

MÖVZU 22

**XÜSUSİ VIRUSOLOGİYAYA GİRİŞ.
VİRUS İNFEKSİYALARININ
DİAQNOSTİKA
ÜSULLARI.VIRUSLARIN
İNDİKASİYA VƏ İDENTİFİKASİYA
ÜSULLARI**

Metodik istiqamətlər

- Virus və onun komponentlərinin birbaşa xəstədən götürülmüş kliniki materialda aşkar edilməsi (təcili diaqnostika).
- Kliniki materialda virusun alınması və onun identifikasiyası.
- Virus infeksiyalarının serodiaqnostikası

Laborator diaqnostika üsulunun seçilməsi asılıdır:

- Xəstəliyin xarakterindən
- Güman edilən törədicidən
- Xəstəliyin dövründən

Virus xəstəliklərinin laborator diaqnostika üsulları

I.. Virusoloji üsul (Ag)

1.virusun aşkar edilməsi

Yaxmaların mikroskopiyası

- a. Işıq mikroskopu
- b. Lüminessent
- c. Elektron

- **indikasiya – HAR**

2. Virusun alınması

- a.Laboratoa heyvanlar
- b.Toyuq embrionu
- c. hüceyrə kulturası

3. Virusun identifikasiyası, tipləndirilməsi və differensiasiyası

Diaqnostik immun zərdablarla seroloji reaksiyalar: NR, HALR, PR,İFA, İFR,və s.

II. Seroloji üsul (Ac)

Məlum antigenlərlə seroloji reaksiyalar: NR, HALR, PR,İFA, İFR,və s.

MIKROSKOPİYA: Işıq mikroskopu

- Virusla yoluxmuş hüceyrələrdə əlavələrin aşkar edilməsi

Virusla yoluxmuş hüceyrələr

SP-da yaranan əlavələr:

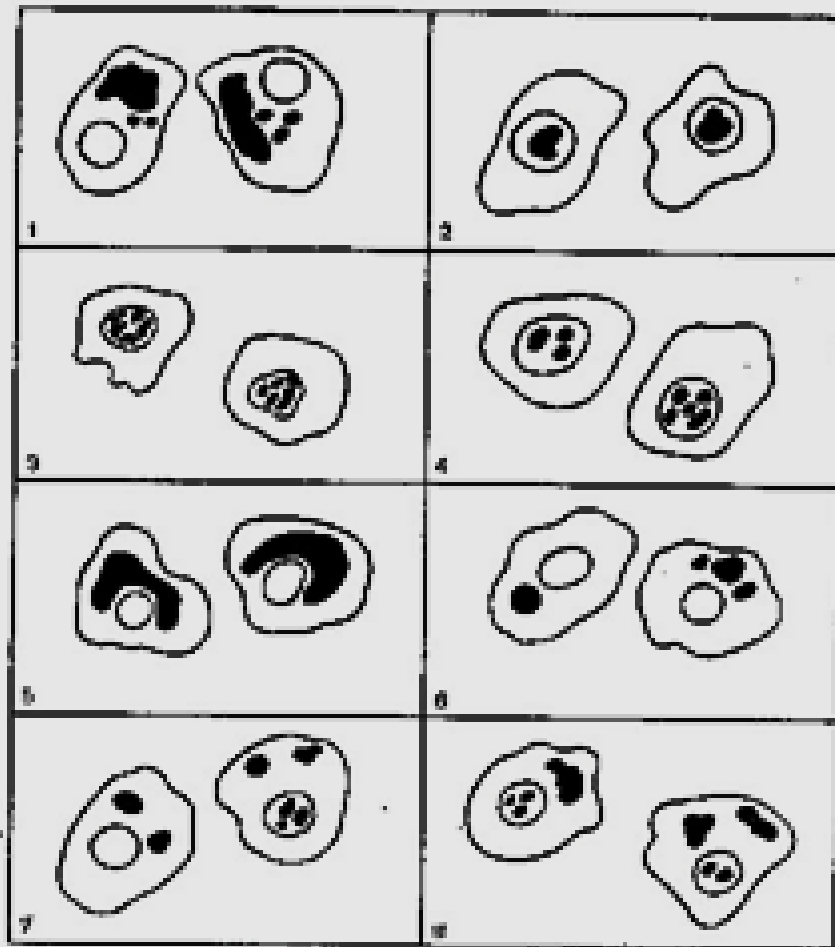
1. təbii çiçək (Qvarnieri cisimcikləri)
5. Reoviruslar
6. Quduzluq (Babes-Negri cisimikləri)

Nüvədə yaranmış əlavələr:

2. Herpes (Kaudri cisimcikləri)
3. Adenoviruslar
4. Papovavirus SV40

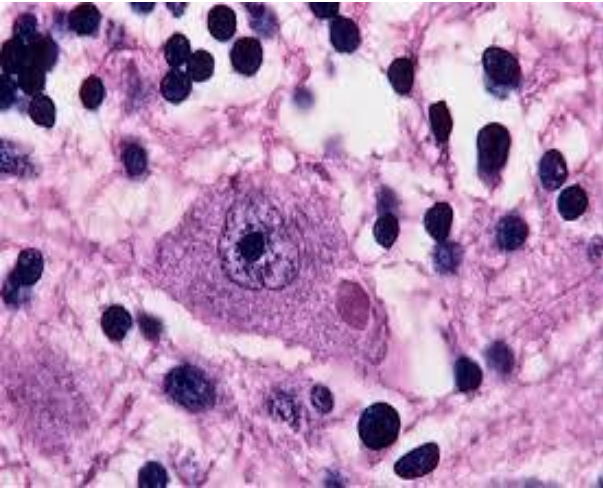
Nüvədə və SP-da yaranan əlavələr:

7. Qrip
8. Qızılça

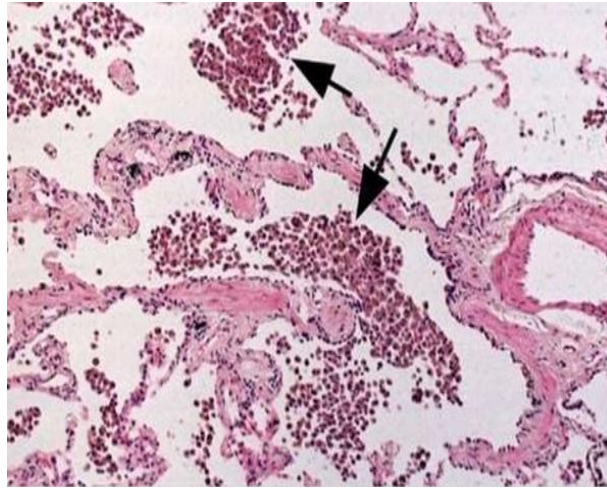


Əlavələr qara rəngdədir

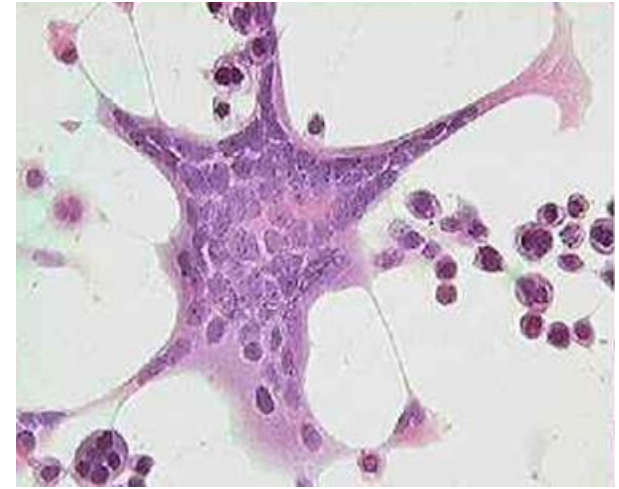
Virusla yoluxmuş hüceyrələr ışık mikroskopunda



Babeş-Neqri cisimciyi
Quduzluqdan ölmüş
xəstənin beyincik
qabığından hazırlanmış
kəsikdə hüceyrədaxili
virus əlavələr

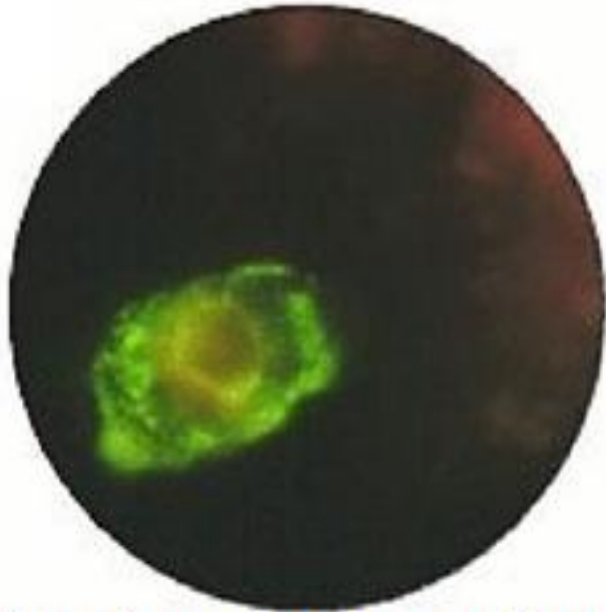


Paşen cisimcikləri
Təbii çiçək xəstələrinin
buynuzlaşmış epidermis
hüceyrələrində virus
hissəcikləri

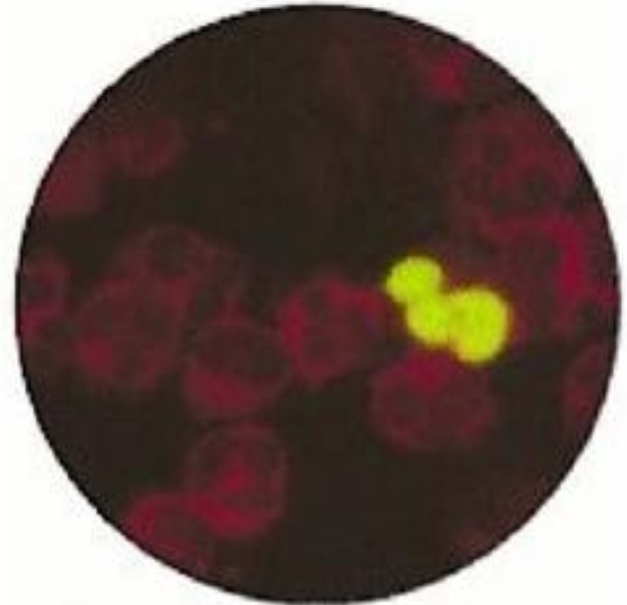


Sadə herpes virusun
sitopatik təsiri

Virusla yoluxmuş hüceyrələr lüminessent mikroskopunda

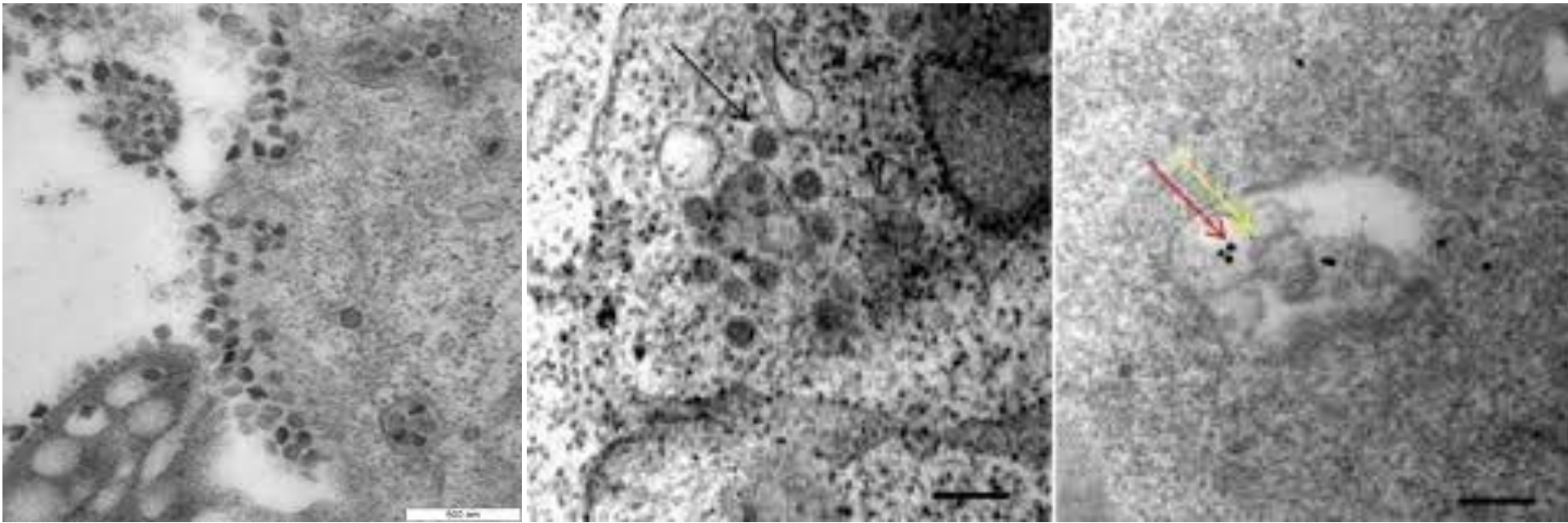


Virusla yoluxmuş epitel
hüceyrəsi (HSV)



Periferik qan
neytrofillərində SMV
(pp65antigen)

Virusla yoluxmuş hüceyrələr elektron mikroskopunda

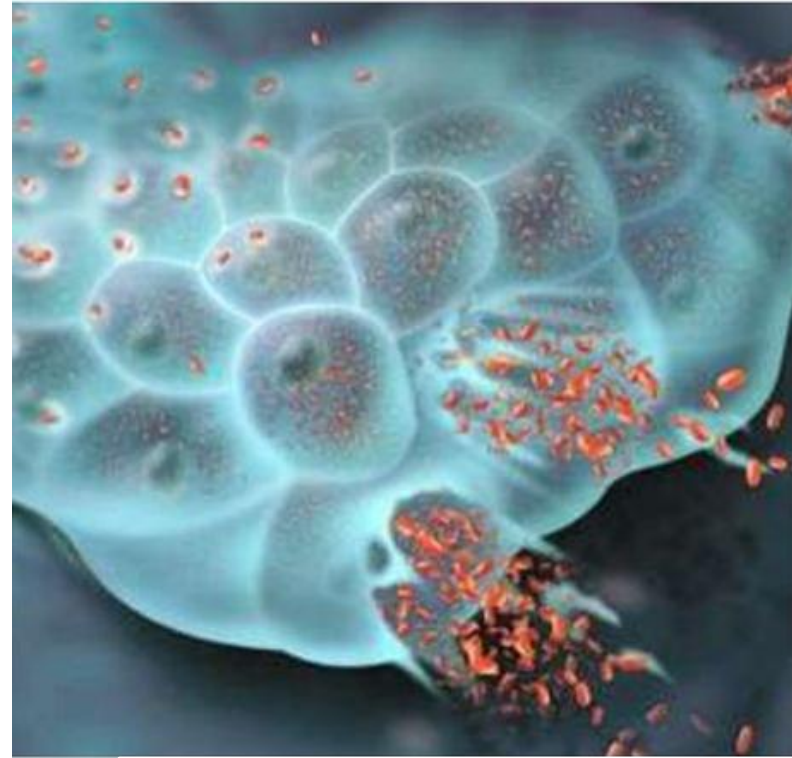


Koronaviruslar

2. Virusoloji üsul

Etaplar:

- **Virusların kultivasiyası**
- **Virusların indikasiyası (indikasiya)**
- **Virusların tipləndirilməsi (identifikasiya)**



Ölməkdə olan hüceyrədən
virusların xaric olması

Virusların heyvan orqanizmində kultivasiyası

- **Məhdudiyyət:** münasib üsul mümkün olmadıqda tətbiq edilir.
- **Yoluxdurulma:** əsasən südəmə hər heyvanlar (ağ siçanlar, siçovul, dovşan, dəniz donuzları, dağ siçanları, meymunlar).
- **Heyvanın seçilməsi:** virusa həssas olan heyvan növü.
- **Yoluxdurulma üsulu:** sitotropizmə görə (**neyrotrop** (quduzluq və s.) – intraserebral yoluxdurma; **respirator** (qrip) – intranazal yoluxdurma; **dermatotrop** (herpes) – dəriyə yoluxdurma).

VİRUSUN İNDUKASIYASI:

- Heyvanın xəstələnməsi
- Heyvanın ölümü. (ilkin yoluxdurulma zamanı heyvan xəstələnməyə bilər, ona görə də 5-7-gündən sonra heyvan öldürülür, onların orqanlarından suspenziya hazırlayaraq digər heyvanı yoluxdururlar («passaj»)).
- Toxuma və orqanlarda patomorfoloji və patohistoloji dəyişikliklər
- Orqan ekstraktlarından HAR

VİRUSUN IDENTİFİKASIYASI: virus NR

Toyuq emrionunun yoluxdurulması

5-7 günlük, bəzən 10-12 günlük embrion götürülür.

ƏSAS YOLUXDURMA ÜSULLAR:

- Xorion-allantois qışa
- Xorion-allantois boşluq
- Sarılıq kisəsi
- Amnion boşluğu
- Embrionun özü

İNDİKASIYA:

- Embrionun ölümü
- Embrionda Ğ/qışalarda morfoloji dəyişikliklər
- Boşluqlardan götürülmüş mayelərlə HAR

İDENTİFİKASIYA:

- NR (HALR)
- KBR

Способы заражения куриных эмбрионов CHICKEN EMBRIO INOCULATION



Продольный разрез 10-дневного эмбриона LONGITUDINAL SECTION OF 10-DAY-OLD EMBRYO



Hüceyrə kulturaları

1. HAZIRLANMA TEXNIKASINA GÖRƏ:

- **Birqatlı** kimyəvi neytral laborator qabların səthinə yapışır və bir qatlı şəkildə şoxalır.
- **Suspension** – qidalı mühitdə daimi qarışdırmaqla çoxalırlar
- **Toxuma** – orqanizmdən kənar öz strukturunu qoruyan orqan və toxuma hissələri

2. MƏNŞƏYİNƏ GÖRƏ:

- Embrional
- Şiş
- Yetkin orqanizmlər

3. MORFOHENEZİNƏ GÖRƏ:

- Fibroblast
- Epitelial

GENERASIYA SAYINA GÖRƏ:

- İlk (tripsinləşdirilmiş)
- Köçürülən (stabil)
- Yarım köçürülən

Hüceyrə kulturaları üçün neytral laborator qablar və qidalı mühitlər



Hüceyrə kulturaları üçün qidalı mühitlər

- Bu mühitlərin tərkibində amin turşuların, vitaminlərin, boy amillərinin tam dəsti mövcuddur.
- Quru mühitlər və ayrı-ayrı komponentlərlə yanaşı hazır maye mühitlər (199, lql, laktalbumin hidrolizat, quru mühitlər və konsentratlar) da istehsal edilir.
- Kultural mühitlər inkişaf və konservasiya mühitlərinə ayrılır. Hüceyrə kulturalarının kultivasiyası üçün heyvan və insan zərdabı (məsələn, öküz zərdabı, fetal inək zərdabı və s.) ilə zənginləşdirilmiş *inkişaf mühitləri* tətbiq edilir. Qidalı mühitdə zərdabların miqdarı adətən 2-30% təşkil edir, hüceyrə kulturasının xüsusiyyətlərindən və mühitin tərkibindən asılıdır.

Hüceyrə kulturaları üçün qidalı mühitlər

Mühitlərə fenol qırmızı indikator əlavə edir, turş mühitdə o, narıncı-sarı, qələvi mühitdə isə moruğu (tünd qırmızı) rəngdə olur.



qidalı mühitlər - tərkibində kultivasiya olunan hüceyrələr tərəfinindən sintez olunmayan maddələr (aminturşular, vitaminlər, həll olan qazlar, qeyri-üzvi ionlar və enerji mənbələri)

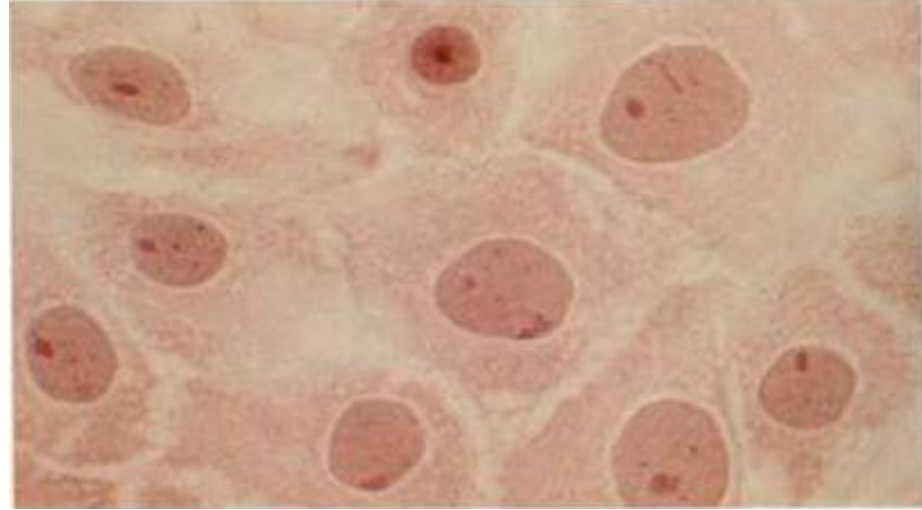
1. **İql mühiti(MEM)**
2. **199 (1950, Morqan, Mortan və Parker)**
3. **DMEM**
4. **RPMi-1640**
5. **F-12, Xem-F-12**



Viroloji praktikada hüceyrə kulturalarının
aşağıdakı növləri istifadə olunur:

1. İlkin hüceyrə kulturaları
2. Köçürülən (stabil) hüceyrə kulturaları
3. Yarımköçürülən (diploid) hüceyrə kulturaları

1. İlkin hüceyrə kulturaları



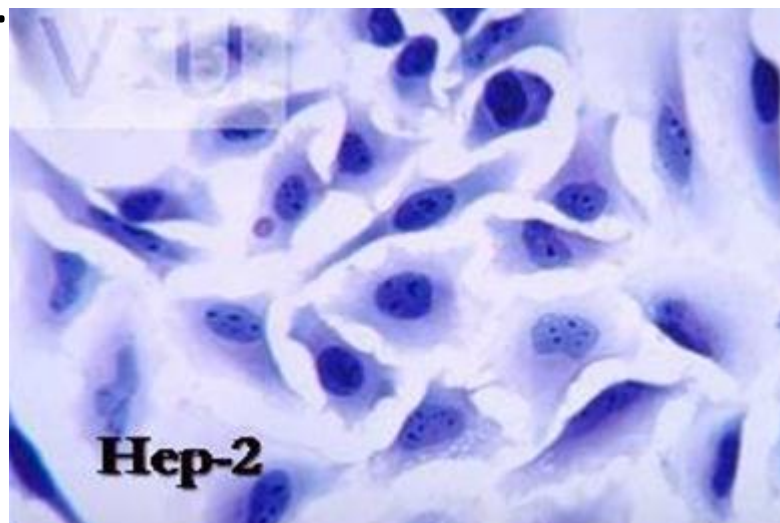
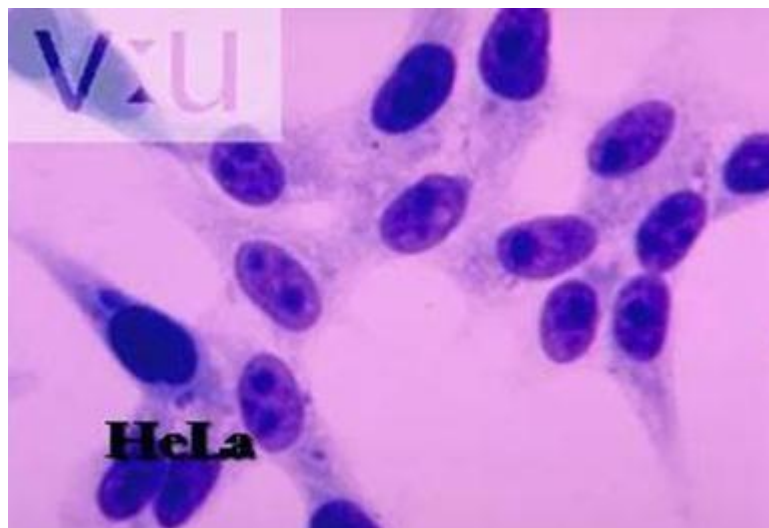
- İlkin hüceyrə kulturaları birbaşa canlı orqanizmdən alınan hüceyrə kulturalarıdır.
- İlkin kulturalar formalaşmış, *yüksək differensasiyalı* hüceyrələrdən alındığına görə, onların bölünmə və çoxalma qabiliyyəti məhduddur, onları ancaq 5-10 dəfə passaj etmək (köçürmək) mümkündür.
- İlkin kultura insan və heyvan embrionunun müxtəlif orqan və toxumalarından əldə etmək mümkündür (çünki embrion hüceyrələri daha yaxşı böyüyür və çoxalır).
- İlkin kulturalara insan embrionunun fibroblastları (İEF) və toyuq fibroblastları (TF), insanın böyrək hüceyrələri (İBH) və s. aiddir.

2. Köçürülən (stabil) hüceyrə kulturaları

- Köçürülən (fasiləsiz və ya stabil və ya davamlı) hüceyrə kulturaları qeyri-müəyyən müddətə orqanizmdən kənarda çoxalmağa qadir olan hüceyrələrdir.
- Laboratoriyalarda, qida mühitinin dəyişdirilməsi şərtilə, bir qabdan digərinə köçürmə ilə saxlanılır.
- Kultura hüceyrələri eyni formaya, heteroploid xromosom dəstinə malikdir.
- İn vitro inkişaf şəraitində sabitdir.
- Bəziləri onkogen aktivliyə malikdir.
- Onkogen aktivliyə malik olduğu üçün onların vaksinlərin istehsalında istifadəsi məhdudlaşdırılır.
- Köçürülən hüceyrələr həm heyvanların, həm də insanların sağlam və şiş toxumalarından əldə edilə bilər.

Köçürülən hüceyrə kulturaları

- ☐ HeLa (1951-ci ildən) uşaqlıq boynu xərçəngi
- ☐ BHK-21 (baby hamster kidney; yeni doğulmuş hamsterin böyrəyi);
- ☐ PPT (köçürülmüş dana böyrəyi);
- ☐ PPO (köçürülmüş qoyun böyrəyi);
- ☐ Hep-2 (insanın qırtlaq xərçəngi);
- ☐ Hep -3 (insan limfoid karsinoması) və s.
- ☐ Detroyt-6 (ağciyər xərçənginin sümük ilyinə vermiş metastaz)
- ☐ RH (insan böyrəyi xərçəngi)
- ☐ McCoy (insan sinovial hüceyrələr)



3. Yarımköçürülən (diploid) hüceyrə kulturaları

- Yarımköçürülən hüceyrə kulturaları olan hüceyrələrin 75%-i eyni karyotipə malikdir.
- Diploid kulturalar köçürülən kulturalardan ikiqat (düzgün) xromosom dəstinə malik olması ilə fərqlənir.
- İlk 50-60 Köçürmədə (passajda) belə kulturalar diploid statusunu saxlaya bilir.
- Nəzəri və praktiki problemlərinin həlli üçün geniş istifadə olunur (insanlar üçün bioloji preparatların hazırlanması, onkovirusların təcrid edilməsi və s.).
- Yarımköçürülən hüceyrələr kifayət qədər həyat qabiliyyətinə malikdirlər.
- Yarımköçürülən hüceyrələr morfoloji dəyişikliklərə məruz qalmır, spontan virus daşıyıcılığına malik deyil və s.
- Hüceyrələrin diploid kulturasını əldə etmək üçün insan və heyvanın embrional toxumasından alınmış fibroblast hüceyrələrdən istifadə edirlər.
- WI-38 (insan embrionunun ağciyər hüceyrələri), HL-8 (meymun embrionu hüceyrəsi) kulturaları və s.

Hüceyrə kulturlarının istifadəsi

1. Virus və hüceyrə arasındakı qarşılıqlı münasibətlərin xüsusiyyətlərinin öyrənilməsi
 2. Diagnostika – virusologiyada qızıl standart.
 3. Virus infeksiyalarının profilaktikası üçün preparatların istehsalı.
- Hüceyrə kulturlarının istifadə etmək üçün seçilməsi ayrı-ayrı virusların həssaslığına görə müəyyən edilir.
 - Müayinə materialında (hüceyrə kulturası və s.) virusun inkişafı (olması) **indikasiya** və **identifikasiya** üsullarından istifadə etməklə müəyyən edilir.

Вирусларын индикасийасы

Тойуг эмбрионларыда –
хорионаллонтоис
гишасында некроз
сациялари, эмбрионун
юлцмц, амнион вя
аллантоис майеляри иля
щемагглицтина сий
реаксийасы

Toxuma kulturalarında
sitopatik təsir(CИТ),
hüceyrədaxili əlavələr, neqativ
koloniyalar, hemadsorbsiya
reaksiyası, rəng sınağı

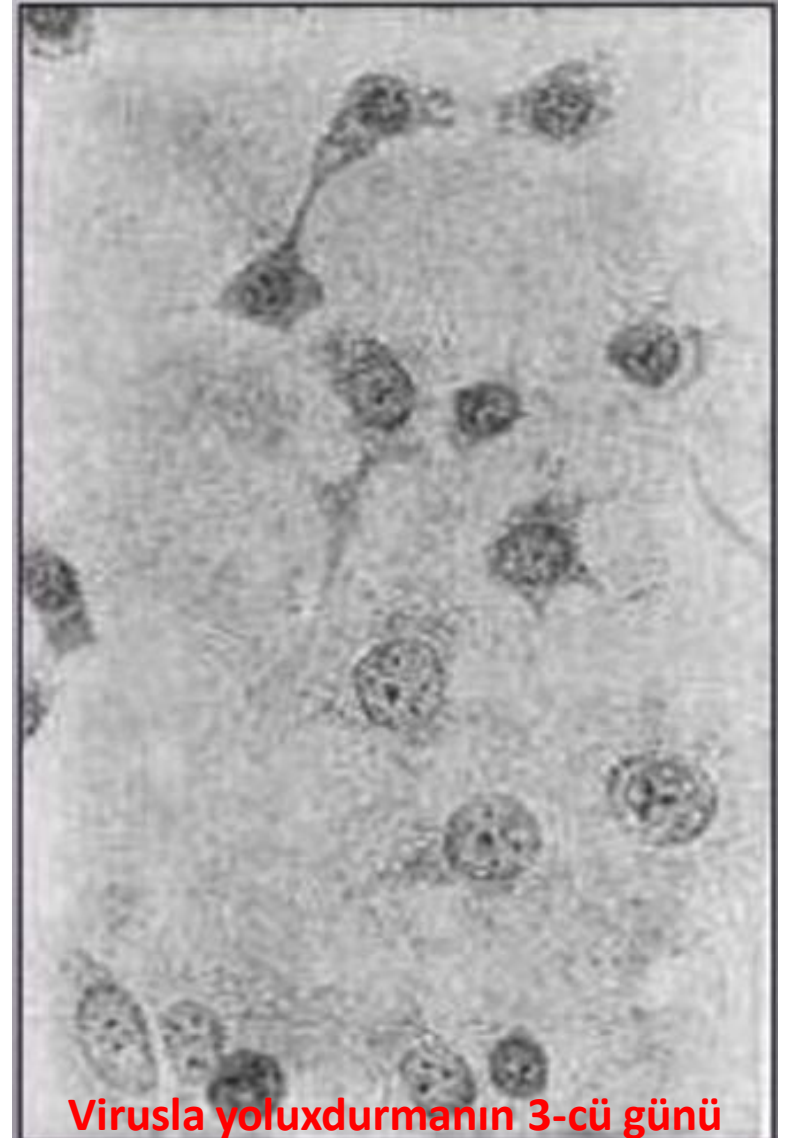
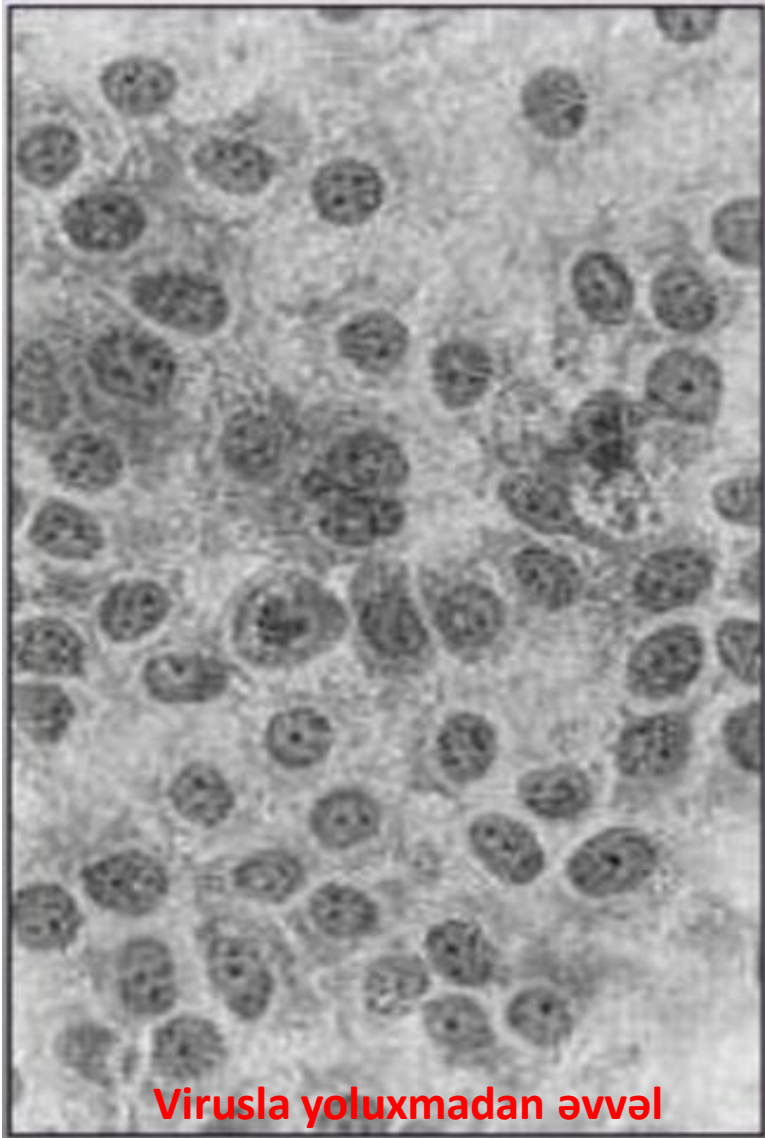
Лаборатор
щейванларын
организминдя
щейванларын
хястялянмяси
юлцмц –
вя

*İndikasiya
əlamətləri*

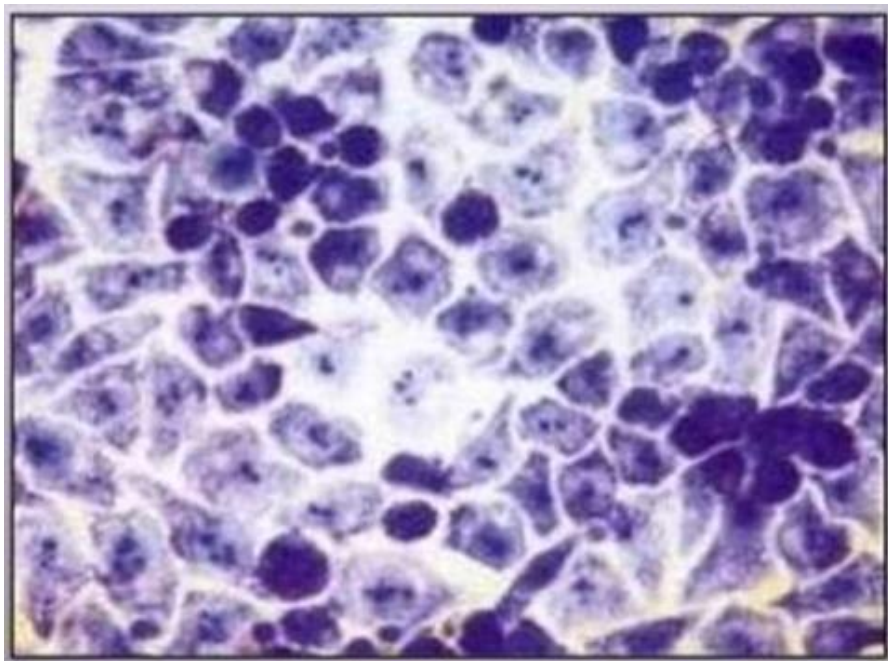
Virusların indikasiyası

- Virusların indikasiyası - yəni virusların bioloji xüsusiyyətlərinin və onların həssas hüceyrələrlə qarşılıqlı əlaqəsinin xüsusiyyətlərinin müəyyən edilməsinə əsaslanan infeksiya faktının qeyri-spesifik aşkarlanmasıdır.
- Aşağıdakı fenomenlər əsasında aparılır:
 - Virusların sitopatik təsirləri (SPT).
 - Hüceyrədaxili əlavələrin yaranması.
 - Piləklərin əmələ gəlməsi.
 - Solkun rəng sınağı.
 - Hemadsorbsiya.

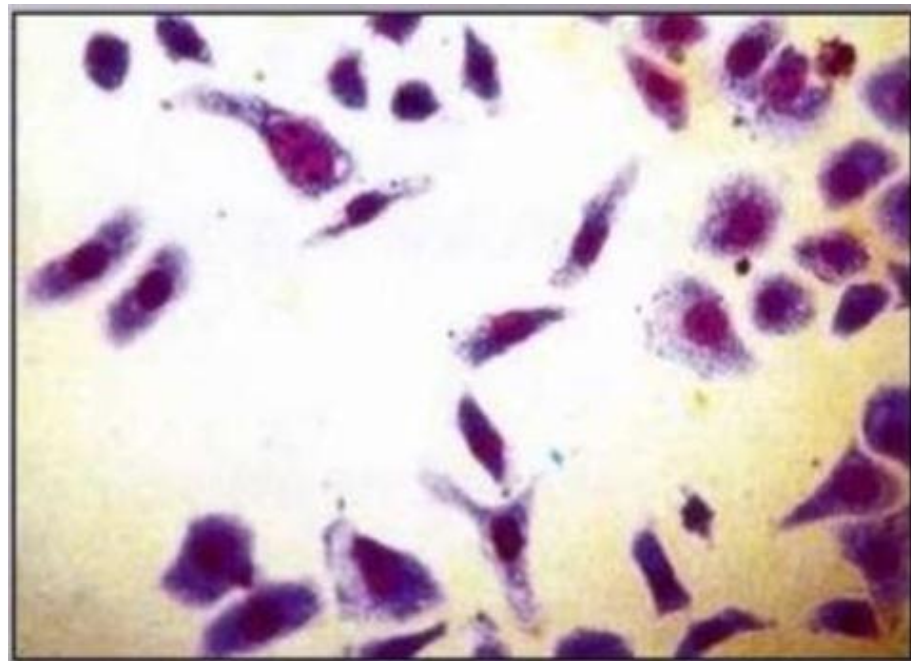
HeLa hüceyrə kulturasında SPT



Her-2 hüceyrə kulturasında SPT

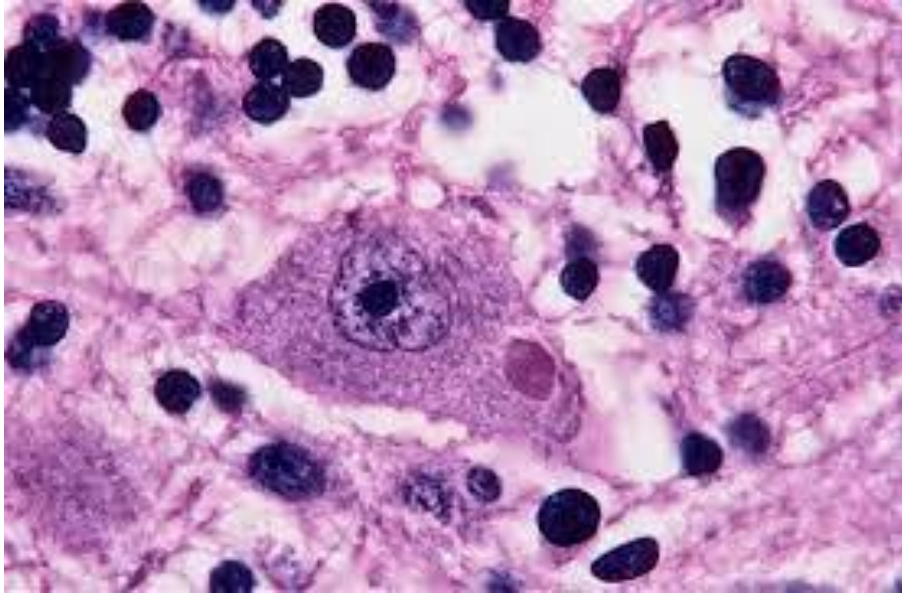


Virusla yoluxmadan əvvəl

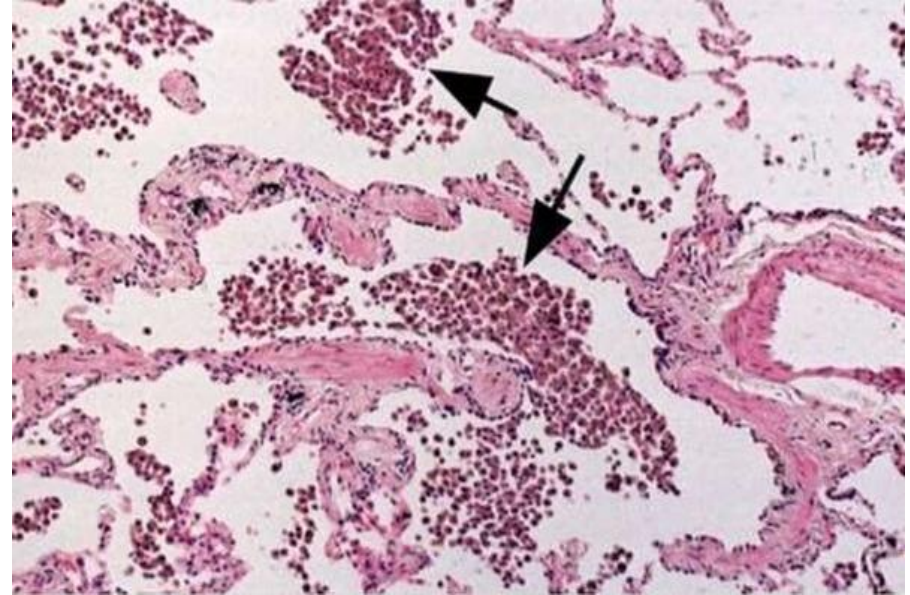


Virusla yoluxdurmanın 3-cü günü

Hüceyrədaxili əlavələrin yaranması



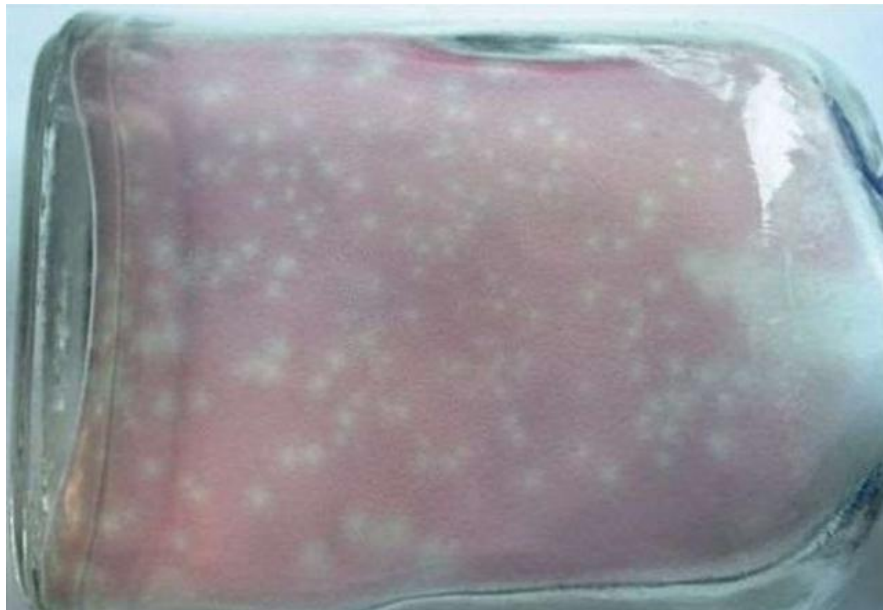
Babeş-Neqri cisimciyi



Paşen cisimcikləri

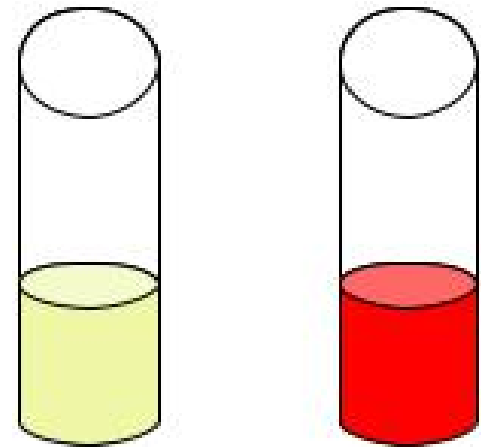
«Piləklər» və ya «Neqativ» koloniyalar

- Hüceyrə kulturlarında bəzi virusların inkişafı müvafiq nahiyyədə hüceyrələrin məhvi ilə nəticələnir ki, bu sahələri («*neqativ koloniyaları*») aşkar etməklə virusları indikasiya etmək mümkündür.
- Hüceyrə kulturasını yoluxdurduqdan sonra onun üzərinə aqar təbəqəsinin əlavə edilməsi virusların reproduksiya ocaqlarını məhdudlaşdırır.
- Nəticədə onların əmələ gətirdikləri nekroz ocaqları bir-birindən təcrid olunmuş şəkildə təzahür edir.



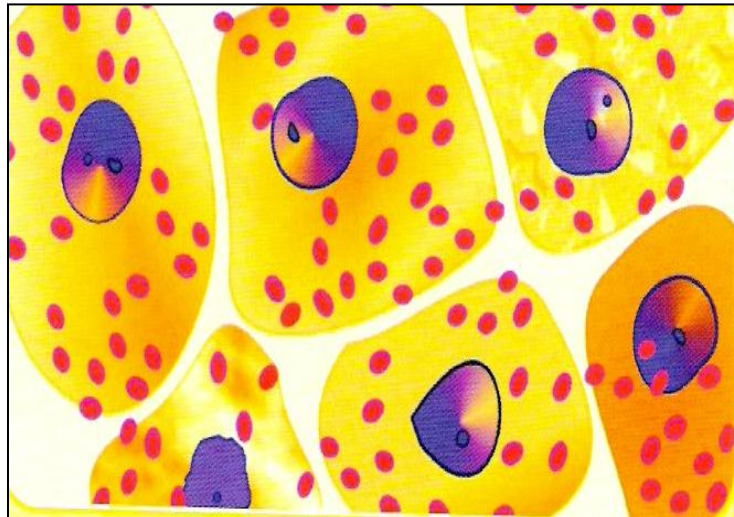
«Rəng sınağı»

- Hüceyrə kulturalarında virusların inkişafını «**rəng sınağı**» vasitəsilə indikasiya etmək olar. Bunun üçün indiqatorlu (məsələn, metil qırmızısı) qidalı mühitdə kultivasiya edilən hüceyrə kulturasından istifadə edilir.
- Virus inkişaf edərkən hüceyrələr məhv olur, ona görə də mühitin ilkin rəngi dəyişməz qalır.
- Virus inkişaf etmədiyi təqdirdə hüceyrələrin metabolitik məhsullarının təsiri nəticəsində mühitin rənginin dəyişməsi müşahidə olunur.

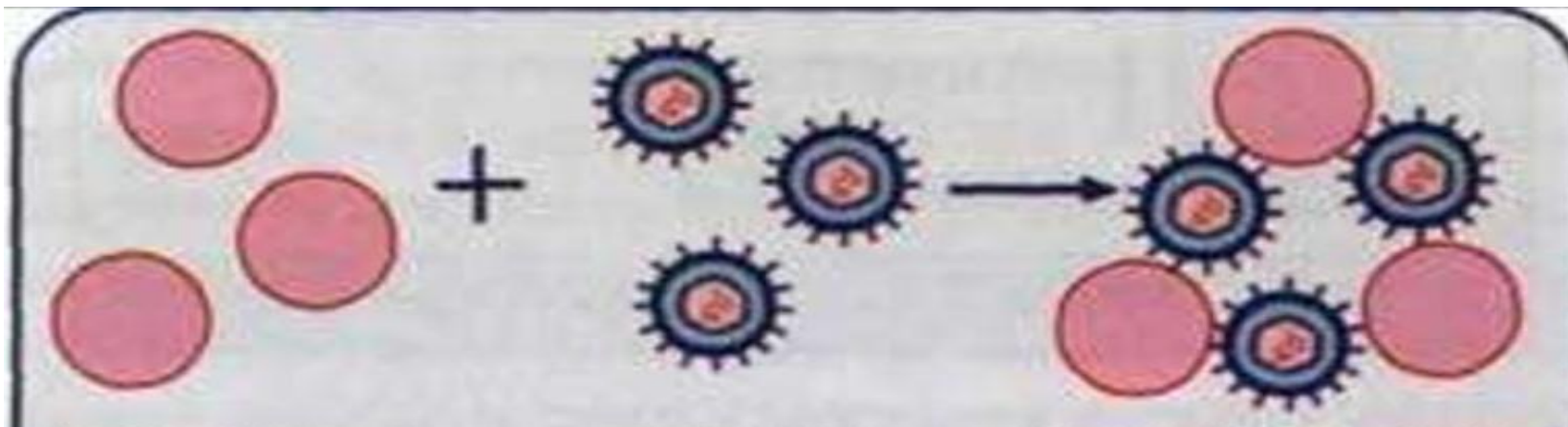


Hemadsorbsiya fenomeni

- Hüceyrə kulturlarında virusların indikasiyasının daha bir üsulu **hemadsorbsiya** fenomenidir. Bəzi virusların çoxaldığı hüceyrələr müəyyən eritrositləri öz səthlərinə yapışdırır. Buna səbəb həmin virusların (paramiksoviruslar, ortomiksoviruslar və s.) səthində hemaqqlütininlərin olmasıdır.
- Viruslar daxilində çoxaldığı hüceyrələrin səthinə çıxaraq eritrositlərlə birləşir, nəticədə hemadsorbsiya fenomeni baş verir. Beləliklə, bu fenomen hemaqqlütinasiya reaksiyasının bir variantıdır.



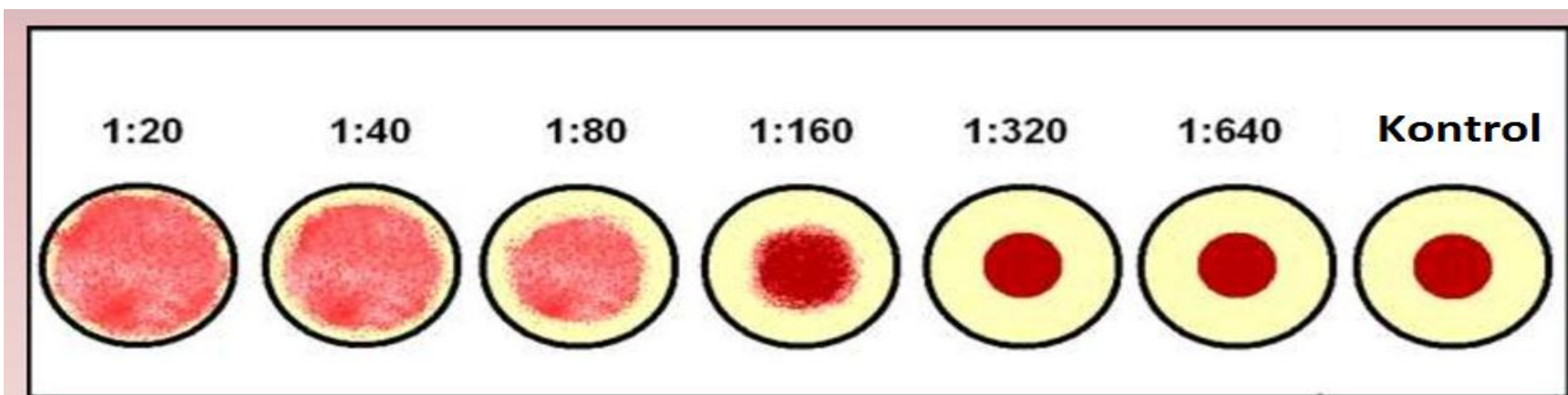
Hemaqqlütinasiya reaksiyası



Eritrositlər

Virus

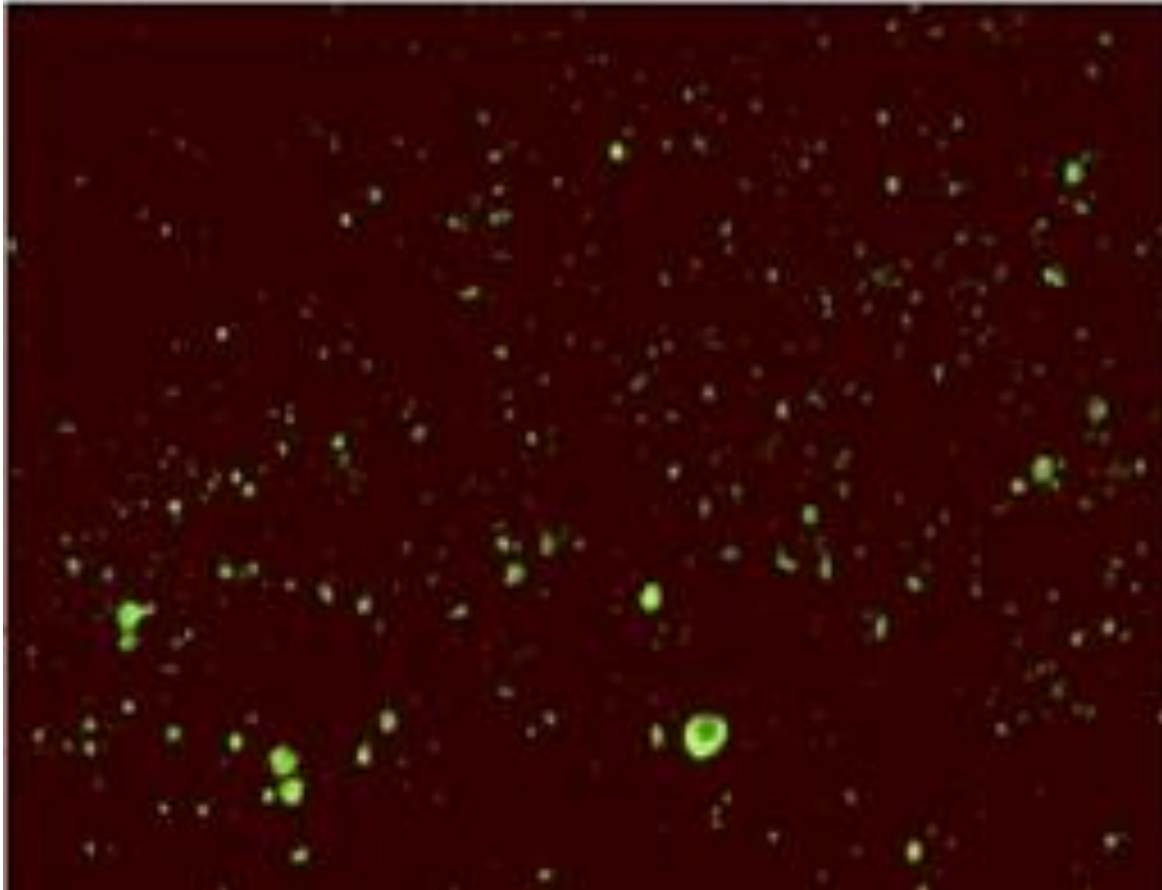
Hemaqqlütinasiya



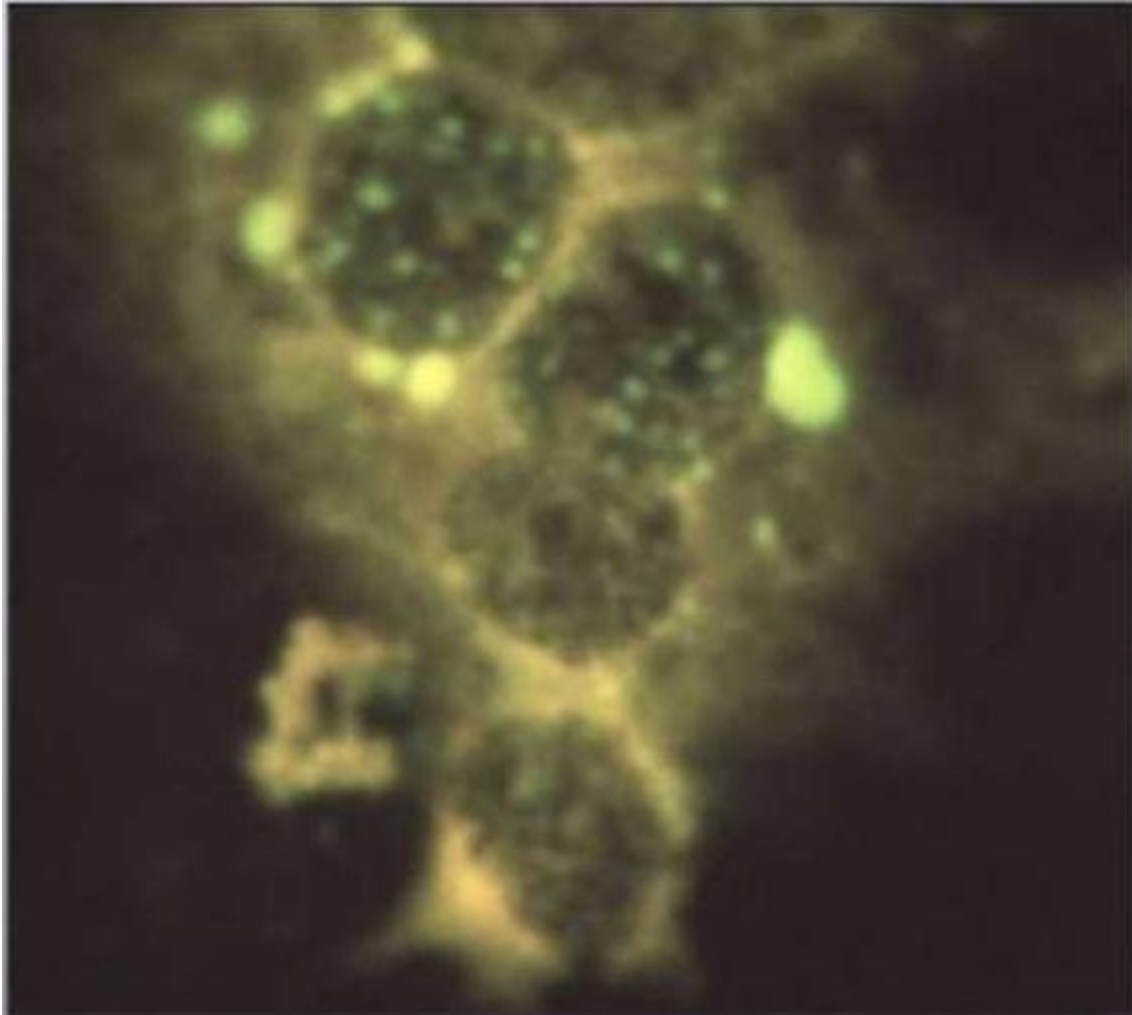
İnterferensiya fenomeni

- Bəzi hallarda, xüsusən kultivasiya edilərkən SPT törətməyən virusları indikasiya etmək üçün ***interferensiya fenomenindən*** istifadə edilir. Interferensiyanın mahiyyəti ondan ibarətdir ki, bir növ virusla yoluxmuş hüceyrə digər viruslara qarşı rezistent olur.
- Məsələn, məxmərək virusu müxtəlif hüceyrə kulturalarında kultivasiya olunmasına baxmayaraq SPT törətmir. İlk toxuma kulturalarında bu virusu interferensiya fenomeninə görə aşkar etmək olur.
- Bunun üçün məxmərək virusu ilə yoluxdurulmuş hüceyrə kulturası SPT əmələ gətirən indikator virusla, məsələn, vezikulyar stomatit virusu ilə də yoluxdurulur. Məxmərək virusunun hüceyrə kulturasında çoxalması indikator virusun replikasiyasına mane olduğundan SPT müşahidə edilmir. Lakin məxmərək virusu hüceyrə kulturasında inkişaf etmədikdə indikator virus çoxalmağa başlayır və bu, SPT ilə təzahür edir

İmmunofüoresensiya reaksiyası (İFR)



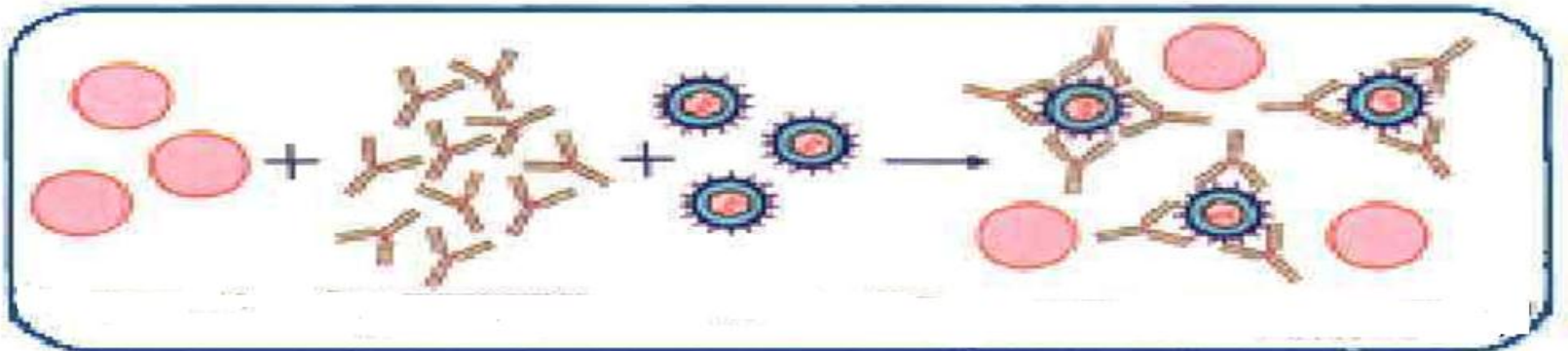
Qızılşa virusu ilə yoluxmuş insan amnionunun hüceyrə kulturası (İFR)



Virusların identifikasiyası

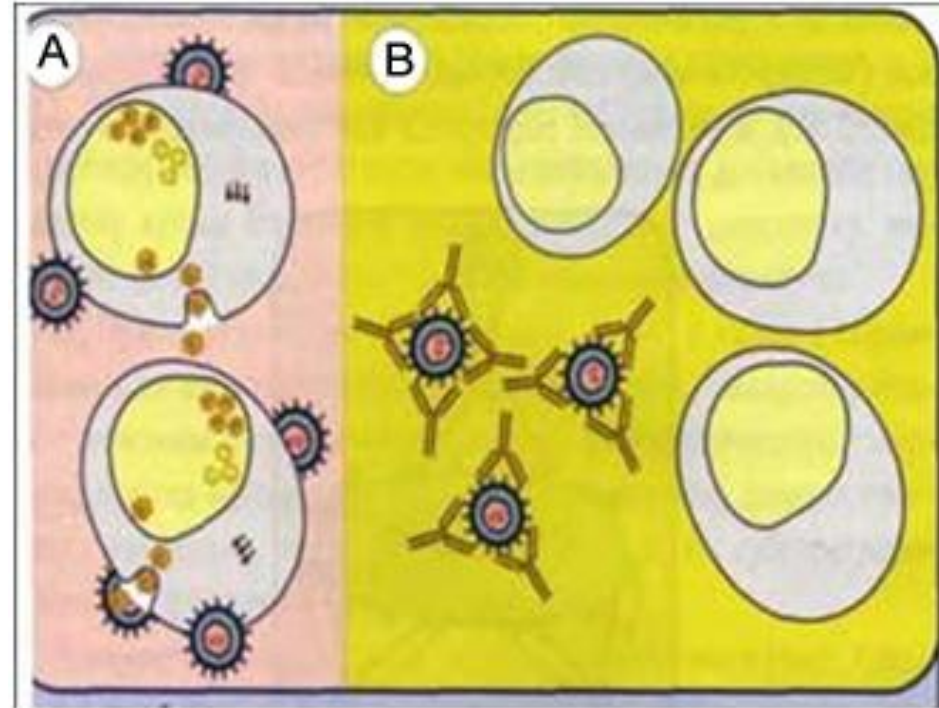
Hemaqqlütinasiyanın ləngimə reaksiyası

- Bu reaksiyadan bəzi virusların (qrip, qızılca, gənə ensefaliti və s.) identifikasiyasında istifadə edilir.
- Müayinə edilən materialdakı virusların növünü təyin etmək üçün onun üzərinə tərkibində müəyyən viruslara qarşı spesifik anticisimlər olan zərdablar əlavə edilir.
- Materialda müvafiq virus olduğu təqdirdə anticisimlərinin təsirindən onlar eritrositləri aqqlütinasiya etdirmək qabiliyyətini itirir və reaksiyanın titri əhəmiyyətli dərəcədə azalır.



Virusların identifikasiyası

- **Virusların neytrallaşma reaksiyası** (bioloji neytrallaşma reaksiyası) virusları identifikasiya etməyə imkan verir.
- Müvafiq anticisimlərin təsirindən viruslar həssas laborator heyvanlarda xəstəlik törətmir, hüceyrə və toxuma kulturlarına sitopatik təsir göstərmir, eləcə də toyuq embrionlarında çoxalmırlar



Virus infeksiyalarının ekspres- diagnostika üsulları

- Nümunələrdə virus antigeninin aşkar edilməsi: İFR, İFA, PHAR, gələcək presipitasiya reaksiyası (2-24 saat ərzində).
- Erkən İgM anticisimlərinin aşkar edilməsi: PHAR, dPHAR, İFR, İFA və s.
- Virus fermentlərinin aşkar edilməsi
- Nuklein turşularının aşkar edilməsi: ZPR