**БПОУ ВО ВОРОНЕЖСКИЙ БАЗОВЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ КОЛЛЕДЖ**

**Рассмотрено на заседании ЦМК**

**«\_\_\_\_\_»\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_20 г.**

**Председатель ЦМК\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_**

**МЕТОДИЧЕСКАЯ РАЗРАБОТКА**

**ПРАКТИЧЕСКОГО ЗАНЯТИЯ**

**По теме «МЕТОДЫ ВИРУСОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ»**

**МДК 04.01. «Теория и практика лабораторных микробиологических и иммунологических исследований» Для специальности 31.02.03 «Лабораторная диагностика» Курс 3.**

**Составитель: КУПРИЯНОВА С.И.**

**2016 – 2017 уч. год.**

**Специальность 31.02.03. «Лабораторная диагностика» ПМ.04. «Проведение лабораторных микробиологических и иммунологических исследований» МДК 04.01. «Теория и практика лабораторных микробиологических и иммунологических исследований» Раздел 3. «Частная вирусология» Часть 8. «Возбудители вирусных инфекций»**

**ТЕМА ПРАКТИЧЕСКОГО ЗАНЯТИЯ: «МЕТОДЫ ВИРУСОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ».**

**ЦЕЛИ ЗАНЯТИЯ. Учебная**: прочное усвоения системы знаний, формирование умений объяснять факты на основе причинно-следственных связей, закономерностей. Формирование умения самостоятельной работы с методической литературой, учебником. Освоение общих и соответствующих профессиональных компетенций ПК 4.1, ПК 4.2, ПК 4.3, ПК 4.4. **Развивающая:** формирование навыков самообразования, самореализации личности, развитие речи, мышления, памяти, познавательного интереса. **Воспитательная:** привитие умений и навыков учебной работы и коллективного труда. Формирование у студентов целостного миропонимания и современного научного мировоззрения, основанного на признании приоритетов общечеловеческих ценностей: гуманности, милосердия, сострадания, уважения к жизни и здоровью человека. **Межпредметные связи:** эпидемиология, инфекционные болезни, латинский язык, ТЛР, фармакология, анатомия и физиология человека, основы патологии, терапия, педиатрия. **Внутрипредметные связи:** морфология и физиология вирусов, методы диагностики вирусных заболеваний, иммунология, дезинфекция и стерилизация, методы культивирования и идентификации вирусов. **ПОСЛЕ ИЗУЧЕНИЯ ТЕМЫ СТУДЕНТ ДОЛЖЕН: иметь практический опыт**  работы с инфекционным материалом, с микроскопией вирусных включений, идентификацией вирусов с помощью иммунных реакций. **уметь : -** принимать и регистрировать поступающий исследуемый материал, - проводить подготовку материала для проведения исследования, - проводить индикацию вирусов и ставить реакции для их идентификации (РНГА, ИФА и др.), - проводить обеззараживание отработанного материала; - соблюдать санэпидрежим в лаборатории. **знать:** - основные правила взятия и обработки исследуемого материала, - биологические свойства изучаемых вирусов, - принципы вирусологической диагностики, - свойства возбудителей, имеющие диагностическое значение, - биологические объекты, используемые для культивирования вирусов, - особенности роста различных видов вирусов в культурах тканей и куриных эмбрионах; - характер проявления цитопатогенного действия вирусов в тканях.

**СТРУКТУРА ЗАНЯТИЯ. 1. Организационная часть:** проверка отсутствующих, готовность студентов к занятию, наличие халатов и т.д.

**2 .Начальная мотивация учебной деятельности:** название темы, её цель, значение, связь с современностью, перспективы развития.

**3. Актуализация опорных знаний** (воспроизведение ранее усвоенных знаний и применение их в новых ситуациях): - особенности строения и воспроизведения вирусов; - место вирусологии в инфекционной патологии человека; - особенности противовирусного иммунитета; --- - основы культивирования вирусов; - цитопатогенное действие вирусов и их идентификация.

**4. Контроль знаний:**  Устный фронтальный опрос: 1) каковы особенности строения вирусов? 2) каковы этапы репродукции вирусов в клетке? 3) как проявляется органотропность вирусов? 4) какова резистентность вирусов в окружающей среде? 5) что вы можете сказать об интерфероне? 6) в чём проявляются особенности противовирусного иммунитета? 7) каковы особенности культивирования вирусов? 8) какие методы диагностики используются при вирусных инфекциях?

**5. Изучение нового материала: -** вирусоскопический метод обнаружения вирусов (использование световой и электронной микроскопии); - характеристика вирусологического метода (использование куриных эмбрионов и культур тканей); -правила заражения куриных эмбрионов, демонстрация методов заражения; - методы обнаружения вирусов в клетках; - использование серологических методов диагностики, демонстрация серологических реакций; - использование ИФМ для ускоренной диагностики вирусных инфекций; - демонстрация приготовления однослойной культуры тканей; - демонстрация цитопатических изменений клеток культуры тканей, вызванных репродукцией вируса;

**6. САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА.**

**Задание №1.**

**Изучите под микроскопом демонстрационные препараты, содержащие включения: -вируса бешенства (тельца Бабеша—Негри) и -вируса оспы (тельца Гварниери). Сделайте в тетради зарисовку препаратов и их описание.**

**Задание № 2.**

**Охарактеризуйте письменно преимущества метода культивирования вирусов в куриных эмбрионах перед другими методами.**

**Задание № 3**

**Заполните таблицу исследования куриных эмбрионов при заражении их вирусом:**

|  |  |
| --- | --- |
| **Материал для исследования** | **Метод определения вируса** |
| Аллантоисная жидкость |  |
| Амниотическая жидкость |  |
| Хорион-аллантоисная оболочка |  |
| Амниотическая оболочка |  |
| Желточная оболочка |  |

**Задание № 4**

**Определите репродукцию вируса по цитопатическому действию в культуре ткани. Сделайте в тетради описание проделанной работы.**

**Задание № 5.**

**Определите репродукцию вируса с помощью реакции гемагглютинации в курином эмбрионе. Сделайте в тетради описание проделанной работы и зарисовку реакции.**

**7**.**Закрепление изученного материала:** а) решение тестовых заданий; б) решение ситуационных задач.

**8. Подведение итогов. Выводы.**

**9. Домашнее задание: -**учебник Сбойчакова В.Б. «Микробиология с основами эпидемиологии и методами микробиологических исследований», стр. 442-449, 482-489; - учебник Черкес Ф.К. «Микробиология», стр. 447-451; -конспект лекции.

**10. Оснащение**: - дидактический раздаточный материал, учебники, таблицы; - микроскопы, осветители, иммерсионное масло; - демонстрационные препараты; - пробирки с тканевой культурой; - куриные эмбрионы; - чашки Петри, пастеровские пипетки, ножницы остроконечные, горелки, пинцеты; - пластины из плексиглаза или стерильные пробирки; - спирт 70 , 2% раствор йода; - стерильный изотонический раствор хлорида натрия; - 1% суспензия отмытых куриных эритроцитов.

Литература: В.Б.Сбойчаков «Микробиология с основами эпидемиологии и методами микробиологических исследований», СПб СпецЛит 2007; Ф.К. Черкес «Микробиология», Москва Альянс 2012, А.И.Коротяев и С.А.Бабичев «Медицинская микробиология и вирусология», СПб 2009.

**ПРИЛОЖЕНИЕ №1**

**ВОПРОСЫ И ОТВЕТЫ ТЕСТ-КОНТРОЛЯ К ТЕМЕ**

**«МЕТОДЫ ВИРУСОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ».**

**Пояснение: выберите один правильный ответ.**

**1.Внутриклеточные включения вирусов можно обнаружить с помощью:** А --биологического метода диагностики Б -- использования ДНК-зондов В -- цепной полимеразной реакции Г -- световой микроскопии

**2. Внутриклеточные включения Бабеша-Негри образует:** А -- вирус гриппа Б -- вирус натуральной оспы В -- вирус бешенства Г -- вирус полиомиелита

**3. При вирусологических исследованиях важное значение имеют:** А -- взятие материала и его предварительная обработкаБ -- условия транспортировки В -- соблюдение необходимых условий при культивировании вирусов Г -- всё перечисленное верно

**4. Вирусы размножаются:** А -- в куриных эмбрионах 20 дневного возраста Б -- в куриных эмбрионах 7—12 дневного возраста В -- в сывороточных жидких средах Г -- на кровяном агаре

**5. Заражение вирусами куриных эмбрионов производят:** А -- в желточный мешок Б -- в аллантоисную полость В -- в амниотическую полость Г -- всё перечисленное верно

**6. Пригодность куриных эмбрионов для заражения определяют:** А -- по целостности скорлупы Б -- по наличию движений эмбриона В -- по определённому весу Г -- всё перечисленное неверно

**7. Культивирование вирусов в куриных эмбрионах имеет преимущество перед другими методами, потому что:** А -- эмбрионы очень жизнеспособны Б -- устойчивы к воздействию внешних факторов В -- метод заражения эмбрионов прост и доступен Г -- всё перечисленное верно

**8. Инфицированные вирусом яйца проверяют овоскопом** А -- ежедневно Б -- 2 раза в суткиВ -- 1 раз в 3 дня Г -- всё перечисленное неверно

**9. Чтобы получить однослойную культуру клеток, на ткани воздействуют:** А -- антибиотиками в высоких концентрациях Б -- специфической сывороткой В -- слабым раствором трипсина Г -- сульфаниламидными препаратами

**10. О росте вирусов в клетках можно судить:** А -- по изменению цвета индикатора Б -- по появлению пятен-бляшек В -- по активному размножению культуры клеток Г -- всё перечисленное верно

**11. Цитопатогенное действие вирусов в культурах клеток проявляется в виде:** А -- гроздевидной дегенерацией клеток Б -- крупозной деструкции клеток В -- мелкозернистой деструкции клеток Г -- всё перечисленное верно

**12. Методом ускоренной диагностики вирусных инфекций является:** А -- РСК Б -- РП в геле В -- реакция нейтрализации вирусов Г -- иммунофлуоресцентный метод -- ИФМ

**13. Применение радиоиммунного метода основано на использовании:** А -- антител, меченых изотопом Б -- антител, меченых ферментом В -- антител, меченых флуоресцинами Г -- эритроцитарного диагностикума

**14. Метод ДНК-зондов может быть использован:** А -- для выявления любых генов Б -- для выявления любых фрагментов нуклеиновых кислот В -- для идентификации любого биологического объекта Г -- всё перечисленное верно

**15. Вскрытие заражённых эмбрионов проводят в сроки максимального накопления вируса:**  А -- через 48-72 часа инкубации при 37 С Б -- через 48-72 часа инкубации при 4 С В -- через 24-48 часов инкубации при 4 С Г -- через 24-48 часов инкубации при 37 С

**ОТВЕТЫ К ТЕСТ-КОНТРОЛЮ ПО ТЕМЕ:**

**«МЕТОДЫ ВИРУСОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ»**

**1 -- Г 6 -- Б 11 -- Г**

**2 -- В 7 -- Г 12 -- Г**

**3 -- Г 8 -- А 13 -- А**

**4 -- Б 9 -- В 14 -- Г**

**5 -- Г 10 -- Б 15 -- Г**

**ПРИЛОЖЕНИЕ №2**

**СИТУАЦИОННЫЕ ЗАДАЧИ К ТЕМЕ**

**«МЕТОДЫ ВИРУСОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ».**

**ЗАДАЧА №1. В вирусологической лаборатории проводят выделение из материалов, полученных от больных. Вам необходимо подобрать биологические системы для выделения вирусов.**

**ЗАДАНИЯ: 1.** Перечислите биологические системы, которые используются для выделения вирусов. 2. Опишите принципы подготовки первичной трипсинизированной культуры. 3. Опишите достоинства и недостатки различных культур клеток.

**ЗАДАЧА №2**  **В вирусологическую лабораторию поступил материал от больных (смывы из носоглотки) с подозрением на грипп. Необходимо провести его вирусологическое исследование с использованием куриных эмбрионов и перевиваемых культур клеток.**

**ЗАДАНИЯ:**  1. Назовите возраст эмбриона и полости, в которые можно провести заражение. 2. Назовите метод, с помощью которого исследуют жизнеспособность эмбрионов и признаки, по которым судят о его пригодности для заражения. 3. Соблюдение каких условий необходимо при работе с эмбрионами. 4. Опишите цитопатическое действие вируса (ЦПД) в перевиваемых культурах клеток.

**ЗАДАЧА №3 1. В вирусологической лаборатории используют однослойные культуры клеток для выделения вирусов. Лаборант ведёт постоянный контроль качества однослойных культур и следит за процессом их роста.**

**ЗАДАНИЯ:** 1. Какая лабораторная посуда используется для выращивания однослойных культур? 2. Опишите состав питательной среды для выращивания культур клеток. Как часто меняют питательную среду? 3. Дайте характеристику нормальным пролиферирующим клеткам и клеткам, непригодным для размножения вирусов. 4. Как долго однослойные культуры клеток сохраняют жизнеспособность?

**ПРИЛОЖЕНИЕ №3**

**ЭТАЛОНЫ ОТВЕТОВ К СИТУАЦИОННЫМ ЗАДАЧАМ**

**ПО ТЕМЕ «МЕТОДЫ ВИРУСОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ».**

**ЭТАЛОН ОТВЕТА К ЗАДАЧЕ №1. 1.** Клеточные культуры, куриные эмбрионы и экспериментальные лабораторные животные. **2.** Подготовка первичной трипсинизированной культуры клеток заключается в разрушении межклеточных связей в тканях слабым раствором трипсина (протеолитические ферменты). Клетки разобщаются и выращиваются в питательной среде на поверхности стекла в виде монослоя. **3**. Чем меньше дифференцирована ткань, тем более интенсивно её клетки пролиферируют in vitro. В этом плане преимущество имеют эмбриональные и опухолевые ткани, которые легче культивируются вне организма, в отличие от трипсинизированных.

**ЭТАЛОН ОТВЕТА К ЗАДАЧЕ №2. 1**. Для вирусологического исследования используют 7—12 дневные эмбрионы. Заражение проводят на хорион-аллантоисную оболочку, в аллантоисную полость, в амниотическую полость, желточный мешок. **2.** Жизнеспособность эмбрионов исследуют с помощью овоскопа при его просвечивании. Пригодность для заражения определяют по наличию движений эмбриона и развитию сети кровеносных сосудов на хорион-аллантоисной оболочке. **3.** Заражение эмбрионов проводят в боксах в строго асептических условиях, стерильными инструментами, а эмбрионы дважды протирают тампоном, смоченным спиртом. После заражения место прокола (отверстие в скорлупе) заливают стерильным парафином. Инфицированные яйца ежедневно проверяют овоскопом. Если эмбрионы погибли в первые сутки, то причиной этого может быть травма при заражении. Такие яйца выводят из опыта. **4**. ЦПД вирусов в перевиваемых культурах проявляется различной дегенерацией клеток, выявляемой при микроскопии.

**ЭТАЛОН ОТВЕТА К ЗАДАЧЕ №3. 1**. Для выращивания однослойных культур клеток используют стеклянные плоские сосуды-матрацы вместительностью 100 мл, 200 мл и 1л. **2.** Питательная среда для выращивания культуры клеток должна содержать аминокислоты, витамины, минеральные соли, глюкозу и другие вещества. Питательную среду меняют через 2 -3 дня после посева клеток. **3**. Нормальные клетки светлые, пролиферируют и растут однослойным пластом. Клетки тёмные, зернистые, не размножающиеся изымают из опыта и не используют для культивирования вирусов.  **4**. Однослойные культуры клеток жизнеспособны 2 – 3 недели.

**ПРИЛОЖЕНИЕ №4**

**САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА СТУДЕНТОВ НА ЗАНЯТИИ.**

**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ДЛЯ ВЫПОЛНЕНИЯ ЗАДАНИЯ №4.**

**Методика изучения цитопатического действия вирусов.**

Для исследования монослоя клеток пробирку с тканевой культурой поместите на предметный столик микроскопа так, чтобы монослой находился сверху. Для удобства определения положения монослоя на противоположной стороне проведите ручкой по стеклу черту, которая должна быть обращена вниз. Придерживая пробирку левой рукой, изучите морфологию клеток тканевой культуры с помощью объектива 8 при опущенном конденсоре и прикрытой диафрагме.

При сравнении клеточного монослоя, инфицированного вирусом, с незаражёнными клетками в контрольной пробирке, отметьте полное или островковое разрушение пласта клеток, которое характерно для цитопатического действия (ЦПД) различных вирусов.

**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ДЛЯ ВЫПОЛНЕНИЯ ЗАДАНИЯ №5.**

**Постановка реакции гемагглютинации (РГА).**

Для постановки РГА приготовьте двукратные разведения аллантоисной жидкости и разлейте в лунки пластины в объёме 0,5 мл. Для контроля возьмите 0,5 мл аллантоисной жидкости незаражённого эмбриона. Затем добавьте по 0,5 мл 1% суспензии отмытых куриных эритроцитов и выдержите при комнатной температуре. Результаты реакции учтите через 40 минут после оседания эритроцитов в контроле. Наличие гемагглютинации в опытных пробирках при её отсутствии в контрольных указывает на содержание вируса в исследуемой жидкости. Тип вируса дифференцируют в РТГА.

**ТАБЛИЦА ИССЛЕДОВАНИЯ КУРИНЫХ ЭМБРИОНОВ ПРИ ЗАРАЖЕНИИ ИХ ВИРУСОМ.**

|  |  |
| --- | --- |
| **Материал для исследования** | **Метод определения вируса** |
| Аллантоисная жидкость | С помощью реакции гемагглютинации |
| Амниотическая жидкость | С помощью реакции гемагглютинации |
| Хорион-аллантоисная оболочка | Изучение характера очаговых поражений на тёмном фоне |
| Амниотическая оболочка | Изучение характера поражений на тёмном фоне |
| Желточная оболочка | Изучение характера поражений на тёмном фоне |