



МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ОДЕСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ФАКУЛЬТЕТ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ

**Кафедра епізоотології, паразитології
та мікробіології ім. проф. В.Я. Атамася**



МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ
до організації навчальної практики
з дисципліни «Ветеринарна вірусологія»
для здобувачів денної форми навчання
другого (магістерського) рівня вищої освіти, спеціальності
211 ветеринарна медицина

Одеса 2023

УДК: 636.09:578(083.13)

Укладач:

кандидат ветеринарних наук, доцент

Пероцька Л.В.

Рецензент:

кандидат біологічних наук, доцент

Бойко Ю.О.

Методичні рекомендації до організації навчальної практики з дисципліни «Ветеринарна вірусологія» для здобувачів денної форми навчання другого (магістерського) рівня вищої освіти, спеціальності 211 ветеринарна медицина / Л.В. Пероцька [Електронний ресурс] – Одеса. : ОДАУ, 2023. – 1 електрон. опт. диск (CD-ROM); 12 см. 30 с.

Методичні рекомендації до організації навчальної практики з дисципліни «Ветеринарна вірусологія» призначені для здобувачів денної форми навчання другого (магістерського) рівня вищої освіти спеціальності 211 «Ветеринарна медицина». У матеріалах представлено перелік індивідуальних завдань, тести для самоконтролю та рекомендовану літературу. Рекомендації спрямовані на формування у майбутніх фахівців теоретичних знань та практичних навичок щодо правил роботи у вірусологічних лабораторіях.

Схвалено науково-методичною комісією факультету ветеринарної медицини
Протокол № 6 від 09 лютого 2023 р.

Зміст

1. Вступ.....	3
2. Мета та завдання навчальної практики.....	3
3. Основні положення.....	3
4. Обов'язки керівника практики та здобувача вищої освіти.....	6
5. Проведення інструктажу з техніки безпеки під час роботи в умовах вірусологічної лабораторії ветеринарної медицини. Вивчення правил охорони праці та виробничої санітарії. Знайомство з роботою вірусологічної лабораторії ветеринарної медицини	8
6. Правила відбору патологічного матеріалу, його консервування та транспортування до лабораторії; оформлення супровідної документації згідно з правилами, методи лабораторної діагностики інфекційних хвороб сільськогосподарських тварин.....	14
7. Виконання індивідуальних завдань. Підведення підсумків практики, прийом та перевірка щоденників, виставлення заліків з навчальної практики.....	24
8. Заключення.....	28

Вступ

Перед сільськогосподарськими вищими навчальними закладами поставлена ціль підготувати високо кваліфікованих спеціалістів, які повинні володіти досягненнями науки і техніки та практичними навичками в розв'язуванні практичних задач сучасного агропромислового комплексу.

Навчальна практика здобувачів вищої освіти в умовах виробництва органічна частина навчального процесу, важливий засіб підготовки висококваліфікованих фахівців за спеціальністю 211- Ветеринарна медицина. Вона спрямована на закріплення теоретичних знань, отриманих здобувачами вищої освіти за час вивчення дисципліни «Ветеринарна вірусологія», набуття і удосконалення практичних навичок і умінь у процесі діагностики інфекційних захворювань.

Метою навчальної практики є закріплення і поглиблення теоретичних знань, одержаних під час навчання, ознайомлення здобувачів вищої освіти із класифікацією вірусів, сучасними засобами і методами їх діагностики та специфічною профілактикою вірусних хвороб тварин. Навчальна практика закріплює інтерес до вибраної спеціальності.

Завдання навчальної практики. Основними завданнями практики з ветеринарної вірусології є:

1. Ознайомлення здобувачів вищої освіти із структурою та особливостями роботи вірусологічної лабораторії ветеринарної медицини;
2. Ознайомлення із чинними Державними стандартами лабораторної діагностики інфекційних хвороб тварин.

За результатами навчальної практики здобувач повинен **знати:**

- правила техніки безпеки при роботі з інфекційним матеріалом;
- правила техніки безпеки при проведенні стерилізації;
- техніку ідентифікації вірусів.

уміти:

- готувати лабораторний посуд до вірусологічних досліджень;
- стерилізувати лабораторний посуд після виконаної роботи;
- заражати лабораторних тварин та відбирати патологічний матеріал;
- культивувати віруси в курячих ембріонах;
- заражати культури клітин.

Основні положення. Навчальна практика з ветеринарної вірусології проводиться для здобувачів вищої освіти II курсу повного терміну навчання впродовж 6 днів за типом шести годинного практичного заняття. Всього

згідно навчального плану відведено 45 годин, з яких 18 годин практичних занять та 27 самостійної роботи.

Здобувачам вищої освіти проводять інструктаж з техніки безпеки під час роботи в умовах вірусологічної лабораторії ветеринарної медицини, з метою ознайомлення з правилами охорони праці та виробничої санітарії.

Здобувачів вищої освіти знайомлять з правилами внутрішнього розпорядку відділів лабораторій, порядком отримання матеріалів для вірусологічних досліджень (кров, гній, трупи дрібних загинув тварин, шматочки паренхіматозних органів, проби об'єктів зовнішнього середовища) та документацією, з основною задачею лабораторій ветеринарної медицини - діагностика хвороб сільськогосподарських та свійських тварин, хутрових звірів, риб, бджіл.

Звертається увага на помилки в супровідних документах, на правила відбору, упаковки, пересилання патологічного матеріалу, умови зберігання в період досліджень.

Знайомляться з необхідним обладнанням відділів, роботою термостатів, автоклавів, сушильних шаф, інших приладів, з умовами підготовки спеціального посуду, живильних середовищ, розчинів фарб.

Здобувачі вищої освіти вивчають специфічні методи діагностики, профілактики та терапії інфекційних хвороб.

Під час проведення навчальної практики з ветеринарної вірусології здобувач вищої освіти отримує індивідуальне завдання у вигляді рішення ситуаційних задач та складання схем вірусологічного дослідження патологічного матеріалу за інфекційних захворювань вірусної етіології. На виконання індивідуального завдання здобувач вищої освіти одержує вихідні дані від викладача практики.

Орієнтовний перелік індивідуальних завдань для здобувачів вищої освіти під час практики:

- скласти схему дослідження патологічного матеріалу за сказу, хвороби Ньюкасла та ін. захворювань;
- скласти схему постановки відповідних реакцій.

В період перебування на практиці здобувачі вищої освіти повинні вести робочі записи, в яких реєструється виконана відповідно програми практики робота. Поточний контроль практики здійснюється щоденно за ходом виконання практики кожним здобувачем вищої освіти проводить керівник практики, шляхом перевірки робочих записів здобувачів вищої освіти, де вони занотовують власні спостереження і роблять аналіз робочого дня.

Внаслідок перевірки робочих записів і співбесіди на задану тему здобувач вищої освіти отримує оцінку, яка виставляється в журналі, а в кінці практики підсумкову оцінку за весь період проходження практики.

За результатами практики на підставі здачі індивідуального завдання у вигляді тестів здобувач вищої освіти отримує залік.

Викладачі, відповідальні за проведення практики, щоденно перевіряють робочі записи та знання здобувачів вищої освіти за темою практики згідно тематичного плану. Ведеться журнал відвідування навчальної практики.

Оцінюється практика на підставі результатів перевірки виконання індивідуальних завдань, тестів, співбесіди і висновків керівника практики від університету. Результати оцінки записуються у відомість обліку успішності та залікову книжку здобувач вищої освіти за підписом керівника практики. У тих випадках, коли програма практики не виконана або отримано негативний відгук, здобувачу вищої освіти може бути надано право повторного проходження практики для виконання умов, визначених університетом.

Здобувачам вищої освіти, які не виконали програму практики і поважних причин, може бути надано право проходження практики в інші терміни встановлені деканатом.

Здобувачам вищої освіти, які не виконали програму практики без поважних причин практика не зараховується і розглядається питання про їх відрахування з університету.

Підсумки проведення практики відображаються в звіті кафедри.

Підсумки практики підводять наприкінці останнього дня практики. За результатами навчальної практики здобувачі вищої освіти отримують залік.

Зарахування практики проводиться за умови отримання позитивної підсумкової оцінки за весь період практики, яка вираховується як середнє арифметичне суми оцінок за кожен з тем і виконання індивідуального завдання.

Рівень сформованості знань та навичок здобувача вищої освіти під час проходження навчальної практики оцінюється шляхом захисту індивідуального завдання та отримання заліку.

Місце проведення навчальної практики. Місцем проведення навчальної практики є навчальні лабораторії кафедри епізоотології, паразитології та мікробіології ім. проф. В.Я. Атамася ОДАУ, лабораторії ветеринарної медицини, клініка ОДАУ.

Обов'язки керівника практики від університету. Навчально - методичне керівництво практикою здійснюється безпосередньо викладачами кафедри, які:

- забезпечують здобувачів вищої освіти програмою та методичними рекомендаціями з навчальної практики;
- проводять інструктаж із техніки безпеки;
- повідомляють про терміни виконання завдань;
- роз'яснюють порядок оформлення документів;
- складають план виконання програми;
- видають індивідуальні завдання;
- перевіряють ведення щоденних записів про виконану роботу.

Обов'язки здобувачів вищої освіти до початку практики. До початку проходження практики здобувачам вищої освіти проводять інструктаж із техніки безпеки, на якому звертають увагу на наступні заходи охорони праці:

- необхідність суворого дотримання правил техніки безпеки та особистої гігієни;
- правильне використання необхідного спецодягу;
- техніка безпеки під час роботи з патологічним матеріалом, сироватками крові.

Кожен здобувач вищої освіти після інструктажу розписується в журналі реєстрації інструктажу з техніки безпеки кафедри епізоотології та інфекційних хвороб тварин.

Здобувачі вищої освіти до початку проходження навчальної практики зобов'язані:

- уважно ознайомитися з програмою та графіком проходження практики;
- отримати індивідуальні завдання та методичні рекомендації щодо її виконання;
- своєчасно прибути до місця проходження практики.

Обов'язки здобувачів вищої освіти під час проходження практики.

Здобувачі вищої освіти під час проходження навчальної практики зобов'язані:

- дотримуватись режиму роботи та правил внутрішнього розпорядку на підприємстві;
- під час роботи зі шкідливими хімічними сполуками (кислоти, луги, леткі речовини і т. ін.) для забезпечення безпеки працюючого та присутніх необхідно використовувати спеціально устатковані робочі місця (витяжні шафи) та спецодяг (халати, маски, гумові рукавички);

- під час роботи з електроприладами необхідно дотримуватися правил безпеки, що розміщені біля відповідного обладнання та виконувати роботу під наглядом викладача;
- робоче місце та обладнання утримують в чистоті;
- запалювати спиртівку користуючись сірниками або запальничками;
- посуд із доставленим для дослідження матеріалом обробляють дезрозчином, поміщаючи у кювети чи ставлячи на підлогу;
- під час дослідження матеріалу, а також під час роботи і вірусомісним матеріалом дотримуватися технічних прийомів, які виключають можливість розтин трупів лабораторних тварин проводити на відповідно обладнаному столі за допомогою необхідних інструментів, які після розтину поміщаються в - для роботи з рідким інфікованим матеріалом використовувати гумові груші з'єднані з піпеткою; рідини, що містять патогени, переливаються за допомогою пастерівської піпетки або піпетки Мора на 20 см³. Якщо в процесі маніпуляцій патологічний матеріал випадково потрапив на робочий стіл, він терміново видаляється тампоном, змоченим у дезрозчині. В разі потрапляння зараженого матеріалу на шкіру, кон'юнктиву очей, в ротову порожнину терміново здійснюються заходи щодо знезараження;
- після закінчення роботи використаний матеріал (патологічний матеріал, інструменти та ін.) необхідно віддати лаборанту для знезараження, робоче місце ретельно прибрати і дезінфікувати, вимити руки з милом, за необхідності продезінфікувати, халати та головні убори скласти в поліетиленові пакети;
- не виносити з лабораторії препарати;
- в усіх випадках аварій чи їх загрози (травмування, несправність обладнання, пожежа тощо) необхідно негайно сповістити відповідальну особу та спеціаліста служби з охорони праці підприємства;
- у повному обсязі виконати завдання, передбачені програмою та вказівками її керівників;
- не залишати місця практики без дозволу керівника практики;
- нести відповідальність за виконану роботу;
- суворо дотримуватись правил охорони праці, техніки безпеки і виробничої санітарії.

Звітність. За результатами проходження навчальної практики здобувачі відповідають на тестові запитання, що відображають обсяг і суть виконаної роботи за кожен день практики. При цьому ним мають бути виконані та опрацьовані всі питання програми навчальної практики.

По закінченню практики здобувач представляє на кафедру, особисто керівнику, щоденні записи та відповіді на тестові запитання з навчальної практики, який є звітом і складає залік з навчальної практики.

1-й день – 3 години. Перед початком роботи у вірусологічній лабораторії ветеринарної медицини відбувається проведення інструктажу з техніки безпеки. Розглядаються питання з техніки безпеки під час роботи в умовах вірусологічної лабораторії, а також вивчаються правила охорони праці та виробничої санітарії.

План.

1. Характеристика підрозділів вірусологічної лабораторії.
2. Основи техніки безпеки при роботі з інфекційним матеріалом в лабораторії.

Характеристика підрозділів вірусологічної лабораторії.

У вірусологічних лабораторіях кількість робочих приміщень залежить від масштабів та складності робіт.

Назва приміщення	Призначення приміщення	Обладнання приміщення
1. Прийомна	Реєстрація патматеріалу після прийому.	Столи оцинковані, бачок з дезрозчином.
2. Підготовча	Розтин трупів, огляд, відбір патматеріалу для дослідження.	Дезрозчини, стерильний посуд, бокси для відбору проб та фіксації мазків.
3. Відділ культивування	Культивування клітин і вірусів, виділених з патматеріалу.	Дезрозчини, бокси настільні, посуд та інструменти для культивування, спиртові, газові пальники, термостати, бактерицидні лампи.
4. Серологічний відділ.	Застосування серологічних реакцій для ідентифікації вірусів.	Інструменти, посуд, набори діагностиків.
5. Мийна	Миття приладів, посуду і апаратури.	Каструлі для замочування та кип'ятіння посуду, бачки кислотостійкі, відра емальовані, сушильні шафи.
6. Автоклавна	Стерилізація інструментів, посуду, розчинів, поживних середовищ, відпрацьованого матеріалу.	Столи для прийому посуду та обладнання, автоклави, дистиллятори, сушильні шафи, шафи для стерильного посуду.
7. Дезінфекційна	Знезараження інструментів, посуду, поживних середовищ і розчинів, відпрацьованого патматеріалу.	Столи для прийому інструментів, забрудненого посуду, сушильні шафи, шафи для стерильного посуду, дистиллятори.
8. Віварій	Розведення та утримання здорових і заражених лабораторних тварин.	Обладнання та прилади для утримання тварин.

Задля виконання молекулярно-біологічних методів дослідження, таких як імуноферментний аналіз (ІФА) та полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) в сучасних лабораторіях відводяться окремі приміщення. Але в разі необхідності, обладнання для постановки таких реакцій може розміщуватись і в серологічному відділі.

Основи техніки безпеки при роботі з інфекційним матеріалом.

Планування та обладнання вірусологічних лабораторій потребують ретельної уваги щодо питань з техніки безпеки. При цьому важливо враховувати основні правила:

1. Створити умови безпечної праці співробітників.
2. Унеможливити винос інфекції за межі лабораторії.
3. Зручно розмістити приміщення та апаратуру.

Весь матеріал, що надходить до вірусологічної лабораторії ветеринарної медицини вважається інфекційним!!!

В лабораторії для суворого контролю всі операції, які проводяться с патматеріалом, обов'язково реєструються в документах, а саме:

1. Журнал обліку виявлених вірусів і терміну їх знищення.
2. Журнал вірусологічних досліджень.
3. Журнал обліку руху виробничих або музейних штамів вірусів.

При роботі в лабораторії з вірусовмісним матеріалом необхідно:

- 1. Подбати про власну безпеку!**
2. Унеможливити розсіювання вірусів в навколишньому середовищі.
3. Не допускати забруднення і контамінацію вірусовмісного матеріалу сторонньою мікрофлорою (контамінантом).

Виконуючи роботи із збудниками інфекції, слід пам'ятати, що в зоні ризику особа яка доставляє, відбирає, патматеріал або безпосередньо проводить дослідження.

За статистичними даними, що були зібрані в лабораторіях, з'ясовано, що тільки в 25-50% випадках зараження можливо встановити їх причину.

Дана інформація дозволила випадки хвороби персоналу розподілити наступним чином:

- прокол голкою спецодягу ($\approx 22\%$);
- контакт з розлитим або аерозольним матеріалом ($\approx 22\%$);
- пошкодження склом або іншим гострим предметом ($\approx 20\%$);

- порушення правил користування піпетками ($\approx 18\%$);
- зараження через забруднений скляний посуд ($\approx 2\%$);
- зараження під час розтину лабораторної тварини ($\approx 3\%$);
- заражених при укусах лабораторних тварин ($\approx 1\%$);

*Правила, за умови виконання яких можлива **безпечна** робота в лабораторії:*

1. Двері лабораторії тримати зачиненими. Всі роботи із патологічним або клінічним матеріалом проводити лише в спеціальних боксах.
2. Одягати лабораторну білизну, спецодяг (шапочка, хустинка, халат, марлева пов'язка, бахіли та ін.). В спецодязі не виходити за межі вірусологічного боксу, через певний термін спецодяг стерилізувати.
3. При виконанні робіт користуватись лише стерильним посудом та інструментами. Інструментарій, що використовувався у роботі обов'язково знезаражувати в дезінфекційних розчинах та автоклавувати.
4. Використовувати тільки механічні прилади для набору рідини піпетками. Мінімізувати користування голками та шприцами.
5. Проводити з обережністю всі процедури, запобігати утворенню аерозолів із збудниками інфекції. Щоденно дезінфікувати робочі поверхні, обов'язково після розлиття вірусомісного матеріалу.
6. Мати в наявності окремих холодильників, морозильників для збереження патогенного матеріалу.
7. Рідкі відходи не виливати в каналізацію, тверді не викидати у відра для сміття. Збирати в спеціальні контейнери для обов'язкового знезараження всі види відходів.
8. Не палити, не вживати їжу. На робочому місці підтримувати належний санітарний стан.

2-й день – 3 години. Лише після інструктажу починається знайомство з роботою вірусологічної лабораторії ветеринарної медицини.

План.

1. Проведення дезінфекції у вірусологічній лабораторії.
2. Методика обробки лабораторного посуду для вірусологічних досліджень.

Проведення дезінфекції у вірусологічній лабораторії.

Обов'язковому ретельному знезараженню підлягають усі види скляного, пластикового посуду; обладнання лабораторії; трупи лабораторних тварин, предмети догляду за тваринами (клітки, підстилка, скляні банки, годівниці тощо). Знезараженню також підлягають використані мийні та дезінфікуючі розчини.

Новий посуд та обладнання перед початком досліджень слід тільки

промити та стерилізувати.

Щодо використаного (забрудненого збудниками) обладнання, боксів віварію та різноманітних приміщень першим і обов'язковим етапом обробки є проведення дезінфекції.

Дезінфекція надає можливість:

- максимально знищити вегетативні форми мікроорганізмів (бактерій, грибів) у повітрі, на лабораторних столах, на підлозі боксу, на стінах тощо;
- запобігти рознесенню вірусної або іншої інфекції за межі лабораторії після закінчення дослідів;
- запобігти вторинному інфікуванню систем клітин (курячі ембріони, культури клітин), в яких вирощують віруси.

У вірусологічній лабораторії найуживанішими дезінфектантами є лізол, хлорамін, триетиленгліколь, йодоформ, четвертинні аміни, етиловий, пропіловий, ізопропіловий спирти.

Термін дії дезінфектанта (експозиція) залежить від хімічного складу даного вірусу, механізму дії дезінфектанта та інших факторів.

5%-вий хлорамін використовують у вірусологічних лабораторіях для дезінфекції усіх видів обладнання та інструментів:

1. Перед проведенням дослідів (марля, якою накривають робочий стіл, металеві інструменти для розтину тварин, для прибирання віварію, боксів та інших приміщень);
2. Після проведення дослідів (робочий стіл, інфіковані курячі ембріони, гумові рукавички (10% розчин), взуття на дезінфекційному килимку, клітки та банки, в яких знаходились заражені тварини, металеві інструменти для розтину лабораторних тварин, трупи перед автоклавуванням).

Додаткові дезрозчини, що використовують для дезінфекції вірусовмісних матеріалів.

Спиртові розчини (80%-вий етиловий, 50%-вий пропіловий, 60%-вий ізопропіловий)	2%-вий розчин лізолу	2%-вий розчин лугу
1. Протирають робочий стіл перед початком досліджень. 2. Протирають окуляри після проведення дослідів. 3. Протирають інструменти та шприци	Обробляють сміття від тварин (перед автоклавуванням)	1. Знезаражують трупи лаб.тварин. 2. Знезаражують інфіковані предмети догляду. 3. Знезаражують сміття від тварин. Трупи та сміття заливають дезрозчином перед автоклавуванням

Після проведення дезінфекції в боксі (експозиція 10-12 годин) посуд й обладнання обробляють за відповідними схемами.

Методи обробки посуду для вірусологічних досліджень.

Усе обладнання вірусологічних лабораторій ветеринарної медицини розподіляють на 5 груп:

1. Пробірки, флакони, колби для культивування клітин, центрифужні пробірки, ємкості для поживних середовищ.
2. Шприци.
3. Піпетки.
4. Гумові предмети.
5. Фільтри.

Посуд кожної групи обробляють кип'ятінням в лужних розчинах, а також кислотами. Остаточну стерилізацію проводять автоклавуванням або стерилізацією сухим жаром.

Зміна схем обробки може бути пов'язана зі структурою матеріалу (термостійкі або нетермостійкі пластики та гуми).

Методика обробки лабораторного посуду та обладнання

№ з/п	Назва обладнання	Методика обробки обладнання
1.	Пробірки, флакони, колби	1. Кип'ятити 15 хв. в синтетичному миючому засобі. 2. Обробити абразивом або ферментним препаратом (у разі потреби). 3. Промити 3 рази проточною водою. 4. Витримати 2 години в 15-20% сірчаній кислоті. 5. Промити 10-15 разів проточною водою і 5 разів дистильованою водою. 6. Висушити при 100-110°C. 7. Закрити фольгою і стерилізувати в сушильній шафі при 170°C.
2.	Піпетки	8. Кип'ятити 15 хв. в синтетичному миючому засобі. 9. Промити теплою водою. 10. Витримати в 15-20% H₂SO₄ (2 год.) або в 4% HCl (10-12 год.) 11. Промити 1 годину проточною водою (в апараті для піпеток). 12. Витримати 2 години в дистильованій воді. 13. Висушити при 100-110°C. 14. Стерилізувати в сушильній шафі при 170°C.
3.	Шприци	1. Промити дистильованою водою. 2. Загорнути в марлю. 3. Покласти в чашку Петрі. 4. Стерилізувати в паровому котлі.

4.	Фільтри	1. Залити сірчаною кислотою. 2. Промити водою до нейтральної реакції. 3. Висушити, загорнути в папір. 4. Стерилізувати в автоклаві.
5.	Гумові предмети (пробки, шланги)	1. Кип'ятити 10-15 хв. в синтетичному миючому засобі. 2. Промити теплою водою. 3. Кип'ятити 10 хв. в 0,2% розчині соляної кислоти. 4. Витримати 1 годину в теплій воді. 5. Багаторазово промити дистильованою водою.

Після всіх обробок порожній лабораторний посуд стерилізується *сухим жаром (сушильна шафа)*. Режим роботи даного приладу – Т 165°C (1,5 години) або 180°C (30 хвилин). Його роботу необхідно контролювати.

Автоклавування - один з методів стерилізації посуду та обладнання. Стерилізують даним методом:

- всі живильні середовища та сольові розчини;
- спецодяг (до та після дослідів);
- сміття із кліток лабораторних тварин;
- трупи тварин (в баках, залитих лужним розчином);
- усі миючі розчини (мильні, содові, тощо), в яких після обробки інструментів, рук, посуду та ін. може знаходитись вірус;
- предмети з термостійкої гуми або пластмаси.
- порожній скляний посуд перед початком роботи;
- шприці;

В автоклаві обробка насиченою водяною парою здійснюється за різних температурних режимах.

Значення Т°C регулюють відповідно до додаткового тиску, який встановлюють в автоклаві:

За температури 111-116°C, додатковий тиск 0,5-0,75 атм (40-60хв.). В результаті знищуються віруси та вегетативні форми клітинних мікробів. Спори бацил залишаються неушкодженими.

За температури 121-126°C, додатковий тиск 1,0-1,5 атм (30-45хв.). В результаті знищуються всі віруси та всі форми клітинних мікроорганізмів.

За температури 134-138°C, додатковий тиск 2,0-2,5 атм (10-15хв.). В результаті знищуються всі віруси та всі форми клітинних мікроорганізмів.

Кип'ятіння використовують при неможливості проведення автоклавування. Вібріони руйнуються починаючи з Т 80°C, а відтак, посуд від лабораторних тварин, після попередньої дезінфекції, а також металеві інструменти, гумові рукавички перед початком роботи обробляють при 105°C впродовж 15-20 хв.

Утилізаційні майданчики використовують для спалювання сміття із клітин, в яких утримувались заражені тварини. В них також спалюють трупи, інфікований пластиковий посуд та обладнання, вату, марлю, тощо *після дезінфекції автоклавуванням*.

3-й день – 3 години. Правила відбору патологічного матеріалу. Консервування та транспортування патологічного матеріалу до лабораторії;

План.

1. Правила відбору проб патологічного матеріалу.
2. Техніка взяття проб різного патологічного матеріалу.
3. Консервування, транспортування й зберігання проб патологічного матеріалу .

Контамінацією біоматеріалу називають потрапляння до нього будь-якої сторонньої мікрофлори. Це може відбуватися: під час взяття проб, консервування патологічного матеріалу, його транспортування. Стороння мікрофлора інколи потрапляє під час дослідження патологічного матеріалу.

Відтак *контамінант* – це будь-який сторонній мікроорганізм. Потрапивши до патматеріалу, контамінанти можуть спотворити або унеможливити лабораторне дослідження.

Деконтамінацією, відповідно, називають будь-які прийоми видалення або пригнічення репродукції контамінантів у патологічному матеріалі.

При транспортуванні та зберіганні матеріалу використовують консерванти. Також застосовують спеціальні методики обробки матеріалу під час його підготовки до дослідження.

Правила відбору проб матеріалу.

Час взяття проб. Слід враховувати, що більшість вірусів міститься в патологічному матеріалі в найбільшій кількості лише в перші години хвороби. *Матеріал необхідно відбирати в найкоротші термін!* Важливо провести відбір після появи ознак захворювання або загибелі тварини. У разі необхідності виконують вимушений забій хворої тварини з діагностичною метою. Враховуючи формування специфічної імунної відповіді, затримка на кілька годин знижує вірогідність виділення вірусу. Також після загибелі тварини бар'єрна функція кишечника знижується. Мікрофлора травного тракту проникає в навколишні органи – розвивається бактеріальна та грибкова контамінація органів і тканин. Даний процес теж заважає виділити вірус. Слід враховувати можливий феномен аутостерилізації - руйнування вірусу в трупі. Що також унеможливить виявлення вірусу в трупі.

З урахуванням *патогенезу досліджуваної інфекції* проводять відбір матеріалу. Починають з «воріт інфекції», далі місць його розповсюдження, репродукції та шляхів виділення. Таким чином, відбирають той матеріал, в якому припускають найбільшу концентрацію вірусу. Під час розтину обов'язково відбирають ті шматочки тканин і органів, де виявляють видимі зміни. У більшості випадках відбирають *селезінку, лімфовузли, нирки, печінку, а також головний та спинний мозок, легені тощо.*

Щодо кількості матеріалу: шматочки органів (тканин) біля 10-20г, обов'язково взяті на кордоні уражених і здорових ділянок. Кожен вид матеріалу поміщають лише в окремий посуд.

NB! Не змішувати контамінований і не контамінований матеріал!

Стерильність є обов'язковою умовою під час відбору патологічного матеріалу. Під час транспортування та підготовки до досліджень мікрофлора, що випадково попаде в матеріал, ускладнить збереження вірусів та їх виявлення. Правильно поставити діагноз можливо лише за суворого дотримання умов стерильності. Використання стерильного посуду, інструментів та матеріалів дасть можливість отримати найкращий результат.

Техніка взяття проб різного патологічного матеріалу.

Кров та її компоненти:

- 1) цільна дефібринована кров;
 - 2) цільна кров, стабілізована гепарином чи цитратом натрію;
 - 3) кров, що згорнулась;
 - 4) мазок крові (обов'язково висушити!);
 - 5) лакова кров (цільну кров розбавляють стерильною дистильованою водою у співвідношенні 1:1);
 - 6) окремі клітинні елементи отримують із стабілізованої крові;
 - 7) сироватку крові отримують після згортання та відстоювання;
 - 8) парні проби сироватки крові для ретроспективного дослідження.
- Щонайменше дві проби сироватки крові, отримані від однієї тварини з інтервалом не менше 14 діб. Можливо через місяць, один раз на квартал або півроку.

Фекалії (послід) відбирають в стерильну пробірку стерильною паличкою. з намотаним на неї стерильним ватним тампоном, змоченим стерильним фізіологічним розчином (або живильним середовищем).

Змиви (носового секрету, піхвового, секрету з препуцію) – отримують стерильним поролоновим тампоном в стерильні пеніцилінові флакони із живильним середовищем. До флаконів додають антибіотики (ністатин, стрептоміцин, пеніцилін). Змиви можливо отримати також в стерильний лоток стерильним ватним тампоном, теж змоченим стерильним фізіологічним розчином.

Зіскрібок отримують із слизової оболонки або шкіри з уражених ділянок стерильним скальпелем у стерильний флакон.

Стінки везикул, афт або їх вміст відбирають шприцом або зіскрібають стінки афт.

Слину відбирають безпосередньо у пробірку (за великої кількості) або шляхом просочування стерильних ватних чи марлевих тампонів з перенесенням їх у пробірки. За необхідності посилення слиновиділення

застосовують пілокарпін у дозі 0,2 мг/кг.

Спинномозкову рідину (СМР) відбирають шляхом пункції.

Молоко, сечу відбирають стерильним катетером у стерильний посуд.

Біопсія – прижиттєвий відбір мізерних шматочків тканин або органів спеціальною голкою через шкіру. Даний матеріал називається *біоптат*.

Консервування, транспортування, зберігання проб.

1. *Охолодження* патологічного матеріалу уповільнює процес інактивації вірусів, а також розмноження клітинних контамінантів. При цьому застосовують різні режими охолодження, а саме:

+4°C – температура побутового холодильника;

-15-20°C – умови морозильної камери побутового холодильника;

-70°C – умови спеціальної морозильної камери з режимом регулювання температури;

-196°C – в рідкому азоті в судинах Дюара (-272°C – в рідкому гелії).

2. *Хімічні консерванти*:

5-20% розчин NaCL, 50%-вий гліцерин на стерильному фізіологічному розчині; фенол - 0,2-0,5 %; 5-10-20%-ві розчини глюкози; білкові стабілізатори: 10-50% сироватка крові; 10-50% знежирене молоко; 0,1-2% желатин; 5% ДМСО (диметилсульфоксид).

Транспортування проб.

Патологічний матеріал направляють до вірусологічної лабораторії із супровідним документом в максимально короткий час.

Транспортування проводиться в спеціальних ємностях з притертими пробками, з кришками, що загвинчуються, або в пеналах. Тара повинна мати три шари: 1) зовнішня - для захисту вмісту від навколишніх факторів, що можуть пошкодити матеріал чи упаковку, 2) герметична ємність з патологічним матеріалом, 3) внутрішня водонепроникна упаковка.

Найчастіше використовують термоси з охолодженою рідиною. Для підтримання стабільності температури ємність з патологічним матеріалом поміщають в суміш сухого льоду, кухонної солі та етилового спирту.

Перед початком роботи обов'язково складають план проведення вірусологічного дослідження.

Для проведення досліджень з патматеріалу, що надійшов до лабораторії, відбирають необхідну частину. Залишок (1-2 доби) зберігають в холодильнику. У разі необхідності проводять додаткові дослідження.

4-й день – 3 години. Підготовка проб до вірусологічного дослідження. Методи лабораторної діагностики інфекційних хвороб сільськогосподарських та свійських тварин.

План.

1. Характеристика основних етапів підготовки матеріалу.

2. Методи долабораторної діагностики вірусовмісного матеріалу.
3. Загальна схема діагностики вірусовмісного матеріалу.

Порядок роботи з патологічним матеріалом.

1. Необхідно ретельно обробити дезінфікуючим розчином зовнішню сторону банки з патологічним матеріалом.
2. Флакони з патологічним матеріалом ставлять на лоток, поверхня якого закрита кількома шарами марлі, обробленої 5%-вим розчином хлораміну.
3. Вірусовмісну рідину переливають *тільки над кюветою з дезрозчином.*
4. Порожній скляний посуд після використання патматеріалу обов'язково знезаражують шляхом занурення в дезрозчин.
5. *Винос посуду та обладнання за межі лабораторії проводиться тільки після їх обов'язкової дезінфекції в пароформаліновій камері!*
6. Приміщення та робоче місце після закінчення роботи ретельно дезінфікують.
7. Вірусовмісний матеріал опечатують та здають під охорону.

Стадії підготовки матеріалу включають: *подрібнення твердих та напівтвердих матеріалів, розведення, центрифугування, додавання антибіотиків і перевірка ефективності їх дії.*

Характеристика основних етапів з підготовки матеріалу.

1. Розведення патологічного матеріалу.

Для розведення використовують: фосфатний буфер, сольові розчини Хенкса та Ерла. Дані розчини використовують в лабораторії при роботі:

- із згустками крові (розведення 1:1 або 1:2);
- з подрібненими органами й тканинами (10 %-ва суспензія);
- з вмістом пустул, папул (розведення 1:5 – 1:10);
- зі шматками ураженої шкіри (розведення 1:5 – 1:10);
- з фекаліями (1г на 10 мл розчину).

Стерилізація готових сольових розчинів відбувається в автоклаві при Т 130°C - 15 хвилин.

2. Центрифугування.

Зразки органів, тканин, кров, сечу, змиви з носоглотки та гомогенізовані фекалії після розведення фізіологічним розчином центрифугують при 1500-3000 об./хв. впродовж 15-30 хвилин. Час центрифугування залежить від виду матеріалу. В рідину над осадом переходять вібріони та їх частинки. Залишки органів або тканин представляють собою осад. Рідину над осадом після центрифугування обережно відсмоктують піпетками і обробляють антибіотиками.

3. Обробка антибіотиками.

На місці відбору зразка та під час транспортування мікрофлора потрапляє до патматеріалу. Тому обробку антибіотиками широкого спектру

дії підготованої рідини проводять з метою звільнення її від сторонньої мікрофлори. Доза антибіотика залежить від виду патологічного матеріалу та можливостей його контамінації. Експозиція - 30-60 хв. при Т 20-25°C.

Дози антибіотиків застосованих у роботі з вірусовмісними матеріалами

Назва патологічного матеріалу	Застосовані антибіотики	Доза антибіотиків ОД/мл
Суспензія тканин та органів	Стрептоміцин, пеніцилін, канаміцин, тетрациклін – проти бактерій, ністатин – проти грибів.	100 - 2000
Гомогенізовані фекалії (послід)	Стрептоміцин, пеніцилін, канаміцин, тетрациклін – проти бактерій, ністатин – проти грибів.	30 - 1000
Суспензія з ураженої шкіри	Стрептоміцин, пеніцилін	200 - 500
Кров	Стрептоміцин, пеніцилін	100 - 200
Сеча	Стрептоміцин, пеніцилін	500 - 1000

4. Бактеріологічне дослідження одержаної суспензії.

Задля виявлення супутньої мікрофлори (бактерій, хламідії, актиноміцетів, мікоплазм, грибів) в обробленому матеріалі, проводять висів рідини в розведенні на певні живильні середовища. Таким чином, для культивування мікроорганізмів різних морфологічних груп використовують різноманітні поживні середовища (м'ясо-пептонний бульйон, м'ясо-пептонний агар, середовище Сабуро та ін.).

З метою отримання точних результатів використовують загальні і спеціальні поживні середовища, на які висів робиться в 2-х або 3-х повтореннях. Метод висіву(глибинний або поверхневий) та вибір посуду для нього (пробірки із скошеним агаром, чашки Петрі) залежить від різноманітних обставин.

У разі, якщо дослідження не проводиться, патологічний матеріал краще заморожувати (- 20 - 70°C). Інфіковані матеріали зберігають в окремому холодильнику або морозильній камері. Не допускається сумісне зберігання фізіологічних розчинів, матеріалів від хворих тварин чи поживних середовищ.

Методи долабораторної діагностики вірусовмісного матеріалу.

Діагноз захворювання встановлюють в два етапи, а саме долабораторна та лабораторна діагностика:

- 1) долабораторна діагностика – збір інформації щодо епізоотологічних даних, клінічних ознак захворювання, виявлення патолого-анатомічних змін в органах і тканинах за наявності загиблих тварин;

- 2) лабораторна діагностика - інформація, отримана в результаті досліджень патологічного матеріалу з застосуванням різних методів (вірусологічний, мікроскопічний, серологічний, гістологічний та ін.).

Методи долабораторної діагностики вірусних хвороб

Показники	Методика вивчення
Епізоотологічні данні	Збір інформації щодо видового та кількісного складу захворілих тварин, швидкість та поширення захворювання, проведені щеплення, тощо.
Клінічні симптоми	Реєстрація змін фізіологічних показників хворих тварин (ТПД, порушення апетиту, поведінки, стан шкіри, слизових, функції органів, систем тощо).
Патолого-анатомічні зміни в тканинах та органах (розтин)	<i>Макроскопічні зміни</i> розміру, форми, кольору, консистенції тканин та положення органів; крововиливи, утворення везикул, афт, абсцесів тощо. <i>Мікроскопічні зміни</i> виявляють гістологічними методами в органах та тканинах.

Загальна схема діагностики вірусовмісних матеріалів.

Патологічний матеріал у вірусологічній лабораторії аналізують в певній послідовності. Вибір методу залежить від різних факторів, а саме: *біологічних особливостей вірусу, кваліфікації персоналу, можливостей лабораторії тощо*. Він ґрунтується на чинних ветеринарних інструкціях та лабораторних настановах.

Схема дослідження вірусовмісних матеріалів.

Патологічний матеріал.

- I. За можливості використовують експрес – методи щодо виявлення:
 - антигенів (імунофлюоресценція).
 - тілець – включень (мікроскопічні, гістологічні дослідження);
 - вібріонів (електронна мікроскопія);
- II. Підготовка патологічного матеріалу та отримання вірусовмісної суспензії:
 - накопичення збудника (культивування в курячих ембріонах, культурах клітин, організмі лабораторних тварин);
 - виявлення в отриманій суспензії: антигенів (серологічна діагностика, ІФА), специфічних нуклеотидних послідовностей (ПЛР), аналіз клінічних і патологічних ознак хвороби, цитопатичних змін в культурах клітин.
- III. Підготовка нової партії вірусовмісного матеріалу.

Виявити вірус у патологічному матеріалі складно. Характерні тільця – включення утворює незначна кількість збудників. Навіть концентрація вірусу в ураженій тканині може бути недостатньою для виявлення у електронному мікроскопі. Необхідною стадією роботи є культивування збудника в придатній системі (курячі ембріони, культури клітин, лабораторна тварина). Використання тварин дає також можливість спостерігати клінічні ознаки

захворювання, поставити біопробу. У будь-якій із зазначених систем після накопичення збудника проводять додаткові тести, що підтвердять наявність вірусу.

Загальна характеристика методів лабораторної діагностики

Назва методу	Характеристика методу
Мікроскопічні методи (люмінесцентна, світлова, фазово-контрасна, електронна мікроскопія)	Виявлення віріонів у патологічному матеріалі частіше проводиться за допомогою електронної та люмінесцентної мікроскопії. Задля характеристики змін в інфікованих культурах клітин проводяться дослідження з використанням світлового мікроскопу.
Вірусологічні методи (культивування збудника інфекції в курячих ембріонах, в культурах клітин в організмах лабораторних тварин)	Шляхом культивування в 7-14 денних курячих ембріонах, в первинних та перевивних культурах клітин, а також в організмі лабораторних тварин – морських свинок (мурчак, кавія свійська), кролів, мишей, голубів <i>збудник інфекції активно накопичується</i> . Результатом дії вірусу є зміни в зараженому об'єкті - патологоанатомічні, цитопатичні. Перевіряють, також, здатність вірусу до адсорбції на еритроцитах й чутливість вірусу до ефіру та інших органічних розчинників.
Серологічні методи	Постановка серологічних реакцій різних типів залежить від біологічних особливостей вірусу. Серологічні методи (РП, РПГА, РН та ін.) застосовують для діагностики вихідного патологічного матеріалу й для виявлення вірусу, який культивується на живих тест-об'єктах.
Біологічна проба	Для доведення етіологічної ролі збудника проводиться зараження здорових (інтактних) тварин виділеним вірусом. Приклад, підозра на хворобу Ауескі, сказ, везикулярний стоматит, ящур, інфекційний ларинготрахеїт та ін.
Експрес - методи	Дані методи навіть за незначної кількості патологічного матеріалу дозволяють зібрати інформацію про збудника інфекції вже через 2-8 годин після одержання.

Вибір методу та напрямку досліджень залежить від біологічних властивостей збудника, небезпечності хвороби, можливостей лабораторії тощо.

5-й день – 3 годин. Види лабораторних тварин. Способи фіксації та методи зараження лабораторних тварин. Методики роботи з культурами клітин.

План.

1. Способи фіксації лабораторних тварин
2. Методи зараження лабораторних тварин.
3. Загальні відомості про культури клітин.

Лабораторні тварини

Найчастіше лабораторних тварин використовують з метою проведення біопроби. Патологічний матеріал в *інтактний* організм лабораторних тварини вводиться різними методами.

Види лабораторних тварин.

Для проведення біопроби найчастіше використовують – білих мишей (б/м), кролів, морських свинок (м/св), курей (курчат). Білих пацюків, цуценят, сірійських ховрахів використовують рідше.

Але лабораторними можуть стати тварини будь-якого виду у разі необхідності, умова – репродукція вірусу лише в організмі природно сприйнятливих тварин (ягнята, телята, поросята, лошата та ін.).

Вибір лабораторних тварини відбувається з врахуванням їх виду, віку чутливості, здоров'я, іноді, навіть, чистоти ліній. Слід пам'ятати, що при використанні лабораторних тварин існує небезпека присутності в їх організмі вірусу в латентному стані. Тому при проведенні певних досліджень велике значення відіграють гнотобіоти – *SPF-тварини* (безмікробні тварини), вільні від будь-яких патогенних агентів (бактерій, вірусів, грибів, гельмінтів).

В досліді кількість тварин не повинна бути меншою 3-4 голів в кожній групі.

Піддослідні тварини - тварини, яким вводять вірусовмісний матеріал.

Інтактні тварини - контрольна група (незаражені), вона обов'язково повинна мати однакову кількість.

Тропізм вірусу визначає вибір методу зараження. Розрізняють нейротропні віруси (вірус сказу), пневмотропні (вірус парагрипу-3), дермотропні (вірус віспи), політропні (вірус хвороби Ауескі), що репродукуються в багатьох видах тканин, пантропні (віруси чуми) репродукуються практично в усіх клітинах.

Способи фіксації тварин та техніка їх зараження:

Б/м, пацюк – беруть за хвіст пінцетом, корнцангом або рукою. Миші дають ухватитись за край клітки. Великим і вказівним пальцями беруть за шкіру потилиці, відтягнувши її і утримують тварину, не даючи їй рухатися.

Хом'як – підходять ззаду і обхоплюють грудну клітину.

Кролик – однією рукою беруть за дорсальну частину шкіри, піднімають вгору, другою - утримують за задню частину тіла.

Морська свинка – опускають руку до груднини, попередньо поглажуючи спинку, потім беруть тварину під грудну клітину й за задні лапи;

Курка – однією рукою тримають за ноги, а другою – за обидва крила.

Методи введення вірусовмісного матеріалу:

Ентеральні (в шлунково-кишковий тракт): через рот (перорально, per os), через зонд безпосередньо в шлунок, через пряму кишку (ректально, per rectum).

Парентеральні (поза шлунково-кишкового тракту) внутрішньошкірно (в/ш), підшкірно (п/ш), наскірно (скарифікація), внутрішньовенно (в/в), внутрішньоаортально (в/а), інтраназально (і/н), в серце, аерозольно, внутрішньом'язово (в/м), внутрішньоочеревинно (в/о), інтратрахеально, інтрацеребрально (і/ц).

Групові методи - (одночасно кільком тваринам): перорально. аерозольно.

Індивідуальні методи – зараження однієї тварини будь-яким методом.

Методика введення лабораторним тваринам:

Внутрішньошкірний – тварину фіксують, місце введення вірусовмісного матеріалу вистригають, вибрівають та дезінфікують. Захоплюють невеличку складку шкіри, великим і вказівним пальцями, паралельно шкірі роблять укол і вводять патматеріал. За правильного попадання патматеріалу, на місці введення в товщі шкіри утворюється потовщення, схоже на кульку («гудзик»). Білим мишам та морським свинкам можна робити в плантарну поверхню задньої лапки.

Підшкірно – місце обирають в залежності від виду й розміру лабораторної тварини (лопатка, ділянка спини або плеча, основа хвоста). Великим і середнім пальцями беруть складку шкіри, а вказівним роблять в складці ямку (заглибину) куди вводять голку.

Скарифікація – патматеріал вводять шляхом нанесення подряпини голкою (до появи крапельок лімфи), а також втиранням шпателем (зубною щіткою або скляною паличкою) в шкіру.

Внутрішньом'язевий – ссавцям патматеріал вводять у м'язи стегна, птиці – в грудний м'яз.

Внутрішньоочеревинний (інтраперитонеальний) – для зміщення органів черевної порожнини до діафрагми, тварину тримають вертикально головою донизу. Місце введення обирають збоку від серединної лінії.

Внутрішньовенний – введення виконують обережно через високу небезпеку емболії у різні вени: б/м, пацюкам - у хвостову, кроликам – у вушну, птиці – у підкрилову, крупним тваринам - у яремну, м/с – лише під наркозом після препарування вени.

В серце – ссавців фіксують на спині, птицю – на боці. У м/св – це другий міжреберний простір, 2 см від грудної кістки. Б/м – біля краю грудної кістки, 0,5 см над верхнім поштовхом серця. Кролик – третій міжреберний простір, 3 см від краю грудної кістки. Курка – третій четвертий міжреберний простір на лінії плече-лопаткового суглоба і каудального кінця грудної кістки.

Інтраназальний – слід пам'ятати про небезпеку чхання, матеріал може попасти в органи дихання самого дослідника. Рекомендують введення проводити після засинання тварини. Для цього тварину поміщають в банку з ваткою, змоченою ефіром. Фіксація тварини відбувається в положенні лежачи на спині догори ніздрями, матеріал вводять по краплях. Рідина може потрапити в органи дихання також з повітрям, що вдихується. Кролям можна вводити без наркозу.

Інтрацеребральний – за даного метода використовують голку з обмежувачем 1-2мм. Шкіру на голові відтягують до потилиці. Кролики і м/св – прокол тонкої кістки в області надочноямкової борозни. Б/м – 1-2мм від перетину середньої лінії черепа з перпендикуляром, проведеним через зовнішній край очної ямки.

Аерозольний – застосовують в спеціальних герметичних камерах.

Максимальні об'єми патматеріалу щодо зараження лабораторних тварин,

мл

Метод зараження тварин	Кролик	Морська свинка	Білий пацюк	Біла миша
Внутрішньошкірний (в/ш)	0,1	0,1	0,05	0,02
Підшкірний (п/ш)	5,0	3,0	3,0	0,5

Внутрішньом'язевий (в/м)	5,0	2,0	1,0	0,3
Внутрішньоочеревинний (в/о)	10,0	5,0	2,0	1,0
Внутрішньовенний (в/в)	5,0	2,0	2,0	1,0
Інтраназальний (і/н)	1,0	0,3	0,1	0,03
Інтрацеребральний (і/ц)	0,3	0,05	0,03	0,02

Характерні ознаки репродукції вірусу в організмі лабораторної тварини:

Клінічні ознаки – видимі характерні для даного захворювання зміни стану лабораторної тварини і функціонування її органів, що є прямим доказом наявності та накопичення вірусу після введення патматеріалу.

Імунологічна перебудова організму – наявність в сироватці крові специфічних противірусних антитіл (не раніше 5-7 діб після зараження).

Загибель тварини – щоб виключити ранню загибель (від травми або неправильного введення матеріалу), враховують загибель найчастіше після 24 годин.

Патологоморфологічні (патологоанатомічні та патологогістологічні) зміни виявляють після загибелі або умертвіння. Відмічають видимі зміни органів і тканин, а також зміни, виявлені після гістологічних досліджень.

Феномен гемаглютинації – (здатність склеювати еритроцити) виявлення в органах тварини окремих вірусів, що мають гемаглютинуючі властивості.

Загальні відомості про культури клітин.

Методика отримання культури клітин має стадії:

- ізоляція живих клітин із свіжих тканин (за допомогою ферментативного гідролізу);
- експлантація цих клітин в спеціальні флакони для культивування.

При вирощуванні клітин на стінках культуральних флаконів працюють з моношаровою культурою.

При вирощуванні культури у реакторі з перемішуванням працюють із суспензійною культурою.

6-й день – 3 годин. Методики роботи з культурами клітин. Виконання індивідуальних завдань. Підведення підсумків практики, прийом та перевірка щоденників, виставлення заліків з навчальної практики.

План

1. Переваги і недоліки культури клітин.
2. Тривалість використання культур клітин різних типів.

3. Підготовка культур до роботи.

Переваги і недоліки культур клітин.

Вирощування облигатних паразитів в культурах клітин надало можливість замінити використання тварин в лабораторній практиці. Враховуючи те, що культури клітин є нащадками однотипних клітин, вони мають однорідний генетичний матеріал. Оскільки всі роботи з ними проводяться в стерильних умовах, вони набагато менше забруднені сторонньою мікрофлорою. На їх виготовлення витрачається менше коштів, ніж на утримання лабораторних тварин, навіть з урахуванням недешевих багатокomпонентних поживних середовищ. Ці об'єкти під час роботи не рухаються, не кусають експериментатора. Вони є безпечними. В культурах вірус накопичується в рідині навколо клітин і тому вірусовмісний матеріал відбирати зручно.

Практично всі віруси можна накопичувати в культурі клітин. Це головна перевага даного методу культивування.

Але слід пам'ятати, що клітини в культурі не зовсім ідентичні клітинам тваринного організму. Зміни, які відбуваються в них, не завжди співпадають з тим, які реєструються в цілісному організмі. Робота з культурами клітин дозволяє розмножити й накопичити вірус. В результаті, за допомогою непрямих ознак, спостерігають його дію на клітину - хазяїна. *Відомо, що працюючи з культурами клітин, щоразу трохи модифікується сам вірус.* Змінюються хімічний склад та вірулентність вірусу. Тому необхідно чітко дотримуватись всіх правил техніки безпеки при роботі з зараженими культурами.

Тривалість використання культур клітин різних типів.

Використовуються різні типи культур, які за терміном життя, кількістю пересівів можна розділити на кілька видів (*первинні, перещеплювані*).

Первинні культури. Взяті безпосередньо з організму тварини, з будь-якого органу чи тканини. З ембріональних органів та тканин отримують найкращі культури клітин. Вони характеризуються максимальною швидкістю росту. Використовують трипсинізовані тканини курячих ембріонів, клітини легенів, печінки, нирок, тестікул та ін. Життєздатність клітин визначає вік організму, з якого було взято клітини та їх тип.

До позитивних рис вторинних або субкультур відносять:

- можливість отримати практично з усіх видів клітин, які використовуються у вірусології (окрім курячих фібробластів);
- при пересівах виключають мертві або ненормальні клітини;
- мають таку ж чутливість до вірусів, як і первинні.

Перещеплювані культури. Головна особливість вторинної культури - зміна генетичного матеріалу (мутації). У вторинній культурі зміни генотипу можуть бути *спонтанними* або *індукованими*. Дослідники в останньому випадку опромінюють клітини вторинної культури або обробляють їх хімічними мутагенами. В результаті трансформації природної або штучної утворюються клітини, які здатні витримувати сотні пересівів без втрати фізіологічних й морфологічних властивостей. Клітини вторинної лінії вважають як такі, що перетворились на постійну перевивну або перещеплювану лінію, якщо витримали 70 пересівів з інтервалом 3 дні.

Розмноження збудників вірусних хвороб в культурах клітин.

Тип культури клітин	Назва захворювання	Звідки отримано культуру
Первинні культури	Ящур	Нирка теляти або ембріона
	Везикулярний стоматит	Тканини курячих ембріонів
	Ньюкаслська хвороба	Тканини курячих ембріонів
	Гастроентерит свиней	Нирка або щитовидна залоза свиней
Перещеплювані культури	Сказ	Нирка новонародженого хом'яка
	Ротавірусні хвороби тварин	Нирка ембріона макаки - резуса
	Коронавіруси ВРХ	Аденокарцинома прямої кишки людини
	Епізоотична діарея свиней	Нирка зеленої мавпочки

Підготовка культур клітин до роботи

Насамперед проводять ізоляцію живих клітин зі свіжих тканин. Далі проводять подрібнення (*дезагрегацію*) тканин, переважно за допомогою ферментів. *Ферментативний гідроліз* речовин міжклітинного простору проводять за допомогою трипсину, пронази, колагенази, панкреатину, еластази, гіалуронідаз тощо.

Окрім ферментів для дезагрегації тканин також використовують версен, цитрат або гліцерофосфат натрію. Концентрація і набір компонентів розчину,

а також температура, при якій проводять дезагрегацію залежать від типу тканин та багатьох інших обставин.

Наступним після подріблення проводять *експлантацію клітин*, а саме висів на рідкі живильні середовища в спеціальні флакони.

Оптимальна засівна концентрація клітин – 200 000-500 000 клітин на мл середовища. Клітини після засіву адаптуються до середовища. Вони прикріплюються до скла або пластику та розподіляються по поверхні субстрату. У подальшому вони діляться і розміщуються в один шар по поверхні субстрату. При щільному заповненні клітини контактують між собою. Культура переходить в стаціонарну фазу розвитку. Термін утворення моношару визначається за допомогою світлового мікроскопу. Він залежить від виду й типу культури та складу середовища. Після отримання моношару, при роботі з вторинними або постійними культурами, флакони можна використовувати не тільки для досліджень, але й для розмноження (пересів) культури. Життєздатність клітини моношару зберігають до 20 діб, потім культура гине.

У флакони вносять підготований вірусомісний матеріал в кількості 0,1-0,2 мл. Для розвитку вірусів оптимальна кислотність знаходиться в інтервалі 7,2 – 7,4. Температура може коливатись в межах від 27 до 36°C, але найкраща для вирощування Т 34 - 36°C. Зміни морфології клітин в культурі свідчать про накопичення вірусу. До змін належать: цитопатичні зміни культури, цитопатичних ефект, цитопатична дія вірусу.

Зміни встановлюють, порівнюючи зовнішній вигляд окремих клітин та їх скупчень в заражених флаконах та в флаконах без вірусу (контролі). Зміни добре реєструються за допомогою світлового мікроскопу.

Найчастіше дія вірусу призводить до: появи тілець – включень в цитоплазмі та ядрі, утворення величезних клітин кулястої форми, утворення ділянок мертвих клітин в шарі живих (бляшки), фрагментації клітин, утворення симпластів.

Морфологічні зміни можуть не реєструватись в перших пасажах вірусів в культурі клітин. *Існують віруси, які при відтворенні ніколи не призводять до цитопатичних змін в культурі.* Такі віруси виявляють вивчаючи зміни фізіології культури. До прикладу: постановка серологічних реакцій, неможливість розмноження в зараженій культурі іншого вірусу – *інтерференція*, поява здатності до адсорбції еритроцитів – *гемадсорбція*.

Від типу збудника залежить вид пошкодження і спосіб виявлення вірусу. Слід зазначити, при вивченні одного й того ж вірусу, до змін типу

пошкодження тваринних клітин можуть призвести: заміна одної культури клітин на другу, зміна температури культивування.

Заключення.

При проходженні учбової практики з ветеринарної вірусології здобувачі зобов'язані:

- 1) повністю виконати завдання, які передбачені програмою практики;
- 2) вивчити і суворо дотримуватись правил охорони праці, техніки безпеки і виробничої санітарії;
- 3) нести відповідальність за виконану роботу і її результати нарівні зі штатними ветеринарними фахівцями;

Підсумки учбової практики з ветеринарної вірусології обговорюються на засіданні кафедри. Короткий звіт про результати практики направляються в деканат, а підсумки з учбової практики разом з іншими кафедрами обговорюються на засіданні Вченої ради факультету ветеринарної медицини.

Тестові питання:

- 1. Кількість робочих приміщень у вірусологічних лабораторіях залежить від:**
 - масштабів та складності робіт;
 - території розташування;
 - кількості тваринних господарств в зоні діяльності;
 - кількості досліджуваного матеріалу та штатних працівників.
- 2. Контамінацією матеріалу називають:**
 - контакт матеріалу з лабораторним посудом;
 - забруднення матеріалу екскретами тварин;
 - забруднення матеріалу секретами тварин;
 - попадання в нього будь-якої сторонньої мікрофлори.
- 3. Обробку підготовленої рідини антибіотиками широкого спектру дії проводять з метою:**
 - звільнення від вірусів, що можуть зіпсувати результати лабораторних досліджень;
 - створення стерильного середовища для росту патогенних мікроорганізмів;
 - звільнення її від сторонньої мікрофлори, яка потрапила у флакон на місці відбору зразка і не була знищена під час транспортування;
 - звільнення її від сторонньої мікрофлори, яка потрапила до патматеріалу на робочому місці та в приймальній вірусологічній лабораторії.
- 4. Лабораторна діагностика – це:**
 - комплекс різних методик досліджень, що застосовують в лабораторіях;

- люмінесцентна, світлова, фазово-контрасна, електронна мікроскопія;
- культивування збудника інфекції в курячих ембріонах, в організмах лабораторних тварин або культурах клітин;
- інформація, що була зібрана в результаті досліджень патологічного матеріалу різними методами (вірусологічний, серологічний, мікроскопічний, гістологічний тощо).

5. Мікроскопічні методи:

- люмінесцентна, світлова;
- фазово-контрасна;
- електронна мікроскопія;
- культивування збудника інфекції в курячих ембріонах.

6. Вірусологічні методи:

- люмінесцентна, світлова, фазово-контрасна, електронна мікроскопія;
- культивування збудника інфекції в культурах клітин;
- культивування збудника інфекції в курячих ембріонах;
- культивування збудника інфекції в організмах лабораторних тварин.

7. Біологічна проба

- зараження здорових тварин виділеним вірусом;
- відбір крові або будь-якого іншого матеріалу для досліджень;
- дослідження біологічного матеріалу від хворих тварин;
- розведення патологічного матеріалу для досліджень.

8. Методи введення вірусомісного матеріалу:

- парентеральні
- ентеральні
- групові методи
- індивідуальні методи

9. Деконтамінацією називають:

- прийоми видалення або пригнічення репродукції контамінантів у патологічному матеріалі;
- попадання в патологічний матеріал будь-якої сторонньої мікрофлори з навколишнього середовища;
- прийоми для створення умов щодо стимуляції репродукції контамінантів у патологічному матеріалі;
- швидку заморозку патологічного матеріалу з подальшим розморожуванням у вакуумі.

10. Основні етапи підготовки патологічного матеріалу:

- розведення патологічного матеріалу, центрифугування;
- обробка антибіотиками.
- бактеріологічне дослідження одержаної суспензії.
- охолодження матеріалу, консервування

11. Дезагрегація:

- подрібнення тканин;
- ізоляція живих клітин;

- заморожування клітин;
- обробка антибіотиками патматеріалу.

12. Долабораторна діагностика це:

- інформація щодо клінічних ознак захворювання;
- епізоотологічні дані;
- виявлення патзмін в органах і тканинах при наявності загиблих тварин;
- культивування збудника інфекції в курячих ембріонах.

Література:

1. Ветеринарна вірусологія: підручник. О.С. Калініна, І.І. Панікар, В.Г. Скибіцький. - К.: Вища освіта, 2004. - 432 с.
2. Практикум з ветеринарної вірусології. В.Г. Скибіцький, І.І. Панікар, О.А. Ткаченко [та ін.]. - Київ.: Вища освіта, 2005. - 208 с.
3. Медична мікробіологія, вірусологія та імунологія: підручник для студ. вищ. навч. заклад. І За ред. В.П. Широбокова. Видання 2-е. Вінниця: Нова Книга, 2011. - 952 с.
4. Панікар І.І. Практикум з ветеринарної вірусології. І.І. Панікар, В.Г. Скибіцький, О.С. Калініна. - Суми: Козацький вал, 1990. - 232 с.
5. Лабораторні методи досліджень у біології, тваринництві та ветеринарної медицині: довідник / В.В. Влізла, Р.С. Федорук, І.Б. Ратич та ін.; за ред. В.В. Влізла. - Львів: СПОЛОМ, 2012. - 764 с.
6. Методичні розробки до лабораторних занять «Ветеринарна вірусологія», ЖНАЕУ.- Житомир, 2011.- 57с.