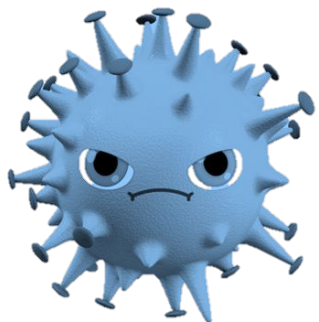


РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«ТЮМЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ

# МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ



2016 г.

Выполнила:  
студентка 3 курса ИНБИО  
группы 38БиБ136  
Нечаева Ж.И.

Проверила:  
к.б.н. Колоколова Н.Н.

# Введение

- Диагностика играет одну из решающих ролей в системе мероприятий по борьбе с болезнями животных вирусной этиологии. Быстрый и правильно поставленный диагноз обеспечивает успех в ликвидации вспышки болезни, так как позволяет четко выяснить эпизоотическую ситуацию и своевременно принять целенаправленные меры по оздоровлению поголовья животных с наименьшими потерями.
- Для постановки диагноза требуется сбор, изучение, анализ и сопоставление целого комплекса различных данных.
- На первом этапе диагностики используют данные, которые можно быстро собрать непосредственно в хозяйстве. К таковым относятся:
  1. Эпизоотологические данные, включающие свои сведения об охвате болезнью данного поголовья животных, скорости и территориальном распространении болезни, видах заболевших животных, динамике выявления больных и т.д. ;
  2. Клинические признаки болезни. Они включают определение (по сравнению с нормой) температуры тела, частоты и формы дыхания, частоты пульса, нарушение аппетита, поведение, состояния кожных покровов и слизистых оболочек, функционирования органов пищеварения, выделения т.д. ;
  3. Патологоанатомические изменения, которые обычно устанавливают при вскрытии павших животных. Различают макроскопические изменения (по сравнению с нормой) формы, размера, цвета, консистенции, появление узелков, кровоизлияний, везикул и другие образования, не встречающиеся в норме, а также микроскопические изменения в клетках и тканях, обнаруживаемые гистологическими методами.



# Задачи в исследовании материала

- Взятие материала, транспортировка в лабораторию и подготовка к исследованию (для подавления сопутствующей бактериальной флоры обрабатывают антибиотиками).
- Заражение исследуемым материалом чувствительной модели. Вирусы в отличие от бактерий не растут на питательных средах, т.к. являются абсолютными (облигатными) паразитами, поэтому для их культивирования применяются особые модели:
  1. в организме восприимчивых животных;
  2. в куриных эмбрионах (овокультуры);
  3. в культуре клеток.
- Культивирование вируса в зараженной модели при стандартных условиях (оптимальная температура, продолжительность культивирования).
- Индикация (обнаружение) вируса в зараженной модели.
- Идентификация выделенного вируса в серологических реакциях.





# Правила работы в вирусологической лаборатории

- При работе с вирусами необходимо прежде всего:
  1. Не допустить загрязнения штаммов вирусов посторонней микрофлорой;
  2. Обеспечить безопасность работающего персонала от возможного заражения вирусами;
  3. Обеспечить безопасность окружающего населения от заражения вирусными инфекциями через сточные воды, трупы экспериментальных животных и т.п.



При исследовании материалов, полученных от больных вирусными инфекциями, с целью лабораторной диагностики этих заболеваний применяются различные методы:

Методы электронной и в меньшей степени световой микроскопии;	Методы выделения и культивирования вирусов в культурах клеток;	Методы выделения и культивирования вирусов в развивающихся куриных эмбрионах и в организме чувствительных экспериментальных животных;	Методы выявления вирусов по их гемагглютинирующей способности;	Методы серологических исследований: традиционные и экспресс-методы;	Методы молекулярно-генетических исследований: молекулярная гибридизация и полимеразная цепная реакция.
--	--	---	--	---	--

# Микроскопические методы исследования в вирусологии

## Электронная микроскопия

- *Метод напыления металлами*
- *Метод негативного контрастирования*
- *Метод сканирующей микроскопии*

## Световая микроскопия

- *Люминесцентный метод*
- *Иммунофлюоресцентный метод*





# Методы серодиагностики и иммуноиндикации

- радиоизотопный иммунный анализ (РИА),
- иммуноферментный анализ (ИФА),
- реакция иммунофлюоресценции (РИФ),
- реакция связывания комплемента (РСК),
- реакция пассивной гемагглютинации (РПГА),
- реакции торможения гемагглютинации (РТГА).



- РИА - высокочувствительный метод, основанный на реакции антиген—антитело с применением антигенов или антител, меченных радионуклидом ( $^{125}\text{J}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{51}\text{Cr}$  и др.).
- ИФА - выявление антигенов с помощью соответствующих им антител, конъюгированных с ферментом-меткой. После соединения антигена с меченой ферментом иммунной сывороткой в смесь добавляют субстрат/хромоген. Субстрат расщепляется ферментом, и изменяется цвет продукта реакции.
- РПГА основана на использовании эритроцитов (или латекса) с адсорбированными на их поверхности антигенами или антителами, взаимодействие которых с соответствующими антителами или антигенами сыворотки крови больных вызывает склеивание и выпадение эритроцитов на дно пробирки или ячейки в виде фестончатого осадка.
- Прямой метод РИФ основан на том, что антигены тканей или микробы, обработанные иммунными сыворотками с антителами, мечеными флюорохромами, способны светиться в УФ-лучах люминесцентного микроскопа.
- Непрямой метод РИФ заключается в выявлении комплекса антиген—антитело с помощью антиглобулиновой (против антитела) сыворотки, меченой флюорохромом.
- РСК основан на активации комплемента комплексом антиген—антитело. Суть заключается в том, что при соответствии друг другу антигены и антитела образуют иммунный комплекс, к которому через Fc-фрагмент антител присоединяется комплемент (C), т. е. происходит связывание комплемента комплексом антиген—антитело.
- РТГА основан на блокаде, подавлении антигенов вирусом антителами иммунной сыворотки, в результате чего вирусы теряют свойство агглютинировать эритроциты.

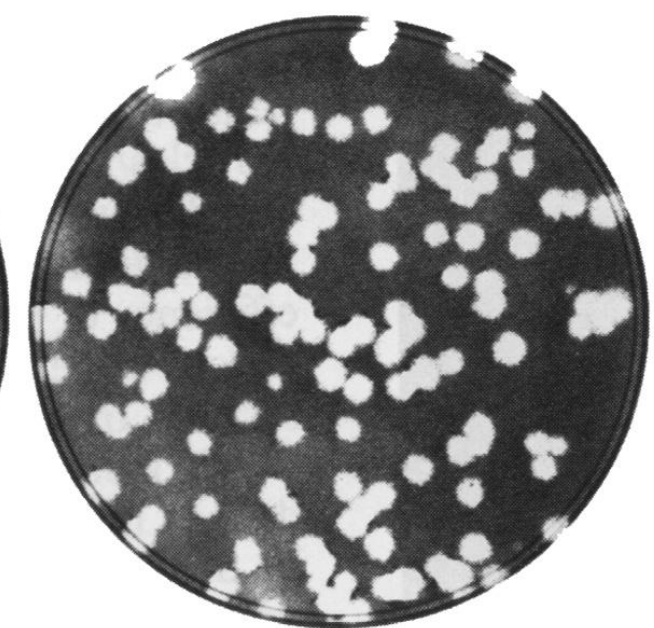
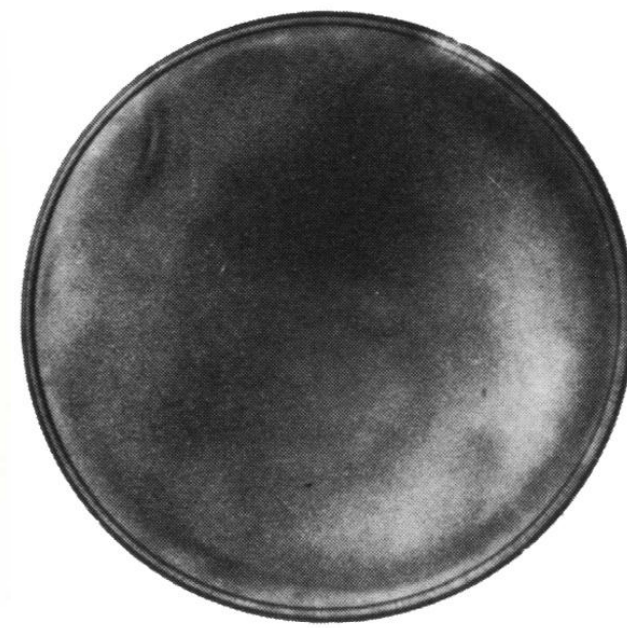
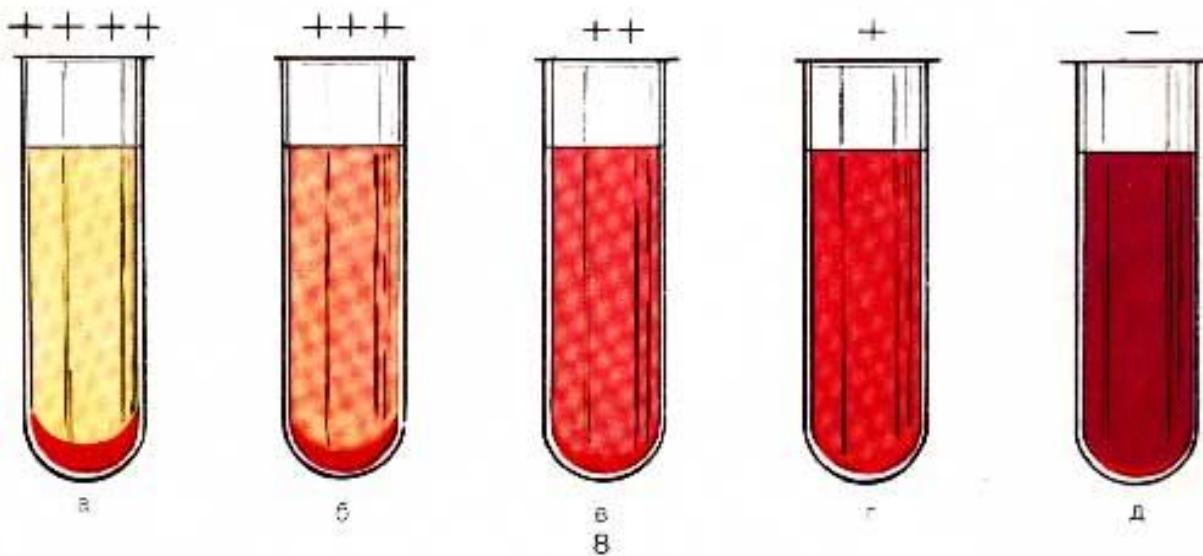
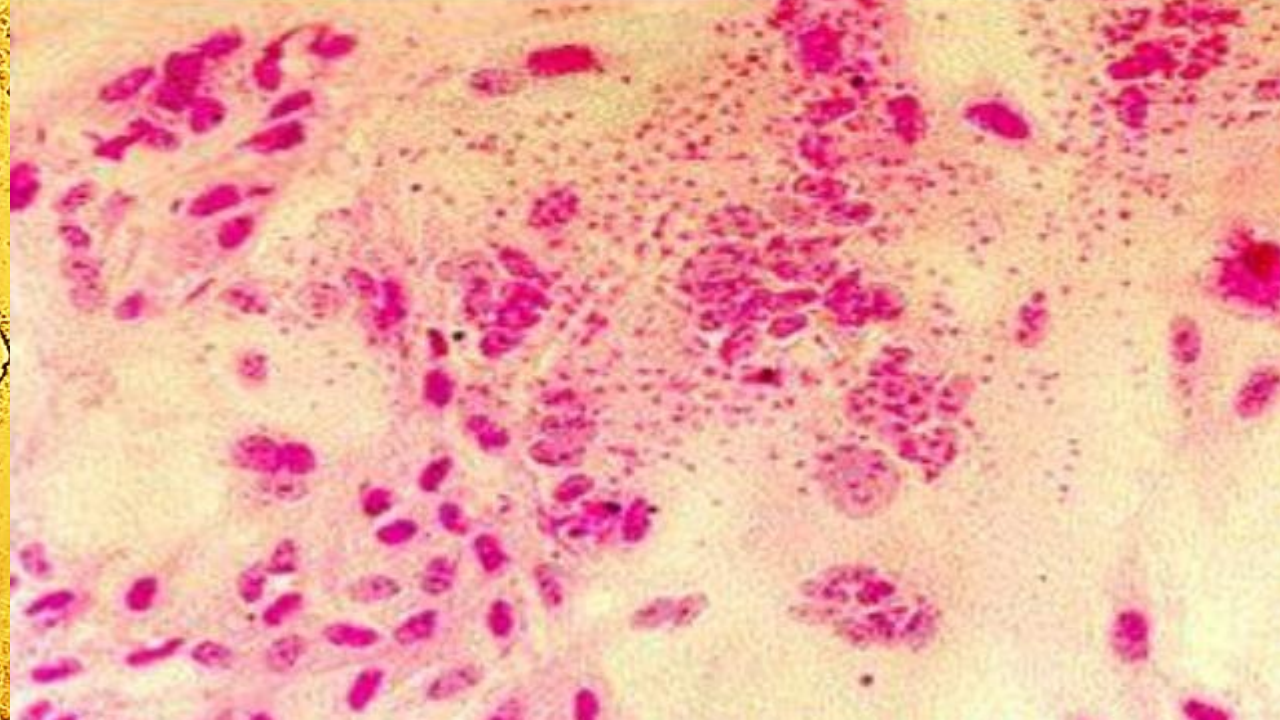
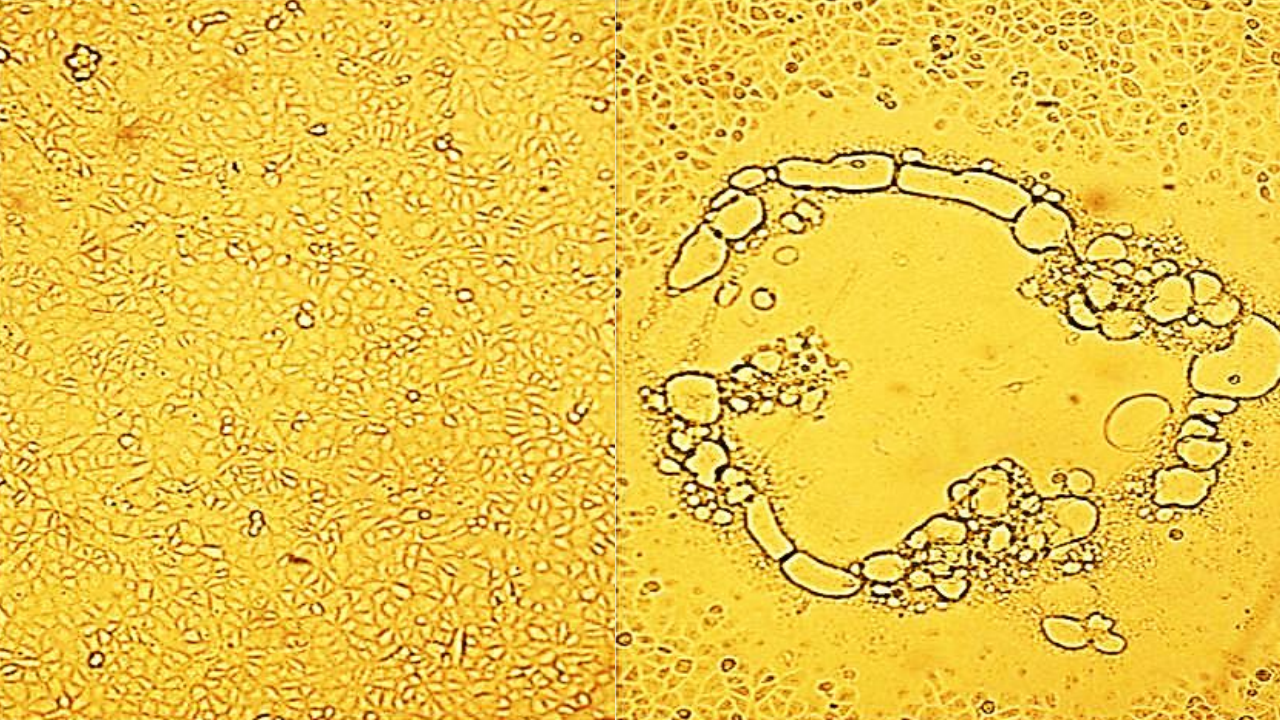


Возбудители	Тест	Возбудители	Тест
Респираторные инфекции:		Гепатит:	
вирусы гриппа А и В	РСК, РТГА	вирус гепатита А и В	РИА, ИФА
вирус парагриппа	РТГА, РСК, ИФА	Инфекций с преимущественным кожным проявлением:	
респираторно-синцитиальный вирус	РСК, ИФА	вирус краснухи	РИФ, ИФА, РСК
аденовирусы	РСК, ИФА	вирус опоясывающего герпеса	РСК, РИФ
Инфекций центральной нервной системы:		Другие инфекции:	
энтеровирусы	РСК, РН, ИФА	вирус цитомегалии	РСК, РНГА, ИФА, РИФ
вирус паротита	РТГА, РИФ, ИФА	краснуха	ИФА, РИФ
вирус простого герпеса	РСК, РНГА, ИФА, РИФ	вирус Эпштейна-Барра	Гетерофильный тест РИФ

# Индикация и идентификация вирусов

- При заражении вирусами клеточных культур можно получать различные видимые проявления действия вируса:
  1. Цитопатическое действие вируса на культуру клеток (ЦПД) – возникновение в ней видимых морфологических дегенеративных изменений (литическая инфекция);
  2. Приобретение заражённой культурой клеток способности к гемадсорбции – к адсорбции эритроцитов на поверхности клеточного слоя;
  3. Образование в заражённой клеточной культуре под плотным слоем специального агарового покрытия характерных бляшек, являющихся «негативными колониями» вирусов;
  4. Подавление процессов метаболизма в заражённой вирусом культуре клеток, выявляемое с помощью так называемой цветной пробы.







# Молекулярно-генетические методы исследования

- **Молекулярная гибридизация или метод молекулярных зондов**
- Метод основан на способности двухспиральной ДНК к денатурации и ренатурации.
- При постановке реакции молекулярной гибридизации зонды метят радиоактивной ( $P^{32}$ ), флюоресцентной или биотиновой меткой, соединяют с исследуемым материалом, содержащим определяемую нуклеиновую кислоту, подвергающуюся денатурации. Если зонд комплементарен цепи определяемой нуклеиновой кислоты, происходит гибридизация в комплементарном участке.
- После отжига зонд оказывается включённым в ренатурированную нуклеиновую кислоту и может быть обнаружен по имеющейся метке. Выявление наступившей молекулярной гибридизации позволяет установить природу определяемого вируса.
- **Полимеразная цепная реакция (ПЦР) или локальная амплификация нуклеиновых кислот (ЛАНК)**
- Метод тоже основан на способности ДНК к денатурации и ренатурации и на комплементарности цепей ДНК.
- Важным принципом реакции является использование термостабильной ДНК-полимеразы, при участии которой происходит амплификация – умножение определяемых генов или фрагментов с определённой нуклеотидной последовательностью ДНК.
- В результате реакции исследуемый генетический материал накапливается в значительном количестве и может быть легко выявлен и идентифицирован.



# Сравнение различных подходов к диагностике вирусных инфекций

Методы	Время	Преимущества	Недостатки
Культура клеток	Дни - недели	Высокая специфичность и чувствительность; возможность дальнейшей работы с выделенным вирусом	Необходимость в специальном оборудовании, длительность
Прямые методы диагностики	Часы - 1 день	Быстрота; применимость для вирусов, которые сложно культивировать	Риск получения ложноположительных и ложноотрицательных результатов; сложность одновременного проведения большого количества исследований
Серологические	Недели	Определение иммунного ответа на вирус; применимость для вирусов, которые сложно культивировать	Возможность перекрестных реакций; во многих случаях необходимы парные сыворотки крови

# Список литературы

1. Биргер М.О. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования. 3-е изд. – М.: Медицина, 1982.
2. Голубев Д.Б. Руководство по применению клеточных культур в вирусологии. – Л., 1986. Электронный учебник.
3. Yolken R.H., Lennette D.A., Smith T.F., Waner J.L. Algorithms for detection and identification of viruses. In: Murray P.R., Baron E.J., Tenover F.C., Tenover F.C., Tenover F.C., Yolken R.H., editors. Manual of clinical microbiology. 7th ed.; 1999. p.843-6.
4. Мейхи Б. Вирусология. Методы / Под ред. Б. Мейхи. – М.: Мир, 1988.



Спасибо за  
внимание!

