Реакція, що оцінюється за зміною кольору індикатора, що знаходиться в поживному середовищі культивування. Якщо віруси не розмножуються в культурі клітин, то живі клітини в процесі метаболізму виділяють кислі продукти, що призводить до зміни рН середовища, а відповідно і кольору індикатора. При репродукції вірусу нормальний метаболізм клітин порушується, внаслідок чого клітини гинуть, а середовище зберігає свій первинний колір.

Теоретичні питання до заняття:

- Методи вивчення вірусів, їх оцінка.
- Особливості взяття, обробки та транспортування матеріалу для вірусологічних досліджень.
- Методика підготовки вірусомісного матеріалу та техніка інфікування чутливих до вірусів систем.
- Методи культивування вірусів, їх оцінка.
- Реакції вірусної гемаглютинації і гемадсорбції. Механізм, практичне значення, використання, діагностична цінність.
- Цитопатична дія вірусів (ЦПД). Класифікація ЦПД вірусів.

Практичні завдання, які виконуються на занятті:

- Поставити реакцію гемаглютинації (РГА) з метою виявлення вірусу в алантоїдній рідині курячого ембріону, визначити титр вірусу.
- Виявити вірусну репродукцію в клітинних культурах за цитопатогенною дією (ЦПД), бляшкоутворенням, «кольоровою» пробою, реакцією гемадсорбції.
- Вивчити різні види ЦПД вірусів.

Зміст теми:

На практичному занятті студенти знайомляться з методами виявлення вірусів у різних чутливих системах (клітинних культурах, курячих ембріонах, чутливих лабораторних тваринах); вчать виявляти вірус в культурі клітин за цитопатичною дією; вивчають різні види ЦПД у культурі клітин; знайомляться з методикою постановки реакцій бляшкоутворення під агаровим та бентонітовим покриттям; вивчають вірусні бляшки у культурі клітин під агаровим та бентонітовим покриттям; здійснюють облік “кольорової проби”, що поставлена з метою індикації вірусів у культурі клітин; здійснюють облік реакції гемадсорбції, що поставлена з метою індикації вірусів у культурі клітин; здійснюють облік реакції гемаглютинації, що поставлена з метою індикації вірусів у хоріоалантоїсній рідині курячого ембріону. Виконані завдання студенти записують у протокол та підписують його у викладача.

Рекомендації для оформлення протоколу.

Методи індикації вірусів

Виявлення цитопатичної дії вірусів (ЦПД) у культурі клітин.

ЦПД – це дегенеративні зміни в клітинах, що проявляються в результаті репродукції в них вірусів

Тип ЦПД		Віруси, що викликають ЦПД
Повна деструкція		поліовіруси віруси Коксакі віруси ЕСНО
Часткова деструкція	за типом гронуутворення	аденовіруси
	за типом вогнищевої деструкції	вірус віспи вірус грипу
	за типом симпластоутворення	вірус кору вірус паротиту вірус парагрипу РС-вірус вірус герпесу
Проліферація		онкогенні віруси

Поява внутрішньоядерних включень, що виявляють при забарвленні за Романовським-Гімзе, при люмінесцентній мікроскопії, електронній мікроскопії.

Бляшкоутворення під агаровим та бентонітовим покриттям.

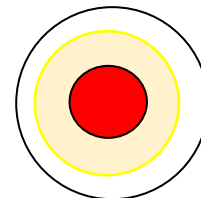
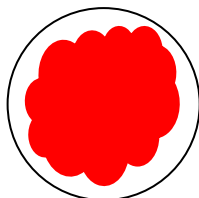


Бляшки під агаровим покриттям



Бляшки під бентонітовим покриттям

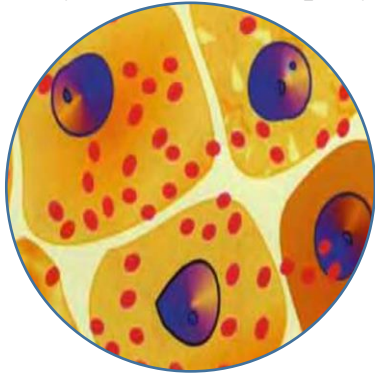
Реакція гемаглютинації (РГА).



“+” реакція у вигляді «парасольки» “-” реакція у вигляді щільного диску

Реакція гемадсорбції

Властива лише тим гемаглютуючим вірусам, чії гемаглютиніни здатні вбудовуватись в мембрану клітини-хазяїна



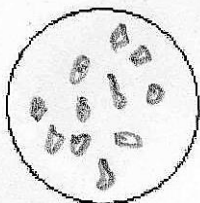
Кольорова проба

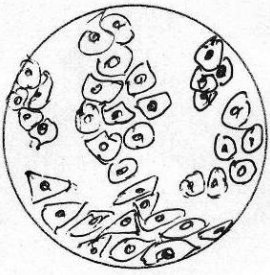

В результаті життєдіяльності клітин в поживному середовищі (ПС) накопичуються кислі продукти, які призводять до відповідної зміни рН середовища (жовтий). При зараженні культури клітин цитопатогенними вірусами пригнічується метаболізм клітин та рН середовища не змінюється (середовище залишається червоним).

Виявлення розмноження вірусів в курячих ембріонах

Частина ембріона	Віруси	Ознака розмноження
Жовточний мішок	вірус простого герпесу	загибель ембріону
Хоріон	вірус простого герпесу поксвіруси вірус саркоми Рауса	утворення бляшок
Алантаїс	вірус грипу	затримка розвитку ембріону та його капіляротоксикоз, гемаглютинація
	вірус паротиту	загибель ембріону
Амніон	вірус грипу	гемаглютинація
	вірус паротиту	загибель ембріону

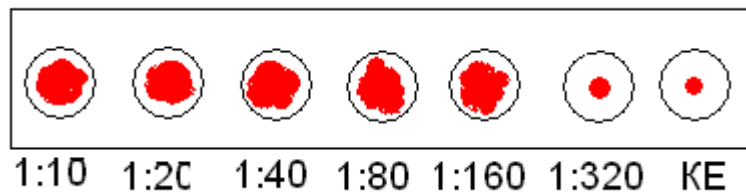
Завдання 1. На демонстраційних препаратах вивчити різні види ЦПД вірусів.

Тип ЦПД	Віруси, що викликають ЦПД	Вигляд ЦПД
Повна деструкція	Віруси поліомієліту, віруси Коксаки, віруси ЕСНО	 Дегенерація клітин

За типом гроноутворення	Аденовіруси	 ЦПД за типом гроноутворення
За типом симпластоутворення	Вірус кору, вірус паротиту, вірус парагрипу, вірус герпесу	 ЦПД за типом симпластоутворення

Завдання 2. Здійснити облік реакції гемаглютинації з метою виявлення вірусів грипу в хоріоналантоїсній рідині та зробити висновок.

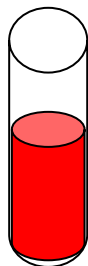
РГА – це склеювання еритроцитів під дією вірусів.



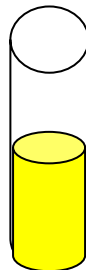
Розведення вірусовмісної рідини.

KE- контроль еритроцитів.

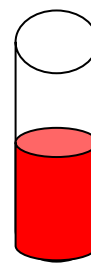
Завдання 3. Провести облік кольорової проби



Вихідний колір
поживного
середовища



Зміна кольору як
наслідок метаболізму
клітин ПС



Збереження кольору
ПС як наслідок
репродукції вірусу

Питання для самоконтролю.

- Після інфікування клітинних культур з наступним інкубуванням пробірок в термостаті спостерігається помутніння середовища підтримки. Про що це свідчить?
- Які біологічні ознаки характерні для репродукції вірусу в курячому ембріоні?
- Як і коли можна використати реакцію гемаглютинації (РГА) для індикації вірусів?
- Які ознаки репродукції вірусу при культивуванні вірусу в лабораторних тваринах?
- Культивуючи вірус кору в культурі клітин можна виявити великі багатоядерні клітини. Як можна назвати такі зміни в уражених клітинах? Які ще типи ЦПД можуть викликати віруси в культурі клітин?
- Чи можуть розмножуватись віруси в культурі клітин без появи ЦПД? Якщо так, то яким чином можна виявити репродукцію таких вірусів?

Практичне заняття №18

Тема: «Серологічні реакції, які використовуються у вірусології»

Актуальність теми

Серологічна ідентифікація вірусних антигенів за допомогою стандартних діагностичних сироваток та серологічна діагностика вірусних захворювань на основі виявлення антитіл у досліджуваних сироватках за допомогою стандартних антигенів - діагностикумів є основними напрямками досліджень у практичних вірусологічних та імунологічних лабораторіях. Тому знання та розуміння суті серологічних досліджень, принципів і особливостей постановки серологічних реакцій є запорукою ефективності лабораторної діагностики вірусних захворювань і, відповідно, ефективності їх лікування. Наведені дані свідчать про актуальність теми даного практичного заняття та спрямовані на формування позитивної мотивації її вивчення.

Конкретні цілі:

- Засвоїти закономірності імунітету при вірусних інфекціях.
- Оволодіти основними методами постановки серологічних реакцій, які використовуються у вірусології.

Базові знання, вміння, навички, необхідні для вивчення теми (міждисциплінарна інтеграція). Дивись практичне заняття №16.

Завдання для самостійної праці під час підготовки до заняття.

Перелік основних термінів, параметрів, характеристик, які повинен засвоїти студент при підготовці до заняття.

Термін	Визначення
Комплемент	Складний комплекс білків сироватки крові, який при активації комплексом антиген-антитіло та іншими факторами вивільнює мембраноатакуючі ферменти і забезпечує неспецифічний захист організму від чужорідних агентів клітинної природи.
Діагностичні сироватки	Сироватки імунізованих тварин (кролів, баранів, коней та ін.), які мають високий рівень специфічних антитіл проти певних збудників та їх антигенів.
Моноклональні антитіла	Препарати антитіл, високо специфічних до однієї антигенної детермінанти, одержані з одного клону клітин-продуцентів <i>in vitro</i> .
Діагностикуми	Діагностичні препарати з відомих антигенів.
Гемолітична сироватка	Сироватка крові яка містить антитіла гемолізину. Одержують шляхом 3-4 разової внутрішньовенної імунізації кролика 50% суспензією еритроцитів барана та ін. з наступною інактивацією при температурі 56°C.

Теоретичні питання до заняття:

- Особливості серологічних реакцій, що використовуються в вірусології
- Методика парних сироваток.
- Особливості вірусних діагностикумів.
- Реакція зв'язування комплементу та особливості її застосування в вірусології.
- Реакції, що використовуються виключно у вірусології – реакція гальмування гемаглютинації та гемадсорбції, реакція віруснейтралізації.

Практичні завдання, які виконуються на занятті:

- Ознайомитись з особливостями серологічної діагностики вірусних інфекцій. Здійснити облік реакції зв'язування комплементу (РЗК) з метою серологічної діагностики вірусного захворювання. Обґрунтувати висновок.
- Здійснити облік реакції гальмування гемаглютинації (РГГА), поставленої з метою серологічної ідентифікації виділеного вірусу. Зробити висновок про тип вірусу.
- Здійснити облік реакції гальмування гемаглютинації (РГГА), поставленої з парними сироватками хворого з метою серологічної діагностики грипу, зробити обґрунтований висновок.
- Вивчити схему постановки і зробити облік реакції нейтралізації бляшкоутворення під бентонітовим поживним середовищем з метою серологічної ідентифікації вірусу.
- Провести облік ІФА, що була поставлена з метою виявлення HBsAg у сироватці крові хворих з підозрою на вірусний гепатит В.

Зміст теми.

На практичному занятті студенти вивчають закономірності імунітету при вірусних інфекціях, роль гуморальних і клітинних механізмів, які приймають участь у формуванні імунітету та антигенну будову вірусів. Ознайомлюються з методикою постановки та принципами обліку серологічних реакцій, які використовуються у вірусології: реакції гемаглютинації, реакції гальмування гемаглютинації, реакції зв'язування комплементу, реакції нейтралізації. Проводять облік реакції гальмування гемаглютинації, що поставлена з метою серологічної ідентифікації та діагностики вірусних інфекцій. Здійснюють облік реакції зв'язування комплементу з метою виявлення противірусних антитіл, оцінюють реакцію віруснейтралізації з метою ідентифікації вірусів. Виконані завдання студенти записують у протокол та підписують його у викладача.

Рекомендації для оформлення протоколу.

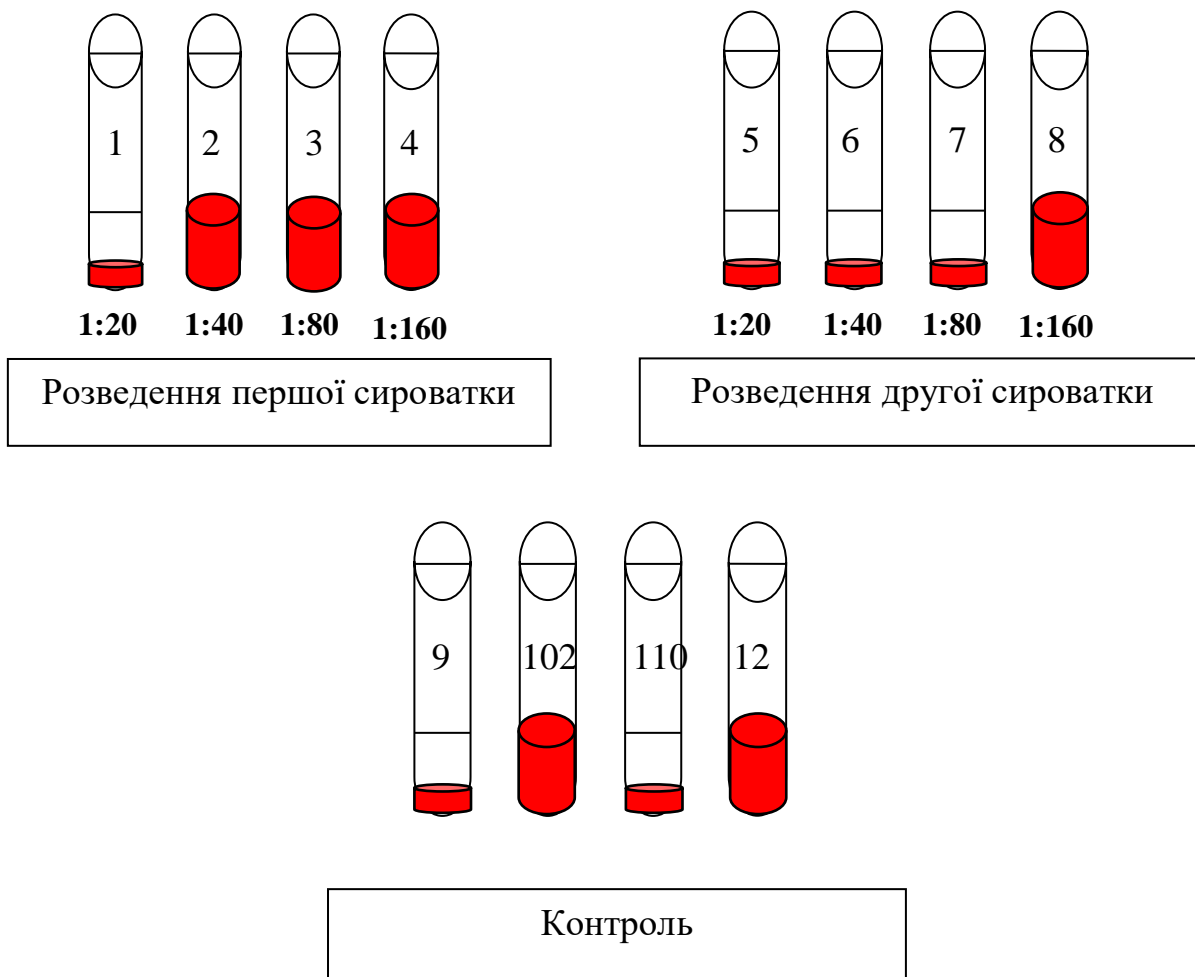
Завдання 1. Ознайомитись з особливостями серологічної діагностики вірусних інфекцій. Здійснити облік реакції зв'язування комплементу (РЗК) з метою серологічної діагностики вірусного захворювання. Обґрунтувати висновок.

Особливості серологічної діагностики вірусних захворювань

1. Антитіла виявляють у парних сироватках, першу беруть на початку хвороби, другу - через 2 тижні.

2. Сироватки позбавляють вірусних інгібіторів.
3. Реакція вважається позитивною, якщо титр антитіл у 2 сироватці збільшився в 4 і більше рази.

Схема постановки РЗК при вірусних інфекціях



Вміст пробірок:

1-4 – розведення досліджуваної сироватки (сироватка + антиген + комплемент).

9 – контроль антигену на гемотоксичність (антиген + фізрозчин + гемолітична система).

10 – контроль антигену на антикомплементальність (антиген + комплемент + фізіологічний розчин + гемолітична система).

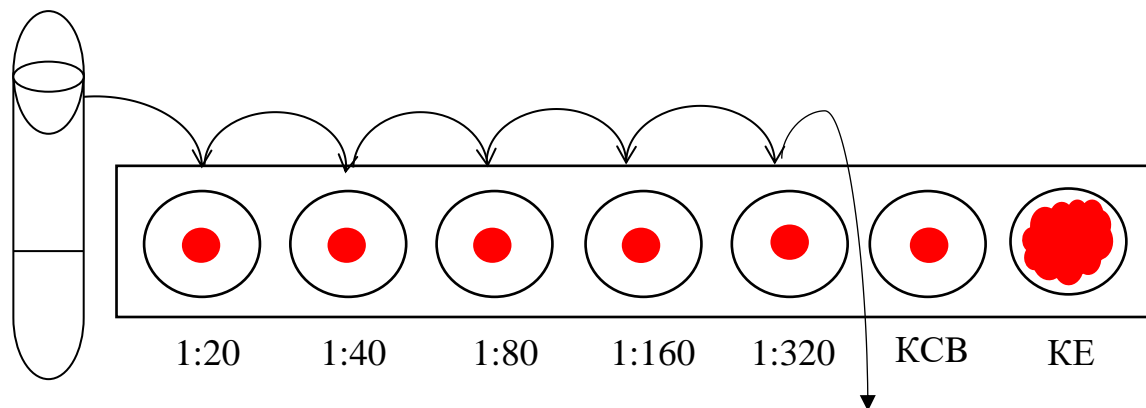
11 – контроль еритроцитів (фізрозчин + еритроцити барана)

12 – контроль комплементу (комплемента + гемолітична система).

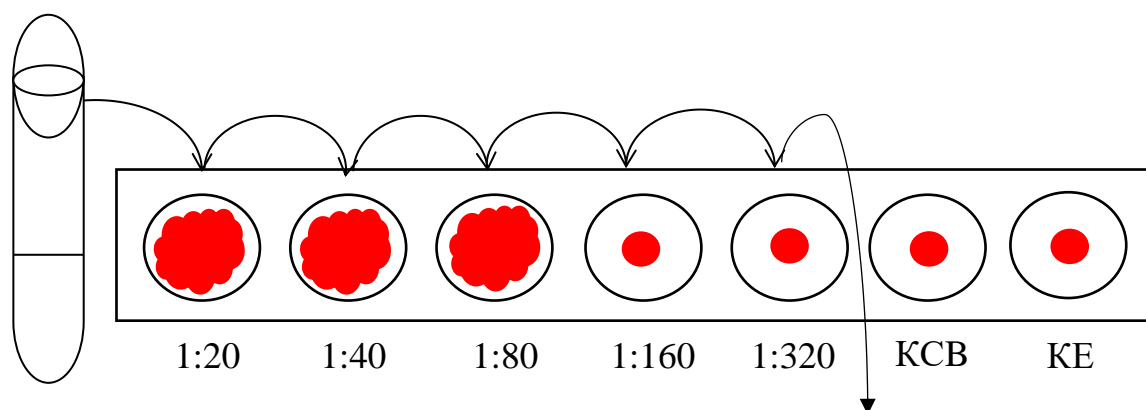
Висновок:

Завдання 2. Здійснити облік реакції гальмування гемаглютинації (РГГА), поставленої з метою серологічної ідентифікації виділеного вірусу. Зробити висновок про тип вірусу.

Схема постановки реакції гальмування гемаглютинації (РГГА) з метою серологічної ідентифікації вірусів грипу



**Діагностична сироватка
грипозна А ТИТР 1:320**



**Діагностична сироватка
грипозна В ТИТР 1:160**

*по 0,25 мл фізіологічного розчину
по 0,25 мл виділеного вірусу
по 0,25 мл 1% суспензії курячих еритроцитів*

КСА – контроль діагностичної сироватки грипозної типу А

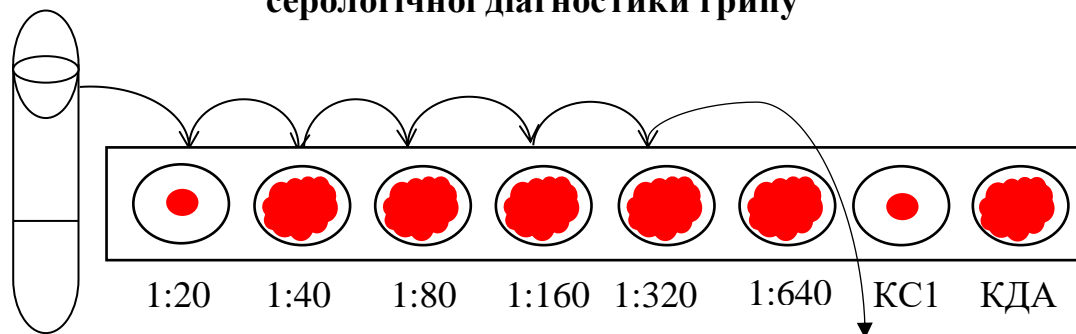
КСВ – контроль діагностичної сироватки грипозної типу В

КЕ – контроль еритроцитів

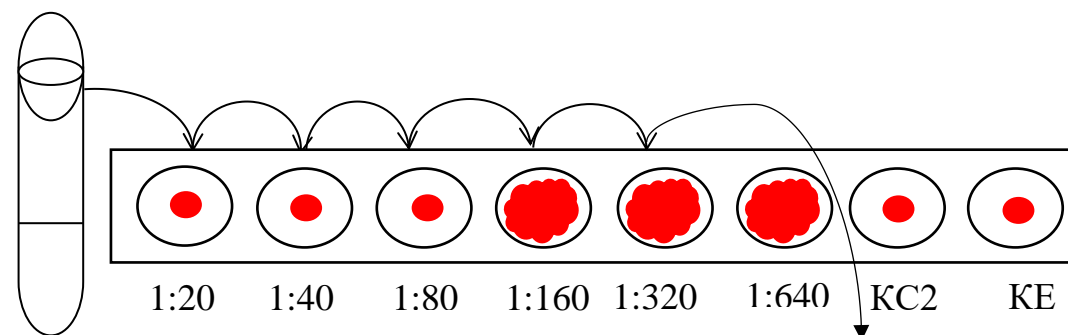
Висновок:

Завдання 3. Здійснити облік реакції гальмування гемаглютинації (РГГА), поставленої з парними сироватками хворого з метою серологічної діагностики грипу, зробити обґрунтований висновок.

Схема постановки реакції гальмування гемаглютинації (РГГА) з метою серологічної діагностики грипу



**Сироватка хворого
(робоче розведення 1:10)
початок хвороби**



**Сироватка хворого
(робоче розведення 1:10)
через 2 тижні хвороби**

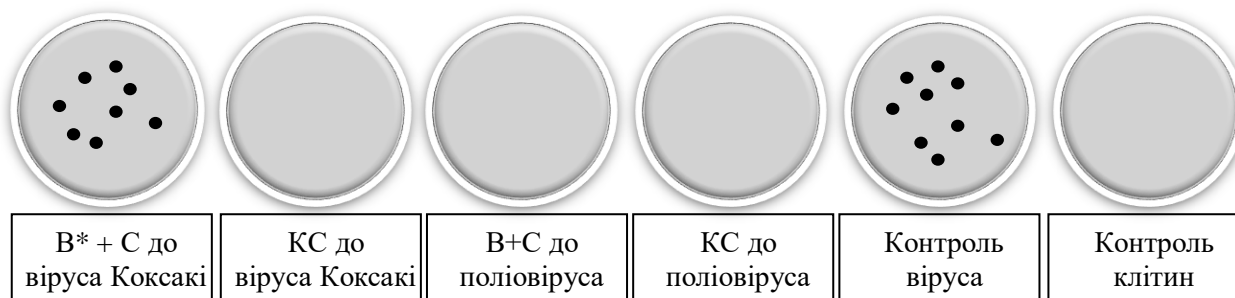
КС – контроль сироватки

КДА – контроль діагностикуму грипозного типу А

КЕ – контроль еритроцитів

Висновок:

Завдання 4. Вивчити схему постановки і зробити облік реакції нейтралізації бляшкоутворення під бентонітовим поживним середовищем з метою серологічної ідентифікації вірусу.



* В – вірус; С – сироватка; КС – контроль сироватки

Завдання 5. Провести облік ІФА, що була поставлена з метою виявлення *HBsAg* у сироватці крові хворих з підозрою на вірусний гепатит В.

Принцип аналізу. Виявлення *HBsAg* в тест-системі «Vitro-Test *HBsAg*» базується на одноетапному «сендвіч»-варіанті ІФА. У лунках планшета адсорбовані моноклональні антитіла, специфічні до *HBsAg*. У кожену лунку додаються зразки сироватки або плазми пацієнта та другі антитіла, кон'юговані з ферментом пероксидазою хрому. Під час інкубації досліджуваних зразків та пероксидазного кон'югату в лунках планшета *HBsAg*, в разі наявності у зразках, зв'язується як з першими антитілами на твердій фазі, так і з другими антитілами, кон'югованими з пероксидазою хрому, утворюючи «сендвіч» антитіло-антиген-антитіло. Незв'язані компоненти видаляються під час відмивання. Імунні комплекси виявляються шляхом додавання розчину хромогену з перекисом водню. Після 30-ти хвилинної інкубації реакція зупиняється додаванням стоп-реагенту. Оптична густина (ОГ) в лунках визначається на спектрофотометрі при довжині хвилі 450/620-695 нм. Інтенсивність жовтого забарвлення пропорційна кількості антигена, зв'язаного на твердій фазі.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
B	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
E	○	○	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○
F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
G	○	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

Для ІФА використовується 96-лунковий мікропланшет.

У лунках *A1* – негативний контроль, *B1* – позитивний контроль, решта лунок – дослідні. Позитивний результат спостерігаються у лунках *E3* та *G2*.

Висновок:

Питання для самоконтролю.

- Які біологічні моделі можна використати для постановки реакції нейтралізації вірусів?
- Які особливості серологічної діагностики вірусних захворювань?
- З якою метою при серологічній діагностиці вірусних інфекцій беруться парні сироватки?
- Особливості постановки реакції зв'язування комплексу при вірусних інфекціях.
- Що таке гемолітична сироватка та як її отримують.
- Що таке гемолітична система?
- Які додаткові контролю потрібно поставити при постановці реакції зв'язування комплексу у вірусології.

Практичне заняття №19

Тема: «Ортоміксовіруси. Лабораторна діагностика грипу»

Актуальність теми

Через широке розповсюдження та високий рівень захворюваності, грип та гострі респіраторні інфекції продовжують залишатись актуальною проблемою системи охорони здоров'я України. Щороку на них хворіють понад 13-20 млн осіб, що складає понад 90 % усіх зареєстрованих інфекцій.

Своєрідність структури та генетики збудників грипу, їх широке розповсюдження не лише серед людей, а й серед тварин, здатність до інтенсивної мінливості і, як наслідок, виникнення тяжких грипозних епідемій та пандемій – все це обумовлює наукову та практичну важливість усіх питань, пов'язаних з грипом. Внаслідок нових екологічних та соціально-економічних умов, забруднення навколишнього середовища, глобального потепління змінюється коло природних хазяїв збудників грипу, контакти між ними, формується підґрунтя для виникнення нових типів грипозних вірусів. Є абсолютно реальна загроза появи пандемічного штаму збудника при рекомбінації вірусів грипу людини та птахів. Наслідки такої пандемії можуть бути катастрофічними у глобальному масштабі. Все це свідчить про актуальність теми заняття та спрямовано на формування позитивної мотивації її вивчення.

Конкретні цілі:

- Засвоїти біологічні властивості вірусів грипу.
- Оволодіти методами вірусологічної та серологічної діагностики грипу.
- Аналізувати основні сучасні підходи до лікування та профілактики грипу.

Базові знання, вміння, навички, необхідні для вивчення теми (міждисциплінарна інтеграція). Дивись практичне заняття №16.

Перелік основних термінів, параметрів, характеристик, які повинен засвоїти студент при підготовці до заняття.

Термін	Визначення
Вірусні глікопротеїни	Структурні поверхневі білки зовнішніх оболонок складних вірусів, які складаються із зовнішньої (гідрофільної) частини, що містить на кінці аміногрупу (N-кінець), і занурену у ліпідний шар гідрофобну частину, остання містить на зануреному кінці гідроксильну групу (C-кінець). Вірусні глікопротеїни є специфічними антигенами. Основною функцією вірусних глікопротеїнів є взаємодія із специфічними рецепторами поверхні клітин, тобто специфічна адсорбція вірусу на клітинах. Іншою їх функцією є участь у злитті вірусної і клітинної мембран, що призводить до проникнення вірусів у клітину та роздягання (вивільнення геномів).

Антигенний шифт	Мінливість вірусу грипу, яка призводить до появи штамів із зовсім новими поверхневими глікопротеїнами, тобто супроводжується радикальним оновленням антигенів збудника.
Антигенний дрейф	Часткові зміни певного гемаглютиніну, при якому відбувається заміна однієї або декількох амінокислот внаслідок точкових мутацій, що призводить до появи штамів з незначно оновленими антигенними властивостями.
Вірусна популяція	Віруси окремого виду, що походять з однієї вірусної частки репродукуються в природній або експериментальній чутливій системі і утворюють в ній необмежену кількість генерацій.
Адаптація вірусу	Здатність вірусу інтенсивно розмножуватися в культурі клітин нового господаря або при зміні умов культивування.

Теоретичні питання до заняття:

- Загальна характеристика і класифікація ортоміксовірусів. Класифікація вірусів грипу людини.
- Загальна характеристика вірусів грипу: структура та особливості геному, хімічний склад та антигенна будова.
- Резистентність вірусів грипу, чутливість до фізичних та хімічних факторів.
- Методи культивування ортоміксовірусів.
- Джерело інфекції та механізм передачі грипу.
- Патогенез грипу, роль персистенції вірусу в організмі людини і тварин у збереженні епідемічно значущих штамів.
- Особливості лабораторної діагностики грипу.
- Основи специфічної профілактики і лікування грипу.

Практичні завдання, які виконуються на занятті:

- Засвоїти схему вірусологічної діагностики грипу. Здійснити облік РГА з метою вивчення і визначення титру вірусу, а також облік РГГА з метою серологічної ідентифікації вірусів грипу, зробити висновок.
- Здійснити постановку РГГА з метою серологічної діагностики грипу, оцінити результати і зробити висновки.
- Ознайомитись з діагностичними, профілактичними і лікувальними препаратами, які використовуються при грипі.

Зміст теми.

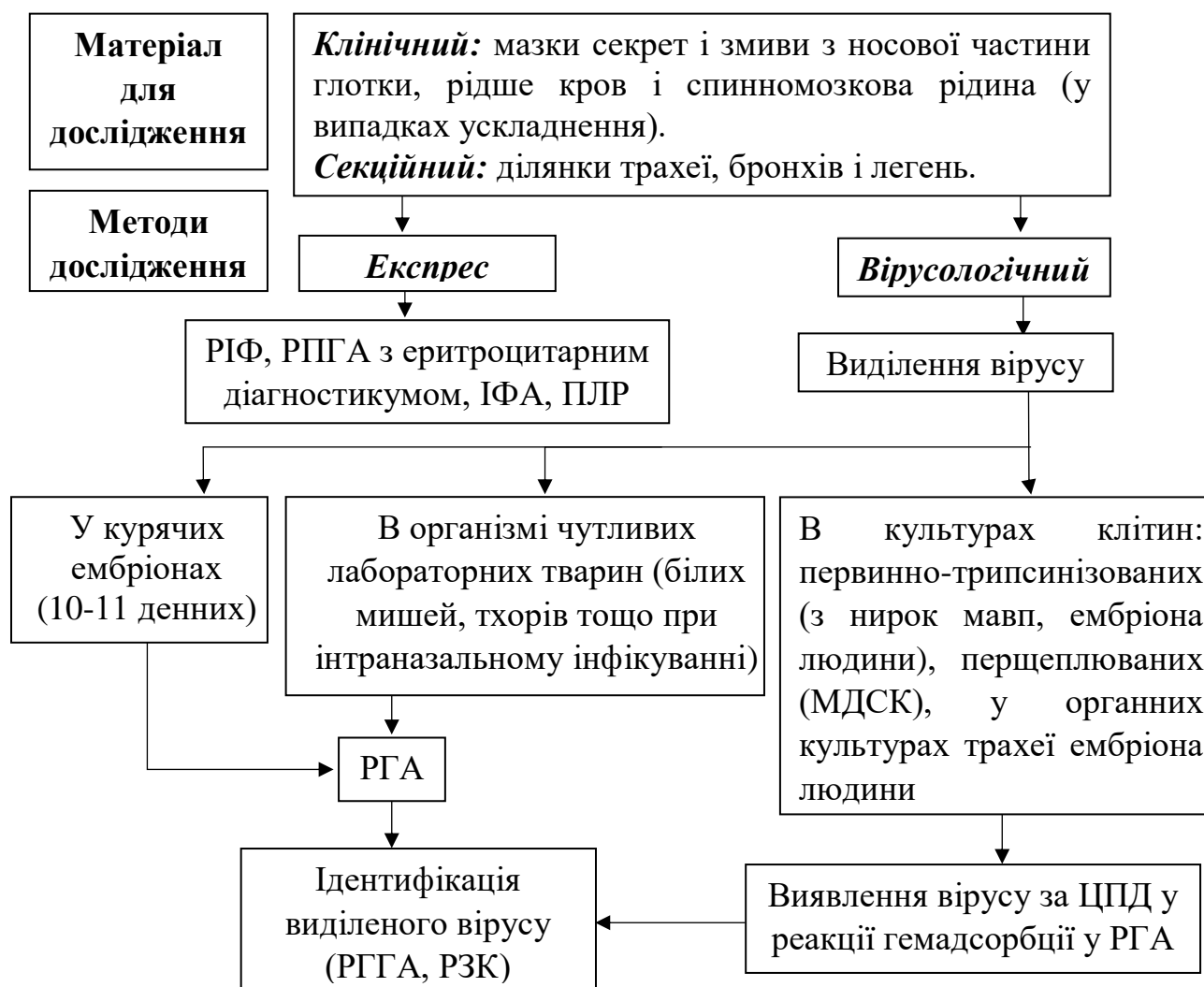
На практичному занятті студенти вивчають морфологічні, фізико-хімічні властивості, ультраструктуру та антигенну будову представників родини *Orthomyxoviridae*, види та механізми антигенної мінливості. Складаючи схему лабораторної діагностики, студенти використовують набуті знання під час самостійної підготовки та в процесі розгляду теми на занятті. Проводять облік

реакцій та надають їм оцінку (визначають наявність вірусу в РГА, проводять облік РГГА, поставленої з метою серологічної ідентифікації вірусів грипу, здійснюють облік РГГА, поставленої з метою серологічної діагностики грипу). Ознайомлюються та вносять до протоколу назву препаратів, які використовуються для лабораторної діагностики та профілактики грипу. Виконані завдання студенти записують у протокол та підписують його у викладача.

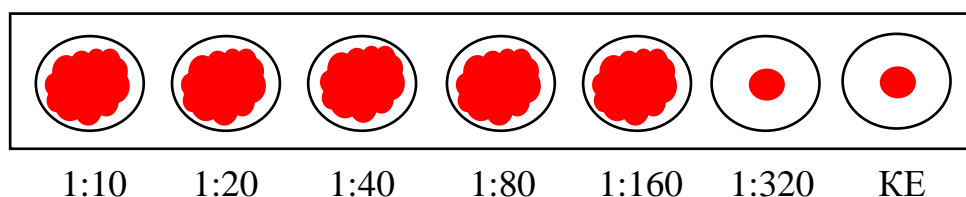
Рекомендації для оформлення протоколу

Завдання 1. Ознайомитись зі схемою лабораторної діагностики грипу.

Схема лабораторної діагностики грипу

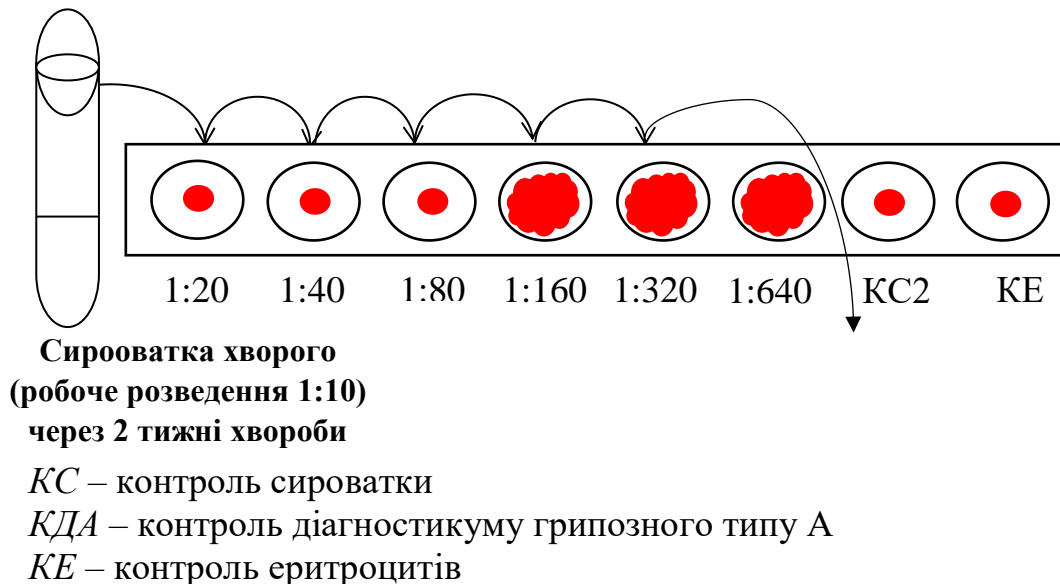
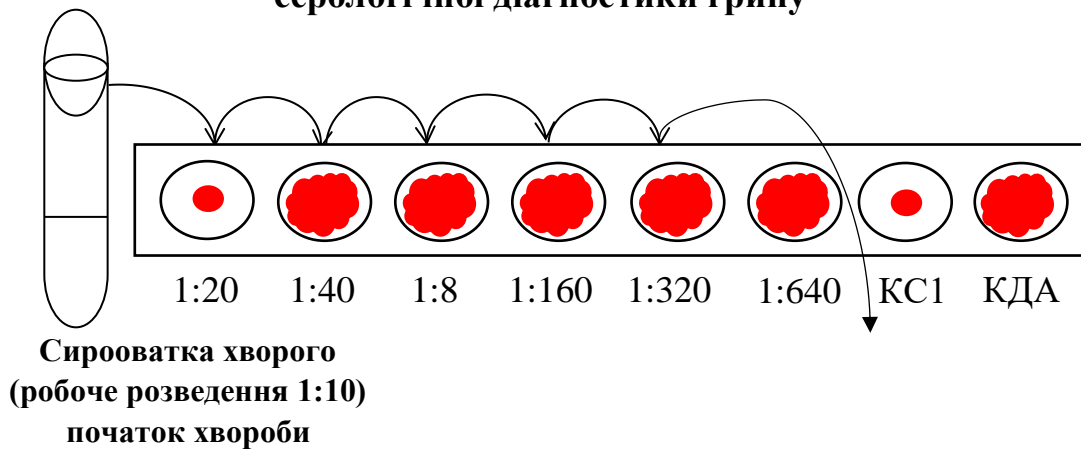


Завдання №2. Здійснити облік РГА з метою виявлення вірусу з гемаглютинуючими властивостями.



Завдання 3. Здійснити облік РГГА, поставленої з метою серологічної ідентифікації та серологічної діагностики грипу.

Схема постановки реакції гальмування гемаглютинації (РГГА) з метою серологічної діагностики грипу



Завдання 4. Вивчити препарати для специфічної профілактики грипу.

1. *Вакцина грипозна алантоїсна жива суха для інтраназального введення (I покоління вакцин) (Росія).*
2. *Очищена інактивована спліт-вакцина для профілактики грипу „Ваксігрип” (Франція).*
3. *Інактивована субдинична вакцина „Інфлувак” (Нідерланди).*

Питання для самоконтролю.

- До якої родини належать віруси грипу?
- Яка морфологія вірусу грипу?
- Яка стратегія геному вірусу грипу?
- Які білки визначають штамову специфічність вірусу грипу?
- Який механізм антигенного шифту вірусу грипу?
- На яких біосистемах найчастіше здійснюють виділення вірусів грипу?
- Який метод профілактики грипу у дорослих є найбільш доцільним?

Практичне заняття №20

Тема: «Параміксовіруси. Лабораторна діагностика параміксовірусів»

Актуальність теми:

Параміксовіруси найчастіше вражають дітей, викликаючи у них парагрип, фронтити, бронхіоліти, круп, пневмонію, свинку, кір, гострі респіраторні захворювання, хворобу Ньюкастла (кон'юктивіт - професійне захворювання працівників птахофабрик). У дорослих як правило ці захворювання, окрім кору, протікають легше. Вірус кору здатний проникати через плаценту, викликаючи вади новонароджених або мертвонародженість. Пік захворюваності на параміксовірусну інфекцію припадає на холодну пору року (осінь-зима), спричиняючи значне зменшення працездатності населення, важко піддається диференціації (окрім кору та свинки). Вірус епідемічного паротиту у дітей в період статевого дозрівання (у хлопчиків) здатний призводити до ураження статевих залоз з розвитком орхітів, а також менінгітів. У тварин ці віруси викликають цілу низку інфекційних захворювань (чума собак, ВРХ, псевдочума та ін.).

Конкретні цілі:

- Засвоїти основні біологічні властивості вірусів парагрипу, паротиту, кору та респіраторно-синцитіального вірусу.
- Оволодіти методами вірусологічної та серологічної діагностики парагрипу, паротиту, кору та респіраторно-синцитіального вірусу.
- Аналізувати основні підходи до лікування та профілактики парагрипу, паротиту, кору та респіраторно-синцитіального вірусу.

Базові знання, вміння, навички, необхідні для вивчення теми (міждисциплінарна інтеграція). Дивись практичне заняття №16.

Перелік основних термінів, параметрів, характеристик, які повинен засвоїти студент на занятті:

Термін	Визначення
Родина <i>Paramyxoviridae</i>	Складається з трьох родів: <i>Paramyxovirus</i> , <i>Morbillivirus</i> та <i>Pneumovirus</i> . Ці віруси близькі до ортоміксовірусів за рядом властивостей: мають овальну або округлу форму, складається із нуклеокапсиду та внутрішньої оболонки. Нуклеокапсид має спіральну симетрію, покритий оболонкою, яка складається із шару білку М, подвійного шару ліпідів і зовнішнього глікопротеїдного шару, який включає гемаглютинін і нейрамінідазу. У той же час <i>Paramyxoviridae</i> відрізняються від <i>Orthomyxoviridae</i> більшими розмірами (120-300 нм), здатністю викликати гемоліз, утворювати в культурі клітин синцитій.

Парагрип	Парагрипозні віруси людини вперше були виділені Чанокком у 1956 році. Є складними вірусами розмірами від 120 до 300 нм, овальної форми і складаються із нуклеокапсиду і зовнішньої оболонки. Оболонка має багаточисельні шипи-ворсинки, розміщені радіально. Нуклеокапсид має спіральну симетрію, покритий оболонкою, яка складається із білку М, подвійного шару ліпідів і зовнішнього глікопротеїдного шару, який включає гемаглютинин і нейрамінідазу.
Антигенна будова	По антигенних властивостях білків HN, NP і F розрізняють 4 основних серотипи вірусу парагрипу: ВПГЛ-1, ВПГЛ-2, ВПГЛ-3, ВПГЛ-4. У всіх серотипів вірусу парагрипу є гемаглютиніни. ВПГЛ-1 і ВПГЛ-2 аглютинують еритроцити морських свинок, курей, мавп і людини. ВПГЛ-3 аглютинують еритроцити морських свинок, мавп і людини. ВПГЛ-4 склеює тільки еритроцити морських свинок.
Вірус паротиту	Вірус паротиту відноситься до <i>Paramixovirinae</i> і роду <i>Rubulavirus</i> . Вперше був виділений від експериментальних тварин на курячих ембріонах в 1934 році К. Джонсоном і Э. Гудпасчером. Морфологія вірусу і молекулярно-біологічні властивості такі ж як і в інших параміксовірусів.
Паротитна інфекція («свинка»)	Гостре вірусне інфекційне захворювання, яке характеризується переважно враженням привушних залоз, рідко — інших залозистих органів і нервової системи. Інкубаційний період — 2–3 тижні, іноді 23–25 днів
Вірус кору	Вірус кору відноситься до родини параміксовірусів і є представником роду <i>Morbillivirus</i> . Вірусна етіологія була встановлена Т. Андерсоном та Дж. Гольдбергером, в 1911 році. У 1954 р. Дж. Ендерс і Т. Піблс виділили вірус від хворого на первинно-трипсинізованих клітинах нирки мавп і людини.
Плями Бельського – Філатова – Копліка	Висипання у продромальному періоді кору. На слизистій оболонці щік навпроти малих корінних зубів з'являються білувато-сіруваті елементи розміром від 1 до 3 мм, що оточені гіперемірованою каймою. Як «крупинки солі на червоному тлі». Не зливаються між собою, не знімаються тампоном чи шпателем. Через 48-72 години безслідно щезають.

Теоретичні питання до заняття:

- Загальна характеристика і класифікація параміксовірусів.
- Загальна характеристика вірусів парагрипу, паротиту, вірусу кору та респіраторно-синцитіального вірусу: структура та особливості геному, хімічний склад та антигенна будова.
- Резистентність вірусів парагрипу, паротиту, вірусу кору та респіраторно-синцитіального вірусу, чутливість до фізичних та хімічних факторів.
- Методи культивування параміксовірусів.
- Джерело інфекції та механізм передачі парагрипу, паротиту, вірусу кору та респіраторно-синцитіального вірусу.
- Патогенез парагрипу, паротиту, вірусу кору та респіраторно-синцитіального вірусу.
- Особливості лабораторної діагностики парагрипу, паротиту, кору та респіраторно-синцитіальної вірусної інфекції.
- Основи специфічної профілактики і лікування.

Практичні завдання, які виконуються на занятті:

- Створити схему лабораторної діагностики парагрипу, паротиту, кору та респіраторно-синцитіальної вірусної інфекції.
- Засвоїти схему постановки та здійснити облік РЗК в парних сироватках, поставленої з метою серологічної діагностики кору.
- Вивчити препарати, які використовуються для діагностики, специфічної профілактики і терапії парагрипу, паротиту, кору та респіраторно-синцитіальної вірусної інфекції.

Зміст теми:

На практичному занятті студенти вивчають класифікацію параміксовірусів, їх морфологічну структуру, культивування, антигенну будову; роль вірусів парагрипу, паротиту, вірусу кору та респіраторно-синцитіального вірусу в патології людини, патогенез і імуногенез захворювань; методи лабораторної діагностики парагрипу, паротиту, кору та респіраторно-синцитіальної вірусної інфекції; принципи лікування, профілактики парагрипу, паротиту, кору та респіраторно-синцитіальної вірусної інфекції; здійснюють облік РЗК, поставленої з метою серологічної діагностики кору в парних сироватках крові, створюють схему лабораторної діагностики парагрипу, паротиту, кору та респіраторно-синцитіальної вірусної інфекції, вивчають препарати, які використовують для діагностики і специфічної профілактики парагрипу, паротиту, кору та респіраторно-синцитіальної вірусної інфекції.

Виконані завдання студенти записують у протокол та підписують його у викладача.

Рекомендації для оформлення протоколу

- Студенти вивчають та заносять в протокол класифікацію параміксовірусів.
- Обговорюють та занотовують у протокол схему лабораторної діагностики кору, паротиту та парагрипу.
- Проводять облік РЗК при серологічній діагностиці кору.
- Обговорюють та заносять до протоколу основні препарати, що використовуються для профілактики, діагностики та лікування парагрипу, кіру та паротиту.

Paramyxovirinae

Morbillivirus (вірус кору)

Respirovirus (парагрипу серотипу 1 та 3)

Rubulavirus (вірус парагрипу сер. 2, 4a, 4b,
віруси епідемічного паротиту)

Pneumovirinae

RS virus (респірно-синцитіальний
вірус)

Metapneumovirus

Лабораторна діагностика парагрипу

1. Експрес діагностика

-Ag в клітинах носових ходів (РІФ, ІФА)

2. Вірусологічний метод

змив з носоглотки



культура клітин



РГАдс, ЦПД



РЗК, РГГА, РН

3. Серологічний метод

- Виявлення антитіл в парних сироватках
(РГГА, РЗК, РН)

Лабораторна діагностика кору

Серологічна діагностика

- За допомогою ІФА IgM антитіла виявляються в 90% випадків кору через 3 дні після появи висипання.

- Рівень IgM антитіл досягає піку через 7-10 днів, потім швидко знижується. Пізніше 6-8 тижня IgM антитіла виявляються дуже рідко.

- Рівень IgG антитіл наростає протягом 4-х тижнів і зберігається тривалий час після інфекції (4-х кратне підвищення титру).

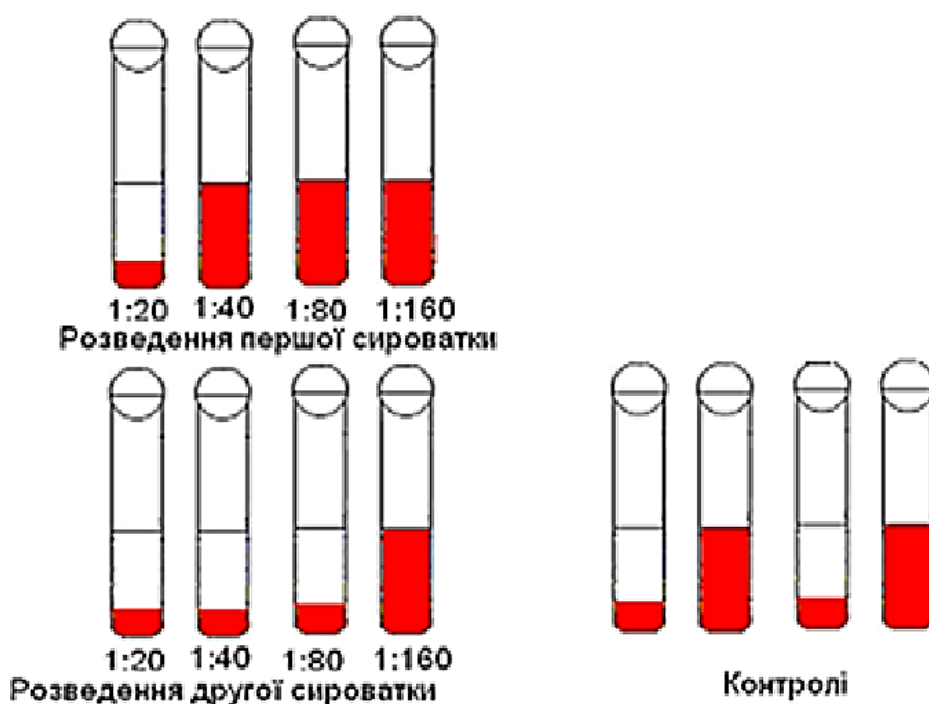
- Крім того виробляються сироваткові і секреторні IgA антитіла.

Вірусологічна діагностика

- Полягає в виділенні вірусу з крові і носоглоткового змиву в культурі клітин
- Характерна ЦПД – утворення гігантських багатоядерних клітин з цитоплазматичними включеннями, через тиждень після зараження – внутрішньоядерні включення. Фарбування за Романовським-Гімзе.
- Реакція гемадсорбції (РГАдс) з еритроцитами мавп.
- Реакція ЗГАдс з сироваткою імунізованих тварин.
- Реакція нейтралізації ЦПД, РГГА та ІФА

Завдання 1. Провести облік реакції РЗК, поставленої з метою серологічної діагностики кору(на демонстраційному наборі).

Схема постановки РЗК при серологічній діагностиці кору



Завдання 2. Ознайомитися та занести до протоколу основні препарати, що використовуються для профілактики та лікування кору, паротиту та парагрипу.

Питання для самоконтролю:

- До якої родини належать віруси парагрипу, паротиту, кору?
- Який тип нуклеїнової кислоти містять параміксовіруси?
- Яка морфологія параміксовірусів?
- На яких біосистемах найчастіше здійснюють виділення вірусів парагрипу, паротиту, кору?
- Шляхи потрапляння збудника в організм людини?
- Клінічні прояви та ускладнення паротиту та кору?
- Методи лабораторної діагностики парагрипу, паротиту, кору?
- Який метод профілактики параміксовірусів є найбільш доцільним?

Практичне заняття №21

Тема: «Пікорнавіруси. Лабораторна діагностика ентеровірусних інфекцій»

Актуальність теми:

Родина пікорнавірусів є типовим представником РНК-вмісних простих ікосаедричних вірусів. Для цих вірусів притаманна висока стійкість до фізико-хімічних факторів. Пікорнавіруси мають широке коло хазяїв, значне розмаїття клінічних проявів патології та широко розповсюджені в довкіллі. Основним родом цієї родини з патогенним потенціалом для людини є рід ентеровірусів. До цього роду належать віруси поліомієліту, Коксакі та ЕСНО-інфекцій. Лікарі повинні знати біологічні властивості ентеровірусів, патогенез, імуногенез та клінічні прояви інфекцій, лабораторні методи діагностики, принципи лікування та специфічної профілактики інфекцій. Все це зумовлює актуальність теми заняття, яка спрямована на формування позитивної мотивації її вивчення.

Конкретні цілі:

- Аналізувати фізико-хімічні та біологічні властивості родини пікорнавірусів взагалі та роду ентеровірусів зокрема.
- Створити схему лабораторної діагностики ентеровірусних інфекцій.
- Порівняти двох пробірочних препарати культур клітин під номерами: визначити, в якому представлений незмінений моношар, а в якому – цитопатична дія по типу повної дегенерації, спричинена вірусом поліомієліту.
- Здійснити облік реакції зв'язування комплементу, поставленої з метою серологічної діагностики поліомієліту.
- Здійснити облік реакції вірусної нейтралізації, поставленої з метою серологічної ідентифікації ентеровірусу, виділеного від хворої дитини з підозрою на поліомієліт.
- Вивчити препарати, що використовуються для діагностики, специфічної профілактики і терапії ентеровірусних інфекцій.

Базові знання, вміння, навички, необхідні для вивчення теми (міждисциплінарна інтеграція). Дивись практичне заняття №16.

Перелік основних термінів, параметрів, характеристик, які повинен засвоїти студент при підготовці до заняття:

Термін	Визначення
Пікорнавіруси	Дрібні (24-30 нм в діаметрі), прості ікосаедричні РНК-геномні віруси, високо стійкі до дії фізико-хімічних чинників. Багато представників цієї родини високо патогенні для людини. За сучасною класифікацією представлені 9 родами.

Ентеровіруси	Типовий рід родини пікорнавірусів, якому притаманні тропність до ентероцитів і клітин нервової системи, стійкість в широкому діапазоні рН (від 2,0 до 10,0) катіонна стабілізація іонами Ca^{++} , Mg^{++} , Al^{+++} до теплової інактивації.
Поліовіруси	Вид ентеровірусів людини, який існує у вигляді трьох серотипів, що чітко розрізняються та інфікують клітину, зв'язуючись з специфічними рецепторами PVR:CD 155.
Вакцина Солка	Інактивована поліовірусна вакцина. Вводиться парентерально. Не створює місцевий імунітет.
Вакцина Себіна	Жива поліомієлітна вакцина, виготовлена з атенуйованих штамів трьох серотипів поліовірусів. Вводиться перорально. Створює загальний і місцевий імунітет.
Віруси Коксакі	Ентеровіруси, виділені в містечку Коксакі штату Нью-Йорк (США), для яких притаманний полі органний тропізм. Поділяються на групи А і В за антигенною будовою, цитопатичною дією на культуру клітин та формою параліча у новонароджених мишей. Відомо 23 серотипи вірусів Коксакі А та 6 – Коксакі В.
Віруси ЕСНО	Скорочена назва, що походить від англійських слів: <i>enteric</i> – кишкові, <i>cytopathogenic</i> – цитопатогенні, <i>human</i> – людські, <i>orphan</i> – “сирітські”. Виділено 28 серотипів.

Теоретичні питання до заняття:

- Загальна характеристика родини пікорнавірусів, класифікація.
- Будова та хімічний склад ентеровірусів.
- Чутливість ентеровірусів до фізичних та хімічних чинників.
- Антигенна структура ентеровірусів.
- Культивування та особливості репродукції в чутливих клітинах.
- Патогенез, клінічні прояви та імуногенез поліомієліту, Коксакі-вірусної та ЕСНО-вірусної інфекції.
- Принципи та методи лабораторної діагностики ентеровірусних інфекцій.
- Принципи специфічної профілактики ентеровірусних інфекцій. Порівняння живої та інактивованої поліомієлітної вакцин.

Практичні завдання, які виконуються на занятті:

- Створити схему лабораторної діагностики ентеровірусних інфекцій.
- Здійснити облік результатів серологічної і вірусологічної діагностики поліомієліту (демонстрація).
- Вивчити препарати, що використовують для діагностики, специфічної профілактики і терапії ентеровірусних інфекцій.

Зміст теми:

На практичному занятті студенти вивчають біологічні властивості родини пікорнавірусів в цілому, роду ентеровірусів та окремих його представників (вірусів поліомієліту, Коксакі та ЕСНО). Під керівництвом викладача створюють схему діагностики захворювань, спричинених ентеровірусами. На демонстраційних препаратах вивчають цитопатичну дію вірусів поліомієліту на культуру клітин та здійснюють серологічну ідентифікацію ентеровірусу, виділеного від хворої дитини з підозрою на поліомієліт. При цьому знайомляться з диференціацією “диких” та атенуєваних штамів поліовірусів, яку можна здійснити за допомогою ПАР, ІФА, РН з моноклональними антитілами.

Для поліовірусів I типу використовують бентонітовий тест (вірулентні поліовіруси мають характеристику Абент⁻, а авірулентні Абент⁺). Здійснюють облік реакції зв'язування комплементу, поставленої з метою серологічної діагностики поліомієліту. Виконані завдання студенти записують у протокол та підписують його у викладача.

Рекомендації для оформлення протоколу.

Завдання 1. Під керівництвом викладача студенти складають схему лабораторної діагностики ентеровірусних інфекцій і замальовують її в протокол.

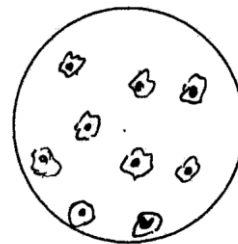
Лабораторна діагностика ентеровірусів

Матеріал для дослідження		
<i>Клінічний</i> – фекалії хворих (1 тиждень), секрети носоглотки (1-3 дні) <i>Секційний</i> – шматочки головного, спинного мозку, мозочок, м'язи, мигдалики, лімфотичні вузли, стінки кишечника.	<i>Сироватка</i>	
Методи		
Експресні	Вірусологічні	Серологічні
МФА, каріологічний аналіз, РНГА (поліовіруси 1-3)	Виділення та індикація вірусної репродукції: <i>Культура клітин:</i> АМН, Нер-2, HeLa, лабораторні лінії з органів мавп (нирки), клітин ендотелію та серця; <i>Тварини:</i> миші сисунці мавпи, зараження в мозок	Наростання титру антитіл (б ніж в 4 р) РЗК, РН, РІД, РНГА (Коксакі В)

Завдання 2. Визначити на демонстраційних препаратах незмінену культуру клітин (контроль) та ЦПД вірусу поліомієліту за типом повної дегенерації. Мікроскопічну картину замалювати в протокол.



Незмінений моношар



ЦПД вірусу поліомієліту

Диференціація ентеровірусів за ЦПД

Вірус	ЦПД
Поліовірус	+
Коксакі А	±
Коксакі В	+
ЕСНО	+

Завдання 3. За демонстраційним препаратом здійснити облік реакції вірус нейтралізації, поставленої з метою серологічної ідентифікації вірусу, виділеного від хворої дитини з підозрою на поліомієліт.

В* + С до вірусу Коксакі	КС до вірусу Коксакі	В+С до поліовірусу	КС до поліовірусу	Контроль вірусу	Контроль клітин
--------------------------	----------------------	--------------------	-------------------	-----------------	-----------------

* В – вірус; С – сироватка; КС – контроль сироватки

Завдання 5. Вивчити препарати, що використовують для діагностики та специфічної профілактики ентеровірусних інфекцій.

Питання для самоконтролю.

- Який тип нуклеїнової кислоти містять пікорнавіруси?
- Яку будову мають пікорнавіруси?
- Які визначальні ознаки роду ентеровірусів?
- Які віруси належать до роду ентеровірусів?
- Яка антигенна будова ентеровірусів?
- Як можна культивувати ентеровіруси?
- Які етапи взаємодії ентеровірусів з чутливими клітинами?
- Скільки існує серологічних типів вірусів поліомієліту?
- Який патогенез поліомієліту?

- Які методи лабораторної діагностики поліомієліту?
- Які вакцини використовують для профілактики поліомієліту? Які позитивні та негативні сторони живих та інактивованих вакцин?
- Які критерії диференціації вірусів Коксакі А та вірусів Коксакі В?
- Як розшифровується аббревіатура ЕСНО?

Практичне заняття №22

Тема: «Герпесвіруси, аденовіруси. Лабораторна діагностика герпесу та аденовірусних інфекцій»

Актуальність теми:

Патогенні для людини віруси, що містять дезоксирибонуклеїнову кислоту (ДНК) входять до складу 9 родин: *Adenoviridae*, *Herpesviridae*, *Parvoviridae*, *Poxviridae*, *Papillomaviridae*, *Poliomavaviridae*, *Hepadnaviridae*, *Circoviridae*, *Circinoviridae*.

Порівняльно з вірусами, що містять рибонуклеїнову кислоту (РНК) вони генетично більш консервативні, тобто менш мінливі, нерідко здатні до тривалої персистенції в організмі хазяїна. Більшість ДНК-геномних вірусів репродукуються в ядрах клітин. Представники родини *Adenoviridae* є збудниками інфекційних захворювань дихальних шляхів та інших органів у людини, мавп, рогатої худоби, собак, мишей і птахів.

Конкретні цілі:

- Створити схему лабораторної діагностики аденовірусних інфекцій та герпесу.
- Здійснити облік РНГА, поставленої з метою серологічної діагностики аденовірусної інфекції.
- Вивчити ЦПД, спричинену вірусами герпесу.
- Вивчити препарати, які використовують для діагностики і специфічної профілактики аденовірусних інфекцій і герпесу.

Базові знання, вміння, навички, необхідні для вивчення теми (міждисциплінарна інтеграція). Дивись практичне заняття №16.

Перелік основних термінів, параметрів, характеристик, які повинен засвоїти студент при підготовці до заняття:

Термін	Визначення
ДНК-геномні віруси	Віруси, що містять дезоксирибонуклеїнову кислоту (ДНК). Патогенні для людини віруси, що містять дезоксирибонуклеїнову кислоту (ДНК) входять до складу 9 родин: <i>Adenoviridae</i> , <i>Herpesviridae</i> , <i>Parvoviridae</i> , <i>Poxviridae</i> , <i>Papillomaviridae</i> , <i>Poliomavaviridae</i> , <i>Hepadnaviridae</i> , <i>Circoviridae</i> , <i>Circinoviridae</i> .
Герпесвіруси	Родина <i>Herpesviridae</i> включає в себе 3 підродини: <ul style="list-style-type: none">• <i>Alpha herpesviridae</i>• <i>Beta herpesviridae</i>• <i>Gamma herpesviridae</i>
Аденовірусні інфекції	Родина <i>Adenoviridae</i> поділяється на два роди: <i>Mastadenovirus</i> – аденовіруси ссавців, у тому числі 49 сероваріантів, що викликають захворювання у людей, і <i>Aviadenovirus</i> – 14 сероваріантів, що спричиняють захворювання у птахів.

Теоретичні питання до заняття:

- Загальна характеристика ДНК-геномних вірусів, їх класифікація.
- Морфологія та особливості репродукції герпесвірусів і аденовірусів.
- Культивування.
- Патогенез, клінічні прояви та імуногенез герпесвірусної і аденовірусної інфекцій.
- Принципи та методи лабораторної діагностики герпесвірусної і аденовірусної інфекцій.
- Принципи лікування та профілактики герпесвірусної і аденовірусної інфекцій.

Практичні завдання, які виконуються на занятті:

- Створити схеми лабораторної діагностики герпесу і аденовірусних інфекцій.
- Виявити результати репродукції вірусу герпеса і аденовірусу за цитопатогенною дією (ЦПД).
- Вивчити схему постановки і здійснити облік реакції непрямой гемаглютинації (РНГА) з метою серологічної діагностики аденовірусної інфекції.
- Ознайомитись з діагностичними, лікувально-профілактичними препаратами, які використовуються при герпетичній та аденовірусній інфекції.

Зміст теми:

На практичному занятті студенти вивчають класифікацію аденовірусів та вірусів герпесу, їх морфологічну структуру, культивування, особливості їх репродукції; роль аденовірусів та вірусів герпесу в патології людини, патогенез і імуногенез захворювань; методи лабораторної діагностики аденовірусної та герпесної інфекції; принципи лікування, профілактики аденовірусної та герпесної інфекції; вивчають симпластоутворення, спричинене вірусами герпесу, здійснюють облік РНГА, поставленої з метою серологічної діагностики аденовірусної інфекції, створюють схему лабораторної діагностики аденовірусної та герпесвірусної інфекцій, вивчають препарати, які використовують для діагностики і специфічної профілактики аденовірусних інфекцій і герпесу.

Виконані завдання студенти записують у протокол та підписують його у викладача.

Рекомендації для оформлення протоколу

Основні властивості аденовірусів.

- Кубічний (ікосаедричний) тип симетрії капсиду;
- Капсид складається з 252 капсомерів:
 - ❖ 240 гексонів;
 - ❖ 12 пентонів з відростками;
- ДНК лінійна, біля 30 генів.

Схема лабораторної діагностики аденовірусних інфекцій.

1. Виділення та ідентифікація вірусу	Матеріал від хворого	
	Первинні та перещеплювані культури клітин людини і мавпи. 5 -14 діб	Риноцитоскопія (фарбування флюорохромами і міченими сироватками)
	ЦПД	Сероідентифікація 1.РН 2.РТГА
2. Серологічна діагностика	Парні сироватки від хворого 1. РН; 2. РСК; 3. РТГА; 4. РНГА.	
3. Генетична діагностика	ПЛР	

Основні властивості вірусів герпесу

- Ікосаедральна форма будови нуклеокапсиду;
- Великі розміри 150-250 нм; складні (мають суперкапсид);
- ДНК лінійна, 80 генів; молекулярна маса 54-94 млн. дальтон;
- Капсид складається з 162 капсомерів: 150 гексонів; 12 пентонів на вершинах;
- Тегумент – простір між суперкапсидом і нуклеокапсидом містить вірусні білки і ферменти, необхідні для реплікації;
- Схильний до тривалої персистенції в нервовій тканині.

Препарати для лікування та профілактики аденовірусних інфекцій.

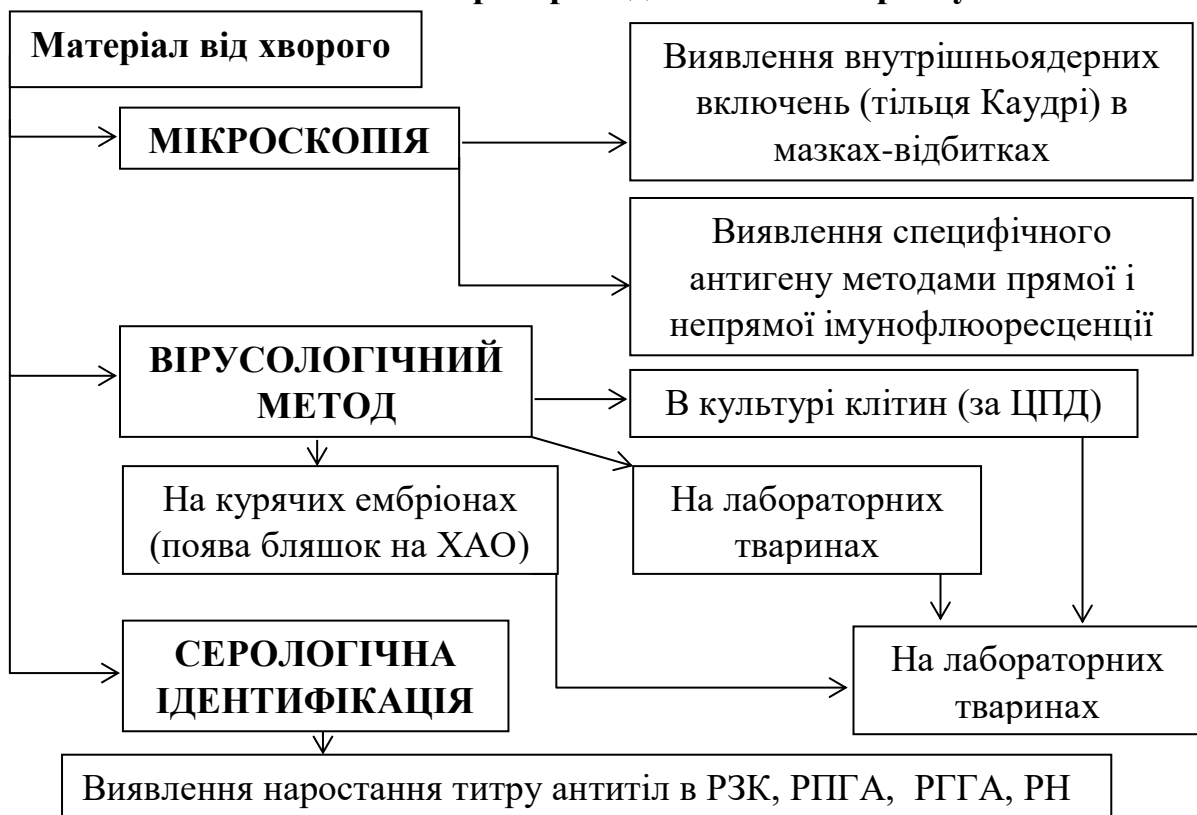
- інтерферон;
- ДНК-аза;
- окосолінова мазь та ін.;
- живі вакцини з 4,7,21 серотипів (запропоновані)

Класифікація родини *Herpesviridae*

Підродини	Рід	Назва вірусу	Патологія
<i>Alphaherpesviridae</i>	<i>Simplexvirus</i>	Вірус простого герпесу тип 1	Лабіальний герпес, енцефаліт, ураження очей
		Вірус простого герпесу тип 2	Генітальний герпес, менінгоенцефаліт, рак шийки матки

	<i>Varicellovirus</i>	Вірус вітряної віспи – оперізуючого герпесу	Вітряна віспа, оперізуючий герпес
<i>Betaherpesviridae</i>	<i>Cytomegalo virus</i>	Цитомегаловірус	Цитомегалія, рак простати
	<i>Roseolovirus</i>	Вірус лімфотропного герпесу 6	Раптова екзантема, синдром хронічної втоми, синдром Шегрена, ураження печінки, нирок та ін.
Вірус герпесу людини 7			
<i>Gammapherpesviridae</i>	<i>Lymphocrypto virus</i>	Вірус Епштейна-Барр	Інфекційний моноклеоз, лімфома Беркитта, назофарингіальна карцинома, ворсиста лейкоплакія язика
	<i>Rhadinovirus</i>	Вірус герпесу людини 8	Саркома Капоші












Схема лабораторної діагностики герпесу



Препарати для лікування і профілактики герпесу:

- модифіковані нуклеозиди, що пригнічують реплікацію вірусу (індуктори)
- інтерферону, ацикловір);
- гамма-глобуліни проти вірусу вітряної віспи;
- імуномодулятори (левамізол).
- Вакцини:
 - ❖ інактивована вакцина зі штамів вірусу герпесу 1 і 2-го типів;
 - ❖ жива атенуйована вакцина проти цитомегаловірусу людини.

Завдання 1. Оцінити результати реакції пасивної гемаглютинації, поставленої з метою серологічної діагностики аденовірусної інфекції (демонстрація)

	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	К (ЕД)
I сироватка (р/р 1:10)						
II сироватка (р/р 1:10)						

Примітки:

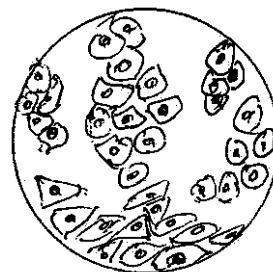
р/р – робоче розведення

К(ЕД) – контроль еритроцитарного діагностикуму

Завдання 2. Вивчити зміни в клітинах, що з'являються в результаті розмноження вірусів герпесу і аденовірусів. Замалювати в протокол малюнок.



Симпластоутворення викликане герпес вірусами



Гроноподібна деструкція, викликана аденовірусами

Питання для самоконтролю

- Загальна характеристика ДНК-геномних вірусів, родини *Adenoviridae*, *Herpesviridae*, їх класифікація.
- Морфологія та особливості репродукції герпесвірусів і аденовірусів в клітині.
- Культивування. Цитопатична і цитотоксична дія.
- Патогенез, клінічні прояви та імуногенез герпесвірусної і аденовірусної інфекцій.
- Принципи та методи лабораторної діагностики герпесвірусної і аденовірусної інфекцій.
- Принципи лікування та профілактики герпесвірусної і аденовірусної інфекцій.

Практичне заняття №23

Тема: «Збудники вірусних гепатитів. Лабораторна діагностика вірусних гепатитів»

Актуальність теми:

Вірусні гепатити (ВГ) — це група захворювань, викликаних різними типами вірусів, що характеризуються хоча й неоднаковими механізмами передачі інфекції й відмінностями в патогенезі, але об'єднані гепатотропністю збудників та обумовленою цим схожістю основних клінічних проявів (жовтяницею, інтоксикацією, гепатоспленомегалією).

За останні десятиліття відмічається різке зростання захворюваності на вірусні гепатити, зокрема, з парентеральним шляхом передачі. Вважають, що близько 1 мільярда людей на планеті заражені принаймні одним із вірусів, що викликають ВГ. Хоча ВГ і займають за офіційними даними II місце після грипу та інших гострих респіраторних інфекцій (ГРІ) за кількістю уражених, вони значно переважають їх по числу тяжких форм, економічним витратам, летальним наслідкам. І це при тому, що реєструються далеко не всі випадки ВГ — безжовтяничні, стерті форми часто проходять повз увагу лікаря. Тому в дійсності ВГ не поступаються грипу та іншим ГРІ за поширеністю, тому що фактично до статистичних звітів потрапляють лише жовтяничні форми, які складають меншу частину усіх гострих ВГ. За один день на земній кулі помирає від ВГ та їх наслідків стільки людей, скільки за рік від СНІДу. Зупинити це і є однією з першорядних проблем світової системи охорони здоров'я.

На даний момент встановлена роль у патології печінки щонайменше 6 вірусів (А-Е та G). Дослідження останніх часів так званого вірусу гепатиту F дозволили встановити його неоднорідність — виявлені на першому етапі культури вірусу виявилися мавпячими флавовірусами та вірусом G, тому термін "ВГF" зараз не вживається. Дискутується участь у людській патології та можливий ступінь пошкодження органу нещодавно відкритими вірусами TTV та SEN, а також деякими тваринними вірусами (пекінських качок, канадського лісного бабака та ін.).

На занятті студентам надається можливість ознайомитись з методами діагностики вірусних гепатитів, зокрема, з постановкою ІФА. Приділяється увага визначенню діагностичних маркерів вірусних гепатитів.

Конкретні цілі:

- Аналізувати біологічні властивості збудників вірусних гепатитів.
- Пояснювати роль збудників вірусних гепатитів в патології людини.
- Тракувати методи діагностики вірусних гепатитів, робити висновки за результатами досліджень.
- Аналізувати препарати, які використовують для специфічної профілактики вірусних гепатитів.

Базові знання, вміння, навички, необхідні для вивчення теми (міждисциплінарна інтеграція). Дивись практичне заняття №16.

Перелік основних термінів, параметрів, характеристик, які повинен засвоїти студент при підготовці до заняття:

Термін	Визначення
Вірусні гепатити	Група захворювань, викликаних різними типами вірусів, що характеризуються хоча й неоднаковими механізмами передачі інфекції й відмінностями в патогенезі, але об'єднані гепатотропністю збудників та обумовленою цим схожістю основних клінічних проявів (жовтяницею, інтоксикацією, гепатоспленомегалією).
Віруси гепатитів	Віруси, здатні викликати специфічне ураження печінки - гепатити. Вони відносяться до різних таксономічних груп та мають різні біологічні властивості. Поєднує їх лише здатність викликати гепатит у людини. До вірусів гепатитів відносять: вірус гепатиту А, вірус гепатиту В, вірус гепатиту С, вірус гепатиту D чи дельта-гепатиту, вірус гепатиту Е, і вірус гепатиту G. Передбачають існування інших поки що неідентифікованих вірусів гепатиту.
Діагностичні маркери	Антигени, антитіла і нуклеїнові кислоти вірусів, виявлення яких дозволяє встановити етіологію вірусного гепатиту і/або присутність вірусу, характеризувати перебіг інфекції, прогнозувати її результат, оцінити ефективність лікування, судити про попередню зустріч з вірусом, що викликає гепатит, і поствакцинальний імунітет.
Вірусна персистенція	Збереження вірусу у функціонально активному стані в клітинах організму чи культурах клітин довше строків, притаманних гострій інфекції. Інфекції, пов'язані з цим феноменом, називають персистентними вірусними інфекціями.
Швидкі імунохроматографічні методи визначення HBsAg і анти-ВГС	<i>(Rapid, instrument-independent assays for the detection of HBsAg and anti-HBs)</i> дозволяють отримати результат дослідження протягом 5-15 хвилин без використання складного лабораторного устаткування. Основою тесту є нітроцелюозна мембрана, на поверхні якої міцно сорбовані анти-HBs або антигени, що кодуються РНК ВГС. Після зв'язування з ними шуканого HBsAg або анти-ВГС, послідовної промивки і додавання кон'югата (наприклад: анти-HBs, що мітяться колоїдним золотом, або мічена ферментом антисироватка, що преципітує IgG), наявність мітки визначають за допомогою відповідного субстрата.

Теоретичні питання до заняття:

- Облігатні та факультативні збудники вірусних гепатитів, їх властивості та класифікація.
- Вірусний гепатит А. Етіологія, епідеміологія, патогенез, клінічні прояви. Характеристика методів лабораторної діагностики. Специфічна профілактика, постінфекційний та поствакцинальний імунітет.
- Вірус гепатиту В. Особливості будови. Характеристика антигенів. Репродукція.
- Епідеміологія, патогенез і клініка вірусного гепатиту В. Постінфекційний імунітет. Лабораторна діагностика. Динаміка появи серологічних маркерів гепатиту В. Інтерпретація серологічних даних.
- Профілактика і лікування гепатиту В.
- Вірусний гепатит С. Етіологія, епідеміологія, патогенез, клінічні прояви. Характеристика методів лабораторної діагностики. Специфічна профілактика, постінфекційний та поствакцинальний імунітет.
- Вірусний гепатит D. Етіологія, епідеміологія, патогенез, клінічні прояви. Характеристика методів лабораторної діагностики. Специфічна профілактика, постінфекційний та поствакцинальний імунітет.
- Вірусний гепатит Е. Етіологія, епідеміологія, патогенез, клінічні прояви. Характеристика методів лабораторної діагностики.
- Збудники вірусних гепатитів G, TTV, SenV.

Практичні завдання, які виконуються на занятті:

- Вивчити класифікацію і диференційні властивості вірусів гепатитів.
- Здійснити облік лабораторної діагностики гепатиту В за допомогою ІФА. Зробити висновок.
- Ознайомитись з діагностичними тест-системами, лікувально-профілактичними препаратами, які використовуються при гепатитах.

Зміст теми

На практичному занятті студенти знайомляться з сучасними методами лабораторної діагностики вірусних гепатитів; ознайомитись з імуноферментним методом діагностики вірусного гепатиту В; знайомляться з препаратами для специфічної профілактики вірусного гепатиту А та вірусного гепатиту В (вакцини).

Виконані завдання студенти записують у протокол та підписують його у викладача.

Рекомендації для оформлення протоколу.

Характеристика вірусів гепатиту

Характеристика вірусів	<i>HAV</i>	<i>HBV</i>	<i>HCV</i>	<i>HDV</i>	<i>HEV</i>	<i>HGV</i>
Тип нуклеїнової кислоти	1л РНК(+)	2л ДНК, кільцева, неповна	1л РНК (+)	1л РНК дефектний вірус	1л РНК (+)	1л РНК+

Систематичне положення	<i>Picornaviridae</i>	<i>Hepadnaviridae</i>	<i>Flaviviridae</i>	<i>Deltavirus</i>	<i>Caliciviridae</i>	<i>Flaviviridae</i>
Розмір віріону (нм)	27	40	80	36	32-34	60
Будова	Простий	Складний	Складний	Складний	Простий	Складний
Культивування в культурі клітин	Клітини гепатоми	Клітини гепатоми	-	-	-	?
Патогенність для тварин	Шимпанзе, мармозети	Шимпанзе	Шимпанзе	Шимпанзе	Шимпанзе	?
Реплікація в гепатоцитах	Цитоплазма	Ядро	Цитоплазма	Ядро	Цитоплазма	?
Антигенні варіанти	Вірусспецифічний антиген	HBsAg, HBcAg, HBeAg, HBxAg	Кілька субтипів	2 форми: мала, велика	Неоднорідний	5 філогенетичних груп
Онкогенність	-	+	+	+	-	+
Асоціюється з іншими НВ				3 HBV		HCV, HAV, HBV
Механізм передачі	Фекально-оральний	Парентеральний Статевий	Парентеральний Статевий	Парентеральний	Фекально-оральний	Парентеральний
Фактори передачі	Вода, їжа	Кров, сперма, вагінальний секрет	Кров	Кров	Вода, їжа	Кров
Групи ризику	Діти	Медики, реципієнти крові, наркомани, статеві партнери, діти ВГВ-позитивних матерів	Медики, реципієнти крові, наркомани, статеві партнери, пацієнти гемодіалізу	Хворі на ВГВ, медики, рецепієнти, наркомани	Молоді люди Азії, Африки	Медики, реципієнти, наркомани, статеві партнери, пацієнти гемодіалізу
Профілактика	Інактивована та жива вакцина	1. Плазменна вакцина (з крові <i>HbsAg</i> -носіїв) 2. Генно-інженерна дріжджева 3. Рекомбінантна поксвірусна	Інтерферон	-	-	-

Завдання 1. Провести облік реакції ІФА, поставленої з метою виявлення HBs – антигену вірусу гепатиту В.

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

Завдання 2. Ознайомитись з препаратами для специфічної профілактики вірусних гепатитів.

- Комбінована вакцина для профілактики гепатиту А та гепатиту В – *TWINRIX*.
- Рекombінантна дріжджова вакцина проти гепатиту В – *ENGERIX*.

Питання для самоконтролю

- Вкажіть, які антигени вірусу гепатиту В можна виявити в сироватці крові хворих на вірусний гепатит В. Які антигени вірусу гепатиту В можна виявити лише в гепатоцитах?
- Які маркери гострого вірусного гепатиту В можна виявити в крові хворого?
- Які маркери гострого гепатиту А можна виявити в крові хворого?
- Який маркер можна виявити в крові після вакцинації проти вірусного гепатиту В?
- Які препарати застосовують з метою специфічної профілактики вірусного гепатиту В?
- Яка мінімальна інфікуюча доза вірусу гепатиту В при парентеральному попаданні?
- Які віруси гепатитів можуть призводити до розвитку первинної гепатоцелюлярної карциноми?
- Чим зумовлений високий процент хронізації та резистентність до антивірусної терапії при вірусному гепатиті С?
- Який метод профілактики вірусного гепатиту D?
- Які вірусні гепатити можна діагностувати в Україні? Які методи лабораторної діагностики слід застосувати?
- Які віруси є збудниками вірусних гепатитів TTV та SenV? Чи реєструються в Україні випадки цих захворювань?

Практичне заняття №24

Тема: «Ретровіруси. ВІЛ. Лабораторна діагностика ВІЛ-інфекції»

Актуальність теми.

СНІД називають чумою ХХ століття, яка забирає дедалі більше людських жертв. Для попередження подальшого розповсюдження ВІЛ-інфекції та її негативного впливу на соціальні та економічні процеси в нашій державі прийнято Закон України про запобігання захворюванню на СНІД, затверджена і реалізується програма профілактики СНІДу та наркоманії, введена в дію програма “Безпека донорської крові”.

На сьогодні смертельно небезпечним вірусом імунодефіциту у світі щодня інфікується близько 7000 переважно молодих людей. СНІД – соціально небезпечне інфекційне захворювання, інфікування збудником якого, при умові відсутності на сьогодні ефективних методів лікування та специфічної профілактики, призводить до смерті. Щомісяця в епідемію ВІЛ-інфекції (СНІДу) залучаються більш як 1000 громадян України. За темпами розвитку ВІЛ-інфекції наша країна протягом тривалого часу займає провідні позиції. Це все свідчить про актуальність теми заняття та спрямовано на формування позитивної мотивації її вивчення.

Конкретні цілі:

- Засвоїти основні біологічні властивості ретровірусів.
- Оволодіти сучасними методами лабораторної діагностики ВІЛ-інфекції та СНІДу.
- Аналізувати перспективу створення ефективних протиретровірусних препаратів та сучасні підходи до профілактики і лікування ВІЛ-інфекції.

Базові знання, вміння, навички, необхідні для вивчення теми (міждисциплінарна інтеграція). Дивись практичне заняття №16.

Перелік основних термінів, параметрів, характеристик, які повинен засвоїти студент при підготовці до заняття

Термін	Визначення
ВІЛ-інфекція	ВІЛ-інфекція – захворювання, викликане вірусом імунодефіциту людини (ВІЛ).
СНІД	СНІД – кінцева стадія ВІЛ-інфекції, яка характеризується різноманітними патологічними проявами, зумовленими глибоким ураженням імунної системи вірусами імунодефіциту людини.
Зворотня транскриптаза (ревертаза, РНК-залежна ДНК полімераза)	Зворотня транскриптаза (ревертаза, РНК-залежна ДНК полімераза) – фермент, який безпосередньо зв’язаний з вірусною РНК, він визначає стратегію геному в клітині, забезпечуючи деякі етапи репродукції вірусів (на вірусній РНК створює її ДНК-копію).

СНІД-асоційовані хвороби	СНІД-асоційовані хвороби – захворювання, що проявляються на пізніх стадіях розвитку ВІЛ-інфекції і вважаються проявом СНІДу.
Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР)	Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) – метод виявлення та ідентифікації вірусів та мікробів в досліджуваних матеріалах. Принцип методу базується на багаточисленному копіюванні (селективній ампліфікації) досліджуваної нуклеїнової кислоти ферментом ДНК – полімеразою.

Теоретичні питання до заняття:

- Загальна характеристика та класифікація онкогенних вірусів.
- Вірусо-генетична теорія виникнення пухлин за Л.О. Зільбером. Механізми вірусного канцерогенезу.
- Морфологія і хімічний склад вірусів імунодефіциту людини. Типи ВІЛ.
- Походження та еволюція ВІЛ. Особливості геному.
- Культивування ВІЛ, стадії взаємодії цих вірусів з чутливими клітинами.
- Клітини-мішені для ВІЛ в організмі людини, характеристика поверхневих вірусних рецепторів.
- Механізм розвитку імунодефіциту. СНІД-асоційована патологія (опортуністичні інфекції та пухлини).
- Методи лабораторної діагностики СНІДу (імунологічні, генетичні).
- Перспективи специфічної профілактики і терапії ВІЛ-інфекції.

Практичні завдання, які виконуються на занятті:

- Записати в протокол схему лабораторної діагностики ВІЛ-інфекції.
- Здійснити облік лабораторної діагностики ВІЛ-інфекції за допомогою ІФА, зробити висновок.
- Ознайомитись з діагностичними тест-системами, лікувально-профілактичними препаратами, які використовуються при ВІЛ-інфекції.

Зміст теми.

На практичному занятті студенти знайомляться з класифікацією та основними біологічними властивостями ретровірусів, детально зупиняються на морфологічних, фізико-хімічних властивостях, ультраструктурі, антигенній будові ВІЛ, методам лабораторної діагностики та перспективі специфічної профілактики та лікування ВІЛ-інфекції. Студенти розглядають та аналізують схему постановки полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) поставленої з метою лабораторної діагностики ВІЛ/СНІДу а також її модифікацію, яка забезпечує кількісне визначення РНК ВІЛ в крові хворих. Розглядають принципи імуноблоту. Проводять облік реакцій ІФА, поставленої з метою серологічної діагностики ВІЛ. Складаючи схему лабораторної діагностики ВІЛ-інфекції та СНІДу, студенти використовують знання, набуті під час самостійної підготовки та в процесі розгляду теми на занятті. Крім того, студенти на занятті знайомляться з

препаратам, що використовуються для лабораторної діагностики ВІЛ-інфекції. Виконані завдання студенти записують у протокол та підписують його у викладача.

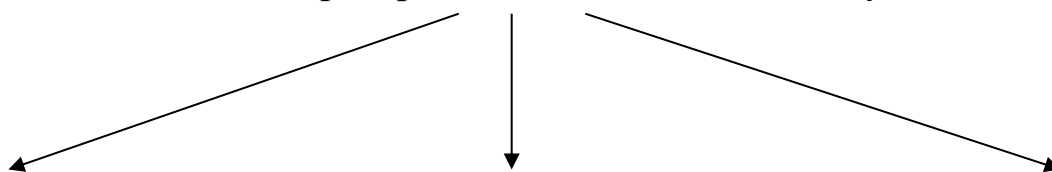
Рекомендації для оформлення протоколу

Класифікація ретровірусів (родина *Retroviridae*)

Рід	Представники
<i>Alpharetrovirus</i>	Віруси лейкозу, саркоми птахів, саркоми Рауса курей
<i>Betaretrovirus</i>	Вірус раку молочних залоз мишей, ендогенний ретровірус людини, вірус мавп Мезон-Пфайзера
<i>Gammaretrovirus</i>	Віруси саркоми і лейкемії мишей, котів, приматів
<i>Deltaretrovirus</i>	Вірус лейкемії великої рогатої худоби, лімфотропний вірус Т-лімфоцитів людини (HTLV-1,2)
<i>Epsilonretrovirus</i>	Вірус саркоми шкіри
<i>Lentivirus</i>	ВІЛ, вірус Меді/Вісна, анемії коней
<i>Sputavirus</i>	Вірус людини, вакуолізує клітини („піниться”), бичачий сінцитіальний вірус

Завдання 1. Записати в протокол схему лабораторної діагностики ВІЛ/СНІДу.

Схема лабораторної діагностики ВІЛ/СНІДу



Індикація ВІЛ, чи його компонентів в матеріалі від хворих	Виявлення противірусних антитіл	Виявлення специфічних змін в імунній системі
<ul style="list-style-type: none"> - полімеразна ланцюгова реакція - імуноферментний аналіз - виділення ВІЛ з клінічного матеріалу на первинних і стабільних культурах клітин лімфоцитів - електронна мікроскопія 	<ul style="list-style-type: none"> - імуноферментний аналіз - вестрнблот (імуноблот) - реакція імунофлюоресценції - реакція латексаглютинації - реакція радіоімунопреципітації 	<ul style="list-style-type: none"> - визначення кількості Т4-клітин - визначення співвідношення Т-хелперів та Т-супресорів - визначення кількості інтерлейкіну-2 та гама-інтерферону

Завдання 2. Провести облік реакції ІФА, поставленої з метою скринінгової серологічної діагностики ВІЛ-інфекції.

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

Завдання 3. Ознайомитися та занести до протоколу основні препарати, що використовуються для лікування ВІЛ/СНІДу.

1. *Інгібітори зворотної транскриптази нуклеозидної природи* (зидовудин, ламівудин, емтрицитабін та тенофовір та ін.).
2. *Інгібітори зворотної транскриптази ненуклеозидної природи* (невірапін, ефавіренз, делавірдин та ін.)
3. *Інгібітори протеази* (ритонавір, дарунавір та ін.).

Питання для самоконтролю.

- Назвіть спільні ознаки представників ретровірусів.
- Яка будова вірусів імунодефіциту людини?
- Які ферменти має ВІЛ?
- З якими рецепторами клітини взаємодіє ВІЛ?
- Які фізичні фактори є згубними для ВІЛ?
- Які порушення клітинного імунітету спостерігаються у хворих СНІДом?
- Яка схема патогенезу ВІЛ?
- Які механізми передачі ВІЛ?
- В яких біологічних рідинах виявляються антитіла до ВІЛ?
- Які методи діагностики ВІЛ?
- Які препарати використовуються для лікування ВІЛ?
- Які проблеми та перспективи розробки специфічної профілактики ВІЛ?

РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА

Основна:

1. Широбоков В.П., Климнюк С.І. Мікробіологія, вірусологія та імунологія в запитаннях і відповідях: навч. посіб. /Широбоков В.П., Клімнюк С.І., Корнійчук О.П. та ін.] –Тернопіль: ТДМУ, 2019. – 564 с.
2. Широбоков В.П., Климнюк С.І. Практична мікробіологія: навчальний посібник / [Климнюк С.І., Ситник І.О., Широбоков В.П. та ін.], - Вінниця: Нова книга, 2018.- 576 с.
3. Широбоков В.П. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология:ученик для студ. Высш. Мед. учеб. Заведений: перевод с укр.. издания / [Адрианова Т.В., Бобырь В.В., Виноград Н.А. и др..], - Винница. – Новая Книга, 2015. – 856 с. : ил.
4. Широбоков В.П. Медична мікробіологія, вірусологія та імунологія: підручник для студ. вищ. навч. закл. / Видання 2-е. – Вінниця: Нова Книга, 2011, 952 с. : іл.
5. Медична мікробіологія, вірусологія та імунологія: підручник для студ. вищ. мед. навч. заклад. (За редакцією В.П.Широбокова). Вінниця: »Нова Книга», 2010. 447 – 451, 912 с.
6. Янковский Д.С., Широбоков В.П., Дымент Г.С. Интегральная роль симбиотической микрофлоры в физиологии человека. К: ТОВ «Червона Рута-Турс», 2011. 169 с.
7. Воробьев А.А., Кривошеин Ю.С., Широбоков В.П. Медицинская и санитарная микробиология. М., 2006.
8. Поздеев О.А. Медицинская микробиология: учебное пособие / под ред. В.И.Покровского. – 4-е изд. испр. – М: ГЭОТАР – Медиа, 2006.
9. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология. Под ред. А.А.Воробьева, М., 2004, с. 354-356.
10. Климнюк С. І, Ситник І. О., Творко М. С., Широбоков В. П. – Практична мікробіологія.-Тернопіль, „Укрмедкнига”, 2004, с. 190-194.

Додаткова:

1. Medical microbiology / edited by Samuel Baron, MD. – 4th ed. The University of Texas Medical Branch and Galveston, 1996, 1273 p.
2. W.Levinson, E.Jawetz. Medical microbiology and immunology: examination and board review, 6th ed. The McGraw-Hill Companies, 2000, 582 p.