

Məşğələ 7**Virus, rikketsiya və xlamidiyaların kultivasiyası. Virusların indikasiya və identifikasiya üsulları. Faqlar, alınması, titrlənməsi, tətbiqi.****Müzakirə olunan suallar:**

1. Virus, rikketsiya və xlamidiyalar - obliqat hüceyrədaxili parazitlər kimi.
2. Virusların çoxalması. RNT və DNT tərkibli virusların reproduksiya xüsusiyyətləri.
3. Rikketsiya və xlamidiyaların çoxalması.
4. Virus, rikketsiya və xlamidiyaların kultivasiyası: həssas heyvanlar, toyuq embrionu, hüceyrə kulturaları.
5. Obliqat hüceyrədaxili mikroorqanizmləri əldə etmək üçün həssas heyvan orqanizminə (qarın boşluğuna, venadaxili, əzələdaxili, intranazal, beyinə və s.) yoluxdurulma üsulları.
6. Obliqat hüceyrədaxili mikroorqanizmləri əldə etmək üçün toyuq embrionuna (sarılıq kisəsinə, amnion və allantois boşluğuna, xorionallantois qışasına) yoluxdurulma üsulları.
7. Obliqat hüceyrədaxili mikroorqanizmləri əldə etmək üçün toxuma kulturasına yoluxdurulma üsulları.
8. Birqatlı hüceyrə kulturasının hazırlanma texnikası və tipləri (ilkin, köçürülən, yarımköçürülən).
9. Yoluxdurulmuş test sistemlərdə və ya patoloji materiallarda obliqat hüceyrədaxili mikroorqanizmlərin aşkar edilməsi: indikasiya (SPT-sitopatik təsir, hemaqqlütinasiya, hemadsorbsiya, hüceyrədaxili əlavələr, rəng sınağı, piləkciqlərin əmələ gəlməsi və s.) və identifikasiya (HALR-hemaqqlütinasiyanın ləngimə reaksiyası, KBR-komplementin birləşmə reaksiyası və s.).
10. Faqlar, onların quruluşu, növləri və xassələri, molekulyar genetikada rolu.
11. Faqların bakteriya hüceyrəsi ilə qarşılıqlı münasibətləri və onun tipləri: virulentli və mülayim faqlar.
12. Lizogen bakteriyalar və onların aşkar edilməsi.
13. Faqların müxtəlif obyektlərdən alınması və titrlənmə üsulları (Appelman və Qrasiya üsulları).
14. Faqların tətbiqi:
 - faqodiyagnostika: faq titrinin artması reaksiyası, patoloji materialda faqın aşkar edilməsi, faqotipləndirmə
 - faqoterapiya
 - faqoprofilaktika

Məlum olduğu kimi, viruslar və rikketsiyalar hüceyrədaxili parazit olub süni qidalı mühitlərdə becərilir. Onlar yalnız heyvan orqanizmində, canlı toxumalarda, toyuq embrionunda çoxalır. İlk dəfə L.Paster heyvan orqanizmində virus çoxaltmışdır, o, quduzluq viruslarını artırmaq məqsədilə passaj etməkdən, yəni bir heyvanı yoluxdurub, ondan da digər heyvana köçürmək üsulundan istifadə etmişdir. Lakin hazırda virusları becərmək üçün heyvanların yoluxdurulması üsulundan məhdud şəkildə istifadə olunur.

Bu məqsədlə ən çox toyuq embrionunun yoluxdurulması üsulu işlənir. Heyvan yoluxdurmaqla virusun becərməsi üsulundan bu üsulun üstün cəhəti ondan ibarətdir ki, laboratoriya heyvanlarında olan infeksiyalar burada təsadüf olunmur, xarici flora ilə çirklənmə ehtimalı azdır. Toyuq embrionunun yoluxdurulması üsulunun çatışmayan cəhəti odur ki, yoluxdurulma nəticəsində embrionda baş verən dəyişikliyi dinamika ilə müşahidə etmək olmur və həm də bütün viruslar (məsələn, paraqrip, poliomielit virusları və s.) toyuq embrionunda becərilə bilmir.

Yoluxdurmaq üçün götürülmüş toyuq embrionunun hansı inkişaf mərhələsinin seçilməsi, yəni neçə günlüyünün götürülməsi virusun növündən asılıdır. Eyni zamanda müxtəlif viruslar toyuq embrionunun müxtəlif hissələrinə yoluxdurulurlar. Məsələn, qrip virusları xorionallantois boşluğuna, çiçək virusları xorionallantois qışasına, parotit virusları amnion boşluğuna və i.ə. Rikketsiyalar isə toyuq embrionunun sarılıq kisəsində çoxalır.

Embrion yoluxdurulmazdan əvvəl onun sağ və ya ölü olduğunu dəqiqləşdirmək lazımdır, belə ki, toyuq embrionu qaranlıq otaqda küt tərəfi yuxarıya baxmaq şərtilə, ovoskop cihazı üzərinə qoyulur və oradaca işıqlandırılır. Embrionun hərəkət etməsi, damarlarının qanla dolması, ürək vurğuları və s. embrionun sağ olmasını bildirir. Buna əmin olduqdan sonra hava boşluğu karandaşla qeyd olunur. Yumurtanın qabığı əvvəlcə spirtlə, sonra yodla silinir, yenidən spirtlə silinib kibritlə yandırılaraq dağlanır və yoluxdurma başlanır.

Allantois boşluğuna yoluxdurmaq üçün 10-11 günlük embrion götürüb steril iynə vasitəsilə ehtiyatla hava kamerası tərəfindən qabıq deyilir və təxminən iynəni 2sm hərəkət etdirib şprisdəki 0,1-0,2ml miqdarında olan müayinə materialı həmin hissəyə yeridilir, sonra iynə çəkilməklə cəld onun yeri isidilmiş parafin və ya leykoplastlarla örtülür.

Amnion boşluğu yoluxdurulduqda 10-12 günlük embrion, sarılıq kisəsinə yoluxdurmaq lazım gəldikdə isə 5-6 günlük embrion götürülür. Embrionun özü yoluxdurulduqda isə yumurta ovoskop üzərində baxılıb

dölün söykəndiyi tərəf qeyd edildikdən sonra o, horizontal istiqamətdə tutulur və yuxarıdakı qayda üzrə yoluxdurulur.

Embrion müxtəlif yollarla yoluxdurulduqdan sonra 37°C termostatda 2-3 sutka vertikal vəziyyətdə saxlanılır, sonra təşrih edilir.

Əgər toyuq embrionu rikketsiyalı materialla yoluxdurulubsa, onda termostatda 6-8 gün saxlamaq lazımdır.

Təşrih edilməzdən (yarılmazdan) əvvəl yumurta 4°C temperaturda 1 gecə saxlanılır. Sonra yenidən onun qabığı spirt və yodla silinir və üzərində kiçik (1sm²) pəncərəlik açılır. Əvvəlcə qışa və embrionda baş vermiş morfoloji dəyişikliklər gözlə, yəni makroskopik müşahidə olunur. Sonra xorionallantois qışa qayçı ilə kəsilir və yumurtanın içərisində olanlar Petri kasasına tökülür. Qabığın daxili səthində qalan qışa (qabıqaltı pərdə) pinsetlə ayrılır, fizioloji məhlulla yuyulur və başqa kasaya qoyulur. Ağ piləkçik şəklində proliferativ-nekrotik zədələnmələrin görünməsi virusun orada çoxalmasını bildirir.

Əgər amnion və allantois boşluğu yoluxdurulmuşsa, yuxarıda göstərilən qayda ilə işlənmədən sonra yenə də qabıqdan kəsilir, məhlul şpris və ya pipetka ilə sorulur, KBR, hemaqqlütinasiya reaksiyaları qoymaqla materialda virusun olub-olmaması dəqiqləşdirilir.

Son illərdə virus və rikketsiyaları becərmək üçün toxuma kulturası üsulundan daha geniş istifadə olunur. Toxuma kulturası anticisimləri olmayan eynicinsli hüceyrələrdən təşkil olunmuşdur və virusun təsirindən həmin hüceyrələrdə sitopatik dəyişikliklərin (SPD) əmələ gəlməsi diaqnozu təsdiq edir. Toxuma kulturasını hazırlamaq üçün insan və heyvanın həm embrional, həm də inkişaf etmiş normal və bədxassəli şiş toxumaları işlədilə bilər. Hal-hazırda inkişaf edən aşağıdakı toxuma kulturalarından istifadə edilir:

- ✚ Fiksə olunmuş toxuma tikələri – bunlar nisbətən az işlənir;
- ✚ Birqatlı toxuma kulturası – bunlar da öz növbəsində ilkin, tripsinizasiya edilmiş, köçürülmüş və yarımköçürülmüş (diploid) növlərə ayrılır;
- ✚ Suspenzion toxuma hüceyrələri.

Birqatlı toxuma kulturalarından daha geniş istifadə olunur. İlkin toxuma kulturasının hazırlanması bir neçə mərhələdə gedir: toxumanın xırdalanması, tripsinləşdirilməklə hüceyrələrin bir-birindən ayrılması, sonra ayrılmış eynicinsli hüceyrələrin suspenziyasının tripsindən təmizlənməsi, bu hüceyrələrin çoxalması üçün onun, xüsusi qidalı mühitlərdə (məsələn, 199 N-li qidalı mühitdə) durulaşdırılması.

Bunun üçün əvvəlcə toxuma kəsikləri Xenks məhlulu ilə bir neçə dəfə yuyulduqdan sonra onun üzərinə 3-4 dəfə durulaşdırılmış 0,25%-li tripsin əlavə edib, bir saat müddətində xüsusi qarışdırıcı ilə qarışdırılır. Alınan suspenziya dördqat tənzifdən süzülür və 10dəq ərzində 600-700dövr/dəq sürətlə sentrifugada tərkib hissələrinə ayrılır, yenidən Xenks məhlulu ilə yuyulur və hüceyrələrdən təşkil olunmuş çöküntü alınır ki, bu çöküntü də 199 N-li qidalı mühitdə durulaşdırılır və Qoryayev kamerasında hüceyrələr sayılır. Sonra hüceyrə kütləsi, 1ml-də 300-400 min hüceyrə qalanadək qidalı mühitlə yenidən durulaşdırılır. Oraya antibiotik də əlavə edilir ki, bakterial çirklənmənin qarşısı alınsın. Bundan sonra həmin qarışıqdan 1-1,5ml olmaqla sınaq şüşələrinə və ya flakonlara tökülür, ağzı rezin tıxacla bağlanır, çəp vəziyyətdə termostatda 37°C temperaturda 1-2 sutka saxlandıqdan sonra fibroblastlardan təşkil olunmuş birqatlı toxuma kulturası alınır.

İlkin toxuma kulturasını yalnız bir dəfə işlətmək olar, ondan təkrar istifadə etmək lazım gələrsə, toxuma yenidən işlənməli olur.

Təcrübədə köçürülmüş toxuma kulturası daha çox işlənir. Köçürülmüş toxuma kulturası bir mühitdən digərinə passaj edilməklə uzun müddət saxlanıla bilər, ona görə də daha əlverişli sayılır. Bunlar nisbətən ucuzdur və bu toxumaların viruslara qarşı həssaslığı daha çoxdur.

Köçürülmüş toxuma kulturalarına misal olaraq Hela (uşaqlıq boynu xərçəngindən ölmüş Helen adlı qızdan alınmışdır), Her-2 (udlaq xərçəngindən alınmış toxumalar), KV (dilin xərçəngi olan xəstədən alınmışdır) və s. göstərmək olar

Köçürülmüş toxuma kulturası yuxarıda göstərilən qayda üzrə tripsinləşdirilir, sonra sınaq şüşələrinin divarında olan birqatlı toxuma kulturası versen və ya tripsinlə işlənməklə ayrılır. Bu kütlə sentrifuga sınaq şüşələrinə tökülür və 10 dəq müddətində 1000 dövr/dəq sürətlə sentrifugadan keçirilir, sonra çöküntünün üzərindəki məhlul atılır, sınaq şüşəsinin dibində qalan hissəsinin üzərinə 5 ml 199 №-li qidalı mühit əlavə olunur, yaxşıca qarışdırılır, sentrifugadan keçirilir, çöküntünün səthindəki məhlul atılır, çöküntü özü isə qidalı mühitlə yenidən durulaşdırılır və nəhayət, hüceyrələr sayılır. Sonra suspenziya 1 ml-də 100000 hüceyrə qalanadək durulaşdırılır, ona 100 vahid penisillin, 50 vahid streptomisin əlavə edib 1,5-2 ml olmaqla sınaq şüşələrinə tökülür, ağzı rezin tıxacla bağlanıb termostatda 37°C temperaturda 5-6 gün saxlanılır.

Sınaq şüşələri xüsusi dayaq üzərində yerləşdirilir və bu da mikroskopun əşya masası üzərinə elə qoyulur ki, tıxac islanmasın. Toxuma kulturasına mikroskopun 8 N-li obyektivi ilə baxıb, birqatlı kulturanın tam inkişafına əmin olduqdan sonra o, viruslu materialla yoluxdurulur. Lakin yoluxdurulmazdan əvvəl patoloji material antibiotiklə işlənilir, sonra 199 №-li qidalı mühitlə durulaşdırılır, toxuma kulturası olan sınaq şüşəsindən maye kənara atılır və oraya 1 ml durulaşdırılmış patoloji material tökülür, şüşənin ağzı rezin tıxacla bağlanılır və horizontal vəziyyətdə 60 dəq müddətində termostatda 37°C temperaturda saxlanılır. Sonra termostatdan çıxarılır, əlavə edilmiş 1 ml maye sorulub kənara atılır və həmin sınaq şüşəsinə yenidən 2ml təzə

199 №-li sintetik qidalı mühit töküb termostata qoyulur və gündə mikroskopla müayinə edilir, SPT-nin müşahidə edilməsi materialda virusun olduğunu sübut edir.

Rikketsiyalar isə köçürülmüş toxuma kulturasında 36-37⁰ C-də 8-14 günə becərilir.

Köçürülmüş toxuma kulturasından fərqli olaraq, yarım-köçürülmüş toxuma kulturasında köçürülmə müəyyən hədd çərçivəsində olur, ən çoxu 50-55 dəfə köçürülə bilər, bundan sonra ştam məhv olur. Buna baxmayaraq, diploid kulturasının bir sıra üstün cəhətləri vardır: bunlarda latent viruslara rast gəlinmir, əksər viruslar üçün həssasdır, hüceyrələr sürətlə çoxalır və s.

Diploid hüceyrə şammları insan embrionunun ürəyindən, ağ ciyərlərindən, böyrəyindən və s. toxumalarından alınır.

Orqan kulturası üsulunda isə hər hansı bir toxuma hissəsi müxtəlif əsas üzərində becərilir. Bu üsulun köməyiylə digər toxumalarda çətin becərilən viruslar çoxaldılır və sənayedə geniş miqyasda hüceyrə istehsalı üçün istifadə olunur.

Bəzi viruslar toxuma kulturasında heç bir dəyişiklik əmələ gətirmir və ya çox zəif təsir göstərir (məsələn, qrip virusları). Bu zaman hemadsorbsiya və hemaqqlütinasiya reaksiyaları tətbiq edilir.

Toxuma kulturası üsulu virusları becərmək üçün bir də ona görə universal üsul sayılır ki, virusların əksəriyyəti üçün həmin virusa qarşı həssas olan toxuma kulturasını seçmək mümkündür.

Virusların indikasiya və identifikasiyası. Virusların indikasiyası dedikdə onun aşkara çıxarılması, əldə edilməsi nəzərdə tutulur. Onun identifikasiyası dedikdə isə, əldə edilmiş virusun hansı virusa xas olduğunu, differensiasiya yolu ilə, təyin etmək başa düşülür.

Əvvəlki materiallarda, yəni virusların kultivasiya üsullarında qeyd edildiyi kimi, virusların patoloji materiallardan alınması üçün üç əsas üsuldən istifadə edilir: toxuma kulturası, toyuq embrionu və həssas laboratoriya heyvanlarının yoluxdurulması.

Toxuma kulturası üsulu xüsusi yer tutur. Baxmayaraq ki, bu üsul çox zəhmət tələb edən və vaxt aparandır, elə ən çox da işlənən üsuldur. Virusların kultivasiyasında əsas şərt yüksək dərəcədə sterilliyin qorunmasıdır. Əksər hallarda yaxşı yumamaq və düzgün sterilizasiya edilməmək ya toxumanın şüşəyə yaxşı yapışmamasına, ya da onun tez degenerasiyasına səbəb olur. Orqanizmdən xaricdə virusu çoxaltmaq üçün mürəkkəb fiziki-kimyəvi faktorlar kompleksinin olması vacibdir.

Məlun olduğu kimi, virusların müvəffəqiyyətlə becərilməsinin əsas şərtlərindən biri həssas toxuma kulturasının seçilməsidir. Elə bir toxuma kulturası yoxdur ki, orada bütün viruslar becərilə bilsin. Ona görə də laboratoriyada becəriləcək virusun növündən asılı olaraq, həmin virusun həssas olduğu bir neçə toxuma kulturasından istifadə edilir. Məsələn, enterovirusların əksəriyyəti qrip, paraqrip, parotit virusları meymun böyrəyindən hazırlanmış birincili kulturalarda, adenoviruslar, respirator sinsitsial viruslar, B qrup Koksaki virusları köçürülmüş Hep-2 toxumalarda, rinoviruslar və sitomeqaloviruslar insan embrionunun diploid hüceyrələrində və s. yaxşı inkişaf edir.

Virusların toxuma kulturasında becərilməsi zamanı həm virusun, həm də toxuma kulturasının növündən asılı olaraq toxuma kulturasında bir sıra xarakterik dəyişikliklər meydana çıxır:

1) Təqatlı toxumalarda becərmə zamanı virusların əksəriyyəti *sitopatik təsir* (SPT) adlanan dəyişiklik əmələ gətirir ki, bu da hüceyrə qatının destruksiyasından ibarətdir.

SPT-nin xarakteri virusun növündən asılı olub diferensial əlamət hesab olunur. Məsələn, respirator-sinsitsial viruslar və paraqrip virusları toxumalarda simplast və sinsiti, sitomeqaloviruslar xirdadənəli destruksiya, gənə ensefaliti virusları ocaqlı xirdadənəli destruksiya, çiçək vaksini virusları və uçuq virusları isə iridənəli destruksiya əmələ gətirir və s.

Virusun SPT-nin nəticəsi bir müsbətdən (+) dörd müsbətə (++++ qədər qiymətləndirilir. Təcrübə üçün işlədilən toxuma kulturalarının 50%-ni öldürə bilən virusun ən az miqdarı (ən böyük durulaşma dərəcəsi) virusun titri hesab olunur.

2) Virus indikasiyasının daha həssas üsullardan biri aqarın altında piləkçiklərin əmələ gəlməsidir. Bu üsulla materialda olan ən az miqdar virus belə aşkara çıxarılır. İşləmək üçün təqatlı toxuma kulturası viruslu materialla yoluxdurulur, sonra bunun üzəri, tərkibinə qidalı mühit (199 №-li zərdab və s.) və neytral rot (qırmızı) qarışdırılmış yarımmayə aqarla örtülür. Bu zaman virusun təsirinə məruz qalmış hüceyrələr rənglənməyib qırmızı fonda şəffaf rəngsiz ləkələr şəklində görünür, canlı hüceyrələr isə qırmızı boyanır, həmin bu ləkələr piləkçiklər adlanır ki, bunlar da bir virus hüceyrəsindən əmələ gəlmiş virus koloniyaları hesab olunur. Bu üsuldən istifadə etməklə virusun titri təyin edilir, həm də virusların seleksiyası aparılır.

SPT göstərməyən viruslar dolayı üsullarla aşkar edilir. Bunlara aiddir: hemadsorbsiya, interferensiya, hüceyrədaxili elementlər hissəciklərin əmələ gəlməsi və immunflüoressensiya üsulları.

3) Hemadsorbsiya reaksiyası eritrositlərin viruslarla yoluxdurulmuş toxuma kulturası üzərinə çökməsindən ibarətdir. Bir sıra virusların hemadsorbsiya qabiliyyəti vardır: qrip, paraqrip, çiçək, qızılça, gənə ensefaliti və s.

Hemadsorbsiya reaksiyasını qoymaq üçün insanın (O-qrup), dəniz donuzunun və s. eritrositlərindən istifadə edilir. Reaksiyanı aparmaq üçün əvvəlcədən viruslarla yoluxdurulmuş toxuma kulturasından qidalı mühit çıxarılır və oraya 0,2 ml 0,4%-li eritrosit suspenziyası əlavə olunur. Sonra sınaq şüşələri çalxalanır və maili vəziyyətdə 3-5 dəq otaq temperaturunda və ya 30-40 dəq soyuducuda saxlanılır. Bundan sonra sınaq şüşələrini, adsorbsiya olmayan eritrositləri toxuma kulturasından ayırmaq məqsədilə,

ehtiyatla sirkələyib mikroskopun 8 N-li obyektivi ilə baxılır və reaksiyanın nəticəsi qiymətləndirilir. Müsbət hemadsorbsiya reaksiyasında eritrositlər viruslarla yoluxdurulmuş hüceyrələrin üzərinə çökərək xarakterik şəkil əmələ gətirir: məsələn, qrip və parotid virusları adacıqlar şəklində toplanır, paraqrip virusları isə yayılmış şəkildə görünür.

4) İnterferensiya fenomeni də SPT verməyən virusları aşkara çıxarmaq üçün istifadə olunur. Bu üsulla toxuma kulturası tədqiq ediləcək, virusla yoluxdurulduqdan 1 gün sonra həmin kultura aydın SPT verən başqa bir virusla yoluxdurulur. Əgər ikinci virusla yoluxdurmadan sonra gözləniləcək SPT əmələ gəlmirsə, bu, müayinə olunan materialda virusun olduğunu göstərir. Bunu belə izah etmək olar: materialda olan virusun toxuma kulturasında çoxalması nəticəsində interferon əmələ gəlir ki, bu da toxumanın ikinci bir virusla yoluxmasının qarşısını alır.

5) Bir sıra virus xəstəliklərinin laboratoriya diaqnostikasında hüceyrədaxili elementar hissəciklərin aşkar edilməsinin mühüm əhəmiyyəti vardır. Bu elementar hissəciklər rəng məhlulları və flüoroxromlarla işlənmiş toxuma kəsiklərində, toxuma qırıntılarında, orqanlardan hazırlanmış iz (basma) yaxmalarda rast gəlinir. Bəzi infeksiyalarda elementar hissəciklər yalnız yoluxdurulmuş hüceyrələrin sitoplazmasında (quduzluqda, çiçək vaksin viruslarında), bəzilərinə isə həm sitoplazmada, həm də nüvədə yerləşir (qızılça, təbii çiçək, suçiçəyi, adenoviruslarda).

Hüceyrə daxili elementlər müxtəlif təbiətli, müxtəlif quruluşlu və formalı, müxtəlif ölçülü (0,25-25mkm) olur. Bunları aşkara çıxarmaq üçün Gimza rəngləmə üsulundan istifadə olunur. Bunun üçün əvvəlcə preparat Düboks-Brazil-Buen qarışığında fiksasiya olunur, sonra isə Gimza üsulu ilə rənglənir. Bu üsulda heceyrədaxili elementar hissəciklər cəhrayı və ya yasəmən rəngdə rənglənir.

Qrip virusunun əmələ gətirdiyi hüceyrədaxili elementar hissəciklər Mani, Piqarevski və Pavlovski üsulları ilə rənglənir.

Quduzluqda əmələ gələn elementar hissəcikləri (Babeş-Neqri cisimciklərini) təyin etmək üçün Muromsev və ya Tureviç üsulu ilə rəngləmək lazımdır.

Təbii çiçək viruslarının hüceyrədaxili elementlərini (Qvarnieri cisimciklərini) aşkara çıxarmaq üçün Gimza üsulundan istifadə olunur ki, bu üsulda da həmin cisimciklər al qırmızı rəngdə görünür.

6) *İmmunflüoressensiya (İF)*. Virusların aşkar edilməsində və identifikasiyasında istər virusların, istərsə də onların hüceyrələrdə əmələ gətirdiklərin lokalizasiyasının mühüm əhəmiyyəti vardır. Bu zaman lüminessent mikroskopiya, yəni immunflüoressensiya daha perspektivli sayılır. Flüoressensiyaedici zərdab ultrabənövşəyi şüaların təsiri ilə işıqlana bilən xüsusi maddələrlə, yəni flüoroxromlarla işlənmiş zərdablardır. İmmunflüoressensiya üsulu spesifik, asan və təcili diaqnostika üsulu olub, əksər virus infeksiyalarının diaqnostikasında işlənir. Üsulun ən qiymətli cəhəti budur ki, tək-tək yoluxmuş hüceyrələrin belə aşkar edilməsinə imkan verir.

Virusların reproduksiyasından asılı olaraq, antigen ya nüvədə, ya sitoplazmada, ya da hər ikisində yerləşir. Quduzluqda və çiçəkdə işıqsəçmə sitoplazmada, adenovirus infeksiyalarında nüvədə müşahidə olunur. Beləliklə, antigenin lokalizasiyası mühüm diaqnostik əlamətlərdən biri sayılır, ona görə də tədqiq edilən hüceyrələrin strukturu pozulmamalıdır.

İmmunflüoressensiya üsulunun əsasını antigenlə spesifik anticisim arasında gedən reaksiya təşkil edir. Flüoroxromla birləşmiş anticisimlər müvafiq antigenlə birləşmə qabiliyyətlərini saxlayır. Flüoroxrom sifətilə flüoressensiyanın izotiosianatı, rodamin və s. istifadə olunur.

Müayinə olunacaq yaxmaya flüoroxromla nişanlanmış anticisim əlavə etdikdə o, spesifik antigenin üzərinə adsorbsiya olunur (çökür) və antigenlə möhkəm birləşmə əmələ gətirir. Sonra çökməmiş anticisimlər fizioloji məhlulla yuyulur və orada yalnız birləşmiş anticisimlər qalır. Lüminessent mikroskopiya zamanı preparatda qara fonad yalnız spesifik anticisimlə birləşmiş antigenlər işıq saçır.

İmmunflüoressensiya düz və dolay yolla aparıla bilər.

Düz immunflüoressensiya üsulundan patoloji materialda virus axtarılan zaman istifadə olunur. Düz immunflüoressensiya üsulunun mahiyyəti aşağıdakıdan ibarətdir: patoloji materiallardan hazırlanmış yaxmalar əvvəlcə asetonla və ya metil spirtində fiksasiya olunur, sonra isə flüoressin-izotiosianatla nişanlanmış spesifik flüoressensiyaedici anticisim və rodaminlə nişanlanmış normal öküz zərdabı albumin qarışığı ilə rənglənir (Flüoressin-izotiosianat yaşıl rəng, rodamin qırmızı rəng verir). Nəticədə fon qırmızı, spesifik antigenlər yaşıl rəngdə görünür.

Dolay immunflüoressensiya reaksiyasında üç komponentin iştirakı zəruridir: antigen+immunqlobulin+flüoressensiyaedici antiqlobulin. Burada əvvəlcə antigen nişanlanmış immunqlobulinlə birləşir və əmələ gələn antigen+anticisim kompleksi flüoressensiyaedici antiqlobulin zərdabının köməyi ilə aşkara çıxarılır. Məsələn, herpes (uçuq) virusu ilə yoluxmuş hüceyrə qatının üzərinə dovşandan alınmış nişanlanmamış antiherpes zərdabı əlavə edilir. Müəyyən müddət keçdikdən sonra zərdab yuyulur və hüceyrələr tərkibində dovşan qlobulini əleyhinə olan nişanlanmış anticisimlərlə işlənir. Bu zaman ram bir kompleks aşkara çıxarılır.

Bu üsulun üstün cəhəti ondan ibarətdir ki, burada hər bir virus əleyhinə nişanlanmış immun zərdabın olması vacib deyildir, dovşan zərdabı əleyhinə nişanlanmış anticisimlərin olması kifayətdir. Həm də bu üsul çox həssas üsuldur.

Yuxarıda qeyd etdiyimiz kimi, bir sıra virusların patoloji materialdan ayrılması üçün həssas laboratoriya heyvanlarının yoluxdurulmasının daha mühüm əhəmiyyəti vardır. Bu zaman virusun aşkar edilməsində xarakterik klinik əlamətlər üstünlük təşkil edir: məsələn, qıcolmalar, ifliclər və s.

Bir sıra virusların patoloji materiallardan alınması üçün toyuq embrionunun yoluxdurulmasından istifadə olunur. Bu üsulda virusların çoxalmasını eritrositlərin hemaqqlütinasiyası (qrip) və ya xorionallantois qışası üzərində xarakterik ağımtıl ləkələrin əmələ gəlməsi göstərir.

Qrip, paraqrip, parotit, çiçək və çiçək vaksini virusları, ECHO və Koksaki tipli virusların bəziləri, arbovirusların bəziləri, adenovirusların əksəriyyəti eritrositləri hemaqqlütinasiya edə bilər.

Hemaqqlütinasiya reaksiyasını qoymaq üçün müəyinə olunacaq virus hansı heyvanda həmişə SPT göstərsə, həmin heyvanın eritrositlərindən istifadə olunur. Paramiksovirus və ortomiksoviruslarla HAR-nı qoymaq üçün insanın "O" qrup, toyuq və dəniz donuzlarının eritrositlərindən, adenoviruslar üçün – ağ siçan və rezus makaka cinsli meymunun eritrositlərindən, arboviruslar üçün – qoyun və ev qazlarının eritrositlərindən istifadə edilir.

HAR qoymaq üçün təzə alınmış qan cəld içərisində şüşə muncuqlar olan qabda fibrinsizləşdirilir və ya antikoagulyantlarla qarışdırılır. Sonra qan steril tənizdən süzülür və üç dəfə 10-20 dəq müddətində 600-1000 dövr/dəq sürətlə sentrifüqadan keçirməklə fizioloji məhlulla yuyulur. Çöküntüdə olan eritrosit kütləsi fizioloji məhlul əlavə etməklə əvvəlki həcminə gətirilir. 100%-li hesab olunan bu eritrosit kütləsindən 1-0,75% qatılıqda suspenziya hazırlanır. HAR sınaq şüşələrində və ya çökəkli pleksiqlas lövhələrdə qoyulur. Həmin çökəklərdə viruslu material 1:10 nisbətindən başlayaraq 1:1280 nisbətində qədər durulaşdırılır. Bunun üçün birincidən başqa, qalan çökəklərin hərəsinə 0,5ml fizioloji məhlul əlavə olunur, 1-ci çökəyə isə 0,9ml fizioloji məhlul tökülür. Sonra 1-ci çökəyə 0,1ml viruslu material əlavə edib, oradan 0,1ml götürülür və 2-ci çökəyə keçirilir, oradan 0,5ml 3-cüyə və i.ə. əlavə edilir. Beləliklə, virus durulaşdırılır. Durulaşdırmadan sonra çökəklərin hər birinə 1%-li 0,5ml eritrosit suspenziyası tökülür. Sonra lövhə çalxalanmaqla qarışdırılır və otaq temperaturunda 30-45dəq saxlanılır. Hemaqqlütinasiyanın nəticəsi eritrosit çöküntüsünün forma və böyüklüyünə görə dörd dərəcə ilə qiymətləndirilir. Eritrositlər çökəyin divarına tamamilə yayılmış halda, "çətir" şəklində böyük çöküntü əmələ gətirərsə (++++), nisbətən az olarsa (+++) eritrositlərin yarısı dibə çökmüş və yarısı yayılmış olarsa (++) , əksəriyyəti dibə çökərsə (+), hamısı "düymə" şəklində dibə çökübsə, (-) hesab olunur.

Hemaqqlütinasiya verən virusun ən böyük durulaşma dərəcəsi hemaqqlütininlərin titri və ya aqqlütinasiyaetmə vahidi hesab olunur (++). HAR ilə yanaşı, kontrol reaksiya da qoyulur. Bu məqsədlə kontrol çökəklərə 0,5ml fizioloji məhlul və 0,5ml eritrosit kütləsi tökülür. Spontan aqqlütinasiya olmadıqda eritrositlər çökəyin dibinə "düymə" şəklində çökür.

Toyuq embrionlarının yoluxdurulması. Xəstəlik törədən əksər viruslar toyuq embrionunun müxtəlif nəhiyyələrində kultivasiya olunurlar: məsələn: çiçək virusları xorion-allantois qışasında, parotit virusları – amnion boşluğunda, qrip virusları – amnion və allantois boşluğunda, quduzluq virusları – sarılıq kisəsində və s. yaxşı çoxalırlar. Digər üsullarla müqayisədə bu üsul daha etibarlı sayılır. Burada embrion qabığıla bağlı olduğundan bakteriyalarla çirklənmə ehtimalı az olur, embrionda anticisim olmadığından çox virus qrupu üçün həssas olur. Həm də bu üsul asandır, sadədir və ucuz başa gəlir. Lakin toyuq embrionunda da bəzən latent infeksiya ola bilər, eləcə də virusun çoxalma dinamikasına nəzarət edilə bilinmir, toyuq embrionunda da bütün viruslar çoxala bilmir. Bəzən yoluxdurulmuş embrion təşrih edildikdə gözlə görünən dəyişiklik olmur, bu zaman hemaqqlütinasiya reaksiyası və s. istifadə edilir. Embrionu yoluxdurmaq üçün 7-12 günlük embrion götürülür. Bu hansı virusa görə yoluxdurulmadan asılıdır. Əgər sonda embrionda virus aşkar olunmuşsa, təcrübə 3 dəfə təkrar olunur, sonra cavabın mənfi olduğuna inanılır.

Laborator heyvanların yoluxdurulması. Əgər virus yuxarıda qeyd olunan üsullarla aşkara çıxarılmırsa, yəni toxuma kulturasında SPT əmələ gətirmərsə, embrionda çoxalmırsa, onda laborator heyvanları yoluxdurulur. Məsələn: arboviruslar, quduzluq virusu, dabaq virusu, Koksaki A virusu və s. Bu üsulun köməyiylə bir sıra virus infeksiyalarının klinik simptomlara görə identifikasiyası aparılır, neytrallaşma reaksiyası qoyulur, diaqnostik və müalicə-profilaktik virus preparatlarının alınması əldə edilir. Bu zaman məlum laborator heyvanları ilə yanaşı, meymunlardan, qaz, ördək, toyuqlardan da istifadə olunur. Daha həssas olduqlarına görə çox vaxt yenidoğulmuş heyvanlar və "steril" heyvanlar işlədilir (heyvanın uşaqlığından çıxarılmış bala).

Müəyinə olunacaq material, bildiyimiz qaydalara əsasən virusun tropizmi nəzərə alınaraq heyvana yoluxdurulur. Məsələn: pnevmotropplar burundan, neyrotropplar beyindən yoluxdurulur, sterilliyi qorumaqla artıq qalan materila sonrakı müayinələr üçün saxlanılır. Heyvanı öldürmək lazım gələrsə ya venaya hava vurulur, ya da xloroformla öldürülür. Bütün təcrübə boksda aparılır, işin həm əvvəlində, həm də sonunda orada bakterisid lampalar yandırılır.

Əgər heyvanda həmin virus infeksiyasına xas olan simptomatik əlamətlər görünərsə, demək virusun aşkar edilməsi, yəni indikasiyası müsbət sayılır.

Virusun identifikasiyası. Laboratoriya heyvanlarında infeksiyanın yaradılması, kulturalarda sitopatik effektin alınması, hemadsorbsiya və hemaqqlütinasiya reaksiyaları, virusun əldə edilməsi üçün ikinci dərəcəli əlamətlər hesab olunur ki, onlara əsaslanaraq gələcək identifikasiya üsulları seçilir. Virusların identifikasiyası daha dəqiq seroloji tıdqiqliq üsulları kompleks halda tətbiq edildikdə ola bilər.

Bioloji neytrallaşma reaksiyası (BNR). BNR-in əsasını tərkibində anticisim olan immun zərdabın təsirindən virusun neytrallaşması təşkil edir.

Reaksiyanı aparmaq üçün müayinə olunan zərdab, qeyri-spesifik inhibitorlardan azad edilmək məqsədilə 56°C temperaturda 30 dəq müddətində qızdırılır. Durulaşmış zərdab virusun daimi dozası ilə qarışdırılır. Məsələn, 100 TTD₅₀ (yoluxdurulmuş toxumanın 50%-də SPT göstərən doza) müəyyən temperaturda 1-2 saat müddətində durulaşdırılmış zərdabla qarışdırılıb kontaktda olduqdan sonra, toxuma kulturasına, toyuq embrionuna və ya siçanlara vurulur.

Anticismin titri, virusun sitopatik təsirinin və ya onun toyuq embrionu və heyvan orqanizmində çoxalmasının qarşısını ala bələn zərdabın ən yüksək durulaşma dərəcəsi hesab olunur.

Toxuma kulturasında piləkciqlərin əmələ gəlməsinin qarşısını ala bilən reaksiya da neytrallaşma reaksiyasının başqa forması hesab oluna bilər. Bu reaksiyada zərdabın müxtəlif durulaşmaları 100 PÖV (piləkciq əmələ gətirən vahid) virusla qarışdırılır və toxuma kulturasına əlavə edilir.

Piləkciq əmələ gətirmə xüsusiyyətini 50-82% aşağı sala bilən durulaşdırma dərəcəsi zərdabın titri sayılır.

Bəzi virusları, xüsusən enterovirusları bir-birindən fərqləndirmək üçün rəngli reaksiyadan istifadə edilir, belə ki, bu virusların toxuma hüceyrələrində çoxalması hüceyrələrin metabolizminin kəskin dəyişməsilə yanaşı gedir. Bunu mühüm rənginin dəyişməsilə təyin etmək olar. Belə hallarda zərdabın neytrallaşma effekti rəng göstəricisi ilə təyin edilir.

Komplementin birləşmə reaksiyası (KBR). Məlum olduğu kimi KBR-də iki sistem iştirak edir: antigen+anticisim+komplement və qoyun eritrositləri+hemolitik zərdab. Virus anticisimlə qarşılıqlı əlaqəyə girdikdə, yəni birləşdikdə komplement də onlarla birləşir və o, eritrositlərin əriməsində iştirak edə bilmir. Beləliklə, eritrositlər ərimir, dibə çökür ki, bu da KBR-in müsbət olmasını bildirir.

Reaksiyanı qoymaq üçün zərdab 56°C-də su hamamında 30 dəq qızdırılır və bundan bir damla ortası çökük lövhəyə əlavə edilir, buraya bir damla antigen və bir damla əvvəlcədən titrlənmiş komplement əlavə edilir. Qarışıq 18-20 saat 4°C temperaturda saxlandıqdan sonra oraya sensibilizə edilmiş qoyun eritrositləri və dovşanın hemolitik zərdabı əlavə olunur. Lövhələr yaxşı-yaxşı silkələməklə qarışdırılır və 37°C temperaturda 45 dəq saxlanılır. Komplementin antigen+anticisim kompleksi ilə birləşmiş olduğu çöküklərdə hemolizin təklildə eritrositləri əridə bilmir və eritrositlər dibə çökür. Əksinə, əgər komplement sərbəst qalırsa, eritrositlər ərimiş olur və deməli, KBR mənfidir.

İmmun diffuziya reaksiyası (İDR). Antigenin anticisimlə birləşməsi ola bilər ki, yarımmaye mühitdə presipitat əmələ gəlməsilə aşkar edilsin, məsələn, gəldə.

İDR qoymaq üçün əridilmiş aqar (gel) şüşə lövhə üzərinə nazik qatla tökülür. Aqar bərkiyəndən sonra 2-3mm diametrli dəliklər açılır. Üzbəüz olan bu dəliklərdə antigen və zərdab yerləşdirilir. Bunlar dəliklərdən aqara diffuziya edərək orada qarşılaşır və ağ zolaqlar şəklində presipitat əmələ gətirir.

Hemaqqlütinasiyanın ləngimə reaksiyası (HALR). Virusların əksəriyyətinin eritrositləri aqqlütinasiya etmək qabiliyyəti var. Yuxarıda göstəriləyi kimi, hemaqqlütinasiya müxtəlif qrup viruslar üçün müxtəlifdir. Məsələn, qrip virusları xoruz eritrositlərini, dəniz donuzları və insanın "O" qrup qanlarını neytral pH-a malik mühitlərdə aqqlütinasiya edir. Arboviruslar göyərçin və qaz eritrositlərini turş reaksiyalı mühitdə aqqlütinasiya edir. İmmun zərdab iştirak etdikdə aqqlütinasiyanın qarşısı alınır, buna *hemaqqlütinasiyanın ləngimə reaksiyası* deyilir.

HALR mikropanellərdə aparılır. Bunun üçün dilyutor adlanan xüsusi ilgəklər vasitəsilə zərdab durulaşdırılır. Sonra oraya, tərkibində 4-5 vahid əvvəlcədən titrlənmiş hemaqqlütinin olan 1 damla antigen əlavə olunur. Hər virus üçün müəyyən olunmuş temperaturda müəyyən müddət saxlandıqdan sonra oraya 2 damla eritrosit kütləsi əlavə olunur və 30-45dəq sonra reaksiyanın nəticəsi qeyd edilir. Hemaqqlütinasiyanı ləngidən ən böyük durulaşma dərəcəsi zərdabın titri hesab olunur.

Hemadsorbsiyanın ləngimə reaksiyası. Bəzi virusların toxuma kulturasında becərilməsi zamanı yoluxdurulmuş hüceyrələrin üst səthində eritrositlərin adsorbsiyası, onların üzərinə çökməsi görünür, tərkibində anticisim olan immun zərdab əlavə etdikdə hemadsorbsiya ləngiyir.

HALR-in köməyi ilə anticismi immun zərdabda titrləmək olar.

Passiv hemaqqlütinasiya reaksiyası (PHAR). PHAR immun zərdabın iştirakı ilə, virus antigenilə sensibilizə olunmuş eritrositlər antigen diaqnostikumu adlanır. Əksər virus infeksiyalarının diaqnostikasında PHAR-dan istifadə olunur.

Bu reaksiya da seroloji reaksiyalar kimi qoyulur. Eritrositlərin aqqlütinasiyasına səbəb olan zərdabın ən yüksək durulaşdırma dərəcəsi onun titri hesab olunur.

Əks passiv hemaqqlütinasiya reaksiyası. PHAR-dan fərqli olaraq bu reaksiyada eritrositlər antigenlə deyil, anticisimlə sensibilizə edilir. Belə eritrositlər (eritrositar immun qlobulin diaqnostikumu) antigen olan mühitdə aqqlütinasiya edilir. Bu reaksiya patoloji materiallarda virusların indikasiyası zamanı geniş miqyasda işlədilir. Eyni zamanda əks passiv hemaqqlütinasiya reaksiyasının ləngimə reaksiyası da (ƏKHARLR) mövcuddur ki, bundan da anticisimlərin titrlənməsində istifadə edilir.

Radial (passiv) hemoliz reaksiyası (RHR). Bu reaksiya virus antigeni ilə sensibilizə edilmiş eritrositlərin komplementin iştirakı ilə anticisimlərlə qarşılıqlı təsirindən baş verən lizis reaksiyasıdır. PHR-dan qrip, məxmərək, parotit, arbovirus infeksiyalarının diaqnostikasında istifadə olunur.

Reaksiyanın qoyulma texnikası. 1%-li eritrosit suspenziyası virus antigenilə işlənir, yuyulur və 42°C-ə qədər əridilmiş 1,3%-li gelə əlavə olunur (eyni zamanda oraya komplement əlavə olunur). Sonra şüşə lövhə üzərinə gel nazik qatla tökülür, bərkiyəndən sonra 2 mm diametrli dəliklər kəsilir ki, bunlara da 5 mkl əvvəlcədən 56°C-də qızdırılmış müayinə olunan zərđab əlavə olunur. Lövhələr 37°C temperaturda 18-20 saat saxlanılır. Anticisimlər gelə diffuz edərək eritrositlərin səthində antigenlə və komplementlə kompleks əmələ gətirir ki, bunun nəticəsində də eritrositlər əriyir, dəliklərin ətrafında diametri anticismin titrinə münasib olan şəffaf hemoliz əmələ gəlir.

Radio immunoloji metod (RİM). Bu üsul antigen və ya anticisimlərin radio izotoplarla nişanlanmasının tətbiqinə əsaslanır. Müayinə düz və dolayı yolla aparılır. Birinci halda nişanlanmış virus durulaşdırılmış antivirus zərđablarında saxlanılır və nəticədə anticisimlər çökür. İkinci halda radioaktiv izotopla nişanlanmış (J125) immun zərđabdan istifadə edilir. Anticismin titri çökdürülən nişanlanmış virusun miqdarı ilə ölçülür ki, bu da radioaktivliyi hesablamaqla təyin edilir.

Bu üsul HB_s-antigeni (virus hepatiti) gəzdiriciliyini aşkar etmək üçün tətbiq edilir.

Elektron və immun elektron mikroskopiya. Elektron mikroskopiya üsulu çiçək xəstəliyinin diaqnostikasında, qrip, paraqrip, hepatit, adenovirus və koronavirus xəstəliklərinin diferensial diaqnostikasında tətbiq olunur. İmmun zərđab virusları aqqlütinasiya edərək elektron mikroskopla asan aşkar edilə bilən iri aqreqatlar əmələ gətirir.

İmmun elektron mikroskopiya üsulu virusları ancaq morfologiyasına görə deyil, həm də eyni fəsilədən olan virusları antigen quruluşuna görə bir-birindən fərqləndirməyə imkan verir. Belə ki, immun zərđab yalnız uyğun virusu aqqlütinasiya edir.

Virusların identifikasiyası üçün istifadə olunan spesifik üsullardan biri də yuxarıda qeyd edilmiş immun flüoressensiya üsuludur.

Enzimlə nişanlanmış anticism reaksiyası prinsipə immun flüoressensiya reaksiyasına bənzəyir. Yalnız burada anticisimləri nişanlamaq üçün fermentlərdən istifadə olunur (əksərən peroksidaza və ya qələvi fosfataza). [Ümumi hissədə verilib].

Yuxarıda izahatı verilən üsullar vasitəsilə kəskin virus infeksiyalarına diaqnoz qoymaq olar. Xroniki, gizli və ləng keçən virus xəstəliklərinin diaqnostikası daha mürəkkəbdir. Belə hallarda virusu patoloji materialdan yalnız irəlicədən aktivləşdirməklə almaq olar. Anticisimlər gec əmələ gəldiyinə görə və bəzən də heç əmələ gəlmədiyinə görə seroloji üsullardan istifadə etmək mümkün olmur.

Bakteriofaqlar, alınması, titrlənməsi. Bakteriofaqlar (faqlar) bakteriyaların virusu olub, təbiətdə geniş yayılmışlar. Onlara çirkəb sularında, çirklənmiş su tutarların suyunda, torpaqda, insan və heyvan ifrazatında, müxtəlif həşəratların bağırsaqlarında, yara möhtəviyyatında, qanda, meyvə və tərəvəz məhsullarında və s. rast gəlmək olar.

Hər hansı bir obyektə bakteriya varsa, orada bakteriofaq da ola bilər. Çünki bakteriofaqlar yalnız onlara həssas olan bakteriyalarda (aktinomiset və yaşıllardan da) artıb çoxalır və onlardan ətraf mühitə yayılır. Deməli, bakteriofaq ona həssas olan bakteriyaların indikatoru hesab edilə bilər.

Bakteriofaqlar virulentli və mülayim qruplarına bölünür. Virulentli faqlar bakteriya hüceyrəsinə daxil olduqdan sonra, orada yeni faqların əmələ gəlməsinə (reproduksiyasına) və bakteriya hüceyrəsinin məhv olmasına səbəb olur.

Mülayim faqlar isə bakteriya hüceyrəsinə daxil olduqdan sonra hüceyrənin məhvini səbəb olmur. Bu zaman bakteriofağın DNT-si bakteriya xromosomlarında yerləşir və hüceyrənin bölünməsilə bölünərək qeyri-məhdud miqdarda nəsilən-nəslə ötürülür. Belə qeyri-infeksiyon vəziyyətdə qalan faq profaq adlanır. Xromosomlarında faq DNT-sini daşıyan bakteriyalara lizogen bakteriyalar, bu prosese isə lizogenizasiya deyilir.

Lizogen bakteriyalar təbiətdə geniş yayılmışlar. Bakteriyalar lizogen hala keçdikdə, onlarda əvvəllər mövcud olmayan müəyyən əlamətlər və xassələr meydana çıxır. Məsələn, difteriya korinobakteriyaları lizogen halında ekzotoksin ifraz edən (toksigen), bakteriofaq genomundan azad olduqda isə ekzotoksin ifraz etməyən (qeyri-toksigen) formada olur. Çünki bu bakteriyaların ekzotoksin ifrazını determinasiya edən gen (tox⁺ gen) faq genomunda yerləşir.

Bakteriofağın alınması. Müayinə edilən material (su, nəcis, yara möhtəviyyatı və s.) bakterial filtrlərdən keçirilir. Tədqiq olunan material bərk və ya yarımmaye halda olarsa, əvvəlcə o NaCl-un 0,85%-li məhlulunda suspenziyalaşdırılır və bundan sonra filtrdən süzülür. Alınmış filtratdan 1 ml götürülür və o, içərisində 1 ml sutkalıq kultura əkilmiş 30 ml ət-pepton bulyonu olan flakona tökülür (hansı bakteriyaların fağı əldə edilirsə həmin bakteriyadan tökülməlidir). 37°C-də 18-24 saat inkubasiya edildikdən sonra termostatdan götürülür. Bu zaman bulyonun şəffaf qalması orada bakteriofaqların inkişaf etdiyini göstərir. Onları təmiz halda (bakteriyalardan ayrı) əldə etmək üçün həmin bulyon termostatdan götürüldükdən sonra bakterial filtrlərdən süzülür və alınmış filtratda bakteriofağın titri təyin edilir.

Bakteriofağın titrini artırmaq üçün həmin filtratdan müvafiq bakteriyaların bulyon kulturasına əkilir və bu proses bakteriofağın titri istənilən miqdara çatana qədər təkrar edilir.

E.coli faqlarının keyfiyyət üsulu ilə təyin edilməsi. Petri kasasına tökülmüş ətli-peptonlu aqarın səthində E.colinin 18-24 saatlıq bulyon kulturası çox qalın əkilir. Bunun üçün aqarın bütün səthində bağırsaq çöplərinin bulyon kulturasında isladılmış tampon sürülür və qurmaq üçün 37°C temperaturda 10-15 dəq

termostatda saxlanılır. Sonra əkilmiş aqarın üzərinə bir damcı faq qoyulur və kasanı şaquli vəziyyətdə tutmaqla damcı kasanın o biri divarına qədər axıdılır. 37°C temperaturda termostatda 18-24 saat saxlandıqdan sonra nəticə yoxlanılır. Damcının axdığı yolun “steril” qalması, yəni bakteriyaların inkişaf etməməsi (lizisə uğramaları) burada E.coli faqının olduğunu sübut edir.

Bakteriofaqın aktivliyini bilmək üçün onu titrləyirlər, yəni faqın titri onun aktivliyi deməkdir. Bakteriofaqın titri Appelman və Qrasiya üsulları ilə təyin edilir.

Appelman üsulu ilə bakteriofaqın titrinin təyin edilməsi. Bu üsulla bakteriofaqı titrləmək üçün ştativə 12 sınaq şüşəsi qoyulur (10-u təcrübə, 2-si isə kontrol üçün) və onların hər birinə 4,5 ml ət-peptonlu bulyon tökülür. Birinci sınaq şüşəsinə tədqiq olunan faqdan (filtratdan) 0,5 ml əlavə olunur və yaxşı-yaxşı qarışdırılır. Sonra ondan 0,5 ml ikinci sınaq şüşəsinə, ikincidən 0,5 ml üçüncü sınaq şüşəsinə və s. keçirilir. 10-cu sınaq şüşəsindən isə 0,5 ml kənar edilir. Beləliklə, tədqiq olunan faq ardıcıl olaraq 1:10 (10^{-1}) nisbətindən 1:1000000000 (10^{-10}) nisbətinə kimi durulaşdırılır. Sonra hər bir sınaq şüşəsinə müvafiq bakteriyaların 18-24 saatlıq bulyon kulturasından 0,05ml tökülür. Bakteriya kulturasının təmizliyinə (içərisində faqın olub-olmamasına) və bakteriofaqın sterilliyinə nəzarət etmək məqsədilə 11-ci sınaq şüşəsindəki bulyona bakteriya, 12-ci sınaq şüşəsindəki bulyona isə yalnız bakteriofaq əlavə edilir. Bütün sınaq şüşələri 37°C temperaturda 18-24 saat saxlandıqdan sonra nəticə yoxlanılır. Tam lizis (şəffaflıq) müşahidə olunan ən axırıncı sınaq şüşəsindəki durulaşma dərəcəsi bakteriofaqın titri (aktivliyi) hesab olunur. Məsələn, 1-ci sınaq şüşəsindən 6-cı sınaq şüşəsinə kimi lizis, 7-ci sınaq şüşəsindən başlayaraq 10-cu sınaq şüşəsinə kimi bakteriyaların inkişaf etməsi (yəni bulanıqlıq) müşahidə olunarsa, onda bakteriofaqın titri 6-cı sınaq şüşəsinin durulaşma dərəcəsinə (10^{-6}) bərabərdir (cədvəl).

Cədvəl

Sınaq şüşələri	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Kontrol	
İnqredientlər, ml											aq 11	kultura 12
Ət-pepton bulyonu	4,5											
Tədqiq edilən faq	0,5	→									0,5	
NaCl-un 0,85%-li məh.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,5
Bakteriyaların bulyon kulturaları											-	0,05
Nəticə	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+

Şərti işarələr: + bakteriyaların bitməsi; - bakteriyaların bitməməsi.

Qrasiya üsulu ilə bakteriofaqın titrinin təyin edilməsi. Petri kasalarına 25-30ml 1,5%-li ətli-peptonlu aqar tökülür və termostatda 10-15dəq müddətində qurudulur.

Titri təyin ediləcək faq NaCl-un izotonik məhlulunda və ya bulyonda 10 qat (10^{-7} - 10^{-10}) durulaşdırılır. Sınaq şüşələrinə 2,5ml miqdarında əridilmiş yarımmayə (0,7%-li) aqar tökülür.

Onun üzərinə 0,5-1ml faqın müvafiq durulaşmalarından (10^{-5} - 10^{-6} - 10^{-7} və s.) əlavə edilir. Sonra onların üzərinə 0,1ml həmin faqa həssas olan bakteriyaların 1 günlük bulyon kulturası əlavə edilir. Yaxşı-yaxşı qarışdırıldıqdan sonra sınaq şüşəsindəki qarışıq Petri kasasındakı aqarın üstünə tökülür və bərabər səviyyədə yayılır. Qarışıqın Petri kasasındakı aqarın səthində nazik lövhə (lay) şəklində bərkiməsi üçün kasalar otaq temperaturunda 30dəq sakitcə saxlanılır. Sonra 37°C temperaturda termostatda 18-24saat inkubasiya edilir. Bu zaman faqla yoluxmayan bakteriyalar çoxalaraq aqarın səthini ərp şəklində örtür. Faqla yoluxan hər bir bakteriyadan isə yüzlərlə yeni faq əmələ gəlir və bakteriyalar məhv olur. Əmələ gəlmiş faqlar yeni bakteriyalara daxil olur və bu proses yenidən təkrar olunur. Nəticədə bakteriofaqların inkişafı ilə bərabər, bakteriyaların lizisi gedir. Bu zaman aqarın səthində neqativ faq koloniyalarının, yəni “steril” nöqtəvari ləkələrin əmələ gəlməsi müşahidə olunur. Bu ləkələrin miqdarı əkilmiş materialdakı faqların miqdarına uyğun gəlir. Tədqiq edilən faqın titrini hesablamaq üçün əmələ gəlmiş neqativ koloniyaların miqdarını faqın durulaşma dərəcəsinə vurmaq lazımdır. Məsələn, 10^{-7} -yə qədər durulaşdırılmış 1ml faq aqar laylarında 25 neqativ koloniya (“steril” ləkələr) əmələ gətirmişdir. Onda faqın titri $25 \times 10^{-7} = 2,5 \times 10^{-8}$ olar.

Bakteriofaqların tətbiqi. Bakteriofaqlar bir sıra yoluxucu xəstəliklərin diaqnostikasında, müalicə və profilaktikasında tətbiq edilir. Bakteriofaqlar vasitəsilə bakteriyaları faqotiplərə ayırmaq (faqotipi təyin etmək), yəni eyni bir növə məxsus olan bakteriyaların müxtəlif ştammlarının eyni və yaxud müxtəlif mənşəyə malik olmalarını aşkar etmək mümkündür. Bu üsul yoluxma mənbələrini müəyyən etməyə imkan verir ki, bu da böyük epidemioloji əhəmiyyət kəsb edir. Faq vasitəsilə bir sıra xəstəliklərin, xüsusilə bağırsaq infeksiyalarının diaqnozunu qoymaq olar. Məsələn, dizenteriyalı xəstənin nəcisindən dizenteriya bakteriofağı alınarsa, bu, həmin xəstənin bağırsaqlarında dizenteriya törədicilərinin olmasını dolayı yolla isbat edir.

Bir sıra yoluxucu xəstəliklərin, xüsusilə, bağırsaq infeksiyalarının faqoprofilaktikası və faqoterapiyası antibiotiklər kəşf edilməmişdən əvvəl geniş yayılmışdı. Lakin antibiotiklərin və bir sıra kimyəvi terapevtik preparatların kəşfi və infeksiyon xəstəliklərin müalicəsində geniş tətbiqi faqoprofilaktika və faqoterapiyanı bir qədər arxa plana çəkmişdir.

