

МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ ДЛЯ СТУДЕНТІВ ІІІ КУРСУ

МЕДИЧНОГО ФАКУЛЬТЕТУ. МОЛОДШІ СПЕЦІАЛІСТИ.

Модуль 3. Вірусологія загальна та спеціальна.

Цілі модуля. 1.Інтерпретувати біологічні властивості патогенних та непатогенних вірусів та закономірності їх взаємодії з макроорганізмом, з популяцією людини і зовнішнім середовищем. 2.Трактувати основи вірусологічної діагностики, етіотропної терапії та специфічної профілактики вірусних інфекцій

.Змістовий модуль. Загальні властивості вірусів. Механізми взаємодії вірусів з макроорганізмом. Методи культивування вірусів. Лабораторна діагностика вірусних інфекцій.

ЗАНЯТТЯ 8.

ТЕМА №12: «Загальні властивості вірусів. Методи культивування вірусів. Культури клітин»

I. АКТУАЛЬНІСТЬ ТЕМИ

Віруси є мікроскопічні хвороботворні агенти, що широко розповсюджені в природі, які вражають всі живі істоти, що населяють нашу планету. Це стосується всіх представників царства тварин, (найпростіших, комах, риб, птахів, звірів, у тому числі людину), і царства рослин (бактерій і вищих рослин). Віруси є виключно внутрішньоклітинними паразитами, репродукція яких на всіх стадіях їхнього розвитку тісно пов'язана з клітинними структурами й метаболізмом клітин, в яких вони паразитують. Віруси – облігатні внутрішньоклітинні паразити, що не мають клітинної структури. У них відсутні білоксинтезуючі системи, власні джерела енергії і є лише один тип нуклеїнової кислоти – або РНК або ДНК.

Успіхи медичної науки і практичної охорони здоров'я сприяли зниженню захворюваності більшістю бактеріальних інфекцій. У зв'язку з цим у загальній структурі захворюваності людини і домашніх тварин зростає питома вага захворювань, що обумовлені вірусами. Так, захворюваність тільки грипом і ГРВІ досягає сьогодні 60-70%.

В останні роки, завдяки впровадженню нових методів діагностики, відкриті збудники цілого ряду інфекцій (віруси гепатитів С, Е, F, G, ТTV, герпесвіруси людини HHV6, HHV7, HHV8) описані раніше невідомі інфекції й ізольовані їхні збудники (збудники людських Т- клітинних лейкозів - HTLV1, HTLV2, віруси імунодефіциту людини HIV1 і HIV2 та ряд інших). Останнім часом з'являються повідомлення про етіологічну роль вірусів у виникненні ряду таких захворювань, як підгострий склерозуючий паненцефаліт, ішемічна хвороба серця, цукровий діабет. Стає зрозумілим, що роль вірусів у патології людини незрівнянно більша за ту, що визначалась уявленнями про їх значення лише як етіологічних агентів відомих інфекцій.

Істотних успіхів досягла противірусна хіміотерапія. У лікуванні цілого ряду вірусних інфекцій відбувається поступовий відхід від симптоматичної терапії і переключення на етіотропну.

Для постановки діагнозу недостатньо одного епідеміологічного анамнезу та клінічного обстеження хворого, а необхідне визначення збудника. Це особливо актуально у випадку, коли для лікування, викликаного вірусом захворювання, медицина має специфічні противірусні препарати. Призначення противірусної терапії повинне базуватися на чіткому уявленні про її необхідність, шляхи й конкретний час її використання, що неможливо без знання патогенезу інфекції на клітинному і субклітинному рівнях.

2. МЕТА НАВЧАННЯ

Загальна мета. Вміти розрізняти патогенні віруси за їхніми властивостями (будовою, етапам взаємодії вірусів з клітиною), визначати методи їхнього культивування для добору тактики вірусологічної діагностики і хіміотерапії.

Конкретні цілі:

Вміти

1. Визначати принципи будови й класифікації вірусів.
2. Диференціювати віруси за типом їхньої взаємодії з чутливою клітиною.
3. Визначати особливості стратегії вірусного геному в ДНК і та РНК-вірусів.
4. Розрізняти методи культивування вірусів і різних клітинних культур, які використовуються для діагностики у вірусології.
5. Готувати первинно - трипсинізовану культуру клітин.

3. ОСНОВНІ ТЕОРЕТИЧНІ ПИТАННЯ

До конкретної мети 1. (Визначати принципи будови й класифікації вірусів).

1. Принципова відмінність вірусів від мікроорганізмів.

2. Ультраструктура і хімічний склад віріону.

До конкретної мети 2. (Диференціювати віруси за типом їхньої взаємодії з чутливою клітиною).

3. Варіанти взаємодії вірусного і клітинного геномів – альтернативний й інтегративний.

4. Типи взаємодії вірусів з чутливою клітиною (продуктивна, абортівна інфекція)

5. Фази взаємодії вірусів з чутливою клітиною при альтернативному типі взаємодії геномів (продуктивної інфекції).

До конкретної мети 3. (Визначати особливості стратегії вірусного геному у ДНК- і РНК вірусів).

6. Стратегія вірусного геному у різних типів вірусів (РНК, ДНК, «однониткових», «двохниткових»).

До конкретної мети 4. (Розрізняти методи культивування вірусів і різновидності клітинних культур, що використовуються в діагностичній вірусології).

7. Біологічні об'єкти, що використовуються для культивування вірусів.
До конкретної мети 5. (Приготувати первинно - трипсинізовану культуру клітин).

8. Етапи отримання первинно-трипсинізованої культури клітин.

4. ЗМІСТ НАВЧАННЯ

Джерела інформації

Література, що рекомендується:

1. Гайдаш І.С., Флегонтова В.В. Медична Вірологія.- Луганськ, 2002.-С.31-91.
2. Пяткін К.Д., Кривошеїн Ю.С. Мікробіологія з вірусологією та імунологією. - Київ: Вища школа, 1992.-С. 38-40, 44-45, 69-70.
3. Букринская А.Г. Вирусология. - М.: Медицина, 1986. - С. 30-87, 150-159.
4. Коротяев А.И., Бабичев С.А. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология.-Санкт-Петербург: Специальная литература, 1998.-С.239-253.
5. Руководство к практическим занятиям по медицинской микробиологии и лабораторной диагностике инфекционных болезней/ Под ред. Проф. Ю.С.Кривошеина.-Київ:Вища школа, 1986.-С.191 – 204, 211-213.
6. Лекція.
7. Стенд у навчальному музеї кафедри.

Додаткова література

1. Фролов А.Ф., Шевченко Л.Ф., Широбоков В.П. Практическая вирусология. - Киев: Здоровья, 1989. - С. 13-23.
2. Посібник з медичної вірусології/ за редакцією В.М.Гіріна.-Київ: Здоров'я, 1995.-С.8-23, 44-54.

При роботі з підручниками та іншою літературою користуйтеся графом логічної структури до даної теми. Якщо в процесі самопідготовки у Вас виникнуть питання, запишіть їх і з'ясуйте на початку заняття у викладача.

5. ОРІЄНТОВНА ОСНОВА ДІЇ

Протокол практичного заняття до теми: **„Загальні властивості вірусів. Методи культивування вірусів. Культури клітин”**

1. Розібрали біологічні об'єкти, що використовуються для культивування вірусів (лабораторні тварини, курячі ембріони що розвиваються, культури клітин).
2. Розібрали класифікацію і загальну характеристику культур клітин і тканин, які використовуються у вірусології. Мікроскопіювали препарати клітинних культур, що пофарбовані гематоксилін-еозином.
3. Вивчили етапи одержання первинно-трипсинізованої культури клітин. Приготували первинно-трипсинізовану культуру курячих фібробластів.

Орієнтуючою основою дії, при вивченні і виконанні даної теми є інструкція.

ІНСТРУКЦІЯ З ВИГОТОВЛЕННЯ ПЕРВИННО-ТРИПСИНИЗОВАНОЇ КУЛЬТУРИ КЛІТИН КУРЯЧИХ ФІБРОБЛАСТІВ

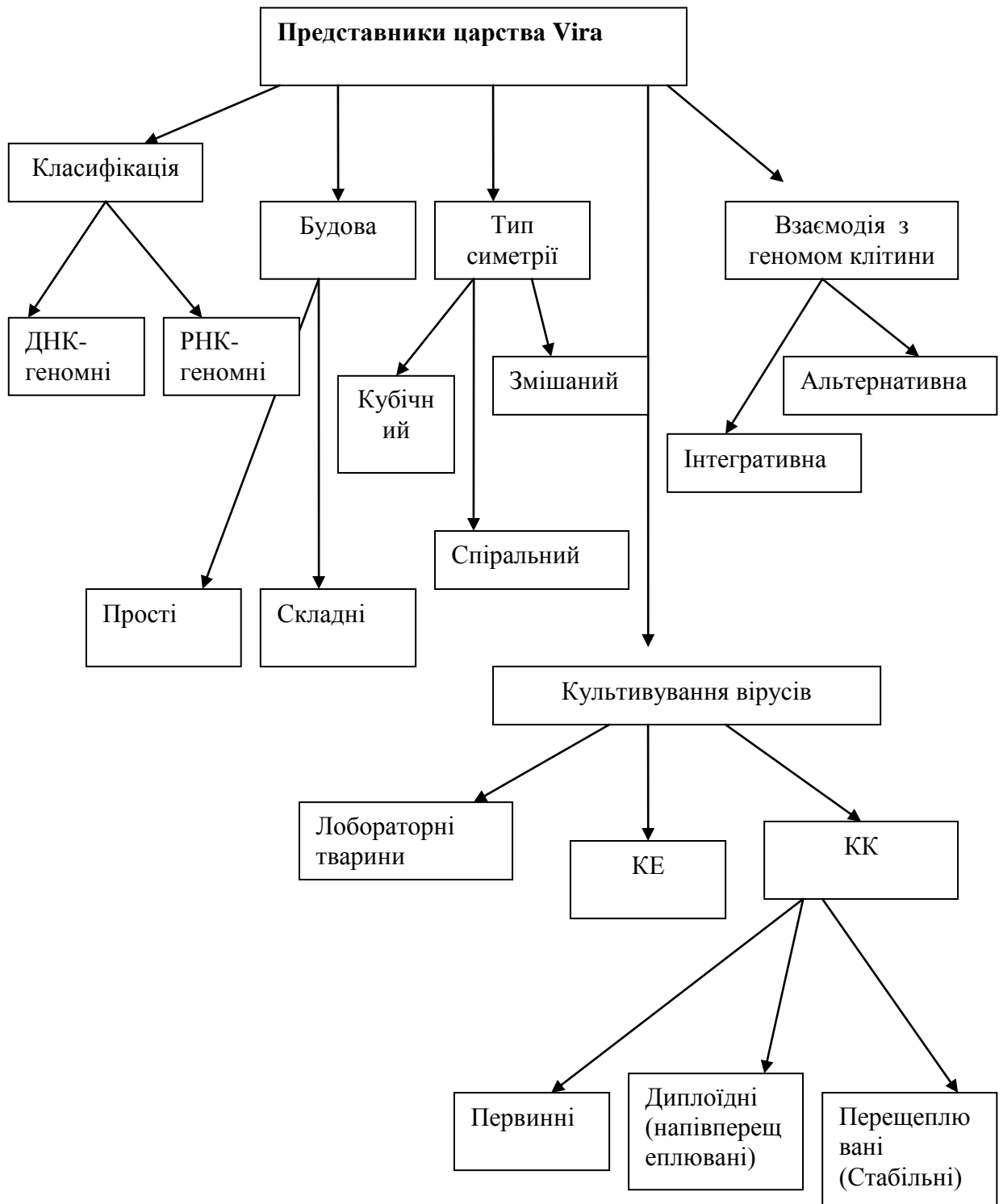
Оснащення заняття:

1. Подрібнені й відмиті від крові фрагменти тканини курячого ембріона в стерильному пеніциліновому флаконі з гумовою пробкою.
2. Фізіологічний розчин.
3. Розчин трипсину 0,25 %. в флаконі з гумовою пробкою.
4. Суміш із середовища 199, сироватки великої рогатої худоби, антибіотиків для культивування клітин (культуральна суміш).
5. Градуйовані піпетки на 1,0 мл.
6. Градуйовані центрифужні пробірки, позначені номерами.
7. Стерильні бактеріологічні пробірки з промаркованим «верхом».

ХІД РОБОТИ

1. До подрібнених й відмитих від крові фрагментів тканини курячого ембріону біля полум'я пальника мірною стерильною піпеткою додати рівний об'єм 0,25% розчину трипсину
2. Закрити пробкою і струснути суспензію тканини в трипсині до помутніння.
3. Дати суспензії відстоятися 1 хв.
2. Перенести суміш трипсинізованих фрагментів тканини курячого ембріона у центрифужні пробірки. Запам'ятати номер відповідної пробірки.
3. Осадити центрифугуванням клітини після трипсинізації.
4. Надібрати надосад (суміш розчину трипсину і фізіологічного розчину) у ємність з дезінфікуючим розчином у зоні полум'я пальника.
5. Додати до осаду клітин у центрифужній пробірці культуральну суміш в об'єм обсязі 1,0 мл.
6. Ресуспендірувати клітини у культуральній суміші.
7. Перенести суспензію клітин у культуральну суміші в стерильні бактеріологічні пробірки з промаркованим «верхом».
8. На пробірки надягти етикетки з написом: Ф.І.О. студентів, що виконували роботу, курс, факультет, група, число й місяць проведення роботи.
9. Черговий збирає пробірки і здає їх лаборанту для інкубації в термостаті в положенні «лежачи» під кутом 10-15 градусів, маркіруванням пробірки догори.

ГРАФ ЛОГІЧНОЇ СТРУКТУРИ ДО ТЕМИ:» «Загальні властивості вірусів. Методи культивування вірусів. Культури клітин»



МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ ЗАНЯТТЯ

Заняття практичне. На початку заняття викладач проводить перевірку й корекцію рівня підготовки студентів до заняття. За запропонованою схемою записується протокол. Студенти виконують самостійну роботу з виготовлення первинно-трипсинізованої культури курячих фібробластів, оформляють протокол. У ході заняття студенти вирішують ситуаційні задачі з посібника „Завдання для самостійної роботи студентам вищих медичних закладів освіти III – IV рівня акредитації” та зі збірника «Завдання для самостійної роботи студентів за курсом загальної і спеціальної мікробіології», знайомляться зі «Схемою виготовлення первинно-трипсинізованої культури клітин» і «Схемою перещеплення стабільної (перещеплюваної) лінії клітин» у навчальному посібнику. Викладач проводить підсумковий тестовий контроль, підписує протоколи, підводить підсумки.

Завдання для перевірки досягнення конкретних цілей навчання
до п.1

Тест 1

Віруси-це особлива форма життя. За цілим рядом властивостей віруси відрізняються від всього живого, але принциповою відмінністю їх від мікроорганізмів є особлива форма паразитизму -паразитизм на генетичному рівні. Що мають на увазі під таким типом паразитизму, що притаманий тільки вірусам?

- А.Репродукцію вірусів в ядрі клітин з використанням клітинної ДНК-полімерази
- В.Фізичний зв'язок вірусного і клітинного геномів
- С.Обов'язкову інтеграцію геному вірусу з геномом клітин і стадію «провіруса»
- Д.Реалізацію генетичної програми вірусу в збиток реалізації генетичної програми клітини
- Е.Використання енергетичних ресурсів клітин

до п.2

Тест 2

Складні віруси мають на відміну від простих додаткову оболонку – суперкапсид. Чим є дана оболонка у складних вірусів?

- А.Фрагментом цитоплазматичної або ядерної мембрани клітини, ліпідним шаром
- В. Фрагментом клітинної стінки, полісахаридним шаром
- С.Другою білковою оболонкою, синтезованою в клітці
- Д.Липопротейиновою оболонкою, кодованою геномом вірусу
- Е. Фрагментом цитоплазматичної або ядерної мембрани клітки, білковим шаром

п.3

Тест 3

При проникненні вірусу в клітину відбувається депротейнізація, транспортування вірусного генома в ядро (або він залишається в цитоплазмі), транскрипція і реплікація вірусного геному, синтез вірусних білків, збірка дочірніх віріонів. Така послідовність подій і їх результат характерні для взаємодії вірусного і клітинного геномів, яку називають

- A.Продуктивною
- B.Корпоративною
- C.Альтернативною
- D.Абортивною
- E.Інтегративною

до п.4

Тест 4

Віруси є паразитами на генетичному рівні. При проникненні вірусу в клітку відбувається депротейнізація, транспортування вірусного генома в ядро (або він залишається в цитоплазмі), синтезу вірусних білків збірки дочірніх віріонів не відбувається. Такий варіант **вірусної інфекції клітки** називають

- A.Продуктивним
- B.Корпоративним
- C.Абортивним
- D.Альтернативним
- E.Інтегративним

Тест 5

Віруси є паразитами на генетичному рівні. При проникненні вірусу в клітку відбувається депротейнізація, транспортування вірусного генома в ядро вбудовування цього генома в геном клітки, надалі, за певних умов, - транскрипція і реплікація вірусного генома, синтез вірусних білків, збірка дочірніх віріонів. Така послідовність подій і їх результат характерні для **взаємодії вірусного і клітинного геномів**, яку називають

- A.Продуктивним
- B.Корпоративним
- C.Альтернативним
- D.Абортивним
- E.Інтегративним

до п. 5

Тест 6

Даний етап взаємодії вірусу з клітиною забезпечується наявністю на поверхні цитоплазматичної мембрани відповідних рецепторів і у вірусу – т.з..

„прикріплювальних” білків. Як називається такий етап взаємодії вірусу з клітиною?

- A. Специфічна адсорбція
- B. Проникнення шляхом злиття
- C. Проникнення шляхом рецепторного ендоцитозу
- D. Проникнення шляхом інокуляції
- E. Неспецифічна адсорбція

Тест 7

Даний етап взаємодії вірусу з клітиною забезпечується різницею зарядів на поверхні цитоплазматичної мембрани клітини і на зовнішній оболонці вірусу. Як називається такий етап взаємодії вірусу з клітиною?

- A. Специфічна адсорбція
- B. Проникнення шляхом злиття
- C. Проникнення шляхом рецепторного ендоцитозу
- D. Проникнення шляхом інокуляції
- E. Неспецифічна адсорбція

до п.6

Тест 8

При проникненні вірусу в клітину відбувається депротейнізація, транспортування вірусного геному в ядро. За участю клітинних полімераз здійснюється реплікація вірусного геному, клітинні транскриптази забезпечують утворення вірусспецифічної іРНК. У цитоплазмі відбувається синтез вірусних білків. Для кого властива така стратегія експресії вірусного геному?

- A. + ниткоподібний РНК-геномних вірусів.
- B. ДНК – геномних вірусів
- C. Ретровірусів
- D. - ниткоподібний РНК-геномних вірусів.
- E. РНК – геномних вірусів з фрагментарним геномом

Тест 9

Серед вірусів вирізняється група ретровірусів, яким притаманий тільки їм властивий варіант експресії геному. Який варіант експресії геному властивий для даної групи вірусів?

- A. ДНК – інформаційна РНК – білок.
- B. Віріонна РНК – білок.
- C. Віріонна РНК – вірусспецифічна ДНК – білок.
- D. Віріонна РНК – інформаційна РНК – білок.
- E. ДНК – ДНК – білок.

до п.7

Тест 10

У пацієнта з підозрою на вірусну інфекцію був відібраний і направлений в лабораторію матеріал для вірусологічної діагностики. Яким чином можна буде ізолювати вірус з матеріалу, отриманого від даного хворого?

- А. Якщо посіяти матеріал на живильне середовище з високим вмістом сироватки.
- В. Якщо посіяти отриманий матеріал в живильне середовище з високим вмістом CO₂.
- С. Культивувати матеріал від хворого в анаеробних умовах.
- Д. Заразити отриманим матеріалом культуру клітин.
- Е. Дослідити отриманий від хворого матеріал під електронним мікроскопом

до п.8

Тест 11

В процесі приготування первинно-трипсинізованої культури клітин виконали механічне подрібнення ембріональної тканини, відмили розчином Хенкса і для отримання клітинної суспензії використали певний засіб. Як називається цей засіб?

- А. Розчин трипсину
- В. Розчин Ерла
- С. Розчин Версена
- Д. Фосфатно-буферний розчин
- Е. Фізіологічний розчин