

➤ **Тақырып:** Клетка және ұлпа культураларында вирустарды айқындау әдістері

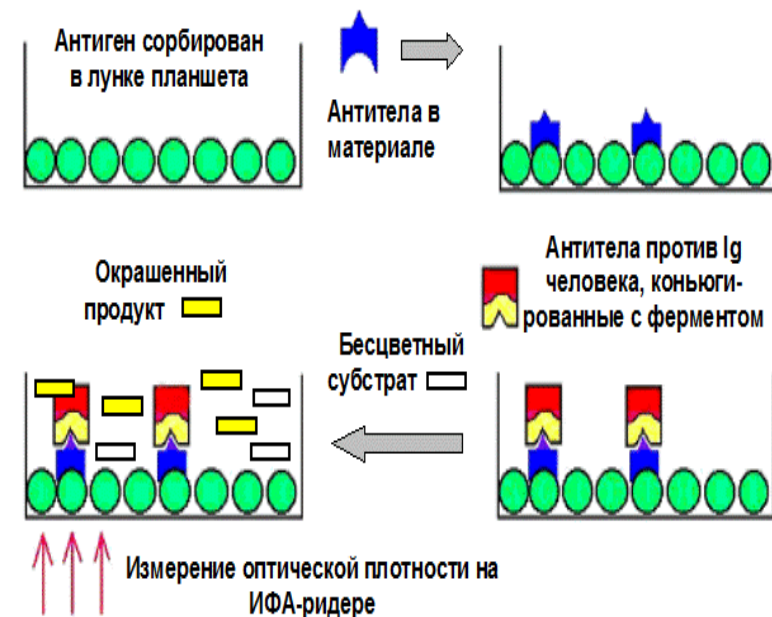
Жоспар:

1. Вирустарды иммунопероксидаздық реакция арқылы анықтау (ИФА, иммуноферменттік анализ);
2. Қатты фазалы ИФА әдісі;
3. Вирусты электронды микроскоп арқылы анықтау;
4. Негативті контрастты әдіс;
5. Жаншылған препараттар әдісі;
6. Издер әдісі (метод отпечатков);
7. Вирустардың интерференциясына негізделген әдіс;
8. ДНҚ зондтар арқылы вирустарды анықтау әдісі;
9. ПТР әдісі

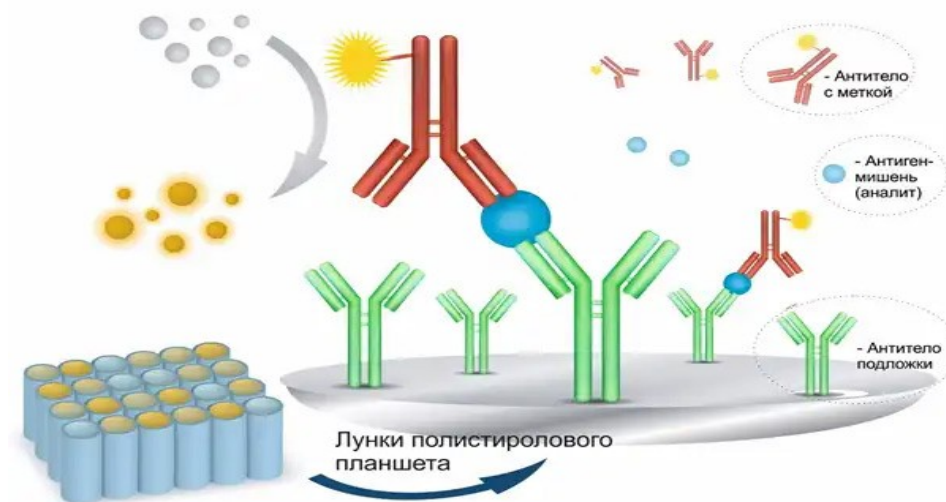


➤ Вирустарды иммунопероксидазальқ реакция арқылы анықтау (ИФА, иммуноферменттік анализ)

1. Иммундық флуоресценттік реакциядан (РИФ) айырмашылығы сарысуды **флуорохром** орнына ферментпен (**пероксидаза** немесе **сілтілік фосфотаза**) конъюгациялау.
 2. Конъюгатпен жағындыларды, іздерді, кесінділерді өңдеу.
 3. Конъюгат қалдығын жуып, препаратқа субстрат ерітіндісін (**диаминобензидинтетрахлорид**) тамызу, соңғысы фермент әсерінен түсін өзгертеді.
 4. Жарық микроскоп арқылы препаратты зерттеу.
- **ИФА** әмбебап, өте сезімтал әдіс, оны тұра және жанама варианттарда қолдануға болады.



Принципиальная схема «сэндвич» ИФА



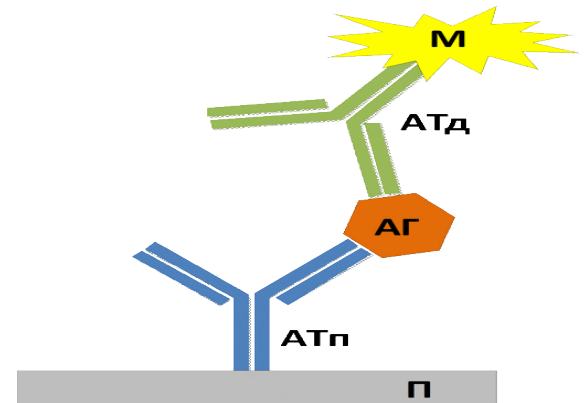
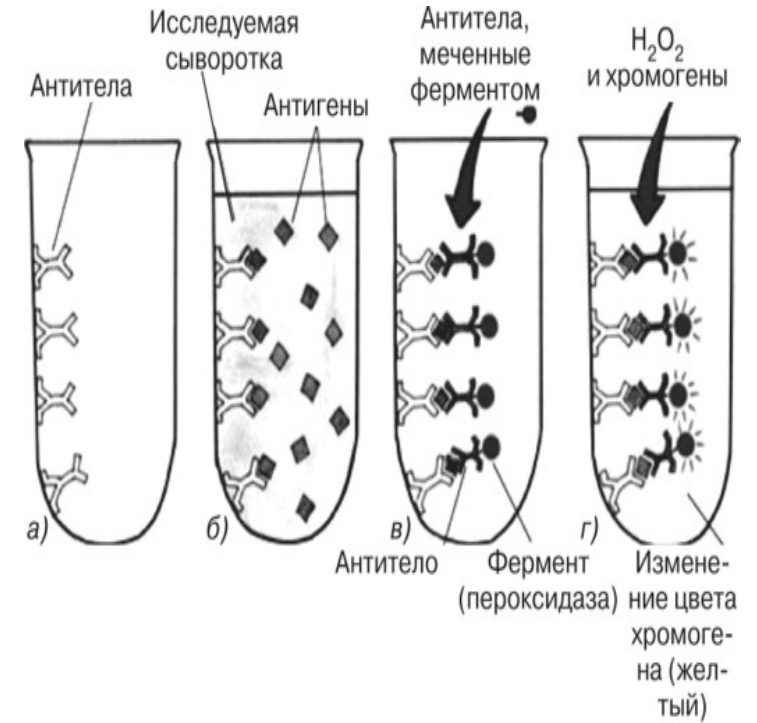
➤ **Қатты фазалы ИФА** әдісін жиі қолданады.

• Әдіс ерекшелігі:

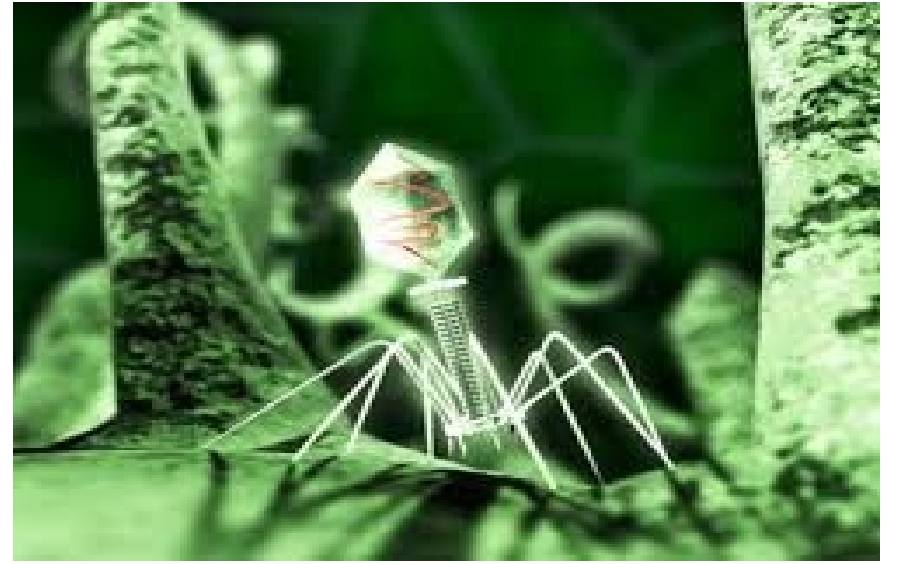
1. Полистиролды микро ұяшықтарды зерттелетін антигенге қарсы **антиденелер қосылған гамма - глобулин** ерітіндісімен өңдеу,
2. Зерттелетін материалды суспензия түрінде ұяшықтарға құю.
3. Байланыспаған антиденелерді төгіп жуғаннан соң, ұяшықтарда байланысқан комплекстер үстіне **иммуноферменттік конъюгат (пероксидаза немесе сілтілік фосфотаза + антиденелер)** құю, соңғысы ұяшықта құрылған комплекспен байланысады (реакцияға түспеген конъюгат жуылылады).
4. Қалыптасқан үштік комплекс анықталады.

• Ол үшін барлық ұяшықтарға **индикатор** құйылады, соңғысы фермент әсерінен белгілі бір түске боялады. Бақылау вариантының ұяшықтарында түске боялу байқалмайды.

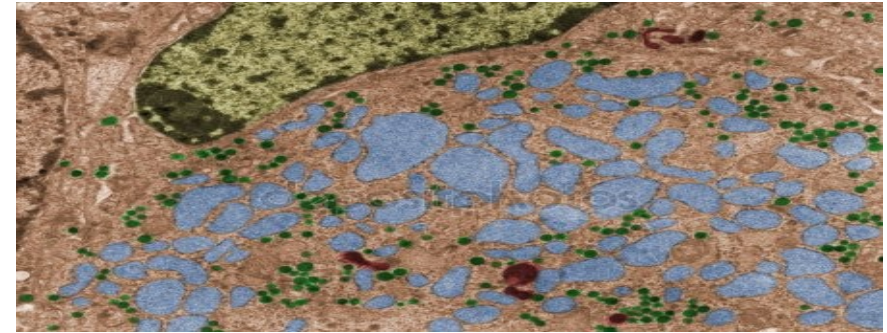
• Әдіс артықшылығы: процесті автоматтандырады және бір сағаттың ішінде 2000 -ға жуық үлгіні зерттеуге мүмкіндік береді.



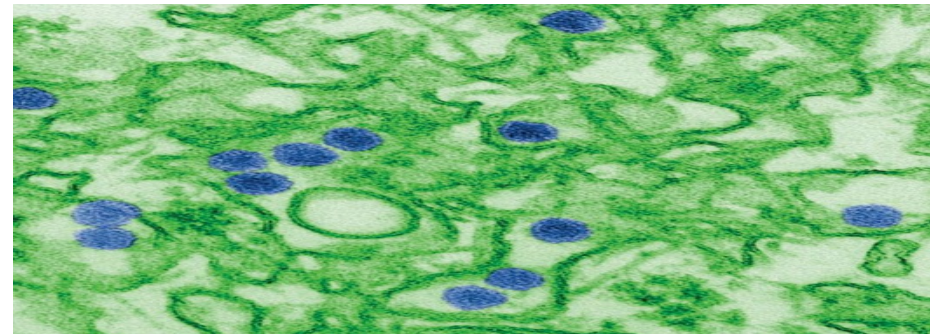
- **Вирусты электронды микроскоп арқылы анықтау**
- Электрондық микроскоп негізінен зерттеу мақсатында қолданылады.
- Егер 1 мл суспензияда вириондар мөлшері шамамен 10^7 болса, онда зерттелетін материалды қосымша тазарту қажет.



- **Электрондық микроскопия** – вирустарды идентификациялау және вирустық инфекцияларды диагностикалауға қолданылады.



- **Әдіс ерекшелігі** – тез арада нәтиже алу және вирустарды морфологиялық сипаттамасы жағынан дифференциалдау мүмкіндігі.



- Кейбір жағдайларда электронды микроскопияны басқа әдістермен алмастыруға болмайды.
- Мәселен, дақылдау қиын вирустарды немесе аралас және латентті инфекцияларды айқындауда қолданылады.
- Кейбір вирустық инфекцияның этиологиясын анықтауда, жаңа вирустарды бөліп алғанда, биопрепараттардың контаминациясын бақылауда қолданылады.
- Электрондардың көзі вольфрамды катод болып табылады, тоқпен бірнеше мың микроампермен қыздыру барысында термоэлектрондық эмиссия орын алады.



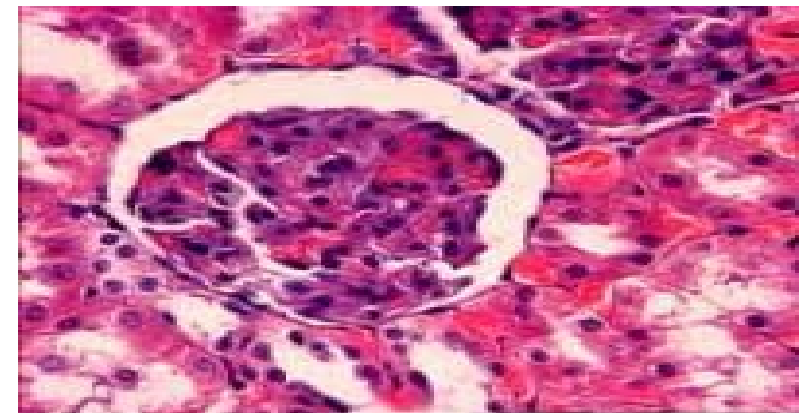
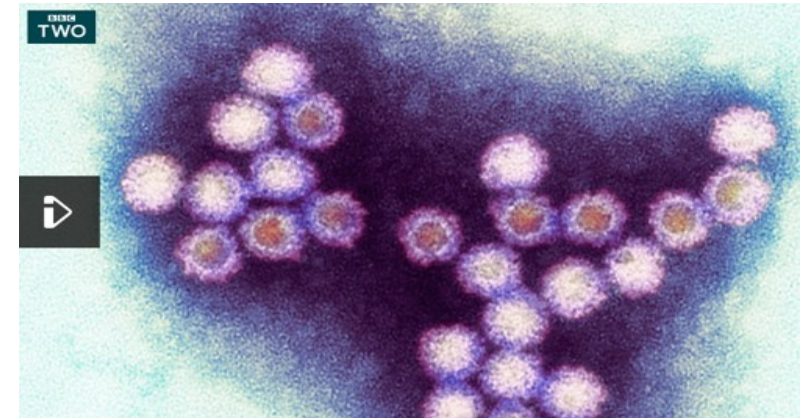
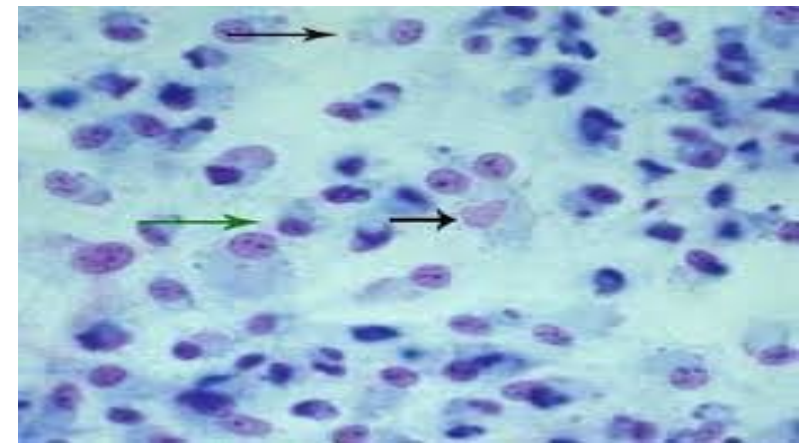
➤ **Негативті контрасты әдіс, С.Брещер және Р.Уорн, 1959**

- Суспензиялық материалда вирустық бөліктердің морфологиясын жан-жақты идентификациялау үшін қолданылады.
- Ондай материалдарға:
- мұрын және жұтқыншақ секреттері мен жуындылары,
- несеп, фекалий,
- везикулярлы және пустулезді сұйықтықтар,
- сарысу,
- вирус бар клетка культураларының суспензиясы,
- тауық эмбрионының аллантоисты сұйықтығы,
- тері кесіндісі, оспаның ұштық бөлігі, оспаның қабыршағы,
- ішектің шырышты бөлігінен алынған жағындылар,
- Сойылған мал, өлекселердің мүшелері мен ұлпалардың кесінділері.

➤ **Негативті контраст әдісіне қолданылатын заттар:**

- ❑ 2-4 % фосфорлы -вольфрамды қышқылдың (ФВК) судағы ерітіндісі, рН 6,8;
- ❑ 2-4% молибден қышқылды аммоний ерітіндісі,
- ❑ кремний -вольфрам қышқылды натрий, рН 7,2;
- ❑ 0,5-2% сірке қышқылды уранилдың (уранил -ацетат) судағы ерітіндісі, рН 4,5;
- ❑ 0,5% қымыздық сірке қышқылды уранилдың (кронил -оксалат) судағы ерітіндісі;
- ❑ 1% құмырсқа қышқылды уранилдың (уранил -формит) судағы ерітіндісі.

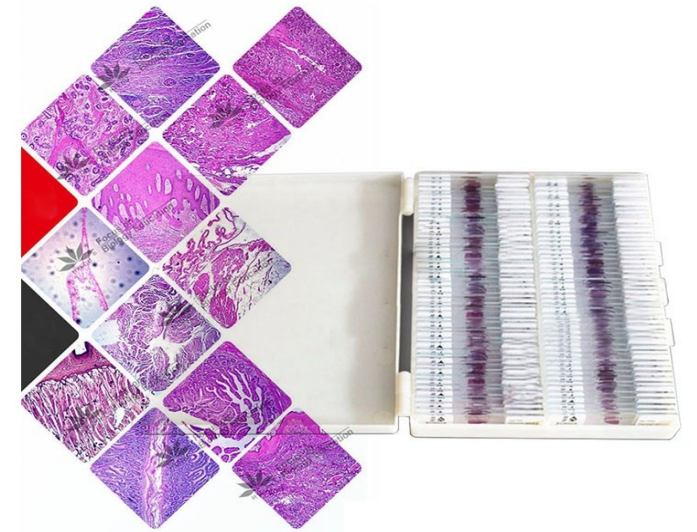
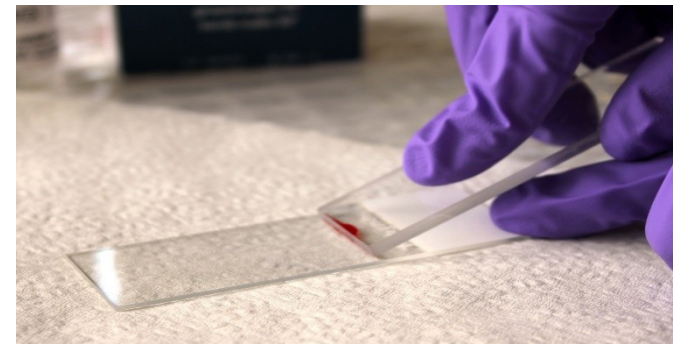
- **Зерттеу материалын дайындау** суспензия құрамындағы вирустың концентрациясынан, бөтен балласты заттардан тазалығынан және морфологиясынан тәуелді.
- материалдар бірден табиғи күйінде зерттеледі
 1. Пустула мен везикуланың құрамындағы вирустық сұйықтық,
 2. қабықшалы материалдан алынған суспензия,
 3. инфекцияланған клетка культурасының сұйықтығы,
 4. тауықтың эмбионының аллантоисты сұйықтығы,
 5. мұрын шырыштары.



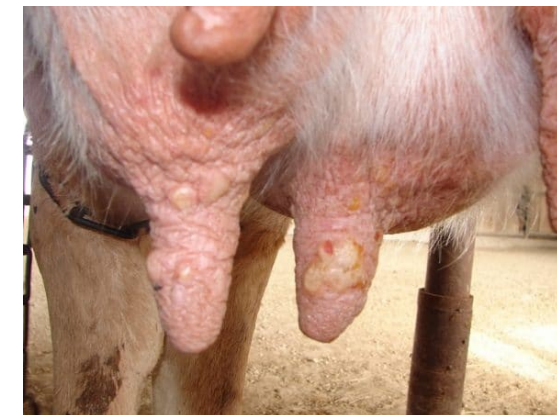
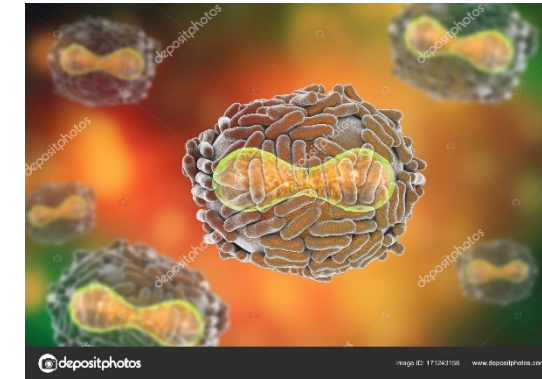
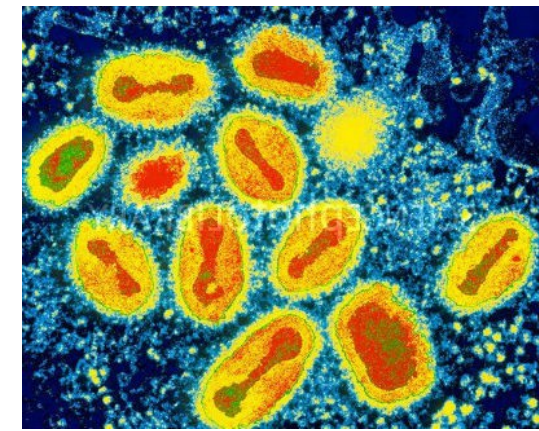
- **Әдістеме:**

1. Зерттеу материалын (мұрын пердесінің, ішектің шырышты қабатынан , оспа қабыршағынан алынған сұйықтық, мүшелер мен ұлпа кесінділерін) алдын ала заттық шыны бетінде 1-2 тамшымен езу.
 2. Суспензияның тамшысына арнайы негізі бар **пленкалы тормен** көмкеру (вирустар тор бетіне адсорбцияланады). Алайда, материалда көптеген балласты заттар болғандықтан көптеген вирустардың морфологиясын индефикациялау қиындық тудырады.
- Ауылшаруашылығында малдың мен құстың оспалық инфекциясын электрондық - микроскоптық диагностикасы үшін клиникалық аурулардан, өлекселер мен сойылған жануарлардан биопсиялық материал алынады.
 - Лезвиямен оспаның ұшын (тері эпидермисі) немесе оспамен зақымдалған теріні оның айналасындағы ісінген терімен, тері асты клетчаткасымен (папула, пустула) бірге алынады.

- **Жаншылған препараттар әдісі**
- Эпидермис кесіндісін заттық шыныға кесілген аймағы жоғары қаратып салып, үстіне 2-3 тамшы дистилденген су тамызады.
- Скальпельдың моқал ұшымен ақырыпдап кесіндіні жаншиды, бұл жағдайда судың қатты лайланбауын қадағалау керек.
- Суспензия бетіне негізі бар торлы пленканы 2 минут бастырады.
- Осыдан соң 2-3 тамшы дистильденген сумен жуып, негативті контраст ерітіндісімен өңдейді, ерітіндінің артық бөлігін төгіп тастап, препаратты элеатрондық микроскопта зерттейді.



- Жаншылған препарат әдісін жануарлардың оспамен шалдыққан ауруды анықтауға (кепте, тауық, шошқа, сиыр, түйе, қодас оспасына,
- осповакцинаның әсерінен туындаған оригиналды шошқа оспасы),
- қойдың контагиозды, пустулезды стоматиті (дерматит),
- ешкілердің (эктимасы),
- ірі қара малдардың желіндерінің оспасы (сауыншылардың түйіндері),
- паравакцинадан туындайтын түйелердің ауыздығы (эктима) негізделген.



➤ **Іздер әдісі (метод отпечатков).**

- Мал терісінің оспамен зақымдалған терісі мен тер асты клетчаткасын зерттеуге қолданылады.
- **Әдістеме:**
 1. Оспамен зақымданған тері мен тері клетчаткасынан, бұлшық ет қабатына дейінгі аралықтан биопсия алу.
 2. Биопсия алынған ауданды теріге перпендикуляр бағытты лезвиямен тілімдеу.
 3. Тілімденген аудан бетіне астары бар пленкалы торды қойып, материал жуғындысын алу. Сондай -ақ, зақымдалмаған тері аймақтарынан, тері асты клетчаткадан да материал алу.
- Эктимаға зерттеу жүргізгенде қабыршықтың ішкі жағынан іздер алынады немесе қабыршықты бір тамшы суда майдалайды, вириондар торға адсорбцияланады.

- **Вирустардың интерференциясына негізделген.**
- Клетка культураларында кейбір вирустар екінші бір бирустың көбею қабілетін тежейді. Мысалы, шошқа мәліні (чума) - аусыл (ящур) вирусын тежейді; ньюкасл ауруын тудыратын вирус - везикулярлы стоматит вирусын тежейді.
- Бұл әдіс вирус жұққан клетка культураларында ЦПД тудырмайтын жағдайда қолданылады. шошқаның клетка культурасында мәлін вирусын (ЦПД тудырмайды) анықтау үшін, осы инфекцияланған культураны екінші вируспен (аусыл) 100 ТЦД50 дозамен зақымдап, 37 °С термостатта дақылдайды.
- Бірнеше тәуліктен соң микроскоп астында санақ жүргізеді. Егер клетка культурасында ЦПД байқалмаса, онда мәлін вирусы бар дегенді меңзейді. Интерференция әдісін ЦПД тудырмайтын вирустарды титрлеуге де қолданады.

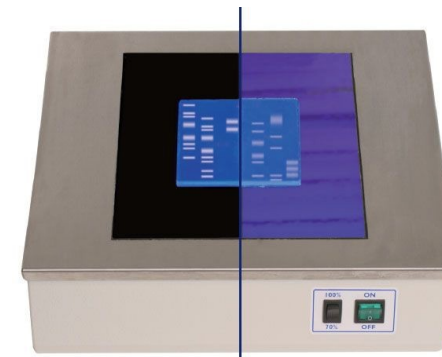
- **ДНҚ зондтар арқылы вирустарды анықтау.**
- Белгілі бір вирусты анықтауға қажет молекулалық зонд дайындалады, оның құрамына зерттелетін вирустың нуклеин қышқылына комплиментарлы ДНҚ немесе РНҚ тізбегі кіреді.
- Зондты **биотинмен** немесе **радиоактивті фосформен (P32)** белгілейді. Зерттелетін материалда нуклеин қышқылдарының денатурациясынан кейін (қыздыру), соңғыларын арнайы фильтрде бекітеді. Осыдан кейін осы фильтр арқылы ерітілген зондты өткізеді, бұл жағдайда зерттелетін материалдың 1-спиралды нуклеин қышқылының молекулалары зонтың 1-спиралды нуклеин қышқылының молекулалары комплиментарлы байланысады (молекулалық будандасу). Будандаспаған 1-спиралды нуклеин қышқылының молекулалары фильтрден жуылып кетеді.
- Будандасқан 2-спиралды нуклеин қышқылының молекулалары зондағы белгі арқылы анықталады, яғни биотинмен бегіленген зонд жағдайында ортаға авидин қосылғанда (биотин мен авидин байланысы салдарынан орта түсі өзгереді), ал биотин радиоактивті фосформен байланысқанда радиациялық импульстер арқылы анықталады.
- Бұл әдіс басқа диагностикалық тесттермен салыстырғанда өте сезімтал болып табылады. Сонымен қатар, зерттеу материалында вирустың кезкелген формасын, тіпті клетка геномында интеграцияланған вирусты анықтауға қолданылады.

➤ ПТР әдісі арқылы вирустарды анықтау.

Амплификация, яғни пробиркада (in vitro) ДНК-полимеразаның қатысуымен ДНК белгілі бір фрагменттерінің көшірмелерінің артуы, мұнда ДНК полимераза ДНК тізбегінің өзара компенсаторлы тізбектерін екі праймерден бастап синтездеу қызметін атқарады. Праймер 20–30 нуклеотидтерден тұратын (синтезделіп алады) олигонуклеотид.

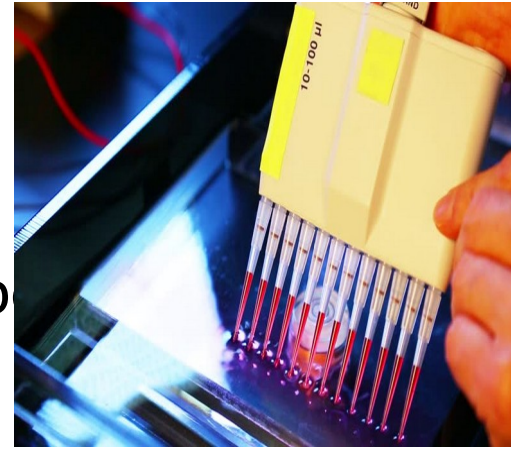
ПТР 20 – 40 циклден тұрады, әр қайсысы үш сатыдан тұрады:

1. **Денатурация** $t=92-95\text{ }^{\circ}\text{C}$, 1 минут.
2. **Отжиг** $t= 50-60\text{ }^{\circ}\text{C}$, 1 минут.
3. **Элонгация** $t= 68 - 72\text{ }^{\circ}\text{C}$.



• Агароза гелде электрофорез жүргізу

1. Патологиялық материалдан нуклеин қышқылдарын бөліп алады (фенол, хлородюр спирт), 100 мкл (0,1 мл) эпендорфта 2 сағат адсорбциялау.



2. ДНК матрица және буфер, дезоксирибонуклеотидтрифосфат (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), ДНК-полимераза, 2 праймер, MgCl және дионоизацияланған су, минералды май қосу.



3. Амплификация

• Амплификанттардың детекциясы агарлы гелде электрофорез арқылы жүргізіледі. Ол үшін этидий бромид қолданылады. Трансиллюминатор.

