

ЗАНЯТТЯ 9.

ТЕМА №13: «Методи лабораторної діагностики вірусних інфекцій.»

1.АКТУАЛЬНІСТЬ ТЕМИ

За останні роки різко зросла питома вага захворювань вірусної етіології. Завдання лікаря, що здійснює етіологічну діагностику окремих захворювань чи розшифровку причини (етіологічної) спалахів та епідемій, в сучасних умовах незмірно ускладнилося. Останнє обумовлено відсутністю чи складністю методів ранньої (експрес - діагностики) при одних вірусних інфекціях, та їхньою надмірністю при інших -, що утруднює вибір тактики етіологічної діагностики вірусних захворювань. Вибір методу лабораторної діагностики визначається, в основному, характером захворювання, імовірним збудником та визначається в кожному окремому випадку в залежності від періоду хвороби і можливостей лабораторії.

Лікар будь-якої спеціальності повинен володіти загальними принципами лабораторної діагностики вірусних інфекцій для того, щоб вірно провести добір матеріалу для дослідження з метою встановлення імовірного діагнозу. При цьому необхідно засвоїти, що лабораторна діагностика вірусних інфекцій складається з трьох основних напрямків:

- вірусологічний метод діагностики - ізоляція (виділення) вірусу з клінічного матеріалу і його ідентифікація;

- серологічний метод діагностики вірусних інфекцій;

- група експрес-методів – рання діагностика вірусних інфекцій, що заснована на виявленні вірусних антигенів у матеріалі, який досліджується, виявленні «ранніх» специфічних противірусних Ig M- антитіл, виявленні специфічних фрагментів вірусних геномів у клінічному матеріалі, який досліджується за допомогою гібридизації нуклеїнових кислот та полімерної ланцюгової реакції (ПЛР).

Вірусологічний метод є найбільш вірогідним доказом вірусної етіології інфекції.

Серологічний метод - це виявлення за допомогою різних реакцій специфічних противірусних антитіл у сироватках людей, які обстежуються. Застосування даного методу при діагностиці масових вірусних інфекцій має свої особливості й обмеження – у сироватках більшості осіб є антитіла до ряду респіраторних і кишкових вірусів, що часто зустрічаються. В зв'язку з цим факт виявлення специфічних противірусних антитіл до якого -небудь вірусного антигену не може розглядатися як підтвердження вірусної етіології захворювання. Для підтвердження вірусної природи захворювання за допомогою серологічного методу діагностики необхідна констатація збільшення (наростання) титрів антитіл у динаміці.

Для цього добір сироваток у пацієнта для серологічної діагностики проводять протягом захворювання – на початку й у період реконвалесценції (але не раніш чим через 10-14 діб після забору першої сироватки) – так званий «метод парних сироваток». Ця обставина прирікає серологічний метод діагностики вірусних інфекцій на ретроспективність.

Для лікаря будь-якої спеціальності важливе знання можливостей лабораторної діагностики вірусних інфекцій для ефективного використання її, організації забору матеріалу від хворого й уміння інтерпретувати результати лабораторних досліджень.

2. МЕТА НАВЧАННЯ

Загальна мета. Вміти вибирати метод лабораторної діагностики вірусних інфекцій з урахуванням особливостей взаємодії збудника та ураженого організму, а також періоду інфекційного процесу, організувати відбір матеріалу для відповідного методу обстеження та інтерпретувати отримані в лабораторії результати.

Конкретні цілі:

Вміти:

- 1.Розрізняти методи лабораторної діагностики вірусних інфекцій (чутливість, придатність у залежності від стадії захворювання).
- 2.Вибирати метод лабораторної діагностики вірусних захворювань.
- 3.Організувати добір матеріалу для відповідного методу лабораторного обстеження.

4. *Інтерпретувати отримані в лабораторії результати.*

3. ОСНОВНІ ТЕОРЕТИЧНІ ПИТАННЯ, ЩО РОЗГЛЯНУТІ ПРИ ВИВЧЕННІ ДАНОЇ ТЕМИ.

До конкретної мети 1. (Розрізняти методи лабораторної діагностики вірусних інфекцій (чутливість, придатність у залежності від стадії захворювання).

1. Особливості лабораторної діагностики вірусних інфекцій.
2. Застосування мікроскопії в діагностиці вірусних інфекцій.

До конкретної мети 2. (Вибирати метод лабораторної діагностики вірусних захворювань).

3. Вірусологічний метод діагностики вірусних інфекцій – індикація та ідентифікація вірусів.

4. Серологічний метод діагностики вірусних інфекцій. Реакції, що використовуються: РЗК, РПГА, РГГА.

5. Загальні принципи експрес-діагностики вірусних інфекцій.

До конкретної мети 3. (Організувати відбір матеріалу для відповідного методу лабораторного обстеження).

6. Схема підготовки (обробки) матеріалу для вірусологічного дослідження.

7. Вимоги до організації добору матеріалу для серологічної діагностики вірусних інфекцій

До конкретної мети 4. (Інтерпретувати отримані в лабораторії результати).

8. Другий етап вірусологічного методу діагностики – ідентифікація вірусів.

9. Експрес-методи діагностики, засновані на виявленні специфічних «ранніх» антитілах.

10. Експрес-діагностика, заснована на виявленні вірусних антигенів.

11. Виявлення фрагментів вірусного геному за допомогою гібридизації нуклеїнових кислот й полімеразної ланцюгової реакції.

12. Ретроспективний характер серологічної діагностики вірусних інфекцій.

4. ЗМІСТ НАВЧАННЯ

Джерела інформації

Література, що рекомендується:

1. Гайдаш І.С., Флегонтова В.В. Медична Вірологія.- Луганськ, 2002.-С.97-118.

2. Букринская А.Г.. Вирусология. - М.: Медицина, 1986. - С. 165-181.

3. Руководство к практическим занятиям по медицинской микробиологии и лабораторной диагностике инфекционных болезней/ Под ред. проф. Ю.С.Кривошеина.-Киев: Вища школа, 1986.-С.191 – 221.

4. Лекція.

5. Стенд у навчальному музеї кафедри.

Додаткова література

1. Фролов А.Ф., Шевченко Л.Ф., Ширококов В.П. Практическая вирусология. - Киев: Здоровья, 1989. - С. 3-39.

2. Посібник з медичної вірусології/За редакцією проф. В.М.Гіріна.-Київ: Здоров'я, 1995.- С.43 - 148.

Під час роботи з 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.ОРІЄНТОВАНА ОСНОВА ДІЇ

Протокол практичного заняття за темою: «Методи лабораторної діагностики вірусних інфекцій. Індикація й ідентифікація вірусів»

- 1.Розібрали вимоги до матеріалу, призначеного для ізоляції вірусів.
- 2.Вивчили схеми підготовки (обробки) матеріалу для вірусологічного дослідження. Обробили клінічний матеріал – випорожнення від хворого з підозрою на поліомієліт.
- 3.Інфікували культуру клітин курячих фібробластів підготовленою пробкою фекалій від хворого з підозрою на поліомієліт.
- 4.Розібрали вимоги до організації відбору матеріалу для серологічної діагностики вірусних інфекцій
- 5.Розібрали загальні принципи методів, заснованих на виявленні фрагментів вірусних геномів - гібридизацію нуклеїнових кислот і полімеразну ланцюгову реакцію.

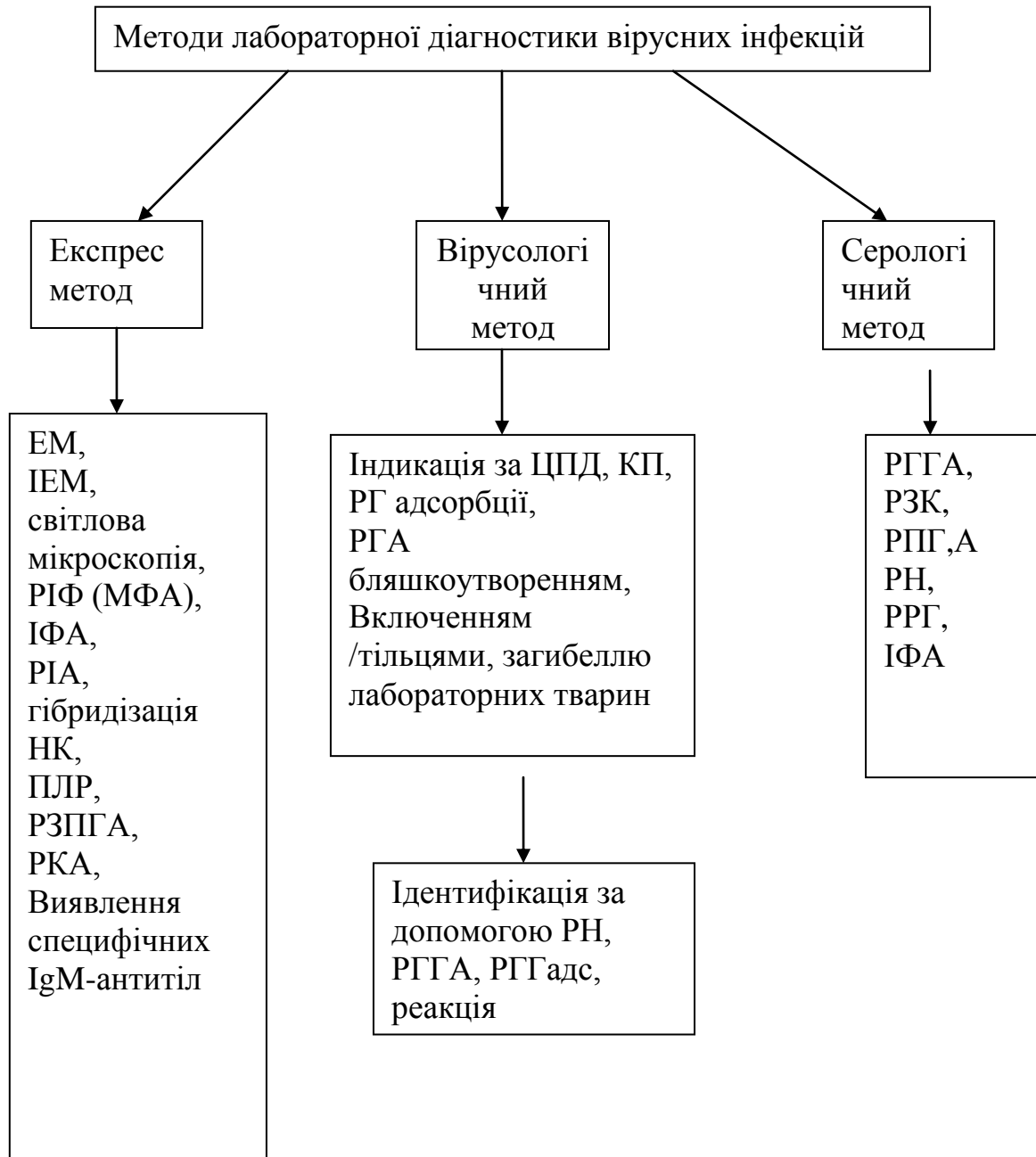
Для реалізації поставленої мети й засвоєння навчального матеріалу розв'язували задачі № 204-206 зі збірника «Завдання для самостійної роботи студентів за курсом загальної і спеціальної мікробіології».

Орієнтовною основою дії при вивченні і виконанні даної теми служить інструкція.

ІНСТРУКЦІЯ З ПІДГОТОВКИ ПРОБИ КЛІНІЧНОГО МАТЕРІАЛУ (ФЕКАЛІЙ) ДЛЯ ДОСЛІДЖЕННЯ І ЗАРАЖЕННЯ КУЛЬТУРИ КЛІТОК

- 1.Пробки пеніцилінових флаконів з навіскою калу обробіть серветкою, змоченою дез. розчином.
- 2.Відкрийте пробку флакона і до навіски фекалій додайте 2-3 мл стерильного фіз. розчину.
- 3.Закрийте пробкою флакон і енергійно струшуйте його протягом 1-2 хвилин. Отриману каламутну рідину перелийте в центрифужну пробірку. Запам'ятайте номер центрифужної пробірки і здайте їх черговому студенту для центрифугування.
- 4.У період центрифугування вивчіть ріст культури клітин під малим збільшенням мікроскопу.
- 5.Після центрифугування за допомогою 1,0 мл піпетки відберіть 0,5 мл надосадової рідини і внесіть її в окрему стерильну пробірку, додайте суміш антибіотиків.
- 6.Залишіть суміш для контакту на 5-7 хв. Відпрацьовану піпетку скиньте в дезинфікуючий розчин.
- 7.Після закінчення часу контакту, стерильною піпеткою внесіть 0,2 мл обробленого матеріалу в пробірку з культурою клітин, попередньо зливши з пробірки уже використане живильне середовище (культуральну суміш).
- 8.Помістіть пробірку на лоток під кутом 10-15 градусів міткою нагору на 3-5 хв. для контакту моношару клітин з матеріалом, що містить вірус. Відпрацьовану піпетку скиньте в дезинфікуючий розчин.
- 9.Після контакту моношару клітин з дослідним матеріалом, стерильною піпеткою додайте в пробірку 1,8 мл свіжої культуральної суміші (середовище 199 і 20% сироватки великої рогатої худоби).
- 10.На пробірки з зараженою культурою клітин надягніть етикетки з написом: прізвища студентів, що виконали роботу, № групи, факультет, дата виконання роботи.

ГРАФ ЛОГІЧНОЇ СТРУКТУРИ ДО ТЕМИ: «Методи лабораторної діагностики вірусних інфекцій. Індикація й ідентифікація вірусів»



МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ ЗАНЯТТЯ

Заняття практичне. На початку заняття викладач проводить перевірку і корекцію рівня підготовки студентів до заняття. За запропонованою схемою записується протокол. Студенти виконують самостійну роботу з обробки клінічного матеріалу (випорожнень), підготовки матеріалу для вірусологічного дослідження і виконують зараження культури клітин - курячих фібробластів, мікроскопіюють препарати з проявами ЦПД і гемадсорбцією, оформляють протокол. У ході заняття студенти знайомляться зі схемою «Обробки матеріалу для вірусологічного методу дослідження» і таблицею «Вірусологічний метод діагностики» у навчальному посібнику. Закінчується заняття підсумковим тестовим контролем.

Завдання для перевірки досягнення конкретних цілей навчання

До п.1

Тест 1

Аналогом бактеріологічного методу (виділення чистої культури) у вірусології є вірусологічний (ізоляція вірусу). Проте у зв'язку з особливостями вірусів діагностика вірусних інфекцій відрізняється від мікробіологічної. Які властивості вірусів обумовлюють специфіку вірусологічної діагностики?

- А. Малі розміри
- В. Існування вірусів з РНК-геномом
- С. Існування вірусів з фрагментарним геномом
- Д. Неможливість культивуватися на штучних живильних середовищах
- Е. Здатність проходити крізь бактерійні фільтри

До п.2

Тест 2

При мікроскопії моношару клітин, ураженого вірусом та обробленого специфічною сироваткою, міченою флюорохромом, знайшли смарагдово-зелене випромінення в околядерній зоні клітин. Як називають такий різновид мікроскопії?

- А. Темнопольна
- В. Фазовоконтрастна
- С. Імерсійна
- Д. Люмінесцентна
- Е. Аноптральна

До п.3

Тест 3.

В основі одного з методів індикації (виявлення) вірусів лежить поява в моношарі заражених вірусом клітин під агаровим покриттям ділянок, що складаються з дегенерованих клітин. Ці ділянки моношару клітин, що загинули, називають «негативними колоніями». Як називається даний метод індикації вірусів?

- А. Цитопатична дія.
- В. Кольорова проба.
- С. Метод бляшок.
- Д. Реакція гемаглютинації.
- Е. Реакція гемадсорбції.

Тест 4.

З метою індикації вірусів у культурі клітин, застосовують метод, що заснований на зміні рН культурального живильного середовища у процесі культивування вірусів *in vitro*. Як називається даний метод індикації вірусів?

- А. Цитопатична дія.
- В. Реакція гемаглютинації.
- С. Реакція гемадсорбції.
- Д. Кольорова проба.
- Е. Реакція бляшкоутворення

Тест 5

З метою індикації вірусів в культурі клітин застосовують метод, заснований на зміні рН культурального живильного середовища в процесі культивування вірусів in vitro. Як називається метод індикації вірусів?

- A. Цитопатична дія
- B. Реакція гемаглютинації
- C. Реакція гемадсорбції
- D. Кольорова проба
- E. Бляшкоутворення

До п.4

Тест 6.

3. При серологічному методі діагностики вірусних захворювань сироватку, що досліджують, дворазово розводять у лунках планшету. Вносять вірусний діагностикум і завись еритроцитів. Як називається дана серологічна реакція?

- A. Реакція гемаглютинації.
- B. Реакція пасивної гемаглютинації.
- C. Реакція зворотної пасивної гемаглютинації.
- D. Реакція гальмування гемаглютинації.
- E. Реакція зв'язування комплементу.

До п.5

Тест 7

Досліджуваний матеріал обробили специфічною сироваткою, витримали 1 годину, центрифугували, з осаду приготували препарат і роздивились під мікроскопом з метою виявлення вірусів. Який це різновид мікроскопії?

- A. Електронна
- B. Імерсійна
- C. Фазовоконтрастна
- D. Імуноелектронна
- E. Аноптральная

До п.6

Тест 8

Зараження курячих ембріонів є основним методом виділення вірусу грипу. При введенні в курячий ембріон досліджуваного матеріалу (змиву з носоглотки) з метою знищення мікробів до нього спочатку додають:

- A. Стрептомицин та пеніцилін
- B. Періодат калія
- C. Розчин Ігла
- D. Формалін
- E. Ефір

До п.7

Тест 9.

Для лабораторного підтвердження діагнозу гострої респіраторної вірусної інфекції у пацієнта, лікар вирішив використовувати серологічний метод діагностики. Як необхідно відібрати матеріал для даного методу діагностики у пацієнта?

- A. На початку захворювання, якомога раніше.
- B. Наприкінці захворювання, у період згасання клінічних симптомів.
- C. На піку захворювання, у момент прояву всіх клінічних симптомів.
- D. На початку захворювання (якомога раніше) і через 2-3 тижні.
- E. Під час максимального підвищення температури.

До п.8

Тест 10

З метою ідентифікації вірусу в зараженій культурі кліток застосовують реакцію нейтралізації кольорової проби з використанням специфічної сироватки. Який буде колір живильного середовища при позитивній реакції нейтралізації кольорової проби?

- A. Жовтий
- B. Червоний

- C. Синій
- D. Коричневий
- E. Сірий

Тест 11

Випорожнювання хворого з підозрою на кишкову вірусну інфекцію обробили антибіотиками і заразили первинні культури і культури клітин, що перевиваються. Через 2-3 дні в заражених культурах клітин виявлена цитопатична дія, що притамана ентеровірусам. За допомогою якої реакції далі провести ідентифікацію цих вірусів?

- A. Нейтралізації цитопатичної дії.
- B. Реакції імунофлюоресценції.
- 3. Реакції гальмування гемаглютинації
- D. Реакції аглютинації.
- E. Реакції преципітації.

До п.9

Тест 12

Для підтвердження діагнозу герпетичної інфекції у пацієнта, що захворів кілька днів тому, лікар призначив обстеження з метою виявлення противірусних антитіл за допомогою ІФА. Виявлення антитіл якого класу може вірогідно підтвердити діагноз герпетичної інфекції у даного хворого?

- A. Імуноглобулінів А
- B. Імуноглобулінів М
- C. Імуноглобулінів D
- D. Імуноглобулінів E
- E. Імуноглобулінів G

До п.10

Тест 13.

У дитячій установі зареєстрований спалах інфекції, імовірно вірусної етіології. Необхідно терміново намітити план протиепідемічних заходів.

Які реакції чи методи лабораторної діагностики необхідно підключити в першу чергу для швидкої і своєчасної розшифровки даного спалаху?

- A. Електронна мікроскопія.
- B. Вірусологічний метод.
- C. Серологічний метод.
- D. Імунофлюоресцентна мікроскопія.
- E. Світлова мікроскопія нативного матеріалу.

До п.11

Тест 14.

В даний час як експрес-методи діагностики вірусних інфекцій все ширше використовуються методи, що дозволяють знайти в досліджуваному матеріалі слідові кількості нуклеїнових кислот.

Який з перерахованих методів відноситься до даної групи методів?

- A. ІФА.
- B. РІА.
- C. ІЕМ.
- D. ПЛР.
- E. РІФ.

До п.12

Тест 15

У пацієнта з підозрою на аденовірусну інфекцію на початку захворювання і на третьому тижні від початку захворювання були відібрані сироватки. Після забору другої сироватки матеріал був переданий у вірусологічну лабораторію для постановки РЗК з аденовірусним антигеном. Як можна оцінити діагностику захворювання у даного хворого?

- A. Експрес-метод, що дозволяє в перші години підтвердити етіологію хвороби
- B. Метод, що дозволяє прогнозувати результат хвороби
- C. Метод, що дозволяє виділити збудник
- D. Ретроспективний метод, що дозволяє підтвердити вірусну етіологію хвороби

Е. Метод, що виявляє циркуляцію вірусних антигенів в організмі хворого