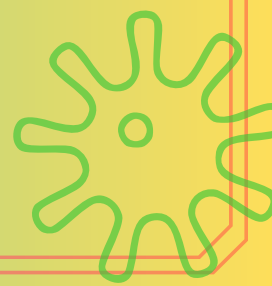
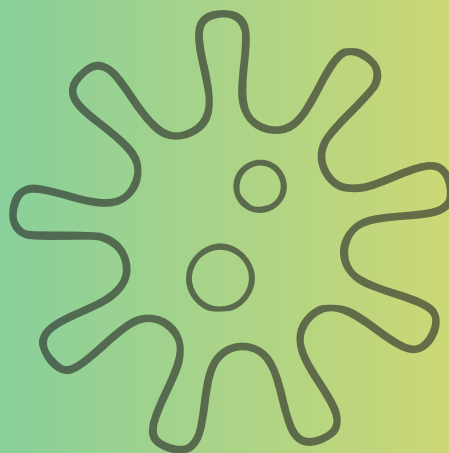


РОМАНИШИНА Т.О.
ЛАХМАН А.Р.
СОЛОДКА Л.О.
БЕГАС В.Л.

**ВЕТЕРИНАРНА МІКРОБІОЛОГІЯ,
ВІРУСОЛОГІЯ
ТА
ІМУНОЛОГІЯ**

НАВЧАЛЬНИЙ ПОСІБНИК



**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ПОЛІСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**

**Романишина Т. О., Лахман А. Р.,
Солодка Л. О., Бегас В. Л.**

**Ветеринарна мікробіологія, вірусологія та
імунологія**

Навчальний посібник

За загальною редакцією Романишиної Т. О. та Лахман А. Р.

Житомир 2024

УДК 619:579:579.2:57.087
В-39

рекомендовано до друку Вченою радою Поліського національного університету
(Протокол № 4 від 27.11.2024)

Рецензенти:

Гутий Б. В., д., вет. н., професор, завідувач кафедри гігієни, санітарії та загальної ветеринарної профілактики ім. М.В. Демчука Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького

Зажарський В. В., к. вет. н., доцент, завідувач кафедри інфекційних хвороб тварин Дніпровського державного аграрно-економічного університету

Сокульський І.М., к. вет. н., доцент, завідувач кафедри нормальної та патологічної морфології, гігієни та експертизи Поліського національного університету

Автори:

Романишина Т. О. к. вет. н., доцент, доцент кафедри мікробіології, фармакології та ветеринарної епідеміології

Лахман А. Р., доктор філософії, асистент кафедри мікробіології, фармакології та ветеринарної епідеміології

Солодка Л. О., к. біол. н., доцент

Бегас В. Л., к. вет. н., доцент, доцент кафедри мікробіології, фармакології та ветеринарної епідеміології

В-39.

Ветеринарна мікробіологія, вірусологія та імунологія: навч. посібник / Романишина Т. О., Лахман А. Р., Солодка Л. О., Бегас В.Л.; за заг. ред. Т. О. Романишиної та А. Р. Лахман. Житомир: Поліський національний університет. 2024. 186 с. (8,64 д. а.) Режим доступу: <https://drive.google.com/drive/u/7/folders/10LMXbYyMCuRwevrtgeWqu7aJnmrB7WLS>

У навчальному посібнику подано перелік та характеристику основних теоретичних та практичних аспектів у сфері ветеринарної мікробіології, вірусології та імунології. Описані сучасні підходи до ідентифікації, діагностики та дослідження мікроорганізмів, вірусів і системи імунітету, які впливають на здоров'я тварин.

Для студентів та аспірантів факультету ветеринарної медицини спеціальності
211 «Ветеринарна медицина» та біологічних спеціальностей.

УДК 619:579:579.2:57.087

© Т. О. Романишина, А. Р. Лахман, Л. О. Солодка, В. Л. Бегас. 2024
Всі права захищені

Зміст

Передмова	5
РОЗДІЛ 1. ВЕТЕРИНАРНА МІКРОБІОЛОГІЯ	6
Тема 1. Бактеріологічні лабораторії	6
Поняття біозахисту та біобезпеки у лабораторіях	
Організація роботи в мікробіологічних лабораторіях	
Поняття дезінфекції та стерилізації	
Методи термічної стерилізації лабораторного обладнання	
Тема 2. Поживні середовища для культивування мікроорганізмів. Вимоги до поживних середовищ	17
Тема 3. Методи висівів мікроорганізмів на живильні середовища	24
Тема 4. Характеристика мікробних культур, вирощених у лабораторних умовах. Культуральні ознаки мікроорганізмів	33
Тема 5. Мікроскопічні дослідження. «Живі» препарати. Фарбовані препарати. Прості методи фарбування мікробних клітин.	39
Тема 6. Мікроскопічні дослідження мікроорганізмів Фарбовані препарати: складне фарбування методом Грама. Виявлення структур бактерій	47
Тема 7. Методи ідентифікації чистих культур мікроорганізмів. Визначення деяких фізіологічних (біохімічних) властивостей бактерій	58
РОЗДІЛ 2. ВЕТЕРИНАРНА ВІРУСОЛОГІЯ	65
Тема 1. Характеристика клітинних та неклітинних інфекційних агентів	65
Загальна характеристика вірусологічної лабораторії	
Правила техніки безпеки при роботі з вірусологічним матеріалом	
Тема 2. Методи інактивації вірусів у лабораторних умовах. Алгоритм обробок об'єктів забруднених вірусами.	75
Тема 3. Відбір патологічного матеріалу при підозрі на вірусну хворобу, особливості його пакування, консервації та транспортування	81
Тема 4. Підготовка вірусологічного патологічного матеріалу до лабораторних досліджень	90
Тема 5. Схема діагностики при вірусомісних захворюваннях тварин	95

Тема 6. Накопичення вірусів у живих об'єктах. Живильні середовища для культур клітин	99
Тема 7. Експрес-методи досліджень вірусовмісного патологічного матеріалу	107
РОЗДІЛ 3. ВЕТЕРИНАРНА ІМУНОЛОГІЯ	124
Тема 1. Імунітет. Види імунітету. Рівні вивчення імунітету. Фактори неспецифічної резистентності. Органи імунної системи.	124
Тема 2. Поняття антигенів. Властивості антигенів	131
Тема 3. Штучні антигени (вакцини)	137
Типи вакцин. Хронологія створення вакцин	
Проведення вакцинації різним видам тварин	
Тема 4. Клітини імунної системи. Поняття імуноглобулінів.	144
Тема 5. Імунна відповідь. Механізми нормальної імунної відповіді	154
Тема 6. Порушення нормальної імунної відповіді	160
Список використаної літератури	166
Предметний показчик	180

ПЕРЕДМОВА

Становлення ветеринарної мікробіології, вірусології та імунології як окремих галузей біологічної науки почалося з нагромадження знань про патогени та їх вплив на здоров'я тварин і людей. Початково ці дисципліни розвивалися у межах ветеринарної медицини, орієнтуючись на контроль та лікування інфекційних захворювань у сільськогосподарських і домашніх тварин. Однак зі зростанням потреб у забезпеченні здорової харчової продукції, посиленням глобалізації та виникненням нових патогенів стало зрозуміло, що необхідно більш комплексне вивчення взаємодії мікроорганізмів з тваринами. Це привело до швидкого прогресу ветеринарної мікробіології та вірусології.

З розвитком знань про мікроби, бактерії, віруси й інші інфекційні агенти, ветеринарна мікробіологія та вірусологія виділилися в окремі напрями дослідження. Імунологія, як дисципліна, що вивчає захисні механізми організмів, розвивалася паралельно, адже розуміння реакції імунної системи тварин на патогени є критичним для створення ефективних вакцин та лікувальних препаратів. Науковий підхід до цих галузей включає комплексні експериментальні дослідження, розробку новітніх методів діагностики, профілактики та контролю хвороб. Різноманітність мікроорганізмів і вірусів, що викликають захворювання у тварин, вимагає від майбутніх фахівців ґрунтовних знань для їх ідентифікації та контролю.

На сьогодні ветеринарна мікробіологія, вірусологія та імунологія взаємопов'язані з різними сферами медицини, екології, генетики та біотехнологій. Вони розвиваються в рамках єдиної наукової концепції «Єдиного здоров'я», що визнає спільність інфекційних агентів між людьми, тваринами та довкіллям.

Цей навчальний посібник орієнтований на студентів, аспірантів та практикуючих ветеринарів, що прагнуть оволодіти знаннями з основ мікробіології, вірусології та імунології. Посібник має на меті надати актуальні теоретичні базові знання, необхідні для подальшого розуміння патогенезу інфекційних патологій та імунних процесів.

Також, посібник спрямований на створення теоретичної бази для подальшого вивчення спеціалізованих дисциплін та ефективного застосування знань у практичній діяльності, а також сприятиме комплексному розумінню взаємодії між організмом тварини та збудниками інфекцій.

Завдяки цьому підходу, майбутні лікарі ветеринарної медицини зможуть отримати важливі знання для діагностики, лікування та профілактики захворювань тварин і тим самим сприятимуть захисту здоров'я як тварин, так і людей, беручи до уваги зростання поширеності зоонозних інфекцій.

РОЗДІЛ 1. ВЕТЕРИНАРНА МІКРОБІОЛОГІЯ

Тема 1. Бактеріологічні лабораторії

Поняття біозахисту та біобезпеки у лабораторіях Організація роботи в мікробіологічних лабораторіях

Поняття дезінфекції та стерилізації

Методи термічної стерилізації лабораторного обладнання

Бактеріологічні лабораторії — це спеціалізовані науково-дослідні або практичні установи, в яких здійснюються мікробіологічні, біологічні та серологічні дослідження. Такі лабораторії створюють у науково-дослідних інститутах, навчальних закладах, медичних та ветеринарних установах, а також у санітарно-епідеміологічних організаціях для виконання діагностичних та контрольних завдань.

Бактеріологічні лабораторії медичних та ветеринарних закладів проводять аналізи для діагностики інфекційних захворювань, визначають чутливість мікроорганізмів до антибіотиків і контролюють ефективність хіміотерапевтичного лікування. Вони також забезпечують дотримання санітарно-епідеміологічного режиму в установах.

Типи лабораторій

Бактеріологічні лабораторії умовно систематизують на:

- мікробіологічні лабораторії (медичні, ветеринарні);
- регіональні лабораторії санітарно-епідеміологічного контролю;
- лабораторії в обласних і міських санепідемстанціях.

Мікробіологічна лабораторія – це установа, де здійснюють дослідження для індикації та ідентифікації мікроорганізмів, проведення діагностики інфекційних захворювань, контролю за санітарно-епідеміологічним станом, а також перевірки ефективності хіміотерапевтичних і профілактичних заходів. Сучасні мікробіологічні лабораторії можуть функціонувати в різних установах, включаючи медичні заклади, ветеринарні клініки, науково-дослідні інститути тощо.

Регіональні лабораторії санітарно-епідеміологічного контролю виконують санітарно-бактеріологічний аналіз води, продуктів харчування та біологічних матеріалів (випорожнень, сечі, шлункових промивних вод тощо), що дозволяє виявити хвороботворні та умовно-патогенні бактерії. Зокрема, вони виділяють гемокультури для діагностики черевного тифу, паратифів, сепсису та інших інфекційних захворювань, аналізують матеріал для виявлення збудників туберкульозу, дифтерії, коклюшу та інших інфекцій.

Лабораторії в обласних і міських санепідемстанціях проводять розширені дослідження, зокрема перевіряють стерильність медичних матеріалів, проводять аналізи повітря, а також змиви з рук, інструментів та обладнання в лікарнях і дитячих закладах. Лабораторії такого рівня досліджують анаеробну, кокову та кишкову мікрофлору, а також визначають

чутливість збудників до антибіотиків за допомогою серійних розведень. Особлива увага приділяється моніторингу носійства патогенних бактерій серед медичного персоналу та співробітників підприємств громадського харчування з метою профілактики харчових інфекцій і дисбактеріозу.

Поняття біозахисту та біобезпеки у лабораторіях

Біозахист та біобезпека — це ключові поняття, що мають на меті забезпечення безпечних умов роботи у лабораторіях, особливо при роботі з біологічними матеріалами, що містять патогени. Хоча ці поняття тісно пов'язані, вони мають різні цілі та охоплюють різні аспекти роботи з патогенними мікроорганізмами.

Біозахист (англ. *biosecurity*) — це комплекс заходів і процедур, спрямованих на запобігання випадковому або навмисному поширенню патогенів за межі лабораторії. Біозахист зосереджений на тому, щоб захистити навколишнє середовище, людей та тварин від небезпечних мікроорганізмів, що можуть вийти з-під контролю. Основне завдання біозахисту — контроль доступу до патогенних матеріалів та захист від розповсюдження патогенів у зовнішнє середовище.

Біобезпека (англ. *biosafety*) — це заходи, спрямовані на мінімізацію ризиків зараження, травмування чи інших небезпечних ситуацій для співробітників, які працюють з патогенами в лабораторії. Вона включає методи, які забезпечують безпеку самого працівника та інших осіб, що можуть контактувати з лабораторією чи матеріалами. Основна мета біобезпеки — захистити здоров'я та життя людей, які мають безпосередній контакт з патогенами.

Біозахист та біобезпека є взаємопов'язаними концепціями, адже обидва спрямовані на забезпечення безпеки при роботі з патогенами. Вони часто доповнюють одне одного: біобезпека захищає персонал від патогенів, а біозахист — зовнішнє середовище від можливого виходу патогенів з лабораторії. Головна відмінність полягає у фокусі: біобезпека зосереджена на безпеці працівників, тоді як біозахист — на запобіганні поширенню патогенів у навколишнє середовище.

У ветеринарних лабораторіях при роботі з різними типами патогенних матеріалів важливо дотримуватись таких принципів:

Контроль доступу — забезпечення доступу до лабораторії тільки уповноваженим особам, щоб мінімізувати ризик неконтрольованого використання або поширення патогенів.

Використання захисного обладнання — обов'язкове використання засобів індивідуального захисту (ЗІЗ), таких як рукавички, захисні окуляри, халати та респіратори, що знижують ризик зараження при роботі з біоматеріалами.

Суворі гігієна та дезінфекція — після кожного дослідження робоче місце та обладнання повинні бути очищені та дезінфіковані, щоб уникнути забруднення інших зразків або поверхонь.

Фізична ізоляція патогенів — використання спеціальних боксів з контролем мікроорганізмів для роботи з патогенами високого рівня небезпеки, що запобігає їхньому виходу в атмосферу.

Контроль та утилізація відходів — біологічні відходи, зокрема ті, що містять патогени, повинні бути правильно зібрані та знешкоджені, щоб не допустити їх потрапляння у зовнішнє середовище.

Навчання та інструктаж персоналу — регулярне навчання працівників щодо правил біозахисту та біобезпеки, інструктаж з протоколів роботи з небезпечними біоматеріалами, а також дії у випадку аварійних ситуацій.

Моніторинг та контроль здоров'я працівників — постійний контроль здоров'я співробітників, що працюють з патогенами, для швидкого виявлення можливих інфекційних випадків.

Організація простору та обладнання у бактеріологічних лабораторіях

Планування, обладнання та режими роботи бактеріологічної лабораторії повинні забезпечувати умови, які гарантують стерильність досліджень, запобігають поширенню інфекцій та контамінації мікроорганізмами навколишнього середовища. Це досягається через належний поділ приміщень на «чисті» і «брудні» зони, а також суворий контроль за дезінфекцією робочих поверхонь.

Лабораторія має спеціальні приміщення: лабораторні кімнати, бокси для роботи з інфікованими матеріалами, стерилізаційні кімнати, термостати, автоклави для стерилізації обладнання та інші приміщення для обробки проб. Приміщення облаштовують так, щоб уникнути перехресного забруднення, використовуючи матеріали, які легко очищаються та дезінфікуються. Зокрема, робочі кабінети мають бути просторими та добре освітленими, з підведеною гарячою та холодною водою для забезпечення належних умов роботи.

Сучасні ветеринарні бактеріологічні лабораторії використовують новітні методи діагностики, такі як ПЛР та геномне секвенування, методи геномної чіпізації, що дозволяє швидко виявити збудників і оцінити ризики розповсюдження інфекцій серед тварин. Це особливо важливо для запобігання спалахам інфекцій, які можуть передаватися як серед тварин, так і від тварин до людей. Лабораторна кімната є ключовим приміщенням для проведення досліджень, де дотримуються суворих протиепідемічних вимог. Щоденне вологе прибирання та регулярна дезінфекція всіх поверхонь — підлоги, стін, столів та обладнання — необхідні для забезпечення стерильності робочого середовища. Робочі столи вкривають спеціальним склом або пластиком, щоб їх було легко дезінфікувати. У приміщенні виділяють окремі робочі місця, закріплені за кожним співробітником для мінімізації ризику перехресного забруднення. Для роботи з матеріалами в умовах максимальної стерильності

створюють спеціальні бокси. Їхній простір зазвичай розрахований на двох осіб і має окремий вхід із тамбуром для запобігання контамінації. Меблі у боксі — металеві або інші стійкі до дезінфекції матеріали, а поверхні оброблені світлою фарбою або облицювальною плиткою, що полегшує чистку. Бокс оснащений системою стерильного повітря, що є особливо важливим для ветеринарних лабораторій, де досліджують інфекційні зразки, здатні викликати зоонозні захворювання.

Сучасні лабораторні бокси обладнані системами подачі стерильного повітря або ламінарними потоками, що забезпечує оптимальні умови стерильності та високий рівень безпеки для персоналу. Перед початком і після завершення роботи у боксах проводиться ретельне вологе прибирання, дезінфекція поверхонь та опромінення приміщення бактерицидними лампами протягом 1-2 годин. Контроль чистоти повітря здійснюється регулярно, зокрема шляхом тестування на наявність мікроорганізмів для запобігання контамінації. Для невеликих об'ємів досліджень використовуються компактні настільні бокси. Їх конструкція включає скляну камеру розмірами 100 x 70 x 70 см, з отворами для рук, оснащеними спеціальними нарукавниками, що забезпечує максимальну стерильність. Найбільш ефективними є настільні бокси з ламінарним потоком стерильного повітря, які часто застосовуються у ветеринарній мікробіології для швидкої та безпечної обробки зразків. У великих регіональних лабораторіях та морських портах створюються спеціалізовані відділення для роботи з особливо небезпечними збудниками інфекційних хвороб, таких як чума, холера, сибірка, бруцельоз, сап, лептоспіроз та інші зоонозні інфекції, що передаються від тварин до людини. В таких лабораторіях впроваджується жорсткий протиепідемічний режим, чітко регламентований спеціальними інструкціями. До роботи в цих відділеннях допускаються лише спеціально підготовлені працівники, які пройшли відповідне навчання, а особи з протипоказаннями не допускаються.

Особливо жорсткі протиепідемічні заходи впроваджуються для лабораторій, де досліджують надзвичайно небезпечні інфекції. Перед входом у такі лабораторії персонал змінює одяг у спеціальній роздягальні. Залежно від типу роботи використовуються різні протичумні костюми, що включають захисний одяг, респіратор та окуляри. По завершенні роботи одяг знезаражується: спочатку руки в рукавичках обробляються в 5% розчині лізолу, а всі предмети одягу по черзі знімаються, обробляючи їх дезінфектором. Інструменти після розтину тварин кип'ятять у дезрозчині, а залишки матеріалу знищують автоклавуванням чи спаленням. У ветеринарних лабораторіях, де досліджують інфекційні захворювання тварин, також впроваджуються сучасні методи безпеки, наприклад, одноразове обладнання та автоматизовані системи відбору і зберігання зразків, що знижує ризик поширення інфекцій серед персоналу та забезпечує біозахист у дослідженнях зоонозних інфекцій.

Організація роботи в мікробіологічних лабораторіях

У ветеринарній медицині мікробіологічні лабораторії відіграють важливу роль, оскільки дозволяють своєчасно діагностувати інфекційні бактеріологічні захворювання серед тварин, визначати необхідне лікування та заходи для запобігання поширенню інфекцій. Такі лабораторії займаються дослідженням зразків від тварин, таких як кров, сеча, фекалії, слиз, а також біопсії тканин для виявлення патогенних мікроорганізмів або інших збудників захворювань.

Види мікробіологічних лабораторій

Мікробіологічні лабораторії можуть бути бактеріологічними, вірусологічними, мікологічними, паразитологічними або імунологічними. Кожен тип лабораторії має свої функції та завдання, хоча їх організація та структура часто є схожою.

Бактеріологічні лабораторії займаються виявленням та ідентифікацією бактерій, що викликають інфекційні захворювання у тварин і людей. Вони проводять діагностику, визначають чутливість збудників до антибіотиків, досліджують проби води, харчових продуктів, середовищ існування тварин.

Організація та планування приміщень

Приміщення мікробіологічної лабораторії повинні відповідати певним вимогам для забезпечення безпеки персоналу та правильного проведення досліджень. Основними приміщеннями є лабораторна кімната, бокс з передбоксником для роботи зі зразками, автоклавна для стерилізації обладнання, термостатна для зберігання культур. Кожне приміщення має свої вимоги до стерильності, освітлення та вентиляції.

Зони зразків та зон обробки повинні бути чітко розмежовані. Лабораторії також повинні бути обладнані системами для видалення повітря, фільтрації та дезінфекції приміщень, щоб забезпечити необхідний рівень стерильності.

Протиепідемічний режим та дотримання стерильності

У мікробіологічних лабораторіях ветеринарного профілю суворо дотримуються протиепідемічного режиму. Для роботи з інфекційними матеріалами персонал користується індивідуальним захисним одягом, дезінфікує всі поверхні та інструменти після завершення досліджень. Особливі заходи безпеки вживаються під час роботи з високопатогенними збудниками, такими як лептоспіри, сальмонели, мікобактерії. Крім того, в лабораторіях ветеринарного профілю можуть проводити дослідження на наявність антибіотикорезистентності мікроорганізмів. Такий підхід забезпечує контроль за ефективністю лікування та сприяє розробці рекомендацій щодо раціонального використання антибіотиків у тваринництві.

Обладнання та меблі

Основне обладнання включає мікроскопи, термостати, центрифуги, рН-метри, холодильники, ламінарні бокси. Сучасні ветеринарні лабораторії також мають спеціалізовані аналізатори для ідентифікації бактерій, грибів і вірусів на основі генетичних методів дослідження. Для роботи з матеріалом в умовах стерильності облаштовуються спеціальні бокси, які забезпечують подачу стерильного повітря.

Одним із ключових інструментів є мікроскоп, що дозволяє детально досліджувати мікроорганізми та структуру зразків. Для стерилізації обладнання і знищення патогенних мікроорганізмів застосовуються автоклави, які працюють під високим тиском та температурою. Термостати підтримують оптимальні умови для культивування мікроорганізмів, що є важливим для дослідження їх властивостей та чутливості до антибіотиків. Лабораторні столи вкриті спеціальним покриттям, яке легко піддається дезінфекції, а простір розділений на чисті та робочі зони для мінімізації ризику контамінації. Додатково встановлюються ламінарні шафи, які забезпечують подачу стерильного повітря, захищаючи як зразки, так і персонал. Бактерицидні лампи використовуються для обробки повітря і поверхонь, що знижує ризик поширення інфекцій. Для роботи з біологічними матеріалами персонал користується пінцетами, піпетками, чашками Петрі та іншими стерильними інструментами, що зберігаються у спеціальних контейнерах або шафах з ультрафіолетовою обробкою. Сучасні мікробіологічні лабораторії також обладнані комп'ютерними системами для збору, обробки та зберігання даних, що спрощує роботу з великими обсягами інформації та забезпечує точність у результатах досліджень.

Вимоги та правила безпеки при роботі у мікробіологічних лабораторіях

1. До роботи допускаються лише фахівці, які пройшли навчання і знайомі з правилами лабораторної безпеки.
2. Кожен співробітник закріплений за окремим робочим місцем для зменшення ризику контамінації.
3. Лабораторний персонал має індивідуальний захисний одяг, включаючи халати, шапочки, стерильні маски, а для роботи у боксі – додатковий фартух, рукавички та нарукавники.
4. У лабораторії заборонено палити, вживати їжу та зберігати продукти.
5. Всі зразки, що надходять, вважаються потенційно небезпечними та реєструються у спеціальному журналі з обов'язковим маркуванням.
6. Використані матеріали знищуються щоденно, а робочі поверхні та інструменти підлягають дезінфекції.
7. Переливання рідин з патогенами здійснюється лише над посудиною з дезінфектором, а рідини набираються за допомогою гумових груш або балонів.

8. При випадковому розливі заразного матеріалу співробітник негайно повідомляє керівника та проводить дезінфекцію уражених ділянок.

9. У лабораторії заборонено непотрібні рухи, розмови та пересування, що знижує ризик контамінації.

10. Матеріали, культури та зразки з лабораторії не повинні виноситися без дозволу, а обладнання, що зберігає їх, підлягає пломбуванню під контролем керівника.

11. Для зберігання музейних культур використовують агарові стовпчики під вазеліном або герметично запаюні ампули.

12. Після завершення робіт лабораторія дезінфікується, всі інфіковані предмети збираються в окремі контейнери для подальшої стерилізації.

Поняття дезінфекції та стерилізації

Дезінфекція — це процес знищення або пригнічення патогенних мікроорганізмів на поверхнях, у повітрі та на різних предметах. Її мета — значно зменшити кількість мікробів до рівня, безпечного для здоров'я, але вона не гарантує повного знищення всіх мікроорганізмів і їхніх спор. Дезінфекція використовується для забезпечення безпечного середовища в медичних, громадських та побутових умовах.

Стерилізація — це повне знищення всіх мікроорганізмів, включаючи спори бактерій, грибків та вірусів, що досягається при високих температурах, тиску або з допомогою спеціальних хімічних засобів. Стерилізація використовується для обробки медичних інструментів та лабораторного обладнання, де необхідна абсолютна стерильність.

Спільні ознаки між даними діями: обидва процеси спрямовані на знищення патогенних мікроорганізмів (табл. 1.1).

Табл. 1.1. Відмінні ознаки між дезінфекцією та стерилізацією

Критерій порівняння	Дезінфекція	Стерилізація
Мета	Знищення патогенних мікроорганізмів до безпечного рівня	Повне знищення всіх мікроорганізмів, включаючи спори
Сфера застосування	Поверхні, повітря, загальне середовище	Інструменти та матеріали, що потребують абсолютної чистоти
Рівень знищення мікроорганізмів	Не повністю усуває всі мікроорганізми та спори	Повністю усуває всі мікроорганізми та спори
Методи	Фізичні (УФ-випромінювання), хімічні (спирти, хлорвмісні препарати)	Фізичні (автоклавування, сухе тепло), хімічні (формальдегід, оксид етилену)
Область застосування	Побутові, медичні, лабораторні умови для дезінфекції поверхонь	Медичні та лабораторні умови для обробки інструментів

А також, мають чіткий вектор на забезпечення безпеки під час роботи з інфекційними матеріалами. Завдяки методам дезінфекції і стерилізації досягається необхідний рівень чистоти в лабораторіях та медичних установах, що сприяє безпеці працівників і пацієнтів

Методи Дезінфекції

Фізична дезінфекція: здійснюється за допомогою тепла, ультрафіолетового випромінювання чи бактерицидних ламп. Наприклад, опромінення ультрафіолетом ефективно для обробки повітря та поверхонь у медичних і лабораторних приміщеннях.

Хімічна дезінфекція: включає використання хімічних засобів, таких як спирти, хлорвмісні препарати, феноли та четвертинні амонієві сполуки. Хімічна дезінфекція ефективна для обробки поверхонь, інструментів та рук.

Сучасні Дезінфектанти

Спиртові розчини (етанол, ізопропанол) — швидкодіючі засоби, ефективні проти широкого спектра мікроорганізмів.

Хлоргексидин – застосовується в медичних установах для обробки шкіри, антисептики.

Четвертинні амонієві сполуки (ЧАС) – використовуються для поверхонь, мають м'яку дію на матеріали та стійкий антимікробний ефект.

Гіпохлорит натрію – ефективний дезінфектант для поверхонь, використовується в госпіталях і лабораторіях.

Методи стерилізації

До основних методів стерилізації належать хімічні та фізичні методи.

Хімічна стерилізація: використовується для матеріалів, які не витримують високих температур або вологих умов. Включає використання хімічних речовин для стерилізації обладнання та інструментів.

Сучасні засоби для хімічної стерилізації

Формальдегід – використовується для стерилізації апаратури, але потребує ретельної вентиляції, оскільки газ є токсичним.

Оксид етилену – газовий стерилізатор, ефективний для виробів з пластику, гумових виробів та медичних інструментів, чутливих до температури.

Перекис водню у вигляді пари — використовується для стерилізації чутливих матеріалів; є нетоксичним та екологічно безпечним.

Глутаральдегід – використовується для стерилізації оптичних приладів та чутливих до тепла медичних інструментів, але вимагає ретельного контролю часу контакту.

Перекисна кислота – має швидку дію і підходить для стерилізації хірургічних інструментів, забезпечує повне знезараження без залишкових токсичних продуктів.

Сучасні хімічні методи стерилізації дозволяють забезпечити стерильність навіть для найчутливіших матеріалів, одночасно дотримуючись вимог екологічної безпеки.

Важливим інструментом для забезпечення безпеки, профілактики інфекцій та підтримки стерильності обладнання, інструментів і робочих зон у ветеринарній медицині є **фізичні методи стерилізації**. Фізичні фактори, такі як висока температура, ультрафіолетове випромінювання, різні види іонізуючої радіації, ультразвук та фільтрація, широко використовуються у ветеринарних лабораторіях та клініках для знезараження інструментів і матеріалів.

Висока температура є основним і одним з найбільш ефективних фізичних методів стерилізації, що дозволяє знищити широкий спектр мікроорганізмів, включаючи спорові форми бактерій (Рис. 1.1).

МЕТОДИ ТЕРМІЧНОЇ СТЕРИЛІЗАЦІЇ ТА ОБРОБКИ МІКРОБНИХ МАТЕРІАЛІВ						
Назва методу	Пастеризація	Кип'ятіння	Тиндалізація	Автоклавування	Сухий жар	Фламбування
Температура	60-85 °С	100°С	100°С	108-145°С	165-180°С	300-400°С
ЧАС ОБРОБКИ	15-20 хв	15-60 хв	3 рази по 20 хв з перервами 9-10 год	15 хв – 2 год	1,5 год – 30 хв	1-2 хв
призначення	обробка харчових продуктів	обробка харчових продуктів, не багацилярного патматеріалу	стерилізація харчових продуктів, порживних середовищ	стерилізація посуду, поживних середовищ, відпрацьованих матеріалів, спецодягу, лабораторного обладнання	стерилізація посуду	стерилізація мікробіологічних голок, петель, скляних шпательів, металевого інструментарію
прилад	водяна баня, плітка			автоклав	сушильна шафа	пальник
групи знищених мікроорганізмів	окремі види неспороутворюючих бактерій, гіфи грибів та актиноміцетів	неспороутворюючі бактерії, гіфи та спори грибів та актиноміцетів, дріжджі	всі мікроорганізми	всі мікроорганізми	всі мікроорганізми	всі мікроорганізми
ВИЖИВАЮТЬ	пигментовані дріжджі, спори грибів та актиноміцетів, бацити	бацити	гинуть всі мікроорганізми			
фактор середовища	висока температура					
вид впливу	обробка матеріалу для зменшення к-ті мікробів		стерилізація			
Дія на речовини мікробів	денатурація білків та РНК, «розплавлення» та денатурація ДНК	Денатурація білків та РНК, «розплавлення» та денатурація ДНК	Денатурація білків та РНК, «розплавлення» та денатурація ДНК, руйнація ендоспор бацит в стадії проростання	Денатурація білків та РНК, «розплавлення» та денатурація ДНК, руйнація оболонки ендоспор бацитл	Денатурація білків та РНК, «розплавлення» та денатурація ДНК, руйнація оболонки ендоспор бацитл	Обвуглення всіх речовин мікроорганізму

Рис. 1.1. Методи термічної стерилізації та обробки мікробних матеріалів

Прожарювання в полум'ї пальника (фламбування) використовують для поверхневої стерилізації предметів, які витримують високі температури та не є легкозаймистими. Метод підходить для стерилізації платинових петель, препарувальних голок, голок для шприців, предметних та покривних скелець,

шпательів, скальпелів, пінцетів, ножиць та піпеток. Інструменти кілька разів переміщують через верхню частину полум'я, де температура є максимальною.

Метод пастеризації названий на честь французького мікробіолога Л. Пастера. Даний спосіб належить до методів часткової стерилізації, так як при його використанні гинуть лише вегетативні (активні) форми бактерій, а спорові форми залишаються життєздатними.

Кип'ятіння застосовують для стерилізації голок, шприців, гумових рукавичок, хірургічних інструментів, скляного та металевого посуду, а також предметних скелець. Тривалість кип'ятіння становить не менше 30 хвилин. Щоб підсилити стерилізуючий ефект і уникнути іржавіння металевих предметів, до води додають 1–2% розчин соди. Проте цей метод не забезпечує повного знищення мікроорганізмів, оскільки деякі віруси та бактеріальні спори можуть залишатися живими.

Тиндалізація, названа на честь англійського фізика Дж. Тиндала, є прикладом фракційної стерилізації. Цей метод потребує спеціальних пристроїв, таких як апарат Коха або автоклав із відкритим краном. Режим стерилізації становить 1–1,5 атм при експозиції 15–60 хвилин і повторюється протягом 3–5 днів.

Важливими для ветеринарної медицини є такі методи термічної обробки, як автоклавування та сухожарова стерилізація. Наприклад, автоклавування використовують для знезараження інструментів, перев'язувальних матеріалів та скляного посуду при високій температурі і тиску. Стерилізація парою під тиском в автоклаві – це один із найбільш надійних та ефективних методів, оскільки він дозволяє повністю знищити бактеріальні спори.

Сухий жар для стерилізації використовують у печах Пастера, сухожарових шафах або повітряних стерилізаторах. Після стерилізації предмети виймають після охолодження до +50 °С. Пожовтіння паперу та ватно-марлевих пробок вказує на ефективну стерилізацію, але якщо температура перевищить +175 °С, вата та папір можуть зайнятись. Для контролю стерилізації до сухожарової шафи можна покласти сахарозу або цукор, що плавляться при температурі +170 °С.

Ультрафіолетове випромінювання є ефективним методом знезараження поверхонь і повітря у ветеринарних приміщеннях. УФ-лампи застосовуються для дезінфекції операційних, лабораторій та інших приміщень, де є ризик розповсюдження інфекцій. Ультрафіолетові промені руйнують ДНК мікроорганізмів, що перешкоджає їхньому розмноженню. Цей метод є особливо зручним для обробки поверхонь, які не піддаються термічній або хімічній обробці, і може використовуватися як додатковий засіб захисту для підтримання стерильності в клінічних умовах.

Іонізуюча радіація (гамма-промені, рентгенівське випромінювання) також застосовується для стерилізації матеріалів, чутливих до високих температур. У ветеринарній медицині цей метод використовується для знезараження перев'язувальних матеріалів, шприців, голок, а також деяких харчових продуктів для тварин. Іонізуюча радіація забезпечує знищення

більшості відомих патогенів і дозволяє довго зберігати стерильні матеріали. Важливо, що під час такої стерилізації температура матеріалів залишається низькою, що дозволяє обробляти навіть термолабільні предмети.

Ультразвук є методом стерилізації, що застосовується для очищення і знезараження інструментів та обладнання, які мають складну структуру та важкодоступні поверхні. У ветеринарних клініках ультразвукові ванни використовуються для обробки медичних інструментів, що допомагає усунути мікроорганізми, адгезиви, органічні залишки та біоплівки з поверхонь інструментів. Цей метод добре підходить для попередньої очистки перед автоклавуванням або іншими методами стерилізації.

Бактеріальні фільтри використовуються для стерилізації рідин та повітря, які не можуть бути піддані термічній обробці. У ветеринарній медицині фільтрація застосовується для підготовки стерильних розчинів, живильних середовищ, а також для очищення повітря в приміщеннях з високим ризиком інфекційного зараження. Бактеріальні фільтри видаляють мікроорганізми з рідин, дозволяючи отримати стерильні розчини без необхідності нагрівання, що важливо при роботі з термолабільними матеріалами.

Застосування фізичних методів стерилізації у ветеринарній медицині має велике значення для забезпечення санітарних умов, профілактики поширення інфекцій і збереження здоров'я як тварин, так і персоналу клінік та лабораторій.

Контрольні запитання та завдання

1. Які основні завдання бактеріологічної лабораторії у ветеринарній медицині?
2. Які методи використовуються для ідентифікації бактеріальних збудників у лабораторних умовах?
3. Які умови зберігання необхідні для бактеріальних культур у лабораторії?
4. Які особливості роботи з патогенними бактеріями в бактеріологічній лабораторії?
5. Які правила транспортування зразків до бактеріологічної лабораторії?
6. Яка різниця між біозахистом і біобезпекою у лабораторіях?
7. Які рівні біобезпеки існують для мікробіологічних лабораторій?
8. Які заходи безпеки потрібно вжити для роботи з патогенами четвертого рівня небезпеки?
9. Що таке контроль доступу і як він забезпечується у лабораторіях з високим рівнем біобезпеки?
10. Які персональні засоби захисту використовуються в лабораторіях для забезпечення біозахисту?
11. Які вимоги до облаштування робочого місця у мікробіологічній лабораторії?
12. Як правильно поводитися з біологічними відходами у лабораторії?
13. Які основні кроки включає підготовка зразків для мікробіологічного дослідження?

14. Які обов'язкові документи повинні бути в лабораторії для проведення мікробіологічних досліджень?
15. Які методи застосовуються для контролю якості у мікробіологічних лабораторіях?
16. Які основні хімічні засоби використовуються для дезінфекції лабораторного обладнання?
17. Які методи стерилізації застосовуються до біологічних відходів у мікробіологічних лабораторіях?
18. Які основні фактори впливають на ефективність дезінфекції?
19. У чому полягає суть методу автоклавування та для яких матеріалів він використовується?
20. Які параметри (температура, час, тиск) є критичними для успішної стерилізації автоклавуванням?
21. Як проводиться перевірка ефективності термічної стерилізації лабораторного обладнання?
22. Які переваги та недоліки має метод стерилізації сухим жаром порівняно з автоклавуванням?
23. Чому необхідно дотримуватися правильного укладання матеріалів в автоклав під час стерилізації?
24. Які типи лабораторного обладнання найбільш чутливі до термічної стерилізації і які альтернативні методи стерилізації для них застосовуються?

Тема 2. Поживні середовища для культивування мікроорганізмів

Вимоги до поживних середовищ

Поживні (живильні) середовища — це спеціально створені субстрати, які забезпечують мікроорганізмів необхідними речовинами для їхнього росту і розвитку в лабораторних умовах. Вони містять різні хімічні елементи та сполуки, що служать джерелами вуглецю, азоту, водню, кисню та інших елементів, потрібних для метаболізму та розмноження бактерій. Поживні середовища є основою для бактеріологічних досліджень, дозволяючи мікробіологам виділяти, культивувати та вивчати бактерії, а також оцінювати їхню чутливість до антибіотиків, що має важливе значення для діагностики та лікування інфекційних захворювань.

Поживні середовища містять усі необхідні для мікроорганізмів хімічні компоненти, серед яких макроелементи, як-от вуглець, водень, кисень, фосфор, сірка, азот, натрій, магній, калій, залізо, а також низка мікроелементів, що входять до складу розчинних органічних та неорганічних сполук. Склад таких середовищ формується на основі типу живлення мікроорганізму (наприклад, автотрофного чи гетеротрофного, а також паразитичного або непаразитичного) і специфічних потреб у поживних речовинах, з урахуванням фізіологічної групи (наприклад, нітрифікаторів, фотосинтетиків, ліполітиків тощо).

Здебільшого для розвитку мікроорганізмів необхідні такі неорганічні іони, як калій, магній, марганець, залізо (в різних формах), фосфат, сульфат, а іноді також цинк, мідь, кобальт, хлор тощо, які природно присутні у водопровідній воді або в компонентах поживних середовищ, таких як пептон, м'ясний і дріжджовий екстракти. Деякі метали виконують важливі функції: вони є активаторами ферментів, залізо є частиною білкових комплексів, а іони натрію та калію беруть участь у транспортуванні речовин через мембрану клітини. Деякі мікроорганізми мають незворотні генетичні зміни, через які не можуть синтезувати певні речовини (так звані ауксотрофні мутанти), зокрема амінокислоти або азотисті основи. Більшість амінокислот, за винятком глутаміну, витримують автоклавування; розчини з глутаміном стерилізують фільтруванням. Майже всі амінокислоти розчиняються в теплій воді, але для цистину потрібно трохи соляної кислоти (HCl). Перед приготуванням середовища білки, гідролізовані кислотою, втрачають триптофан, глутамін та аспарагін, бо руйнуються в кислому середовищі. Азотисті основи для живлення додають у чистому вигляді: гуанін та ксантин розчиняють у мінімальній кількості соляної кислоти, решту — у гарячій воді. Деякі гетеротрофні мікроорганізми для росту потребують особливих речовин, таких як жирні кислоти, холестерин та поліаміни (путресцин, спермін), а також вітаміни, що активують мікробні ферменти.

Поживні середовища в основному класифікують за складом, консистенцією, призначенням і властивостями, наприклад, прості — містять лише базові компоненти, такі як вода, джерело вуглецю та азоту; складні — включають додаткові компоненти, такі як білки, вітаміни або мінеральні солі; селективні — пригнічують ріст одних мікроорганізмів, одночасно сприяючи росту інших, що дозволяє ізолювати певні види бактерій; диференціальні — містять індикатори, що змінюють колір або вигляд середовища в залежності від метаболічної активності бактерій, допомагаючи ідентифікувати види за їхніми біохімічними властивостями (табл. 1.2).

Табл. 1.2. Характеристика живильних середовищ різних типів

№ п/п	Ознака	Тип	Характеристика середовища	Приклади
1	Склад	Природне	Виготовляється з рослинних або тваринних продуктів і має невизначений хімічний склад.	Пептонна вода, м'ясний бульйон — середовище, що містить продукти тваринного походження без точної хімічної характеристики, підходить для загального росту мікроорганізмів.

		Напів-синтетичне	Містить компоненти рослинного чи тваринного походження та певні хімічні речовини, при цьому хімічний склад визначений частково.	Глюкозо-пептонний бульйон — містить пептон (продукт білкового розпаду) і глюкозу, що забезпечує додаткове джерело вуглецю.
		Штучне (Синтетичне)	Складається з точно відміряної кількості хімічно чистих речовин, розчинених у дистильованій воді.	Мінімальне середовище Мінімального середовища (мінімальний агар) — містить визначену кількість глюкози, амонійних солей, фосфатів і мінералів, потрібних для росту.
2	Консистенція	Рідке	Компоненти розчиняються у водопровідній або дистильованій воді.	Пептонний бульйон — вода з додаванням пептону для вирощування різних бактерій.
		Напіврідке	До рідкого середовища додають загусники, такі як агар-агар* (0,1-1,4%) або желатина** (5-7%).	Поживний агар — звичайне середовище з 1,5% агару, яке надає тверду консистенцію для вирощування колоній бактерій.
		Тверде	До рідкого середовища додають 1,5-2,5% агар-агару або 10-15% желатини.	Поживний агар — звичайне середовище з 1,5% агару, яке надає тверду консистенцію для вирощування колоній бактерій.
3	Призначення	Загальне	Середовище, придатне для росту багатьох видів мікроорганізмів, які можуть належати до різних морфологічних груп.	Поживний бульйон або поживний агар — використовується для вирощування різних мікроорганізмів.
		Спеціальне	Містить певні компоненти, які забезпечують прояв специфічних культуральних ознак у мікроорганізмів.	Кров'яний агар — дозволяє виявляти гемолітичні властивості бактерій завдяки наявності еритроцитів.

		Диференційно-діагностичне	Містять індикатори, що змінюють колір або вигляд середовища в залежності від метаболічної активності бактерій, допомагаючи ідентифікувати види за їхніми біохімічними властивостями.	Середовище МакКонкі — містить лактозу та індикатори для розрізнення лактозопозитивних та лактозонегативних бактерій. агар Ендо, середовище Левіна та ін.
		Елективне	Містить речовини, що сприяють росту лише певних мікроорганізмів одного роду.	Середовище Сабуро — сприяє росту грибів, пригнічуючи ріст бактерій за рахунок низького рН.
		Селективне	Пригнічують ріст одних мікроорганізмів, одночасно сприяючи росту інших, що дозволяє ізолювати певні види бактерій.	Середовище МакКонкі (MacConkey Agar) Середовище Сабуро (Sabouraud Agar) Маніт-сольовий агар (Mannitol Salt Agar)

**Агар-агар – це полісахарид, який видобувають із морських водоростей. Він плавиться при температурі понад 45°C, а після охолодження повертається до полімерної структури, що надає середовищу желеутворюючих властивостей. Лише деякі види морських мікроорганізмів здатні розщеплювати зв'язки в полімерних ланцюгах агар-агару.*

***Желатина – це продукт, що отримується шляхом виварювання кісток, і складається з амінокислот та поліпептидів різної довжини. Багато мікроорганізмів можуть використовувати желатин як поживний ресурс, що часто призводить до його розрідження в процесі росту мікробів.*

Вимоги до поживних середовищ

Поживні середовища, які використовуються в мікробіології, повинні відповідати ряду вимог, щоб забезпечити оптимальні умови для росту та розвитку мікроорганізмів.

Основні вимоги до поживних середовищ, що використовуються у мікробіології:

Харчова цінність – середовище повинно містити всі необхідні поживні речовини, які потрібні для життєдіяльності конкретного виду мікроорганізмів (вода+елементи живлення). Це включає вуглецеві та азотні джерела, мінерали, вітаміни та інші допоміжні речовини.

Стабільність рН – поживні середовища повинні мати оптимальний рівень рН, який є стабільним протягом усього періоду культивування, щоб не викликати стрес у мікроорганізмів. Зазвичай використовуються буферні системи для збереження потрібного рівня кислотності.

Стерильність – середовище повинно бути повністю вільним від сторонніх мікроорганізмів перед початком експерименту, що досягається стерилізацією, як правило, автоклавуванням.

Прозорість – для деяких типів досліджень важливо, щоб середовище було прозорим, що дозволяє спостерігати за ростом колоній і оцінювати зміни, які відбуваються в процесі культивування.

Консистенція – середовище має відповідати певним фізичним властивостям залежно від цілей дослідження: рідке, напіврідке або тверде, для забезпечення оптимальних умов для різних видів мікроорганізмів.

Термостабільність – компоненти середовища повинні зберігати свої властивості при стерилізації та не розкладатися при впливі високих температур.

Під час діагностики бактеріальної хвороби дослідник використовує спеціальне, або диференційно-діагностичне середовище. Так як після культивування на таких середовищах мікроорганізми мають специфічні культуральні ознаки.

Основні етапи виготовлення поживних середовищ

Вибір компонентів середовища:

Вода — основний розчинник, яка має бути очищеною або дистильованою, щоб уникнути забруднень, які можуть вплинути на ріст мікроорганізмів.

Джерела вуглецю — глюкоза, сахароза, гліцерин та інші органічні сполуки, що забезпечують енергію для мікробів.

Джерела азоту — амонієві солі (наприклад, амонійний хлорид) або амінокислоти, які є необхідними для синтезу білків.

Мінерали — кальцій, магній, калій, фосфор, сірка, які важливі для нормальних метаболічних процесів.

Вітаміни та амінокислоти — додаються для підтримки росту специфічних мікроорганізмів, особливо тих, що мають особливі вимоги до поживних речовин.

Приготування рідкого середовища:

Компоненти ретельно дозуються та розчиняються у воді. Для цього їх зважують і додають у відповідних пропорціях. Розчинення відбувається шляхом кип'ятіння або тривалого перемішування. При необхідності додають індикатори (наприклад, фенолфталеїн або бромкрезоловий зелений), які змінюють колір середовища при зміні рН, або антибіотики для пригнічення небажаних мікроорганізмів.

Приготування твердого середовища

У рідке середовище додається агар-агар або інші гелюючі речовини (колаген, желатин). Агар вводиться в кількості 1,5–2% від загального об'єму, після чого суміш стерилізується і розливається по чашках Петрі. Після охолодження середовище стає твердим, що дозволяє мікроорганізмам рости та формувати колонії.

Стерилізація:

Всі середовища повинні бути стерилізовані, щоб знищити забруднювачів.

Для цього використовуються автоклави, де середовище стерилізується при температурі 121°C і тиску 1 атм протягом 15–20 хвилин, або фільтрація для рідких середовищ, які не можна піддавати високим температурам.

Охолодження та розлив:

Після стерилізації середовище охолоджують до температури 45–50°C (для агарового середовища), після чого розливають у стерильні посудини (чашки Петрі, пробірки і т.д.). Середовище, яке містить агар, можна відразу розливати в чашки Петрі, де воно швидко застигне.

Зберігання:

Готові поживні середовища зберігаються в стерильних умовах (наприклад, у герметичних контейнерах) для запобігання забрудненню.

Для забезпечення стабільності та уникнення росту непотрібних мікроорганізмів зберігаються в холодильнику при температурі 4–8°C.

Приклади сучасних поживних середовищ, які використовують у мікробіології

Середовище МакКонкі (MacConkey agar)

Використовується для вибіркового вирощування грамнегативних бактерій, зокрема для ізоляції і диференціації ентеробактерій (наприклад, *Escherichia coli*).

Склад: включає лактозу, індикатор бромкрезоловий зелений, агар та інші основні компоненти.

Особливості: має важливе значення для розрізнення бактерій, здатних ферментувати лактозу (які утворюють рожеві колонії) і тих, які не ферментують лактозу (колонії залишаються безбарвними).

Середовище Сабуро (Sabouraud agar)

Основне середовище для вирощування грибів, зокрема дріжджів і пліснявих грибів, таких як *Candida* і *Aspergillus*.

Склад: складне середовище, що містить пептон, декстрозу, агар та інші компоненти для підтримки росту грибів.

Особливості: має низький рН (приблизно 5,6), що робить його сприятливим для росту грибків і пригнічує розвиток бактерій.

Середовище Шиффа (Shiff's medium)

Використовується для вирощування мікроорганізмів, що потребують специфічних поживних речовин, як-от ті, що мають обмежені можливості метаболізувати звичайні джерела вуглецю.

Склад: містить амінокислоти, вітаміни, органічні кислоти та мінерали, адаптовані для специфічних культур.

Середовище для антагоністичних досліджень (Antagonistic test media)

Використовуються для тестування здатності певних мікроорганізмів інгібувати чи знищувати інші види завдяки продукуванню антимікробних речовин.

Склад: містить основні поживні речовини, а також антимікробні речовини, що дають змогу вивчати антагоністичні взаємодії між різними мікроорганізмами.

Середовище для анаеробних бактерій (Anaerobic media)

Використовується для вирощування анаеробних бактерій, які потребують відсутності кисню для нормального росту.

Склад: зазвичай включає додавання редуційних агентів (наприклад, тіогліколят натрію), щоб знизити рівень кисню в середовищі.

Особливості: вимагає використання анаеробних камер або герметичних середовищ для забезпечення безкисневого середовища.

Середовище Бродмана (Broth media)

Використовується для вирощування різних видів бактерій в рідкому середовищі, а також для виготовлення суспензій мікроорганізмів для подальших тестів.

Склад: включає основні компоненти (пептон, натрієвий хлорид, вода), іноді з додаванням спеціальних речовин для підвищення росту певних видів.

Середовище для молочнокислих бактерій (MRS agar)

Використовується для вирощування молочнокислих бактерій, таких як *Lactobacillus*, які відіграють важливу роль у процесах ферментації.

Склад: середовище містить пептон, глюкозу, тріптозу, амінокислоти та вітаміни, що сприяють росту молочнокислих бактерій.

Середовище для біolumінесцентних бактерій (Bioluminescent media)

Середовище для мікроорганізмів, які мають здатність до біolumінесценції.

Склад: включає живильні речовини для росту бактерій, а також хімічні індикатори для вимірювання біolumінесценції в експериментах.

Середовище для пліснявих грибів (Potato dextrose agar)

Призначення: використовується для культивування пліснявих грибів, таких як *Penicillium*, *Aspergillus*, а також дріжджів.

Склад: основними компонентами є картопляний екстракт та декстроза. Середовище стимулює швидкий ріст пліснявих грибів.

Середовище для тестів на антибіотичну чутливість (Antibiotic susceptibility test media)

Призначення: використовується для вивчення чутливості мікроорганізмів до різних антибіотиків.

Склад: містить основні поживні речовини та антибіотики в різних концентраціях, щоб оцінити ефективність терапевтичних препаратів.

Інновації в сучасних середовищах

Інтелектуальні поживні середовища, які можуть автоматично змінювати свої характеристики (наприклад, рН або окисно-відновний потенціал) залежно від умов росту, щоб оптимізувати середовище для конкретних мікроорганізмів. Модифікації середовищ для використання в біотехнологіях, наприклад, для виробництва біофармацевтичних продуктів або біопалива.

Контрольні запитання та завдання

1. Які основні типи поживних середовищ використовуються для культивування мікроорганізмів?
2. Чому важливо підтримувати стерильність поживних середовищ?
3. Які компоненти обов'язково мають входити до складу поживного середовища для вирощування бактерій?
4. У чому полягає різниця між загальними та спеціальними поживними середовищами?
5. Які поживні середовища вважаються селективними, і для чого вони застосовуються?
6. Які характеристики поживного середовища важливі для вирощування анаеробних мікроорганізмів?
7. Які поживні середовища використовуються для диференціації різних видів мікроорганізмів?
8. Як визначають рівень рН у поживних середовищах, і чому це важливо для культивування мікроорганізмів?
9. Що таке збагачені поживні середовища і для яких мікроорганізмів їх використовують?
10. Яким чином поживне середовище може впливати на швидкість росту мікроорганізмів?
11. Чому в певних поживних середовищах використовують специфічні індикатори кольору?
12. Яка роль агару у приготуванні твердих поживних середовищ?
13. У яких випадках застосовують рідкі поживні середовища і чим вони відрізняються від твердих?
14. Які поживні середовища вважаються синтетичними, і коли їх використовують?
15. Які поживні середовища застосовуються для виділення та ідентифікації грибів?
16. Чому важливо дотримуватися точного рецепту приготування поживного середовища?
17. Які критерії свідчать про якість готового поживного середовища?
18. Яка роль вітамінів та мінеральних речовин у складі поживних середовищ?
19. Як впливає концентрація органічних сполук на ріст мікроорганізмів у поживному середовищі?
20. Чому поживні середовища для мікроорганізмів мають бути адаптовані до особливостей конкретного виду або групи мікроорганізмів?

Тема 3. Методи висівів мікроорганізмів на живильні середовища

Посів (висів) – один з стаціонарних методів культивування мікроорганізмів на поживних середовищах, застосовуваний для культурально-морфологічної діагностики в мікробіології, а також для дослідження біохімічних і біологічних властивостей в різних біотехнологічних цілях.

Мікроорганізми можна вирощувати на середовищах різних типів (**тверді, напіврідкі, рідкі**) в чашках Петрі, пробірках, колбах, флаконах (рис. 1.2). Характер росту на вищезазначених типах середовищ також відрізняється (окремі **колонії, плівка, ріст по «штриху»**). В залежності від кількості видів мікробів, які містяться в патологічному або клінічному матеріалі, в процесі вирощування отримують або **чисту** або **накопичувальну** мікробну культуру.

На поверхні рідких поживних середовищ вирощують культури аеробних або факультативно-анаеробних мікроорганізмів. Представники таких видів утворюють на поверхні **плівку**.

Колби або пробірки засівають відповідною кількістю мікробного матеріалу (підготованою суспензією), користуючись стерильною піпеткою чи петлею. Мікробні культури, вирощені на рідкому середовищі, мають назву **бульйонних культур**.

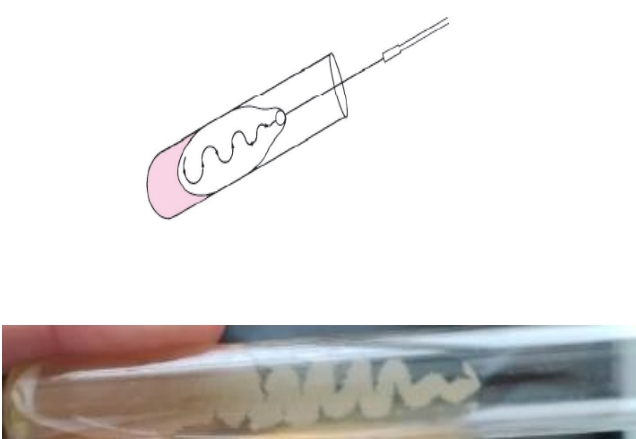
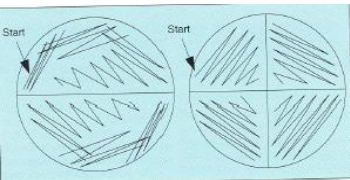


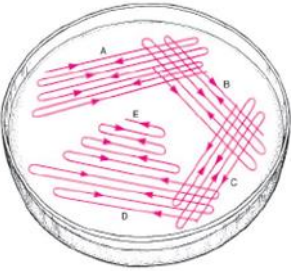
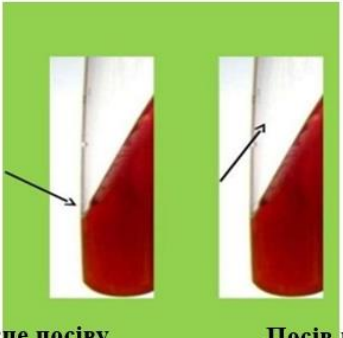
Рис. 1.2. Ріст різних видів мікробів залежно від відношення до кисню
(Джерело: інтернет-ресурс)

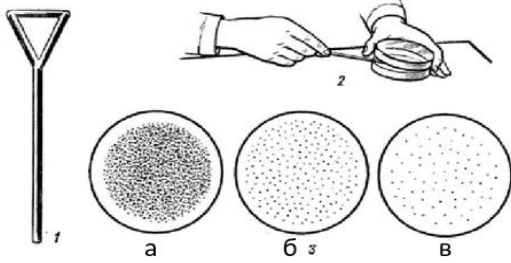
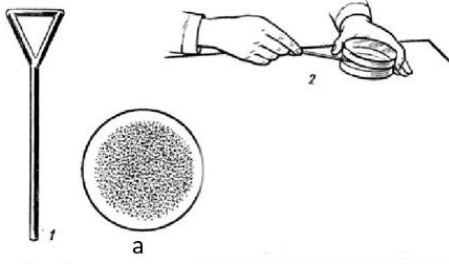
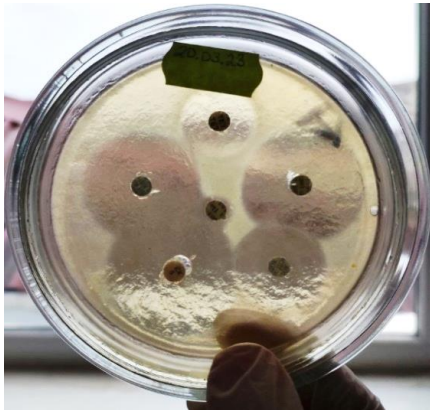
В напіврідких середовищах мікроби найчастіше вирощують за допомогою **висіву уколom** (мікробіологічна голка). На твердих поживних середовищах, користуючись відповідною методикою, можна отримати культури мікроорганізмів у вигляді колонії (**поверхневі або глибинні висіви**), плівки чи штриха (**поверхневі висіви**) (рис. 1.2). Будь-яка мікробна культура, вирощена на твердому середовищі, називається агаровою культурою (табл. 1.3).

Після висіву мікроорганізмів пробірки та чашки Петрі розміщують у термостатах, де створюються ідеальні умови для їхнього росту. Колби із засіяними рідкими середовищами вирощують в термостатних приміщеннях на шуттель-апаратах (перемішування середовища забезпечує постійне надходження поживних речовин до мікробних клітин в плівці).

Табл. 1.3. Методи висівів мікроорганізмів на поживні середовища

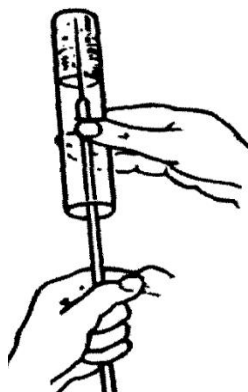
Назва методу	Методика висіву
ПОВЕРХНЕВІ ВИСІВИ	
Осідання мікробних клітин (седиментація)	
Поверхневий пасивний висів (седиментаційний метод, метод Коха) Використовується для визначення мікробного числа повітря. 	В стерильні чашки Петрі стерильно наливають 10-15 мл поживного середовища. Після загусання останнього, чашки відкривають на 5 хв в місці відбору зразка. За цей час на поверхню поживного середовища площею 100 см² осідають всі мікробні клітини з 10 л повітря. Чашки закривають і інкубують в термостаті. Через 2-3 доби на поверхні середовища утворюється мікробна культура (різноманітні колонії).
Примусове нанесення на поживне середовище	
Поверхневий висів чистої культури в пробірку (метод штриха) 	По поверхні твердого середовища в пробірках, яке має назву «скошений агар», профламбованою мікробіологічною петлею або стерильним «свабом» (тампон-зонд) знизу до верху проводиться хвиляста доріжка – штрих. Така форма лінії дозволяє накопичити значну кількість мікробного матеріалу на малій площі, з використанням малої кількості агару (2-5 мл). В пробірках можна висівати культуру і прямим штрихом.
А) Секторний метод  Поверхневий висів чистої культури в чашку Петрі (секторний метод)	Зворотню сторону чашки Петрі розділяють на 2 чи 3 сектори. Петлею з культурою роблять висів в секторі №1. Петлю стерилізують на вогні і охолоджують впродовж 15 с. Проводять петлею по поверхні середовища в секторі №1 і одразу роблять штрих в секторі №2. Така ж операція повторюється для сектору №3. Чашки інкубують в термостаті вверх дном.

Б) (секторний метод, метод Голда)  Порядок висіву штрихів за методом Голда  Візуальний вигляд висіву методом Голда	В секторі №1 виростає велика кількість колоній, в секторах №2 та №3 – можуть з'являтися ізольовані колонії. Отримання одночасно значної кількості біомаси мікробів та ізольованих колоній дозволяє продовжити роботи з чистою культурою, порівняти певні культуральні ознаки колоній, вирощених в чашці Петрі із підозрілими колоніями накопичувальної культури. На зовнішньому боці дна чашки Петрі з поживним агаром проводять розмежувальні лінії, що розділяють її на 4 сектори. Досліджуваний матеріал вносять петлею в перший сектор і проводять нею паралельні лінії по всьому сектору на відстані одна від одної близько 5 мм. Цією ж петлею, не змінюючи її положення щодо агару, проводять такі ж лінії на інших секторах чашки. У тому місці, де на агар потрапила велика кількість мікробних клітин, ріст мікроорганізмів буде у вигляді суцільного штриха. На секторах із невеликою кількістю клітин мікроорганізми виростають у вигляді окремих колоній.
Поверхневий висів чистої культури в чашку Петрі (одиначний хвилястий/прямий штрих), паралельні штрихи)  Візуальний вигляд висіву методом одиначного хвилястого штриха	б) В певних випадках, користуючись початковими етапами техніки, зазначеної при посівах секторним методом, на чашку Петрі висівають культуру у вигляді одиначного хвилястого штриха або декількох прямих штрихів. Це дозволяє докладно вивчити структуру штриха при ідентифікації невідомого мікроорганізму або (за допомогою прямих штрихів) чітко побачити результати фізіологічних тестів (розщеплення крохмалю амілолітичними мікробами, метод КАМПа – при ідентифікації патогенних стрептококів)
Метод Шукевича  Місце посіву культури Посів штрихом на скошеному агарі методом Шукевича	Цей метод використовується для отримання чистої культури протей та інших мікроорганізмів, які мають «повзучий» тип росту. Посів матеріалу здійснюється в конденсаційну воду біля основи скошеного агару. Рухливі мікроорганізми, такі як протей, здатні рухатися вгору по скошеному агару, тоді як нерухомі залишаються на місці посіву внизу. Пересіваючи верхні частини культури, можна отримати чисту культуру.

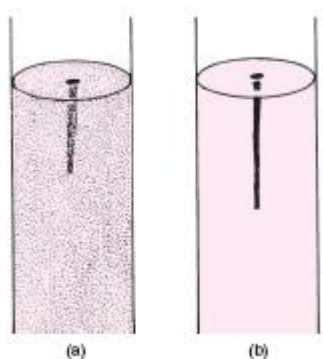
Висів шпателем	При посіві мікроорганізмів з рідкого середовища з використанням мікробіологічного шпателя надходять у такий спосіб. На поверхню середовища в чашці наносять за допомогою стерильної піпетки заданий обсяг рідкої культури. Одночасно обертаючи чашку і проводячи кругові рухи стерильним шпателем, суспензію розподіляють по поверхні середовища.
Метод Дригальського  Висів шпателем методом Дригальського 1. Шпатель Дригальського 2. Посів 3. Ріст мікроорганізмів після посіву: а – Суцільний ріст б – Густий ріст в – Ріст ізольованих колоній	1 мл матеріалу вносять у першу чашку, після чого стерильним скляним шпателем рівномірно розподіляють його по поверхні середовища. Тим самим шпателем (НЕ пропалюючи його в полум'ї пальника) проводять посів у другій та третій чашках. З кожним посівом кількість бактерій на шпателі зменшується, і на третій чашці бактерії розподіляються окремо одна від одної по поверхні середовища. Через 1-7 діб перебування чашок в термостаті (в залежності від швидкості росту мікроорганізмів) на третій чашці кожна бактерія утворює клон клітин, формуючи ізольовану колонію, яку пересівають на скошений агар для отримання чистої культури.
Висів «газоном»  Висів шпателем методом «газону» 1. Шпатель Дригальського 2. Посів 3. Ріст мікроорганізмів після посіву: а – Суцільний ріст  Вигляд чашки Петрі після проведення висіву методом «газону» (тест на антибіотикочутливість)	Посіви методом «газону» виконують на твердому поживному середовищі в чашці Петрі, здебільшого для оцінки чутливості мікроорганізмів до антибіотиків. Для цього, тримаючи кришку лівою рукою, петлею або піпеткою наносять матеріал на поверхню агару за методом Дригальського. Після інкубації на посіві утворюється рівномірний суцільний ріст бактерій, що поділяються на окремі колонії. Ідентифікацію виділених культур проводять через вивчення їх морфології, культуральних, біохімічних та інших специфічних характеристик, притаманних кожному виду.

ГЛИБИННІ ВИСІВИ

Висів чистих культур уколом в стовпчик твердого середовища

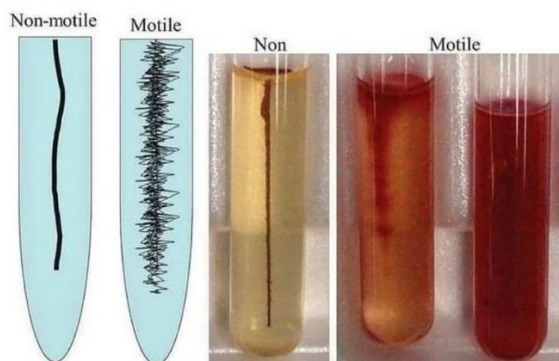


Проведення висіву чистих культур уколом в стовпчик твердого середовища



Висів чистих культур уколом в стовпчик твердого середовища (тест на здатність мікроорганізмів до руху)

Motility Test Media Results



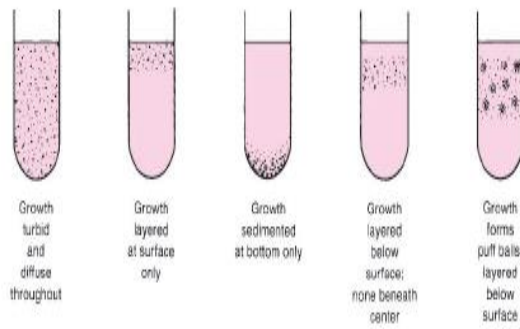
Висів чистих культур уколом в стовпчик твердого середовища (тест на здатність мікроорганізмів до руху)

Мікробний матеріал з колонії беруть бактеріологічною голкою, прожареною та охолодженою в агарі. Висів виконують уколом голки в глибину поживного середовища по центру пробіри.

Таким чином перевіряють важливі діагностичні ознаки, характерні для мікробів окремих родів чи видів: здатність до аеробного чи анаеробного росту, вигляд прямого штриха (ялинка, чулок, щіточка) при можливості росту в без кисневих умовах.

Рухливі мікроорганізми при висіві уколом в глибину агарового середовища здатні утворювати тонкі плівки або помутніння за межами зони інокуляції (рис. «а» - роїння мікробів, що мають джгутики).

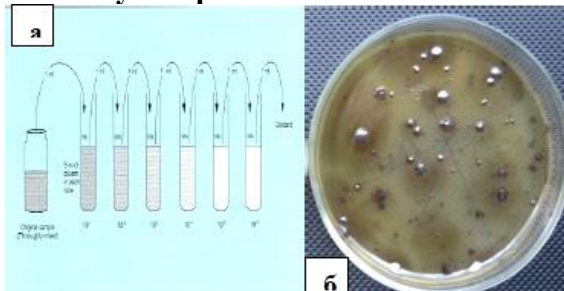
Висів чистих культур в рідкі середовища



Прожареною та охолодженою в агарі мікробактеріологічною петлею беруть мікробний матеріал. Вносять його в пробірку з рідким середовищем, легко струшують у верхньому меніску рідини. Петлю виймають та фламбують, пробірку закривають і поміщають у термостат.

Висів методом розведень

А) У чашку Петрі



Глибинний висів методом розведень у чашку Петрі

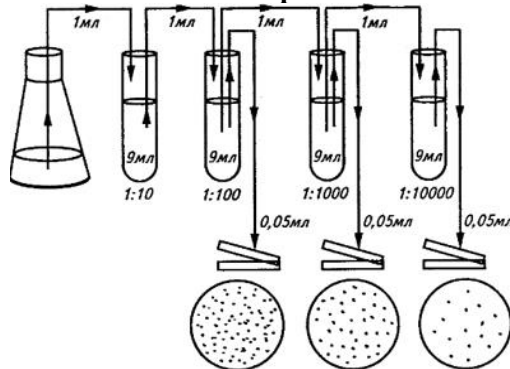
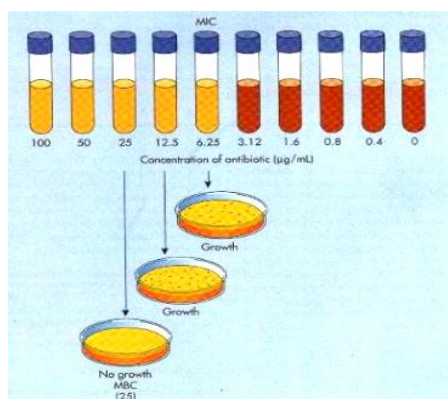


Схема приготування розведень при глибинному висіві

А) 1 мл рідкого зразка (рис.а) мікробного матеріалу стерильною піпеткою переносять в 9 мл фізіологічного розчину, фосфатного буферу або м'ясо-пептонного бульйону (розведення 1:10). Наступне розведення за такою ж схемою проводиться новою стерильною піпеткою (1:100). В залежності від обсіменіння вихідного матеріалу розведення можна продовжити. Висів на агарове середовище 1 мл останнього розведення призводить до розвитку окремих колоній (рис.б)

Б) У пробірку



Метод серійних розведень у рідкому поживному середовищі

Б) Метод проводиться аналогічно до попереднього тільки у рідкому живильному середовищі. Зазвичай, згідно певних методик.

Контрольні запитання та завдання

1. Які основні методи висіву мікроорганізмів на живильні середовища застосовуються в мікробіології?
2. У чому полягає метод розведених висівів і для яких цілей він застосовується?
3. Як проводиться висів мікроорганізмів за методом Коха, і які особливості цього методу?
4. Які переваги та недоліки має метод секторного (штрихового) висіву?
5. У чому полягає метод паралельного висіву і коли його доцільно використовувати?
6. Як здійснюється висів мікроорганізмів за допомогою петлі, і чому важливо підтримувати стерильність інструменту?
7. Який метод висіву використовується для підрахунку колонієутворюючих одиниць (КУО) у повітрі?
8. У чому полягає метод конвеєрного висіву і для яких досліджень він підходить?
9. Які особливості має метод висіву з використанням крапельної техніки?
10. Як впливає концентрація початкового зразка на результат висіву?
11. Чому важливо рівномірно розподіляти зразок на поверхні живильного середовища при висіві?
12. У яких випадках доцільно застосовувати метод збагаченого висіву?
13. Як проводиться висів мікроорганізмів за допомогою шпателя, і які переваги має цей метод?
14. У чому полягає метод капілярного висіву, і для яких цілей він застосовується?
15. Як здійснюється висів у глибину середовища і для яких видів мікроорганізмів цей метод підходить?
16. Які фактори необхідно враховувати при виборі методу висіву мікроорганізмів?
17. Який метод висіву застосовується для дослідження аеробних та анаеробних мікроорганізмів?
18. У чому полягає метод серійного розведення і як він допомагає при ізоляції чистих культур?
19. Як визначити ефективність висіву за кількістю та виглядом колоній на живильному середовищі?
20. Які методи висіву використовуються для виявлення антибіотикорезистентності у мікроорганізмів?

Тема 4. Характеристика мікробних культур, вирощених у лабораторних умовах. Культуральні ознаки мікроорганізмів

Чисті або змішані мікробні культури можуть утворюватися на поживних середовищах рідкої або твердої консистенції.

Вивчення ознак росту необхідне для ідентифікації мікроорганізмів і його найкраще проводити, коли на поживному середовищі розвиваються представники тільки одного виду (чиста культура).

Сукупність ознак росту мікроорганізмів, які можна охарактеризувати візуально на середовищі будь-якого типу називають **культуральними ознаками** даного виду (рис.1.3).



Рис.1.3. Ознаки росту мікробів в середовищах різної консистенції

На твердих поживних середовищах (як у природних умовах, так і в лабораторіях) мікроорганізми розвиваються у вигляді специфічних скупчень (рис. 1.4; 1.5). Кожне з цих скупчень (плівка, колонія) містить тисячі або навіть мільйони клітин. Мікробіологів особливо цікавлять ізольовані, характерні колонії, за ознаками яких можна визначити морфологічну групу, а іноді й рід мікроорганізму (рис. 1.6).

Саме тому, на етапі первинного висіву зразків природного мікробного матеріалу, дослідник має на меті виділити колонії, спершу для накопичувальної, а згодом — для чистої культури. Ізольовані колонії можна отримати різними методами висіву. Проте залежно від потреб у кисні мікроорганізми на агарових середовищах формують поверхневі, глибинні або донні колонії.

Ознаки росту мікробних колоній, культивованих на твердому поживному середовищі

- **Форма:** округла, куляста, ризоїдна, складна, ниткоподібна амебовидна, неправильна тощо;
- **Розмір:** крапкова, маленька, велика, додатково розмір в мм;
- **Краї:** гладенькі, рівні, хвилясті, зубчасті, ризоїдні тощо; додатково - наявність або відсутність пігменту в середовищі навкруги колонії;
- **Колір, відтінок:** біла, жовта, флуоресцентна тощо;
- **Поверхня:** гладенька, суха; складчаста; бугриста тощо;
- **Профіль:** краплевидний, кратероподібний, бугристый тощо;

- Структура: однорідна, неоднорідна зерниста, волокниста тощо;
- Оптичні властивості: прозора, непрозора, напівпрозора;
- Консистенція: крохкувата; слизувата, масляниста, в'язка тощо.

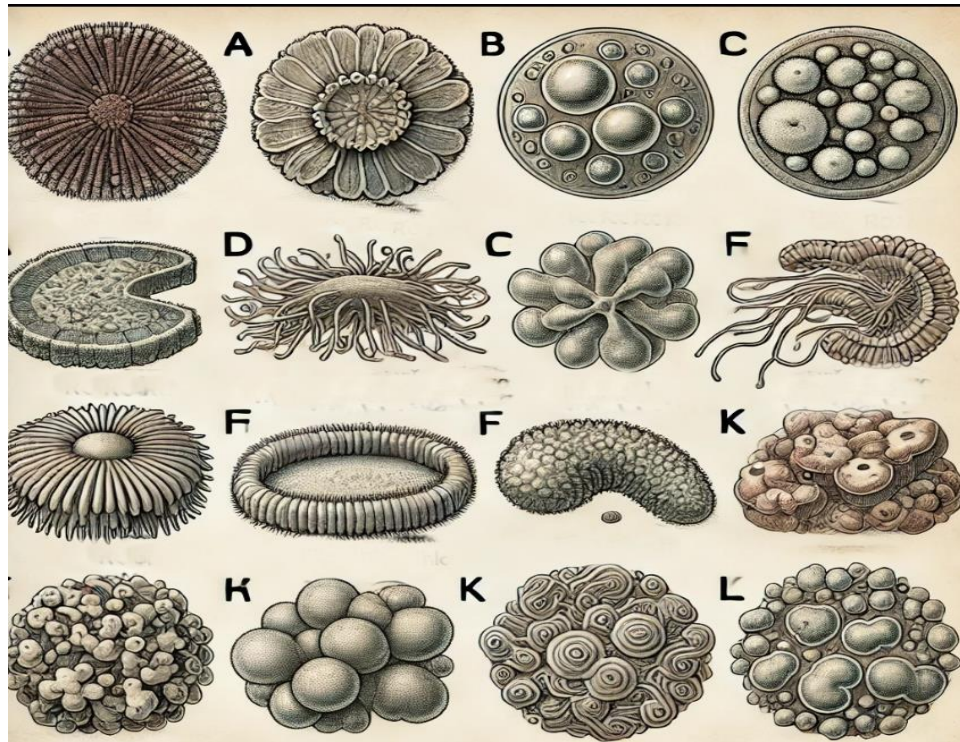


Рис. 1.4. Форма колоній (ШП): А – кругла; В – кругла з фестончатыми краями; С – кругла з валиком; D, Е – ризоїдна; F – з ризоїдним краєм; G – амебовидна; H – нитковидна; I – складчаста; J – неправильна; K – концентрична; L – складної форми



Рис. 1.5. Профіль колоній: 1 – зігнутий; 2 – у формі кратера; 3 – горбистий; 4 – щільно прикріплений до субстрата; 5 – плоский; 6 – випуклий; 7 – у вигляді краплі; 8 – конічний (Джерело: інтернет-ресурс)

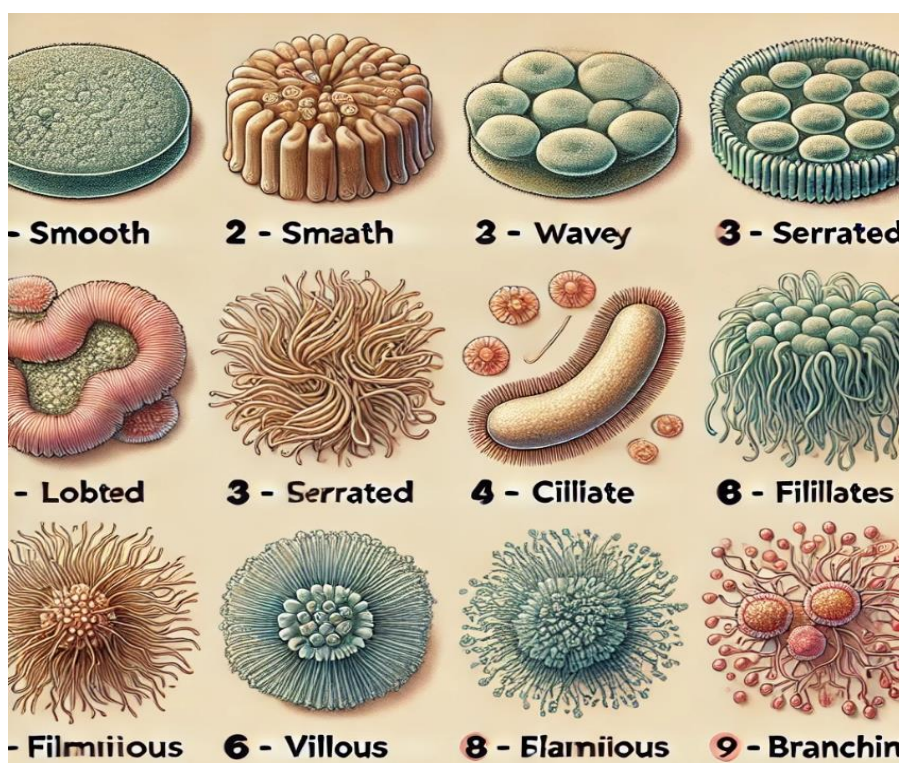


Рис. 1.6. Краї колоній (III): 1. Smooth – гладенький; 2. Wavy – хвилястий; 3. Serrated – зубчастий; 4. Lobed – лопастний; 5. Irregular – неправильний; 6. Ciliate – війчастий; 7. Filamentous – нитчастий; 8. Villous – ворсинчастий; 9. Branching – гілковидний

Представники кожної морфологічної групи мають специфічні набори культуральних ознак, які дозволяють диференціювати колонії різних типів після аналізу характеру їх росту на поживних середовищах (табл. 1.4; рис. 1.7).

Табл. 1.4. Культуральні ознаки мікроорганізмів окремих морфологічних груп

№ п/п	Група мікробів	Типові культуральні ознаки
1	Бактерії – прокаріоти	Діаметр колоній – 1-5 мм, блискучі, гладенькі, слизуваті
2	Бацили – прокаріоти з ендоспорами	Діаметр колоній – в см, часто блискучі та гладенькі, слизуваті, складчасті, розгалужені краї, сформований центр
3	Актиноміцети – прокаріоти	Діаметр колоній – 1-5 мм, сухі, крохкуваті, врастають в агар, поверхня нагадує присохший коректор
4	Мікоплазми – прокаріоти	Діаметр колоній – 1-2 мм, дрібні, нагадують «яєшню»
5	Гриби – еукаріоти	Діаметр колоній – в см, сухі, крохкуваті, порошисті, концентричний ріст, краї та периферія різного кольору

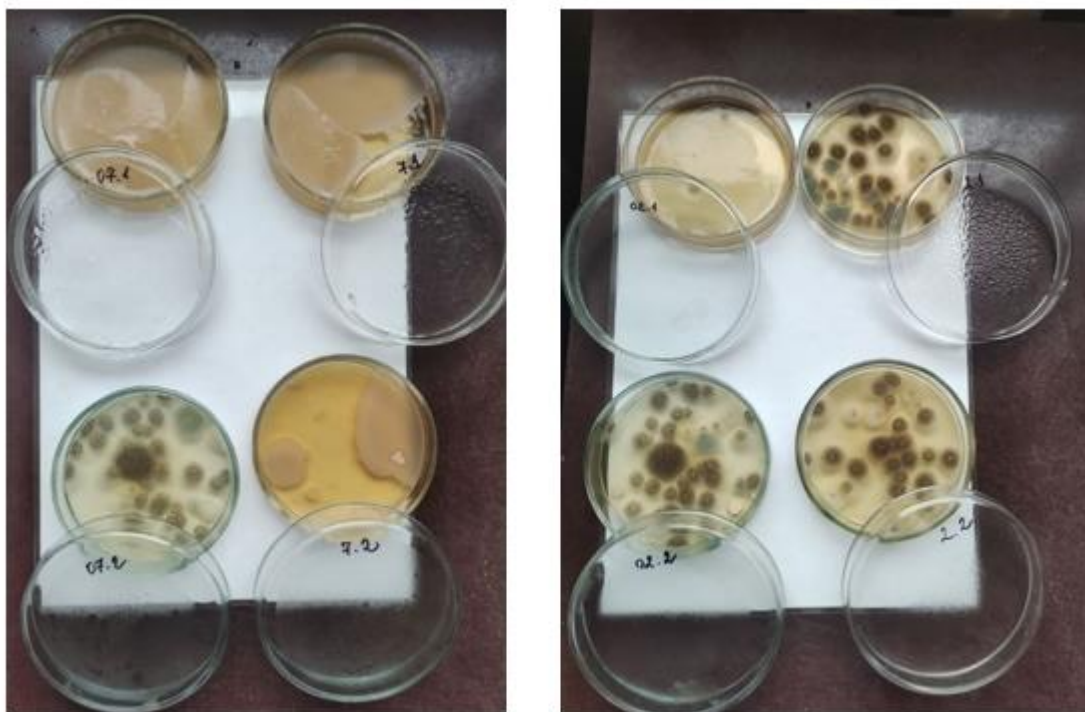


Рис. 1.7. Приклади росту мікроскопічних грибів на твердому поживному середовищі

Ознаки росту мікробних колоній у вигляді «штриха»

Метод штрихового висіву використовують для отримання ізольованих колоній мікроорганізмів на твердих поживних середовищах. Поживний агар інокулюють стерильною петлею, проводячи її по поверхні середовища послідовними штрихами. Це дозволяє рівномірно розподілити клітини, з яких згодом утворюються окремі колонії. При роботі з накопичувальними та чистими культурами мікробний матеріал на поверхню агару можна висівати штрихом (рис. 1.8). У такому разі інформацію про зовнішній вигляд окремих колоній, що з'явилися в чашках Петрі, доповнюють описом особливостей мікробного росту отриманих мазків.

Колонії, що виростають таким способом, мають різні культуральні ознаки: форму (кругла, неправильна, амебовидна), край (гладенький, хвилястий, зубчастий), піднятість (плоска, опукла, конусоподібна) і текстуру (гладка, блискуча, суха або зерниста). Ці ознаки дозволяють ідентифікувати мікроорганізми та віднести їх до певних морфологічних груп. При такому посіві на твердому середовищі *виростають мікроби у вигляді лінії* із рівними, хвилеподібними або шорохуватими краями. Лінія має певний характер росту (суцільний або у вигляді ланцюжка ізольованих колоній). При описі враховують також колір штриха, характер його поверхні, консистенцію та прозорість, інтенсивність росту (незначна, помірна, інтенсивна) вигляд країв штриха (дифузні, ризоїдні тощо).

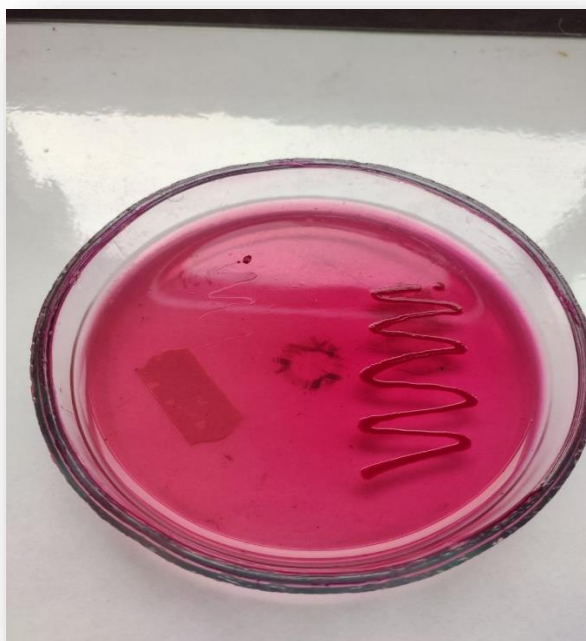


Рис. 1.8. Висів методом штриха

Ознаки росту мікробних колоній на рідких поживних середовищах

Найчастіше на рідких середовищах в лабораторії вирощують **чисту культуру**. Ознаками росту мікробів при цьому є помутніння середовища в пробірці; утворення плівки на поверхні та осаду на дні пробірки; поява пристінкового кільця у верхній частині пробірки (табл. 1.5).

Табл. 1.5. Ознаки росту мікроорганізмів на рідкому середовищі

№ п/п	Назва ознаки	Види ознак	Вигляд посівів
1	Інтенсивність росту	Незначний, помірний, інтенсивний	
2	Помутніння всього стовпчика середовища	Однорідне, з утворенням пластівців, шовковисте	
3	Плівка на поверхні середовища	Суцільна або кільцева, товста або тонка, гладенька або складчата, суха або слизова, щільна або рихла	
4	Осад на дні пробірки	Незначний, інтенсивний, щільний, зернистий	

Контрольні запитання та завдання

1. Як визначити чистоту мікробної культури, вирощеної в лабораторних умовах?
2. Які фізіологічні характеристики мікробних культур важливі для їх ідентифікації?
3. Як середовище вирощування мікроорганізмів впливає на їх біохімічні властивості?
4. Які методи застосовуються для визначення морфологічних ознак бактерій, вирощених в лабораторії?
5. Які фактори можуть вплинути на ріст і розвиток мікробних культур у лабораторних умовах?
6. Як змінюються біохімічні властивості бактерій при вирощуванні на різних типах живильних середовищ?
7. Як використовуються різні температурні режими для ідентифікації та вирощування мікробних культур?
8. Як середовище з різним рН впливає на фізіологічні характеристики мікроорганізмів?
9. Яка роль вологи в процесі вирощування мікробних культур у лабораторії?
10. Як визначити стабільність мікробних культур при довготривалому зберіганні?
11. Які методи використовуються для збереження чистих культур мікроорганізмів на тривалий час?
12. Як вирощування на аеробних та анаеробних середовищах впливає на метаболічну активність мікроорганізмів?
13. Які методи визначення росту та метаболічної активності мікробних культур використовуються у ветеринарії?
14. Як виявити патогенність мікробних культур, вирощених у лабораторних умовах, для тварин?
15. Як можна використовувати мікробні культури для вивчення імунного статусу тварин?
16. Як змінюється генетичний склад мікробних культур під час їх вирощування у лабораторії?
17. Яким чином аналіз росту мікробних культур допомагає у визначенні оптимальних умов для їх розвитку?
18. Як мікробні культури, вирощені в лабораторії, можуть бути використані для розробки вакцин у ветеринарії?
19. Які лабораторні методи дозволяють визначити чутливість мікробних культур до антибіотиків?
20. Яким чином культуральні характеристики бактерій використовуються для діагностики інфекційних захворювань у тварин?

Тема 5. Мікроскопічні дослідження «Живі» препарати. Фарбовані препарати. Прості методи фарбування мікробних клітин

Для виконання стандартного мікроскопічного дослідження, крім світлових мікроскопів різних типів (рис. 1.9), застосовуються:

- **предметні скельця** (прямокутна скляна пластина розміром 75×25 мм, товщиною не більше 1,2 мм);
- **покривні скельця** (квадратна скляна пластина розміром 25×25 мм, товщиною 0,15-0,17 мм).

!Використання предметних та покривних скелець із більшою товщиною не дають можливості для отримання чіткого зображення.



Рис. 1.9. Види мікроскопів:
(А, Б – світлові мікроскопи; В, Г – світлові мікроскопи (працюють від елементів живлення типу АА); Д – просвічуючий електронний мікроскоп)
(Джерело: інтернет-ресурс)

Очищення предметного скла від жиру

Щоб очистити предметне скло від жиру, його залишають на кілька днів у хромовій суміші, а потім ретельно промивають спочатку водопровідною, а далі дистильованою водою.

Також можливий інший метод: кип'ятіння скла протягом 10 хвилин у 10% розчині соляної кислоти, після чого його обробляють у мильному або 10% содовому розчині (для нових скелець використовують 1% розчин соди). Завершальним етапом є промивання водою та протирання ефіром для видалення залишкових забруднень.

Чисті предметні скельця рекомендується зберігати у герметичних банках або ванночках з 96% етиловим спиртом чи спирт-ефірною сумішшю, що допомагає зберегти їх стерильність та чистоту.

«Живі» та фіксовані препарати

«Живі» препарати — це зразки, що містять живі бактеріальні клітини, призначені для мікроскопічного дослідження без попередньої фіксації або забарвлення. Оскільки живі бактерії можуть бути патогенними, під час роботи з ними необхідно дотримуватися правил біобезпеки.

Фіксовані препарати — це зразки мікроорганізмів або тканин, клітини яких були оброблені спеціальними речовинами для збереження їхньої структури, але при цьому втрачають життєздатність. Зазвичай фіксовані препарати піддають забарвленню, щоб краще розрізняти різні структури клітини, що робить їх зручними для анатомічного та морфологічного аналізу.

У мікроскопічних дослідженнях вибір між живими та фіксованими (мертвими) препаратами залежить від характеру матеріалу та поставленої мети. **«Живі» препарати** дозволяють спостерігати за природною поведінкою клітин, їхнім рухом, процесами обміну речовин і реакціями на зовнішні подразники.

Фіксовані препарати містять мертві клітини, які фіксують за допомогою хімічної або фізичної фіксації. Така обробка допомагає зберегти структуру клітин та дозволяє детально вивчати їхню будову, оскільки клітини стають нерухомими та часто забарвленими для кращої видимості під мікроскопом. Фіксовані препарати зручніші для довготривалих спостережень і можуть бути використані для аналізу тонкої внутрішньої будови клітин та виявлення специфічних компонентів, що важко зробити на живих зразках.

Виготовлення «живих» препаратів

В живому вигляді вивчають:

– морфологічні характеристики великих мікробних клітин (еукаріотів), таких як гриби та дріжджі. У таких препаратах можна дослідити форму клітин, спори грибів та інші структурні елементи. Живі клітини мікроорганізмів є прозорими, тому лише злегка помітні в полі зору мікроскопа. Для вивчення живих мікробів, а саме морфологічних ознак, часто використовують метод «розчавленої краплі», що дозволяє детальніше дослідити їхні особливості (рис. 1.10).

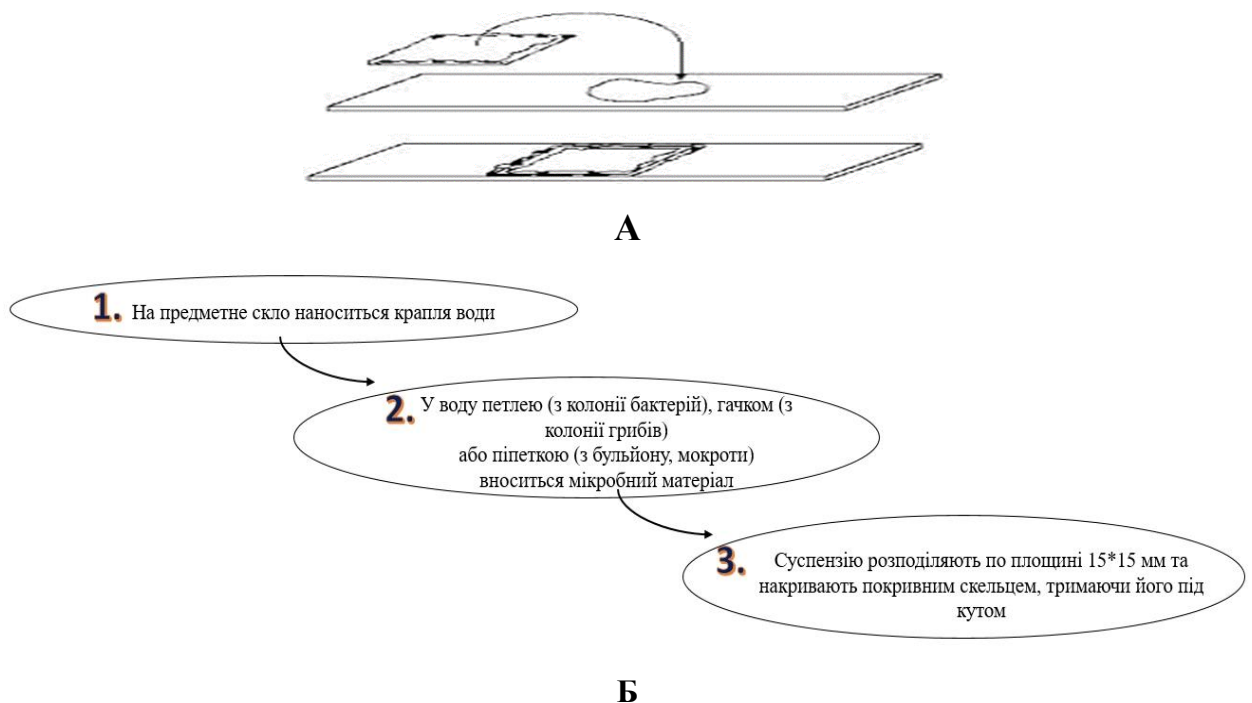


Рис. 1.10. Методика виготовлення «живого» препарату методом розчавленої краплі

—фізіологічні властивості бактерій, що здатні до руху. Джгутиків у таких препаратах не можна виявити, але у полі зору можливо спостерігати направлений рух мікробів. Тому для вивчення рухливості використовують приготування препарату методом «висячої» краплі (рис. 1.11).

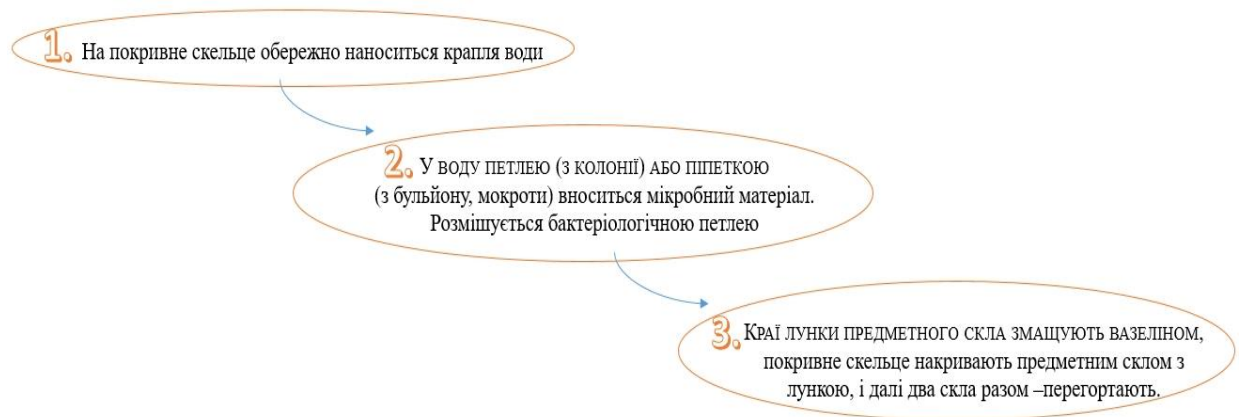


Рис. 1.11. Методика виготовлення «живого» препарату методом «висячої краплі»

Фарбовані препарати: просте фарбування

Виготовлення фарбованих значно полегшує спостереження за клітинними структурами та їх змінами. Завдяки фарбуванню стає можливим

візуалізація деталей, які інакше були б непомітні під мікроскопом, зокрема ядра (в еукаріотів), мембрани, цитоплазму та інші органели. Просте фарбування часто є першим етапом у комплексних діагностичних дослідженнях, дозволяючи швидко та економічно оцінити морфологію клітин.

Важливість виготовлення таких препаратів зростає ще більше в умовах клінічних лабораторій. Наприклад, фарбовані препарати використовуються для діагностики захворювань крові, виявлення бактеріальних інфекцій та оцінки тканинних змін при онкологічних процесах. Просте фарбування є базовою технікою, яка забезпечує надійну та швидку діагностику й стає основою для більш складних методів, таких як багатоступеневе (складне) або диференційне фарбування.

Для створення простих фарбованих препаратів застосовують барвники (рис. 1.12).



Рис. 1.12. Барвники для проведення фарбування

У мікробіології користуються аніліновими барвниками. Анілінові барвники, представлені у вигляді кристалічного або аморфного порошку, є органічними речовинами, які поділяють на дві основні групи: кислотні та основні барвники.

Вибір певного барвника залежить від завдань, поставлених перед мікроскопічним дослідженням, оскільки мікробні клітини містять компоненти як кислої, так і основної природи.

Барвники застосовують як у водних, так і в неводних розчинах. У водних розчинах розчинником виступає вода, тоді як у неводних використовують такі речовини, як спирт, формалін або фенол. Водні розчини, однак, є нестійкими,

і процес фарбування з їхньою допомогою проходить повільніше, а також не всі мікробні клітини рівномірно фарбуються. Тому частіше використовують неводні розчини барвників або виконують фарбування з підігрівом розчину, що підвищує ефективність процесу.

Барвники, які постійно потрібні в мікробіологічній лабораторії – це фуксин Циля, фуксин Пфейфера (карболовий фуксин розведений дистильованою водою 1:9), метиленовий синій за Лефлером, набір реактивів для фарбування за Грамом та фарба Романовського.

Виготовлення фіксованих препаратів

Фіксація мікробних препаратів — це процес підготовки мікробних клітин або тканин для мікроскопічного дослідження, при якому зразки закріплюють на предметному склі, щоб зберегти їхню структуру та запобігти руйнуванню. Фіксація забезпечує збереження форми клітин, стабілізує їхні внутрішні компоненти та робить їх стійкішими до впливу барвників.

Основні методи фіксації включають термічну та хімічну фіксацію (рис. 1.13). При термічній фіксації препарат нагрівають, що сприяє швидкому закріпленню клітин на склі. Хімічна фіксація здійснюється за допомогою спеціальних розчинів, таких як формалін або етанол, які проникають у клітини і закріплюють їхні білкові та ліпідні структури. Фіксація запобігає деформації клітин під час фарбування, дозволяє точніше оцінити їхню морфологію і полегшує подальший аналіз під мікроскопом.

Отже, після фіксації:

- мікроорганізми міцно прикріплюються до скла завдяки коагуляції білків;
- знешкоджені клітини патогенних мікробів втрачають здатність спричиняти захворювання;
- загиблі мікробні клітини краще поглинають барвники.

Способи фіксації препаратів

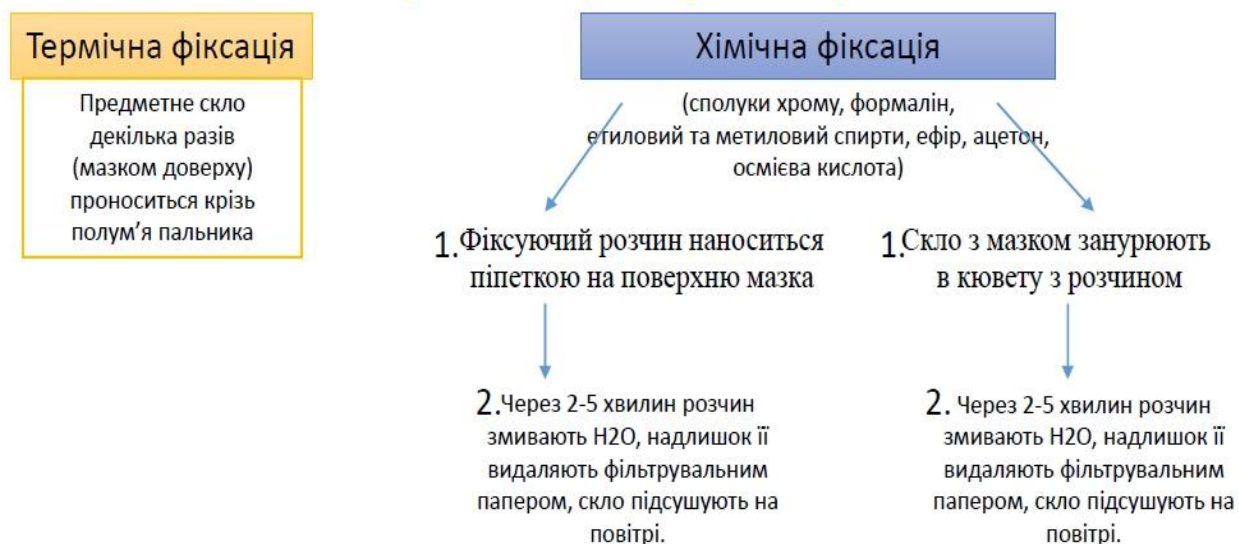


Рис. 1.13. Способи фіксації препаратів

У деяких методиках фіксація мазка-відбитка, мазка крові або суспензії патологічного матеріалу проводиться шляхом висушування на повітрі. Такий спосіб допомагає зберегти клітинну структуру і зручний для подальшого фарбування. Методи фарбування поділяються на прості та складні залежно від кількості використаних барвників. Прості методи передбачають застосування лише одного барвника, такого як червоний фуксин або метиленовий синій (Рис. 1.14).

Червоний фуксин використовується у вигляді концентрованого карболового розчину, відомого як фуксин Циля, який має високу стійкість і зберігає свої властивості протягом декількох місяців. Також може застосовуватися водний розчин карболового фуксину, або фуксин Пфейфера, що придатний до використання протягом 10 днів.

Метиленовий синій готують у формі насиченого спиртового розчину, який також зберігається тривалий час.

Складні методи фарбування, які використовують кілька барвників, допомагають ідентифікувати мікроорганізми і діагностувати патогени. Вони дозволяють розрізняти клітинні структури, що важливо для визначення типу мікроорганізмів і оцінки патологічних змін у зразках.



Рис. 1.14. Методи фарбування (порівняння)

Просте фарбування

Просте фарбування в мікробіології — це метод обробки мікроорганізмів, який допомагає дослідникам швидко ідентифікувати бактерії під мікроскопом. На відміну від складних багатокрокових процедур, просте фарбування використовує лише один барвник, наприклад, метиленовий синій або фуксин, щоб забарвити клітини, роблячи їх помітними та відокремленими від фону. Це дозволяє легко визначити форму, розмір та розташування бактерій, що важливе для подальших, детальніших досліджень.

Коли використовують лише просте фарбування?

Простим фарбуванням користуються, коли необхідно отримати загальну інформацію про морфологію бактерій, як-от форму, розмір і розташування клітин, без глибокої диференціації структур (рис. 1.12). Цей метод застосовують, коли потрібно швидко перевірити наявність або відсутність мікроорганізмів у зразку. Просте фарбування зручно використовувати в початкових дослідженнях, коли важливі базові відомості про клітини, а також у випадках, коли немає потреби в подальшій класифікації на основі складніших методів, як-от фарбування за Грамом або кислотостійке фарбування.

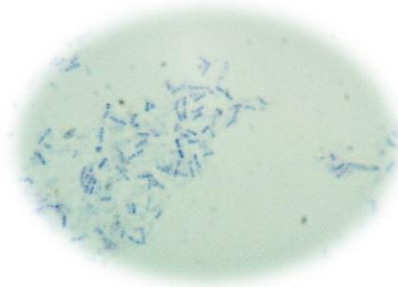


Рис. 1.15. Препарат виготовленим методом простого фарбування, барвник – метиленовий синій, x100

Послідовність дій при фарбуванні простим методом

- Зафіксований препарат, зазвичай оброблений полум'ям спиртівки, поміщають на спеціальні містки, розташовані на стінках кювети або кристалізатора.

- Поверхню мазка покривають розчином барвника на 1-3 хвилини (тривалість залежить від типу барвника). Альтернативно, барвник можна наносити через фільтрувальний папір, змочений розчином, що допомагає економити реактиви. У цьому випадку на фільтрувальний папір наливають воду, і після кількох хвилин його обережно знімають.

- Після закінчення часу фарбування препарат промивають водою, якщо це потрібно, щоб видалити надлишок барвника.

- Заключним етапом є висушування препарату на повітрі, в потоці гарячого повітря над пальником або обережним промоканням фільтрувальним папером.

Після висушування фарбований препарат готовий для мікроскопічного дослідження — його можна розглядати у повітрі або з використанням масляної імерсії. У випадку імерсії на підготовлений препарат додають краплю кедрової олії (імерсійне масло), що дозволяє розглядати мікроорганізми за допомогою спеціального об'єктива для масляної імерсії (позначений як OIL з чорною смужкою).

Контрольні запитання та завдання

1. Що таке мікроскопічне дослідження у ветеринарній мікробіології, і які методи при цьому застосовуються?
2. Які переваги та обмеження має використання «живих» препаратів для дослідження мікроорганізмів?
3. Як мікроскопічні методи допомагають в ідентифікації патогенних мікроорганізмів у зразках від тварин?
4. Чим відрізняються методи фарбування для живих і мертвих мікробних культур?
5. Які методи використовуються для виготовлення фарбованих препаратів бактерій у ветеринарії?
6. Як застосовувати методи простого фарбування для виявлення морфологічних ознак мікроорганізмів?
7. Які фарби використовуються для простого фарбування мікробних клітин, і в чому їх особливості?
8. Як правильно підготувати зразок для мікроскопії за допомогою простого методу фарбування?
9. Які типи мікробів найбільше підходять для дослідження за допомогою простих методів фарбування?
10. Як вибір методу фарбування може вплинути на точність результатів мікроскопічного дослідження?
11. Які з методів фарбування застосовуються для виявлення бактерій у мокроті або екскрементах тварин?
12. Які особливості мікроскопії «живих» препаратів при дослідженні аеробних та анаеробних мікроорганізмів?
13. Як зміни в кольорі клітин можуть бути використані для визначення їх фізіологічного стану?
14. Які методи фарбування застосовуються для виявлення специфічних органел у мікробних клітинах?
15. Як використання живих препаратів допомагає в дослідженнях з рухливості мікроорганізмів?
16. Як фарбування за Грамом використовується в ідентифікації бактерій у ветеринарії?
17. Які основні помилки можуть виникнути при підготовці та дослідженні мікробних препаратів під мікроскопом?
18. Як оцінити результат фарбування препаратів під мікроскопом для визначення структури мікробних клітин?
19. Які методи фарбування використовуються для дослідження грамнегативних та грампозитивних бактерій?
20. Як правильно використовувати прості методи фарбування для ідентифікації патогенних бактерій у зразках сечі або крові тварин?

Тема 6. Мікроскопічні дослідження мікроорганізмів

Фарбовані препарати: складне фарбування методом Грама

Виявлення структур бактерій

Складне фарбування – це метод фарбування, що використовує кілька барвників або реагентів для поетапного забарвлення мікроорганізмів, що дозволяє чіткіше виявити різні структурні елементи клітин. За складного фарбування фарбуються деякі органоїди клітини. Метою такого фарбування є не тільки спрощення візуалізації, а й підвищення точності ідентифікації та диференціації різних типів бактерій, грибів та інших мікроорганізмів. Складне фарбування широко застосовується в мікробіології, особливо у клінічній діагностиці, де воно дозволяє швидко ідентифікувати збудників інфекцій та допомагає лікарям обрати ефективне лікування. Завдяки поєднанню барвників і реактивів, метод дозволяє розрізнити різні клітинні структури, такі як капсули, джгутики та спори, що важливо для точного визначення виду мікроорганізму.

Сучасні підходи до складного фарбування включають інновації, що підвищують швидкість, точність і зручність обробки мікробіологічних зразків. Одним із важливих напрямів є автоматизація процесів фарбування — лабораторні системи з роботизованими установками здатні стандартизувати і пришвидшити процедури, зменшуючи ризик людської помилки та забезпечуючи стабільні результати. Це особливо корисно в діагностичних лабораторіях, де щодня обробляються великі обсяги зразків. Крім того, сучасні технології використовують флуоресцентні барвники, які, в комбінації з лазерними мікроскопами, дозволяють отримувати високоінформативні зображення мікроорганізмів на клітинному рівні. Це значно покращує можливості вивчення структури клітин і точність ідентифікації збудників. Флуоресцентні барвники допомагають диференціювати живі та мертві клітини або активні та неактивні ділянки всередині клітини, що стає цінним інструментом для досліджень у молекулярній біології та вірусології. Ще один перспективний напрям — використання штучного інтелекту та алгоритмів машинного навчання для аналізу мікроскопічних зображень. Програми здатні автоматично розпізнавати структури, класифікувати мікроорганізми і навіть прогнозувати ймовірність інфекцій. Завдяки поєднанню складного фарбування з алгоритмами обробки зображень, діагностика стає швидшою та доступнішою, що сприяє розвитку персоналізованої медицини й підвищенню якості лікування на глобальному рівні. Але одним із найвідоміших методів складного фарбування — це фарбування за Грамом, яке допомагає визначити основні групи бактерій: грампозитивні (Грамм+) та грамнегативні (Грамм-).

Фарбування даним методом **дозволяє ідентифікувати мікроорганізми по відношенню до структур їх клітинної стінки** (важливість даного методу проголошено Емілем Ру 1886 рік), що має важливе значення для дослідника та лікаря, а саме (джерело: Source credits rishad via LinkedIn):

1. Вибір лікувальних засобів: чутливість до антибіотиків — грампозитивні (Грам+) та грамнегативні (Грам-) бактерії по-різному реагують на антибіотики.

2. Механізми протікання захворювання: вироблення бактеріями токсинів — грамнегативні (Грам-) бактерії часто виробляють ендотоксини, тоді як грампозитивні (Грам+) бактерії виробляють екзотоксини.

3. Діагностика для ветеринарного лікаря: ідентифікація інфекції: Забарвлення за Грамом є інструментом швидкої діагностики, що дозволяє медичним працівникам швидко ідентифікувати тип бактерій, що викликають інфекцію.

Метод заснований на фарбуванні клітинних стінок мікроорганізмів-**прокаріот (бактерій, актиноміцетів, рикетсій, хламідій)**, які (через їх хімічний склад) по-різному сприймають барвники (рис. 1.16; рис. 1.17).

Клітинна стінка знаходиться поза межами клітинної мембрани бактеріальних клітин. Її функції — забезпечувати міцність та каркас для мікроорганізмів, підтримка форми клітини, захист від осмотичного лізису, захист від деяких токсинів та стійкість мікроорганізмів до певних препаратів. Грам+ та Грам- бактерії мають клітинну стінку. Основним складовим клітинної стінки є полісахарид — муреїн або пептидоглікан. Сам пептидоглікан є відносно пористою речовиною.

Клітинна стінка Грам+ бактерій на 90% складається із пептидоглікану (який розміщується є пошарово, потім ці шари зшиваються між собою завдяки пептидним місткам), поліцукрів, тейхоевої та ліпотейхоевої кислоти. Така структура забезпечує повне зшивання пептидоглікану у міцний каркас. Тому клітинна стінка Грам+ бактерій є міцною зшитою структурою (Рис. 1.16).

Клітинна стінка Грам- бактерій більш багаторівнева структура та містить більше складових ніж у Грам+ бактерій. **Грам- бактерії мають** зовнішню мембрану (основна складова клітинної стінки), яка складається із ліпідного бішару (*лінополісахариди, лінополіпротеїни та білки-порини*), далі периплазматичний простір, а тоді невеликий шар пептидоглікану (Рис. 1.16). Але відсоток пептидоглікану від усієї клітинної стінки варіює у межах 5-10%. Тобто Грам- бактерії містять декілька шарів пористого пептидоглікану або муреїну. Тоді, як клітинна стінка Грам- бактерій на 90% складається з шарів пептидоглікану (муреїну).

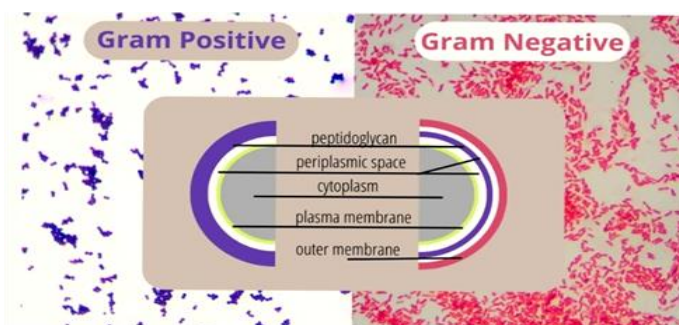
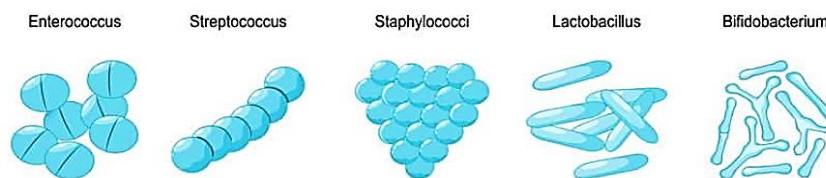


Рис. 1.16. Схематична будова Грам+ та Грам- бактерій
(Джерело: Source credits rishad via LinkedIn)

Gram-positive bacteria



Gram-negative bacteria

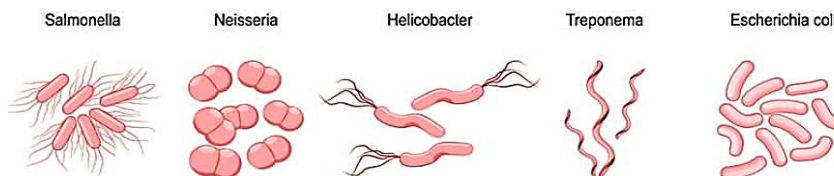


Рис. 1.17. Приклади родів та видів Грам+ та Грам- бактерій
(джерело: @microbiologynote and microbiologyinfo)

Принцип механізму фарбування методом Грама:

Для виявлення морфології бактеріальної клітини використовують процедуру забарвлення аніліновими барвниками.

Спочатку клітину фарбують фіолетовим, зеленим або синім барвником (частіше застосовують генціан фіолетовий). Далі обробляють спеціальною протравою, яка допомагає закріпити барвник, утворюючи комплекс «барвник + протрава + пептидоглікан клітинної стінки». Цей комплекс міцно утримується в грампозитивних бактерій, де вміст пептидоглікану в стінці досягає 90%, тоді як у грамнегативних (з 5-10% пептидоглікану) він менш стабільний.

Після обробки клітини набувають кольору першого барвника. Далі препарат короткочасно обробляють знебарвлювачем (спиртом, ацетоном чи ксилолом). У грампозитивних бактерій через високу концентрацію пептидоглікану барвник не вимивається повністю, тож клітини залишаються фіолетовими. У грамнегативних клітин комплекс з пептидогліканом руйнується, барвник вимивається, і клітини стають прозорими.

Після видалення знебарвлювача водою додають контрастний червоний барвник (часто використовують фуксин), що надає грамнегативним бактеріям червоного або рожевого відтінку, тоді як грампозитивні залишаються фіолетовими.

Насамкінець препарат промивають, висушують і досліджують під мікроскопом.

На даному механізмі побудований класичний метод фарбування за Грамом. Зазвичай використовують класичний метод фарбування методом Грама, але також користуються і модифікаціями.

Класичний метод Грама

1. Нанесення генціан фіолетового на мазок (1–2 хвилини).
2. Обробка розчином Люголя (1 хвилина), потім змивання водою.
3. Обробка спиртом для знебарвлення (0,5–1 хвилина), потім змивання водою.
4. Нанесення фуксину (1–2 хвилини) і повторне змивання водою.

Модифікація Синьова

1. Накласти папірці з барвником на мазок, змочити водою (2 хвилини).
2. Обробити розчином Люголя (1 хвилина) і змити водою.
3. Обробити спиртом для знебарвлення (0,5 хвилини), потім знову змити водою.
4. Додати фуксин (1–2 хвилини) і змити водою.

Модифікація Нікольса

1. Використовується генціан фіолетовий і фуксин для забарвлення.
2. Обробка проводиться спиртовим знебарвлювачем (95%-вий спирт).

Модифікація Буркса

1. Застосовується генціан фіолетовий або кристалічний фіолетовий для початкового фарбування.
2. Обробляється спеціальною йодною протравою для фіксації.
3. Для знебарвлення застосовується суміш ацетону та спирту (95%-вий етанол).

ВАЖЛИВО! дотримуватись часових інтервалів між етапами, використовуючи секундомір для забезпечення точності.

Отже, після фарбування за методом Грама:

- грампозитивні (Грам+) мікроорганізми набувають фіолетового забарвлення (у модифікаціях Каліни — чорно-фіолетового або зеленого кольору).
- грамнегативні (Грам-) мікроорганізми забарвлюються в червоний колір.

Для досягнення високої якості фарбування за Грамом необхідно дотримуватись кількох ключових умов

По-перше, бактеріальна культура, нанесена на предметне скло, повинна утворювати лише тонкий моношар клітин. Це забезпечує достатню відстань між окремими клітинами чи їх скупченнями, що дозволяє барвнику рівномірно проникати.

Оптимальним для фарбування є використання молодих культур, вирощених протягом 24-48 годин. Це допомагає уникнути помилок у визначенні грам-позитивності чи грам-негативності. Для більшої точності варто одночасно фарбувати контрольні зразки з відомими бактеріями.

Підготовка культури для фіксації також впливає на якість результату. Клітини краще суспендувати в дистильованій воді, а фіксацію проводити над пальником з обережністю, щоб уникнути перегріву та пошкодження структури клітин. Фарбування починають тільки після того, як препарат охолоне.

Розчин Люголя, що використовується для закріплення, слід зберігати в прохолодному і темному місці у темному склі, оскільки під дією світла і тепла в ньому утворюється йодна кислота, яка знижує якість фарбування.

Найефективнішим знебарвлювачем є чистий ацетон або його суміш зі спиртом.

Деякі відмінності між грампозитивними і грамнегативними мікроорганізмами

Грампозитивні і грамнегативні мікроорганізми по-різному діляться (розмножуються), також на них неоднаково впливають антибіотики внаслідок різної будови клітинних стінок. Як, у грампозитивних мікробів (товстий шар пептидоглікану) при поділі спочатку вп'ячується клітинна стінка, надалі утворюються наскрізна перетинка, яка розділяється ферментами (рис. 1.18 – А). Нестача ферментів у багатьох кулястих бактерій призводить до утворення багатоклітинних скупчень (Рис. 1.19 – А). У грамнегативних паличок клітина спочатку розтягується, потім - утворюється «вісімка» з тонкою перетинкою, яка легко розрізається ферментами (рис. 1.18 – Б). Через це більшість паличок в препаратах є поодинокими, а скупчення у них утворюються у вигляді латинської літери V або палісаду (Рис. 1.19 – Б).



Рис. 1.18. Поділ бактерій (електронна мікроскопія)
А - грампозитивні кулясті бактерії; Б – грамнегативні паличковидні бактерії (Джерело: Інтернет-ресурс)



Рис. 1.19. Вигляд скупчень бактерій (електронна мікроскопія)
(Джерело: Інтернет-ресурс)

А - грампозитивні кулясті бактерії; Б – грамнегативні паличковидні бактерії

КОН-тест

Розрізнення грампозитивних і грамнегативних бактерій можна здійснити за допомогою розчину калій гідроксиду (КОН).

Порядок виконання КОН-тесту:

- На предметне скло додають 2 краплі 3% розчину КОН і наносять мікробну культуру.
- Перемішують бактеріологічною петлею протягом 5-10 секунд.
- Потім петлю занурюють у краплю та піднімають вгору.
- ✓ у грамнегативних (Грам-) за петлею тягнеться слизовий тяж 0,5-2 см (рис. 1.20);
- ✓ у грампозитивних (Грам+) слиз і тяж відсутні.

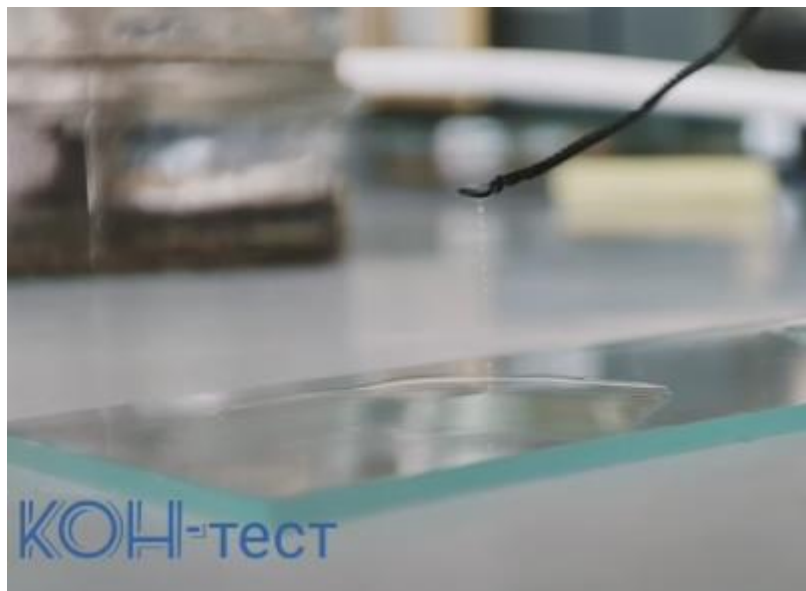


Рис. 1.20. КОН – тест (утворення слизового тяжу у грамнегативних (Грам-) бактерій)

Виявлення структур бактерій

Під час ідентифікації певних мікроорганізмів виникає потреба у виявленні їх морфологічних ознак, таких як: **структура клітинних стінок у деяких видів мікробів, виявлення ендоспор чи капсул.** Під час ідентифікації певного виду збудника, чи його патогенності (наявність кислотостійкої капсули), високої контагіозності (заразності) внаслідок утворення ендоспор.

Фарбування оболонок кислотостійких мікроорганізмів

Кислотостійкість - властивість деяких мікроорганізмів, які мають **високий вміст ліпідів в клітинній стінці** (бактерії родів *Mycobacterium*, *Corynebacterium*, актиноміцети роду *Nocardia*). Такі види мікроорганізмів (наприклад, збудник туберкульозу *Mycobacterium tuberculosis*) мають **клітинну стінку**, яка товстіша, ніж у більшості бактерій, восковиста, багата на **міколову**

кислоту та її солі. Основу клітинної стінки складають гідрофобні шари **міколатів** та **шар пептидоглікану**, який з'єднаний з молекулами **полісахариду арабіногалактану**. Саме за допомогою цих специфічних складових клітинної стінки кислотостійкі бактерії здатні чинити опір до знебарвлення під час фарбування. Тобто, складові клітинної стінки міцно зв'язуються із барвниками та утворений забарвлений комплекс не змивається (рис. 1.21; 1.23).

Послідовність фарбування мазка методом Циля-Нільсена для виявлення кислотостійких мікроорганізмів:

- а) На фіксований препарат наносять **карболфуксиновий барвник** (фуксин Циля) і **нагрівають** на пальнику (без кипіння!).
б) Також На мазок також можна накладати папірець, просочений барвником. В такому випадку мазок змочують H_2O .
** Всі клітини препарату фарбуються в червоний колір.*
- Охолоджують і промивають** слабким струменем води.
- Мазок поміщають в **знебарвлюючий розчин**, промивають водою. Операції повторюють доти, поки плівка не буде блідо-рожевого кольору або жовтуватого кольору.
При використанні сірчаної кислоти в якості знебарвлювача препарат прополоскують спиртом.
** Нестійкі до кислот мікроби при взаємодії з розчином HCl або H_2SO_4 знебарвлюються.*
- Мазок 2-3 хв. дофарбовують в розчині **метиленового синього за Лефлером**. Промивають водою. Підсушують фільтрувальним папером.
**Додатковий барвник фарбує знебарвлені клітини в синій колір. При мікроскопії – кислотостійкі бактерії – червоні, всі інші – сині.*

Рис. 1.21. Метод Циля-Нільсена (принцип методу)

Кислотостійкі бактерії можна виявити також за допомогою флуоресцентної мікроскопії, застосовуючи спеціальні флуоресцентні барвники, такі як родамін-аурамін (рис. 1.22).

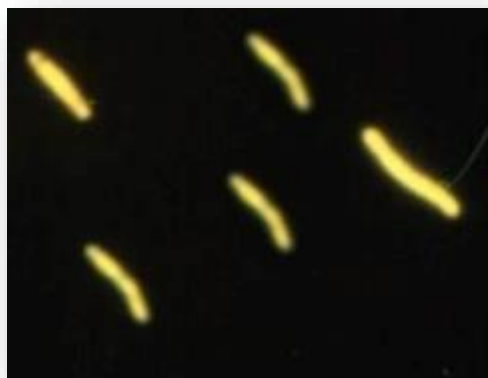


Рис. 1.22 Фарбування *Mycobacterium tuberculosis* родаміном-аураміном (Джерело: Інтернет-ресурс)

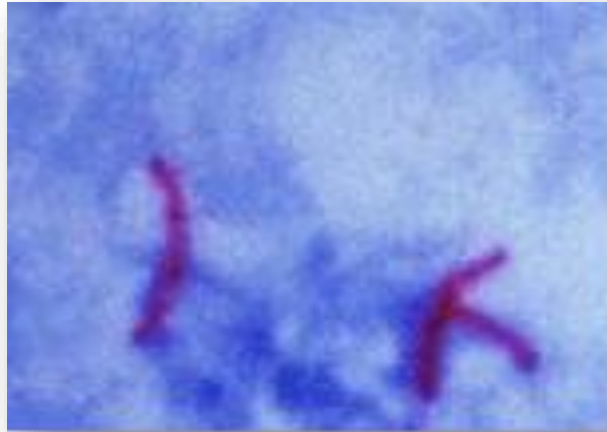


Рис. 1.23. Фарбування *Mycobacterium tuberculosis* методом Циля-Нільсена (Джерело: Інтернет-ресурс)

Виявлення ендоспор бацил

Спори бактерій — тільця певної форми (зазвичай округлої), які утворюються у тільці деяких видів бактерій на певній стадії їх розвитку та слугують для виживання у несприятливих умовах. Спори можуть зберігатися у різних об'єктах середовища протягом десятиліть та переходити у вегетативну форму при сприятливих умовах (впродовж 3-4 годин, за наявності води та глюкози в середовищі існування).

Ендоспори бактерій — утворення всередині клітин деяких родів бактерій (наприклад рід *Bacillus* та *Clostridium*), які складаються з кількох шарів стійких оболонок (від 3-х до 20 шарів), які вкривають генетичний матеріал бактерій та ферменти) (рис. 1.24).

Екзоспори бактерій — утворення, які є стійкими до високих температур та утворюються під час бутонізації у представників родів *Metylosinus* і *Rhodomicrobium*.

Запам'ятайте — спори бактерій призначені для виживання у несприятливих умовах. Спори грибів та рослин — призначені для розмноження!



Рис. 1.24. Ендоспори (помаранчеві) у збудника правця *Clostridium tetani* (Джерело: Інтернет-ресурс)

Оболонки ендоспори не дають можливості ефективно профарбувати клітину бацили одним барвником. Тому простими методами фарбування ендоспори зазвичай не виявляють. Але виявлено, що оболонки ендоспор здатні фарбуватися після обробки розбавленою гарячою HCl (60 °C).

Метод Пешкова

Реактиви: метиленовий синій і лужний метиленовий синій Леффлера.

Хід роботи:

Мазки нагрівають до появи парів (наприклад, проводять 2-3 рази над полум'ям або витримують на водяній бані 10 хвилин).

Дають мазкам охолонути та промивають водою.

Фарбують мазки водним розчином сафраніну 0,5% або нейтрального червоного 0,5% протягом 1-2 хвилин.

Промивають водою, висушують і переглядають під мікроскопом.

Метод Ціля-Нільсена

Реактиви: карболовий фуксин Ціля, 5% сірчана кислота, метиленовий синій (розведення 1:40).

Хід роботи:

Наносять карболовий фуксин Ціля на мазок і нагрівають до появи парів 5-7 хвилин, додатково фарбують 2-3 рази.

Промивають мазок водою.

Знебарвлюють у 5% розчині сірчаної кислоти до блідо-рожевого кольору.

Фарбують мазок метиленовим синім протягом 3-5 хвилин.

Промивають, висушують і переглядають під мікроскопом.

Виявлення капсул бактерій

Деякі види бактерій здатні утворювати мукоїдні слизові капсули. Здатність до капсуло утворення є важливим елементом вірулентності (патогенності) мікроорганізмів. Капсула містить 70-90% води та полімерів різної будови: поліцукрів та поліпептидів. У капсульованих бактерій капсула складається із поліцукрів, винятком є бацили, капсула яких складається з двох типів речовин: поліцукрів та поліпептидів.

За товщиною розрізняють:

- Мікрокапсули;
- Макрокапсули;
- Слизові шари.

Функції капсули у капсульних бактерій:

- Пристосування до виживання;
- Прикріплення до субстрату;
- Захист від імунних факторів (фагоцитоз)
- Захист від токсичних речовин, висихання і механічних пошкоджень.

Для виявлення капсул у живих препаратах до водної суспензії мікроорганізмів додають барвники, такі як 3% розчин конго червоного або 10% розчин опалового синього. Препарат повинен бути одношаровим: надлишок рідини видаляють фільтрувальним папером, одночасно притискаючи суспензію покривним скельцем.

Застосовуються методи негативного фарбування, де суспензію живих бактерій готують не у воді, а в розчині стерильної туші.

Для виявлення капсул у фіксованих препаратах варто зазначити, що при термічній фіксації речовини капсули легко руйнуються, тому мікроорганізми фіксують хімічним способом або пасивним висушуванням на повітрі. Після цього препарат фарбують складним методом із використанням декількох барвників.

Метод Буррі

Реактиви: туш.

Хід роботи:

Наносять краплю туші на предметне скло, розмішують її з досліджуваним матеріалом і виготовляють «мазок крові».

Висушують на повітрі, не промивають водою.

Переглядають під мікроскопом з імерсією.

Метод Буррі-Гінса

Реактиви: туш і 96% етаноловий розчин фуксину Пфейффера.

Хід роботи:

Наносять краплю туші на предметне скло та розмішують її з матеріалом.

Готують мазок і дають йому висохнути.

Потім фарбують 1 хвилину фуксином Пфейффера.

Промивають водою і переглядають під мікроскопом з імерсією.

Метод Антоні

Реактиви: 1% водний розчин кристалічного фіолетового і 10% водний розчин сульфату міді (CuSO_4).

Хід роботи:

Наносять фіолетовий кристал на мазок і витримують на повітрі.

Промивають мазок 10% водним розчином сульфату міді.

Не промивають водою після фарбування, висушують на повітрі та переглядають під мікроскопом.

Контрольні запитання та завдання

1. В чому полягає суть методу фарбування за Грамом і як він застосовується в ветеринарній мікробіології?

2. Яка роль фарбування за Грамом у диференціації бактерій на грампозитивні та грамнегативні?

3. Як принцип фарбування за Грамом дозволяє визначити особливості клітинної стінки бактерій?
4. Які основні етапи фарбування бактерій методом Грама та їх значення для результату дослідження?
5. Які типи бактерій найчастіше виявляються за допомогою методу Грама в ветеринарії?
6. Як виглядають грампозитивні та грамнегативні бактерії під мікроскопом після фарбування за Грамом?
7. Як фарбування методом Грама допомагає в діагностиці бактеріальних інфекцій у тварин?
8. Які структурні особливості клітинної стінки грампозитивних і грамнегативних бактерій?
9. Як метод Грама використовується для виявлення бактеріальних інфекцій у крові чи сечі тварин?
10. Які зміни в результатах фарбування можуть свідчити про наявність атипових або відмінних від звичайних клітинних стінок бактерій?
11. Як можна використати фарбування за Грамом для диференціації бактерій у клінічних зразках тварин?
12. Які структурні компоненти бактерій можна виявити під час фарбування за Грамом?
13. Як фарбування за Грамом допомагає в розрізненні різних родів бактерій, наприклад, *Staphylococcus* і *Escherichia*?
14. Як вибір часу витримки під час фарбування методом Грама може вплинути на результат?
15. Які помилки можуть виникнути при фарбуванні методом Грама і як їх уникнути?
16. Як складне фарбування методом Грама допомагає у вивченні структури пліснявих бактерій та їх впливу на здоров'я тварин?
17. Яка роль фарбування за Грамом у вивченні патогенності та антибіотикорезистентності мікроорганізмів?
18. Які додаткові методи фарбування можна використовувати для вивчення специфічних структур бактерій після фарбування за Грамом?
19. Як фарбування за Грамом може бути використане для оцінки ефективності антибіотиків у ветеринарії?
20. Як виявлення внутрішньоклітинних структур бактерій за допомогою фарбування за Грамом може допомогти в ідентифікації патогенів при інфекційних захворюваннях у тварин?
21. Які основні методи фарбування застосовуються для виявлення спор у спороутворюючих бактерій, і в чому їх принципова різниця?
22. Як структура та хімічний склад бактеріальної спори впливають на здатність сприймати фарбувальні агенти?
23. Які особливості фарбування за методом Шеффера-Фултона дозволяють чітко відрізнити спори від вегетативних клітин?

24. Чому важливо визначати наявність спор у бактеріях при діагностиці збудників інфекційних захворювань у тварин?

25. Як зміни умов фарбування, таких як температура та час, можуть впливати на результат фарбування спор у бактерій?

Тема 7. Методи ідентифікації чистих культур мікроорганізмів Визначення деяких фізіологічних (біохімічних) властивостей бактерій

Ідентифікація чистих культур мікроорганізмів — комплексна система заходів, яка передбачає поетапне визначення родової та видової приналежності мікроорганізмів.

Родина (лат. *familia*) — це таксономічна категорія, що об'єднує кілька родів мікроорганізмів зі спільним еволюційним походженням. Наукова (латинь) назва родини формується завдяки додаванню до кореня назви роду спеціального закінчення *-aceae*, наприклад родина *Enterobacteriaceae*. У друкованому тексті родини, рід та вид мікроорганізмів пишуть латинськими назвами та виділяють курсивом.

Рід (лат. *genus*) — це базова надвидова таксономічна категорія, яка об'єднує близькі за спорідненістю види. Наукова назва роду зазначають **одним латинським словом**, наприклад, рід *Klebsiella*.

Вид (лат. *species*) — це основна таксономічна одиниця, що охоплює групу мікроорганізмів із загальними морфологічними, фізіологічними та генетичними характеристиками. Наукова назва виду формується латинською мовою завдяки, де перше слово це назва **роду** (з великої літери), наприклад, бактерії виду *Klebsiella pneumoniae*.

→ Для визначення **родини** мікроорганізмів слід визначити їх **культуральні та морфологічно-тинкторіальні ознаки**.

**тинкторіальні ознаки – відношення мікроорганізмів до барвників (здатність фарбуватися).*

1. Для вивчення культуральних ознак проводять висіви на твердих спеціальних поживних середовищах з метою виділення накопичувальної культури (до 20 видів м\о). Наступним етапом є висів колоній (метод Голда, метод Дригальського) із певними специфічними ознаками на диференційно-діagnostичні середовища, до складу яких входять барвники, для отримання чистої культури мікроорганізмів. **Метою даного етапу виявлення бактеріальних чи грибкових антигенів є отримання ізольованих, типових колоній, які мають однакові культуральні ознаки.**

2. Для вивчення морфологічно-тинкторальних ознак проводять мікроскопію типових, ізольованих колоній після виконання складного фарбування. Основним методом, який застосовують у мікробіології — складне фарбування методом Грама. Тому виділені ізольовані колонії фарбують методом Грама з метою вивчення відношення барвників до клітинних стінок прокаріот. Для більш чіткого вивчення та розуміння морфологічних ознак

досліджуваних бактерій (*форма, розмір, здатність до спороутворення, розміщення спор у клітинах, наявність капсул та включень, кислотостійкість та тип джгутикування*) проводять фарбування для визначення капсул, оболонки кислотостійких м/о та ендоспориальними відомими методиками.

→ Після визначення **роду** мікроорганізмів проводять їх подальшу ідентифікацію з метою встановлення **роду та виду**. Приналежність мікробів до певного роду і виду можливо встановити після вивчення їх **фізіолого-біохімічних ознак**.

3. Для вивчення здатності мікроорганізмів до руху (фізіологічна властивість) проводять глибинний висів уколом у м'ясопептонну желатину. Надалі вивчають характер росту бактерій (по ходу уколу, тощо).

4. Для вивчення ферментативних (біохімічних) властивостей мікроорганізмів проводять ряд реакцій, що мають назву БІОХІМІЧНЕ ТИПУВАННЯ (ідентифікація).

За допомогою **біохімічного типування** вивчають:

- відношення мікроорганізмів до вуглеводів, спиртів та азоту;
- відношення мікроорганізмів до кисню, основ (лугів), тощо;
- виявлення продуктів життєдіяльності мікроорганізмів (метаболітів) у вигляді кислот, газів і спиртів;
- здатність мікроорганізмів діяти на амінокислоти, тощо;
- здатність мікроорганізмів розщеплювати білки та пептони до продуктів розпаду: індолу та сірководню (тест на утворення індолу та сірководню);
- здатність мікроорганізмів, які мають фермент уреазу, гідролізувати (розкладати) сечовину з утворенням аміаку та діоксиду вуглецю (тест на уреазну активність);
- здатність мікроорганізмів до окислення феніллендіамінових сполук до індофенолу завдяки активному ферменту оксидази (тест на оксидазну активність);

Слід зазначити, що саме ферменти — обов'язкові учасники усіх процесів, які забезпечують життєдіяльність мікроорганізмів: дихання, розмноження, живлення (харчування). Для засвоєння поживних речовин мікроорганізми, за допомогою певних груп ферментів, розкладають складні органічні компоненти на прості і засвоюють (споживають) їх. Біохімічна активність кожної бактерії є специфічною для певного виду, що і дає можливість ідентифікації. Причому, набір біохімічних реакцій для кожного виду бактерій є визначеною та специфічною (табл. 1.6).

Патогенні мікроорганізми мають строгий набір біохімічних (ферментних) реакцій. Так як в організмі хазяїна (там, де викликають хворобу) патогенетично мають конкретний механізм. В свою чергу, сапрофітні мікроби (ті, які існують за рахунок живлення мертвими речовинами навколишнього середовища) мають широкий біохімічних реакцій. Так як, для розщеплення великої кількості компонентів у навколишньому середовищі таким бактеріям (сапрофітним) необхідно використовувати усі групи ферментів.

Табл. 1.6. Диференціація деяких видів стафілококів за біохімічними властивостями

Ознака	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. saprophyticus</i>
Здатність рости в анаеробних умовах	+	+	+/-
Ріст на середовищі з 10% натрію хлориду	+	+/-	+
Ріст при :			
15°C	+	-	+
45°C	+	+	+/-
Ферментація вуглеводів до кислоти в аеробних умовах:			
-арабіноза	-	-	-
-галактоза	+	+/-	-
-ксиліт	-	-	+/-
-ксилоза	-	-	-
-лактоза	+	+/-	+/-
-маніт	+	-	+/-
-маноза	+	+/-	-
-рафіноза	-	-	-
-сахароза	+	+	+
-трегалоза	+	-	+
-фруктоза	+	+	+
Лужна фосфатаза	+	+	-
Галорунідаза	+	+/-	?
уреаза	+/-	+	+

Групи ферментів, які виділяють мікроорганізми: оксидоредуктази, трансферази, ліпази, гідролази, ізомерази, лігази.

Ферменти, які постійно утворюються в мікробній клітині-прокаріот — **конститутивні ферменти**.

Ферменти, які пов'язані з клітинним обміном (синтез відбувається у відповідь на присутність у середовищі специфічного субстрату) — **індуцибельні ферменти**.

**субстрат – спеціальний компонент, що під дією реагенту трансформується в продукт реакції.*

Для **родової та видової** ідентифікації бактерій зазвичай досліджують такі ферменти (їх наявність (активність/відсутність): оксидаза, каталаза, уреаза, протеаза, амілаза та інвертаза.

Для **виявлення наявності/відсутності активності певного типу ферменту** у мікробіології зазвичай використовують індикаторні тести та середовища — **діагностичні набори** (Рис. 1.25). Такі набори виготовлені для

ідентифікації різних родів мікроорганізмів, для кожного роду набір з тест-реагентами специфічний.

▪ **СІП (системи індикаторні паперові)** — хроматографічний папір у вигляді дисків або смужок, на які нашарований певний субстрат з індикатором (стабілізований полівініловим спиртом).

▪ **Системи індикаторні рідкі** — аналогічні паперовим, але субстрат з індикатором знаходиться у розчині.

▪ **Використання специфічних індикаторних диференційно-діагностичних поживних середовищ:**

○ **«Строкатий ряд» Гісса** — сукупність напіврідких середовищ (середовища Гісса), які дозволяють диференціювати мікроорганізми за здатністю до ферментації цукрів і спиртів. Висів проводять методом уколу. Індикатором у середовищі Гісса є бромкрезоловий пурпуровий. Залежно від кількості цукрів і спиртів розрізняють «короткий строкатий» ряд Гісса та звичайний строкатий» ряд (рис. 1.25 – А, Б).

○ **Середовище Кліглера (агар Кліглера)** — диференційно-діагностичне середовище, яке використовують для ідентифікації міжвидової ідентифікації мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae*. Вивчають здатність мікробів ферментувати лактозу, глюкозу з утворення газу та сірководню.

○ **Середовище Сімонса (цитратний агар)** — диференційно-діагностичне середовище, на якому здатні рости лише цитрат-позитивні мікроби (використовувати цитрат в якості єдиного джерела вуглецю), тощо.

Кожен діагностикум (СІП; специфічні індикаторні диференційно-діагностичні поживні середовища) має свою чітку інструкцію, методику виконання, рекомендації до використання та інтерпретацію отриманих результатів (рис. 1.25 – Б).

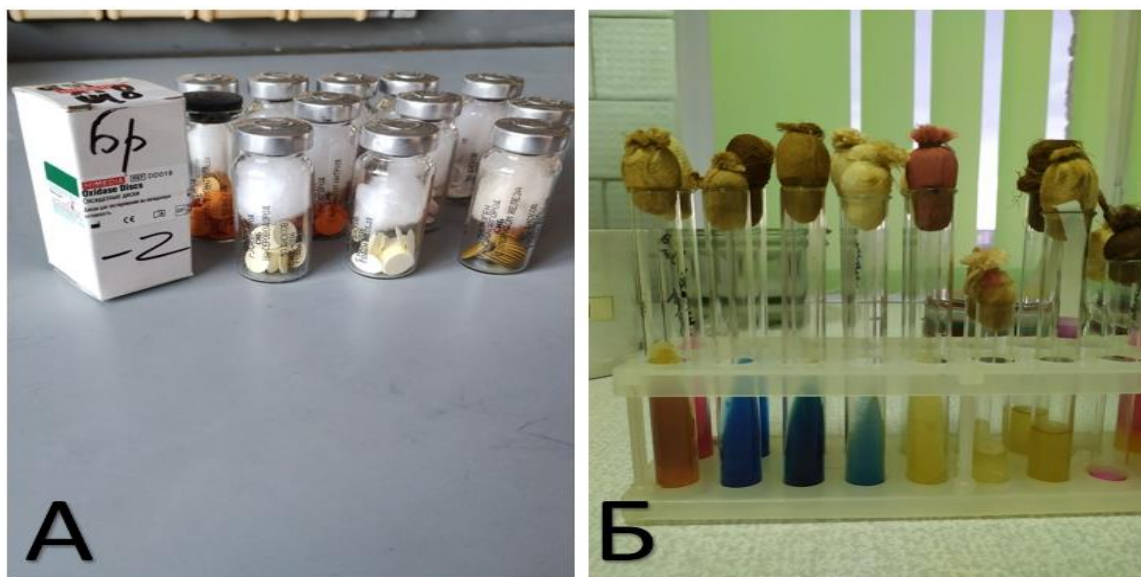


Рис. 1.25. Діагностичні набори для ідентифікації бактерій: А – СІБ; Б – специфічні індикаторні диференційно-діагностичні поживні середовища

Таким чином, при підозрі на той чи інший вид мікроорганізмів лікар-бактеріолог підбирає такі методи ідентифікації (діагностикуми), які будуть зручними для використання саме у момент досліджень.

5. Після ідентифікації родової та видової приналежності досліджуваних мікроорганізмів проводять їх висів на поживне середовище загального призначення (МПА (м'ясо-пептонний агар; АМХ (Агар Мюллера-Хінтона) у пробірку на скошений агар для подальшого накопичення та зберігання культури.

Визначення деяких фізіологічних (біохімічних) властивостей бактерій

Визначення фізіологічних властивостей мікроорганізмів є важливим етапом у процесі їх ідентифікації та біохімічного типування. Одними з найбільш поширених методів є визначення оксидазної та каталазної активності, які дозволяють виявити наявність специфічних ферментів у мікроорганізмах, що мають велике значення для їх життєдіяльності та адаптації до навколишнього середовища.

Тест на оксидазну активність мікроорганізмів

Для дихання деякі бактерії використовують фермент цитохромоксидазу, або індофенолоксидазу. В ході оксидазного тесту в результаті окисно-відновних реакцій за участю мікробної оксидази утворюється індофенол, речовина синього кольору.

На діагностикум (диск для визначення оксидази) втирають досліджувану бактеріологічну культуру, взяту з пробірки або чашки Петрі.

ВАЖЛИВО! Обов'язково слід використовувати платинову петлю чи скляну паличку.

Позитивний результат - місце контакту диска і культури синіє протягом 60 секунд (рис. 1.26 – А), негативний результат – зміни на поверхні диска відсутні (рис. 1.26 – Б),

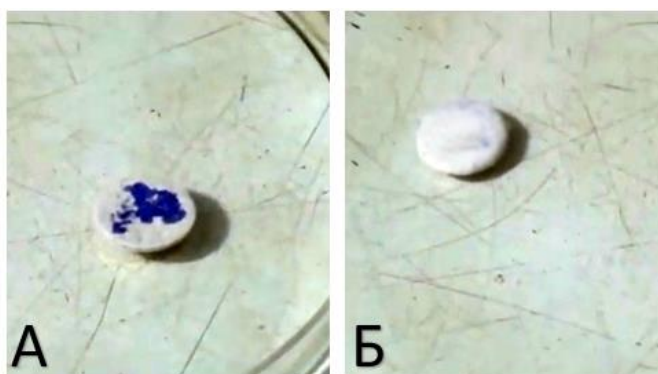


Рис. 1.26. Тест на оксидазну активність: А – позитивний результат;
Б – негативний результат

Цей тест дозволяє виявити аеробні бактерії, зокрема такі роди, як *Pseudomonas* та *Neisseria*, у яких цитохромоксидаза є важливим компонентом

дихальної ланцюга. Позитивний результат тесту, що проявляється у вигляді синього забарвлення на діагностикумі, свідчить про наявність оксидази у бактерії.

Тест на каталазну активність мікроорганізмів

Деякі мікроорганізми здатні продукувати фермент каталазу (група оксиредуктаз), який здійснює розщеплення 3% H_2O_2 до води та кисню.

Послідовність проведення тесту:

1. На предметне скло наносять досліджувану культуру м/о;
2. Вносять краплю 3% розчину перекису водню;

Позитивна реакція: утворення бульбашок кисню, внаслідок наявності ферменту каталази, який розщеплює перекис водню на воду і кисень (рис. 1.27 – А).

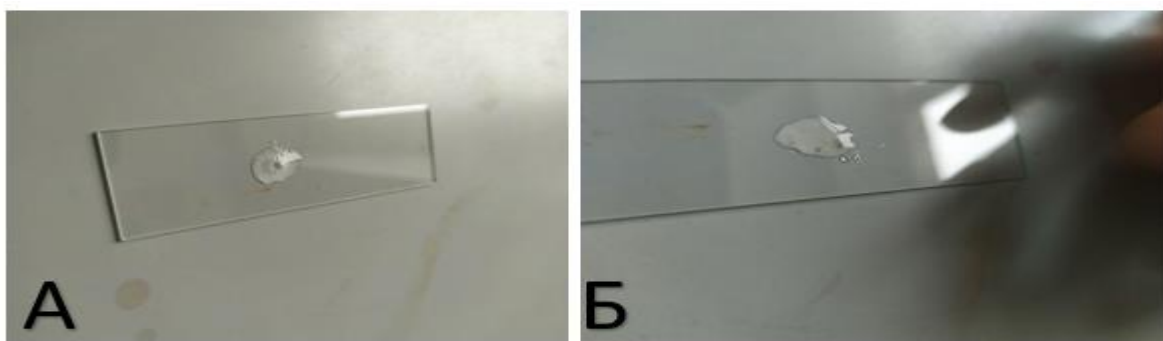


Рис. 1.27. Тест на активність ферменту каталази: А – позитивний результат; Б – негативний результат

Фермент каталаза присутній у багатьох аеробних бактерій, таких як *Staphylococcus* і *Bacillus*, та важливий для захисту клітин від оксидативного стресу. Позитивний результат тесту, що проявляється у вигляді бульбашок кисню при контакті мікробної культури з перекисом водню, є свідченням наявності каталази в клітинах бактерії. Відсутність бульбашок вказує на негативний результат, що може бути характерним для анаеробних або факультативно анаеробних мікроорганізмів (рис.1.27 – Б).

Тести, які дозволяють виявити фізіологічні властивості мікроорганізмів є важливим інструментом у біохімічному типуванні та ідентифікації бактерій, і сприяють точній діагностиці хвороби і вивченню мікробних популяцій при існуванні їх у різних середовищах.

Контрольні запитання та завдання

1. Які лабораторні бактеріологічні підходи можуть бути використані для отримання чистих культур мікроорганізмів?
2. Які основні етапи включає процедура ізоляції та очищення культури бактерій?
3. Як методи аерації впливають на ріст бактерій в процесі їх ідентифікації?

4. Які мікробіологічні середовища застосовуються для виділення специфічних бактерій із зразків від тварин?
5. Які основні принципи використання селективних та диференційних середовищ для ідентифікації мікроорганізмів?
6. Що таке тест на оксидазну активність, і яку роль він відіграє в ідентифікації бактерій?
7. Які фактори можуть впливати на точність результатів тесту на оксидазну активність?
8. Як проводиться тест на каталазну активність, і для яких бактерій цей тест є характерним?
9. Яке значення має визначення ферментативної активності бактерій у ветеринарній мікробіології?
10. Як тест на оксидазну активність допомагає в диференціації аеробних мікроорганізмів?
11. Які мікроорганізми можуть дати позитивний результат на тест на каталазну активність?
12. Як можна використовувати біохімічні тести для диференціації бактерій роду *Staphylococcus*?
13. Яка роль тесту на ферментативну активність при визначенні антибіотикорезистентності бактерій?
14. Як мікробіологічні тести використовуються для діагностики захворювань у сільськогосподарських тварин?
15. Як змінюються фізіологічні властивості бактерій при переході до анаеробних умов?
16. Як визначити в лабораторії чутливість бактерій до антибіотиків за допомогою біохімічних тестів?
17. Яким чином біохімічні властивості бактерій можуть допомогти в класифікації патогенних мікроорганізмів?
18. Що таке тест на ферментативну активність, і як він використовується для виявлення мікробних штамів у ветеринарії?
19. Як визначення чутливості бактерій до різних температур може допомогти в їх ідентифікації?
20. Які переваги та обмеження має використання біохімічних тестів у порівнянні з молекулярно-генетичними методами для ідентифікації бактерій?
21. Як застосування молекулярних методів, таких як ПЛР, покращує точність ідентифікації мікроорганізмів порівняно з традиційними методами?
22. Які морфологічні ознаки допомагають розрізняти грампозитивні та грамнегативні бактерії під час ідентифікації?
23. Які умови культивування (температура, рН, поживне середовище) найчастіше використовуються для вирощування мікроорганізмів з метою їх подальшої ідентифікації?
24. Як впливає присутність специфічних ферментів у мікроорганізмах на їх ідентифікацію і диференціацію серед інших видів?

РОЗДІЛ 2. ВЕТЕРИНАРНА ВІРУСОЛОГІЯ

Тема 1. Характеристика клітинних та неклітинних інфекційних агентів. Загальна характеристика вірусологічної лабораторії Правила техніки безпеки при роботі з вірусологічним матеріалом

Деякі відмінності між вірусами та бактеріями

1. Структура

Віруси — неклітинні структури. Тобто їх склад характеризується наявністю генетичного матеріалу (ДНК або РНК), оточеного білковою оболонкою (капсидом), іноді доповненою ліпідною оболонкою.

Бактерії — мікроорганізми, які складаються з клітини (клітинні мікроорганізми). Кожна клітина, окрім генетичного матеріалу (нуклеоїд), має інші компоненти (клітинна стінка, мембрана, цитоплазма і генетичний матеріал у вигляді кільцевої молекули ДНК (нуклеоїда) тощо), для забезпечення життєдіяльності.

2. Розмір

Віруси — розміри варіюються від 20 до 300 нанометрів.

Бактерії — розмір становить приблизно 1-10 мікрометрів.

3. Існування у навколишньому середовищі

Віруси — облигатні паразити. Віруси не можуть існувати без клітини господаря. Дані неклітинні форми не мають власного механізму для виробництва енергії або синтезу білків.

Бактерії — здатні самотійно існувати у навколишньому середовищі. Мають механізми синтезу енергії, білка для власних потреб.

4. Розмноження

Віруси — не здатні розмножувати поза клітиною (розмножуються тільки всередині клітин господаря). Вони вводять свій генетичний матеріал у клітину і використовують її ресурси для виробництва нових вірусних частинок.

Бактерії — здатні самотійно розмножуватися поза клітиною.

5. Чутливість до лікарських засобів

Віруси — для знешкодження вірусів використовують противірусні препарати, які спрямовані на блокування розмноження вірусу в інфікованих клітинах.

Бактерії — зазвичай використовують антибіотики та інші хіміотерапевтичні засоби, дія яких спрямована на порушення життєво-важливих процесів в клітинах бактерій, такі як синтез клітинної стінки, білків та генетичного матеріалу.

6. Роль в біоценозах

Віруси — є *патогенами*, існують, навіть, віруси бактерій (фаги). Деякі віруси використовують з терапевтичною метою.

Бактерії — відіграють важливу роль в екосистемах. Багато з них корисні (пробіотики): беруть участь у розкладанні органічних речовин, фіксації азоту,

травленні та інших біологічних процесах. Але є й патогенні бактерії, що спричиняють хвороби.

Загальна характеристика вірусологічної лабораторії. Правила техніки безпеки при роботі з вірусологічним матеріалом

Вірусологічна лабораторія — це спеціалізований медичний або науковий підрозділ, що займається дослідженням вірусів, їхніх властивостей, механізмів інфікування та взаємодії з організмом людини або тварини. Лабораторії такого типу поділяються на кілька підрозділів, кожен з яких виконує специфічні функції для забезпечення повного циклу дослідження та діагностики вірусних інфекцій.

Характеристика підрозділів у вірусологічній лабораторії

Сучасна вірусологічна лабораторія є складною структурою, що включає кілька ключових підрозділів, кожен з яких виконує специфічні функції. Мінімальною вимогою до такої лабораторії є наявність діагностичного відділу, де проводять тестування зразків на наявність вірусів за допомогою методів, таких як ПЛР (полімеразна ланцюгова реакція), LAMP та серологічні тести. Крім того, важливим є відділ біобезпеки, обладнаний герметичними боксами, системами очищення повітря та засобами індивідуального захисту для персоналу. Ці підрозділи забезпечують безпечну роботу з потенційно небезпечними вірусними агентами та запобігають їх поширенню за межі лабораторії.

В найсучасніших лабораторіях світу функціонують також спеціалізовані підрозділи, які займаються геномним секвенуванням вірусів, що дозволяє відстежувати їх мутації та створювати бази даних для епідеміологічного моніторингу (табл. 2.1). Інший важливий напрямок — відділ дослідження антивірусних препаратів і вакцин, де за допомогою високопродуктивних технологій перевіряють ефективність нових лікарських засобів. Такі лабораторії часто мають відділ штучного інтелекту та аналізу великих даних, який використовується для прогнозування поширення вірусів та створення моделей для оптимізації заходів боротьби з епідеміями.

Персонал, який працює у вірусологічній лабораторії, повинен мати високий рівень кваліфікації та відповідну підготовку. До складу команди входять вірусологи, мікробіологи, біоінформатики, епідеміологи та технічний персонал. Ключовими вимогами є знання методів молекулярної діагностики, навички роботи з високоточним обладнанням та розуміння принципів біобезпеки. Важливим аспектом є регулярне навчання персоналу, оскільки методи діагностики та дослідження постійно вдосконалюються. Крім того, співробітники повинні суворо дотримуватися протоколів безпеки, адже робота з вірусами, особливо високопатогенними, вимагає уважності та дисципліни. Від рівня компетенції персоналу залежить якість результатів досліджень, тому

провідні лабораторії світу значну увагу приділяють професійному розвитку та атестації своїх співробітників.

Табл. 2.1. Характеристика підрозділів сучасної вірусологічної лабораторії

Підрозділ	Функції	Методи
Діагностичний підрозділ	Діагностика вірусних інфекцій, виділення вірусів, їхня ідентифікація, визначення вірусного навантаження	ПЛР, ІФА, серологічні дослідження, швидкі тести на антигени
Культивування вірусів	Культивування вірусів для досліджень та підготовки до виготовлення вакцин	Вирощування на клітинних культурах, інфікування лабораторних тварин, інкубація в курячих ембріонах
Підрозділ молекулярної вірусології	Дослідження генетичного матеріалу вірусів, їхня геномна структура, мутації, шляхи еволюції	Секвенування геному, ПЛР-аналіз, аналіз генетичних варіацій, CRISPR
Серологічний підрозділ	Вивчення взаємодії вірусів із імунною системою, оцінка імунної відповіді	ІФА, реакція нейтралізації, радіоімунний аналіз, флюоресцентні антитіла
Епідеміологічний підрозділ	Аналіз поширення вірусів серед населення, визначення шляхів передачі, контроль епідемій	Збір та аналіз статистичних даних, математичне моделювання, моніторинг вірусної активності
Науково-дослідний підрозділ	Фундаментальні дослідження вірусів, розробка вакцин, терапевтичних засобів, нових методів діагностики	Молекулярно-біологічні та біохімічні методи, створення вірусних векторів, дослідження інтерферонового та інших механізмів
Підрозділ із розробки вакцин	Створення, тестування та вдосконалення вірусних вакцин	Культивування вірусів, тестування на тваринах, клінічні випробування, оцінка імуногенності та безпечності вакцин
Підрозділ біобезпеки	Забезпечення безпеки роботи з вірусами, особливо небезпечними патогенами	Міжнародні стандарти біобезпеки, закриті системи культивування вірусів, утилізація небезпечних матеріалів

В Україні вірусологічні лабораторії класифікують на три основні категорії:

Базові лабораторії – це загальні або універсальні лабораторії, які використовуються в освітніх закладах, медичних установах, лікарнях та університетах. Вони працюють із збудниками інфекцій III групи, а також із вірусами рослин і бактеріями. До цієї групи належать патогени, які здатні викликати захворювання у людей, але, як правило, не мають високого рівня поширення. Такі інфекції зазвичай піддаються лікуванню та контролю, але можуть бути небезпечними для осіб зі слабкою імунною системою або у спеціалізованих медичних закладах.

Режимні лабораторії – це ізольовані лабораторії або лабораторії з контрольованим середовищем. У таких лабораторіях працюють зі збудниками інфекцій II групи. Це патогени, які можуть спричиняти захворювання, але зазвичай не становлять високого ризику для життя при своєчасному медичному догляді. Зазвичай такі інфекції можна контролювати і лікувати за допомогою стандартних методів, але вони все ж можуть нести певний ризик для здоров'я.

Лабораторії особливого режиму – ці лабораторії призначені для роботи з найбільш небезпечними патогенами I групи, які становлять значний ризик для здоров'я людини. Такі віруси часто мають високу летальністю, здатні швидко передаватися і зазвичай не мають ефективних методів лікування або профілактики. Робота з цими патогенами вимагає спеціальних умов ізоляції та високого рівня безпеки.

Рівні біобезпеки в лабораторіях

Існує **чотири рівні** біологічної безпеки, кожен з яких передбачає використання первинних і вторинних бар'єрів, а також дотримання специфічних процедур.

При визначенні груп ризику для збудників враховуються такі фактори:

- рівень патогенності та вірулентності,
- стійкість у навколишньому середовищі,
- коло потенційних хазяїв,
- наявність переносників інфекції,
- резистентність до лікарських препаратів і дезінфікуючих засобів,
- шляхи передачі та заразність викликаних хвороб.



Згідно даної класифікації розподіл лабораторій та їх приміщень відповідає 4 класам, за рівнем біобезпеки



*Лабораторії класу **BSL-1***

Лабораторії першого рівня біобезпеки створені для проведення базових мікробіологічних або вірусологічних досліджень. Вони обладнані стандартним лабораторним устаткуванням та основними допоміжними приладами. Робота в таких лабораторіях виконується у спеціальному робочому одязі, як-от халати чи костюми, але не потребує додаткових засобів індивідуального захисту. Для дезінфекції використовуються звичайні хімічні засоби, що забезпечують належний рівень санітарії.

*Лабораторії класу **BSL-2***

Лабораторії рівня BSL-2 мають посилені заходи безпеки порівняно з BSL-1. Вони обладнані попереджувальними знаками, а персонал зобов'язаний використовувати засоби індивідуального захисту. У таких лабораторіях

встановлюють шафи біологічної безпеки першого або другого рівня для роботи з матеріалами. Відходи, які утворюються, піддаються обов'язковій стерилізації в автоклавах за межами лабораторії, а приміщення регулярно дезінфікуються спеціальними хімічними засобами. Рекомендовано, щоб система вентиляції приміщень була контрольованою. Доступ до лабораторій цього рівня обмежений, а всі операції та відвідування ретельно фіксуються у відповідній документації.

Лабораторії класу BSL-3

Лабораторії BSL-3 створені для роботи з патогенами високого рівня ризику і мають комплексну архітектуру, що включає три основні сегменти: робочі лабораторні приміщення, технічні зони на цокольному поверсі та технічний простір на горищі. Цоколь використовується для очищення та дезактивації рідких і твердих відходів, тоді як горище відповідає за стерилізацію повітря на вході та виході з приміщення. Лабораторні кімнати розташовані між цими зонами, забезпечуючи зручну комунікацію для роботи. Окрім базових заходів безпеки, характерних для BSL-2, лабораторії рівня BSL-3 обладнані системою шлюзових дверей із цифровими замками, які запобігають витоку патогенів. Доступ до приміщень здійснюється через спеціальні пропускники з кодовим доступом і зоною для повної зміни одягу, включно з душовими кабінами. Повітря фільтрується подвійною системою очищення, а відпрацьовані матеріали стерилізуються автоклавами прямо на місці. Крім того, використовується фізична та хімічна дезактивація для стічних вод і відходів. Для підвищення рівня контролю за безпекою часто застосовуються системи моніторингу, такі як оглядові вікна та камери відеоспостереження, що забезпечують цілодобовий контроль за роботою в лабораторії.

Лабораторії класу BSL-4

Лабораторії BSL-4, що забезпечують найвищий рівень біологічної безпеки, зазвичай розташовуються в межах зон BSL-3 або в окремих спеціалізованих будівлях. Вони відповідають усім стандартам BSL-3, але мають додаткові системи підтримки та життєзабезпечення. Для роботи з високонебезпечними патогенами використовуються спеціалізовані костюми біологічного захисту, які забезпечуються через інтегровані комунікаційні системи. Ці лабораторії обладнані вдосконаленими системами моніторингу, зокрема розширеним відеоспостереженням і модернізованими автоклавами для стерилізації. Їх особливістю є наявність двох типів душових: хімічна духова, де проводиться дезінфекція перед зняттям костюма, і звичайна для гігієнічних потреб після роботи. Душові кімнати з'єднані між собою через систему пневматичних і шлюзових дверей, що гарантує безпечний вихід із робочої зони та мінімізацію ризику зараження.

Техніка безпеки при роботі з інфекційним вірусологічним матеріалом

Проектування та оснащення вірусологічних лабораторій повинно здійснюватися з урахуванням ключових аспектів безпеки (табл. 2.2). Так як увесь патологічний матеріал, що потрапляє до лабораторії вважають інфекційним.

Табл. 2.2. Основні аспекти безпеки, яких слід дотримуватися під час роботи у вірусологічній лабораторії

Категорія	Опис заходів безпеки
Особиста захисна екіпіровка (ОЗЕ)	- Носіння лабораторного халата, захисного костюма (біозахисного), маски або респіратора, окулярів або щитка. - Захисні рукавички, спеціальні чоботи або бахіли.
Робоче середовище	- Використання ламінарних боксів (кабінетів біологічної безпеки) для роботи з інфекційним матеріалом. - Забезпечення адекватної вентиляції та повітряних фільтрів HEPA.
Підготовка та стерилізація інструментів	- Стерилізація обладнання та інструментів до і після використання (автоклавування, хімічна дезінфекція).
Утилізація відходів	- Всі біологічні відходи поміщаються в спеціальні контейнери та знищуються відповідно до вимог.
Поведінка персоналу	- Обмежений доступ до лабораторії. - Заборона прийому їжі, пиття, використання косметики та зберігання особистих речей у зоні роботи з патогенами.
Дезінфекція робочих поверхонь	- Регулярне очищення робочих місць дезінфікуючими розчинами до та після роботи.
Аварійні процедури	- Оперативні дії у випадку аварійної ситуації (розливу матеріалу, пошкодження контейнерів).
Навчання персоналу	- Регулярне навчання та інструктаж з техніки безпеки при роботі з біологічно небезпечними матеріалами.

Головними принципами техніки безпеки у вірусологічних лабораторіях можна узагальнити в три основні аспекти.

Охорона здоров'я працівників: це включає використання відповідних засобів індивідуального захисту, таких як халати, рукавички, маски, щитки або спеціалізовані костюми біобезпеки. Також важливим є навчання персоналу правильному використанню цих засобів та дотриманню встановлених стандартів роботи з біологічно небезпечними матеріалами.

Забезпечення безпеки середовища: необхідно правильно організувати систему вентиляції, установити біозахисні шафи та ефективні фільтри для очищення повітря в лабораторії. Дезінфекція робочих поверхонь, інструментів і загального простору є обов'язковою частиною щоденної діяльності.

Безпечне управління відходами: усі лабораторні відходи, включаючи рідкі та тверді матеріали, повинні проходити належну обробку, наприклад,

стерилізацію або дезінфекцію, до того, як будуть утилізовані. Це допомагає мінімізувати можливі ризики розповсюдження патогенних організмів.

Також, окрім, основних принципів та аспектів роботи у вірусологічних лабораторіях, необхідно дотримуватися правил техніки безпеки при роботі з інфекційним вірусологічним матеріалом.

Правила техніки безпеки при роботі з вірусологічним матеріалом у вірусологічних лабораторіях

1. **Обов'язковий контроль доступу** — у лабораторії з патогенними матеріалами доступ дозволяється лише уповноваженому персоналу, який пройшов спеціалізоване навчання.

2. **Індивідуальний захист** — персонал повинен використовувати засоби індивідуального захисту, включаючи халати, рукавички, маски, захисні окуляри або екрани, а також костюми біозахисту за потребою.

3. **Перед початком роботи** — співробітники повинні перевіряти справність засобів індивідуального захисту, що використовуються, а також впевнитись у працездатності обладнання для виконання досліджень.

4. **Навчання персоналу** — усі співробітники повинні пройти навчання з техніки безпеки, включаючи правила роботи з інфекційними матеріалами та дії у разі надзвичайної ситуації.

5. **Очищення та дезінфекція** — регулярне очищення робочих поверхонь та обладнання засобами, що мають ефективний антивірусний та антисептичний ефект, є обов'язковим.

6. **Вентиляція** — лабораторії повинні бути оснащені ефективною системою вентиляції, що забезпечує утримання інфекційних матеріалів в межах приміщення.

7. **Робота в біологічних шафах** — для маніпуляцій з вірусологічним матеріалом використовувати біологічні шафи, що забезпечують герметичність та контроль за умовами стерильності.

8. **Робота з матеріалом через спеціальні контейнер** — патологічні матеріали повинні транспортуватися та зберігатися у герметичних контейнерах з відповідною маркуванням.

9. **Заборона на їжу та напої** — у лабораторіях категорично заборонено вживати їжу та напої, щоб уникнути випадкового потрапляння патогенів у організм.

10. **Зберігання матеріалів** — усі вірусологічні зразки повинні зберігатися в спеціалізованих холодильниках або морозильниках, оснащених системами контролю температури.

11. **Запобігання контакту з очима та обличчям** — не можна торкатися обличчя, очей або волосся під час роботи з патогенним матеріалом.

12. **Автоматизовані системи для роботи з вірусами** — використовувати автоматизовані системи, де це можливо, для мінімізації прямого контакту з патогенами.

13. Захист від аерозолів — при роботі з матеріалом, який може утворювати аерозолі, необхідно використовувати спеціальне обладнання, що запобігає їх поширенню в повітря.

14. Персоналізація обліку матеріалів — кожен зразок вірусного матеріалу має бути чітко ідентифікований та внесений до відповідного облікового журналу.

15. Технічне оснащення — лабораторія повинна мати спеціалізоване обладнання, яке відповідає стандартам безпеки і дозволяє ефективно працювати з вірусами.

16. Протоколи роботи з вірусами — для кожного типу досліджень та маніпуляцій з патогенними матеріалами повинні бути розроблені та затверджені протоколи, що містять інструкції щодо безпеки.

17. Дії у разі витоку — у разі аварії або витоку матеріалу необхідно негайно припинити роботу, ізолювати заражену зону та застосувати екстрені заходи.

18. Спостереження за здоров'ям персоналу — персонал повинен регулярно проходити медичні обстеження та моніторинг для виявлення можливих ознак інфекційних захворювань.

19. Утилізація відходів — всі вірусологічні відходи повинні бути правильно знешкоджені шляхом автоклавування або хімічної обробки до їх утилізації.

20. Транспортування зразків — для перевезення вірусних зразків повинні використовуватися спеціальні транспортні контейнери з необхідною документацією для контролю.

21. Робота з відкритими контейнерами — під час роботи з відкритими контейнерами необхідно строго дотримуватись норм та процедур, щоб мінімізувати ймовірність витоку матеріалу.

22. Регулярні перевірки обладнання — лабораторне обладнання повинно проходити регулярні технічні перевірки для забезпечення належного рівня безпеки.

23. Особиста гігієна — перед входом до лабораторії необхідно ретельно мити руки та дезінфікувати всі інструменти, які будуть використовуватися.

24. Шлях переміщення в лабораторії — робочі шляхи для персоналу повинні бути чітко визначені, щоб уникнути випадкового контакту з зараженими матеріалами

25. Використання багатократних захисних елементів — для особливо небезпечних маніпуляцій повинні використовуватись багаторазові захисні елементи, включаючи спеціалізовані костюми для біологічного захисту.

26. Контроль повітряних потоків — повітря в лабораторії повинно оброблятися через фільтри високого класу, щоб запобігти розповсюдженню інфекцій.

27. Управління зразками — під час обробки зразків необхідно суворо контролювати їх ідентифікацію, щоб уникнути змішування чи переплутування матеріалів.

28. Дії при порушенні правил безпеки — у разі виявлення порушень правил безпеки персонал має негайно повідомити керівництво та вжити всіх необхідних заходів для усунення ризику.

29. Безпека при роботі з інфекційними вірусами в умовах підвищеного ризику — для роботи з особливо небезпечними вірусами (наприклад, вірусами, що передаються повітряно-крапельним шляхом) слід використовувати додаткові заходи безпеки, включаючи спеціальні системи для контролю тиску та фільтрації повітря.

30. Зберігання документації — всі документи, що стосуються роботи з вірусологічним матеріалом, повинні зберігатися у захищених архівах і бути доступні для перевірок.

Одним із правил при роботі у вірусологічній лабораторії є правильне зберігання документації (пункт 30). Документи, де фіксуються основні аспекти роботи відносять до:

Журнали обліку матеріалів — для документування надходження, зберігання, використання та утилізації зразків патогенів.

Протоколи досліджень — для реєстрації методів, ходу та результатів проведених експериментів.

Журнали контролю безпеки — для перевірки виконання вимог щодо безпеки при роботі з небезпечними матеріалами.

Картки обліку біологічних зразків — для деталізованої інформації про кожен зразок, його ідентифікацію та обробку.

Документація з транспортування — для фіксації даних про транспортування матеріалів, забезпечуючи їх правильне зберігання і переміщення.

Реєстрація утилізації відходів — для обліку всіх заходів, пов'язаних з дезінфекцією та утилізацією відходів.

Ці документи забезпечують точний контроль за обігом патогенних матеріалів, гарантують дотримання стандартів біобезпеки та дозволяють проводити ефективний аудит лабораторної діяльності.

Отже, вірусологічні лабораторії, зокрема ті, що працюють з високонебезпечними патогенами, повинні бути оснащені сучасним обладнанням, яке забезпечує безпеку персоналу, точність досліджень і ефективне управління ризиками. Водночас дотримання суворих правил техніки безпеки є невід'ємною частиною лабораторної роботи. Забезпечення належного захисту, контроль навколишнього середовища та правильне поводження з патогенними матеріалами є необхідними для збереження здоров'я персоналу та запобігання поширенню інфекцій.

Тому, для досягнення високих стандартів безпеки та наукових результатів, важливо постійно удосконалювати методи роботи та контролю, застосовувати інноваційні технології та забезпечувати безперервне навчання персоналу.

Контрольні запитання та завдання

1. Характеристика клітинних та неклітинних інфекційних агентів
2. Чим відрізняються клітинні та неклітинні інфекційні агенти за структурою і способом розмноження?
3. Які основні групи клітинних інфекційних агентів, і які особливості їх патогенності?
4. Як віруси, як неклітинні агенти, взаємодіють із клітинами-господарями на молекулярному рівні?
5. Чим відрізняються патогенні властивості вірусів від патогенних властивостей бактерій?
6. Які відмінності в реплікації клітинних і неклітинних агентів, що дозволяють ідентифікувати їх у лабораторії?
7. Як імунна система реагує на клітинні інфекційні агенти порівняно з вірусами?
8. Яку роль відіграють бактеріофаги як неклітинні інфекційні агенти у ветеринарії?
9. Як діють токсини клітинних агентів, порівняно з дією вірусних інфекцій на організм?
10. Яке обладнання є обов'язковим для роботи у вірусологічній лабораторії?
11. Які класифікації вірусів проводять у вірусологічній лабораторії та на якій основі?
12. Як забезпечується стерильність у вірусологічній лабораторії для запобігання контамінації?
13. Чому важливо використовувати контрольні зразки у вірусологічних дослідженнях?
14. Як відбувається зберігання зразків вірусів у вірусологічній лабораторії для збереження їх активності?
15. Які вимоги висуваються до систем вентиляції та фільтрації повітря у вірусологічних лабораторіях?
16. Які показники ефективності та безпеки необхідно контролювати у вірусологічній лабораторії?
17. Правила техніки безпеки при роботі з вірусологічним матеріалом
18. Які засоби індивідуального захисту обов'язково використовуються при роботі з вірусами?
19. Які правила поводження із забрудненими інструментами та матеріалами у вірусологічній лабораторії?
20. Які протоколи дезінфекції та знезараження використовуються для очищення робочих місць у вірусологічних лабораторіях?
21. Які основні етапи дій у разі випадкового зараження або травми під час роботи з вірусологічним матеріалом?
22. Які методи утилізації відходів, що містять вірусологічний матеріал, забезпечують безпеку персоналу та довкілля?

Тема 2. Методи інактивації вірусів у лабораторних умовах

Алгоритм обробок об'єктів забруднених вірусами

Знищення та інактивація вірусів — це процеси, спрямовані на ліквідацію або припинення активності вірусів для запобігання їх поширенню (табл. 2.3).

Табл. 2.3. Основні методи знищення та інактивації вірусів

Метод	Опис	Приклад використання
Фізичні методи		
Термічна обробка	Висока температура руйнує структуру вірусів.	Автоклавування (121°C, 15-30 хв.), сухе тепло (160-180°C, 1-2 год.)
Ультрафіолетове випромінювання	УФ-промені пошкоджують ДНК/РНК вірусів, інактивуючи їх.	УФ-лампи для стерилізації лабораторій
Гамма- та рентгенівське випромінювання	Руйнують генетичний матеріал вірусів.	Стерилізація медичних інструментів
Хімічні методи		
Хлорвмісні засоби	Окислюють та руйнують віруси на поверхнях.	Гіпохлорит натрію для знезараження поверхонь
Спирти (етанол, ізопропанол)	Руйнують ліпідну оболонку вірусів.	Антисептики для шкіри та дезінфекції поверхонь
Перекис водню	Окислює білкові структури вірусів.	Обробка медичного обладнання та поверхонь
Формальдегід, глутаровий альдегід	Денатурують білки вірусів та знищують їх.	Стерилізація інструментів у медичній практиці
Детергенти	Руйнують ліпідну оболонку вірусів.	Очищення та дезінфекція поверхонь
Біологічні методи		
Вакцини та антитіла	Стимулюють імунну відповідь для нейтралізації вірусів в організмі.	Вакцинація проти вірусних інфекцій
Вірусні інгібітори	Блокують реплікацію вірусів на рівні клітин.	Противірусні препарати (інгібітори протеаз, полімераз)
Інші методи		
Фільтрація	Фізичне видалення вірусів із рідин через фільтри з дрібним поровим розміром.	Фільтрація лабораторних розчинів
pH-обробка	Екстремальні pH-значення руйнують віруси.	Використовується у промисловій дезінфекції

Фізичні методи знищення та інактивації вірусів полягають у використанні фізичних факторів, таких як 1. температура, 2. випромінювання

або 3. механічні впливи, для руйнування вірусних структур або пригнічення їх активності. Вибір методу залежить від типу вірусу, середовища його існування та специфічних умов використання (табл. 2.4). Фізичні методи інактивації вірусів слугують інструментами для дезінфекції поверхонь, повітря в лабораторних умовах, медичних інструментів та рідин.

Табл. 2.4. Основні фізичні методи знищення та інактивації вірусів

Метод	Механізм дії	Застосування
Термічна обробка	Високі температури руйнують вірусні білки та нуклеїнові кислоти. Низькі температури пошкоджують частинки під час заморожування і розморожування.	Автоклавування, сухе тепло (матеріали, що не переносять вологи), заморожування (не знищує віруси повністю).
Ультрафіолетове випромінювання	УФ-С промені ушкоджують ДНК/РНК вірусів, перешкоджаючи їхній реплікації.	Знезараження поверхонь, повітря, води. Не проникає через тверді та непрозорі матеріали.
Гамма- та рентгенівське випромінювання	Іонізуюче випромінювання руйнує нуклеїнові кислоти вірусів.	Стерилізація медичних інструментів, одноразових матеріалів, харчових продуктів.
Фільтрація	Видалення вірусів через фільтри з порами меншими за 0,2 мкм.	Очищення розчинів, повітря (НЕРА фільтри), води. Не знищує віруси, а лише видаляє їх.
Мікрохвильове випромінювання	Генерує тепло, яке може знищувати віруси.	Стерилізація деяких медичних відходів або матеріалів.
Осмотичний тиск	Високі концентрації солей або цукру руйнують вірусні оболонки.	Використовується рідко, наприклад, для зберігання продуктів або дезінфекції матеріалів.
Ультразвук	Коливання руйнують вірусні частинки або клітини.	Дослідницькі лабораторії: руйнування вірусів у суспензіях або водних розчинах.

Хімічні методи знищення та інактивації вірусів полягають у застосуванні хімічних речовин різних груп, які руйнують вірусні структури або інактивують їх, перешкоджаючи подальшій реплікації (табл. 2.5).

Табл. 2.5. Основні хімічні методи знищення та інактивації вірусів

Група хімічних засобів	Механізм дії	Застосування	Концентрація
Хлорвмісні засоби	Окислюють білки та нуклеїнові кислоти вірусу, порушуючи його структуру.	Дезінфекція поверхонь, обладнання, води.	0.1% для загальної дезінфекції, 0.5% для зон високого ризику.
Спирти (етанол, ізопропанол)	Руйнують ліпідну оболонку та денатурують білки вірусу.	Антисептики для шкіри, дезінфекція поверхонь і медичного обладнання.	60-80%
Перекис водню (H ₂ O ₂)	Окислює білки та нуклеїнові кислоти, призводячи до інактивації вірусів.	Дезінфекція медичних інструментів, поверхонь, повітря.	3-6%
Формальдегід та глутаровий альдегід	Денатурують білки вірусу, зв'язують білки і нуклеїнові кислоти.	Стерилізація медичного обладнання та інструментів.	Токсичні, потребують обережного використання.
Детергенти (ПАР)	Руйнують ліпідні оболонки вірусів, порушують їх структуру.	Очищення та дезінфекція поверхонь, лабораторного та медичного обладнання.	Використовуються в чистячих засобах.
Йодофори	Окислюють білки та нуклеїнові кислоти вірусу.	Обробка шкіри, дезінфекція обладнання та поверхонь.	Ефективні в низьких концентраціях.

Механічні методи знищення та інактивації вірусів полягають у застосуванні фізичних впливів (механічної дії) для видалення або руйнування вірусних частинок (табл. 2.6). На відміну від хімічних і фізичних методів, ці методи не впливають на віруси шляхом хімічної реакції чи термічного впливу, а базуються на механічній дії.

Усі види скляного та пластикового посуду, лабораторне обладнання, тіла лабораторних тварин, а також предмети, які використовуються для догляду за ними (такі як клітки, скляні банки, годівниці й підстилка), обов'язково підлягають знезараженню. Також знезаражують відпрацьовані мийні та дезінфікуючі розчини.

Перед початком використання нового посуду й обладнання їх достатньо лише промити та простерилізувати. Для устаткування, яке контактувало з вірусами, а також для приміщень лабораторних боксів і віварію, дезінфекція є першочерговою та необхідною процедурою.

Табл. 2.6. Основні механічні методи знищення та інактивації вірусів

Механічний метод	Механізм дії	Застосування
Фільтрація	Видалення вірусів з рідин або газів за допомогою фільтрів з дрібними порами (менше 0,2 мікрметра).	Очищення води, повітря та розчинів у лабораторіях, медичних установах та промисловості.
Центрифугування	Відокремлення вірусних частинок від рідини за допомогою відцентрової сили.	Концентрування вірусів та відділення їх від зразків у лабораторіях (кров, сеча, слиз).
Ультразвукове руйнування	Утворення і колапс бульбашок (кавітація), що призводить до руйнування клітин і вірусних оболонок.	Стерилізація рідин і дезінфекція поверхонь у лабораторіях.
Механічне перемішування	Руйнування вірусних частинок через механічні сили під час перемішування рідин.	Допоміжний метод при обробці вірусних зразків або рідин, використовується рідко.
Седиментація	Осідання вірусних частинок під дією сили тяжіння.	Очищення рідин від великих вірусних агрегатів, попередня обробка зразків.
Механічне подрібнення	Руйнування вірусних частинок через подрібнення біологічних тканин.	Підготовка зразків біологічних тканин, утилізація матеріалів, що можуть містити віруси.

Залежно від типу вірусу, типу поверхонь та безпеки використання у вірусології використовують такі дезінфектанти:

- етанол (70-90%) – використовується для обробки поверхонь і лабораторного обладнання, хоча деякі віруси можуть виявляти до нього стійкість;
- ізопропанол (70-80%) – подібний за дією до етанолу, часто застосовується для знезараження поверхонь та інструментів;
- гіпохлорит натрію (0,1-0,5%) – потужний антивірусний засіб, ефективний для очищення поверхонь, однак слід уникати його контакту з металом через можливість корозії;
- перекис водню (3-6%) – відомий своєю ефективністю проти багатьох вірусів, широко використовується у формі аерозолу для знезараження приміщень;
- 5-10% лізол – для дезінфекції різних видів обладнання;
- формальдегід – застосовується для дезінфекції повітря та поверхонь, хоча потребує обережного поводження через високу токсичність;
- глутаральдегід – призначений для обробки медичного та лабораторного обладнання, особливо для стерилізації інструментів, які чутливі до високих температур.

•четвертинні амонієві сполуки – підходять для дезінфекції різноманітних поверхонь та інструментів, ефективні проти широкого спектра вірусів.

5% розчин хлораміну може використовуватися у вірусологічних лабораторіях для дезінфекції всіх видів обладнання, як до, так і після проведення досліджень:

«Підготовка до експериментів»: дезінфекція марлі для покриття робочого столу, стерилізація металевих інструментів, які використовуються для розтину тварин, та очищення віварію, боксів і всіх робочих приміщень.

«Після експериментів»: дезінфекція робочого столу, гумових рукавичок, інфікованих курячих ембріонів (використовується 10% розчин), взуття на дезінфекційному килимку, металевих інструментів для розтину лабораторних тварин, трупів тварин перед автоклавуванням, а також кліток і банок, у яких перебували заражені тварини.

Після проведення дезінфекції у самому боксі (10-12 годин) обладнання обробляють згідно відповідних схем, які зазначені у кожній лабораторії. Але процес обробки повинен включати дію на віруси високих температур, лугів, кислот та тиску. Після знезараження лабораторного посуду його слід простерилізувати (сухий жар, автоклавування тощо).

Часто у вірусології використовують метод **автоклавування для стерилізації:**

- спецодягу (як до, так і після експериментів),
- сміття з кліток лабораторних тварин і трупів тварин (у контейнерах, заповнених лужним розчином),
- всіх живильних середовищ та сольових розчинів,
- миючих розчинів (содових, мильних тощо), які можуть містити вірус після обробки рук, інструментів, посуду та іншого лабораторного обладнання,
- порожнього скляного посуду перед початком роботи,
- шприців,
- термостійких гумових і пластикових предметів.

Температурний режим в автоклаві визначається додатковим тиском:

- 111-116°C при додатковому тиску 0,5-0,75 атм (40-60 хв.): віруси та активні форми мікроорганізмів усуваються, однак спори бацил зберігають свою життєздатність.
- 121-126°C при додатковому тиску 1-1,5 атм (30-45 хв.): знищується все (віруси+форми клітинних мікроорганізмів).
- 134-138°C при додатковому тиску 2-2,5 атм (10-15 хв.): знищується все (віруси+форми клітинних мікроорганізмів).

Якщо автоклавування неможливе, для знищення вірусів використовують кип'ятіння. Посуд від лабораторних тварин, гумові рукавички та металеві інструменти обробляють при температурі 105°C протягом 15-20 хвилин (оскільки віруси починають руйнуватися при температурі 80°C) після попередньої дезінфекції.

Завершальним етапом обробки об'єктів, заражених вірусами, є їхнє знищення. Після дезінфекції та автоклавування (залежно від типу об'єкту) відходи вивозять на спеціальні утилізаційні майданчики, де спалюють сміття

з кліток інфікованих тварин, тіла тварин, забруднені пластикові контейнери та інструменти, а також вату, марлю та інші матеріали, що були в контакті з вірусами.

Контрольні запитання та завдання

1. Які основні фізичні методи інактивації вірусів використовуються в лабораторних умовах?
2. Як високі температури впливають на вірусні структури, і які віруси найчутливіші до нагрівання?
3. Які хімічні засоби використовуються для інактивації різних типів вірусів, і як вони діють на вірусні капсиди?
4. Як ультрафіолетове випромінювання сприяє знищенню вірусів, і які обмеження має цей метод?
5. Які фактори слід враховувати під час використання автоклавування для інактивації вірусів у лабораторії?
6. Які віруси мають підвищену стійкість до хімічної обробки, і як підвищити ефективність дезінфекції?
7. Як вибір концентрації та часу експозиції дезінфектантів впливає на успішність інактивації вірусів?
8. Як заморожування та розморожування впливають на життєздатність вірусів?
9. Які новітні методи інактивації вірусів розробляються для використання у ветеринарній мікробіології?
10. Як діють окислювачі на вірусні геноми, і які окислювальні агенти застосовують найчастіше?
11. Як інактивація за допомогою кислот та лугів впливає на вірусні капсиди?
12. Які переваги використання озону для інактивації вірусів у порівнянні з іншими методами?
13. Чому важливо враховувати властивості вірусу, коли обирають метод інактивації?
14. Яким чином діють на віруси дезінфекційні засоби на основі етанолу та ізопропанолу?
15. Як гіпохлорит натрію використовується для інактивації вірусів, і які віруси є найбільш чутливими до цього засобу?
16. Як проводиться перевірка ефективності інактивації вірусів після обробки лабораторного матеріалу?
17. Які методи інактивації дозволяють зберегти структуру вірусів для подальших досліджень, але знищити їх інфекційність?
18. Опишіть алгоритм обробок об'єктів, забруднених вірусами.
19. Які етапи включає алгоритм обробки об'єктів, забруднених вірусами, для забезпечення біобезпеки?
20. Яким чином слід підготувати робоче місце перед обробкою об'єктів, забруднених вірусами?

21. Які індивідуальні засоби захисту необхідні для проведення безпечної дезінфекції вірусно-забруднених об'єктів?

22. Які особливості очищення пористих та непористих поверхонь, забруднених вірусами?

23. Які протоколи рекомендується використовувати для обробки лабораторного обладнання, що контактувало з вірусами?

24. Як обирати відповідний дезінфектант залежно від типу поверхні та вірусу?

25. Які методи та засоби слід використовувати для обробки лабораторного посуду після роботи з вірусами?

26. Як часто необхідно проводити контроль якості знезараження та ефективності обробки об'єктів, забруднених вірусами?

Тема 3. Відбір патологічного матеріалу при підозрі на вірусну хворобу, особливості його пакування, консервації та транспортування

Патологічний матеріал — це будь-які біологічні зразки, які отримуються від хворої або мертвої тварини з метою дослідження патологічних змін у тканинах, органах чи рідинах організму. У патологічному матеріалі містяться патологічні зміни в органах, чи рідинах ураженого організму, збудники інфекційних та паразитарних хвороб.

При **вірусних хворобах** тварин патологічний матеріал включає біологічні зразки, що використовуються для діагностики та вивчення впливу вірусів на організм тварини.

Вибір патологічного матеріалу залежить від специфіки захворювання та **тропності (тропізму)** збудника інфекції. При відборі патологічного матеріалу необхідно враховувати **місце локалізації збудника (тропна тканина)**.

Тропна тканина — це тканина, яка має найкращі умови для розвитку збудника хвороби, там, де йому найкраще здійснювати репродукцію нових віріонів.

Умовами для оптимального розвитку вірусу є 1. Специфічні рецептори прикріплюються до комплементарних білків цитоплазми мембрани хазяїна, 2. Форму білкових молекул (рецептори вірусу) може змінювати неоптимальну температуру, рН.

Вузьку спеціалізацію — здатність прикріплюватися до тканин шкіри, епітелію кишечника, дихальних шляхів, нервових клітин тощо мають збудники окремих вірусних інфекцій. Рецептори більшості вірусів універсальні, де вірус розвивається одночасно в різних тканинах — **пантропність**.

Оцінка деяких факторів, що пов'язані з тропністю, є ключовою для ефективної діагностики, профілактики та лікування хвороб у ветеринарії. Саме тому лікарю ветеринарної медицини слід звертати увагу на такі фактори:

Видова специфічність – деякі збудники або паразити специфічні для певних видів тварин, тому важливо враховувати біологічні особливості виду, з яким працює ветеринар.

Тканинна тропність – багато патогенів мають здатність уражати певні типи тканин або органів (наприклад, гепатотропні віруси, що вражають печінку, або нейротропні – нервову систему). Це знання дозволяє ветеринару прогнозувати можливі ускладнення та обирати відповідні діагностичні методи (табл. 2.7).

Табл. 2.7. Відбір патматеріалу для діагностики деяких хвороб згідно тропності вірусу

Тропність	Типи вірусів	Патологічний матеріал для дослідження	Приклади хвороб
Нейротропні (нервова система)	РНК-віруси, арбовіруси, рабдовіруси	Спинномозкова рідина, мозок, нервові тканини	Сказ, вірусний енцефаліт, вірусний менингіт
Пневмотропні (дихальна система)	Коронавіруси, параміксовіруси, аденовіруси	Секрет із носа, бронхіальний секрет, легенева тканина	Грип птахів, вірусна пневмонія
Дерматотропні (шкіра)	Поксвіруси, папіломавіруси	Зразки шкіри, пухирці, слиз, зішкріб з уражених ділянок	Віспа овець, папіломатоз великої рогатої худоби
Гепатотропні (печінка)	Флавівіруси, гепаднавіруси	Кров, біопсія печінки, фекалії	Вірусний гепатит собак, вірус гепатиту качок
Ентеротропні (шлунково-кишковий тракт)	Ротавіруси, парвовіруси, астровіруси	Фекалії, зішкріб зі слизової кишечника	Коронавірус великої рогатої худоби, парвовірусний ентерит
Кардіотропні (серце)	Парвовіруси, пікорнавіруси	Серцева тканина, кров, перикардіальна рідина	Вірусний міокардит, ентеровірусний перикардит
Нефротропні (нирки)	Аденовіруси, коронавіруси, каліцивіруси	Сеча, біопсія нирок, кров	Аденовірусний нефрит у собак, інфекційний перитоніт котів
Репродуктивна система	Артеріївіріни, герпесвіруси	Виділення із статевих органів, плацента, кров	Репродуктивний і респіраторний синдром свиней, герпесвірус
Лімфотропні (лімфійна система)	Ретровіруси, герпесвіруси, лейкозні віруси	Лімфатичні вузли, кров, селезінка	Лейкоз великої рогатої худоби, вірусна лімфома

Екологічні умови – тропність патогенів може залежати від умов навколишнього середовища, таких як температура, вологість, забруднення тощо. Це допомагає зрозуміти, які хвороби можуть загрожувати в певний сезон або за конкретних умов утримання тварин.

Стан імунної системи тварини – імунокомпрометовані тварини більш схильні до інфекцій, навіть тих, що зазвичай не викликають захворювання у здорових особин.

Генетичні фактори тварини – різні породи або генетичні лінії можуть бути більш чутливі або резистентні до певних патогенів.

Шляхи передачі збудника – знання про тропність до органів та систем допомагає встановити можливі шляхи зараження та фактори ризику для інших тварин в умовах загальної популяції або конкретного господарства.

Правила відбору патологічного матеріалу для вірусологічних досліджень

Відбір патологічного матеріалу слід здійснювати в таких випадках: 1. При наявності виражених клінічних ознак захворювання – як тільки стають помітними перші симптоми, щоб забезпечити максимальну точність діагностики; 2. У разі загибелі або вимушеного забою тварини – відбір матеріалу повинен проводитися оперативно, бажано протягом перших двох годин після смерті або забою, що допоможе зберегти біологічні властивості зразка і точність результатів лабораторного дослідження.

Ветеринарний лікар має пам'ятати, що патологічний матеріал при вірусних хворобах має бути якомога «чистішим» з мінімальною концентрацією мікроорганізмів (бактерії, гриби, актиноміцети тощо).

Зміна термінів відбору патологічного матеріалу призведе до:

1. Забруднення (контамінації) патологічного матеріалу кишковою мікрофлорою внаслідок зменшення бар'єрної функції кишківника.
2. Зменшення концентрації або інактивація вірусу в патматеріалі.



Що, у свою чергу, **призведе до неможливості накопичення вірусу** для подальших досліджень у лабораторії, **далі неможливо ідентифікувати вірус (поставити діагноз).**

Принцип відбору вірусного патологічного матеріалу

Патологічний матеріал відбирають за наявності ознак хвороби, хворих та мертвих тварин. В останньому випадку досліджують 1 вид патологічного матеріалу — шматки органів.

Клінічний матеріал відбирають у здорових тварин для визначення терміну ревакцинації, визначення титру антитіл для вироблення імунних сироваток на біофабриках у дослідних тварин. **Клінічний матеріал** має відношення до хвороби, яка не почалася (довгий інкубаційний період), або закінчилася, хронічно хворої тварини – вірусоносій. В даному випадку дослідженню обов'язково підлягають тварини-плідники, спортивні та виставкові тварини.

Особливістю відбору патологічного матеріалу для вірусологічних досліджень є відібрати такий матеріал, щоб віруси були не у вигляді «віріонів», а у стані «**комплекс вірус-клітина**», такий стан важливий для постановки діагнозу під час ідентифікації вірусу.

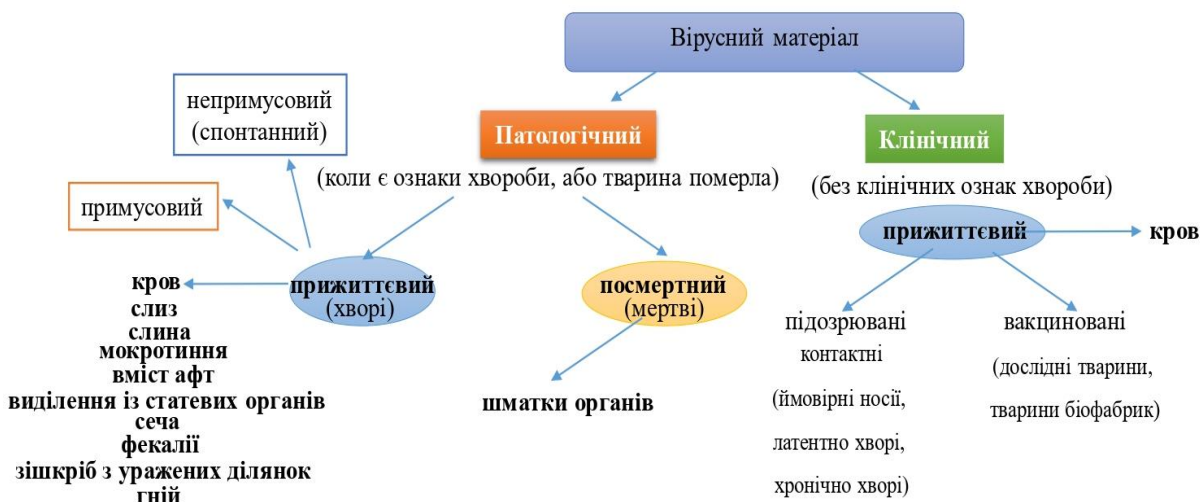


Рис. 2.1. Характеристика відбору вірусного матеріалу

****Примусовий патологічний матеріал** — це зразки, які отримують шляхом вимушеного втручання, наприклад, після евтаназії або вимушеного забою тварини для проведення досліджень.*

***Спонтанний патологічний матеріал** — це зразки, які збираються після природної загибелі тварини або в процесі розвитку хвороби без стороннього втручання.*

При відборі з певного органу звертають увагу на **розміри, вік, вид тварини та розмір самого органу**. Все це враховується для здійснення швидкого відбору і не занесення в зразок спонтанних мікробів (бактерії, гриби, актиноміцети).



Рис. 2.2. Забрудненість патологічного матеріалу для відбору для вірусологічних досліджень

Під час відбору патологічного матеріалу ветеринарний спеціаліст має дотримуватися правил біобезпеки та працювати у спеціальному одязі і виконуватися правил безпеки під час відбору патологічного матеріалу.

Для кожної окремої хвороби існують спеціальні правила відбору патологічного матеріалу (що відбирати, як відбирати та у якій кількості) «Правила відбору зразків патологічного матеріалу, крові, кормів, води та пересилання їх для лабораторного дослідження». Кожну пробу відбирають стерильними інструментами і поміщають у стерильний, окремий посуд, при необхідності відбору частин органів для досліджень поверхню його розрізу припалюють на полум'ях спиртівки.

Наприклад, згідно правил відбору «фекалії відбирають під час акту дефекації або безпосередньо з прямої кишки у кількості 100-150 г. Якщо у фекаліях є слиз, згустки крові, або клаптики слизової оболонки, то їх відбирають окремо».

«Секрет з носа, глотки та гортані відбирають за допомогою ватно-марлевого тампону, який поміщають у спеціальні стерильні пробірки з 0,5 мл розчину Хенкса або Ерла або розчину фізіологічного».

«Вміст абсцесів, виразок та ран — за допомогою стерильних пастерівських піпеток та шприців».

«Зішкріби при ураженні шкіри чи слизових оболонок роблять за допомогою скельця на межі здорової та ураженої тканини шкіри чи слизової оболонки, якщо уражений волосяний покрив, то відбирають для досліджень і його».

«Трупи птахів, дрібних тварин — відбирають цілими».

«Частину кишки разом з вмістом відбирають перерізуючи її між подвійними лігатурами накладених з обох сторін».

Правила консервування вірусовмісного патологічного матеріалу

Мета дослідника при консервуванні патологічного матеріалу: зберегти вірус, не допустити його руйнування або утворенню дефектних віріонів, знищити сторонні мікроорганізми.

Лікар звертає увагу на ступінь природної забрудненості зразка *сторонніми мікроорганізмами*. На *швидкість розвитку сторонніх мікробів впливають* середовище відбору (пора року: температура, сила вітру, вологість, рівень сонячного проміння; середовище відбору (чистота господарства)), тривалість відбору і тривалість транспортування.

Додавання антибіотиків у зразок є особливо важливим, коли вірусний матеріал може бути забруднений іншими мікроорганізмами, такими як бактерії з фекалій, вмісту кишечника або частинки ураженої шкіри. Це допомагає уникнути бактеріальної контамінації, забезпечуючи точність результатів вірусологічних досліджень.

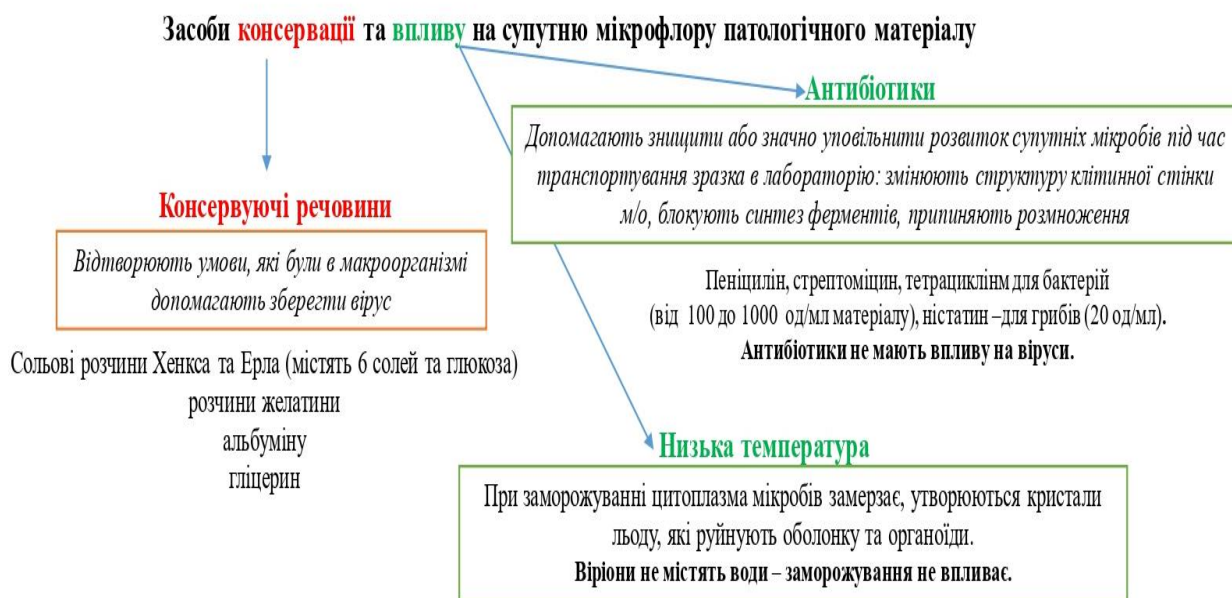


Рис. 2.3. Консервація та вплив на супутні мікроорганізми

* Консервант у вигляді гліцерину значно ускладнює проведення мікроскопії патологічного матеріалу, оскільки змінює його структуру. Тому, якщо застосовується гліцерин, разом із зразком матеріалу необхідно направляти в лабораторію мазки-відбитки, які дозволять провести мікроскопічний аналіз на необхідному етапі лабораторних досліджень.

Важливо не перевищувати стандартні концентрації антибіотика, оскільки це може вплинути на живі клітини лабораторних середовищ, в яких розвивається вірус, і завадити його накопиченню.

Також, слід пам'ятати, що додавання сольових розчинів та дія на мікроорганізми за допомогою низьких температур залежить від деяких факторів (табл. 2.8, табл. 2.9).

Табл. 2.8. Варіанти консервації патматеріалу залежно від обсіменіння мікроорганізмами

Кількість сторонніх мікробів	Сольовий розчин	Антибіотик	Заморожування
Багато	±	+++	+++
Середня кількість	±	++	++
Низька кількість	±	+	+
Поодинокі клітини	±	-	±

Табл. 2.9. Варіанти консервації патматеріалу залежно від пори року

Пора року	Групи сторонніх мікроорганізмів	Засоби консервації та знищення сторонніх мікроорганізмів
Зима	Багато психрофілів (ростуть від -10 до +20°C)	Антибіотики ± Дуже рідко заморожування ±
Весна	Значна кількість психрофілів, багато мезофілів (ростуть при середніх температурах від +15 до +40°C)	Заморожування + Антибіотики ±
Літо	Багато мезофілів, незначна кількість термофілів (ростуть при високих температурах вище 45 °C)	Заморожування + Антибіотики +
Осінь	Мезофіли+психрофіли	Заморожування + Антибіотики ±

Особливості пакування та транспортування патологічного матеріалу для вірусологічних досліджень

Біологічні властивості вірусів зумовлюють те, що будь-який матеріал, який містить віруси, вважається небезпечним. Тому патологічний матеріал завжди пакується у **багатошарову упаковку** (рис. 2.4).

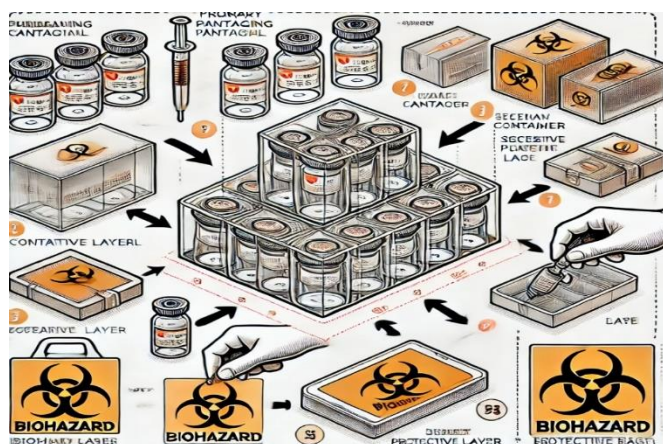


Рис. 2.4. Процес упаковки вірусомісного матеріалу з використанням багатошарової системи для безпечного транспортування та зберігання (Джерело: III)

1. Вірусомісний матеріал поміщають у **стерильний скляний флакон із герметичною кришкою (№1)**. Край флакона додатково герметизують парафіном, воском або плівкою «Парафільм». Кожен флакон маркують за допомогою етикетки, на якій напис роблять простим олівцем по лейкопластиру або водостійким маркером.

Зміст напису на етикетці

Господарство (клініка) _____
Дата, час _____
Вид тварини _____
Вид матеріалу _____

2. Флакони пакують в матеріал, який поглинає вологу у разі пошкодження флакону (вата, цигарковий папір) (№2).

3. Склянку (флакон), обгорнуту ватою, кладуть у поліетиленовий пакет, який герметизують лейкопластирем (№3).

4. Пакет розміщують у твердому водонепроникному контейнері (метал або пластик – (№5), де знаходиться матеріал для кращої амортизації (вата, тирса – (№4).

5. Для транспортування зразків контейнер із патологічним матеріалом слід помістити в термоконтейнер із металу, пластику або пінопласту (№7), наповнений охолоджувальним агентом (№6). На контейнер прикріплюють етикетку з водостійкого матеріалу, напис на якій виконують простим олівцем або стійким до вологи маркером, що забезпечує відповідність даним на етикетці.

До кожного зразка додається супровідний документ (рис.2.5), що забезпечує коректний вибір методів дослідження. Якщо є підозра на присутність як вірусів, так і бактерій чи грибів, зразок поділяють на кілька частин для проведення комплексного вірусологічного, бактеріологічного та мікологічного аналізів.

Зміст напису на супровідному документі	
Вид тварини	_____
Вік тварини	_____
Вид матеріалу	_____
Господарство	_____
Інформація про епізоотологічні дані господарства	
Попередній діагноз	

Прізвище лікаря	_____
Дата відбору	_____
Особистий підпис	_____

Рис. 2.5. Зміст напису на супровідному документі

Контрольні запитання та завдання

1. Які основні типи патологічного матеріалу відбираються при підозрі на вірусну хворобу тварин?

2. Яким чином обирається місце відбору матеріалу в залежності від передбачуваного вірусного збудника?

3. Як дотримання стерильності при відборі матеріалу впливає на точність діагностики вірусних хвороб?

4. Які засоби захисту мають використовуватися під час відбору патологічного матеріалу у тварин?
5. Які ризики виникають при недотриманні техніки безпеки під час роботи з матеріалом, підозрюваним на наявність вірусів?
6. Які зразки слід відбирати для діагностики респіраторних вірусних інфекцій у тварин?
7. Як вибір вікового і фізіологічного стану тварини впливає на відбір патологічного матеріалу?
8. Які вимоги існують до первинного пакування матеріалу з підозрою на вірусну інфекцію?
9. Які основні правила пакування патологічного матеріалу для запобігання контамінації зразків?
10. Як уникнути витоку матеріалу під час пакування для транспортування?
11. Які типи контейнерів використовуються для безпечного пакування різних зразків?
12. Які додаткові запобіжні заходи слід враховувати під час пакування матеріалу з підозрою на вірус високого рівня патогенності?
13. Чому важливо дотримуватися етикетування та маркування під час пакування вірусологічного матеріалу?
14. Які методи консервації найбільш ефективні для збереження вірусних агентів у зразках?
15. Як температура зберігання впливає на життєздатність вірусів у зразках?
16. Які хімічні консерванти можуть бути використані для збереження вірусного матеріалу?
17. Які інструкції слід дотримуватися при заморожуванні зразків для збереження вірусних структур?
18. Які види вірусів чутливі до неправильного режиму зберігання та консервації?
19. Які температурні умови є оптимальними для транспортування зразків, що містять віруси?
20. Які особливості мають контейнери для транспортування патологічного матеріалу, щоб забезпечити безпечність перевезення?
21. Які міжнародні стандарти регулюють транспортування вірусних зразків між лабораторіями?
22. Як часто необхідно перевіряти умови зберігання та транспортування для контролю якості матеріалу?
23. Які заходи застосовуються для мінімізації ризику зараження під час транспортування патологічного матеріалу?
24. Як організувати транспортування зразків у віддалені лабораторії без шкоди для їхнього діагностичного потенціалу?

Тема 4. Підготовка вірусологічного патологічного матеріалу до лабораторних досліджень

Підготовка вірусологічного патологічного матеріалу до лабораторних досліджень — це комплекс маніпуляцій спрямованих на правильний збір, транспортування, обробку та зберігання патматеріалу для подальшого виявлення (ідентифікації) вірусів у лабораторних умовах.

Важливо пам'ятати, що правильна підготовка патологічного матеріалу є критичним етапом, від якого залежить достовірність лабораторного діагнозу.

Загальна підготовка патологічного матеріалу до досліджень включає декілька етапів (рис. 2.6):

1. **Відбір матеріалу** (залежно від локалізації вірусу, типу досліджуваного захворювання) у стерильних умовах, з дотриманням заходів безпеки, часових меж, швидкості відбору.

2. **Транспортування матеріалу** з дотриманням правильного пакування та з додаванням спеціальних сольових розчинів, консервантів та антибіотиків (за потреби) для збереження найвищої концентрації вірусу (з мінімальною кількістю дефектних віріонів).

3. **Первинна обробка матеріалу у лабораторії**, яка включає 5 основних етапів:

3.1. Вивільнення вірусу з патологічного матеріалу шляхом **подрібнення або розтирання** за допомогою стерильного піску чи скла;

3.2. **Розведення** сольовим розчином;

3.3. **Центрифугування** – отримання *вірусологічної суспензії*;

3.4. **Додавання антибіотиків**;

3.5. **Бактеріологічне дослідження (бакконтроль)** одержаної при центрифугуванні вірусологічної суспензії:

А) Якщо контроль **позитивний** – відсутність росту м/о – мікробіологічна стерильність матеріалу;

Б) Якщо контроль **негативний** — наявність росту м/о (мала доза антибіотику або мікроби мало- /нечутливі до використаних препаратів – **повторна обробка антибіотиками та повторне проведення мікробіологічного контролю**).

4. **Зберігання** патологічного матеріалу при низьких температурах (зазвичай від -20 до -70°C), якщо аналіз не може бути виконаний негайно.

5. **Підготовка вірусологічної суспензії (АГ-антигени)** для конкретних аналізів з метою ідентифікації вірус.

Після надходження патологічного матеріалу до лабораторії залишок можуть зберігати протягом 1-2 діб у холодильнику для можливих додаткових досліджень.



Рис. 2.6. Поетапність підготовки вірусологічного патологічного матеріалу до досліджень

Перед початком роботи спеціалісту необхідно обов'язково скласти план виконання вірусологічного дослідження.

Процедура обробки патологічного матеріалу

1. Дезинфікуйте зовнішню поверхню банки з патологічним матеріалом.
2. Флакони з матеріалом слід розмістити на лотку, вкритому декількома шарами марлі, попередньо обробленої 5% розчином хлораміну. Це забезпечить додатковий рівень дезінфекції, зменшуючи ризик розповсюдження інфекційних агентів при транспортуванні чи обробці зразків.
3. Переливайте рідину, що містить віруси, тільки над кюветою, заповненою дезінфекційним розчином.
4. Після використання патологічного матеріалу скляний посуд потрібно знезаразити, зануривши його в дезінфекційний розчин.
5. Винос посуду та обладнання з лабораторії можливий лише після обов'язкової дезінфекції в пароформаліновій камері.
6. Після завершення роботи необхідно ретельно дезінфікувати приміщення та робоче місце.
7. Вірусовмісний матеріал передається під охорону і опечатується.

Підготовка патологічного матеріалу для досліджень після відбору та транспортування **передбачає первинну обробку патматеріалу** у лабораторії. Зазвичай основна обробка матеріалу включає такі стадії, як: розведення, центрифугування, додавання антибіотиків і перевірка ефективності їх дії. Іноді

включають додаткову стадію, таку як, подрібнення твердих (шматки ураженої шкіри, шматки органів) та напіврідких (фекалії) матеріалів.

Опис ключових етапів первинної підготовки патологічного матеріалу

Подрібнення твердого патологічного матеріалу

Для проведення маніпуляції використовують металевий або фарфоровий лоток. В лоток поміщають марлю, просочену дезрозчином, складену у декілька шарів. Використовують фарфорову чашку, фарфорову ступку, стерильний пісок, ножиці, пінцет, ємність з дезрозчином для відпрацьованого інструментарію.

Розведення патологічного матеріалу

Для проведення маніпуляції використовують лоток (марля+дезрозчин), фізіологічний або інший сольовий розчин, шприц для рідкого і напіврідкого матеріалу, резервуар з дезрозчином.

Фосфатний буфер і сольові розчини Хенкса та Ерла застосовуються для обробки різних видів патологічного матеріалу:

- Подрібнених тканин та органів (створюють 10% суспензію);
- Зразків крові зі згустками (розводять у співвідношенні 1:1 або 1:2);
- Вмісту пустул, папул та фрагментів пошкодженої шкіри (розведення від 1:5 до 1:10);
- Калу (1 грам на 10 мл розчину).

Готові сольові розчини підлягають стерилізації в автоклаві при температурі 130°C протягом 15 хвилин.

Центрифугування патологічного матеріалу

Для проведення маніпуляції використовують центрифужні пробірки (пластмасові чи скляні), центрифужний тримач для пробірок, стерильна фольга, вата, пробірки, одноразові пластикові піпетки.

Процес відбувається під дією високої відцентрової сили, що дозволяє осадити важчі частинки, такі як клітинні залишки, на дно пробірки, тоді як рідка фракція (супернатант) залишається у верхніх шарах. Після даної процедури утворюється вірусологічна суспензія (над осадом). Її ретельно відбирають і направляють на обробку антибіотиками.

Додавання антибіотиків

Слід пам'ятати, що високі концентрації антибіотиків у патологічному матеріалі можуть спричинити неспецифічну дегенерацію клітинної культури, в якій надалі буде вирощуватися вірус.

Обробка підготовленої рідини антибіотиками широкого спектру спрямована на усунення небажаної мікрофлори, яка могла проникнути в зразок під час його відбору та не була знешкоджена в процесі транспортування. Доза антибіотика визначається в залежності від типу патологічного матеріалу та можливого рівня його забруднення. Процес обробки займає до години за температури +20 – +25°C. Антибіотики додають згідно із існуючими методиками.

Бактеріологічне дослідження (бакконтроль) одержаної при центрифугуванні вірусологічної суспензії

Бактеріологічне дослідження (бакконтроль) вірусологічної суспензії після центрифугування — це етап первинної підготовки патологічного матеріалу, метою якого є виявлення та усунення можливих бактеріальних контамінантів. Після центрифугування вірусологічної суспензії та додавання до неї антибіотиків проводять аналіз для визначення присутності сторонніх бактерій, які могли потрапити в зразок під час відбору чи підготовки.

На цій стадії вірусологічний матеріал висівають на живильні середовища, що сприяють росту бактеріальної флори. Якщо в суспензії наявні бактерії, вони утворюють колонії, що дає змогу визначити їх вид та здійснити подальшу антибактеріальну обробку зразка. Бакконтроль забезпечує стерильність матеріалу, необхідну для точного проведення вірусологічних досліджень та виключення хибнопозитивних або хибнонегативних результатів через бактеріальне забруднення. Для отримання точних результатів рекомендується використовувати як загальні, так і спеціальні поживні середовища, наносячи зразки в 2-3 повтореннях.

- Якщо після висіву виявлена відсутність росту мікроорганізмів (позитивний контроль), то така вірусологічна суспензія вважається стерильною.

- Якщо після висіву виявлений ріст мікроорганізмів (негативний контроль), то таку вірусологічну суспензію повторна обробляють антибіотиками та проводять повторний мікробіологічний контроль.

Отже, метою первинною підготовки патологічного матеріалу є отримання стерильної вірусологічної суспензії.

Якщо подальші дослідження провести неможливо, то патологічний матеріал зберігають **методом заморожування** в окремому холодильнику. Або проводять подальшу підготовку вірусологічної суспензії до наступних досліджень, залежно від мети та за чітко вказаними методиками.

Подальше дослідження суспензії може бути проведене для таких досліджень як:

- проведення культивування на живих культурах клітин з метою встановлення цитопатичної дії вірусу, чи накопичення вірусу для подальших досліджень;
- проведення серологічних реакцій для встановлення титру антитіл тощо;
- проведення ІФА;
- проведення полімеразної-ланцюгової реакції, тощо.

Контрольні запитання та завдання

1. Які етапи включає підготовка вірусологічного матеріалу перед лабораторним дослідженням?

2. Чому важливо дотримуватися стерильності під час підготовки зразків для вірусологічного аналізу?

3. Які засоби індивідуального захисту необхідні для безпечної підготовки вірусологічного матеріалу?
4. Які типи патологічного матеріалу зазвичай використовуються для вірусологічних досліджень?
5. Як фізичні властивості зразків (наприклад, рідина чи тканина) впливають на методи підготовки до дослідження?
6. Як правильно підготувати зразки крові та сироватки для вірусологічного аналізу?
7. Які вимоги до підготовки зразків мокротиння для діагностики респіраторних вірусних інфекцій?
8. Які особливості підготовки фекальних зразків для виявлення вірусних збудників?
9. Як здійснюється фільтрація або центрифугування зразків для зменшення домішок?
10. Які хімічні реагенти або розчини використовуються для підготовки вірусологічних зразків?
11. Чому важливо підтримувати певну температуру під час обробки вірусного матеріалу?
12. Яким чином обробка зразків забезпечує збереження вірусних антигенів для тестування?
13. Як підготовка зразка впливає на результати ПЛР-аналізу для виявлення вірусних геномів?
14. Які методи дезактивації небажаних мікроорганізмів використовуються перед вірусологічним аналізом?
15. Як здійснюється стандартизація зразків для їхньої подальшої обробки та тестування?
16. Які ризики можуть виникнути під час підготовки зразків до вірусологічного дослідження?
17. Як визначаються критерії якості підготовленого зразка для вірусологічного дослідження?
18. Які методи використовуються для зберігання підготовлених зразків перед лабораторними аналізами?
19. Чим відрізняється підготовка зразків для серологічних тестів від підготовки для вірусної ізоляції?
20. Як обробка матеріалу впливає на збереження інфекційних властивостей вірусу?
21. Які запобіжні заходи необхідні під час маніпуляцій з високопатогенними вірусами?
22. Які етапи обробки матеріалу спрямовані на забезпечення чистоти і якості зразка?
23. Які технічні засоби використовуються для контролю стерильності підготовлених зразків?
24. Які методи попереднього тестування матеріалу проводяться для підтвердження придатності зразка для вірусологічного дослідження?

Тема 5. Схема діагностики при вірусовмісних захворюваннях тварин

Діагностика вірусовмісних матеріалів — це процес виявлення та ідентифікації вірусів у різних зразках (наприклад, біологічних рідинах, тканинах тощо).

Метою діагностики є підтвердження наявності вірусу та його типу для призначення відповідного лікування або вжиття епідеміологічних заходів.

Діагностика вірусовмісних матеріалів включає різні методи, такі як мікроскопія, вірусологічні дослідження, молекулярно-генетичні методи (ПЛР), серологічні тести для визначення антитіл або антигенів, а також культивування вірусів на спеціальних живильних середовищах.

Патологічний матеріал (твердий, рідкий, напіврідкий) проходить стадії підготовки, де отримується вірусологічна суспензія. Вірусологічна суспензія використовується у різних напрямках, таких як:

1. Ідентифікація вірусу високоточними методами дослідження (ІФА, ПЛР, серологічні реакції);

2. Культивування вірусу (вирощування, ізоляція). Для цього використовують культури клітин, курячі ембріони, біопроба. Метою вищевказаних методів є створення вакцин, діагностиків, постановка діагнозу — якщо патологічного матеріалу мало і є необхідність його накопичення.

Постановка діагнозу — це складний та багатоступеневий процес, який включає лабораторну і долабораторну діагностику.

Долабораторна діагностика включає збір анамнезу хворого, епізоотичних даних про спалах хвороби (збір даних про видовий склад та кількість тварин, уражених хворобою в господарстві, а також швидкість й територіального поширення захворювання), наявність певних клінічних ознак (симптомів) хвороби (реєстрація ТПД, габітусу, інформація про кожну систему організму) та виявлення патологічних змін в органах і тканинах у випадках загибелі тварин (виявляють макро (розтин)- та мікрозміни (гістологія)).

Лабораторна діагностика ґрунтується на аналізі патологічного матеріалу за допомогою різних методів дослідження, серед яких вірусологічний, серологічний, мікроскопічний, гістологічний, а також біопроба та експрес-методи (табл. 2.7).

Табл. 2.10. Загальна характеристика методів лабораторної діагностики

Метод діагностики	Призначення	Особливості	Переваги	Недоліки
<u>Вірусологічний</u>	Виявлення та ізоляція вірусів	Культивування збудника інфекції у різних тест-системах.	Висока точність, можливість визначити активність вірусу	Тривалість процесу, вимагає спеціального обладнання
<u>Серологічний</u> (реакція нейтралізації, реакція пасивної гемаглютинації, реакція гальмування гемаглютинації, реакція преципітації тощо)	Виявлення імуноглобулінів (АТ) або антигенів (АГ)	Використання специфічних сироваток	Швидкість, можливість масового тестування	Може не виявляти інфекцію на ранніх стадіях
<u>Мікроскопічний</u> (люмінесцентна, світлова, фазово-контрастна, електронна мікроскопія)	Оцінка клітинних і тканинних змін	Дослідження під мікроскопом	Швидка первинна діагностика	Мала точність без додаткових тестів
<u>Гістологічний</u>	Вивчення змін в тканинах	Дослідження тканинних зрізів	Дає інформацію про морфологічні зміни в тканинах	Трудомісткий, потребує фахівців
<u>Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР)</u>	Виявлення вірусної ДНК/РНК	Аналіз генетичного матеріалу	Висока чутливість та специфічність	Висока вартість, вимагає складної техніки
<u>Біохімічний</u>	Визначення рівня ферментів та інших показників	Аналіз рідин (крові, сечі) на наявність хімічних речовин	Швидкий результат, простота виконання	Обмежена специфічність для деяких хвороб
<u>Біопроба</u>	Перевірка вірулентності на тваринах	Введення патологічного матеріалу піддослідним тваринам	Висока точність у встановленні вірулентності збудника	Етичні питання, потреба в живих тваринах, тривалість

Вибір конкретного напрямку і методу лабораторних досліджень залежить характеру захворювання, клінічних проявів, необхідної точності

діагностики, а також наявності доступних ресурсів та обладнання для проведення відповідних аналізів.

Аналіз патологічного матеріалу у вірусологічній лабораторії – це процес, який включає низку етапів, спрямованих на виявлення, ідентифікацію та характеристику вірусів, що викликають патологічний стан (рис. 2.10). Даний аналіз проводиться за встановленою послідовністю. Вибір методів залежить від біологічних властивостей вірусу, наявних ресурсів лабораторії, рівня кваліфікації персоналу і базується на актуальних ветеринарних інструкціях та лабораторних рекомендаціях.

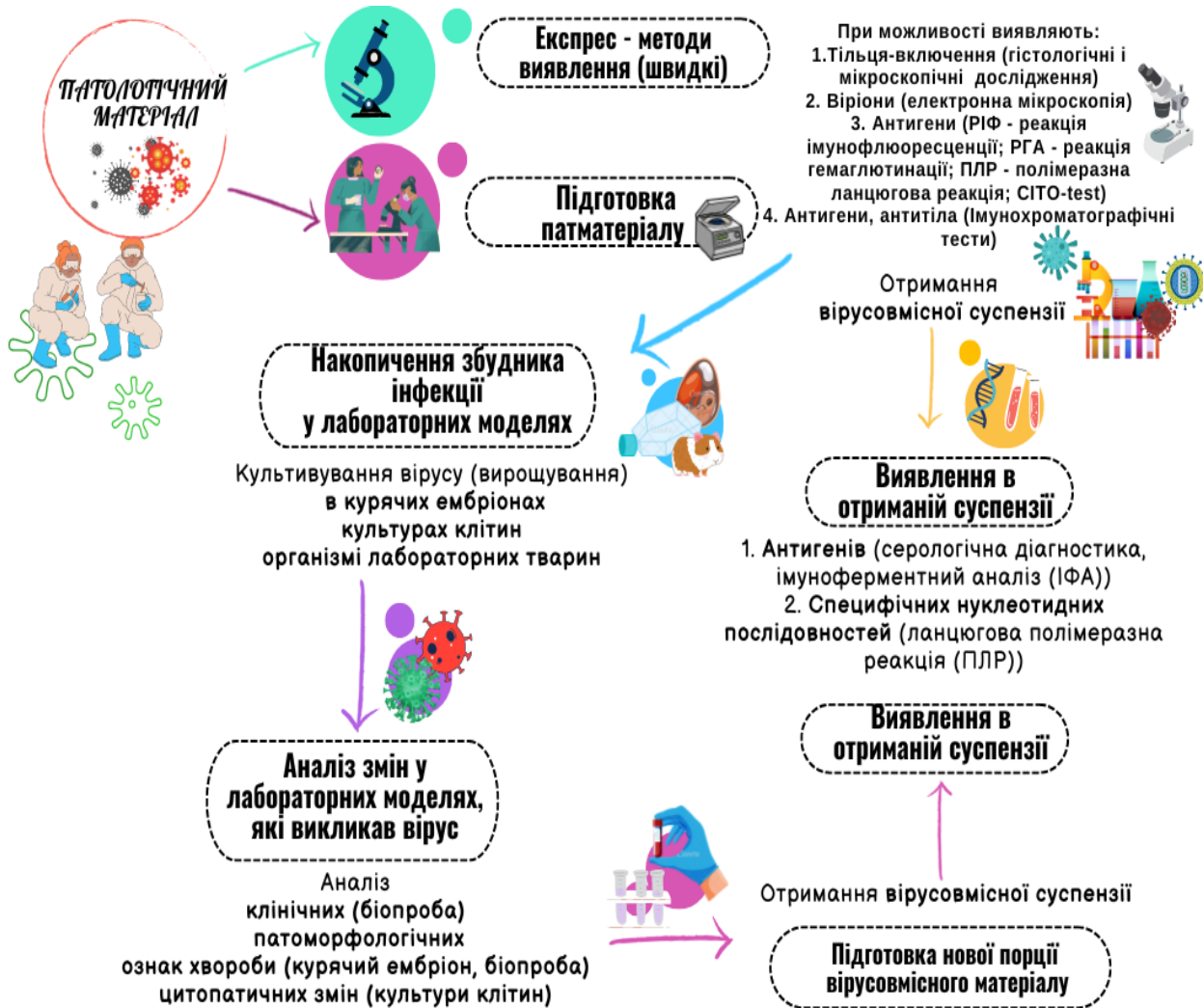


Рис. 2.7. Схема аналізу патологічного матеріалу у вірусологічній лабораторії

Тобто після відбору патологічного матеріалу та його транспортування у лабораторії проводять його аналіз. Якщо можливо (у вірусомісному патматеріалі висока концентрація вірусів), то застосовують «швидкі» експрес методи, що включають: виявлення тілець-включення (гістологічні і мікроскопічні дослідження), безпосереднє виявлення віріонів за допомогою електронної мікроскопії, та виявлення антигенів (вірусів) за допомогою імунофлюоресценції. Але такі методи застосовують рідко, так як ймовірність

знайти антиген буде досить важко. Наприклад, **тілця-включення** (сукупність вірусу у клітині) здатні утворювати деякі віруси, для **еклектронної мікроскопії** необхідне дороге обладнання та концентрація вірусу у патологічному матеріалі може бути недостатня для виявлення мікроскопією. **Реакція імуннофлюоресценції** також не завжди доступна і не для всіх видів вірусів. Тому важливим етапом аналізу патологічного матеріалу у вірусологічній лабораторії є **накопичення, (культивування, вирощування) вірусу** для збільшення його кількості.

Накопичення вірусу проводять на лабораторних моделях: культура клітин, курячий ембріон, та на лабораторних тваринах. При постановці біопроби на лабораторних тваринах можна спостерігати клінічні ознаки хвороби, а при розтині трупа лабораторних тварин можна також виявити патологоанатомічні зміни. При накопичуванні вірусу у культурі клітин дослідних може спостерігати цитопатичну дію вірусу на клітини, а при використанні курячих ембріонів можна, наприклад, виявити специфічні зміни в ембріоні або його мембранах, що допомагає визначити наявність та вид вірусу.

При введенні в амніотичну порожнину (внутрішній простір навколо ембріона): віруси грипу. В алантоїсну порожнину (міхур для збирання відходів): віруси грипу, хвороби Ньюкасла. На хоріоаллантоїсну мембрану (зовнішня мембрана): вірус віспи, герпесу. У жовтковий мішок: вірус сказу. Прояви дії вірусу: затримка розвитку або загибель ембріона, утворення бляшок на мембранах, геморагії та набряки, наявність вогнищ некрозу, везикул або інших структурних пошкоджень на хоріоаллантоїсній мембрані, деякі віруси викликають крововиливи або набряки на різних частинах ембріона або його оболонках.

Причому, чим більший вплив (дія) вірусу на ту чи іншу модель, тим більша його концентрація. Чим більша концентрація вірусу у вірусологічній суспензії, тим легше буде його подальша ідентифікація з метою, наприклад, постановки діагнозу.

Контрольні запитання та завдання

1. Як визначити тип вірусу на основі вірусомісного матеріалу?
2. Які методи використовуються для первинної ідентифікації вірусів у зразках матеріалу?
3. Як проводиться відбір та підготовка матеріалу для вірусологічних досліджень?
4. Як за допомогою вірусологічних тестів визначити наявність вірусу в організмі тварини?
5. Які специфічні методи ідентифікації вірусів використовуються для різних видів матеріалу (кров, слина, тканини)?
6. Яким чином аналіз вірусів за допомогою ПЛР відрізняється від інших методів діагностики?
7. Як вибір інкубаційного часу впливає на результат діагностики вірусів у вірусомісному матеріалі?

8. Які методи детекції вірусів у сироватці крові найбільш ефективні для діагностики гострих інфекцій?
9. Як застосування мікроскопії допомагає у виявленні вірусів у зразках органічного матеріалу?
10. Які особливості діагностики вірусовмісних матеріалів у тканинах при підозрі на внутрішньоклітинні віруси?
11. Як визначити вірусну навантаженість у матеріалі для оцінки тяжкості інфекції?
12. Які серологічні методи використовуються для виявлення вірусних антитіл у крові тварин?
13. Як застосовуються тест-системи для ідентифікації вірусів у лабораторних умовах?
14. Які обмеження має культуральний метод у діагностиці вірусів в організмах тварин?
15. Як змінюються показники у результатах діагностики при використанні різних видів матеріалів (сироватка, мазки, біопсії)?
16. Яким чином проводиться виявлення вірусів за допомогою імуноферментного аналізу (ІФА)?
17. Як оцінити ступінь вірусного зараження за допомогою вірусологічних тестів на тканинах або рідинах?
18. Які сучасні молекулярно-генетичні методи дозволяють точніше ідентифікувати вірусні агенти?
19. Як використання методу електронної мікроскопії допомагає у діагностиці вірусів?
20. Які особливості діагностики вірусних інфекцій у складних або змішаних зразках матеріалу?
21. Як проводиться аналіз вірусних часток у зразках при підозрі на епізоотії?
22. Як система серіальної імунофлуоресценції допомагає виявити вірусні частки в тканинах?
23. Які критерії слід враховувати при виборі методу діагностики вірусів для різних умов експерименту?

Тема 6. Накопичення вірусів у тест-об'єктах Живильні середовища для культур клітин

Культивування вірусів у живих об'єктах в лабораторних умовах

Як відомо, накопичувати або вирощувати вірус у лабораторних умовах можна на лабораторних моделях. Тому збудники вірусних хвороб ізолюють або накопичують у таких тест-системах: курячих ембріонах, культурах клітин та в організмі здорових лабораторних тварин (біопроба).

1. Курячі ембріони:

- Віруси вирощуються в курячих ембріонах, де вони реплікуються в живому організмі. Інфекція вірусами проводиться шляхом ін'єкцій у різні частини ембріона.

- Переваги: цей метод дозволяє отримати великі обсяги вірусів і є ефективним для вірусів, які не розмножуються в клітинних культурах.

- Недоліки: використання курячих ембріонів може бути обмежене до певних типів вірусів і може викликати етичні питання.

2. Культури клітин:

- Віруси вирощують у клітинних культурах, отриманих з різних організмів (людей, тварин, рослин). Клітини поміщаються в спеціальні середовища, що забезпечують їх ріст і підтримують вірусну реплікацію. Призначення культури клітин – діагностика хвороб, вирощування вакцинних вірусів, отримання вірусних діагностикумів. З культурами клітин працюють для розмноження вірусів.

- Переваги: культури клітин дозволяють точніше контролювати умови вирощування вірусів і проводити детальні дослідження. Можна здійснювати модифікації клітин і вірусів.

- Недоліки: Деякі віруси не можуть розмножуватися в стандартних клітинних культурах, що може вимагати використання спеціальних або нетипових клітинних ліній.

3. Біопроба (дослідні тварини):

- Віруси вирощують в організмах дослідних тварин, таких як миші або пацюки. Тварини заражають вірусами, які розмножуються в їхніх тканинах і органах. Можна спостерігати прояви вірусу через клінічні ознаки хвороби, яку він викликає, при розтині трупів дослідних тварин спостерігають мікро-та макро-зміни, що викликав вірус, тощо.

- Переваги: цей метод дозволяє вивчати віруси в умовах живого організму, що може надати важливу інформацію про патогенез та імунну відповідь.

- Недоліки: використання тварин у дослідженнях вимагає дотримання етичних норм, також це дорогий та трудомісткий процес.

Вибір методу залежить від типу вірусу, цілей дослідження та доступних ресурсів у лабораторії.

Найчастіше лабораторні спеціалісти використовують культури клітин для накопичення та культивування вірусів. Культури клітин є потужним інструментом для наукових відкриттів і медичних інновацій, дозволяючи досліджувати клітинні процеси в умовах, які наближаються до природних.

Що таке культури клітин: це метод вирощування клітин в штучних умовах поза організмом, який був розроблений у 1940-50-х роках. Клітини можуть бути отримані з тканин рослин, тварин або людей і вирощуються в спеціальних середовищах, що забезпечують їхній ріст і розмноження. Тобто

культура імітує певні системи живого організму на клітинному рівні. Клітини, відокремлюють з тканин організму, вирощують у спеціальних середовищах, що містять всі необхідні поживні речовини для їхнього росту та поділу. Потім культуру клітин «заражають» вірусом, дію якого досліджують. Незаражена вірусом культура клітин – багатокomпонентна система, яка містить рідке поживне середовище та тваринні клітини. Віруси здатні специфічним чином пошкоджувати клітини в культурі, що отримало назву «**цитопатичний ефект**» (**цитопатична дія**) (1943 році Хуанг, 1949 році Ендерс). Він є специфічним для різних вірусів і дозволяє дослідникам ідентифікувати та вивчати віруси в клітинних культурах за допомогою світлового або електронного мікроскопа. Після розвитку вірусу в культурі клітин утворюються ЦПД (через 3-5 діб). Розвиток тваринних клітин в культурі та дія вірусу на неї перевіряються за допомогою мікроскопу.

Основні прояви цитопатичного ефекту включають:

1. **Зміни у формі клітин:** округлення, злиття або руйнування клітин.
2. **Деструкція клітин:** порушення цілісності та функціонування клітин.
3. **Формування включень:** деякі віруси спричиняють утворення внутрішньоклітинних включень або аномальних структур всередині клітин.
4. **Зміни в рості і розмноженні клітин:** змінена швидкості росту або формуванні специфічних структур.

Метод отримання клітинної культури включає такі етапи:

- Ізоляція живих клітин зі свіжих тканин шляхом ферментативного гідролізу;
- Перенесення цих клітин до спеціальних флаконів для культивування.

Види культур клітин

Культури клітин можуть бути 1. **моношарові** – коли їх вирощують на стінках флаконів для культивування. Після засіву в матрас суспензії тваринних клітин через 3-5 діб в ньому утвориться – моношар та 2. **суспензійні. Моношарові** культури клітин ростуть у матрасах і флаконах, де клітини прикріплюються до скла тільки з одного боку. У ролерних пробірках постійне обертання забезпечує рівномірний розподіл клітин по більшій площі, що сприяє їхньому зростанню на всій внутрішній поверхні. **Суспензійні** культури клітин (лімфобласти, мієломні клітини) в яких клітини вирощуються у реакторі з перемішуванням і не прикріплюються до поверхні флакону чи матрацу, а знаходяться у підвішеному стані у рідкому поживному середовищі. Такі культури зазвичай використовуються для швидкого росту клітин, оскільки вони можуть розмножуватися в тривимірному просторі без обмежень з боку поверхні. Тому культури клітин можуть бути не тільки моно шаровими, але й суспензійними.

Типи культур клітин

1. **Первинні клітинні** культури можуть бути отримані з різних органів і тканин, що безпосередньо взяті з живих організмів. Найбільш ефективні

культури вирощуються з ембріональних тканин, оскільки вони демонструють найвищу швидкість розвитку. Для цього застосовуються тканини курячих ембріонів, а також клітини з нирок, легень, печінки, яєчок та інших органів. Життєздатність клітин значною мірою залежить від віку джерела організму та типу клітин, що використовуються для культури.

Якщо орган чи тканину, взяти безпосередньо з макроорганізму «старого» за віком, то така культура клітин буде мати короткий термін життя в культурі (клітини розвиваються декілька діб). Пересівів не витримують, гинуть. Первинну культуру взятую із старого організму не можна пересівати.

Якщо орган чи тканину, взяти безпосередньо з макроорганізму «молодого» за віком або це ембріональні тканини, то термін життя сягатиме декількох тижнів або місяців. Такі культури клітин витримують пересіви (пасажи), і також здатні до росту без втрати біохімічних та морфологічних властивостей. Кількість таких пересівів може становити від 2 до 5 разів) дані культури називають вторинними, субкультурами або клітинними лініями (приклади клітинних ліній: клітинні лінії HeLa (від ракових клітин людини), Vero (від клітин нирок мавп) та MDCK (від клітин нирок собаки)).

2. Вторинні культури (субкультури, клітинні лінії) – це культури, отримані шляхом перенесення клітин з первинної культури на нові середовища для подальшого росту. Вторинні культури мають таку ж чутливість до вірусу як і первинні, їх можна отримати майже від усіх клітин (окрім курячих фібробластів) та зазвичай при пасажах виключаються мертві чи дефектні клітини.

3. Перещеплювальні культури – культури, які можуть бути пасажовані багаторазово і мають можливість безперервного росту протягом тривалого часу. Вони широко використовуються для довготривалих досліджень, тестування нових ліків, виробництва біологічних продуктів тощо. Однією з основних особливостей вторинних культур є зміна генетичного складу клітин, що може призводити до мутацій або адаптаційних змін у процесі їхнього зростання та розвитку в умовах культури. Зміни генотипу у вторинних культурах можуть бути **спонтанними**, що найчастіше трапляється з клітинами тканин мишей і щурів, та **індукованими** (спеціальна дія на культуру клітин фізичних або хімічних факторів). Внаслідок природних або штучних трансформацій формуються клітини, здатні переносити численні пересіви без втрати своїх морфологічних та фізіологічних характеристик. Якщо клітини вторинної лінії витримують **70** пересівів з інтервалом у **3 дні**, їх зазвичай вважають постійною, перещеплювальною лінією. Основна відмінність перещеплювальних культур від вторинних в можливості клітин до безперервного росту і кількості пасажів: вторинні культури зазвичай мають обмежений потенціал для подальшого росту, тоді як перещеплювальні культури можуть ділитися тривало і без значних обмежень. Аналогом пухлинних клітин є тваринні клітини постійної або перещеплюваної культури.

Живильні середовища для культур клітин

Живильні середовища у вірусології застосовуються для вирощування (культивування) вірусів і вивчення їхньої реплікації (процес розмноження вірусу всередині клітини-хазяїна) та впливу на клітини. **На відміну від бактерій**, віруси не можуть розмножуватись самостійно на штучних живильних середовищах, оскільки для цього їм потрібні живі клітини. Тому в вірусології використовуються клітинні культури, курячі ембріони або експериментальні тварини (біопроба).

Для вирощування культур клітин використовують живильні середовища.

Поживне середовище для клітинних культур — це спеціально підібраний розчин, який створює оптимальні умови для росту, поділу та розвитку клітин у лабораторії. Це середовище містить необхідні компоненти, які підтримують метаболізм і розмноження клітин, дозволяючи досліджувати різні процеси, такі як вірусна реплікація, реакції на ліки або інші біологічні механізми (табл.2.11). Основою будь-якого поживного середовища є сольовий розчин.

Середовища готуються з використанням хімічних реагентів найвищого ступеня очищення. Неорганічні компоненти поживних середовищ загалом є стабільними, за винятком кристалогідратів (наприклад, сульфатів магнію та фосфатів натрію), які можуть поглинати вологу з атмосфери.



Рис. 2.8. Загальна характеристика компонентів поживних середовищ для культур клітин

Органічні кислоти, такі як аскорбінова і глютамінова, краще зберігати в сухому вигляді, оскільки у розчинах вони швидко розкладаються.

➡ Тому середовища для вирощування та розвитку клітинних культур:

- повинні бути **стерильними**,
- **не містити токсичних речовин для клітин**,
- **мати кислотність у діапазоні 6,9–7,4** (оптимальний pH = 7,2). Зміни pH у бік підвищення або зниження слід контролювати буферними компонентами, присутніми в середовищі (карбонати, фосфати, органічні кислоти та їхні солі).

Табл. 2.11. Характеристика складових частин поживних середовищ для вирощування культур клітин

Компонент	Характеристика
Неорганічні солі (сольові розчини)	Забезпечують підтримку осмотичного тиску, електролітного балансу та регулюють рН середовища, імітують іонний склад крові. Приклади: хлорид натрію, сульфат магнію, фосфат натрію, хлорид кальцію. Розчин Ерла містить значно більше натрій бікарбонату, ніж розчин Хенкса, завдяки чому володіє сильними буферними властивостями. Перед фільтрацією через розчин Ерла пропускають вуглекислий газ, тоді як через розчин Хенкса — повітря. Це є недоліком розчину Ерла. Окрім того, бікарбонат може бути токсичним для певних типів клітин. Через це для роботи з первинними та вторинними культурами частіше використовують розчин Хенкса. Розчин Ерла застосовують переважно для культур, які мають високу концентрацію клітин та швидкий ріст.
Амінокислоти	Необхідні для синтезу білків і забезпечення росту клітин. Деякі амінокислоти є незамінними (наприклад, лейцин, ізолейцин, валін), тому повинні бути додані до середовища.
Вітаміни	Важливі для каталізації біохімічних реакцій і забезпечення метаболічних функцій клітин. Наприклад, вітамін В ₁₂ , рибофлавін, аскорбінова кислота.
Глюкоза (або інші джерела енергії)	Є основним джерелом енергії для клітинного метаболізму, особливо для клітин з високими енергетичними потребами. Підтримує процеси росту та поділу клітин.
Ліпіди та жирні кислоти	Є важливими для підтримки клітинних мембран та беруть участь у сигнальних і метаболічних процесах. Додаються до середовищ для певних типів клітин, що потребують додаткових джерел жирів.

Гормони та фактори росту	Стимулюють ріст і диференціацію клітин. Наприклад, інсулін, еритропоетин, епідермальний фактор росту (EGF).
Буферні системи	Використовуються для підтримки стабільного рівня pH у середовищі. Найбільш поширеними є фосфатний і бікарбонатний буфери, а також додавання CO ₂ для контролю pH.
Сироватки	Зазвичай фетальна бичача сироватка (FBS), що містить різні білки, гормони, ліпіди та фактори росту, необхідні для росту клітин. Забезпечує важливі поживні речовини та захищає клітини від стресових умов. Цей продукт містить близько 1000 різних речовин, включаючи пептидні фактори росту і гормони. Недоліки сироватки включають варіабельність складу, можливу контамінацію супутньою мікрофлорою і наявність антитіл.
Антибіотики	Додаються до середовищ для запобігання контамінації бактеріями чи грибами. Наприклад, пеніцилін, стрептоміцин, амфотерицин В.
Вода	Для культур клітин використовують щойно підготовлену воду. Якщо використовуються незакриті бутлі, вуглекислий газ з повітря також може потрапляти у воду.

Типи поживних середовищ

Eagle's Minimum Essential Medium (MEM): базове середовище для багатьох клітинних ліній. Розроблене Гаррі Іглом у 1950-х роках, це середовище забезпечує клітини необхідними поживними речовинами, включаючи амінокислоти, вітаміни, солі, глюкозу та червоний фенол. Використовується для широкого спектру клітинних ліній, таких як фібробласти, епітеліальні клітини та інші типи клітин, що потребують мінімальних поживних речовин для росту. Часто це середовище модифікують додаванням сироваток, антибіотиків або інших добавок залежно від потреб конкретної клітинної лінії.

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM): модифікована версія Eagle's Minimum Essential Medium (MEM), яка активно застосовується в клітинних культурах для вирощування різних типів клітин, таких як фібробласти, епітеліальні клітини та стовбурові клітини, де необхідним є підвищений рівень глюкози (4.5 г/л або 1 г/л). Склад середовища: глюкоза,

амінокислоти, вітаміни, солі, натрій піруват, бікарбонатний буфер, фенол червоний.

РРМІ 1640: живильне середовище для клітинних культур, розроблене спочатку для вирощування клітин лейкемії людського походження, але згодом стало універсальним середовищем для багатьох типів клітин, зокрема імунних клітин, лімфоцитів, а також різних клітинних ліній.

Середовища для вірусологічних досліджень. Ці середовища призначені не тільки для вирощування вірусів, але й для дослідження їх властивостей. Вони часто включають специфічні добавки, які допомагають виявляти певні властивості вірусів, такі як їх здатність до агрегації чи змін в генетичному матеріалі. Для таких досліджень використовуються середовища, що дозволяють визначити типи вірусів за допомогою таких методів, як ПЛР, електронна мікроскопія чи серологічні тести.

Безсироваткові середовища. В останні роки все більш популярними стають середовища, що не містять сироватки крові, оскільки це дозволяє знизити ризик контамінації та підвищити стандартизацію процесу. Безсироваткові середовища містять всі необхідні компоненти для росту клітин, такі як пептиди, гормони, вітаміни, амінокислоти та інші поживні елементи. Вони можуть бути адаптовані для конкретних типів клітин, включаючи ті, що використовуються для вірусологічних досліджень.

Контрольні запитання та завдання

1. Як віруси взаємодіють з клітинами живих організмів на етапі інфекції?
2. Які фактори впливають на здатність вірусів накопичуватися в різних тканинах організму?
3. Як швидко віруси накопичуються в організмі при інфекційних процесах?
4. Які методи використовуються для визначення рівня вірусного навантаження в тканинах живих об'єктів?
5. Як зберігається стабільність вірусів у організмі хазяїна на різних етапах їхнього репродуктивного циклу?
6. Як зміни в клітинному метаболізмі впливають на здатність організму накопичувати вірус?
7. Які особливості накопичення вірусів в клітинах різних органів тварини?
8. Яким чином дослідження накопичення вірусів у тварин допомагає у розробці нових методів лікування інфекцій?
9. Які основні вимоги до складу живильних середовищ для культивування клітин у вірусологічних дослідженнях?
10. Як вибір живильного середовища впливає на ріст і підтримку клітинної культури?

11. Які типи середовищ використовуються для первинних культур клітин, і чим вони відрізняються від середовищ для підтримки клітин у лабораторних умовах?
12. Як скласти оптимальне середовище для культури клітин ссавців з метою вірусологічних досліджень?
13. Чому важливо контролювати рН середовища при культивуванні клітин для вірусних досліджень?
14. Які компоненти живильних середовищ є критичними для підтримки життєздатності клітин при вірусній інфекції?
15. Як використовуються сироватки тварин у складі живильних середовищ для культур клітин?
16. Як концентрація глюкози в середовищі впливає на ріст клітин і реплікацію вірусів?
17. Які живильні середовища використовуються для культивування фібробластів і епітеліальних клітин у вірусологічних дослідженнях?
18. Яким чином співвідношення солей та буферних розчинів у середовищі може впливати на інфікування клітин вірусами?
19. Які середовища забезпечують оптимальні умови для реплікації вірусів у лабораторних культурах клітин?
20. Як підвищена концентрація амінокислот у середовищі впливає на вірусну активність?
21. Яким чином коригується склад середовища для підтримки довготривалої культури клітин?
22. Які типи антибіотиків часто додаються до живильних середовищ для запобігання бактеріальної контамінації під час вірусних досліджень?
23. Як визначити найкраще середовище для підтримки культури клітин при використанні вірусів високої патогенності?

Тема 7. Експрес-методи досліджень вірусовмісного патологічного матеріалу

Експрес-методи у вірусології використовуються для швидкого виявлення вірусів і їхніх компонентів у зразках від тварин. Експрес-методи дають змогу отримати інформацію про збудника інфекції через 2-8 годин після отримання навіть невеликої кількості патологічного матеріалу.

Експрес-методи застосовують **при високій концентрації вірусу в зразках** — коли вірус активно розмножується в організмі і знаходиться на піку своєї реплікації.

Висока концентрація вірусу в зразках спостерігається в таких випадках:

- Гостра фаза інфекції: на початкових етапах вірусної інфекції, коли організм ще не виробив достатньої кількості антитіл для боротьби з вірусом, його концентрація у крові, слизових або інших біологічних рідинах є найвищою.

- Місцева реплікація вірусу: якщо вірус активно розмножується в певних тканинах або органах до яких проявляє тропність (наприклад, у дихальних шляхах при респіраторних інфекціях), концентрація вірусу в зразках з цих ділянок може бути дуже високою.

- Недостатня імунна відповідь (імунна недостатність): у пацієнтів з ослабленою імунною системою, таких як ті, що мають імунодефіцитні стани або приймають імуносупресивні препарати, вірус може розмножуватися неконтрольовано, що призводить до високої концентрації вірусу у зразках.

- Інтенсивне розмноження вірусу: деякі віруси є настільки активні, що здатні швидко реплікуватися в клітинах господаря, що призводить до швидкого збільшення їх кількості в зразках.

- Рецидив або реактивація вірусу: деякі віруси (вірус герпесу або цитомегаловірус), можуть активуватися знову після періоду латентного стану, що призводить до збільшення концентрації вірусу у зразках.

- Пізні стадії інфекції при хронічних вірусних захворюваннях: деяких випадках, особливо при хронічних інфекціях, наприклад, лейкоз врх, вірус може постійно знаходитися в організмі на високих рівнях, так як імунна система вже не може повністю його контролювати.

- Відсутність або неефективність лікування: якщо інфекцію не лікують або лікування є неефективним, вірус продовжує реплікацію, що може призвести до високої концентрації вірусу в зразках.

- Також експрес-методи використовують з метою швидкої діагностики для визначення наявності вірусної інфекції або оцінки її прогресування. Ці методи використовуються для оперативного виявлення збудників вірусних захворювань, коли час є критичним для лікування або контролю захворювання.

Основні обставини, коли застосовую експрес-методи вірусологічної діагностики:

- *Спалахи епідемій та пандемій серед тварин*

Під час масових спалахів інфекцій, таких як африканська чума свиней (АЧС), пташиний грип або сказ, швидкі тести відіграють ключову роль. Вони дозволяють оперативно виявити вірус та інфікованих тварин і вжити заходів для запобігання поширенню хвороби серед інших тварин.

- *Карантин і контроль на фермах (моніторинг здоров'я)*

На великих тваринницьких господарствах і фермах експрес-методи використовуються для моніторингу здоров'я тварин і швидкого виявлення вірусних захворювань. Це допомагає швидко ізолювати хворих тварин і запобігти поширенню інфекцій.

- *Контроль під час транспортування і експорту тварин*

При транспортуванні тварин на великі відстані або перед експортом експрес-методи можуть бути використані для перевірки на наявність вірусних інфекцій, таких як вірус ящуру, сказ чи інші інфекційні хвороби. Це дозволяє запобігти поширенню вірусів між регіонами або країнами.

- *Скринінг диких тварин і птахів*

Експрес-методи важливі для контролю за популяціями диких тварин і птахів, особливо тих, що можуть бути переносниками вірусних захворювань, які можуть передаватися домашнім тваринам або людям. Наприклад, експрес-діагностика застосовується для виявлення сказу у лисиць або пташиного грипу у мігруючих птахів.

- *Моніторинг при підозрі на зоонози*

Оскільки деякі вірусні інфекції можуть передаватися від тварин до людей (зоонози), експрес-методи використовуються для швидкого виявлення таких захворювань, як сказ, лихоманка Західного Нілу або хвороба Лайма, у тварин. Це дозволяє мінімізувати ризики передачі інфекцій людям.

- *Моніторинг вірусного навантаження*

Визначення рівня вірусного навантаження в організмі, що допомагає контролювати ефективність лікування.

- *Швидка діагностика в клініках дрібних тварин*

У ветеринарних клініках експрес-методи використовуються для швидкого виявлення вірусних інфекцій у домашніх тварин. Наприклад, експрес-тести на парвовірус або вірусну панлейкопенію у котів дозволяють оперативно поставити діагноз і розпочати лікування.

- *Програми вакцинації та імунопрофілактики (оцінка ефективності вакцинації)*

Експрес-методи використовують для перевірки ефективності вакцинації тварин, визначаючи рівень антитіл у їхній крові після щеплення. Це важливо для моніторингу вакцинацій проти таких вірусів, як вірус сказу або інфекційний ринотрахеїт великої рогатої худоби.

- *Контроль під час ветеринарних оглядів*

При проведенні планових ветеринарних оглядів на фермах або в зоопарках експрес-методи можуть використовуватися для швидкої діагностики вірусних інфекцій, що дозволяє своєчасно виявити проблеми та запобігти їхньому розповсюдженню.

- *Польові умови*

У важкодоступних регіонах або в умовах польових досліджень експрес-методи дають змогу швидко виявляти вірусні інфекції без необхідності складного лабораторного обладнання. Це особливо актуально для регіонів з високим рівнем поширення інфекційних хвороб.

У вірусології до експрес-методів можна віднести методи, які за характером пошуку направлені на виявлення лише антигену у зразку; лише антитіла у зразку або методи, завдяки яким можна виявити антиген або антитіло.

Виявлення лише антигену (АГ) у зразку:

1. Виявлення тілець-включень;
2. Виявлення віріонів;
3. Виявлення антигенів у РІФ (реакція імунофлюоресценції);
4. Виявлення антигенів у реакції прямої гемаглютинації (РГА пряма);

5. Швидкі тести на антигени (Cito-test) за допомогою імунохроматографічних методів;

6. Виявлення ДНК/РНК антигенів у ПЛР (полімеразна ланцюгова реакція);

7. Виявлення вірусних геномів за допомогою методу молекулярної детекції LAMP (ізотермічної ампліфікації петлі) (Loop-mediated Isothermal Amplification)

8. Виявлення вірусних геномів за допомогою методу геномних мікрочіпів (DNA microarrays)

Виявлення лише антитіл (AT-Ig) у зразку:

9. Виявлення антитіл (IgM, IgG) за допомогою імунохроматографічних методів (експрес-тести);

10. Виявлення антитіл у реакції непрямой гемаглютинації (РГА непряма);

11. Виявлення антитіл, які нейтралізують дію вірусу у реакції нейтралізації (РН);

12. Імуноблотинг (вестерн-блотинг).

Методи, завдяки яким виявляють антиген (АГ) або антитіло (AT-Ig) залежно від мети досліджень:

13. Виявлення антигенів/антитіл за допомогою імуноферментного аналізу (ІФА) - метод ELISA;

14. Виявлення антигенів та антитіл одночасно комбінованими (мультикомплексними) швидкими тестами;

15. Деякі серологічні реакції з коротким терміном обліку результатів (реакція аглютинації (РА), реакція нейтралізації (РН), реакція зв'язування комплементу (РЗК), РП (реакція преципітації) тощо).

Характеристика деяких експрес-методів, які використовують у вірусології

Виявлення лише антигену (АГ) у зразку

Виявлення тілець-включень

Тільця включення — це внутрішньоклітинні утворення (скупчення віріонів в різних структурах клітини), які виникають через вірусну інфекцію (у результаті дії вірусу на клітини) або інші порушення клітинного метаболізму. Вони можуть знаходитися в ядрі, цитоплазмі або одночасно в обох частинах клітини. Виявлення таких включень є важливим діагностичним показником у вірусології, оскільки їх присутність свідчить про активну дію вірусу в клітині. Наприклад, вірус віспи та сказу утворює цитоплазматичні включення, вірус герпесу – внутрішньоядерні включення, деякі віруси здатні утворювати включення одночасно у декількох структурах клітин. Тому тільця-включення диференціюють на декілька типів: *цитоплазматичні, ядерні та змішаного типу*.

Методи виявлення тілець-включень:

1. Мікроскопічний аналіз (мікроскопія) — тільця включення можна побачити під світловим мікроскопом після фарбування тканин різними методами.

Фарбування за *Романовським-Гімзою* дозволяє розпізнати ядерні включення.

Фарбування за *Грамом* і *гематоксилін-еозинове* фарбування застосовують для виявлення цитоплазматичних включень.

2. Електронна мікроскопія — метод забезпечує більш детальне дослідження структури тілець включення на ультраструктурному рівні, що є важливим для підтвердження вірусного походження інфекції.

3. Імунофлуоресцентні методи — для ідентифікації вірусних антигенів, що накопичуються в тільцях включення. Флуоресцентні антитіла зв'язуються з антигенами, дозволяючи їх візуалізувати.

4. Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) — метод не дозволяє прямо виявити тільця включення, але він допомагає виявити вірусну ДНК/РНК, пов'язану з клітинними змінами, включаючи утворення тілець-включень.

Діагностичне значення виявлення тілець-включень:

Виявлення тілець включення допомагає підтвердити вірусну етіологію інфекції та диференціювати її від інших хвороб. Тільця-включення є діагностичним маркером багатьох вірусних інфекцій, наприклад, Сказ (тільця Негрі в нервових клітинах (рис. 2.9)), цитомегаловірус (тільця «сова» в ядрах інфікованих клітин), герпесвірусні інфекції (ядерні тільця включення), кір (гігантські клітини з включеннями).

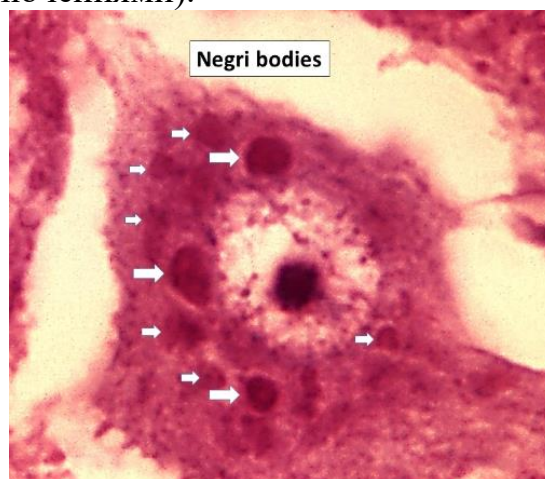


Рис. 2.9. Тільця Негрі в нервових клітинах (Джерело: Інтернет-ресурс)

Виявлення віріонів завдяки електронній мікроскопії

За допомогою електронної мікроскопії можливо візуалізувати віріони та аналізувати їх взаємодію з клітинами. За допомогою цього методу можна детально вивчити морфологію вірусів, їхній розмір, форму та ультраструктурні особливості.

Метод електронної мікроскопії використовують для:

- прямого виявлення вірусів у зразках, таких як клітинні культури, тканини або біологічні рідини;
- класифікації вірусів на основі їхньої морфології, що дозволяє відрізняти різні вірусні родини;
- ідентифікації вірусних частинок у випадках, коли інші методи виявлення вірусів (наприклад, ПЛР) не дають результату.

Виявлення антигенів у РІФ (реакція імуофлюоресценції)

Реакція імуофлюоресценції (РІФ) — це метод виявлення антигенів вірусів або бактерій у зразках тканин чи клітин за допомогою специфічних антитіл, мічених флуоресцентними барвниками.

Принцип: Флуоресцентно мічені антитіла (відомі) зв'язуються з вірусними або бактеріальними антигенами в зразку. Під впливом ультрафіолетового світла такі антитіла світяться, що дозволяє їх візуалізувати за допомогою флуоресцентного мікроскопа. Тому утворені комплекси антиген-антитіло світяться (рис. 2.10).

Переваги: Дає змогу швидко і точно виявляти наявність антигенів в інфікованих клітинах.

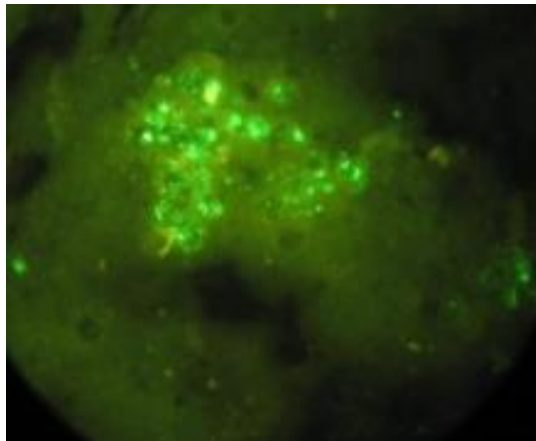


Рис. 2.10. РІФ при діагностиці сказу (Джерело: Інтернет-ресурс)

Виявлення антигенів у реакції прямої гемаглютинації (РГА пряма)

Реакція прямої гемаглютинації (РГА) — метод, заснований на здатності деяких вірусів (антигенів), таких як вірус грипу, з'єднуватися з еритроцитами і викликати їх аглютинацію (злипання).

Принцип: Вірусні частинки виявляються через їхню здатність взаємодіяти з еритроцитами, спричиняючи їх злипання. Якщо вірус є в зразку, він аглютинує еритроцити, і утворюється специфічний малюнок на дні пробірки або планшетки (рис. 2.11).

Переваги: відносно простий та швидкий метод, який не потребує складного обладнання.

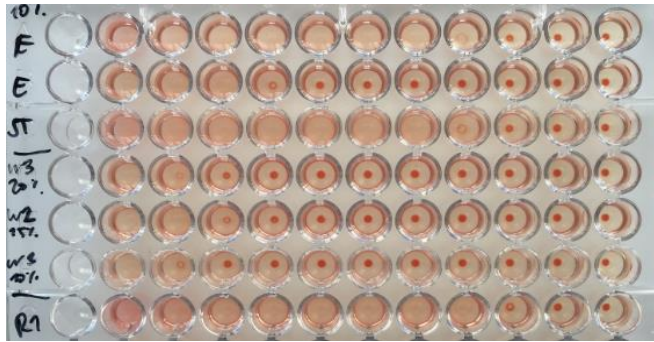


Рис. 2.11. РГА (Джерело: Інтернет-ресурс)

Швидкі тести на антигени (Cito-test)

Cito-test — це експрес-метод діагностики, який дозволяє виявити наявність **вірусних або бактеріальних антигенів** у зразках (зазвичай зі слизових оболонок носа, горла або сечі) за короткий час, часто упродовж 15-30 хвилин.

Механізм дії: швидкі тести базуються на **методі імунохроматографії**. На тестовій смужці містяться **антитіла**, які специфічно зв'язуються з **антигенами** збудника, якщо вони є у зразку (рис. 2.12).

Зразок (наприклад, слиз або слина) наноситься на тестову смужку. **Якщо в зразку присутні антигени, вони зв'язуються з антитілами, міченими барвником.** Зразок просочується через смужку завдяки капілярному ефекту. Це рухає зразок по смужці. У разі позитивного результату на смужці з'являється кольорова лінія, що свідчить про наявність антигену.

Переваги: швидке отримання результату. простота використання, не потребує складного лабораторного обладнання.

Недоліки: нижча чутливість порівняно з ПЛР, можливі хибнопозитивні або хибнонегативні результати, тому інколи потрібні додаткові методи підтвердження діагнозу.

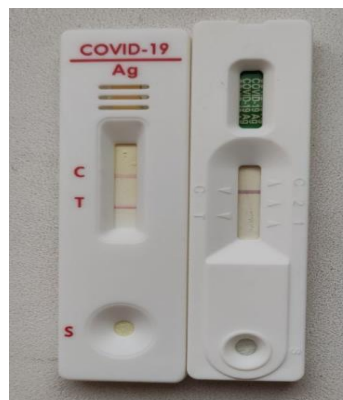


Рис. 2.12. Cito-тести (Ag) щодо COVID-19

Виявлення вірусних геномів за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР)

Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) — це молекулярний метод, який дозволяє виявляти навіть мінімальні кількості антигену вірусної або бактеріальної ДНК чи РНК в зразку.

Принцип: За допомогою специфічних праймерів* та ДНК-полімерази проводиться ампліфікація (багаторазове копіювання) специфічних ділянок вірусної чи бактеріальної нуклеїнової кислоти. Після цього виявляють збільшені кількості вірусної ДНК або РНК.

* *Праймер* — це коротка послідовність нуклеотидів, яка є необхідною для ініціації процесу ампліфікації ДНК або РНК в молекулярно-біологічних методах, таких як полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) або секвенування. Праймери служать як стартові точки для ДНК-полімерази, ферменту, який синтезує нові ланцюги нуклеїнових кислот (рис. 2.13).

Переваги: чутливий і специфічний метод, який дозволяє виявляти навіть незначну кількість збудника на ранніх стадіях інфекції.

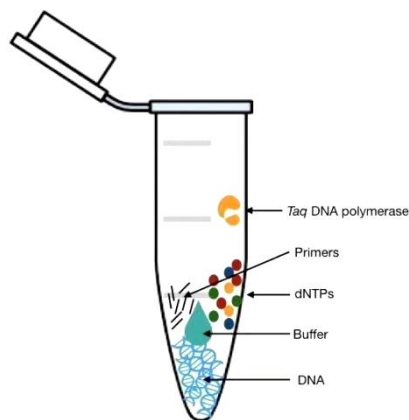


Рис. 2.13. Реактиви для проведення ПЛР (Джерело: Інтернет-ресурс)

Виявлення вірусних геномів за допомогою методу молекулярної детекції LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification)

LAMP (ізотермічна ампліфікація петлі) — це молекулярний метод, що дозволяє ампліфікувати (копіювати) специфічні ділянки ДНК або РНК при постійній температурі (молекулярна техніка, яка дозволяє ампліфікувати (копіювати) специфічні ділянки ДНК або РНК при стабільній температурі). Розроблений для виявлення нуклеїнових кислот без необхідності використання термоциклерів, що спрощує лабораторний процес. Він працює при постійній температурі, на відміну від традиційної ПЛР (полімеразної ланцюгової реакції), яка потребує термоциклювання.

Принцип роботи

Ізотермія: реакція LAMP проводиться при постійній температурі (від 60 до 65°C).

Специфічність: для цього методу використовуються кілька пар специфічних праймерів (зазвичай 4-6), які утворюють петлі (loop) в області ампліфікації (копіювання), що забезпечує високу специфічність до цільового геному.

Лінійна ампліфікація: LAMP використовує унікальні ферменти, які забезпечують швидке копіювання ДНК у вигляді концентричних кілець.

Детекція: результати часто візуалізують за допомогою різних індикаторів, таких як кольорові барвники або флуоресцентні з'єднання, які змінюють колір у присутності ампліфікованого матеріалу.

Механізм дії

Підготовка зразків: зразки, що містять вірусні геноми, підлягають екстракції нуклеїнових кислот (процес виділення ДНК або РНК з клітин або тканин для подальшого аналізу).

Налаштування реакції: у реакційну суміш додають специфічні праймери, ДНК або РНК полімерази, буфер та інші компоненти.

Ампліфікація: реакція проходить при постійній температурі, що дозволяє швидко отримати результати.

Детекція: результати перевіряють за допомогою візуальних індикаторів, що змінюють колір при наявності ампліфікованих продуктів.

Переваги: швидкість (LAMP дозволяє отримати результат за короткий час (30–60 хвилин), що швидше, ніж традиційна ПЛР). Простота, висока специфічність, чутливість, невибагливість до зразків - LAMP може працювати навіть з мінімально підготовленими зразками, такими як слина або кров.

Недоліки: складність набору праймерів, можливість хибнопозитивних результатів: Через високу чутливість методу існує ризик хибнопозитивних результатів, особливо за умов неправильного поводження зі зразками або контамінації. Обмежена кількість цілей - на відміну від ПЛР з використанням множинних праймерів (multiplex PCR), LAMP зазвичай орієнтований на одну або кілька послідовностей, що обмежує кількість генетичних мішеней, які можна одночасно ампліфікувати. Специфічне обладнання для візуалізації.

Геномні мікрочіпи (виявлення різних вірусів одночасно)

Геномні мікрочіпи (або ДНК-мікрочіпи, DNA microarrays) — це технологія, яка використовується для одночасного аналізу експресії великої кількості генів або для виявлення варіантів ДНК у геномі. Вона дозволяє дослідникам вивчати тисячі генів або поліморфізмів у різних зразках за один експеримент. Мікрочіп складається з мініатюрної пластини (скла або кремнію), на поверхні якої розміщені тисячі зон з фрагментами ДНК (рис. 2.14).



Рис. 2.14. Геном миші (праворуч) і людини (ліворуч) на ДНК-мікрочіпах
(Джерело: інтернет-ресурс Вікіпедія)

Принцип роботи геномних мікрочіпів:

- На поверхню чіпа наносяться олігонуклеотиди або фрагменти ДНК, які відповідають певним генам або ділянкам геному.

- ДНК або РНК зі зразка пацієнта екстрагується, а потім мічється (мітять) флуоресцентними мітками.

- Мічений зразок гібридизується* з ДНК на чіпі.

- Чіп сканується, а сигнал флуоресценції показує, наскільки сильно гібридизувалася ДНК з різними зонами, що відповідає рівню експресії генів* або наявності певних генетичних варіацій.

* *гібридизація* — це сполучення двох комплементарних нуклеотидних послідовностей (ДНК або РНК) для утворення гібридної молекули.

* *експресія генів* — процес, за допомогою якого інформація, закладена в генах, використовується для синтезу специфічних білків або РНК, які виконують різноманітні функції в клітині.

Геномні мікрочіпи можуть бути використані як експрес-метод для діагностики вірусних захворювань завдяки їх здатності одночасно аналізувати тисячі послідовностей ДНК або РНК. Вони дозволяють швидко ідентифікувати віруси, визначати штами та мутації, а також оцінювати вірусні навантаження.

- Геномні мікрочіпи використовуються для діагностики як ДНК-, так і РНК-вірусів. Це досягається завдяки тому, що РНК вірусу спочатку конвертують в комплементарну ДНК (кДНК) за допомогою зворотної транскрипції. Потім кДНК, отриману з вірусної РНК, можна аналізувати за допомогою мікрочіпів разом з ДНК-вірусами.

Принцип роботи геномних мікрочіпів у діагностиці вірусних хвороб:

- *Гібридизація нуклеїнових кислот* - мікрочіп містить специфічні олігонуклеотиди або послідовності ДНК/РНК, які відповідають генетичним матеріалам різних вірусів.

- *Підготовка зразка* - генетичний матеріал (ДНК або РНК) вірусу із зразка пацієнта (кров, слина, мазки) виділяється і мічється флуоресцентними мітками.

- *Гібридизація* - мічений генетичний матеріал зі зразка гібридується з ДНК, що знаходиться на чіпі. Якщо у зразку є вірусна послідовність, вона з'єднається з комплементарною ділянкою на мікрочіпі.

- *Виявлення сигналу* - після гібридизації чіп сканується, а інтенсивність флуоресцентного сигналу вказує на наявність і кількість вірусних часток або генетичних варіантів.

Переваги: одночасне виявлення кількох вірусів, швидкість, висока чутливість, ідентифікація мутацій і варіантів (мікрочіпи дозволяють виявляти не лише наявність вірусу, а й конкретні штами або мутації).

Недоліки: обмеження за кількістю відомих вірусів (мікрочіпи можуть виявляти тільки ті віруси або мутації, послідовності яких були заздалегідь нанесені на чіп. Це означає, що вони не можуть ідентифікувати нові або невідомі віруси), чутливість до контамінації, трудомісткість підготовки, висока вартість.

Виявлення лише антитіл (AT-Ig) у зразку

Експрес-тести для виявлення антитіл (IgM, IgG) за допомогою імунохроматографії

Експрес-тести для виявлення антитіл за допомогою імунохроматографії — це швидкий метод діагностики, який дозволяє визначити наявність специфічних антитіл (IgM, IgG) до інфекційних збудників у зразках крові, плазми або сироватки.

Механізм дії: Крапля крові або плазми наноситься на тестову смужку. Зразок просочується через смужку завдяки капілярному ефекту. Це рухає зразок по смужці. Якщо у зразку є **антитіла** до певного збудника, то вони (**антитіла**) зв'язуються з **антигенами**, нанесеними на смужку, які мають кольоровий маркер. При позитивній реакції на тестовій смужці з'являється кольорова лінія, що свідчить про наявність антитіл (рис. 2.15).

Виявляють **2** типи антитіл (Ig): **IgM** (антитіла, що вказують на гостру стадію інфекції або недавнє інфікування.) та **IgG** (антитіла, які свідчать про перенесену інфекцію або наявність імунітету)

Переваги: швидке отримання результатів, простота проведення, не потребує складного лабораторного обладнання.

Недоліки: менш точний порівняно з лабораторними тестами, можливі хибнопозитивні та хибнонегативні результати, не завжди визначає активну інфекцію, особливо при виявленні лише IgG антитіл.



Рис. 2.15. Експрес-тест для виявлення антитіл за допомогою імунохроматографії

Виявлення антитіл у реакції непрямої гемаглютинації (РГА непряма)

Дана реакція ґрунтується на здатності антитіл зв'язуватися з антигенами (вірус), які розташовані на поверхні еритроцитів, що приводить до їх злипання. У лунки мікротитраційної пластинки додають розведені зразки з патматеріалу та еритроцити з антигеном (відомим). Інкують при температурі +37°C протягом 30-60 хв. Якщо реакція позитивна, то відбувається аглютинація (антитіла з патматеріалу зв'язуються з антигенами вірусу, які присутні на поверхні еритроцитів).

Виявлення антитіл, які нейтралізують дію вірусу у реакції нейтралізації (РН)

Реакція нейтралізації (РН) ґрунтується на здатності антитіл блокувати активність вірусів чи токсинів, не дозволяючи їм уражати клітини. Якщо в зразку крові є антитіла до певного патогену (антигену), вони зв'язуються з ним, нейтралізуючи його інфекційні властивості. Це дозволяє з'ясувати, чи має організм захист проти конкретного вірусу або токсину.

Принцип методу: до зразка з патматеріалу додають підозрюваний збудник досліджуваної хвороби – відомий вірус або токсин (антиген), аби дати можливість антитілам, із зразка патматеріалу, зв'язатися з ним та утворити комплекс антиген-антитіло. Зразок залишають на певний час для взаємодії антитіл із антигенами – інкують. Далі у зразок додають клітини (це чутливі клітини, які даний вірус зазвичай вражає, за відсутності антитіл). Якщо антитіла у зразку присутні, то клітини не пошкоджуються.

Позитивна реакція – відсутність руйнування клітин свідчить про наявність антитіл, здатних нейтралізувати вірус чи токсин.

Цей метод застосовують для діагностики різних вірусних інфекцій, оцінки імунітету після вакцинації та дослідження імунної реакції організму.

Імуноблотинг (вестерн-блотинг)

Імуноблотинг (вестерн-блотинг) — це метод, що дозволяє виявляти специфічні білки в зразках, таких як кров або тканини. Це дуже корисний інструмент у ветеринарії для діагностики захворювань, вивчення імунних відповідей на вакцини та інших досліджень. Ось просте пояснення етапів цього методу:

Принцип методу:

Розділення білків: спочатку беруть зразок патматеріалу (наприклад, сироватку крові) і розділяють білки за розміром. Це робимо за допомогою електрофорезу — процесу, в якому зразок поміщають в гель і пропускають електричний струм. Білки переміщуються у гелі: менші молекули йдуть далі, а більші — залишаються ближче до стартової лінії.

Перенесення білків на мембрану: після розділення білків переносимо їх на спеціальну мембрану (нітроцелюлозну або полівініліденфторидну). Це дозволяє нам працювати з білками у зручному форматі.

Блокування: мембрану обробляють блокуючими речовинами, щоб запобігти зв'язуванню антитіл не з тими білками, які нас цікавлять.

Додавання первинних антитіл: додаємо антитіла, які специфічно зв'язуються з білком-мішенню. Це антитіла можуть бути отримані з інших тварин (наприклад, кроликів або курей).

Додавання вторинних антитіл: Після того як первинні антитіла зв'язалися з білками, додають другі антитіла, які мають мітку (наприклад, фермент або барвник). Ці вторинні антитіла зв'язуються з первинними.

Візуалізація: виявлення зв'язаних антитіл. Це можна зробити за допомогою реагентів, які реагують з мітками на вторинних антитілах, утворюючи кольорову реакцію або світіння. Це дозволяє побачити, чи є досліджуваний білок у зразку, і в якій кількості.

Застосування у ветеринарії

Цей метод дуже чутливий і дозволяє отримувати точні результати, що робить його важливим інструментом у ветеринарній медицині для діагностики захворювань, перевірки імунної відповіді та вивченні специфічних білків, які можуть бути маркерами хвороб.

Методи, завдяки яким виявляють антиген (АГ) або антитіло (АТ-Ig) залежно від мети досліджень

Виявлення антигенів/антитіл за допомогою імуноферментного аналізу (ІФА) - метод ELISA

Імуноферментний аналіз (ІФА), також відомий як ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) — лабораторний метод для виявлення та кількісного визначення **антигенів або антитіл** у зразках крові, плазми або

інших біологічних рідинах. Він широко використовується в діагностиці інфекційних захворювань, а також для перевірки імунного статусу (рис. 2.16).

Механізм дії: метод ELISA базується на **взаємодії антитіл з антигенами**, з подальшим використанням **ферменту**, який **перетворює безбарвний субстрат у забарвлений продукт**, що дає можливість візуально або спектрофотометрично оцінити результат.

Принцип дії:

1. *Закріплення антигену або антитіла:* зразок, що містить антиген або антитіло, додається до спеціальної мікропланшетки, де вони зв'язуються з поверхнею.

2. *Додавання реагенту:* додають специфічне антитіло (якщо в зразку антиген) або антиген (якщо зразок містить антитіло), мічене ферментом. Це забезпечує зв'язування з аналізованою молекулою.

3. *Промивання:* видаляються всі незв'язані молекули, залишаючи лише зв'язаний комплекс.

4. *Додавання субстрату для ферменту:* додають субстрат, який фермент перетворює в кольоровий продукт. Інтенсивність кольору пропорційна кількості аналізованої речовини в зразку.

5. *Вимірювання результату:* інтенсивність кольору визначається за допомогою спектрофотометра, що дозволяє кількісно оцінити концентрацію аналізованої речовини.

Типи ІФА (ELISA)

- **Прямий ELISA:** визначає антиген у зразку, використовуючи антитіла, мічені ферментом.

- **Непрямий ELISA:** використовується для виявлення антитіл. Відомий мічений антиген фіксується на планшеті, і зразок з антитілами зв'язується з антигеном.

- **Сендвіч-ELISA:** виявляє антигени за допомогою двох різних антитіл — AT_1 - для фіксації антигену, а AT_2 - для його детекції.

- **Конкурентний ELISA:** використовується для точного вимірювання кількості антигену або антитіла.

Переваги: висока точність і чутливість, можливість автоматизації процесу для одночасної обробки багатьох зразків, визначення якості (наявність) та кількості антитіл/антигенів.

Недоліки: потребує спеціального лабораторного обладнання, відносно тривала процедура, порівняно з експрес-тестами, можливість хибнопозитивних результатів через перехресну реакцію антитіл.



Рис. 2.16. Обладнання для проведення ІФА (Навчально-наукова клініко-діагностична лабораторія факультету ветеринарної медицини Поліського університету)

Виявлення антигенів та антитіл одночасно комбінованими (мультикомплексними) швидкими тестами

Такі тести зазвичай використовують для виявлення інфекційних захворювань, де можна виявити як антиген вірусу, так і специфічні антитіла, що свідчать про імунну відповідь організму.

Такі тести використовуються для діагностики інфекційних захворювань у тварин, таких як:

вірусні інфекції: наприклад, тести для виявлення антитіл і антигенів вірусу парвовірусу у собак або вірусів, що викликають респіраторні захворювання у котів.

бактеріальні інфекції: бактеріальні антигени разом з антитілами, що виробляються у відповідь на інфекцію.

паразитарні інфекції: виявлення антитіл до певних паразитів (наприклад, дирофілярії) і їх антигенів.

Принцип методу ґрунтується аналогічний до швидких тестів на антигени, чи антитіла. Використовують методику імунохроматографії.

Оцінка результатів: позитивний результат - наявність кольорової лінії або зміна кольору в області тесту (Т-тест) вказує на те, що антиген або антитіла присутні у зразку.

Деякі серологічні реакції з коротким терміном обліку результатів (реакція аглютинації (РА), реакція зв'язування комплементу (РЗК), РП (реакція преципітації))

Серологічні реакції з коротким терміном обліку результатів забезпечують швидке виявлення антитіл або антигенів у біологічних зразках. Серед таких методів – реакція аглютинації, яка дозволяє визначити антитіла шляхом утворення видимих агрегатів у присутності антигену; реакція зв'язування комплементу, яка показує наявність антитіл через взаємодію з комплементом; та реакція преципітації, що ідентифікує розчинні антигени або антитіла завдяки утворенню осаду. Ці методи широко використовуються для діагностики інфекцій, оскільки забезпечують швидкі та точні результати.

Таким чином, експрес-методи дослідження матеріалу, що містить віруси, є важливим інструментом сучасної діагностики інфекційних захворювань, оскільки забезпечують швидке та точне виявлення вірусів. Технології ПЛР (полімеразної ланцюгової реакції), LAMP (ізотермічної ампліфікації петлі) та геномних мікрочіпів дозволяють виявляти вірусні інфекції на ранніх етапах, визначати штами, мутації та кількість вірусу (ПЛР+геномні мікрочіпи). Ці методи відзначаються високою чутливістю та специфічністю, що є критично важливим для ефективної терапії, епідеміологічного моніторингу та запобігання поширенню інфекцій.

Переваги експрес-методів включають швидкість отримання результатів, можливість одночасного виявлення кількох патогенів та здатність проводити дослідження в умовах обмежених ресурсів або у польових умовах. Проте потреба у спеціальному обладнанні, ризик хибнопозитивних результатів і висока вартість окремих методів, вимагають подальшого вдосконалення та адаптації.

Загалом, застосування сучасних експрес-методів у діагностиці вірусних інфекцій значно підвищує ефективність контролю та лікування, що має вирішальне значення для зменшення впливу вірусних захворювань тварин.

Контрольні запитання та завдання

1. Що таке експрес-методи досліджень і які їх основні переваги при діагностиці вірусних інфекцій?
2. Які основні принципи застосування експрес-методів для виявлення вірусів у патологічному матеріалі?
3. Як швидко можна отримати результат дослідження вірусомісного матеріалу за допомогою ПЛР-методів?
4. Як застосування лінійних аналізаторів (мікрофлюїдних пристроїв) допомагає у швидкій діагностиці вірусів?
5. Які переваги має використання експрес-тестів на базі технології лантанідних елементів для вірусної діагностики?

6. Як за допомогою методів імунофлуоресценції можна виявити вірусні частки у біологічних зразках?
7. Які типи вірусів найчастіше виявляються за допомогою експрес-методів, і чому?
8. Як використовуються антигенні тести для швидкої діагностики вірусних інфекцій у тварин?
9. Як визначається специфічність і чутливість експрес-методів для вірусологічної діагностики?
10. Яким чином тестування на швидку детекцію вірусів у сироватці крові може допомогти в ранній діагностиці?
11. Як експрес-методи використовуються для виявлення вірусів при епідеміях чи спалахах інфекцій?
12. Які переваги мають тест-системи на основі молекулярно-генетичних методів для швидкої діагностики вірусних хвороб?
13. Як виконуються експрес-тести на визначення вірусних антитіл у крові?
14. Які методи дозволяють провести експрес-діагностику вірусних інфекцій без необхідності складного обладнання?
15. Як визначається вірусна навантаженість за допомогою швидких тестів, таких як ЛФА (латексна аглютинація)?
16. Як експрес-методи допомагають виявити віруси при аналізі зразків з нижніх дихальних шляхів?
17. Як застосовується метод побудови звукових хвиль для виявлення вірусів у крові?
18. Які переваги і недоліки має використання експрес-методів порівняно з класичними лабораторними методами дослідження?
19. Як визначається ефективність експрес-методів для виявлення вірусів у різних тканинах і органах тварин?
20. Як експрес-методи дослідження застосовуються для ідентифікації нових чи незнайомих вірусів?
21. Як оцінюється точність результатів експрес-методів при виявленні вірусів у лабораторних тварин?
22. Як проведення експрес-діагностики може допомогти в прогнозуванні епідемій серед тварин?
23. Як використовуються експрес-тести для виявлення вірусів, що передаються через слину або сечу?
24. Яким чином використовуються імунохімічні методи для ідентифікації вірусів на ранніх стадіях інфекції?

ВЕТЕРИНАРНА ІМУНОЛОГІЯ

Тема 1. Імунітет. Види імунітету. Рівні вивчення імунітету. Фактори неспецифічної резистентності Органи імунної системи

Імунологія – одна з найскладніших біологічних дисциплін. В наш час вона бурхливо розвивається, має дуже важливе значення, а вчені-імунологи займаються і фундаментальною наукою, і практичними питаннями:

- розробляють специфічні методи дослідження, що використовуються в гуманній медицині, ветеринарії та екології (діагностика хвороб, моніторинг стану оточуючого середовища);
- виготовляють препарати для профілактики хвороб, для покращання імунітету організму людини і тварин (**вакцини, сироватки, імуностимулятори та імуномодулятори**);
- виготовляють специфічні, очищені препарати, призначені для проведення лабораторної діагностики (**діагностикуми**);
- досліджують механізми роботи імунної системи.

Імунна система – це скупчення лімфоїдних органів, тканин та клітин, тому її морфологічним синонімом є термін **лімфоїдна система**. Вона призначена для захисту організму від чужорідних речовин різних типів та різного рівня складності. Маса даного дифузного органу у людини складає приблизно 1,5-2 кг.

Імунна система генералізована по всьому організму; її **клітини (імуноцити або імунокомпетентні клітини)** постійно циркулюють через кровоток.

Види імунітету

Імунітет – це багатогранна і багаторівнева система захисту організму, що являє собою сукупність захисних клітинних та гуморальних механізмів, за допомогою яких, макроорганізм здатний знешкоджувати чужорідні агенти (рис.3.1). Розуміння імунітету дозволяє розглядати його різнобічно:

 захист *новонароджених організмів* (**вроджений імунітет, неспецифічний, спадковий**) і той, що *формується з часом* (**набутий, специфічний імунітет**);

 захист, що формується *природним шляхом, після перехворювання* (**природний імунітет**) або *за рахунок введення вакцин* (**штучний імунітет – активний або вакцинний**) та *сироваток* (**штучний імунітет – пасивний або сироватковий**), *прийому спеціальних препаратів*;

 захист, що формується для боротьби з *інфекційними агентами* (**протибактеріальний імунітет, протигрибковий імунітет, противірусний імунітет, протипаразитарний імунітет, інфекційний імунітет, неспецифічний і специфічний імунітет**), з наступним повним виведенням

(стерильний імунітет) чи затримкою збудника в організмі (нестерильний імунітет);

✚ захист, що формується для боротьби з *неінфекційними агентами* (трансплантаційний імунітет, неінфекційний імунітет, протипухлинний імунітет);

✚ захист, який *забезпечує мати під час годування новонародженої дитини* (колостральний імунітет);

✚ захист, який *проводять клітини імунної системи* (клітинний імунітет) або продукти їх обміну, наявні в рідинах та секретах організму (гуморальний імунітет).

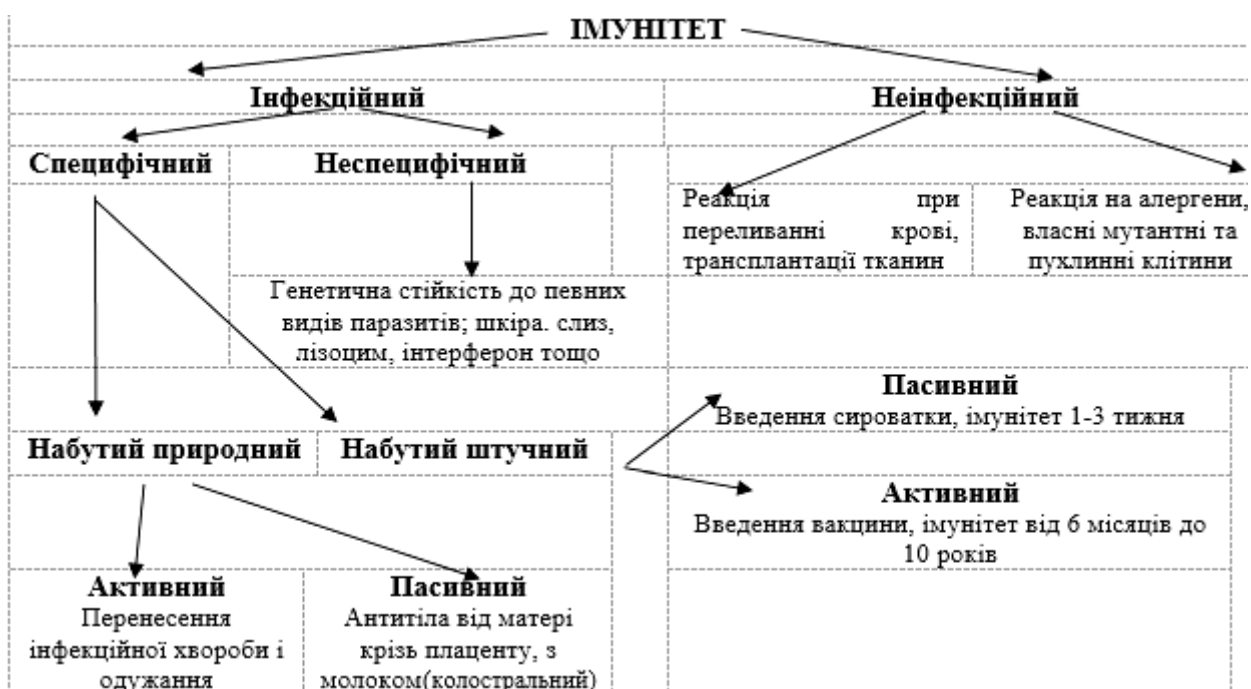


Рис 3.1. Види імунітету

Різні види імунітету відрізняються:

- типом чужорідної речовини, на появу якої виникає реакція;
- швидкістю утворення механізму;
- тривалістю після виведення чужорідного агента.

Окрім «імунітету» існує так зване явище – імунізуюча субінфекція.

Імунізуюча субінфекція – прихована інфекція, що виникає у тварин при постійному потраплянні низьковірulentного збудника (низька здатність до можливості спричинення хвороби) в організм тварин. При цьому хвороба не виникає, але при зниженні резистентності макроорганізму збудник може викликати клінічні ознаки. Дане явище можна виявити лише за допомогою імунобіологічних реакцій.

В реальності реакції **неспецифічного (вроджений, природний, спадковий) імунітету** (*генетична стійкість до певних видів антигенів*) тісно пов'язані із біохімічними реакціями **специфічного імунітету (набутий, штучний)**.

Основи як природного (вродженого), так і набутого імунітету закладаються *в ембріональний період*. Але **набутий імунітет** визначається імунологічною історією певного організму (інфекційні хвороби, щеплення, хірургічні та інші втручання, пересадка органів тощо). Реакції **набутого імунітету** формуються *в постнатальному періоді*, після зустрічі певних типів імунних клітин з чужорідними речовинами.

В організмі ссавців звільнення від чужорідних клітин (антигенів) та речовин (антигенів) здійснюється двома шляхами, які пов'язані між собою:

1. за участю відповідних клітин. Процеси, в яких робота клітин є головною, відносять до **клітинного імунітету**.

2. за допомогою метаболітів (продуктів обміну) різних клітин. Ці речовини надходять в рідини організму і там взаємодіють з чужорідними агентами. Такі процеси відносять до **гуморального імунітету**.

Таким чином, у ссавців системи **природного і набутого, клітинного та гуморального імунітету** тісно взаємодіють. Це підвищує ефективність роботи імунної системи.

Назва	Віруси	Патогенні прокаріоти (мікоплазми, хламідії, рикетсії, бактерії, актиноміцети)	Патогенні і гриби	Найпростіші (амеби, лейшманії, трипаносомы, лямблі та ін.)	Гельмінти
Розмір	$10^{-4} - 10^{-3}$ мм	$10^{-4} - 10^{-2}$ мм	10^{-2} мм	$10^{-3} - 10^{-1}$ мм	$1 - 10^3$ мм

Рис. 3.2. Інфекційні агенти з якими взаємодіє імунна система

До переліку чужорідних речовин необхідно ще додати **токсини, мутантні і онкоклітини організму**, а також – **трансплантовані тканини і алергени**.

Надалі, у вищих хребетних збільшується кількість різноманітних клітин, з'являються мутантні клітини., і це потребує виникнення **протипухлинного захисту**.

В організмі ссавців від народження працюють і **неімунні фізіологічні фактори** захисту, які діють на поверхні оболонки організму людини чи тварини, в тканинах і тканинних рідинах. Такий захист забезпечують відповідні клітини (**клітинний захист**) та їх речовини (**гуморальний захист**) на, так званих, **перших лініях захисту**.

Перші лінії захисту

1. **Механічний бар'єр шкіри** (непошкоджена шкіра);
2. **Низький рівень рН, кислотність на рівні 5,5** на поверхні шкіри (молочна кислота, жирні кислоти із секретів потових і сальних залоз) та в слизі статевих органів (речовини молочнокислих та біфідобактерій).

3. Виведення антигенів за допомогою руху війок і видалення слизово-серозного секрету дихальних шляхів, обмивання оболонок (сльози, слина, сеча, секрети носової порожнини)

4. Активні складники секрету різних залоз (лізоцим, соляна кислота, бактеріоцини та фунгіциди мікробів шлунково-кишкового тракту).

Тому поняття резистентності включає в себе механізми:

- фізіологічної стійкості;
- роботу корисних мікробів (нормофлора);
- роботу певних груп імуніцитів та виділених ними метаболітів.

Окрім перших лінії захисту, існує поняття **факторів неспецифічної резистентності (неспецифічні фактори захисту).**

Фактори неспецифічної резистентності

Дані фактори захисту включають **механічні, хімічні, мікробіологічні фактори захисту та мононуклеарну фагоцитарну систему.**

До механічних факторів захисту відносять: змивання мікроорганізмів рухом рідини і повітря упродовж епітеліальних покривів;

До хімічних факторів захисту відносять: жирні кислоти (шкіра), ферменти і лізоцим (речовина, яка розміщена у слині і має бактерицидні властивості), фермент пепсин, низька кислотність шлунку тощо.

До мікробіологічних факторів захисту відносять: конкуренція нормальної мікрофлори, продукування антибактеріальних сполук, які локалюють розмноження патогенних збудників в організмі.

Клітини мононуклеарної фагоцитарної системи (ретiculoендотеліальної системи): клітини мікроглії; гістіоцити; альвеолярні макрофаги; клітини Купфера; мезенхіальні клітини; макрофаги; моноцити; нейтрофіли; промоцити тощо.

Отже, неспецифічні фактори природної резистентності – це зумовлені механізми на генетичному рівні, які спрямовані на відновлення нормального стану організму за якогось порушення: сльози, слина, блювання, нюх, слиз, миготливий епітелій, кашель, рН шлунку, лізоцим, протеолітичні ферменти, пронос, анаеробний стан, нормальна мікрофлора, линька, жирні кислоти, нормальна мікрофлора тощо.

Рівні вивчення імунітету

Молекулярний — виникає в організмі на рівні взаємодії антитіл з антигеном та формування цитокінів (на рівні молекул).

Клітинний — при формуванні даного імунітету задіяні клітинні лімфоїдні клітини комплексу, тобто лімфоцитів.

Органний — формується органами лімфоїдно-мієлоїдного ряду.

Організмівий — формується на рівні цілого організму, який залежить від функціонування нейрогуморальних чинників і їх впливу на стан імунітету.

Популяційний — формується на рівні популяції тварин чи в колективах людей і сприяє збереженню збудника в живих популяціях.

Органи імунної системи

Розрізняють центральні та периферичні органи імунної системи. Центральні органи (**кістковий мозок, тимус, фабріцієва сумка (бурса)**) відповідають за утворення і диференціацію клітин-імуноцитів, які заселяють організм і забезпечують всі його імунні реакції (**імунологічну реактивність**). В центральних органах імуноцити (клітини імунної системи) дозрівають, далі – мігрують у периферичні. Сполучення між органами здійснюється кровоносними та лімфатичними судинами.

Спільне у всіх органів імунної системи.

Усі органи імунної системи забезпечують організм клітинами імуноцитами та створюють умови для їх **розподілу (міграції)** в тканинах.

Відмінне між органами імунної системи.

Центральні органи - забезпечують початкові стадії диференціації клітин. Периферичні органи – відповідають за остаточну диференціацію, спеціалізацію, розмноження цих клітин.

Імунна система у хребетних різних видів має свої структурні особливості, а кожен з органів відрізняється від іншого морфологічними особливостями, призначенням та інше.



Рис. 3.3. Органи імунної системи

Центральні органи імунної системи

Кістковий мозок. Основний орган гемопоезу (кровотворення) - **місце утворення і диференціації стовбурних клітин**. Саме ці клітини є матеріалом для всіх лімфоїдних тканин. Закладка кісткового мозку у людини відбувається на 12-14 тижні вагітності. На 20-му тижні спостерігається значне збільшення кількості стовбурних клітин. Нащадки цих клітин надалі заселяють всі лімфоїдні органи. У зрілого організму кожен день певна кількість стовбурних клітин евакуюється з кісткового мозку в інші органи імунної системи (2% у лабораторних гризунів, у людини та інших тварин – ще остаточно невідомо).

Тимус (загрудинна або вилючкова залоза). До 60-х років 20 ст. вважався непотрібним органом. Його значення для організму хребетних з'ясували австралійські та американські вчені, насамперед - австралієць Міллер. В тимусі

відбувається дозрівання і диференціація окремої групи (популяції) імуніцитів. Даний орган має максимальну активність і найбільшу масу у новонароджених хребетних. В подальшому залоза дещо атрофується. Якщо цей процес не відбувається, макроорганізм чекають важкі захворювання. Тимус «керує» питаннями клітинного імунітету, відповідає за знищення патогенних грибів, вірусів, попередників пухлин, приймає участь у відторгненні чужорідних тканин при трансплантації.

Бурса або фабрицієва сумка у птахів. Даний орган знайдено тільки у птиці. Розвивається на 10-й день з епітелію кишок в районі клоаки. Структура сумки подібна до структури тимусу, хоча імуніцити, які в ній розвиваються, називаються В-лімфоцити.

Периферичні органи імунної системи

Кожний периферичний орган контролює певну ділянку тіла – на периферії: *селезінка* – кровоносну систему, *лімфатичні вузли* – лімфатичні шляхи, *лімфоїдні тканини мигдаликів* – дихальні шляхи, *пейерові бляшки та апендикс* – шлунково-кишковий тракт. **Всі периферичні органи об'єднані лімфатичними та кровоносними судинами в єдину систему.** Тому всі частини організму під час виведення антигенів можуть працювати скоординовано і ефективно!

Лімфатичні вузли (коливання розмірів від 0,2 до 20 см) розміщуються по ходу лімфатичних судин і закладаються на 3-4 місяці вагітності. Зустрічаються як поодинокі вузли, так і їх скупчення. В перші місяці життя відбувається остаточна структуризація. Зрілість лімфовузла визначається частотою зустрічі з антигенами. **Відповідають як за клітинний, так і за гуморальний імунітет, затримують чужорідні частинки, пухлинні клітини, руйнують еритроцити.**

Перед потраплянням в кровообіг лімфа проходить крізь один чи декілька лімфовузлів. Їх можна порівняти з фільтрами, які лежать на шляху лімфи, котра пливе від менших до більших лімфатичних судин.

Всі судини мають клапани, які забезпечують однонаправлений прохід лімфи крізь судини і вузол.

До основних функцій лімфовузла належать:

- фільтрація лімфи, затримування вільних та зв'язаних антигенів (мікроорганізми, пухлинні клітини, дрібні чужорідні молекули);
- накопичення та розмноження Т- і В-лімфоцитів.

Лімфоїдні утворення шлунково-кишкового тракту (пейерові бляшки, апендикс, плазмоцити слизової оболонки) функціонують в складі слизових оболонок кишечника. **Захищають організм від бактеріальних та харчових антигенів, виробляють толерантність до останніх.** Закладаються на 9-15 тижні вагітності, остаточно формуються на 20-й тиждень. **Імунний захист шлунково-кишкового тракту завжди відбувається разом із дією неспецифічних факторів резистентності (шлунковий сік, перистальтика,**

оновлення клітин епітелію кишечника, дія корисних мікроорганізмів, дія лізоциму, муцину, інтерферону).

Аденоїди та мигдалики знаходяться на початку дихального та травного каналів. Першими контактують із антигенами, які надходять з повітрям, водою, їжею. На поверхні мигдаликів, які мають розвинену поверхню знаходяться клітини-імуноцити 3-х різних типів, їх речовини, які розпізнають антигени, лізоцим, інтерферон тощо. **Тому мигдалики інтенсивно здійснюють місцевий захист**, в тому числі, і противірусний.

Селезінка відповідає, в основному, за гуморальний імунітет, за фізіологічну деструкцію тромбоцитів та еритроцитів. Відіграє важливу роль в процесах диференціації імунних клітин. Селезінка вкрита капсулою, всередині – біла та червона пульпа, структурний каркас для клітин різних типів утворюють трабекулярні тяжі. **В селезінці знаходяться різні типи клітин** Більша частина з них – це В-лімфоцити (до 50%), Т-лімфоцитів 25-35%. Імуноцити знаходяться в білій пульпі, в червоній – переважають еритроцити.

Таким чином, центральні, і периферичні органи: закладаються на ранніх стадіях вагітності і сформовані на момент народження, їх розвиток певний час продовжується; функції зберігаються впродовж всього життя, але з віком спостерігається певна редукція органів (морфологічна або секреторна).

Контрольні запитання та завдання

1. Як імунітет у тваринному організмі захищає від інфекцій і захворювань?
2. Як імунітет у тварин реагує на проникнення патогенів?
3. Які основні механізми імунітету забезпечують ефективну боротьбу з інфекціями у тварин?
4. Як у тваринному організмі відбувається розвиток адаптивного імунітету після зараження?
5. Які існують види імунітету в організмах тварин?
6. Чим відрізняються природний і набутий імунітет у тварин?
7. Що таке імунітет специфічний і неспецифічний, і як вони взаємодіють у тварин?
8. Яка роль імунітету в популяціях тварин у контексті епідеміологічної ситуації?
9. Як імунітет вивчається на клітинному рівні?
10. Які основні методи вивчення молекулярних механізмів імунної відповіді у тварин?
11. Як впливають генетичні фактори на індивідуальні відмінності в імунітеті у тварин?
12. Як дослідження тканин та органів дозволяють оцінити ефективність імунної відповіді у тварин?
13. Яким чином дослідження імунітету на організмовому рівні сприяє розробці вакцин та терапевтичних засобів?

14. Які фактори неспецифічної резистентності беруть участь в захисті організму тварин від інфекцій?

15. Яку роль відіграють фагоцити в першій лінії захисту організму тварини?

16. Яка роль запальних процесів у формуванні неспецифічної резистентності організму тварин?

17. Які органи імунної системи є ключовими для формування імунної відповіді у тварин?

18. Як лімфатичні вузли сприяють розвитку імунної відповіді при зараженні патогенами?

19. Яка роль селезінки в імунному захисті тварин?

20. Як тимус (вилочкова залоза) впливає на розвиток імунітету у тварин?

21. Яким чином кістковий мозок бере участь у формуванні клітин імунної системи?

Тема 2. Поняття антигенів. Властивості антигенів

Чужорідні елементи, що порушують генетичну сталість макроорганізму називаються **антигенами**. При появі таких речовин в організмі:

- утворюються специфічні сполуки;
- активується цілий ланцюг захисних реакцій.

Антиген (АГ) – це речовина або сукупність речовин, після взаємодії з якими імунна система організму утворює специфічні клітини і сполуки, робота яких направлена на знешкодження чужорідної речовини.

Антигени бувають **природні та штучні** (табл. 3.1)

Природні антигени

За іншою класифікацією до **корпускулярних антигенів відносять:**

1. Цілісні віруси, клітини патогенних мікробів, грибів, найпростіших, гельмінтів;
2. Цілісні клітини інших організмів (переливання крові, трансплантація тканин);
3. Дефектні клітини макроорганізму (мутантні та пухлинні);
4. Уламки мікробних клітин та вірусів (цілісні органоїди, уламки органоїдів, речовини цитоплазми тощо);
5. Власні речовини макроорганізму (аутоантигени);
6. Токсини мікроорганізмів, комах, тварин або рослин;
7. Білки пилка рослин, харчових продуктів, екскрементів кліщів (алергени).

До розчинних антигенів відносять:

1. Речовини антропогенного походження (алергени);
2. Речовини цитоплазми зруйнованих клітин.

Табл. 3.1. Види антигенів

Курпускулярні АГ - різні клітини та їх різні частинки: бактерії, гриби, найпростіші.
Розчинні АГ - білки різного ступеня складності: полісахариди, гіпополісахариди тощо.
КсеноАГ - АГ клітин та тканин, які відрізняються від реципієнта на видовому рівні.
АлоАГ - АГ тканин і клітин, які відрізняються від реципієнта на внутрішньовидовому рівні.
Трансплантаційні АГ - АГ клітинних поверхонь, які контролюються головним комплексом гістосумісності.
АутоАГ - АГ власних клітин.
Алергени - АГ їжі, пилу, пилку рослин, отрута комах, які викликають підвищену реактивність організму.
Толерогени - АГ клітин, які викликають арективність.
Синтетичні АГ - штучно синтезовані полімери амінокислот, вуглеводів.
Кон'юговані АГ - прості хімічні сполуки в основному ароматизованого ряду.

Властивості антигенів (АГ)

1. Антигенність (чужорідність).

Антигени чужорідні для організму-хазяїна і тому всі мають таку властивість як антигенність.

Але слід розуміти, що клітини і речовини імунної системи реагують лише на антигени з високою молекулярною вагою (не нижче 10000 Да) – дані антигени імунна система здатна «побачити».

2. Імуногенність (здатність викликати імунну відповідь).

Такі речовини називаються повними антигенами і, окрім антигенності, володіють імуногенністю.

Низькомолекулярні речовини (антибіотики, наркотики, токсичні речовини, речовини фарб, пральних порошків, деякі бактеріальні поліцукри, регулярні поліпептиди, ліпіди і т.п.) при попаданні в організм *не можуть викликати імунної відповіді* – так як імунна система «не бачить» дані антигени.

Такі субстанції вище вказані *низькомолекулярні речовини*) називають гаптенами (неповними антигенами). *Гаптени розрізняються за молекулярною масою*: важчі називаються складними гаптенами, легкі – простими. При з'єднанні гаптена (неповного антигена) із білками харчових продуктів (шлепер або носій) виникає новий, іноді – дуже небезпечний – антиген (кон'югований антиген), який здатний викликати високу імунологічну відповідь.

Таким чином, антиген – це будь-який агент, що специфічно зв'язується з рецепторами імуніцитів, імуноген – це об'єкт, здатний розпочати весь ланцюг багатостадійних імунологічних реакцій.

Найкращими антигенами є полімери з різноманітною будовою (прості білки, складні білки – ліпопротеїни, глікопротеїни і т.п., поліцурри). Всі перелічені речовини називають повними антигенами. Вони не тільки існують у природі, але й утворюються штучним шляхом з продуктів діяльності цивілізації.

3. Специфічність антигену (здатність мати індивідуальну будову).

Зв'язок антигену з відповідними речовинами або клітинами імунної системи відбувається не по всій його поверхні, а тільки в певній частині (антигенна детермінанта або епітоп). Антиген, що має багато епітопів, називається полівалентним. Антиген, що має один епітоп називається моновалентним.

Іноді при стресових станах для організму - речовини патогена (мікроба), який викликав хворобу з'єднується із речовинами організму (складний гаптен + носій). Тоді утворюється аутоантиген. Аутоантигени – це речовини організму, які сприймаються імунною системою як антигени (чужорідні речовини), які потрібно знищити і виникають аутоімунні захворювання.

Мікробні антигени та їх локалізація

Патогенні мікроорганізми (бактерії) мають в своєму складі величезну кількість полімерних речовин, і кожна з них є потенційним антигеном (рис. 3.4).

Але макроорганізм (організм тварини) в першу чергу реагує на антигени, зосереджені в зовнішніх структурах мікроба (джгутики, фімбрії, капсула, клітинна стінка). Після відмирання і руйнування мікроба його включення, рибосоми, ендоферменти стають потенційними антигенами, на які організм реагує у другу чергу (табл. 3.1).

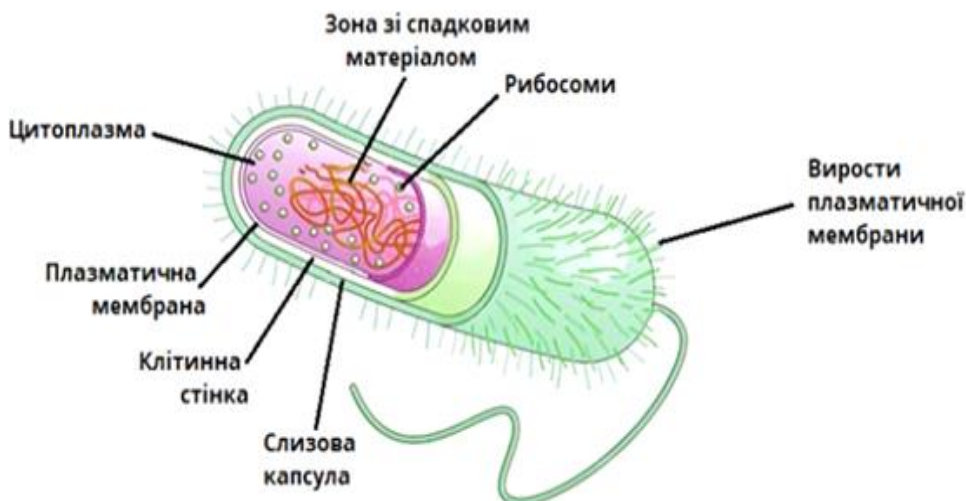


Рис. 3.4. Розміщення антигенів у бактерій (Джерело: Інтернет-ресурс)

Табл. 3.1. Локалізація антигенів в організмі бактерій

Тип антигену	Організм мікроба, в якому знаходяться антигени	Хімічні речовини
1. Капсульні, К-антигени	Капсула	Поліцукри, поліпептиди
2. Поверхневі	Зовнішня поверхня клітинної стінки	Поліцукри, поліпептиди, глікопептиди
3. Соматичні, О-антигени	Внутрішня поверхня клітинної стінки, цитоплазматична мембрана	Комплекси ліпідів, поліцукрів та поліпептидів; ендотоксини грам – бактерій
4. Джгутикові, Н-антигени	Джгутики	Білки

Джгутикові Н-антигени представлені білком *флагеліном*. Руйнується при нагріванні, після обробки фенолом зберігає антигенні властивості.

К-антигени (капсульні) зв'язані з ліпополіцукрами клітинної стінки, представлені кислими поліцукрами (*глюкуронова, галактуринона та інші уронові кислоти*). Капсульні антигени поліцукри знайдені у пневмококів, клебсіел та інших бактерій з макрокапсулою. У бацилл сибірки капсульний антиген складено з поліпептидів.

У мікробів виділяють групоспецифічні антигени (наявні у різних видів роду чи родини), видоспецифічні - у представників одного виду та типоспецифічні або варіантні антигени - у різних штамів (сероварів) всередині одного виду.

Вірусні антигени та їх локалізація

Вірусні антигени — це молекули або фрагменти молекул, які розпізнаються імунною системою як чужорідні, що запускає імунну відповідь. Вони можуть бути представлені на різних частинах вірусу і виконують роль мішені для антитіл або клітин імунної системи (рис. 3.5).

Типи вірусних антигенів та їх локалізація:

Капсидні антигени:

Локалізація: знаходяться в капсиді вірусу (білковій оболонці, що захищає генетичний матеріал вірусу).

Поверхневі антигени:

Локалізація: на зовнішній поверхні вірусу або на оболонці вірусу (якщо вірус має ліпідну оболонку).

Внутрішні антигени:

Локалізація: всередині вірусу або в цитоплазмі інфікованих клітин.

Глікопротеїнові антигени:

Локалізація: на поверхні вірусів з оболонкою, інтегровані в ліпідний шар оболонки.

Нуклеопротейнові антигени:

Локалізація: знаходяться у складі комплексу вірусної РНК або ДНК із білками, які стабілізують геном.

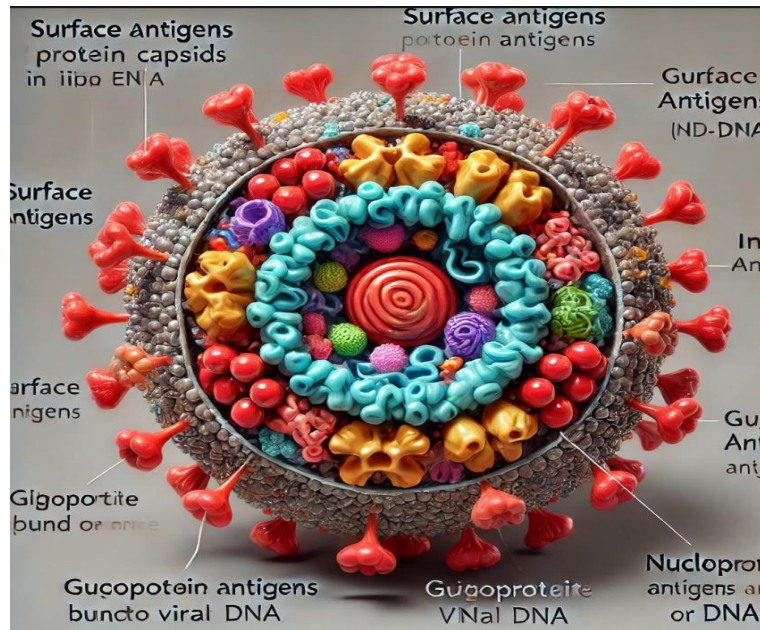


Рис. 3.5. Вірусні антигени (джерело: *ШП*)

Імунна відповідь на вірусні антигени може включати як гуморальну (антитіла), так і клітинну (Т-клітини) реакцію, залежно від типу антигену та локалізації його у вірусі або в клітині (рис. 3.6).

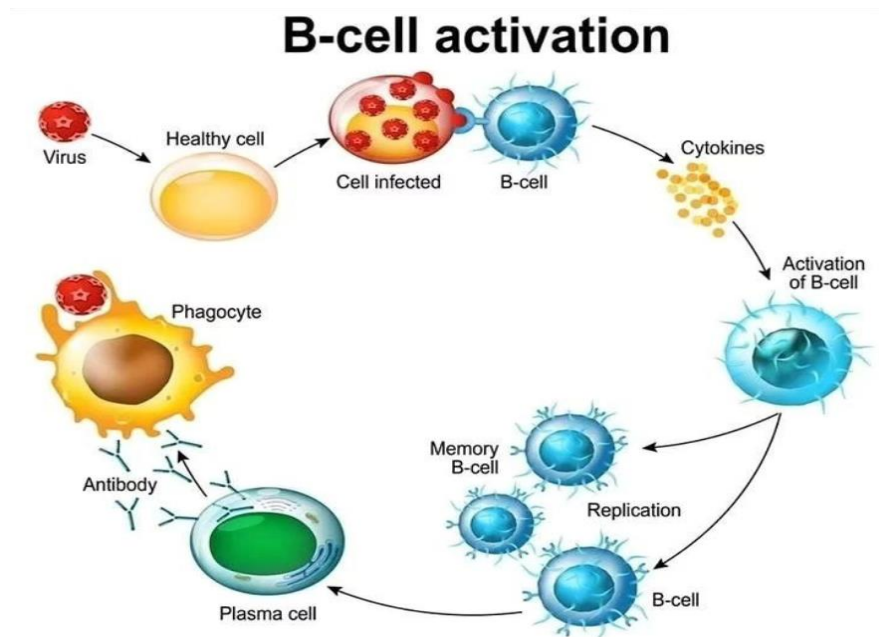


Рис. 3.6. Активація В-клітин (В-лімфоцитів) як частини імунної відповіді на вірусну інфекцію (Джерело: *vigyaankaksha*)

Вірус інфікує клітину: спочатку вірус потрапляє до здорової клітини-господаря та інфікує її. Це запускає процес імунної реакції.

Активація В-клітин: інфікована клітина (вірусні антигени) активують В-клітини. Для цього необхідні цитокіни — сигнальні молекули, які виділяються іншими клітинами імунної системи (наприклад, Т-клітинами), щоб допомогти В-клітинам активуватися.

Реплікація та диференціація В-клітин: після активації В-клітини починають ділитися (реплікація). Деякі з цих клітин стануть плазматичними клітинами, а інші перетворяться на клітини пам'яті.

Плазматичні клітини: вони відповідають за продукцію антитіл, які спеціалізуються на розпізнаванні та нейтралізації вірусів.

Фагоцит: фагоцити — це клітини, які поглинають і знищують інфіковані клітини або віруси, що були позначені антитілами (імуноглобулінами).

Клітини пам'яті: після інфекції частина В-клітин зберігається як клітини пам'яті, що забезпечує швидку реакцію імунної системи при повторному контакті з тим самим вірусом.

Контрольні запитання та завдання

1. Що таке антиген і яку роль він відіграє в імунному процесі?
2. Які основні типи антигенів існують і чим вони відрізняються?
3. Як антигени стимулюють імунну відповідь у організмі?
4. Чим відрізняються екзогенні антигени від ендогенних?
5. Яка роль антигенів у розвитку імунної пам'яті у тварин?
6. Як антигени взаємодіють з рецепторами на поверхні імунних клітин?
7. Яким чином антигени можуть бути знешкоджені організмом?
8. Як антигенні властивості змінюються залежно від природи патогена?
9. Яка роль антигенів у розвитку специфічних захворювань у тварин?
10. Як антигени допомагають визначити тип інфекції у тваринному організмі?
11. Які основні властивості антигенів визначають їх здатність викликати імунну відповідь?
12. Як молекулярна маса антигену впливає на його антигенність?
13. Що таке епітоп і як він пов'язаний з антигенними властивостями молекули?
14. Як структура антигену визначає специфічність імунної відповіді?
15. Які фактори можуть змінювати антигенні властивості молекул?
16. Як виявляється антигенна варіабельність у різних вірусів і бактерій?
17. Яким чином антигенна стійкість до імунних відповідей сприяє розвитку патогенів?
18. Які властивості антигенів визначають їх здатність викликати алергічні реакції?
19. Як хімічний склад антигену впливає на його взаємодію з антитілами?
20. Яка роль глікопротеїнів та гліколіпідів у антигенній активності?

21. Як антигени можуть змінювати свою структуру для уникнення імунного контролю?
22. Як різні антигенні детермінанти впливають на ефективність вакцин?
23. Як здатність антигену до взаємодії з МНС (макрофагами) впливає на імунну відповідь?
24. Як визначити антигенні властивості при дослідженні вірусних або бактеріальних інфекцій?
25. Яка роль антигенів у діагностиці інфекційних хвороб у ветеринарії?

Тема 3. Штучні антигени (вакцини)

Типи вакцин. Хронологія створення вакцин

Проведення вакцинації різним видам тварин

Чужорідні елементи, що порушують генетичну сталість макроорганізму називаються **антигенами**. При появі таких речовин в організмі:

- утворюються специфічні сполуки;
- активується цілий ланцюг захисних реакцій.

Антиген (АГ) – це речовина або сукупність речовин, після взаємодії з якими імунна система організму утворює специфічні клітини і сполуки, робота яких направлена на знешкодження чужорідної речовини.

Антигени бувають **природні та штучні**.

Стимулювати захисні сил макроорганізму можна, якщо вводити в нього мікробні антигени. Такий підхід застосовувався людиною здавна і має назву вакцинація. Для створення штучного активного імунітету використовують **вакцини**. Для створення штучного пасивного імунітету використовують **імунні сироватки**. Вакцини та імунні сироватки є біопрепаратами.

Біопрепарати – це засоби біологічного походження, які використовують у ветеринарії для проведення запобіжних та вимушених щеплень для **діагностики** інфекційних хвороб (діагностикуми), **лікування** хворих тварин (імунні сироватки) та **підвищення їх імунітету** (вакцини).

Сучасні біопрепарати, в складі яких антигени патогенних мікробів потрапляють до організму тварини або людини, називаються **вакцинами**.

Сучасні біопрепарати, в складі яких антитіла до певних інфекційних хвороб потрапляють до організму тварини або людини, називаються **імунологічними сироватками**.

Вакцини – штучні біологічні препарати, до складу яких входять частинки або клітини збудників (віруси, бактерії, гриби, мікоплазми і т.п.), штучно вирощені в лабораторіях або комплекси їх речовин синтетичного походження (ефективні антигени). Ефективна вакцина активізує механізми і гуморального, і клітинного імунітету.

Термін «вакцина» було вперше використано Дженнером (1798р.) при виготовленні препарату для щеплення проти віспи. Основні принципи вакцинації було розроблено Пастером (80-ті роки 19 ст.), який для створення

біопрепаратів використовував **висушування, прогрівання та ослаблення збудника шляхом щеплення несприйнятливій тварині (атенуація).**

З появою теорії клональної селекції Бернета (1957р.) стало зрозумілим, що антигени вакцин спричинюють розмноження клонів специфічних лімфоцитів, обов'язково залишаючи популяцію клітин пам'яті. Саме вони (**В- і Т- клітини пам'яті**) здатні індукувати вторинну імунну відповідь при повторній зустрічі із збудником хвороби.

Ці препарати повинні містити **головні антигени збудника (оптимальна кількість і активність мінімум шкідливості для макроорганізму).**

Специфічні вимоги ідеальної вакцини

Стабільна, знаходиться у формі, зручній для введення.

Забезпечує ефективний захист після введення одної дози.

Не здатна заражати невакцинованих тварин. Не викликає побічних реакцій. Сумісна з іншими медичними препаратами.

Створює у більшості тварин вакцинованої популяції імунітет, інтенсивність якого аналогічна (або більша) імунітету, що виникає у перехворівшої тварини.

При виробництві вакцини потрібно зробити так, щоб до її складу входили тільки основні (ефективні для забезпечення імунітету) антигени.

Типи вакцин

Вакцини відрізняються походженням, активністю, будовою та кількістю видів антигенів в них, набором додаткових речовин (табл. 3.2, табл. 3.3).

Табл. 3.2. Коротка характеристика різних типів вакцин

Тип вакц	Жива, атенуована, ослаблена	Інактивована, вбіта.	Хімічна (анатоксин)	Кон'югована
Характеристика вакцини	Живі патогенні мікроби з ослабленою вірулентністю (дія фізичних, хімічних факторів)+ стабілізатор	Мертві клітини збудника, вбиті дією фізичних або хімічних факторів + консервант + ад'ювант.	Молекулярні комплекси, виділені з патогенних мікробів або їх токсини	Антигенний матеріал зв'язаний з носієм (білки. поліцукри. синтетичні полімери).

Якщо вакцину будь-якого виду зроблено з мікробів конкретної тварини і препарат може використовуватись тільки для неї, тоді його називають **аутовакциною.**

Для проведення ефективної вакцинації не використовують високо очищені антигени, так як вони мають меншу імуногенність.

Табл. 3.3. Характеристика різних типів вакцин за складом

Характеристики, за якими класифікують вакцини	Показники, характерні для даної класифікації	Тип вакцини
1. Кількість видів мікробів у складі вакцини	антигени одного виду мікробів	Гомологічна
	Антигени декількох видів мікробів	Змішана, асоційована
	антигени одного виду мікробів з додаванням особливих, спеціально ідентифікованих антигенів інших видів. Саме така комбінація створює надійний імунітет	Гетерологічна
2. Кількість хвороб, яким запобігає вакцина	Декілька хвороб (в складі вакцини декілька видів мікробів)	Полівалентна
	Одна хвороба	Моновалентна

Ефективність вакцин можна підвищити шляхом додавання різноманітних неантигенних речовин (ад'ювантів імунітету). Ад'ювант вводиться перед щепленням або одночасно з вакциною. Ад'юванти – це речовини, які не є антигенними для організму, але використання яких підсилюють ефект вакцинації шляхом створення депо у місці введення вакцини, де накопчуючись антигени поступово та протягом тривалого часу надходять в організм вакцинованої тварини (табл. 3.4).

Табл. 3.4. Види ад'ювантів

Види ад'ювантів	Мінеральні (неорганічні) речовини	<i>Гідроксид алюмінію, фосфати алюмінію та кальцію, активоване вугілля</i>
	Органічні речовини	<i>Олії, жири, вуглеводи, кофеїн, спирт</i>
	Мікробні антигени	<i>Уламки мембран, рибосоми, окремі білки або ліпіди мікробного походження</i>
	Синтетичні речовини	<i>Пептиди, глікопептиди, полінуклеотиди</i>
	Речовини імунної системи	<i>Препарати з тимусу, речовини кісткового мозку.</i>

Додавання таких речовин значно збільшує кількість захисних речовин, які виділяються при первинному введенні вакцини. У випадку наявності ад'юванту антигени зосереджуються в місці введення (утворення депо). При внутрішньо м'язевому або внутрішньо черевному введенні АГ утримується у місці введення багато часу і повільно виділяються впродовж декількох років. Виникає місцеве «запалення», яке краще виявляється і знешкоджується імунною системою макроорганізму.

Також існує декілька речовин, які називаються ад'ювантами прямої дії. Вони не утворюють депо, а безпосередньо стимулюють певні ланки імунної системи (інактивовані ліпополісахаридні ендотоксини бактерій, вітамін А).

Хронологія створення вакцин

При виробництві вакцини потрібно зробити так, щоб до її складу входили тільки основні (ефективні для забезпечення імунітету) антигени. При експериментальних вакцинаціях 100% захисту групи людей або стада досягти неможливо.

Завжди знайдуться тварини, які утворять незначну кількість захисних речовин (захворюють) або навіть загинуть. Якщо у більшості тварин (70-80%) імунітет створюється, то ланцюг передачі інфекції розривається і масової хвороби (епізоотія, епідемія) не виникає. Розрізняють 4 покоління створення вакцин (табл 3.5).

Табл. 3.5. Хронологія створення вакцин

Покоління вакцин	Вид вакцини	Характеристика біопрепарату
1 покоління	Живі = ослаблені = атенуйовані	<u>Корпускулярні вакцини.</u> Цілісні клітини збудників.
2 покоління	Хімічні вакцини, анатоксини	Окремі фракції збудників або їх метаболіти
3 покоління	Векторна Генно-інженерна Делеційна (маркерна) Прокапсидна	<u>Рекомбінантні вакцини.</u> Препарати, створені методами генної інженерії, мікроорганізми з додатковими нетрадиційними генами
4 покоління	Синтетичні пептидні, Плазмідні ДНК-вакцини	Окремі речовини збудника або їх генетичні попередники, молекулярні „мішені” для імунної системи тварини або людини

Вакцини, виготовлені на принципах, розроблених Луї Пастером та його учнями, називаються **традиційними** (антигени + консерванти, підсилювачі імунітету – **ад'юванти** або стабілізатори). Існують також нетрадиційні вакцини. **Нетрадиційні вакцини** належать до типу синтетичних та генно-інженерних (3-4 покоління) (табл 3.6).

Вакцини всіх типів та всіх поколінь можуть містити: клітини збудника одного виду; набір клітин збудників різних видів; набір клітин, що належать до різних сероваріантів одного виду; набір антигенів, що належать одному або декільком видам збудників хвороб.

Табл 3.6. Характеристика вакцин 3-го та 4-го покоління

Субодиничні або молекулярні вакцини		
Спліт-вакцини	Синтетичні вакцини	Генно-інженерні вакцини
Накопичення вірусу або клітинного мікроорганізму, виділення та очистка його окремих речовин	Хімічний синтез мікробних антигенів	Мікробіологічний синтез нетрадиційних антигенів в рекомбінантних вакцинах
Виділення та очищення ключових антигенів збудника без втрати їх біологічних властивостей	Синтез певної амінокислотної послідовності – епітопу антигену збудника	Штучно зроблені гени збудника додають до геному <i>E.coli</i> , <i>Bac.subtilis</i> , дріжджів <i>Sac.cerevisiae</i> для подальшої продукції вірусних білків

Інтенсивність першої реакції імунної системи пропорційна кількості введеного антигену. Кількість антигену, що вводиться в макроорганізм при вакцинації, залежить від багатьох факторів: від виду мікроба; від ступеня його активності у вакцині; від виду макроорганізму, що підлягає вакцинації; від типу вакцини

Необхідно зазначити, що різні види вакцин по-різному вводяться в організм. **Живу вакцину (атенуйовану)**, яка містить живого, але ослабленого збудника вводять одноразово. Одна доза вакцини забезпечує утворення захисних речовин в макроорганізмі у високій концентрації. **Вбиту вакцину (інактивовану)**, яка містить вбитого збудника хвороби, вводять двічі та більше. Первинна реакція імунної системи не забезпечує стійкого імунітету. Тому, через певний проміжок часу, проводять другу і якщо потрібно – третю і т.п. ін'єкцію антигенів. В разі випадку нестійкого імунітету після першої ін'єкції, повторне введення вакцини відбувається через декілька тижнів (2-4) або декілька місяців (3-6 місяців). Терміни введення вторинної дози (бустер-дози) для кожного типу вакцини, для кожного виду тварин встановлюються в експерименті і порушувати їх не можна. При передчасному, і при пізньому попаданні нової порції антигенів кількість захисних речовин буде незначною, макроорганізм не зможе «запам'ятати» формули ліків. В результаті, незважаючи на трикратне введення біопрепарату, імунітет не утвориться.

Ефективність вакцини також залежить від місця та способу ведення препарату (внутрішнь'язово, у вигляді аерозолі – інтраназально, парентерально). Зміна місця і способу щеплення може підвищити рівень штучного імунітету.

Вибір вакцини проводять в залежності від: виду тварини та технологія ведення тваринництва; наявності хвороб на певній території та ступеню розповсюдження інфекцій; зручності введення препарату; тривалості імунітету, який забезпечує вакцина.

При штучному введенні в організм вакцин (антигенів), особливо – високо імуногенних – знижується природна резистентність. Це призводить до зниження стійкості тварин проти умовно-патогенної мікрофлори.

Особливості специфічної профілактики вірусних хвороб для різних видів тварин

Табл. 3.7. Проведення вакцинації різним видам тварин

Вид тварин	Місце введення	Спосіб введення	Типи вакцин
Велика рогата худоба (ВРХ)	Підшкірно в ділянку шиї або за лопаткою; Внутрішньом'язово в м'язи шиї або стегна	Підшкірне введення: під кутом 45°; Внутрішньом'язове: під прямим кутом	Ящур, лептоспіроз, пастерельоз, сибірка
Свині	Внутрішньом'язово в м'язи шиї або стегна	Внутрішньом'язове: введення в м'язи	Класична чума, ротавірус, парвовірус, респіраторні інфекції
Коні	Внутрішньом'язово в шию або стегно	Внутрішньом'язове: введення в м'язи шиї	Сказ, грип, правець, енцефаломієліти, ботулізм
Собаки	Підшкірно в ділянку холки або стегна; Внутрішньом'язово в стегно	Підшкірне: під кутом 45°; Внутрішньом'язове: в м'язи стегна	Сказ, чума, парвовірус, аденовірус, лептоспіроз, бордетельоз
Коти	Підшкірно в холку або стегно; Внутрішньом'язово в стегно	Підшкірне: між лопатками; Внутрішньом'язове: у стегно	Сказ, панлейкопенія, котячий герпесвірус, кальцивіроз, лейкоз
Кролі	Підшкірно в область шиї або спини	Підшкірне введення: під шкіру	Вірусна геморагічна хвороба кролів, міксоматоз
Птиця (кури, індики, качки)	Інтраназальне; Внутрішньом'язово в грудний м'яз; Ін'єкція в крило	Інтраназальне: вакцина капається в ніздрі; Внутрішньом'язове: введення в грудний м'яз; Ін'єкція в крило	Ньюкаслська хвороба, віспа, інфекційний бронхіт, ларинготрахеїт
Дрібна рогата худоба (вівці, кози)	Підшкірно за лопаткою; Внутрішньом'язово в шию або стегно	Підшкірне: під кутом 45°; Внутрішньом'язове: у м'язи шиї або стегна	Бруцельоз, сибірка, оспа овець, ентеротоксемія
Риби	Ін'єкційне введення в м'язи або черевну порожнину; Оральне введення через воду або корм	Ін'єкційне: введення в м'язи або черевну порожнину; Оральне: вакцина у воді або кормі	Вірусна геморагічна септицемія, інфекційний некроз підшлункової залози

Контрольні запитання та завдання

1. Що таке штучні антигени і яку роль вони відіграють в імунній відповіді?
2. Які види вакцин можна віднести до штучних антигенів?
3. Як вакцинація сприяє створенню імунної пам'яті в організмі?
4. Яка різниця між активною та пасивною вакцинацією?
5. Як штучні антигени використовуються для профілактики інфекційних захворювань?
6. Як визначити ефективність вакцин як штучних антигенів?
7. Які типи вакцин (цілісні, субодиничні, генні) використовуються у ветеринарії для захисту тварин?
8. Як технологія створення вакцин на основі рекомбінантних ДНК сприяє розвитку нових штучних антигенів?
9. Які переваги та недоліки має використання ослаблених або інактивованих вірусів в вакцинації тварин?
10. Яка роль ад'ювантів у створенні ефективних вакцин для тварин?
11. Як визначають безпеку вакцин перед їх використанням у ветеринарії?
12. Які фактори можуть впливати на стабільність та ефективність вакцин, що містять штучні антигени?
13. Як вакцини, що містять штучні антигени, захищають тварин від вірусних та бактеріальних інфекцій?
14. Як штучні антигени допомагають знижувати рівень захворюваності та смертності серед тварин?
15. Яка різниця між вакцинацією домашніх тварин і диких тварин?
16. Як новітні вакцини з штучними антигенами допомагають боротися з збудниками, що швидко мутують?
17. Яким чином вакцинація з використанням штучних антигенів змінює епідеміологічну ситуацію у популяціях тварин?
18. Як ефективність вакцин з штучними антигенами може залежати від вікових та фізіологічних особливостей тварини?
19. Які новітні методи синтезу штучних антигенів використовуються для розробки вакцин?
20. Як вакцинація за допомогою штучних антигенів допомагає забезпечити колективний імунітет у популяціях тварин?
21. Як вакцинація з використанням штучних антигенів може допомогти у боротьбі з антибіотикорезистентними інфекціями?
22. Які методи використовуються для моніторингу довгострокової ефективності вакцин, що містять штучні антигени?
23. Як штучні антигени можуть бути використані для розробки вакцин проти збудників, що передаються від тварин до людей (зоонози)?
24. Як вакцинація з використанням штучних антигенів може допомогти знизити економічні втрати в агропромисловому комплексі?

Тема 4. Клітини імунної системи

Поняття імуноглобулінів

Імунна система є складною та багаторівневою захисною структурою організму, яка відіграє ключову роль у підтриманні його цілісності та захисті від інфекційних агентів. Центральним елементом цієї системи є клітини імунної системи — спеціалізовані клітини, які розпізнають, нейтралізують та знищують патогенні мікроорганізми й інші чужорідні частинки. Кожен тип імунних клітин виконує свою унікальну функцію, і разом вони формують ефективний захисний механізм, який постійно адаптується до нових загроз (рис. 3.7). Серед основних клітин імунної системи виділяються лімфоцити (Т- і В-клітини), макрофаги, нейтрофіли, еозинофіли, базофіли, а також природні кілери (NK-клітини). Лімфоцити забезпечують специфічний імунітет, створюючи пам'ять про патогени, тоді як інші клітини здатні до швидкої, але неспецифічної реакції. Всі ці клітини тісно взаємодіють, координуючи свої дії через сигнальні молекули — цитокини, що дозволяє їм реагувати на загрози злагоджено і швидко (рис. 3.8). Вивчення клітин імунної системи має велике значення для ветеринарної та медичної практики, оскільки знання про їхню функціональну активність та взаємодію дозволяє розробляти нові методи лікування та профілактики інфекційних і аутоімунних захворювань.

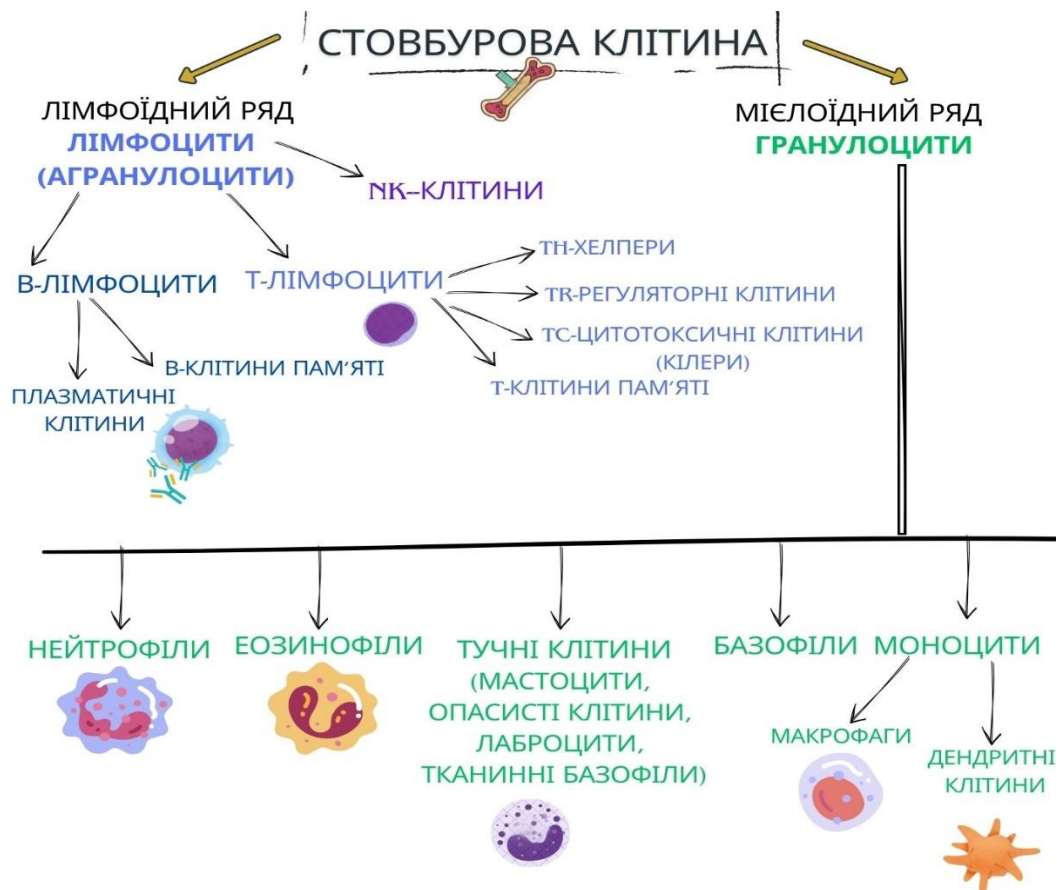


Рис. 3.7. Клітини імунної системи

	Базофіли і тучні клітини	Нейтрофіли	Еозинофіли	Моноцити і макрофаги	Лімфоцити і плазмацити	Дендритні клітини
						
% клітин у крові	рідко	50-70%	1-3%	1-6%	20-35%	NA
Первинна функція(і)	Виділення медіаторів, що викликають запалення і алергічну реакцію	перетравлення і знищення збудників	Знищення збудників, особливо паразитів	Перетравлення і знищення збудників, презентація антигенів	Специфічна відповідь на збудник, включаючи синтез антитіл	Розпізнає збудник і активує інші клітини імунної системи, презентуючи антиген
Класифікації	фагоцити					
	гранулоцити					
			Цитотоксичні клітини		Цитотоксичні клітини (деякі типи)	
				Антиген - презентуючі клітини		

Рис. 3.8. Коротка характеристика деяких клітин імунної системи (Джерело: @medicos.lover)

Клітини імунної системи забезпечують роботу клітинного імунітету. До клітин імунної системи належать клітини, які забезпечують **специфічні та неспецифічні фактори захисту**.

• **Неспецифічні фактори захисту забезпечують:**

• **Фагоцити, які проявляють дію за рахунок фагоцитозу (піноцитозу):**
Фагоцити поділяють на **професійні та факультативні фагоцити**.

Професійні фагоцити – це мікрофаги (нейтрофіли, еозинофіли), моноцити крові та макрофаги тканин (макрофаги печінки, мікроглії, макрофаги сполучної тканини, макрофаги, остеобласти кісткової тканини, тощо).

Факультативні фагоцити – фагоцити, які мають низьку фагоцитарну активність: фібробласти сполучної тканини, ретикулярні клітини кісткового мозку, епітеліоцити синусів печінки та селезінки, лімфатичних вузлів, еозинофіли у крові та клітини Лангенгаса.

Пригадайте!

Стадії фагоцитозу: 1. Адгезія (прилипання) часточок або молекул на фагоциті; 2. Формування фаголізосоми у фагоциті, внаслідок поглинання фагоцитом часточок антигену; 3. Перетравлення лізосомальними ферментами фагоциту антигену.

• **Природні кіллери (NK-клітини)** – клітини, які проявляють **цитотоксичну дію**. За природою вони великі гранулярні лімфоцити (частина вродженого імунітету). Дані клітини не мають специфічних рецепторів на оболонках як, наприклад, у Т- і В- лімфоцитах.

• **Специфічні клітинні фактори захисту забезпечують:**

- **Т-лімфоцити (тимусні).**

• Т-лімфоцити відповідають за координацію імунної відповіді та пряме знищення інфікованих клітин.

Лімфоцити, які відіграють головну роль в імунній відповіді та клітинному імунитеті. Саме зрілі Т-лімфоцити мають на мембранах спеціальний Т-клітинний рецептор, який розпізнає АГ, які приєднані до головного комплексу гістосумісності (В-лімфоцити, та природні кіллери даних рецепторів не мають). Т-лімфоцити НЕ РОЗПІЗНАЮТЬ РОЗЧИННІ АГ. Розпізнавання можливе лише у комплексі з білками головного комплексу гістосумісності.

Субпопуляції Т-лімфоцитів:

- **Т-хелпери** – розпізнають АГ на поверхні антиген-презентуючих клітин: дендритні клітини, макрофаги, В-лімфоцити. Після розпізнавання дають початок клону комплементарному до антигену.

Т-хелпери ділять на два типи:

1. **Т-хелпери₁** – відповідають за клітинний імунітет. Дані Т-клітини виділяють речовини (інтерлейкін-1), які стимулюють дію цитотоксичних клітин, які вражають клітини-мішені (антигени) та макрофагів.

2. **Т-хелпери₂** – активують гуморальний імунітет. Дані Т-клітини виділяють речовини (інтерлейкін-2), завдяки яким синтезуються молекули для взаємодії з В-лімфоцитами.

- **Т-кіллери (Т-цитотоксичні клітини)** – клітини, які після активації мігрують у кров, «пливуть» до місця, де є патоген (антиген)-клітини-мішені та знищують їх.

- **Т-супресори (Т-регуляторні клітини)** – клітини, які здатні пригнічувати клітинну та гуморальну ланку імунітету. Дані клітини регулюють імунологічну толерантність до власних антигенів, модулюючи імунну систему вони запобігають автоімунним хворобам.

- **Т-клітини пам'яті** – клітини, які посилюють імунну відповідь після повторного введення бустер-дозы вакцини, або повторної зустрічі із природним збудником.

- **В - лімфоцити.**

• В-лімфоцити відповідають за вироблення антитіл, що зв'язуються з антигенами патогенів і нейтралізують їх або мітять для знищення іншими імунними клітинами.

Клітини, які забезпечують гуморальну імунну відповідь. Основна роль В-лімфоцитів синтез АТ (Ig) та презентація антигенів Т-клітинам. На поверхні В-лімфоцитів присутні імуноглобуліни (АТ), які є своєрідними «рецепторами» для антигенів (АГ). До того як В-лімфоцит активується, він є «наївним» або неактивним. Після зустрічі *Т-хелперами₂*, які передають інформацію про АГ, В-лімфоцит активується, розмір збільшується – така клітина має назву лімфобласт. Далі лімфобласт трансформується або у плазматичні клітини

(живуть не довше 3х тижнів), які здатні синтезувати розчинні АТ (Ig), або у В-клітини пам'яті (зберігаються роками).

- Макрофаги (моноцити периферійної крові).

•Макрофаги відіграють центральну роль у первинній, і вторинній імунній відповіді, забезпечуючи як захист від інфекцій, так і підтримку гомеостазу тканин. _Основні функції макрофагів: 1. фагоцитоз, 2. презентація АГ Т-лімфоцитам, 3. виділення цитокінів (сигнальні молекули, які регулюють імунну відповідь викликаючи запалення та привертаючи інші імунні клітини до місця інфекції), 4. Відновлення пошкоджених тканин і регенерація ран, 5. Активація імунних клітин (імуноцитів) НК-клітин, нейтрофілів та Т-лімфоцитів.

Найбільші клітини крові- одноядерні лімфоцити. З крові моноцити потрапляють у тканини, де перетворюються у макрофаги, які здатні до активного фагоцитозу і здатні вбивати бактерії. Моноцити активніші до вірусних антигенів, ніж до бактерій. Також дані клітини не руйнуються після взаємодії з АГ (при вірусних ураженнях немає гною) - макрофаги. Моноцити – представляють Т-лімфоцитам антигени – антигенпрезентуючі клітини. Наприклад, нейтрофіли при взаємодії з бактеріями (АГ) руйнуються, тому і утворюється гній. Тому нейтрофіли та еозинофіли – є мікрофагами (вони поглинаються невеликі частинки АГ, при цьому і руйнуються).

•Дендритні клітини.

це ключові регулятори імунної системи, які визначають, коли і як організм запускає імунну відповідь на інфекції або інші загрози. Основні функції: презентація АГ Т-лімфоцитам (основна функція!), активація Т-клітин (Дендритні клітини доставляють антигени до лімфоїдних органів (лімфатичні вузли, селезінка), де вони контактують з наївними Т-лімфоцитами та активують їх), захоплення АГ, індукція імунної толерантності.

Клітини, які розміщуються у тканинах, що контактують з навколишнім середовищем (шкіра, слизові оболонки носа, легень, шлунка, кишечника), мають дендритні відростки та виконують антигенпрезентуючу функцію – переносять інформацію з місць свого розміщення до лімфовузлів про ознаки вірусів і бактерій, які є антигенами, для їх подальшого розпізнавання та формування специфічної імунної відповіді (взаємодіють з Т- та В-лімфоцитами).

Антигенпрезентуючі клітини:

моноцити+макрофаги,
лімфоцити+плазмоцити,
дендритні клітини.

Спільні та відмінні ознаки між Т- та В- лімфоцитами представлені у табл. 3.8. Спільні ознаки:

Походження - обидва типи лімфоцитів походять із стовбурових клітин кісткового мозку.

Тип імунної відповіді - обидва беруть участь в адаптивному (специфічному) імунитеті, який забезпечує захист від конкретних патогенів.

Антигенна специфічність - І Т-, і В-лімфоцити мають рецептори, що розпізнають специфічні антигени.

Активація - Обидва типи лімфоцитів активуються за участі антигенпрезентувальних клітин (дендритних клітин або макрофагів).

Пам'ять - І Т-, і В-лімфоцити можуть створювати клітини пам'яті, що забезпечують тривалий імунний захист після першого контакту з патогеном.

Табл. 3.8. Відмінні ознаки між Т- та В- лімфоцитами

Ознака	Т-лімфоцити	В-лімфоцити
Місце дозрівання	Дозрівають у тимусі (вилочковій залозі)	Дозрівають у кістковому мозку
Тип імунної відповіді	Опосередковують клітинний імунитет	Відповідають за гуморальний імунитет
Основна функція	Виявляють і знищують інфіковані або аномальні клітини	Продукують антитіла для нейтралізації патогенів
Тип рецептора	Т-клітинний рецептор (TCR)	В-клітинний рецептор (BCR)
Різновиди	Основні підтипи: Т-хелпери (CD4⁺), Т-кілери (CD8⁺), Т-регулятори	В основному диференціюються в плазматичні клітини та клітини пам'яті
Механізм дії	Напрямую атакують інфіковані клітини або контролюють активність інших імунних клітин	Виділяють антитіла, які нейтралізують патогени в позаклітинному середовищі
Активація	Активуються через презентацію антигену МНС на поверхні інших клітин (дендритних клітин, макрофагів)	Активуються внаслідок контакту з антигеном і допомогою від Т-хелперів
Тривалість життя	Можуть жити довше, як клітини пам'яті	Плазматичні клітини здебільшого короткотривалі, але В-клітини пам'яті можуть існувати тривалий час

Поняття імуноглобулінів (Антитіл)

Антитіла (АТ) (імуноглобуліни (Ig)) – білкові структури, які синтезує макроорганізм у відповідь на проникнення антигену (рис. 3.9.). Вони забезпечують захист організму від патогенів, розпізнаючи та зв'язуючи їх. Імуноглобуліни мають різну будову і функції тому їх ділять на 5 класів (Ig G, Ig M, Ig A, Ig E, Ig D). Наприклад, при алергічних запаленнях та паразитарному ураженні в організмі різко зростає концентрація імуноглобулін класу Е.

У сироватці крові найбільше імуноглобулінів класу G, A, M.

У молозиві G, M, A.

Антитіла в організмі проводять преципітацію, обсонізацію, лізис, зв'язування, аглютинацію та нейтралізацію збудників та їх токсинів.

Усі антитіла мають різний період напіввиведення G (28 діб), M (8 діб), A (8 діб), E (2-3 доби) та D (8 діб).

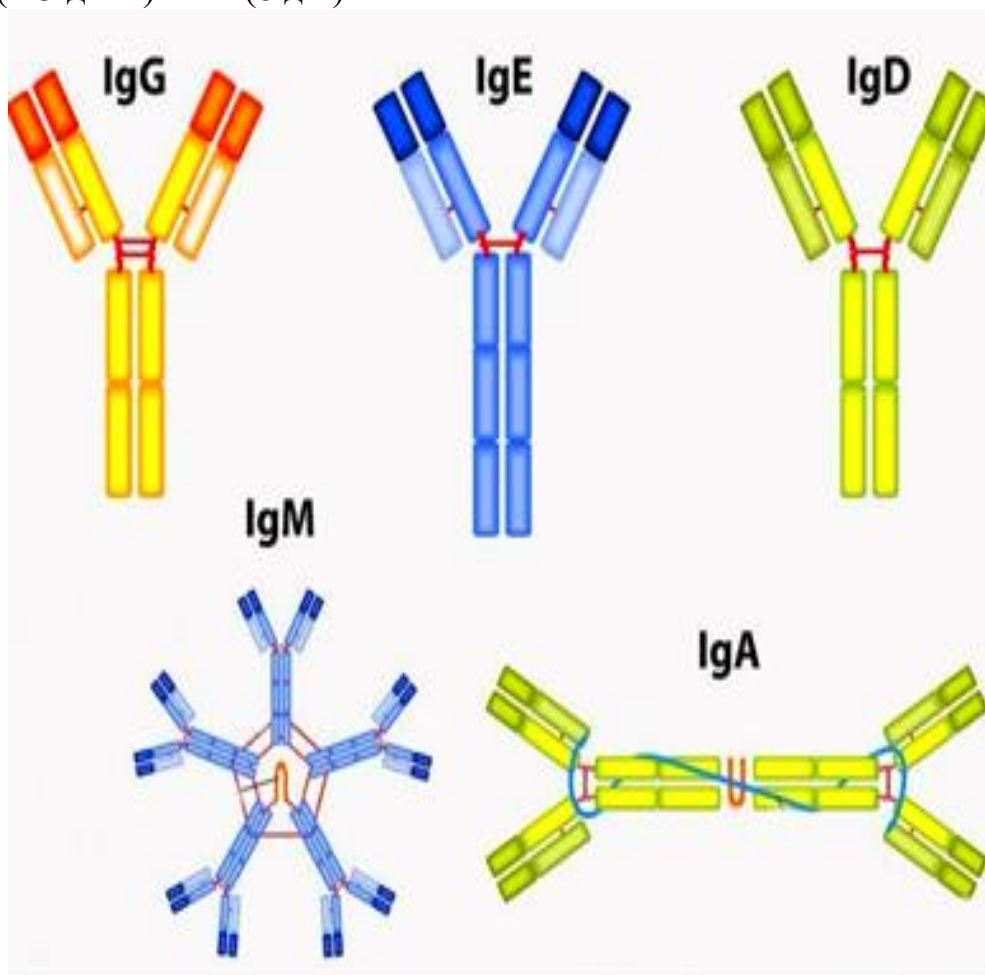


Рис. 3.9. Схематичний вигляд різних класів антитіл (імуноглобулінів)
(Джерело: @microbiologynotes)

Для створення штучного пасивного імунітету вводять **гіперімунну сироватку (імунологічну) сироватку** (рис. 3.10). Дана сироватка є **біопрепаратом, що містить готові антитіла щодо певного збудника інфекції**. Наприклад, при захворюванні на сказ – хворому вводять антирабічну сироватку (антирабічний імуноглобулін), яка містить готові антитіла від вірусу сказу.

Такий спосіб також називають імунізацією, але вводять не антиген, а готові антитіла.



Рис. 3.10. Знешкодження антигена (АГ) антитілами (АТ):
а — розпізнавання; б — зближення, з'єднання паратопів антитіл з епітопами антигену; в — елімінація (руйнування) антигену
(Джерело: @tnsconcepts)

Характеристика основних класів імуноглобулінів

Існує **п'ять основних** класів імуноглобулінів: IgA, IgD, IgE, IgG та IgM. Вони відрізняються за структурою і функціями (рис. 3.11).

Вони складаються з двох важких ланцюгів (heavy chains) і двох легких ланцюгів (light chains), які пов'язані дисульфідними зв'язками. Кожен імуноглобулін має варіабельну область, що відповідає за специфічність до антигену, та постійну область, яка визначає клас імуноглобуліну та його функцію (рис. 3.12).

1. IgA (Імуноглобулін А)

- Будова: зазвичай існує у вигляді димеру (дві об'єднані молекули), але може бути й у формі мономеру.

Будова: існує у двох формах:

- Секреторна форма: димер, два мономери IgA з'єднані з J-ланцюгом і секреторним компонентом.

- Сироваткова форма: мономер.

Має секреторний компонент, який допомагає проходити через слизові оболонки.

- Функція: Основний захисник слизових оболонок (шлунково-кишковий тракт, дихальні шляхи, слина, сльози). Захищає організм від інфекцій на поверхнях, що контактують із зовнішнім середовищем.

2. IgD (Імуноглобулін D)

- Будова: мономер, Мономер, складається з двох важких δ-ланцюгів і двох легких ланцюгів.. Його структура схожа на IgG, проте зустрічається рідше.

- Функція: знаходиться на поверхні В-лімфоцитів і бере участь у початкових стадіях активації імунної відповіді. Його функція ще не до кінця вивчена, але він відіграє роль у розпізнаванні антигенів В-клітинами.

3. IgE (Імуноглобулін E)

- Будова: мономер, складається з двох важких ϵ -ланцюгів і двох легких ланцюгів. Має додаткові цукрові компоненти, які сприяють його зв'язуванню з рецепторами на поверхні базофілів і опасистих клітин.

- Функція: відповідає за алергічні реакції (анафілаксія, астма). Зв'язується з алергенами і запускає вивільнення гістаміну та інших медіаторів запалення. Також бере участь у захисті від паразитарних інфекцій.

4. IgG (Імуноглобулін G)

- Будова: мономер, складається з двох важких γ -ланцюгів і двох легких ланцюгів. Найпоширеніший у крові імуноглобулін (приблизно 75-80% всіх антитіл), має чотири підтипи (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), що трохи відрізняються за функціями.

- Функція: забезпечує довготривалий імунітет, завдяки здатності нейтралізувати токсини, віруси та бактерії. Єдиний антитіло, здатний проходити через плаценту, що забезпечує захист новонародженого. Відповідає за нейтралізацію токсинів і вірусів та активацію комплементу.

5. IgM (Імуноглобулін M)

- Будова: зазвичай пентамер (п'ять з'єднаних молекул), що робить його найбільшим за розміром. Пентамер, п'ять мономерів IgM з'єднані J-ланцюгом. Має десять активних центрів для зв'язування антигенів.

- Функція: перший імуноглобулін, який виробляється у відповідь на інфекцію. Ефективно активує систему комплементу і сприяє початку імунної відповіді.

Основні відмінності між класами імуноглобулінів:

1. Будова: кожен клас має унікальну структуру, що визначає його функціональні можливості (мономери, димери, пентамери).

2. Місце дії: IgA захищає слизові оболонки, IgG і IgM працюють в кровообігу, а IgE бере участь в алергічних реакціях.

3. Функції: від нейтралізації патогенів (IgG) до активації комплементу (IgM) і участі в алергічних реакціях (IgE).

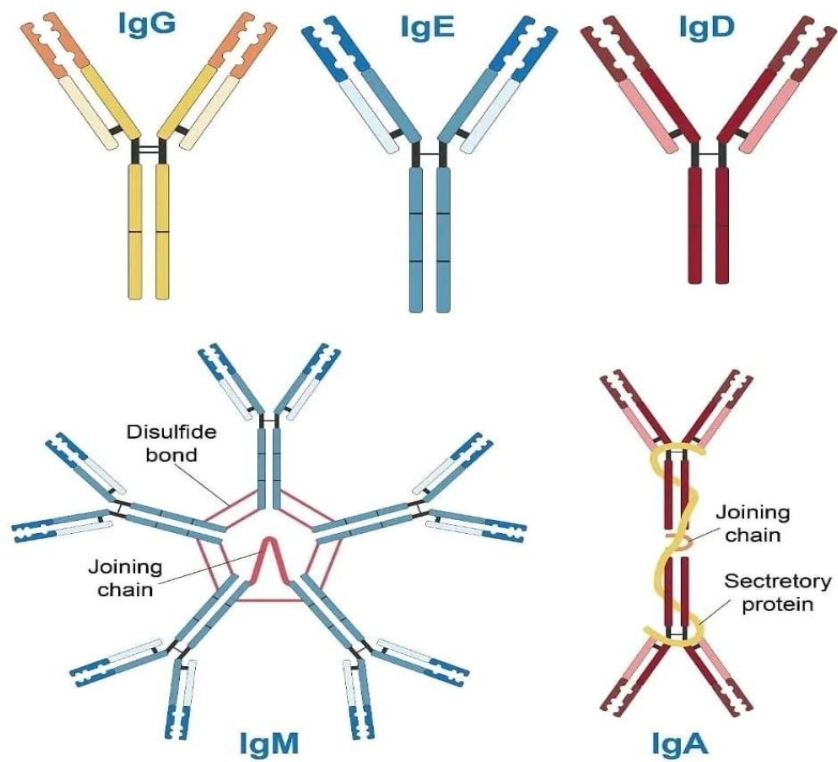


Рис. 3.11. Види імуноглобулінів (Джерело: @viguayankaksha)

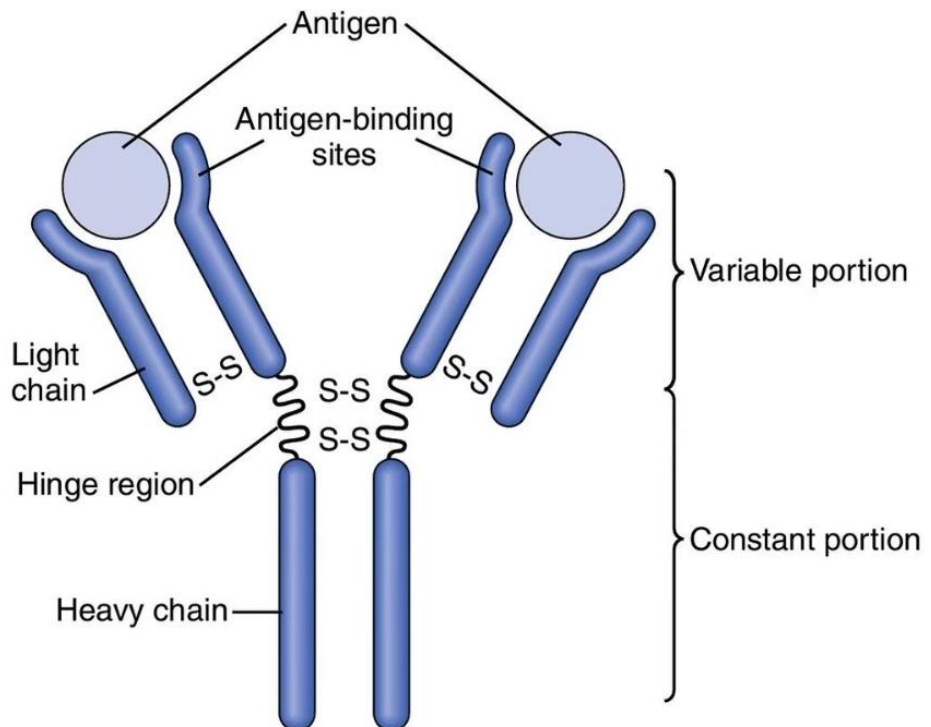


Рис. 3.12. Схематична будова імуноглобуліну (Джерело: @viguayankaksha)

1. Antigen-binding sites (місця зв'язування антигену):

- Це місця, які специфічно зв'язуються з антигеном, зокрема з епітопом — частиною антигену, яку розпізнає антитіло.
- Розташовані у варіабельних ділянках (variable portion) антитіла.

2. Light chain (легкий ланцюг):

- Один із двох типів поліпептидних ланцюгів, які утворюють антитіло. Легкий ланцюг бере участь у формуванні місця зв'язування антигену.

3. Heavy chain (важкий ланцюг):

- Основний ланцюг антитіла, який визначає його клас (IgG, IgA, IgM, IgE або IgD). Важкий ланцюг також бере участь у зв'язуванні антигену та виконує ефекторні функції.

4. Hinge region (шарнірна ділянка):

- Гнучка область між важкими ланцюгами, що дозволяє антитілу змінювати конфігурацію і полегшує зв'язування з антигенами.

5. Disulfide bonds (дисульфідні зв'язки):

- Ці зв'язки утримують разом важкі і легкі ланцюги, забезпечуючи стабільність структури антитіла.

6. Variable portion (варіабельна частина):

- Це ділянки легких і важких ланцюгів, які змінюються у різних антитіл, що забезпечує специфічність до різних антигенів. Саме вони утворюють місця зв'язування антигену.

7. Constant portion (постійна частина):

- Ця частина антитіла є однаковою для всіх антитіл одного класу і відповідає за ефекторні функції, такі як активація комплементу або взаємодія з рецепторами клітин.

Варіабельна частина АТ зв'язується з антигеном, а постійна частина виконує інші функції, пов'язані з імунною відповіддю.

Контрольні запитання та завдання

1. Які основні типи клітин входять до складу імунної системи тварин?
2. Яка роль макрофагів у імунному захисті організму?
3. Як дендритні клітини беруть участь у презентації антигенів?
4. Яка функція Т-лімфоцитів у регуляції імунної відповіді?
5. Як В-лімфоцити утворюють антитіла, і яку роль вони відіграють у захисті організму?
6. Що таке Т-хелпери і як вони підтримують імунну відповідь?
7. Як цитотоксичні Т-лімфоцити забезпечують знищення заражених клітин?
8. Яку роль відіграють еозинофіли у захисті організму від паразитарних інфекцій?
9. Як природні кілери (NK-клітини) впливають на боротьбу з вірусними інфекціями та новоутвореннями?
10. Яка роль пам'яті імунної системи у забезпеченні швидкої відповіді на повторне інфікування?
11. Як імунні клітини організму взаємодіють для розвитку імунної толерантності?
12. Яким чином імунна система забезпечує захист організму без пошкодження власних клітин?

13. Як регуляторні Т-клітини контролюють гіперреактивність імунної системи?
14. Як зміни в функціонуванні клітин імунної системи можуть призвести до аутоімунних захворювань?
15. Що таке імуноглобуліни та яку роль вони відіграють у захисті організму?
16. Які існують класи імуноглобулінів і чим вони відрізняються за функцією?
17. Як IgG відрізняється від інших класів імуноглобулінів за своєю структурою і функціями?
18. Яка роль IgM в первинній імунній відповіді організму?
19. Як IgA забезпечує захист слизових оболонок?
20. Що таке IgE і яку роль цей клас імуноглобулінів відіграє в розвитку алергічних реакцій?
21. Які механізми активації комплементної системи відбуваються за участю імуноглобулінів?
22. Як імуноглобуліни допомагають нейтралізувати патогенні мікроорганізми?
23. Які методи використовуються для кількісного визначення імуноглобулінів у лабораторних умовах?
24. Як імуноглобуліни використовуються в терапевтичних цілях, зокрема в лікуванні аутоімунних і вірусних захворювань?

Тема 5. Імунна відповідь. Механізми нормальної імунної відповіді

Взаємодія імунної системи окремого організму з чужорідними речовинами – це приклад боротьби з **біологічною агресією**, яка поділяється на 2 типи:

екзогенна (інфекційні агенти, алергени, трансплантати). Чужі речовини і клітини надходять з навколишнього середовища;

ендогенна (мутантні клітини, клітини пухлин). Утворюються всередині макроорганізму внаслідок дефектів в процесі його обміну речовин.

Захисні імунні реакції спрямовані на **збереження генетичної сталості макроорганізму (гомеостазу)**, і тому перелік речовин організму та склад його клітин відповідає первинному генетичному плануванню.

Імунна відповідь — це складний процес активації та координації різних клітин і молекул імунної системи, що спрямований на виявлення, нейтралізацію та видалення патогенних агентів, таких як віруси, бактерії або інші чужорідні субстанції, що потрапляють в організм (рис. 3.13).

Реакція імунної системи на чужорідну речовину – **імунна відповідь**, в здійсненні якої приймають участь імунні клітини та синтезовані ними речовини специфічної будови. Звичайна відповідь виникає при першій і повторній зустрічах з чужорідною речовиною (**первинна і вторинна імунна відповідь**).

Для здійснення нормальної життєдіяльності імунна система повинна не реагувати або виявляти **толерантність** до таких чужорідних речовин як харчові продукти, речовини корисних мікробів шлунково-кишкового тракту, сперматозоїди.

Імунологічна толерантність — особлива здатність імунної системи не реагувати на конкретні антигени.

Імунну відповідь умовно ділять:

- нормальна реакція організму;
- певні відхилення від норми зв'язані з вродженими або набутими дефектами імунної системи.



Рис. 3.13. Види імунної відповіді організму

До форм імунної відповіді належать: клітинний імунітет, гуморальний імунітет, імунологічна пам'ять та імунологічна толерантність.

Розвиток нормальної імунної відповіді

Первинна імунна відповідь — нормальна реакція імунної системи організму, яка виникає під час первинного контакту з антигеном (рис. 3.14).

Вторинна імунна відповідь — нормальна реакція імунної системи організму, яка виникає при повторному контакті з тим самим антигеном.

Імунна система тварин та людей є досконалою, та умовно має декілька «ліній оборони».

1-ша лінія оборони – шкіра слиз, війки епітелію тощо.

2-га лінія оборони – фагоцити (клітини здатні до фагоцитозу).

3-тя лінія оборони – лімфоцити.

4-та лінія оборони – антитіла, які дезактивують антигени, далі які знищують макрофаги.

Періоди імунної відповіді:

Латентний (індуктивний) період – період від проникнення АГ в організм до появи АТ або специфічних цитотоксичних Т-лімфоцитів;

Продуктивний (фаза росту) – збільшення у крові АТ або специфічних цитотоксичних Т-лімфоцитів;

Фаза зниження – зниження у крові АТ або специфічних цитотоксичних Т-лімфоцитів.

Періоди первинної імунної відповіді:

Латентний (індуктивний) період;

Продуктивний (фаза росту);

Фаза зниження.

Періоди вторинної імунної відповіді:

Латентний (індуктивний) період – дуже короткий, або відсутній;

Продуктивний (фаза росту) – швидкий ріст титру АТ та швидке накопичення специфічних цитотоксичних Т-лімфоцитів (високий титр (концентрація) АТ);

Фаза зниження – дана фаза пролонгована (більш довга).

Розвиток імунної відповіді, як клітинної так і гуморальної відбувається з моменту проникнення патогену до макроорганізму, де з антигеном взаємодіють імунокомпетентні клітини на різних рівнях ліній оборони організму тварини (рис. 3.14). Необхідно розуміти, що імунний процес є генералізований, який стосується усі органів імунної системи, а не одного.

Спочатку імунна система розпізнає антиген за допомогою: 1. розчинних молекул (ЛПС-зв'язуючий білок, С-реактивний білок, деякі компоненти системи комплементу, природні і імунні антитіла) та 2. молекул розміщених на клітинних мембранах (фагоцитарні клітини). Далі антигенпрезентуючі клітини (дендритні клітини, макрофаги, В-лімфоцити) поглинають антиген і мігрують у регіональні лімфоїдні тканини (Т-залежні зони) і «презентують» - «показують» антиген Т-лімфоцитам (які не є диференційовані) (рис. 3.15).



Рис.3.14. Механізм розвитку імунної відповіді

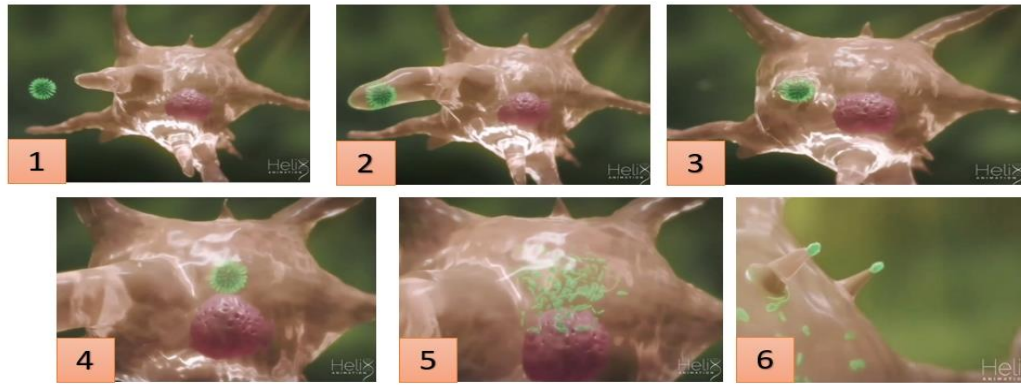


Рис. 3.15. Робота антигенпрезентуючих дендритних клітин (презентація антигену) (Джерело: @helixanimation)

Т-лімфоцити (мають на мембранах спеціальний специфічний Т-клітинний рецептор, який розпізнає антиген (АГ), які приєднані до головного комплексу гістосумісності) прилипають до антигенпрезентуючих клітин, щоб розпізнати антиген – відбувається пошук «комплементарного» до антигену рецептора Т-лімфоциту. Після розпізнавання потрібного-комплементарного до антигену Т-лімфоциту відбувається процес проліферації та диференціації клітин — синтез клонів комплементарного Т-лімфоциту (антиген специфічних Т-лімфоцитів) до антигену. З антиген специфічних Т-лімфоцитів формуються Т-хелпери ($T\text{-хелпери}_1 + T\text{-хелпери}_2$) та Т-цитотоксичні клітини, здатні руйнувати клітини мішені – Т-кіллери.

•**Клітинний імунітет:**

$T\text{-хелпери}_1$ активують роботу Т-кіллерів, які мігрують у кров, а з крові у місця, де міститься специфічний патоген (клітини-мішені) і руйнують його.

•**Гуморальний імунітет:**

$T\text{-хелпери}_2$ (мають молекули, які здатні взаємодіяти з В-лімфоцитами) – взаємодіють з В-лімфоцитами. В-лімфоцити мігрують до фолікулярних зон імунокомпетентних органів, розмножуються та диференціюються до лімфобластів, а згодом до плазматичних клітин, які здатні синтезувати імуноглобуліни (антитіла (Ig, АТ)). Частина клітин В-лімфоцитів мігрують до слизових оболонок лімфоїдних тканин, де продукують антитіла (специфічні до патогену (АГ)). Антитіла своїми паратопами з'єднуються з епітопами антигену та формують комплекси антиген-антитіло (АГ-АТ), дані комплекси активують систему комплементу. Система комплементу – група білків плазми крові (21 плазмовий білок), які перебувають у ній постійно у неактивному стані. Систему комплементу відносять до факторів неспецифічної резистентності. Після активації системи комплементу (утворення комплексів антиген-антитіло (АГ-АТ)) вона «допомагає» роботі антитіл (імуноглобулінів) по відношенню до вірусів, бактерій, тобто патогенів. Функції системи комплементу: 1. Опоснізація (огортання) вірусу/бактерії для більш сприятливості останніх до фагоцитозу, 2. Цитоліз-лізис певних частин антигену, 3. Нейтралізація вірусів, 4. Хемотаксична проникність (підвищує проникність судин). Після дії на антигени антитіл (імуноглобулінів)+системи

комплементу(реакції зв'язування комплементу) віруси та бактерії фагоцитуються та знищуються в організмі.

Необхідно розуміти, що клітинний та гуморальний імунітет функціонують взаємопов'язано. Також, паралельно з усіма вищевказаними процесами у Т- та В- зонах у лімфоїдній тканині утворюються Т- та В- клітини «пам'яті», які при наступному потраплянні до організму того ж самого антигену формують вторинну імунну відповідь, яка є набагато активнішою за первинну. На реакціях вторинної імунної відповіді засновані засади вакцинації. Вторинна імунна відповідь формується після введення бустер-дозы вакцини.

Контрольні запитання та завдання

1. Що таке імунна відповідь і чому вона є важливою для здоров'я тварини?
2. Як імунна система розпізнає чужорідні агенти?
3. Які клітини імунної системи активуються в перші хвилини інфекції?
4. Як відбувається активація Т-лімфоцитів під час імунної відповіді?
5. Яка роль В-лімфоцитів у гуморальній відповіді організму?
6. Як антитіла допомагають нейтралізувати патогени?
7. Яким чином імунна відповідь організму визначає тип інфекції (бактеріальна, вірусна, грибкова)?
8. Яка різниця між первинною та вторинною імунною відповіддю?
9. Як пам'ять імунної системи сприяє більш швидкому реагуванню на повторне зараження?
10. Що таке імунна толерантність і як вона забезпечує захист від аутоімунних захворювань?
11. Як молекули МНС (гістосумісності) впливають на імунну відповідь?
12. Яким чином система комплементу бере участь в активації імунної відповіді?
13. Яка роль цитокінів у регулюванні імунної відповіді тварини?
14. Як змінюється імунна відповідь у залежності від віку тварини?
15. Яку роль відіграють фагоцити в боротьбі з інфекціями?
16. Як імунна система розрізняє власні клітини та чужорідні патогени?
17. Як мікробіота впливає на розвиток імунної відповіді організму тварини?
18. Яким чином імунна відповідь організму тварини може бути посилена або ослаблена через стрес?
19. Які механізми використовує організм для обмеження запальних процесів в межах імунної відповіді?
20. Як вакцинація стимулює імунну відповідь і забезпечує захист від інфекцій?
21. Як природний імунітет відрізняється від специфічного імунітету у тварин?
22. Яка роль нейтрофілів у гострій фазі імунної відповіді?

23. Як реакція на алергени є частиною імунної відповіді, і чому вона може стати патологічною?

24. Як імунна відповідь може сприяти розвитку хронічних захворювань у тварин?

Тема 6. порушення нормальної імунної відповіді

Порушення імунної відповіді спостерігається у декількох випадках:

- в разі перепрацювання імунної системи (**алергія, аутоімунні хвороби**)
- в разі недопрацювання (**первинні і вторинні імунодефіцити**).

Існує два поняття, які необхідно розрізняти: імунодефіцит та імунодефіцитний стан.

Імунодефіцитний стан – тимчасова дисфункція імунної системи, яка виникає під впливом зовнішніх факторів (погане харчування, гіподинамія, інфекційна хвороба, тривалий прийом медикаментів тощо) та триває до 3-6 місяців і не потребує специфічних методів корекції, окрім усунення несприятливих факторів.

Імунодефіцит (стійка імунна недостатність) – це патологічний стан, який характеризується зниженням активності імунної системи, внаслідок чого організм стає менш здатним до захисту від патогенних мікроорганізмів, а також до протипухлинного імунного нагляду. Імунодефіцити призводять до пошкоджень органів, клітин імунної системи та їх молекулярних продуктів.

Імунодефіцити класифікують на первинні та вторинні.

Первинні імунодефіцити класифікують на **спадкові та вроджені**.

Спадкові імунодефіцити спостерігаються в кількох поколіннях та найчастіше передаються за рецесивним механізмом. Вони виявляються з народження, проявляючись уповільненим розвитком і частими інфекціями протягом першого року життя. Це відбувається через порушення функції імунної системи, що сприяє активізації умовно-патогенних мікроорганізмів і швидкому формуванню вогнищ хронічних або генералізованих інфекцій в дихальній, травній, сечостатевої системах, а також на шкірі та слизових оболонках. **Вроджені імунодефіцити** можуть виникати за відсутності сімейного анамнезу, через вплив внутрішньоутробних вірусних і бактеріальних інфекцій або дії імунотоксичних факторів довкілля, таких як хімічні речовини чи радіація.

Вторинні (набуті) імунодефіцити класифікують на **екзогенні** (вплив шкідливих звичок, надмірний рівень стресового навантаження, аліментарні фактори, виробничі чинники, інфекційні хвороби) та **ендогенні фактори** (захворювання імунної системи, алергії, тощо). **Дія екзогенних факторів** спочатку формує імунодефіцитний стан, а тільки потім – набутий імунодефіцит, **дія ендогенних** – проявляється одразу після початку патології або через короткий період.

Алергічна реакція організму

Гіперчутливість негайного типу

Цей тип гіперчутливості, також відомий як реакції типу I, є патологічною реакцією імунної системи, яка виникає незабаром після контакту з алергеном. Основною **причиною** є активація тучних клітин (мастоцити) та базофілів, що вивільняють медіатори, такі як гістамін, які викликають симптоми алергії. Клінічні прояви можуть включати алергічний риніт, бронхіальну астму та анафілаксію.

Механізм розвитку

• Сенсibiliзація:

Під час **першого контакту** з алергеном (пил, пилок, яд оси, тощо) відбувається утворення **специфічних антитіл (IgE)** (пов'язані з В-лімфоцитами), які **осідають на поверхні тучних клітин (мастоцитів) і базофілів** – клінічних проявів алергії немає.

• Повторний контакт

При **повторному контакті** з тим самим алергеном, він зв'язується з IgE, які вже містяться на поверхні тучних клітин (мастоцитів) і базофілів - **активація тучних клітин та базофілів, що призводить до вивільнення медіаторів запалення** – гістамін, цитокіни, простагландини.

• **Клінічні прояви:** Вивільнені медіатори запалення викликають симптоми: *почервоніння і набряк* (підвищення судинної проникності -судинна реакція); *свербіж, чхання, кашель* (стимуляція нервових закінчень); *задишка та бронхоспазм* (у випадку астматичних реакцій – скорочення гладкої мускулатури).

Гіперчутливість сповільненого типу

Цей вид реакції (тип IV) є імунною відповіддю, яка розвивається протягом **24-72 годин** після контакту з антигеном. Цей тип гіперчутливості базується на клітинно-опосередкованій імунній відповіді (без участі імуноглобулінів). У цих реакціях **головну роль** відіграють **Т-лімфоцити**. Приклади цього типу гіперчутливості включають контактний дерматит, реакції на туберкульоз, відторгнення трансплантату тощо.

Механізм розвитку

• Сенсibiliзація

Під час **першого контакту Т-лімфоцити ідентифікують антиген** та починають імунну реакцію – Т-лімфоцити запускають імунну відповідь. Під час первинного контакту з антигеном **Т-лімфоцити** (особливо Т-хелпери) **розпізнають антиген**, презентований антиген-презентуючими клітинами (макрофагами або дендритними клітинами). Цей процес триває кілька днів, і Т-клітини стають «сенсibiliзованими».

• Повторний контакт

При повторному контакті **того ж антигену** сенсibiliзовані Т-лімфоцити знову активуються, одночасно починають виділяти цитокіни, які стимулюють

макрофаги та інші клітини імунної системи. Це спричиняє запалення та пошкодження тканин у місці контакту з антигеном.

- **Клінічна реакція-запальна відповідь**

Вивільнення цитокінів, наприклад, інтерферон-гамма (IFN- γ), **активує макрофаги**, що сприяє розвитку **запалення**. Це запалення може призводити до пошкодження тканин і розвитку клінічних симптомів.

Отже, гіперчутливість негайного і сповільненого типу являють собою різні механізми імунної відповіді, які відрізняються за тривалістю розвитку, типом клітин і процесом активації.

Основні відмінності між гіперчутливістю негайного та сповільненого типів

1. Тривалість реакції:

- **Негайний тип (тип I):** ця реакція виникає протягом кількох хвилин після повторного контакту з алергеном, а основні симптоми проявляються через 15-30 хвилин після експозиції.

- **Сповільнений тип (тип IV):** відповідь розвивається поступово, через 24-72 години після взаємодії з антигеном.

2. Клітинний склад:

- **Негайний тип:** у цих реакціях основну роль відіграють тучні клітини та базофіли, що активуються за допомогою антитіл класу IgE.

- **Сповільнений тип:** головними учасниками є Т-лімфоцити (зокрема, CD4+ Т-хелпери), які регулюють клітинно-опосередковану імунну відповідь.

3. Процес активації:

- **Негайний тип:** при повторному контакті з алергеном, антитіла IgE, що вже прикріплені до тучних клітин та базофілів, зв'язують алерген, що призводить до активації цих клітин і вивільнення таких медіаторів, як гістамін, лейкотрієни та простагландини.

- **Сповільнений тип:** повторний контакт із антигеном призводить до презентації антигену Т-лімфоцитам, які виділяють цитокіни, такі як інтерферон-гамма. Це активує макрофаги та інші клітини, викликаючи запалення та ушкодження тканин.

4. Роль антитіл:

- **Негайний тип:** антитіла IgE є головними учасниками, які активують тучні клітини та базофіли для вивільнення медіаторів запалення.

- **Сповільнений тип:** Антитіла не мають ключової ролі, адже реакція опосередковується Т-лімфоцитами та макрофагами.

5. Клінічні симптоми:

- **Негайний тип:** симптоми включають свербіж, набряки, висипання, бронхоспазм, нежить та утруднене дихання. У важких випадках можливе виникнення анафілаксії.

- **Сповільнений тип:** симптоматика включає запалення тканин, висипи, утворення виразок, некроз та інші ураження шкіри чи внутрішніх органів.

6. Лікування:

- **Негайний тип:** лікування передбачає використання антигістамінних засобів (зв'язування гістаміну), кортикостероїдів (зниження запалення), адреналіну (для стабілізації стану хворого при анафілактичних реакціях) і бронходилататорів (при астмі).

- **Сповільнений тип:** лікування зазвичай включає кортикостероїди для зменшення запалення та інші протизапальні препарати в залежності від конкретної реакції.

- **Елімінаційна терапія:** уникнення контакту з алергенами

Отже, **гіперчутливість негайного типу** відрізняється швидкою антитілозалежною реакцією (Ig), тоді як **сповільнена гіперчутливість** пов'язана з повільною клітинно-опосередкованою відповіддю (Т-лімфоцити, макрофаги)

Аутоімунні захворювання

Аутоімунні хвороби — це група захворювань, при яких імунна система помилково атакує власні клітини та тканини організму, сприймаючи їх як чужорідні. Тобто імунна система починає виробляти антитіла або активувати імунні клітини проти власних тканин, що призводить до запалення та пошкодження різних органів і систем (табл. 3.9).

Механізм розвитку

Неправильна активація імунної системи

Імунна система розпізнає власні клітини як чужорідні. Це призводить до вироблення антитіл (імуноглобулінів) В-лімфоцитами або активації Т-лімфоцитів проти власних тканин.

Запалення та пошкодження тканин

Активовані імунні клітини або антитіла викликають запалення, яке поступово пошкоджує тканини, призводячи до хронічних захворювань.

Генетична схильність

Деякі гени підвищують ймовірність помилкової атаки імунної системи на власні тканини.

Механізми деяких аутоімунних захворювань

Ревматоїдний артрит — характеризується хронічним запаленням суглобів, що призводить до болю, набряку та обмеження рухів. Імунна система атакує суглоби, що може призвести до їх руйнування.

Цукровий діабет 1 типу — при цьому захворюванні імунна система знищує бета-клітини підшлункової залози, що відповідають за вироблення інсуліну, гормону, який контролює рівень цукру в крові.

Системний червоний вовчак — це захворювання характеризується утворенням антитіл, які атакують різні органи, включаючи шкіру, нирки, суглоби, серце. Симптоми можуть бути дуже різноманітними, включаючи висипання, біль у суглобах, втомлюваність та проблеми з нирками.

Розсіяний склероз — при цьому захворюванні імунна система атакує мієлінову оболонку нервових волокон у центральній нервовій системі, що

призводить до порушення передачі нервових імпульсів, слабкості м'язів, втрати координації та зору.

Табл. 3.9. Приклади аутоімунних хвороб у різних видів тварин

Вид тварини	Порода	Аутоімунне захворювання
Собаки	Доберман-пінчер	Аутоімунний тиреоїдит
	Німецька вівчарка	Аутоімунний дерматит, поліартрит
	Золотистий ретривер	Системний червоний вовчак, аутоімунний тиреоїдит
	Кокер-спанієль	Аутоімунна гемолітична анемія (АІНА)
	Ротвейлер	Аутоімунний поліміозит
Коти	Абіссинська кішка	Лімфоцитарний плазмоцитарний стоматит
	Мейн-кун	Аутоімунний дерматит
	Сіамська кішка	Системний червоний вовчак
Коні	Арабська порода	Системний червоний вовчак, аутоімунний артрит
Корови	Молочні породи	Аутоімунний мастит
Папуги	-	Аутоімунний поліморфний дерматит

Лікування аутоімунних захворювань

Лікування аутоімунних хвороб залежить від конкретного захворювання і зазвичай спрямоване на: **пригнічення роботи імунної системи, зниження запалення, замісна терапія** (коли пошкоджений орган не може виконувати свою функцію).

Контрольні запитання та завдання

1. Що означає поняття «порушення імунної відповіді»?
2. Які основні види порушень імунної відповіді можуть спостерігатися у тварин?
3. Як ослаблення імунної відповіді може призвести до підвищеної сприйнятливості до інфекцій?
4. Які фактори можуть викликати порушення нормальної імунної відповіді у тварин?

5. Як порушення функцій Т-лімфоцитів впливає на загальний стан імунної системи?
6. Яка роль генетичних мутацій у розвитку порушень імунної відповіді?
7. Як дефіцит вітамінів або мінералів може впливати на ефективність імунної відповіді?
8. Які наслідки можуть виникнути через порушення функції В-лімфоцитів?
9. Як стрес може негативно вплинути на баланс імунної відповіді в організмі тварини?
10. Що таке аутоімунні захворювання, і як вони виникають через порушення імунної відповіді?
11. Які хвороби можуть бути спричинені гіперреактивною імунною відповіддю?
12. Як надмірна імунна відповідь (гіперреактивність) може призвести до розвитку алергічних реакцій?
13. Яка роль імунної толерантності у запобіганні аутоімунним захворюванням?
14. Як порушення роботи фагоцитів може призвести до неспроможності організму боротися з інфекціями?
15. Які імунологічні порушення можуть виникати при вірусних інфекціях?
16. Як порушення комплементної системи може вплинути на здатність організму до боротьби з інфекціями?
17. Які зміни в імунній відповіді можуть спостерігатися при хронічних запальних процесах?
18. Як порушення балансу між клітинами Th1 і Th2 може призвести до патологічних реакцій організму?
19. Яким чином гормональні зміни можуть впливати на порушення імунної відповіді?
20. Як імунна система реагує на злоякісні новоутворення і які порушення можуть призвести до розвитку раку?
21. Які захворювання можуть виникнути через порушення нормальної діяльності регуляторних Т-клітин?
22. Як інфекційні агенти можуть спричиняти порушення в розвитку імунної пам'яті?
23. Які симптоми можуть вказувати на порушення нормальної імунної відповіді у тварин?
24. Як інфекції можуть викликати зміни у функціях імуноглобулінів та їх вплив на імунну відповідь?
25. Яка роль вакцин у корекції порушень імунної відповіді та попередженні хвороб?

Список використаної літератури

1. Безпека життєдіяльності : навч.-метод. посіб. / О. Й. Бакалюк, С. В. Лукащук-Федик, Я. Г. Русенко. Тернопіль : СПД-ФО Шпак В. Б., 2012. 199 с.
2. Вірусологія : навч. посіб. для лабораторних занять / В. П. Поліщук, І. Г. Будзанівська, Т. П. Шевченко та ін. Київ : ЦП «Компринт», 2017. 242 с.
3. Дослідження впливу токсинів *Clostridium perfringens* на організм курчат-бройлерів / М. Л. Бойко, В. М. Іванов, О. С. Петров. Вінниця: Меркьюрі-Поділля, 2022. 312 с.
4. Застосування швидких тестів в лабораторній діагностиці інфекційних хвороб : метод. рек. / В. П. Широбоков, І. В. Дзюблик, С. Г. Вороненко та ін. Київ, 2008. 34 с.
5. Іваненко А. О., Литвиненко Н. О. Системи імунного захисту у птахів. Черкаси : Чабаненко Ю. А., 2021. 270 с.
6. Імунопрофілактика інфекційних хвороб : навч.-метод. посіб. / Л. І. Чернишова, Ф. І. Лапій, А. П. Волоха та ін.; за ред. Л. І. Чернишової, Ф. І. Лапія, А. П. Волохи. 2-ге вид., перероб. і доп. Київ : Медицина, 2019. 320 с.
7. Інфекційні хвороби тварин : підручник / за ред. М. Г. Василенка. Запоріжжя : Поліграф, 2023. 420 с.
8. Інфекційні хвороби у загальній практиці та сімейній медицині : навч. посіб. / за ред. М. А. Андрейчина. Тернопіль : ТДМУ, 2007. 300 с.
9. Ковальчук В. П., Мельник І. В. Роль токсинів *Clostridium perfringens* в патогенезі інфекційних захворювань. Тернопіль : Осадца Ю. В., 2019. 230 с.
10. Ковальчук М., Лисенко І. Є. Основи імунологічного захисту у птахів. Львів : Підручники і посібники, 2020. 256 с.
11. Культура клітин у медичній вірусології : навч.-метод. посіб. / І. В. Дзюблик, О. П. Трохименко, С. О. Соловійов. Вінниця : Меркьюрі-Поділля, 2015. 144 с.
12. Лабораторний практикум з дисципліни «Медична біологія» / Л. Я. Федонюк, Я. С. Стравський, С. С. Подобівський та ін. Тернопіль : ТНМУ, 2020. 360 с.
13. Лютка Г. І., Радзиховський М. Л., Дишкант О. В. Загальна вірусологія. Основи ветеринарної та зоонотичної вірусології. Ч.1. : навчальний посібник / за ред. Радзиховського М.Л. Вінниця : Друк, 2020. 204 с.
14. Ляхман В. Сучасні підходи до терапії інфекційних захворювань у тварин. Київ : Наукова думка, 2021. 400 с.
15. Максименко О. В. Сучасні підходи до лабораторної діагностики ВІЛ-інфекції. Лабораторна діагностика. 2003. № 4. С. 31–37.
16. Медико-соціальні основи здоров'я : навч. посіб. / З. І. Луй, Н. М. Олійник. Тернопіль : РВВ ТНПУ ім. В. Гнатюка, 2012. 300 с.
17. Медична мікробіологія, вірусологія та імунологія : підручник / В. П. Широбоков, С. І. Климнюк, В. А. Понятовський та ін.; за ред. В. П.

Широбокова. 3-тє вид. Вінниця : Нова Книга, 2021. 920 с. (Гриф МОН; Гриф МОЗ).

18. Медична мікробіологія, вірусологія та імунологія : підручник для студентів вищих медичних закладів / за ред. В. П. Широбокова. Вінниця : Нова книга, 2010. 969 с.

19. Медична мікробіологія, вірусологія та імунологія : підручник для студ. ВНЗ / Т. В. Андріанова, В. В. Бобир, В. О. Виноград та ін.; за ред. В. П. Широбокова. Вінниця : Нова книга, 2011. 951 с. ISBN 978-966-382-200-6.

20. Медична мікробіологія, вірусологія, імунологія : підручник для студентів вищих навчальних медичних закладів IV рівня акредитації / за ред. акад. НАН і АМН України В. П. Широбокова. 3-тє вид., оновлене та доповнене. Вінниця : Нова книга, 2021. 920 с. ISBN 978-966-382-874-9.

21. Медична мікробіологія. Посібник з мікробних інфекцій : патогенез, імунітет, лабораторна діагностика та контроль : у 2-х т. Т. 1 / М. Р. Барер, В. Ірвінг, Е. Свонн, Н. Перера; наук. ред. пер. : С. Климнюк, В. Мінухін, С. Похил. пер. 19-го англ. вид. Київ : Медицина, 2020. 434 с.

22. Медична мікробіологія. Посібник з мікробних інфекцій : патогенез, імунітет, лабораторна діагностика та контроль : у 2-х т. Т. 2 / М. Р. Барер, В. Ірвінг, Е. Свонн, Н. Перера; наук. ред. пер. : С. Климнюк, В. Мінухін, С. Похил. пер. 19-го англ. вид. Київ : Медицина, 2020. 386 с.

23. Медична мікробіологія. Посібник з мікробних інфекцій : патогенез, імунітет, лабораторна діагностика та контроль : 19-е вид. : у 2 т. Т. 2 / М. Р. Барер, В. Ірвінг, Е. Свонн, Н. Перера; пер. : С. Климнюк та ін. Київ : Медицина, 2021. 384 с.

24. Мікробіологічні аспекти ветеринарної медицини / за ред. А. І. Степанова. Одеса : Одеський національний університет, 2018. 198 с.

25. Мікробіологія з основами імунології : підручник / В. В. Данилейченко, Й. М. Федечко, О. П. Корнійчук, І. І. Солонинко; за ред. В. В. Данилейченка, Й. М. Федечка. 2-ге вид., перероб. і доп. Київ : Медицина, 2019. 376 с.

26. Мікробіологія з технікою мікробіологічних досліджень, вірусологія та імунологія : підручник / В. А. Люта, О. В. Кононов. 2-ге вид. Київ : Медицина, 2018. 576 с.

27. Мікробіологія, вірусологія та імунологія в запитаннях та відповідях : навч. посіб. / за заг. ред. В. П. Широбокова, С. І. Климнюка. Тернопіль : Укрмедкнига, 2019. 340 с.

28. Мікробіологія, вірусологія та імунологія в таблицях і схемах : навч. посіб. : у 4 ч. Ч. 1 : Загальна мікробіологія / за заг. ред. С. І. Климнюка, М. С. Творка. Тернопіль : ТНМУ, 2020. 180 с.

29. Мікробіологія, вірусологія та імунологія в таблицях і схемах : навч. посіб. : у 4 ч. Ч. 2 : Імунологія / за заг. ред. С. І. Климнюка, М. С. Творка. Тернопіль : ТНМУ, 2021. 156 с.

30. Мікробіологія, вірусологія та імунологія в таблицях і схемах : навч. посіб. : у 4 ч. Ч. 3 : Вірусологія / за заг. ред. С. І. Климнюка, М. С. Творка. Тернопіль : ТНМУ, 2021. 232 с.
31. Мікробіологія, вірусологія та імунологія в таблицях і схемах : навч. посіб. : у 4 ч. Ч. 4 : Спеціальна, клінічна та екологічна мікробіологія / за заг. ред. С. І. Климнюка, М. С. Творка. Тернопіль : ТНМУ, 2021. 416 с.
32. Мікробіологія, вірусологія, імунологія : підручник для вищих медичних навчальних закладів I-II рівнів акредитації / І. О. Ситник, С. І. Климнюк, М. С. Творко. 2-е вид., без змін. Тернопіль : ТДМУ, 2009. 392 с.
33. Мікробіом організму людини : навч. посіб. / С. І. Климнюк, Н. Я. Кравець, Н. М. Олійник та ін. Тернопіль : Осадца Ю. В., 2023. 416 с.
34. Основи імунології (теорія і практика) : навч. посіб. / М. С. Творко, С. І. Климнюк, Н. І. Ткачук. Тернопіль : Укрмедкнига, 2009. 298 с.
35. Патогенез інфекційних хвороб у тварин / за ред. С. П. Коваленка. Харків : Основа, 2019. 540с.
36. Полімеразна ланцюгова реакція в лабораторній діагностиці інфекційних хвороб : навч.-метод. посіб. для лікарів / за ред. І. В. Дзюблик, Н. Г. Горовенко. Київ, 2012. 219 с.
37. Правила відбору зразків патологічного матеріалу, крові, кормів, води та пересилання їх для лабораторного дослідження від 15 квітня 1997 р. (№ 15-14/111) [Електронний ресурс]. Р URL: <https://vetlabkr.pp.ua/Content/files/%D0%9F%D1%80%D0%B0%D0%B2%D0%B8%D0%BB%D0%B0%20%D0%B2%D1%96%D0%B4%D0%B1%D0%BE%D1%80%D1%83%20%D0%B7%D1%80%D0%B0%D0%B7%D0%BA%D1%96%D0%B2%20%D0%BF%D0%B0%D1%82%D0%BE%D0%BB%D0%BE%D0%B3%D1%96%D1%87%D0%BD%D0%BE%D0%B3%D0%BE%20%D0%BC%D0%B0%D1%82%D0%B5%D1%80%D1%96%D0%B0%D0%BB%D1%83.pdf>
38. Практична мікробіологія : навч. посіб. / С. І. Климнюк, І. О. Ситник, В. П. Широбоков та ін.; за заг. ред. В. П. Широбокова, С. І. Климнюка. Вінниця : Нова Книга, 2018. 576 с.
39. Прокопенко М. В., Литвиненко С. В. Вакцинація у ветеринарній практиці : навч. посіб. Полтава : Полтавський університет, 2017. 192 с.
40. Рекомендації ВООЗ: імунізація в умовах пандемії Covid-19 [Електронний ресурс]. URL: <https://www.kmu.gov.ua/news/rekomendaciyi-vooz-imunizaciya-v-umovah> -
41. Сайт Міжнародного комітету таксономії вірусів (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV) [Електронний ресурс]. URL: <http://ictvonline.org/index.asp?bhcp=1>
42. Ситуаційні задачі з мікробіології та вірусології / за заг. ред. доц. Ткачук. Тернопіль : ТНМУ, 2022. 338 с.
43. Сучасна імунологія : курс лекцій / І. А. Іонов, Т. Є. Комісова, О. М. Сукач, О. О. Катеринич. Харків : ЧП Петров В. В., 2017. 107 с.
44. Сучасні методи діагностики інфекційних захворювань у тварин / В. Ф. Кириленко, Н. С. Романова, І. П. Гордієнко. Дніпро : Ліра, 2021. 144 с.

45. Щодо рекомендації МОЗ України стосовно окремих питань вакцинації проти COVID-19 в Україні [Електронний ресурс]. URL: https://phc.org.ua/sites/default/files/users/user90/2022.01.14_Pozytsia_NTGEI_05.01.2022.pdf
46. Amos L. A., Finch J. T. Aaron Klug and the revolution in biomolecular structure determination. *Trends Cell Biol.* 2004. Vol. 14, No 3. C. 148–152.
47. Antibody variable sequences have a pronounced effect on cellular transport and plasma half-life / Grevys A., Frick R., Mester S. et al. *Science.* 2022. Vol. 25. 103746. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.103746>
48. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells / Guernonprez P., Valladeau J., Zitvogel L., Théry C., Amigorena S. *Annu. Rev. Immunol.* 2002. Vol. 20. P. 621–667. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.20.100301.064828>
49. Antonelli G., Turriziani O. Antiviral therapy: old and current issues. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2012. Vol. 40, No 2. P. 95–102. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.04.005>
50. Athanasopoulos T., Fabb S., Dickson G. Gene therapy vectors based on adeno-associated virus: characteristics and applications to acquired and inherited diseases (review). *Int. J. Mol. Med.* 2000. Vol. 6, No 4. P. 363–375. DOI: <https://doi.org/10.3892/ijmm.6.4.363>
51. Bamford D. H., Grimes J. M., Stuart D. I. What does structure tell us about virus evolution? *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2005. Vol. 15, No 6. P. 655–663. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2005.10.012>
52. Barlow C. C. From Gaia to selfish genes: Selected writings in the life sciences. Cambridge, MA : MIT Press, 1991. 273 p.
53. Beck J., Nassal M. Hepatitis B virus replication. *World J. Gastroenterol.* 2007. Vol. 13, No 1. C. 48–64. DOI: <https://doi.org/10.3748/wjg.v13.i1.48>
54. Bergelson J. M. Virus interactions with mucosal surfaces: alternative receptors, alternative pathways. *Curr. Opin. Microbiol.* 2003. Vol. 6, No 4. P. 386–391. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(03\)00097-3](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(03)00097-3)
55. Biosafety and biosecurity challenges facing veterinary diagnostic laboratories in lower-middle income countries in Southeast Asia: A case study of Thailand / Siengsan-Lamont J., Kamolsiripichaiporn S., Ruanchaimun S. et al. *Appl. Biosaf.* 2019. Vol. 24, No. 4. P. 220–230. DOI: <https://doi.org/10.1177/1535676019869771>
56. Blair D.G., Athanasiou M. Ets and retroviruses – transduction and activation of members of the Ets oncogene family in viral oncogenesis. *Oncogene.* 2000. Vol. 19, No 55. P. 6472–6481. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204046>
57. Boden M. A. Is metabolism necessary? *The British Journal for the Philosophy of Science.* 1999. Vol. 50, No. 2. P. 231–248. DOI: <https://doi.org/10.1093/bjps/50.2.231>
58. Butel J.S. Viral carcinogenesis: revelation of molecular mechanisms and etiology of human disease. *Carcinogenesis.* 2000. Vol. 21, No. 3. P. 405–426. DOI: <https://doi.org/10.1093/carcin/21.3.405>

59. Cann A.J. Principles of molecular virology. San Diego: Academic Press Inc., 2005. 1262 p.
60. Capua I., Alexander D. J. Avian influenza: recent developments. *Avian Pathology*. 2004. Vol. 33, No 4. P. 393–404. DOI: <https://doi.org/10.1080/03079450410001724085>
61. Cationization of a monoclonal antibody to the human immunodeficiency virus REV protein enhances cellular uptake but does not impair antigen binding of the antibody / Pardridge W.M., Bickel U., Buciak J. et al. *Immunol. Lett.* 1994. Vol. 42. P. 191–195. DOI: [https://doi.org/10.1016/0165-2478\(94\)90085-X](https://doi.org/10.1016/0165-2478(94)90085-X).
62. Caughey B., Baron G.S. Prions and their partners in crime. *Nature*. 2006. Vol. 19, No 443 (7113). P. 803–810. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature05294>
63. Cellular uptake mechanisms and endosomal trafficking of supercharged proteins / Thompson D.B., Villaseñor R., Dorr B.M. et al. *Chem. Biol.* 2012. Vol. 19. P. 831–843. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2012.06.014>
64. Characterization of CD4 T cell epitopes of infliximab and rituximab identified from healthy donors / Hamze M., Meunier S., Karle A. et al. *Front. Immunol.* 2017. Vol. 8. e500. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00500>
65. Charge-mediated influence of the antibody variable domain on FcRn-dependent pharmacokinetics / Schoch A., Kettenberger H., Mundigl O. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2015. Vol. 112. P. 5997–6002. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1408766112>
66. Chen Y.-B., Fannjang Y., Hardwick J.M. Cell death in viral infections. In: *When Cells Die II* / Ed. Lockshin R.A., Zakeri Z. Wiley, 2004. P. 436–460. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/0471476501#page=434::~text=ISBN%3A9780471476504%20%7CDOI%3A-,10.1002/0471476501,-Copyright%20%C2%A9%202004%20John>
67. Chiu W., Rixon F.J. High resolution structural studies of complex icosahedral viruses: a brief overview. *Virus Res.* 2002. Vol. 82, No. 1–2. P. 9–17. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0168-1702\(01\)00381-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1702(01)00381-1)
68. Circulating T cells to infliximab are detectable mainly in treated patients developing anti-drug antibodies and hypersensitivity reactions / Vultaggio A., Petroni G., Pratesi S. et al. *Clin. Exp. Immunol.* 2016. Vol. 186. P. 364–372. DOI: <https://doi.org/10.1111/cei.12858>
69. Clark B., McKendrick M. A review of viral gastroenteritis. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2004. Vol. 17, No. 5. P. 461–469.
70. Cleland C.E. Life without definitions. *Synthese*. 2012. Vol. 185, No. 1. P. 125–144. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11229-011-9879-7>
71. Cleland C.E., Chyba C.F. Defining ‘life’. *Orig. Life Evol. Biosph.* 2002. Vol. 32, No. 4. P. 387–393. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1020503324273>
72. Coinfection of chickens with H9N2 and H7N9 avian influenza viruses leads to emergence of reassortant H9N9 virus with increased fitness for poultry and a zoonotic potentia / Bhat S., James J., Sadeyen J. R. et al. *Journal of Virology*. 2022. Vol. 96, No 5. e01856-21. DOI: <https://doi.org/10.1128/jvi.01856-21>.

73. Crick F.H.C., Watson J.D. Virus structure: general principles / *Ciba Foundation symposium on the nature of viruses*. London: J. & A. Churchill, 1957. P. 5–13. DOI: <https://doi.org/10.1002/9780470715239>
74. Cross-species transmission of pseudorabies virus leads to human encephalitis and visual impairment: a case report / Huang H., Wang N., Ai Z. B. et al. / *Front. Neurol.* 2022. Vol. 13. e950931. DOI: <https://doi.org/10.3389/fneur.2022.950931>
75. Data collection for risk assessments on animal health: review protocol / Dorea F. C., Swanenburg M., Horigan V. et al. 2021. *EFSA Supporting Publications*. 2022. Vol. 19, No. 1. e7086E. DOI: <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2022.EN-7086>
76. De Clercq E. Antiretroviral drugs. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2010. Vol. 10, No. 5. P. 507–515. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.coph.2010.04.011>
77. De Clercq E. Antivirals and antiviral strategies. *Nat. Rev. Microbiol.* 2004. Vol. 2, No. 9. P. 704–720. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrmicro975>
78. Delluc S., Ravot G., Maillere B. Quantitative analysis of the CD4 T-cell repertoire specific to therapeutic antibodies in healthy donors. *Fase B J.* 2011. Vol. 25. P. 2040–2048. DOI: <https://doi.org/10.1096/fj.10-173872>
79. den Boon J.A., Diaz A., Ahlquist P. Cytoplasmic viral replication complexes. *Cell Host Microbe*. 2010. Vol. 8, No. 1. P. 77–85. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2010.06.010>
80. Detection of highly pathogenic avian influenza virus H5N1 Clade 2.3.4.4b in great skuas: a species of conservation concern in Great Britain / Banyard A.C., Lean F.Z.X., Robinson C. et al. *Viruses*. 2022. Vol. 14, No. 2. 212. DOI: <https://doi.org/10.3390/v14020212> .
81. Development and qualification of a dendritic cell internalization assay contributing to the immunogenicity risk evaluation of biotherapeutics / Siegel M., Padamsey A., Bolender A.-L. et al. *Front. Immunol.* 2024. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1406804>
82. Diéguez A. Life as a homeostatic property cluster. *Biol. Theory*. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13752-012-0052-4>
83. Differential capacity of T cell priming in naive donors of promiscuous CD4+ T cell epitopes of HCV NS3 and Core proteins / Castelli F.A., Leleu M., Pouvelle-Moratille S. et al. *Eur. J. Immunol.* 2007. Vol. 37. P. 1513–1523. DOI: <https://doi.org/10.1002/eji.200636783> .
84. Does having a cat in your house increase your risk of catching COVID-19? / Allendorf V., Denzin N., Conraths F.J. et al. *One Health*. 2022. Vol. 14. 100381. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2022.100381> .
85. Dolskiy A. A., Grishchenko I. V., Yudkin D. V. Cell cultures for virology: usability, advantages, and prospects. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020. Vol. 21, No. 21. e7978. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms21217978>
86. Effect of pseudorabies virus infection on NMDA receptor expression in mice and its role in immunosuppression / Gong M. D., Long J. Y., Xu W. B. et al.

Veterinary Microbiology. 2024. Vol. 297. e110216. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2024.110216>

87. Effect of variable domain charge on in vitro and in vivo disposition of monoclonal antibodies / Liu S., Verma A., Kettenberger H., Richter W.F., Shah D.K. *mAbs*. 2021. Vol. 13. e1993769. DOI: <https://doi.org/10.1080/19420862.2021.1993769> .

88. Effects of charge on antibody tissue distribution and pharmacokinetics / Boswell C.A., Tesar D.B., Mukhyala K. et al. *Bioconjugate Chem*. 2010. Vol. 21. P. 2153–2163. DOI: <https://doi.org/10.1021/bc100261d>

89. Efstathiou S., Preston C. M. Towards an understanding of the molecular basis of herpes simplex virus latency. *Virus Res*. 2005. Vol. 111, No. 2. P. 108–119. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2005.04.017>

90. Enabling routine MHC-II-associated peptide proteomics for risk assessment of drug-induced immunogenicity / Steiner G., Marban-Doran C., Langer J. et al. *J. Proteome Res*. 2020. Vol. 19. P. 3792–3806. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.0c00309>

91. Evaluating and reporting the immunogenicity impacts for biological products—a clinical pharmacology perspective / Wang Y.-MC., Wang J., Hon Y.Y. et al. *AAPS J*. 2016. Vol. 18. P. 395–403. DOI: <https://doi.org/10.1208/s12248-015-9857-y>

92. Evaluating the Use of Antibody Variable Region (Fv) Charge as a Risk Assessment Tool for Predicting Typical Cynomolgus Monkey Pharmacokinetics / Yadav D.B., Sharma V.K., Boswell C.A. et al. *Evaluating. J. Biol. Chem*. 2015. Vol. 290. P. 29732–29741. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.m115.692434>

93. Examining bull semen for residues of Schmollenberg virus RNA / Dastjerdi A., La Rocca S.A., Karuna S. et al. *Transboundary and Emerging Diseases*. 2021. Vol. 69, No. 4. P. 153–160. DOI: <https://doi.org/10.1111/tbed.14275>

94. Fauci A. S. Host factors and the pathogenesis of HIV-induced disease. *Nature*. 1996. Vol. 384, No. 6609. P. 529–534. DOI: <https://doi.org/10.1038/384529a0>

95. First report of Konjac mosaic virus in *Zantedeschia aethiopica* from the United Kingdom / Chisnall K.A.M., Frew L., Hogan C. et al. *New Disease Reports*. 2022. Vol. 46, No 2. e12130. DOI: <https://doi.org/10.1002/ndr2.12130>

96. Flint S. J., Enquist L. W., Krug R. M. Principles of Virology: Molecular Biology, Pathogenesis, and Control. *Washington: ASM Press*, 2000. 804 p.

97. Forterre P. The origin of viruses and their possible roles in major evolutionary transitions. *Virus Res*. 2006. Vol. 117, No. 1. P. 5–16. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2006.01.010>

98. Forterre P., Prangishvili D. The origin of viruses. *Res. Microbiol*. 2009. Vol. 160, No. 7. P. 466–472. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2009.07.008>

99. Glick B. R., Pasternak J. J. Molecular Biotechnology: principles and applications of recombinant DNA. *Washington : ASM Press*, 1998. 683 c.

100. Global Veterinary Diagnostic Laboratory Equipment Management and Sustainability and Implications for Pandemic Preparedness Priorities / Lasley J.N., Appiah E.O., Kojima K., Blacksell S.D. *Emerging Infectious Diseases*. 2023. Vol. 29, No. 4. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2904.220778>
101. Gordon J., Amini S. General overview of neuronal cell culture. *Neuronal Cell Culture: Methods and Protocols*. 2021. P. 1–8. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1437-2_1
102. Gray S. M., Banerjee N. Mechanisms of arthropod transmission of plant and animal viruses. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1999. Vol. 63, No. 1. P. 128–148.
103. Howard R. S. Poliomyelitis and the postpolio syndrome. *BMJ*. 2005. Vol. 330, No. 7503. P. 1314–1318.
104. Human pseudorabies virus infection: A new threat in Chin. Ou J., Cai S., Zheng F. et al. *J. Infect.* 2020. Vol. 80, No. 5. P. 578–606. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2019.12.018>
105. Humbird D. Scale-up economics for cultured meat / Biotechnology and Bioengineering. 2021. Vol. 118, No. 8. P. 3239–3250. DOI: <https://doi.org/10.1002/bit.27848>
106. Immunol. 2002. Vol. 20. P. 621–667. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.20.100301.064828>
107. Impact of charge patches on tumor disposition and biodistribution of therapeutic antibodies / Stüber J.C., Rechberger K.F., Miladinović S.M. et al. *AAPS Open*. 2022. Vol. 8. P. 3. DOI: <https://doi.org/10.1186/s41120-021-00048-9>
108. Improved prediction of MHC II antigen presentation through integration and motif deconvolution of mass spectrometry MHC eluted ligand data / Reynisson B., Barra C., Kaabinejadian S. et al. *J. Proteome Res.* 2020. Vol. 19. P. 2304–2315. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.9b00874>
109. Incursion of H5N8 high pathogenicity avian influenza virus (HPAIV) into gamebirds in England /Brookes S. M., Mansfield K. L., Reid S. M. et al. *Epidemiology and Infection*. 2022. Vol. 150. 51. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0950268821002740>
110. Innate immune recognition and activation during HIV infection / Mogensen T.H., Melchjorsen J., Larsen C.S., Paludan S.R. *Retrovirology*. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1186/1742-4690-7-54>
111. Insights into viral transmission at the uterine-placental interface / Pereira L., Maidji E., McDonagh S., Tabata T. *Trends Microbiol.* 2005. Vol. 13, No. 4. P. 164–174. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2005.02.009>
112. Javier R. T., Butel J. S. The history of tumor virology. *Cancer Res.* 2008. Vol. 68, No. 19. P. 7693–7706. DOI: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-3301>
113. Johnson J. E., Chiu W. Structures of virus and virus-like particles. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2000. Vol. 10, No. 2. P. 229–235. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(00\)00073-7](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(00)00073-7)

114. Junker F., Gordon J., Qureshi O. Fc gamma receptors and their role in antigen uptake, presentation, and T cell activation. *Front. Immunol.* 2020. Vol. 11. 1393. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01393>
115. Kawai T., Akira S. Innate immune recognition of viral infection. *Nat. Immunol.* 2006. Vol. 7, No. 2. P. 131–137. DOI: <https://doi.org/10.1038/ni1303>
116. Kim M.K., Kim J. Properties of immature and mature dendritic cells: phenotype, morphology, phagocytosis, and migration. *RSC Adv.* 2019. Vol. 9. P. 11230–11238. DOI: <https://doi.org/10.1039/C9RA00818G>
117. Koonin E. Vol., Senkevich T.G., Dolja Vol. The ancient Virus World and evolution of cells. *Biol. Direct.* 2006. P. 1–29. DOI: <https://doi.org/10.1186/1745-6150-1-29>
118. Koonin E.V., Dolja V.V., Krupovic M. Origins and evolution of viruses of eukaryotes: The ultimate modularity. *Virology.* 2015. Vol. 479. P. 2–25. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.02.039>
119. Koyama S., Ishii K.J., Coban C., Akira S. Innate immune response to viral infection. *Cytokine.* 2008. Vol. 43, No. 3. P. 336–341. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2008.07.009>
120. Kraft T.E., Richter W.F., Emrich T. et al. Heparin chromatography as an in vitro predictor for antibody clearance rate through pinocytosis / Kraft T.E., Richter W.F., Emrich T. et al. *mAbs.* 2019. Vol. 12. 1683432. DOI: <https://doi.org/10.1080/19420862.2019.1683432>
121. Kuzmenko O., Kolomiiets S. Trust in Vaccination as a Factor in Public Health During a Pandemic. *Business Ethics and Leadership.* 2021. Vol. 5, No. 4. DOI: <https://lib.sumdu.edu.ua/library/DocumentDescription?docid=USH.8205890>
122. Lee K.K., Johnson J.E. Complementary approaches to structure determination of icosahedral viruses. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2003. Vol. 13, No. 5. P. 558–569. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2003.09.007>
123. Li F., Wang Z., Hu F., Su L. Cell Culture Models and Animal Models for HBV Study. In: Tang H. (eds) Hepatitis B Virus Infection. Advances in Experimental Medicine and Biology, vol 1179. Singapore: Springer, 2020. DOI: https://doi.org/10.1007/978-981-13-9151-4_5
124. Li Y., Li X., Geng X., Zhao H. The IL-2A receptor pathway and its role in lymphocyte differentiation and function. *Cytokine & Growth Factor Reviews.* 2022. Vol. 67. P. 66–79. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2022.06.004>
125. Lucic B., de Castro I.J., Lusic M. Viruses in the Nucleus. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology.* 2021. Vol. 13, No. 8. a039446. DOI: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a039446>
126. Lundström J.O. Mosquito-borne viruses in western Europe: a review. *J. Vector Ecol.* 1999. Vol. 24, No. 1. P. 1–39. PMID: 10436876
127. Machery E. Why I stopped worrying about the definition of life... and why you should as well. *Synthese.* 2012. Vol. 185, No. 1. P. 145–164. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11229-011-9880-1>
128. Maehira Y., Spencer R.C. Harmonization of biosafety and biosecurity standards for high-containment facilities in low-and middle-income countries: an

- approach from the perspective of occupational safety and health. *Front. Public Health*. 2019. Vol. 7. 249. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpubh.2019.00249>
129. Marsh M., Helenius A. Virus entry: open sesame. *Cell*. 2006. Vol. 124, No. 4. P. 729–740. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.007>
130. Matthews R.E.F. Fundamentals of plant virology. *San Diego: Academic Press*, 1992. 403 p.
131. Mayr E. This is biology: The science of the living world. Cambridge, MA: *Belknap Press of Harvard University Press*, 1997. 327 p.
132. Medical Microbiology, Virology and Immunology: textbook for English-speaking students of higher medical educational institutions / T. V. Andrianova, V. V. Bobyr, V. V. Danyleichenko, et al. Vinnytsia: Nova Knyha, 2019. 744 p.
133. Mercer J., Schelhaas M., Helenius A. Virus entry by endocytosis. *Annu. Rev. Biochem.* 2010. Vol. 79. P. 803–833. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060208-104626>
134. Mesri E.A., Cesarman E., Boshoff C. Kaposi's sarcoma and its associated herpesvirus / *Nat. Rev. Cancer*. 2010. Vol. 10, No. 10. P. 707–719. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrc2888>
135. Microbiology and Immunology On-line. URL: <https://www.microbiologybook.org/>
136. Microbiology, virology and immunology in questions and answers / Klymnyuk S.I., Halabitska I.M., Korniyshuk O.P. et al. Ternopil: TNMU, 2022. 400 p.
137. MoFvAb: Modeling the Fv region of antibodies / Bujotzek A., Fuchs A., Qu C. et al. *mAbs*. 2015. Vol. 7. P. 838–852. DOI: <https://doi.org/10.1080/19420862.2015.1068492>
138. Nasir A., Kim K.M., Caetano-Anollés G. Viral evolution: Primordial cellular origins and late adaptation to parasitism. *Mob. Genet. Elements*. 2012. Vol. 2, No. 5. P. 247–252. DOI: <https://doi.org/10.4161/mge.22797>
139. Ng J.C., Falk B.W. Virus-vector interactions mediating nonpersistent and semipersistent transmission of plant viruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2006. Vol. 44. P. 183–212.
140. Ng J.C., Perry K.L. Transmission of plant viruses by aphid vectors. *Mol. Plant Pathol.* 2004. Vol. 5, No. 5. P. 505–511. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2004.00240.x>
141. Niesters H.G. Molecular and diagnostic clinical virology in real time. *Clin. Microbiol. Infect.* 2004. Vol. 10, No. 1. P. 5–11. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2004.00699.x>
142. Non-invasive genetic studies and virus epidemiology (letter) / Everest D., Dastjerdi A., Davies H. et al. *Veterinary Record*. 2022. Vol. 190, No. 5. P. 204–205. DOI: <https://doi.org/10.1002/vetr.1558>
143. Novel human IgG1 and IgG4 Fc-engineered antibodies with completely abolished immune effector functions / Schlothauer T., Herter S., Koller C.F. et al. *Protein Eng. Des. Sel.* 2016. Vol. 29. P. 457–466. DOI: <https://doi.org/10.1093/protein/gzw040>

144. Origin and evolution of viruses / eds. Domingo E., Webster R., Holland J. *London: Academic Press Inc.*, 1999. 620 p.
145. Pandoraviruses: Amoeba Viruses with Genomes Up to 2.5 Mb Reaching That of Parasitic Eukaryotes / Nadège Ph., Matthieu L., Gabriel D. et al. *Science*. 2013. No. 341 (6143). P. 281–286. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1239181>
146. Parainfluenza and corona viruses in a fallow deer (*Dama dama*) with fatal respiratory disease / Dastjerdi A., Floyd T., Swinson V. et al. *Frontiers in Veterinary Science*. 2022. Vol. 9. 1059681. DOI: <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.1059681>
147. Peng H., Bilal M., Iqbal H.M. Improved biosafety and biosecurity measures and/or strategies to tackle laboratory-acquired infections and related risks. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 2018. Vol. 15, No. 12. 2697. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijerph15122697>
148. Pennock R.T. Negotiating boundaries in the definition of life: Wittgensteinian and Darwinian insights on resolving conceptual border conflicts. *Synthese*. 2012. Vol. 185, No. 1. P. 5–20. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11229-011-9873-0>
149. Pirone T.P. Helper-dependent vector transmission of plant viruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* 1996. Vol. 34. P. 227–247.
150. Pithovirus sibericum, a new bona fide member of the “Fourth TRUC” club / Sharma V., Colson P., Chabrol O. et al. *Front. Microbiol.* 2015. Vol. 6. 722. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00722>
151. Possible association between selected tick-borne pathogen prevalence and *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* infestation in dogs from Juarez city (Chihuahua), northwest Mexico-US border / Beristain-Ruiz D. M., Garza-Hernandez J. A., Figueroa-Millan J. V. et al. *Pathogens*. 2022. Vol. 11, No 5. e552. DOI: <https://doi.org/10.3390/pathogens11050552> .
152. Priola S.A., Vorberg I. Molecular aspects of disease pathogenesis in the transmissible spongiform encephalopathies. *Mol. Biotechnol.* 2006. Vol. 33, No. 1. P. 71–88. DOI: <https://doi.org/10.1385/1-59259-766-1:517>
153. Reduction of therapeutic antibody self-association using yeast-display selections and machine learning // Makowski E.K., Chen H., Lambert M. et al. *mAbs*. 2022. Vol. 14. 2146629. DOI: <https://doi.org/10.1080/19420862.2022.2146629>
154. Roossinck M.J. Mechanisms of plant virus evolution. *Annu. Rev. Phytopathol.* 1997. Vol. 35. P. 191–209.
155. Roossinck M.J. Symbiosis versus competition in plant virus evolution. *Nat. Rev. Microbiol.* 2005. Vol. 3, No. 12. P. 917–924. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrmicro1285>
156. Sallusto F., Cella M., Danieli C., Lanzavecchia A. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *Exp. Med.* 1995. Vol. 182. P. 389–400. DOI: <https://doi.org/10.1084/jem.182.2.389>

157. Satija N., Lal S.K. The molecular biology of SARS coronavirus. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2007. Vol. 1102. P. 26–38. DOI: <https://doi.org/10.1196/annals.1408.002>
158. Schramlová J., Arientová S., Hulínská D. The role of electron microscopy in the rapid diagnosis of viral infections – review. *Folia Microbiol.* 2010. Vol. 55, No. 1. P. 88–101. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12223-010-0015-8>
159. Sequestration and Destruction of Rinderpest Virus–Containing Material 10 Years after Eradication / Budke C. M., Pfeiffer D. U., Jones B. A. et al. *Emerging Infectious Diseases.* 2022. Vol. 28, No. 9. P. 1895–1898. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2809.220297>
160. Silva J.M., Hammond S.M., Hannon G.J. RNA interference: a promising approach to antiviral therapy? *Trends Mol. Med.* 2002. Vol. 8, No. 11. P. 505–508. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1471-4914\(02\)02421-8](https://doi.org/10.1016/S1471-4914(02)02421-8)
161. Simmonds P., Aiewsakun P. Virus classification—where do you draw the line? *Arch. Virol.* 2018. Vol. 163. P. 2037–2046. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00705-018-3938-z>
162. Simons C., Wu Q., Htar T.T. Recent advances in antiviral nucleoside and nucleotide therapeutics. *Curr. Top. Med. Chem.* 2005. Vol. 5, No. 13. P. 1191–1203.
163. Sinclair J., Sissons P. Latency and reactivation of human cytomegalovirus. *J. Gen. Virol.* 2006. Vol. 87 (Pt 7). P. 1763–1779. DOI: <https://doi.org/10.1099/vir.0.81891-0>
164. Smith A.E., Helenius A. How viruses enter animal cells. *Science.* 2004. Vol. 304, No. 5668. P. 237–242. <https://doi.org/10.1126/science.1094823>
165. Soosaar J.L., Burch-Smith T.M., Dinesh-Kumar S.P. Mechanisms of plant resistance to viruses. *Nat. Rev. Microbiol.* 2005. Vol. 3, No. 10. P. 789–798. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrmicro1239>
166. Soto C., Estrada L., Castilla J. Amyloids, prions and the inherent infectious nature of misfolded protein aggregates. *Trends Biochem. Sci.* 2006. Vol. 31, No. 3. P. 150–155.
167. State of the art: Lateral flow assays toward the point-of-care foodborne pathogenic bacteria detection in food samples / Sohrabi H., Majidi M.R., Khaki P. et al. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2022. Vol. 21, No. 2. P. 1868–1912. DOI: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12913> .
168. Stram Y., Kuzntzova L. Inhibition of viruses by RNA interference. *Virus Genes.* 2006. Vol. 32, No. 3. P. 299–306. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11262-005-6914-0>
169. Tan K.E., Lim Y.Y. Viruses join the circular RNA world. *FEBS J.* 2021. Vol. 288, No. 15. P. 4488–4502. DOI: <https://doi.org/10.1111/febs.15639> .
170. Tang P., Chiu C. Metagenomics for the discovery of novel human viruses. *Future Microbiol.* 2010. Vol. 5, No. 2. P. 177–189. DOI: <https://doi.org/10.2217/fmb.09.120>
171. Taylor C.E., Brown D.J.F. Nematode vectors of plant viruses. *Wallingford: CAB International*, 1997. 286 p.

172. The Biosafety Research Road Map: The search for evidence to support practices in human and veterinary laboratories / Blacksell S. D., Dhawan S., Kusumoto M. et al. *Applied biosafety*. 2023. Vol. 28, No. 2. P. 64–71. DOI: <https://doi.org/10.1089/apb.2022.0040>.
173. The principle of delivery of T cell epitopes to antigen-presenting cells applied to peptides from influenza virus, ovalbumin, and hen egg lysozyme: Implications for peptide vaccination / Rasmussen I.B., Lunde E., Michaelsen T.E. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2001. Vol. 98. P. 10296–10301. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.181336898>
174. Trombetta E.S., Mellman I. Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annu. Rev. Immunol.* 2005. Vol. 23. P. 975–1028. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.22.012703.104538>
175. Tsai B. Penetration of nonenveloped viruses into the cytoplasm. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2007. Vol. 23. P. 23–43.
176. Tsai W.L., Chung R.T. Viral hepatocarcinogenesis. *Oncogene*. 2010. Vol. 29, No. 16. P. 2309–2324. DOI: <https://doi.org/10.1038/onc.2010.36>
177. Van Regenmortel M.H., Mahy B.W. Emerging issues in virus taxonomy. *Emerg. Infect. Dis.* 2004. Vol. 10, No. 1. P. 8–13. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid1001.030279>
178. Verma A., Verma M., Singh A. Animal tissue culture principles and applications; In: Animal Biotechnology. *Academic Press*, 2020. P. 269–293. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811710-1.00012-4>
179. Viral strategies for evading antiviral cellular immune responses of the host / Iannello A., Debbeche O., Martin E. et al. *J. Leukoc. Biol.* 2006. Vol. 79, No. 1. P. 16–35. DOI: <https://academic.oup.com/jleukbio/article-abstract/79/1/16/6922762>
180. Viroids: survivors from the RNA world? / Flores R., Gago-Zachert S., Serra P. et al. *Annual Review of Microbiology*. 2014. Vol. 68. P. 395–414. DOI: <https://doi.org/10.3390/life12010103>
181. Virus factories: associations of cell organelles for viral replication and morphogenesis / Novoa R.R., Calderita G., Arranz R. et al. *Biol. Cell*. 2005. Vol. 97, No. 2. P. 147–172. DOI: <https://doi.org/10.1042/BC20040058>
182. Virus taxonomy. Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses / eds. Van Regenmortel M.H.V. San Diego, San Francisco, New York: Academic Press, 2000. 1162 p.
183. Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. King A.M.Q., Adams M.J., Carstens E.B. et al. *Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2012. 1327 p.
184. Virus taxonomy: the database of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) / Lefkowitz E.J., Dempsey D.M., Hendrickson R.C. et al. *Nucleic Acids Research*. 2018. Vol. 46, No. D1. P. D708–D717. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkx932>

185. Vis M.A., Ito K., Hofmann S. Impact of culture medium on cellular interactions in in vitro co-culture systems. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2020. Vol. 8. 911. DOI: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00911>
186. Watzinger F., Ebner K., Lion T. Detection and monitoring of virus infections by real-time PCR. *Mol. Aspects Med.* 2006. Vol. 27, No. 2–3. P. 254–298. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.12.001>
187. Weitzman M.D., Lilley C.E., Chaurushiya M.S. Genomes in conflict: maintaining genome integrity during virus infection. *Annu. Rev. Microbiol.* 2010. Vol. 64. P. 61–81.
188. Wongchitrat P., Chanmee T., Govitrapong P. Molecular Mechanisms Associated with Neurodegeneration of Neurotropic Viral Infection. *Mol. Neurobiol.* 2024. Vol. 61. P. 2881–2903. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12035-023-03761-6>
189. Xiong Y., Eickbush T.H. Origin and evolution of retroelements based upon their reverse transcriptase sequences. *EMBO J.* 1990. Vol. 9, No. 10. P. 3353–3362. DOI: <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1990.tb07536.x>
190. Zheng Z.M. Viral oncogenes, noncoding RNAs, and RNA splicing in human tumor viruses. *Int. J. Biol. Sci.* 2010. Vol. 6, No. 7. P. 730–755. DOI: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21152115/>

ПРЕДМЕТНИЙ ПОКАЗЧИК

А

Аглютинація 118
Активація імунної системи 163
Алергічна реакція 161
Антибіотики 21, 23, 48, 51, 65, 87, 92, 105, 132
Антигени 90, 113, 120, 132, 134, 155, 157
Антигенна детермінанта 133
Антигенність 132,
Антитіла 112, 113, 135, 136, 148, 151, 153, 158, 162
Аутоімунні захворювання 133, 163

Б

Бактеріологічні лабораторії 6, 10
Бактеріофаги 74
Біобезпека у лабораторіях 7
Біозахист у лабораторіях 7
Біохімічне типування мікроорганізмів 59
Біохімічні властивості бактерій 58
Бульйон для мікробних культур 20, 25

В

Вакцини 124, 137, 140, 159
Вакцинація у різних тварин 142
Векторні вакцини 140
Види імунітету 124
Визначення антигенів 119
Визначення антитіл у сироватці 95, 117
Визначення біохімічних властивостей 58
Визначення фізіологічних властивостей 58
Визначення чистих культур 58
Висів мікроорганізмів 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31
Висіви на живильні середовища 24, 33, 36, 37
Виявлення антигенів 97, 109, 110, 112, 119, 121,
Виявлення антитіл 110, 117, 118, 120, 121, 122
Виявлення вірусів 107, 112, 122
Виявлення структур бактерій 47, 52
Відбір патологічного матеріалу 81, 83
Віруси 68, 98, 100, 103, 116, 122
Вірусні інфекції 109, 122, 111, 121
Вірусні структури 76,
Вірусологічна лабораторія 66
Вірусологічний пасаж 102

Вірусологічні дослідження 95
Властивості антигенів 131
Вплив на мікроорганізми 12

Г

Генетична стійкість 125
Генетичні методи ідентифікації 114, 115, 116
Гуморальний імунітет 125, 129, 130, 146, 148, 158

Д

Дезактивація 69
Дезінфекція 12, 13, 70, 77
Дендритні клітини 144, 145, 147
Діагностика вірусів за допомогою ПЛР 96, 114
Діагностика вірусного матеріалу 96
Діагностика за допомогою антигенів 117
Діагностика за допомогою ПЛР 114
Діагностика інфекцій 95
Діагностика інфекційних хвороб 95
Діагностика патологічного матеріалу 97
Діагностичні системи 113, 117, 121
Діагностичні тести 113, 117, 121
Діяльність мікробіологічних лабораторій 6

Е

Експрес-методи діагностики 107
Ентеробактерії 20
Еукаріотичні клітини 35

Ж

Живильне середовище 17, 103
Живильні середовища для культур клітин 103, 106
Живі препарати 40

З

Збудники інфекцій 81
Зоонози 109

І

Ідентифікація бактерій 58
Ідентифікація мікроорганізмів 58
Імунітет 124
Імунітет до бактеріальних інфекцій 124
Імунітет проти вірусів 124

Імунна відповідь 154, 157
Імунна пам'ять 146, 158
Імунна система тварин 155
Імунна толерантність 146, 155
Імунний дефіцит 160
Імунні клітини 144, 145, 146, 147, 148
Імуноглобуліни 148, 149, 152, 153
Імуноглобуліни А, G, М, Е 150, 151
Імунологічна пам'ять 146, 158
Імунологічні реакції 109
Імунологічні тести 112, 113, 117, 118, 119, 121
Імуносупресія 146, 164
Інфекційний агент 124, 126, 144, 154

К

Клітини імунної системи 144
Клітини Т-лімфоцити 146, 147, 148
Клітини В-лімфоцити 146, 147, 148
Клітинна активність під час інфекцій 157
Клітинна імунна відповідь 158
Клітинна культура 98, 100, 101
Клітинний імунітет 124, 146, 158
Культивування бактерій 24
Культуральні властивості бактерій 33, 34, 35, 36, 37
Культуральні методи 33
Культури клітин 95, 100, 101, 102
Культури мікроорганізмів 25

Л

Лабораторні дослідження імуноглобулінів 110, 117, 118, 119, 120, 121, 122
Лабораторні методи діагностики 95
Лабораторні методи дослідження 110
Лабораторні методи ідентифікації 58, 107
Лабораторні технології імунодіагностики 119, 120
Лейкоцити 144
Лікування вірусних захворювань
Лімфоцити 144, 145, 148

М

Мембранні рецептори імунної системи 146
Методи висіву 26, 31
Методи вірусологічних досліджень 96, 99

Методи досліджень 96
Методи ідентифікації мікроорганізмів 58, 107
Методи стерилізації 12, 14
Методи фарбування мікроорганізмів 42, 44, 47
Мікробіологічні дослідження 58
Мікробіологічні тести 61, 62, 63
Мікроскопічні дослідження 96
Мікроскопічні методи 39, 58, 96, 110
Мікроскопічні препарати 40, 47
Молекулярна ідентифікація 114, 115, 116
Молекулярне дослідження 114, 115
Молекулярне типування 115, 116
Молекулярні методи виявлення вірусів 114, 115, 116
Молекулярно-біологічні методи 114, 115, 116

Н

Накопичення вірусів 99
Нейтралізація токсинів 118
Неспецифічний імунітет 125
Нормальна імунна відповідь 155, 157
Нуклеїнові кислоти 75, 76, 77, 78, 114, 115, 134

О

Обробка зразків 90, 91, 92, 93

П

Пакування патологічного матеріалу 87, 88
Патогени 7, 144, 148
Патогенність 133
Переваги вакцинації 141
Переваги лабораторних методів 122
Персональна біобезпека 11
Підготовка вірусологічного матеріалу 90
Підготовка матеріалів до дослідження 91
Порушення імунної відповіді 160
Природний імунітет 124
Природні механізми імунітету 126, 127
Проби з патологічного матеріалу 91
Протизапальні препарати 163
Протипухлинний імунітет 125
Профілактика інфекцій у тварин 137

Р

Регуляція імунної відповіді 154

Рецептори імунної системи 146
Роль імуноглобулінів 150, 151, 158

С

Синтез імуноглобулінів 146
Система комплементу 157, 158
Специфічний імунітет 124
Спороутворюючі бактерії 14
Стерилізація 12, 14
Структура імуноглобулінів 152, 153
Схема діагностики 95

Т

Тести на вірусні інфекції 121
Тестування імунного статусу 119, 120
Техніка ідентифікації 58
Техніки висіву мікроорганізмів 31
Техніки імунологічних тестів 112, 113, 117, 118, 119, 120, 121
Технологія вакцинації 142
Т-клітини 144, 146, 148
Тривалість імунної пам'яті 147

У

Умови транспортування патологічного матеріалу 72, 73, 87, 88
Умовно-патогенні мікроорганізми 55

Ф

Фагоцитоз 145, 147
Фармацевтичні засоби для імунізації 137

Х

Характеристика бактерій 133
Характеристика вірусів 134, 135

Ш

Штучний імунітет 124
Штучні антигени 137

Я

Якісні методи досліджень 59, 61

