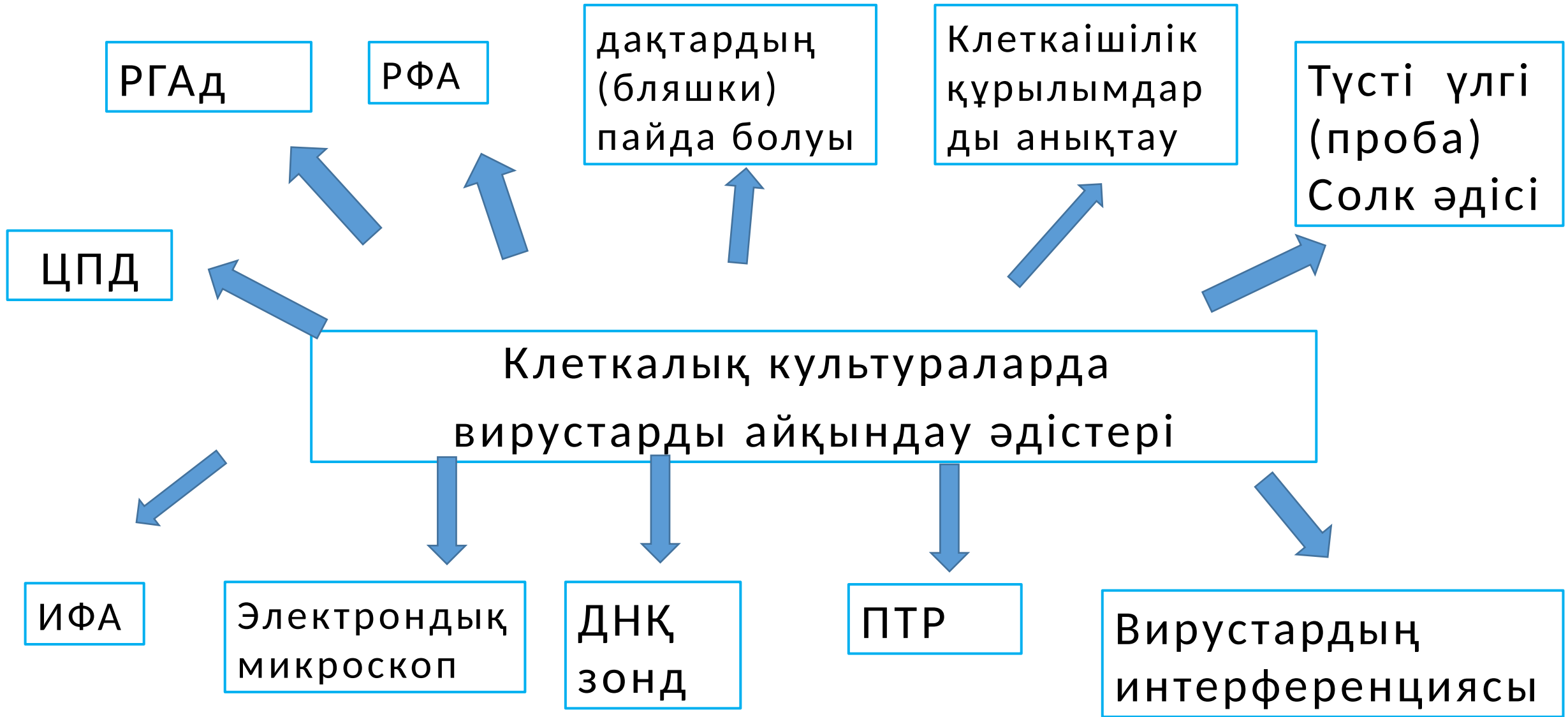


Тақырып: Клеткалық культураларда вирустарды айқындау әдістері



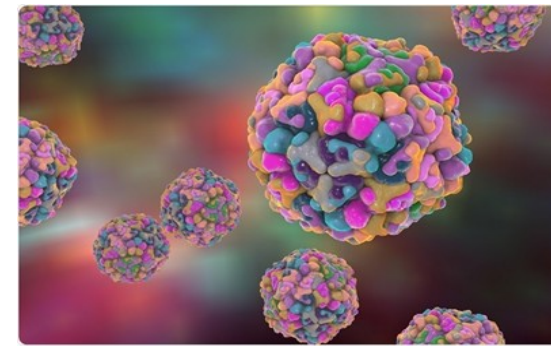
Жоспар:

1. ЦПД (цитопатическое действие)
2. Гемадсорбция реакциясы (РГАд)
3. Вирус жұққан клетка культурасында дақтардың (бляшки) пайда болуын айқындау әдісі
4. Түсті үлгі (проба) Солк әдісі
5. Клеткаішілік құрылымдарды анықтау әдісі
6. Вирустарды иммунофлуоресценттік әдіспен анықтау



➤ Клетка культурасында вирустарды айқындау әдістері

□ ЦПД (цитопатическое действие)



ЦПД - клетка культурасында вирустың әсерінен орын алатын кез келген өзгерістер.

Клеткаларда туындаған морфологиялық өзгерістерді микроскоп (объектив x8-10, окуляр 7-10) көмегімен анықтайды.



ЦПД - клетка культурасындағы моноқабатты тұтас немесе қалыпты клеткалар қабатында ошақтардың түзілуі арқылы байқалады.



ЦПД - дәрежесін шартты белгілермен (крест, балл) белгілейді.

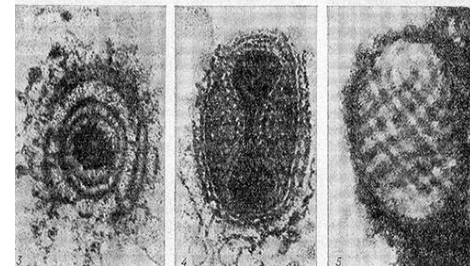
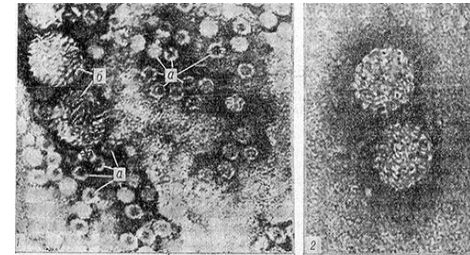
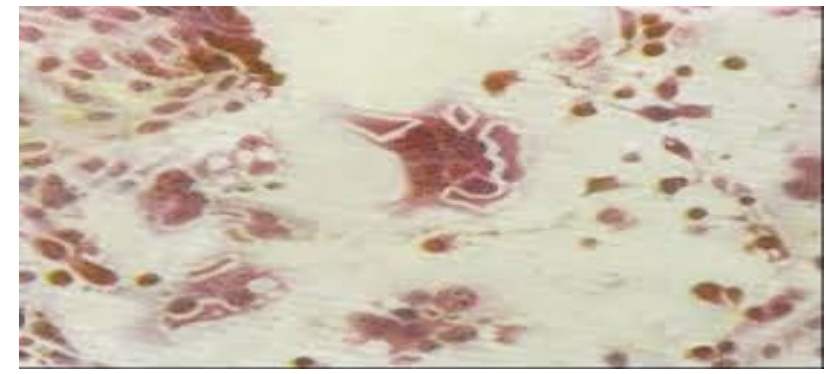
ЦПД - формалары вирустың биологиялық табиғатынан, клеткалар түрінен, жұқтыру дозасынан, өсіру жайдайларынан т.б. тәуелді.



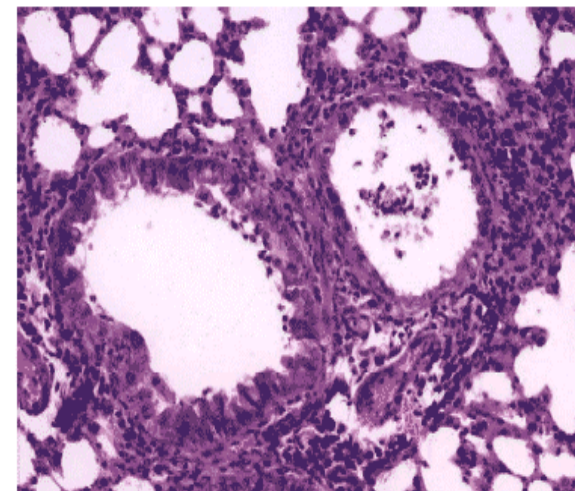
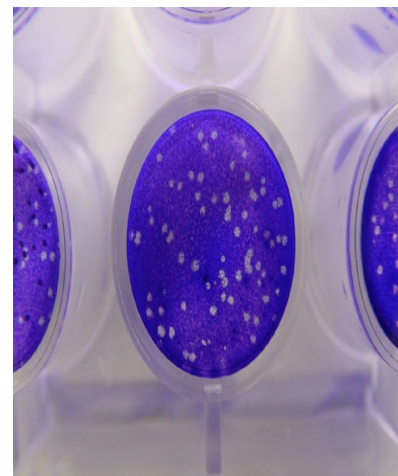
Вирустардың ЦПД әсерінің айқындалу мерзімі өзара ерекшелінеді (энтеровирустар 2-3 тәулік ішінде, аденовирустар 1-2 апта аралығында айқындалады)

➤ ЦПД формалары

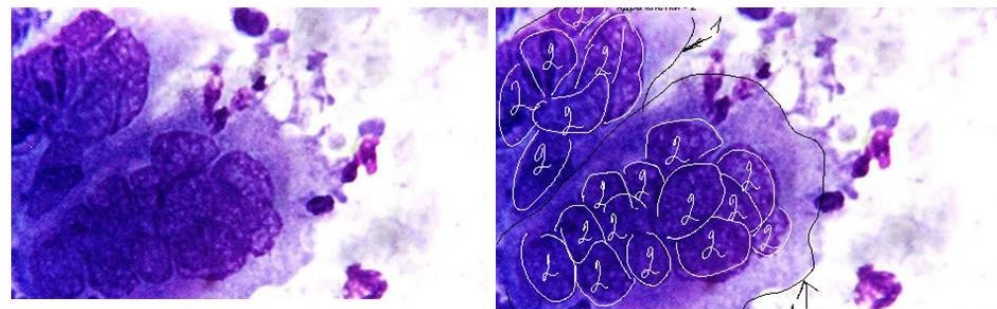
- **Фрагментация** - клеткалардың шыны ыдыс қабырғасынан ажырып, жеке фрагменттерге дейін бөлініп, детриттер түрінде культуралық сұйықтыққа өтуі (визикулярлы стоматит вирусы).
- **Дөңгелектенуі** - культуралық ыдыс қабырғасына бекіну қабілеті жойылып, дөңгелектеніп, әйнек бетінде шашыраңқы таралып, культуралық сұйықтыққа өтуіп тіршілігінің жойылуы (энтеровирус, аденовирус т.б.).
- **Симпласттық құрылымдардың түзілуі** - клетка қабырғаларының еруі салдарынан көрші клеткалармен құйылысуы (клетка ядролары периферияда орналасады). Осында цитоплазмалық массалардан құрылған көп ядролы клеткаларды симпластар (гигантты көпядролы клеткалар) деп атайды.
 - ✓ Лицитиназа (вирустық фермент).
 - ✓ Клеткалардың бөліну процесінің бұзылуы.



- Клеткалар культураларында бірқатар вирустардың (**құтыру, оба, іш сүзегі т.б.**) ЦПД айқындалмайды, ондай культураларда қабатында клеткалардың бөлінуі біртіндеп тежеліп, тіршілігі жойылады.
- Клеткалар культурасында **ақшыл ошақтар (бляшки)** қалыптасады.
- Клетка культурасында көбейген вирустар толық немесе жартылай культуралық сұйықтыққа өтеді (вирустардың суспензиясы),
- Клетка ішінде қалған бөлігін бөліп алу: клеткалар культурасын 2-3 рет қатырып, жібітеді немесе ультрадыбыспен әсер ету әдісін қолданады.

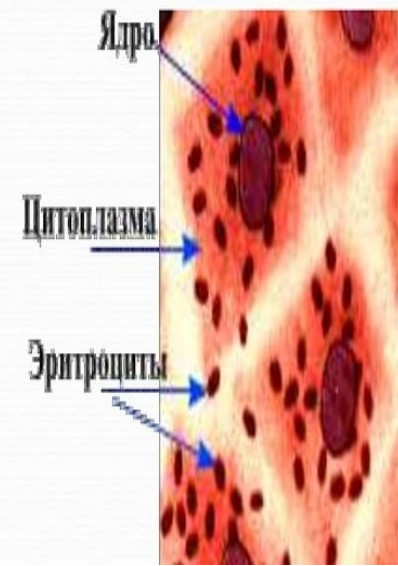
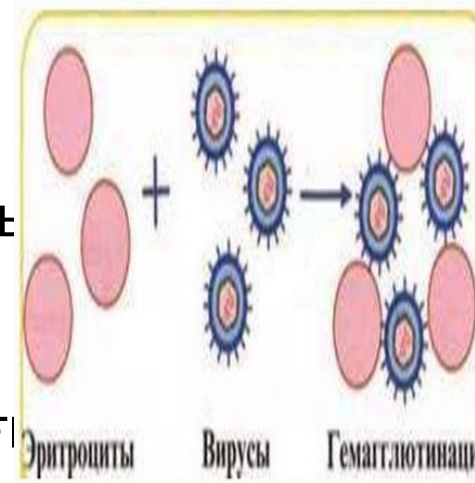


ЦПД вирусів простого герпеса



Синцитий: многоядерные клетки с увеличенной цитоплазмой и внутриядерными включениями Каудри, (окраска по Романовскому-Гимза)

➤ **Гемадсорбция реакциясы (РГАд) –** вирустармен зақымданған клеткалардың беткі қабаттарымен эритроциттердің байланысуы (Фогель Шелок, 1957).



➤ Вируспен зақымдалған клетканың беткі қабатындағы вирустың рецепторлары мен эритроцит рецепторлары өзара жақын болу салдарынан, өзара тіркесіп байланысады.

➤ Гемагглютинация әсеріне сезімтал адамның, маймыл мен теңіз шошқасының эритроциттері қолданылады.



➤ Вирустар: тұмау, парагирпозды, қызылша, оспавакциналар, ньюкасл ауруының вирусы, сүтқоректілер мен құс тұмауы.

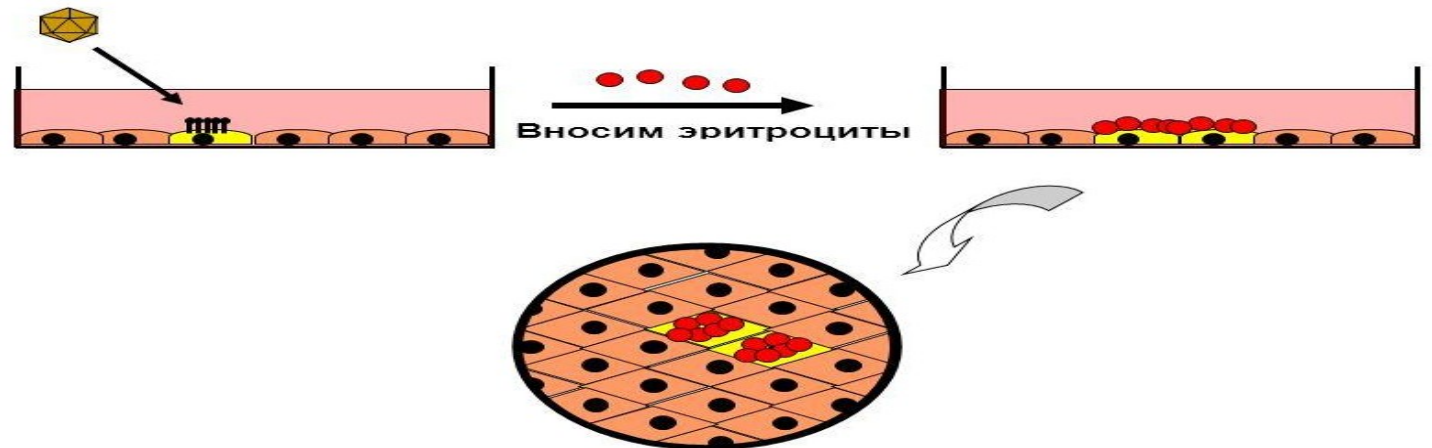
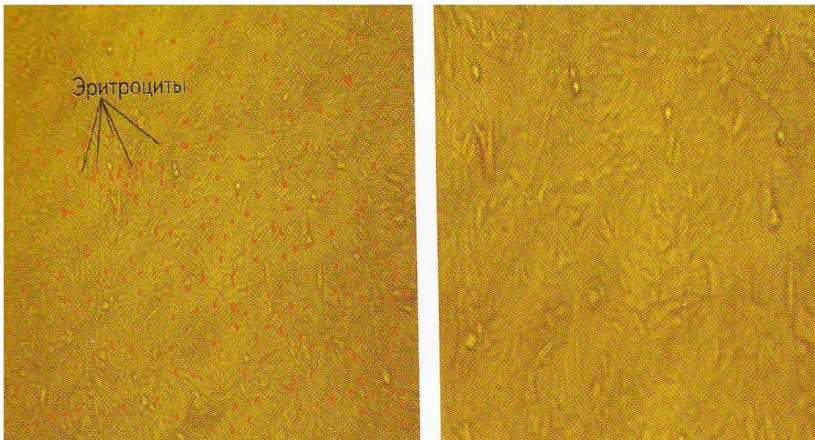
➤ Артықшылығы: клеткада ЦПД әсері айқын байқалмас бұрын қолдануға болады.

• Гемадсорбция реакциясы (РГАд) әдістемесі

Клетка культураларына вирус жұқтыру, 2-3 тәулік өсіру

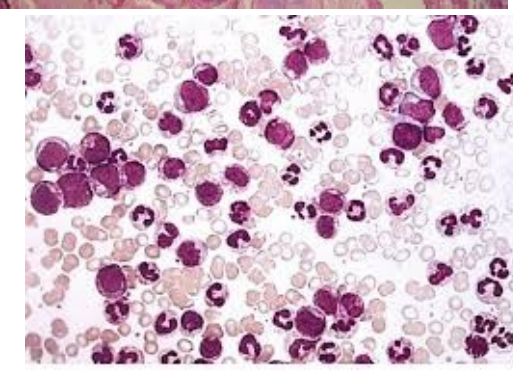
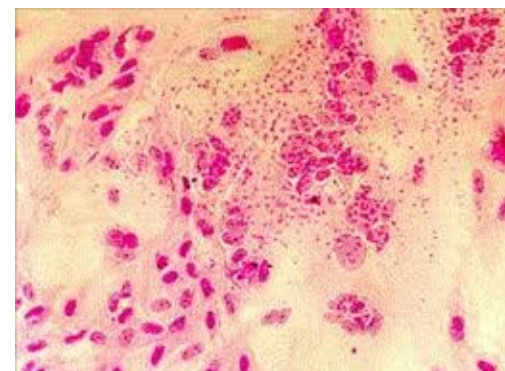
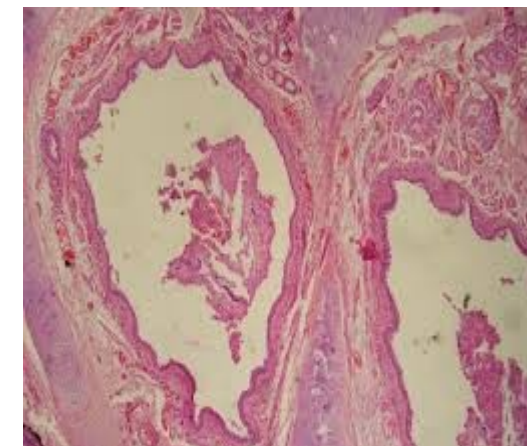
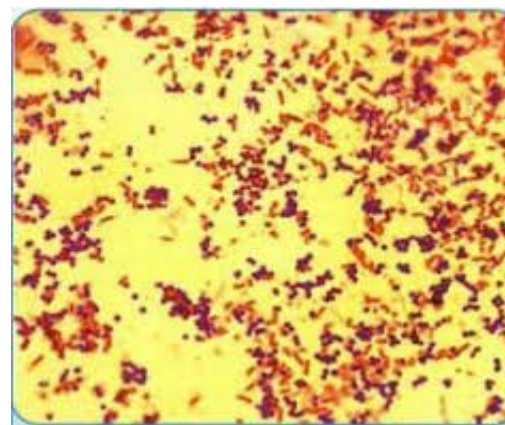
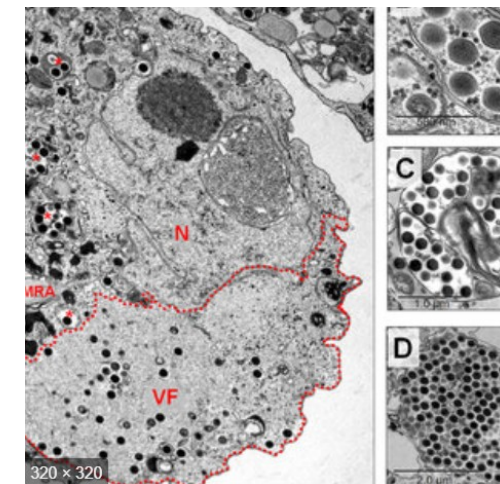
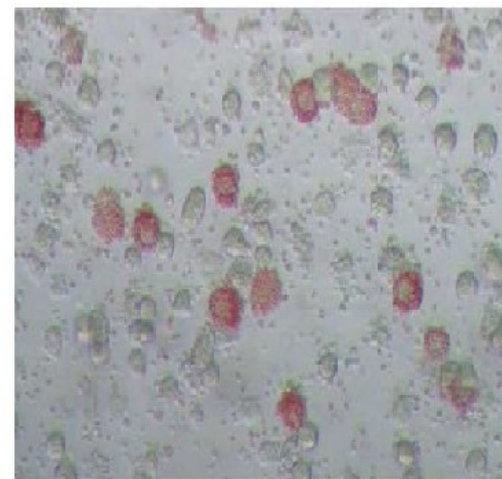
қоректік ортаны төгу,
2-1 0,5 % жуылған эритроцит ерітіндісімен 5-10 минут өңдеу

Физиологиялық ерітіндімен шаю



➤ Вирус пен клеткалардың түріне қарай эритроциттердің орналасуы:

1. Эритроциттер клетка қабатының перифериясында «алқа тәрізді» (шошқалардың африкандық обасы),
2. Эритроциттер клеткалар қабатында ошақтарға жинақталып орналасуы (тумау вирусы),
3. Эритроциттер клеткалар қабатында диффузды орналасуы (парагрипп вирусы)



➤ **Вирус жұққан клетка культурасында дақтардың (бляшки) пайда болуын айқындау әдісі.**

- Орындалуы қиын, вирустарды титрлеуге арналған (Дальбекко және Фогт, 1954 ж) модификацияланған әдіс.
- Вирустардың таза популяцияларын алуға, олардың генетикалық қасиеттерін зерттеуге арналған.
- Мәлін (чума), аусыл (ящур), везикулярлы стоматит, ньюкасл ауруы, құс мәліні , полиомиелит, т.б. айқындауға қолданылады.
- Моноқабат культурасының үстіне құрамында **нейтрльрот** виталды бояғыш қосылған **агарлы (немесе крахмал, метилцеллюлоза)** қоректік орта құйылады, орта құрамында негативті колониялар немесе дақтар болады.
- Дақтар (бляшки) немесе **негативті Дальбеко дақтары** – вирустың әсерінен тіршілігі жойылған клеткалардан тұратын, түссіз аудандар.
- Кейбір вирустар (ірі қара мал мәліні, оспавакциналар, герпестің белгілі бір өкілдері, т.б.) агар қабатымен жабылмаған клеткалық культураларда да түссіз дақты аудандар құруға қабілетті.

Негативті Дальбекко дақтардың пайда болуына негізделген әдіс

Клетка культуралардың моноқабатын қоректік ортамен немесе Хенкс ерітіндісімен жуу



Вирус жұқтыру, 1-2 сағат бойы шайқау, t-37-38 0C



адсорбцияланбаған вирустарды Хенкс ерітіндісімен жуу (пастер пипеткасымен сору)



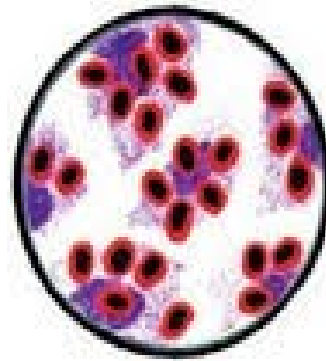
Агарлы орта құю
(агар, Эрл ерітіндісі, бұзау сарысуы, нейтралды қызыл, сода ерітіндісі NaHCO_3 ,
антибиотиктер), қатыру 30-60 минут



Агар бетінен конденсатты төгу.
Флакондарды (клеткаларды төмен қаратып) термостатқа қою

➤ Нейтрал қызыл ерітіндісі әсерінен тек тірі клеткалар боялады, қызыл күлгін фонда негативті Дальбекко дақтары пайда болады.

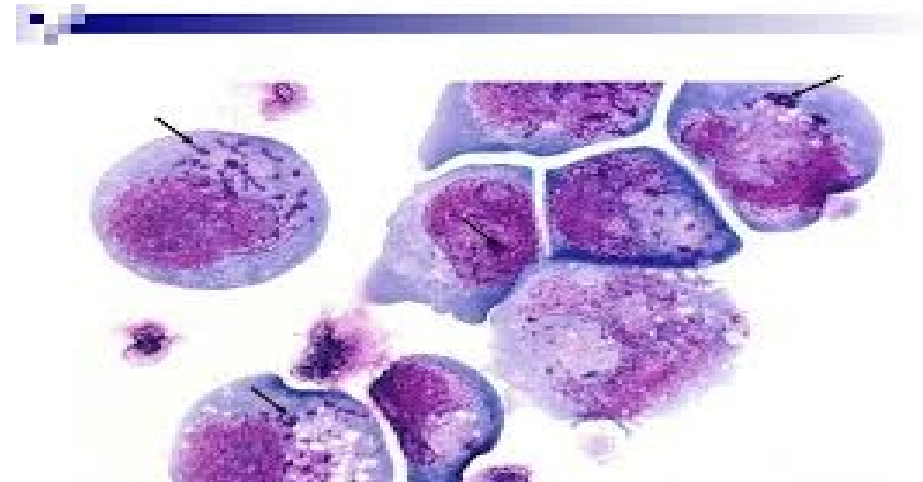
➤ Дақтардың пайда болу уақыты, морфологиясы вирус штамынан, клеткалар түрінен, дақылдау жағдайынан тәуелді.



1



2



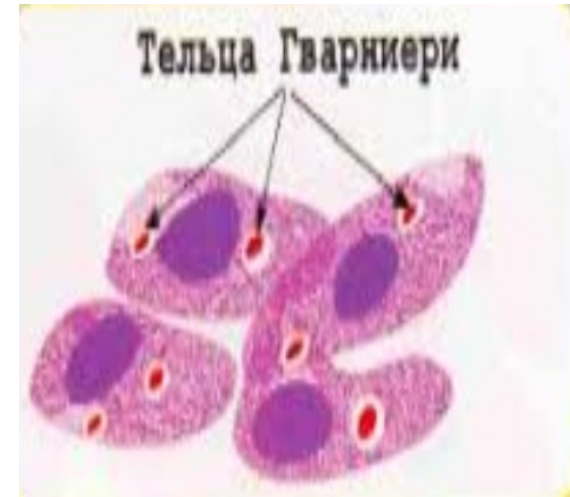
➤ Түсті үлгі (проба) Солк әдісі. /Солк, Янгнер, Уорд, 1954 ж./

- Вирустар жұқтырылмаған ұлпа культураларында метаболизм әсерінен рН қышқыл ортаға ығысады, соның салдарынан қоректік ортаға қосылған **фенолрот** сары түске боялады.
- Ал клеткаларды жоятын вирус жұққан ұлпа культураларындағы сұйықтық түсі өзгеріссіз қалады.
- Көбею коэффициенті жоғары вирустарды баяу өсетін клеткалар культураларына қолданылады.



➤ Клеткаішілік құрылымдарды анықтау әдісі

- Вирустық ауруларда вириондардың немесе олардың бөліктерінің клетка цитоплазмасында немесе ядросында шоғырлануы. Оларды арнайы бояулармен микроскопта анықтайды
- Оларды клеткадағы локализациясына қарай, нуклеин қышқылының құрамына қарай, тинкториалды және гомогенді қасиеттеріне қарай жіктейді.
- Денешіктердің **цитоплазмада** қалыптасуы – шешек, тұмау, құтыру, парагрипп т.б. ауру түрлерінде орын алады.
- **Ядрода** денешіктердің пайда болуы – ірі қара малдың ринотрахеитінде, құстардың ларинготрахеитінде, аденовирустық инфекцияларда т.б. орын алады.



➤ Клеткаішілік құрылымдарды анықтау әдісінің орындалуы

Пробиркаға салынған заттық шыны/ пенициллин флаконында дақылдау



Вирус жұқтыру, t-37 °C



Клетка культурасын жылы Хенкс
(физиологиялық рН 7,0-7,2) ерітіндісімен жуу, кептіру



Фиксация (Буэн 10-15 мин, Карнуа -10 мин, Ценкер-20-30 мин, метил спирті-15 мин немесе т.б.)



Бояу - ГЕМОТОКСИЛИН - ЭОЗИН
(ядро- көк, цитоплазма - күлгін, денешіктер - көк/күлгін)

➤ Гемотоксилин – эозинмен бояу реті

- Бекітілген клеткаларды дист.сумен жуу

- Гемотоксилинмен 5-15 мин өңдеу

- Сумен жуу, аммиак сумен 1-2 мин өңдеу (1-2 тамшы аммиак/дистил.су), сілтілі ортада клеткалар көк түске боялады

- 0,1% эозинмен 30-60 с. өңдеу

- 70%, 80%, 96% спирт, 1 минут

- 96% спирт, 1 минут

- 100 % спирт +ксилол (1:1), 1 минут

- Бальзамға бекіту

➤ Вирустарды иммунофлуоресценттік әдіспен анықтау

Әдіс иммунофлуоресцентті реакция, флуоресцентті антиденелер, белгі салынған антиденелер д.а.

Әдісті орындау: тұра немесе тұра емес жолмен орындалады.

Флуоресценттік қасиеті жоғары (ФИТЦ) затты флуоресценттік қасиеті төмен немесе мүлдем жоқ затпен байланыстырып, соңғыын айқындауға болады.

Флуорохром **ФИТЦ** + белок

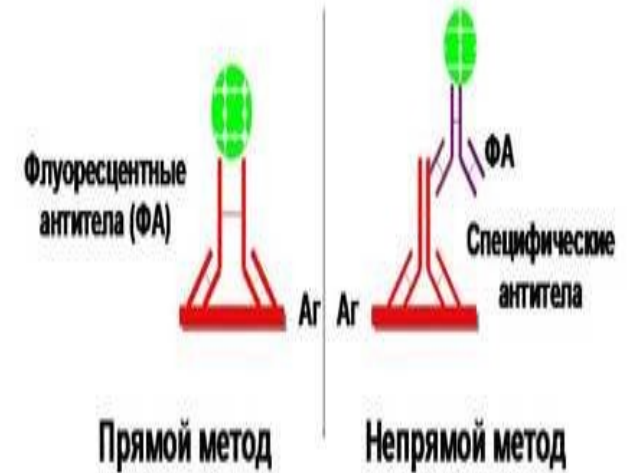
Вирусты тікелей анықтау әдісі

Арнайы препарат дайындалады, оны белгі салынған (меченный) антиденелер бар сарысумен өңдейді, егер препаратта антиген болса, антидене +антиген - байланысы орнайды. Препаратты физиологиялық ерітіндімен жуу барысында барлық белок жуылып кетеді, ал антидене +антиген комплексі заттық шыны бетінде қалып қояды, препаратты құрғатып, люминисцентті микпрскоппен вирусты анықтайды.

➤ Вирусты тікелей емес әдіспен анықтау.

- Жанурадың белгілі бір түрін белгілі бір вируспен иммунизациялап, антивирустық сарысу алады. Осы жануардың қан сарысуын алып, екінші жануар түрін иммунизациялайды. Нәтижесінде сарысудың (**антивидовая сыворотка**) екінші түрін алады, оны флуорохроммен (ФИТЦ) белгілейді.
- Зерттелетін препаратты екі рет өңдейді: бастапқыда белгі салынбаған антивирустық сарысумен жуады, сосын белгі салынған сарысумен жуады. препаратты кептіріп, люминисцентті микроскопта зерттейді.
- Егер препаратта антивирустық сарысуға гомологиялық антиген болса, комплекс құрылады, ол препараттан жуылмайды.
- Екінші рет белгі салынған сарысумен өңдегенде ондағы антиденелер бастапқы комплекспен байланысып күрделі комплекс құрады. Күрделі комплексті люминисцентті микроскопта анықтайды.

Схема Реакции иммунофлюоресценции (РИФ) (Кунса)



- РИФ әдісінің артықшылықтары:

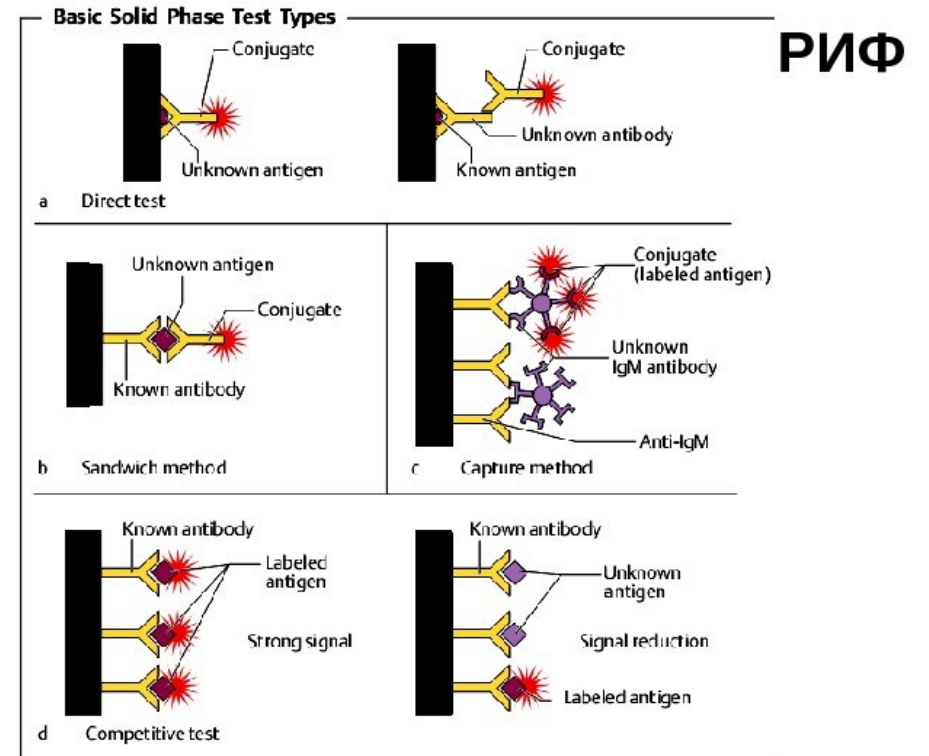
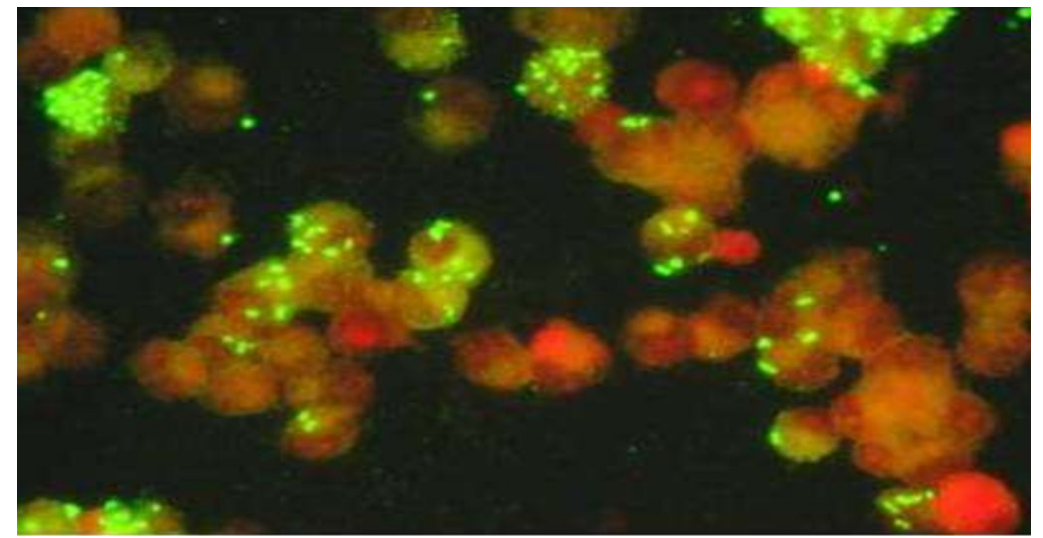
- Бірегей серологиялық реакция негізінде микроскопиялық дәлдігі

- Минималды антиген мен антиденелерді анықтау мүмкіндігі

- Нәтиже алу техникасы жеңіл әрі тез орындалады

- Тұнық немесе лайланған объектілерді зерттеу мүмкіндігі

- Нәтижені суретке түсіру мүмкіндігі



Лабораторная диагностика гриппа

МЕТОДЫ: 1) экспресс-диагностика – обнаружение вирусных а/г в РИФ, ИФА, ПЦР

2) Вирусологический метод:

I. Выделение вирусов



СМЫВ
ИЗ
НОСО-
ГЛОТКИ



II. Индикация



Гемадсорбция



Бляшкообразование

III. Идентификация

3) Серологический – РТГА, РСК, ИФА, РБН вирусов

РГА

