

Київський національний університет імені Тараса Шевченка
Навчально-науковий центр "Інститут біології та медицини"
Кафедра вірусології

МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ
ДО ДИСЦИПЛІНИ «ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА ВІРУСНИХ
ІНФЕКЦІЙ» ДЛЯ СТУДЕНТІВ ОР «БАКАЛАВР», ЩО НАВЧАЮТЬСЯ ЗА ОП
«ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА»

КИЇВ 2024

Методичні рекомендації до дисципліни «Лабораторна діагностика вірусних інфекцій» для студентів освітнього рівня «Бакалавр», що навчаються за ОП «Лабораторна діагностика» ННЦ «Інститут біології та медицини»// Київський національний університет імені Тараса Шевченка.- Київ.- Упорядники: Шевченко Т.П., Коротєєва Г.В., Андрійчук О.М., Будзанівська І.Г. - 2024 – 58С.

Рецензенти: Фалалєєва Т.М. – д.б.н., завідувачка кафедри біомедицини ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка

Загородня С.Д. – к.б.н., старший дослідник завідувачка відділу репродукції вірусів
Інституту мікробіології і вірусології
ім. Д.К. Заболотного НАН України

Рекомендовано до друку вченою радою Навчально-наукового центру "Інститут біології та медицини" Київського національного університету імені Тараса Шевченка (протокол № 10 від 12 березня 2024 року)

ЗМІСТ

ВСТУП.....	4
РОЗДІЛ 1 ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА ГОСТРИХ ВІРУСНИХ ІНФЕКЦІЙ.....	6
Практична робота 1. Методи забору та підготовки матеріалу для проведення діагностики вірусних інфекцій.....	6
Практична робота 2. Лабораторна діагностика збудників гострих респіраторних вірусних інфекцій. Ідентифікація збудника та виявлення антивірусних антитіл.	12
Практична робота 3. Лабораторна діагностика гострих вірусних гастроентеритів. Ідентифікація збудника та виявлення антивірусних антитіл. .	21
РОЗДІЛ 2. ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА ПЕРСИСТЕНТНИХ ВІРУСНИХ ІНФЕКЦІЙ.....	27
Практична робота 4. Лабораторна діагностика вірусних гепатитів серологічними та молекулярними методами.	27
Практична робота 5 . Лабораторна діагностика герпесвірусних інфекцій. Діагностичні маркери герпесвірусних інфекцій.	38
Практична робота 6. Лабораторна діагностика, маркери ідентифікації ВІЛ та контролю розвитку і лікування ВІЛ-інфекції.....	42
Практична робота 7. Швидкі тести: сучасні серологічні методи діагностики вірусних інфекцій.	49
ЗАВДАННЯ ДЛЯ САМОСТІЙНОЇ РОБОТИ.....	54
КОНТРОЛЬНІ ЗАПИТАННЯ ДО МАТЕРІАЛУ СПЕЦКУРСУ.....	55
ПЕРЕЛІК РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	56

ВСТУП

У медичній галузі, яка постійно розвивається, лабораторна діагностика відіграє ключову роль при постановці діагнозу. Швидка та точна ідентифікація патогенів вірусної етіології має вирішальне значення для своєчасного початку належного лікування, контролю розповсюдження вірусів та формулювання стратегій у сфері охорони здоров'я. Методичні рекомендації присвячені основним положенням лабораторної діагностики найбільш розповсюджених, соціально-значущих вірусних інфекцій, від фундаментальних знань з вірусології до впливу вірусних інфекцій на громадське здоров'я, надають студентам цілісне розуміння контексту, в якому лабораторна діагностика вірусних інфекцій відіграє вирішальну роль. Точний вірусологічний діагноз необхідний як для вивчення епідеміології вірусних інфекцій, так і для контролю епідемій і внутрішньо лікарняних інфекцій. У деяких ситуаціях клінічна робота повністю залежить від вірусологічного діагнозу, наприклад, при підозрі на краснуху на ранніх термінах вагітності та для виключення носіїв гепатиту В з категорії потенційних донорів. Потреба в швидкій етіологічній діагностиці зростає, у зв'язку з широким використанням противірусних препаратів та розвитку резистентності до них. Проведення лабораторної діагностики вірусних інфекцій, включаючи визначення серотипів та генотипів, заклало необхідну основу для розробки вірусних вакцин і постійного контролю їх ефективності.

Навчальна дисципліна «Лабораторна діагностика вірусних інфекцій» є складовою освітньо-професійної програми «Лабораторна діагностика» при підготовці фахівців освітнього рівня «Бакалавр».

Мета дисципліни – сформувати систему знань та вмінь з основ лабораторної та диференційної діагностики найбільш розповсюджених вірусних інфекцій та засобів подолання негативної дії цих збудників на здоров'я людини та освоїти навички організації роботи медичного працівника в системі закладів охорони здоров'я.

Дисципліна “Лабораторна діагностика вірусних інфекцій” формує засади для вивчення студентом клінічних дисциплін та вміння застосовувати знання з діагностики вірусних інфекцій в процесі подальшого навчання та у професійній діяльності.

У методичних рекомендаціях наведені різноманітні методи діагностики вірусних інфекцій, як класичні вірусологічні методи, так і розкрито сучасний стан та новітні підходи до діагностики вірусних хвороб з використанням молекулярних методів досліджень вірусів та швидких тестів лабораторної діагностики вірусних хвороб.

Методичні рекомендації розроблені відповідно до навчального плану та робочої програми навчальної дисципліни «Лабораторна діагностика вірусних інфекцій» для студентів спеціальності 224 «Технологія медичної діагностики та лікування», освітньо-професійної програми «Лабораторна діагностика», освітнього рівня «Бакалавр».

Для опанування матеріалу з дисципліни «Лабораторна діагностика вірусних інфекцій» у кінці методичних вказівок наведено рекомендований перелік літератури та тестових питань.

РОЗДІЛ 1 ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА ГОСТРИХ ВІРУСНИХ ІНФЕКЦІЙ

Практична робота 1. Методи забору та підготовки матеріалу для проведення діагностики вірусних інфекцій.

Мета роботи: ознайомитись з видами матеріалу для вірусологічного дослідження, методами його забору та підготовки для проведення лабораторної діагностики вірусних інфекцій.

Прогрес, досягнутий у діагностичних методах за останнє десятиліття, значно підвищив точність і своєчасність вірусної діагностики, що, у свою чергу, може допомогти в лікуванні пацієнтів, контролі захворювання та позитивно вплинути на перебіг захворювання. У діагностиці вірусних інфекцій використовуються три різні підходи:

- (1) Виділення інфекційного вірусу шляхом інокуляції культур клітин або експериментальних тварин.
- (2) Ідентифікація вірусу, вірусних антигенів або вірусних нуклеїнових кислот у клінічному матеріалі пацієнта за допомогою серологічних тестів або ідентифікація геному за допомогою методів гібридизації нуклеїнових кислот
- (3) виявлення та вимірювання специфічних антитіл у сироватці крові пацієнта

Отже, методи діагностики вірусних інфекцій можна розділити на прямими та непрямими. Прямі методи перевіряють наявність самого вірусу, тоді як непрямі методи спостерігають наслідки вірусу, такі як загибель клітин або синтез антивірусних антитіл. Культура тканини — це спосіб ідентифікації вірусу на основі впливу вірусу на клітини. Це також спосіб підтримання реплікації вірусу, якщо для інших діагностичних тестів потрібен більший концентрований зразок. На сьогодні виділення вірусу значною мірою замінено чутливими аналізами детекції нуклеїнових кислот і вимірюванням вірусоспецифічних антитіл. Найкращі діагностичні методи повинні задовольняти критеріям: швидкість, простота, чутливість, специфічність і вартість. У кожного методу діагностики є переваги і недоліки (табл. 1.1).

Таблиця 1.1 - Переваги та недоліки різних методів діагностики вірусів

Метод діагностики	Переваги методу	Недоліки методу
Електронна мікроскопія	Швидкий	Відносно нечутливий
Культура клітин	Може використовуватися для виявлення невідомих вірусів невідомої, дешевше, ніж молекулярні аналізи, може відрізнити інфекційний від неінфекційного вірусу, може використовуватися для ампліфікації невеликої кількості вірусу, може бути відправною точкою для інших тестів	Тривалий в часі, вимагає спеціалізованого технічного персоналу, відносно дорого, живі клітини здатні до мінливості, потреба в спеціалізованому обладнанні і лабораторіях певного рівню біобезпеки, не всі віруси будуть реплікуватися в культурі клітин, потрібен інфекційний вірус
Імунофлуоресцентний метод	Відносно швидкий у виконанні, не потребує спеціалізованого технічного персоналу, може ідентифікувати вид вірус	Потрібне спеціальне обладнання (флуоресцентний мікроскоп), вірусоспецифічні антитіла
Імуноферментний аналіз	Може бути виконано протягом кількох годин, легкий у виконанні, може аналізувати вірусний антиген або противірусні антитіла, може розрізнити первинну та рецидивну інфекцію, може використовуватися для діагностики вроджених інфекцій	Доступно не для всіх вірусів, потрібне спеціальне обладнання (спектрофотометр), низькі рівні можуть не бути виявлені аналізом
Вестерн-блот	Може підтвердити інші тести, відносно швидкий	Потрібні спеціальні реактиви та

	у виконанні	обладнання, низька чутливість
Реакції аглютинації/гемаглютинації	Швидко виконується, не вимагає спеціального обладнання, візуальна оцінка результатів	Суб'єктивна оцінка результатів, потрібні спеціальні реагенти, не всі віруси здатні до гемаглютинації
Імунохроматографічний тест	Можна проводити вдома або в клініці, не вимагає спеціального обладнання та навчання, швидко, відносно недорого	Може призвести до невизначеного результату, має бути перевірено іншими тестами, не може розрізняти штами вірусу
Полімеразна ланцюгова реакція/ Полімеразна ланцюгова реакція зі зворотною транскрипцією	Потрібно дуже мало вихідного матеріалу, швидкий, специфічний, може бути виконаний на неживих тканинах	Потрібне спеціальне обладнання (термоциклер), знання генетичної послідовності вірусу, необхідної для праймерів, дорогі реагенти, результати напівкількісні
ПЛР в реальному часі	Швидкий, надзвичайно чутливий, специфічний, кількісний, може бути виконаний на неживій тканині, забезпечує швидкі результати	Потрібні дорогі реагенти та спеціальне обладнання, знання генетичної послідовності, необхідної для праймерів і зонда
Високопродуктивне секвенування	Відносно швидко, може визначити повну вірусну послідовність, не потребує живих тканин, може використовуватися для диференціації тісно споріднених вірусів, може відстежувати вірусні мутації	Дорогі реагенти та обладнання, для інтерпретації результатів потрібні спеціалісти

Лабораторна діагностика вірусних інфекцій складається з трьох етапів: забору матеріалу, транспортування та його дослідження в лабораторії. До проведення кожного етапу висувають певні вимоги, від дотримання яких залежить ефективність лабораторної діагностики.

Найважливішим фактором, що впливає на точність результатів вірусної діагностики, є клінічний зразок. Тип зразка, термін його відбору, правильне зберігання та транспортування впливають на коректність результатів досліджень.

Вибір виду клінічного зразку залежить від типу вірусної інфекції. Так, для вірусів, які викликають локальні інфекції зразок має бути виділено безпосередня з вогнище інфекції. Наприклад, вірус грипу легко виявляється в мазках з носоглотки, а віруси простого герпесу можна виділити з уражень порожнини рота або статевих органів. У той же час віруси, які викликають системну інфекцію, можуть бути виділені з кількох різних джерел, залежно від місць репродукції вірусу. Для деяких вірусів характерна вірусемія. Наприклад, вірус гепатиту В і вірус гепатиту С, що інфікують гепатоцити, але можуть бути детектовані в сироватці крові (табл. 1.2).

Таблиця 1.2 - Вид клінічного матеріалу для вірусологічних досліджень

Локалізація інфекції	Збудник	Вид клінічного матеріалу
Дихальні шляхи	Аденовірус	Назофарингеальний мазок, назальний аспірат, назальний мазок, промивання носа, мазок із горла
Шлунково-кишкового тракту	Аденовірус	Кал, блювотні маси
Висип на шкірі	Вірус Коксакі А	Біопсія, мазок Тцанка
Очі	Аденовірус	Мазок з кон'юнктиви, мазок з рогівки
Центральна нервова система (менінгіт, енцефаліт)	Арбовіруси Вірус Коксакі А Вірус Коксакі В Вірус Денге Ентеровірус Герпесвіруси Вірус лімфоцитарного хориоменінгіту Вірус кору	Спинномозкова рідина, кал, біопсія, мазок із горла, кров

	Вірус епідемічного паротиту Поліовірус Вірус Західного Нілу	
Інфекції статевих органів	Вірус простого герпесу Вірус папіломи людини	Мазок з шийки матки, мазок з уретри, рідина з везикул, мазок Тцанка, мазок Папаніколау

Вибір діагностичного тесту також буде залежати від стадії інфекції. Вірусне навантаження людини є найвищим під час гострої інфекції, але може впасти до невизначених рівнів, коли інфекція зникне. З іншого боку, для розвитку антитіл під час первинної відповіді проти вірусу потрібні тижні (Рис. 1.1). Вірусоспецифічні IgM синтезуються на ранніх стадіях вірусної інфекції, вірусоспецифічні IgG з вищою спорідненістю починають секретуватися плазматичними клітинами пізніше під час первинної інфекції та під час вторинної імунної відповіді. Вибір тесту залежить від стадії інфекції та ймовірності наявності вірусу чи антитіла в цей час.

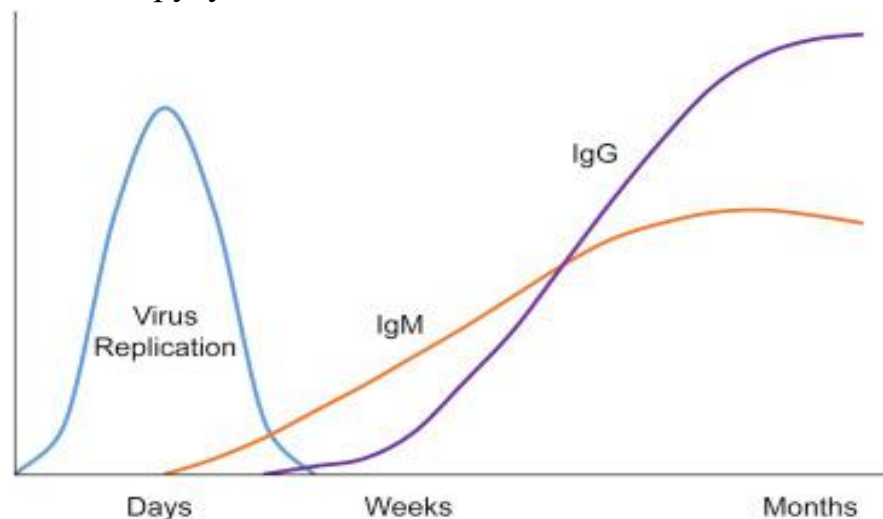


Рис.1.1 - Діаграма, що вказує на типову гостру вірусну інфекцію, показуючи період, протягом якого можна виявити вірус, антитіла до вірусу, IgM та IgG (Louten, 2016)

Необхідно бути дотримуватися правил біобезпеки при роботі з інфекційним матеріалом під час відбору, зберігання та транспортування клінічних зразків. Кров збирається у відповідні пробірки залежно від того, потрібні для діагностичного тесту клітини, сироватка чи плазма. Пробірки, що містять гепарин або ЕДТА як антикоагулянт, блокують згортання крові та використовуються для отримання лейкоцитів або плазми, рідкої фракції, яка залишається під час центрифугування крові для осадження її клітин. Сироватку

отримують, дозволяючи крові згорнутися, а потім центрифугуючи згусток, залишаючи рідку частину крові. Таким чином, різниця між плазмою та сироваткою полягає в тому, що плазма містить фактори згортання, які є частиною згустку, коли отримують сироватку. Антитіла та вірус (або його антигени) можуть бути виявлені у сироватці та плазмі, хоча деякі віруси також можуть бути знайдені у лейкоцитах, наприклад, ВІЛ. Для збору рідини з уражених ділянок шкіри використовується стерильний тампон, який потім поміщається в спеціальне транспортне середовище. Те саме транспортне середовище використовується для мазків з носоглотки, цервікальних мазків, ректальних мазків або мазків із горла. Випорожнення збирають у чистий, герметичний контейнер. Надзвичайно важливо, щоб при проведенні ПЛР-діагностики всі зусилля були спрямовані на мінімізацію контамінації.

Лабораторна діагностика вірусних інфекцій підвищує здатність клініциста приймати рішення щодо відповідного лікування пацієнтів та оцінювати прогресування захворювання. Знання про збудника також дозволяють здійснювати контроль за розвитком інфекцією і успішністю противірусного лікування.

Завдання

1. Використовуючи знання про вірусний гепатит А та вірусний гепатит С запропонувати вид клінічного матеріалу та інструкцію його відбору у таких пацієнтів:

1. Хворий на вірусний гепатит А
2. Хворий на вірусний гепатит С

2. Скласти алгоритм отримання клінічного матеріалу для діагностики грипу молекулярним методом.

Для виконання завдання скористатися «Методичним рекомендаціями «Порядок забору, транспортування та зберігання матеріалу для дослідження методом полімеразної ланцюгової реакції», затверджені наказом МОЗ України № 662 від 30.07.2013 р.»

Практична робота 2. Лабораторна діагностика збудників гострих респіраторних вірусних інфекцій. Ідентифікація збудника та виявлення антивірусних антитіл.

Мета роботи: здобути практичні навички з лабораторної діагностики збудників гострих респіраторних вірусних інфекцій.

Респіраторні віруси, які належать до кількох таксономічних родин, викликають появу клінічних ознак та симптомів, які можуть бути подібними для різних збудників. Респіраторні вірусні інфекції уражують верхні або нижні дихальні шляхи. І хоча респіраторні інфекції можна класифікувати за вірусом-збудником (наприклад, грип), здебільшого їх класифікують клінічно, відповідно до синдрому (наприклад, застуда, бронхіоліт, круп, пневмонія). Не дивлячись на те, що специфічні патогени часто викликають характерні клінічні прояви (наприклад, риновірус переважно викликає застуду, респіраторно-синцитіальний вірус – бронхіоліт, тощо), кожен із збудників респіраторних інфекцій може призводити до появи широко діапазону вірусних респіраторних синдромів (табл. 2.1).

Вірусні респіраторні інфекції діагностуються клінічно на основі симптомів та епідеміологічних показників. Для догляду за пацієнтом достатньо діагностики синдрому; зазвичай ідентифікації конкретного збудника не потрібна.

Діагностичне тестування можуть призначати в наступних випадках:

- коли ідентифікація конкретного збудника впливає на клінічне лікування;
- епідеміологічного нагляду (тобто виявлення та визначення причини спалаху).

Ідентифікація збудника може бути надзвичайно важливою у випадках, коли вирішується питання про призначення специфічної противірусної терапії. Наразі такі випадки обмежені раннім або тяжким перебігом грипу, COVID-19, тяжкою аденовірусною пневмонією або RSV-інфекцією у пацієнтів із серйозним імунодефіцитом. Ідентифікація конкретного збудника (зокрема, вірусу грипу або RSV у нещодавно госпіталізованих пацієнтів або пацієнтів, які перебувають у медичному закладі певний час) також може бути важливою для виявлення та стримування потенційних спалахів.

Швидкі діагностичні тести, базуються на виявленні антигенів збудника, наразі наявні для діагностики грипу, RSV-інфекції та коронавірусної хвороби (SARS-CoV-2). Вони застосовуються безпосередньо у місці надання медичної допомоги, але мають меншу чутливість, ніж лабораторні тести.

У багатьох клінічних лабораторіях доступне виявлення збудників вірусних інфекцій на основі полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) у

мультиплексній панелі (або індивідуально для вірусу грипу, RSV та SARS-CoV-2). Ці тести є швидкими та більш чутливими, ніж тести на місці надання медичної допомоги. У разі їх доступності, їх застосування є кращим вибором для клінічних цілей.

Застосування клітинних культу або серологічних тестів вимагає більшого часу ніж ПЛР-тести, але ці методи діагностики можуть бути корисними при проведенні епідеміологічного нагляду.

Останнім часом респіраторні віруси стали все частіше визнаватися серйозними причинами захворюваності та смертності пацієнтів з ослабленим імунітетом. Швидке та чутливе виявлення респіраторних вірусів має важливе значення для ранньої діагностики та призначення відповідної противірусної терапії, а також для ефективного впровадження заходів інфекційного контролю

Таблиця 2.1 - Збудники вірусних респіраторних інфекцій

Синдром	Збудник	Менш поширений збудний
Застуда	риновіруси, коронавіруси, РСВ	вірус грипу, віруси парагрипу, аденовіруси, метапневмовірус людини
Круп	віруси парагрипу	вірус грипу, РСВ
Бронхіти	респіраторно- синцитіальний вірус (РСВ)	вірус грипу, віруси парагрипу, аденовіруси, риновіруси
Грипоподібні захворювання	вірус грипу	віруси парагрипу, аденовіруси
Пневмонія	вірус грипу, РСВ, аденовіруси, SARS CoV, MERS, SARS CoV2	вірус грипу, віруси парагрипу, риновіруси, метапневмовірус людини

Лабораторна діагностика ГРВІ:

Вірусологічні методи дослідження

Виділення вірусів на курячих ембріонах.

Виділення вірусу на курячих ембріонах (КЕ) широко використовується тільки для вірусу грипу, адже корона-, бока- та респіраторно-синцитіальні віруси не розмножуються на КЕ.

Виділення вірусів у культурах клітин. Використання культур клітин для виділення респіраторних вірусів визначається можливостями лабораторії. Для виділення РС-вірусу використовують перещеплювані лінії культур клітин людини (HeLa, Hep-2, KB) та мавп (Vero).

Для аденовірусів використовують, як правило, перещеплювані лінії клітин епітелію людини (HeLa, Hep-2, KB, L-41), рідше – клітин мавп (Vero).

Оптимальними за чутливістю до аденовірусів є первинні або диплоїдні культури клітин епітелію нирок ембріона людини.

Респіраторні коронавіруси людини здатні розмножуватись лише в органній культурі, деякі адаптовані штами репродукуються у первинній культурі клітин нирок мавп і у диплоїдній культурі легені ембріона людини, а також у первинній культурі клітин легень і нирок ембріона людини. І хоча такі віруси, як MERS-CoV та SARS-CoV-2 здатні репродукуватися після адаптації у перещеплюваній лінії Vero б, ця культура не підходить для безпосереднього виділення вірусу із клінічного матеріалу.

Бокавіруси – не реплікуються у культурі клітин.

Оцінку проводять за цитопатичною дією (ЦПД) вірусу .

Виділення вірусу не є скринінг-тестом, але в періоди низької активності грипу (пізно навесні, влітку і рано восени), воно повинне бути виконане на зразках з дихальних шляхів, отриманих від осіб з підозрою на грип, які звертаються за медичною допомогою протягом 5 днів від початку хвороби, особливо якщо відомо, що такі особи епідеміологічно пов'язані зі спалахом грипу. Впродовж сезону грипу повинно проводитися вірусологічне обстеження групи пацієнтів, особливо це актуально для закладів закритого типу.

Серологічні методи дослідження:

Реакція гальмування гемаглютинації (РГГА)

У реакції пасивної гемаглютинації (РПГА)

Реакція зв'язування комплементу (РЗК)

Метод флуоресціюючих антитіл (МФА, прямий метод Кунса)

Реакція непрямой гемадсорбції

Імуноферментний аналіз (ІФА)

Серологічне тестування, як правило, не рекомендується для підтвердження інфікування людини вірусом грипу з метою лікування гострих випадків. Дані однієї проби сироватки серологічних тестів на грип не можуть бути надійно інтерпретовані. Для визначення титрів антитіл (шляхом інгібування гемаглютиніну, ІФА або фіксації комплементу, доступних тільки через

референтні лабораторії) необхідні зразки парних сироваток крові, відібраних у гостру фазу і фазу одужання. Проте результати таких досліджень не можна отримати своєчасно, тому вони не будуть впливати на клінічне ведення пацієнта. Парні зразки сироватки корисні тільки для ретроспективної діагностики з дослідницькою метою.

Молекулярні методи дослідження:

Полімеразна ланцюгова реакція зі зворотньою транскрипцією (ЗТ-ПЛР)

ЗТ-ПЛР у реальному часі

Метод мультиплексного ПЛР аналіз.

ЗТ-ПЛР має високу чутливість і є надзвичайно точним для виявлення вірусу грипу А і В в клінічних зразках з дихальних шляхів, і може забезпечити результати протягом декількох годин, але в багатьох клінічних закладах своєчасні результати не можуть бути доступні. Мультиплексний ЗТ-ПЛР може бути використаний в деяких умовах для виявлення цілого спектру респіраторних вірусних патогенів. Термін «мультиплексний ПЛР» пов'язаний з включенням більше одного праймерного набору для виявлення більш одного гену чи геномного сегменту для одного чи більше патогенів. Таким чином, використання мультиплексного аналізу дозволяє виявляти широкий діапазон респіраторних патогенів в єдиному тесті.

Які тести повинні використовуватися в осіб з підозрою на грип?

Для ведення хворих рекомендуються тести, котрі дають результати у короткі строки. Результати тестування повинні враховувати теоретичну імовірність грипозної інфекції на основі ознак і симптомів у пацієнта, чутливості і специфічності тесту, що використовується, і відомостей про наявність епідемії грипу в певній групі населення.

У порядку черговості, при наявності, рекомендуються наступні тести на грип:

1. ЗТ-ПЛР. Натепер це найбільш чутливий і специфічний метод тестування на грип з отриманням результатів впродовж 4–6 год після відбору зразка (табл. 2.2).
2. Імунофлуоресценція для виявлення антигену грипу використовується як скринінговий тест, результати якого доступні протягом декількох годин після відбору зразка. Виконання цього аналізу в значній мірі залежить від можливостей лабораторії та якості відібраного зразка (тобто зразки повинні включати клітини епітелію дихальних шляхів)
3. Комерційні швидкі тести для діагностики грипу. Доступні на цей час тести виявлення антигену надають результати впродовж 10–30 хв.

Таблиця 2.2 - Методи тестування на грип

Тест	Час до отримання результатів	Коментарі
ЗТ-ПЛР (звичайна ПЛР; ЗТ-ПЛР у режимі реального часу та мультиплексна ПЛР)	2 год	Висока чутливість і дуже висока специфічність;
Метод прямих флуоресцентних антитіл	2 – 4 год	Виявляє і розрізняє між собою грип А і В, а також А/В/інші збудники респіраторних інфекцій
Непряме флуоресцентне фарбування антитіл	2 – 4 год	Виявляє і відрізняє між собою грип А і В, а також А/В/інші збудники респіраторних інфекцій
Серологічні тести (інгібування гемаглютиніну, ІФА, фіксація комплементу і реакція нейтралізація)		Наявні лише у відповідних лабораторіях; не використовуються для своєчасного клінічного ведення; рекомендуються тільки для ретроспективної діагностики, спостереження або з науково-дослідною метою.
Діагностичні експрес-тести на грип	10 – 20 хв	Залежно від того, який тест використовується, може виявляти тільки грип А, виявляти і диференціювати грип А і В або виявляти, але не диференціювати грип А і В.
Виділення вірусів у культурі клітин	3 – 10 днів	Наявне лише у відповідних лабораторіях; не використовується для своєчасного клінічного ведення; рекомендується тільки для ретроспективної діагностики, спостереження або з науково-дослідною метою.

Завдання

1. Провести виявлення РНК коронавірусу SARS-CoV-2 методом ЗТ-ПЛР у реальному часі.

Загальна інформація:

Набір «Biocore® SARS-CoV-2» (посилання <https://biocortech.com/projects/biocore-sars-cov-2>) має однопобірковий одностадійний

формат, без окремого етапу синтезу кДНК на матриці вірусної РНК. Етап зворотної транскрипції (ЗТ) відбувається в реакційній суміші безпосередньо перед стартом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Проведення аналізу ґрунтується на TaqMan-технології методу ПЛР-РЧ. Для запобігання виникнення хибно-позитивних результатів внаслідок перехресної контамінації, а також контролю виділення РНК і проходження ЗТ-ПЛР-РЧ реакції, в Наборі використовуються урацил-ДНК-глікозилаза (УДГ, UDG) та внутрішній ендогенний контроль (ВК - ген RNase P людини).

Склад:

Набір «Bioscore® SARS-CoV-2» розрахований на 100 реакцій об'ємом 20 мкл. До складу Набору входять такі компоненти:

ПЛР-РЧ суміш (4x)

Суміш праймерів та зондів

НКЗ (негативний контрольний зразок)

ПКЗ (позитивний контрольний зразок)

Усі компоненти Набору, за виключенням ПКЗ, зберігаються при температурі від - 18 0С до - 24 0С. Після першого розморожування ПКЗ зберігається при температурі від +4⁰С до + 8⁰С.

Етапи проведення аналізу:

1. Екстракція РНК з досліджуваного матеріалу

Біологічним матеріалом для екстракції РНК слугують зразки з верхніх дихальних шляхів (мазки із зіву, мазки з носа, носоглоткові секрети), зразки з нижніх дихальних шляхів (мокротиння, секрети дихальних шляхів, рідина бронхоальвеолярного лаважа). Рекомендації щодо відбору, зберігання та транспортування клінічних зразків для тестування на SARS-CoV-2 описані в Стандартах медичної допомоги «Коронавірусна хвороба (COVID-19)», затверджених Наказом МОЗ України від 28.03.2020 № 722.

Увага! При підготовці зразків для дослідження необхідно дотримуватись стандартних заходів безпеки з метою мінімізації можливості інфікування та забруднення навколишнього середовища, керуючись при цьому діючими Стандартами медичної допомоги «Коронавірусна хвороба (COVID-19)», Державними санітарними нормами і правилами, а також тимчасовими рекомендаціями ВООЗ «Лабораторні вказівки щодо біобезпеки, пов'язані з коронавірусною хворобою (COVID-19)» («Laboratory biosafety guidance related to coronavirus disease (COVID-19)», <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-WPE-GIH-2021.1>).

Екстракцію РНК з біологічного матеріалу проводять за допомогою будь-якого комерційного набору, призначеного для виділення РНК згідно інструкції виробника.

За необхідності вихід та чистоту екстрагованої РНК можна перевірити методом спектрофотометрії шляхом визначення співвідношення довжин хвиль A260/280, яке має вкладатися у діапазон 1,8-2,0.

Увага! Допускається зберігання виділених зразків РНК протягом одного тижня при температурі -20°C та більш тривале зберігання при температурі $\leq -70^\circ\text{C}$.

2. Проведення процедури ЗТ-ПЛР-РЧ

Попередньо слід розморозити всі компоненти Набору, ретельно перемішати та осадити краплини короткочасним центрифугуванням.

Увага! Уникати потрапляння прямих сонячних променів на компоненти Набору. Розморожені компоненти тримати при кімнатній температурі лише протягом часу, необхідного для приготування реакційної суміші.

1. Реакційну суміш готувати із розрахунку:

5 мкл ПЛР-РЧ суміші (4x)

10 мкл суміші праймерів та зондів на один зразок.

2. Суміш ретельно перемішати на вортексі, краплини осадити короткочасним центрифугуванням.

3. Використовуючи одноразові наконечники з аерозольним бар'єром, у відібрані ПЛР пробірки внести по 15 мкл реакційної суміші.

4. Додати по 5 мкл РНК досліджуваних зразків, а в пробірки контролю ПЛР по 5 мкл контрольних зразків.

Увага! Згідно вимог до методу ПЛР у реальному часі рекомендовано кожен досліджуваний зразок аналізувати у двох повтореннях з етапу екстракції НК.

5. Прилад для проведення ПЛР-РЧ програмується згідно з інструкцією виробника, під час програмування враховуються наступні параметри:

- об'єм реакційної суміші 20 мкл;

- функція пасивного референтного барвника ROXTM для приладів лінійки Applied Biosystems відключена;

- детектори флуоресценції:

Назва мішені	Канали флуоресценції
ген ORF1ab SARS-CoV-2	FAM / Green
ген N SARS-CoV-2	VIC / Yellow
БК (внутрішній контроль)	JUN / ROX / Orange

- температурний профіль режиму ампліфікації

1 - 25°C 2 хв

2 - 53°C 10 хв

3 - 95°C 2 хв

4 – 40 циклів

95°C 5 с

60°C 30 с

6. Облік та інтерпретація результатів аналізу

Облік результатів ЗТ-ПЛР-РЧ аналізу проводиться за наявності або відсутності графіків ампліфікації та значень порогового циклу (Ct), що їм відповідає. За каналом FAM/Green реєструються дані, що відповідають гену ORF1ab, за каналом VIC/Yellow – гену N SARS-CoV-2, а за каналом JUN/ROX/Orange – ВК. Обробка отриманих даних здійснюється згідно інструкції до приладу. Прилад автоматично розраховує порогову (threshold line) та базову (baseline) лінії. За необхідності їх можна виставити у ручному режимі, окремо для кожного каналу. Порогова лінія встановлюється над рівнем «фонові флуоресценції», приблизно посередині логарифмічної фази графіків ампліфікації. Кінець базової лінії задається за 5 циклів до перетину графіком ампліфікації порогової лінії, а початок – за 12 циклів від кінця базової лінії. Результати аналізу вважаються достовірними, якщо контрольні зразки відповідають наступним критеріям:

Назва мішені	Канали флуоресценції	ПКЗ	НКЗ
ген ORF1ab SARS-CoV-2	FAM / Green	Ct < 35	Ct ≥ 37
ген N SARS-CoV-2	VIC / Yellow	Ct < 35	Ct ≥ 37
ВК (внутрішній контроль)	JUN / ROX / Orange	Ct < 35	Ct ≥ 37

Якщо значення негативного та позитивного контрольних зразків не відповідають зазначеним вимогам, то аналіз вважається некоректним і потребує повторного проведення.

Інтерпретація результатів ЗТ-ПЛР-РЧ аналізу щодо виявлення РНК коронавірусу SARS-CoV-2 проводиться згідно наступним показником:

Дослідний зразок		ВК	Результат
ORF1ab SARS-CoV-2 FAM / Green	N SARS-CoV-2 VIC / Yellow	JUN/ROX/Orange	
Ct < 37		Ct < 35	Вірус виявлено
Ct ≥ 37		Ct < 35	Вірус відсутній
Ct ≥ 37		Ct ≥ 35	Сумнівний результат

Зразок вважається позитивним на SARS-CoV-2 при наявності позитивного сигналу за будь-яким з генів (ORF1ab, N). У випадку виникнення сумнівного результату необхідно провести аналіз повторно, починаючи з етапу екстракції РНК.

За результатами на рисунку 2.1 зазначити позитивний та негативний контролі реакції, а також зразки у яких присутній та відсутній SARS-CoV-2

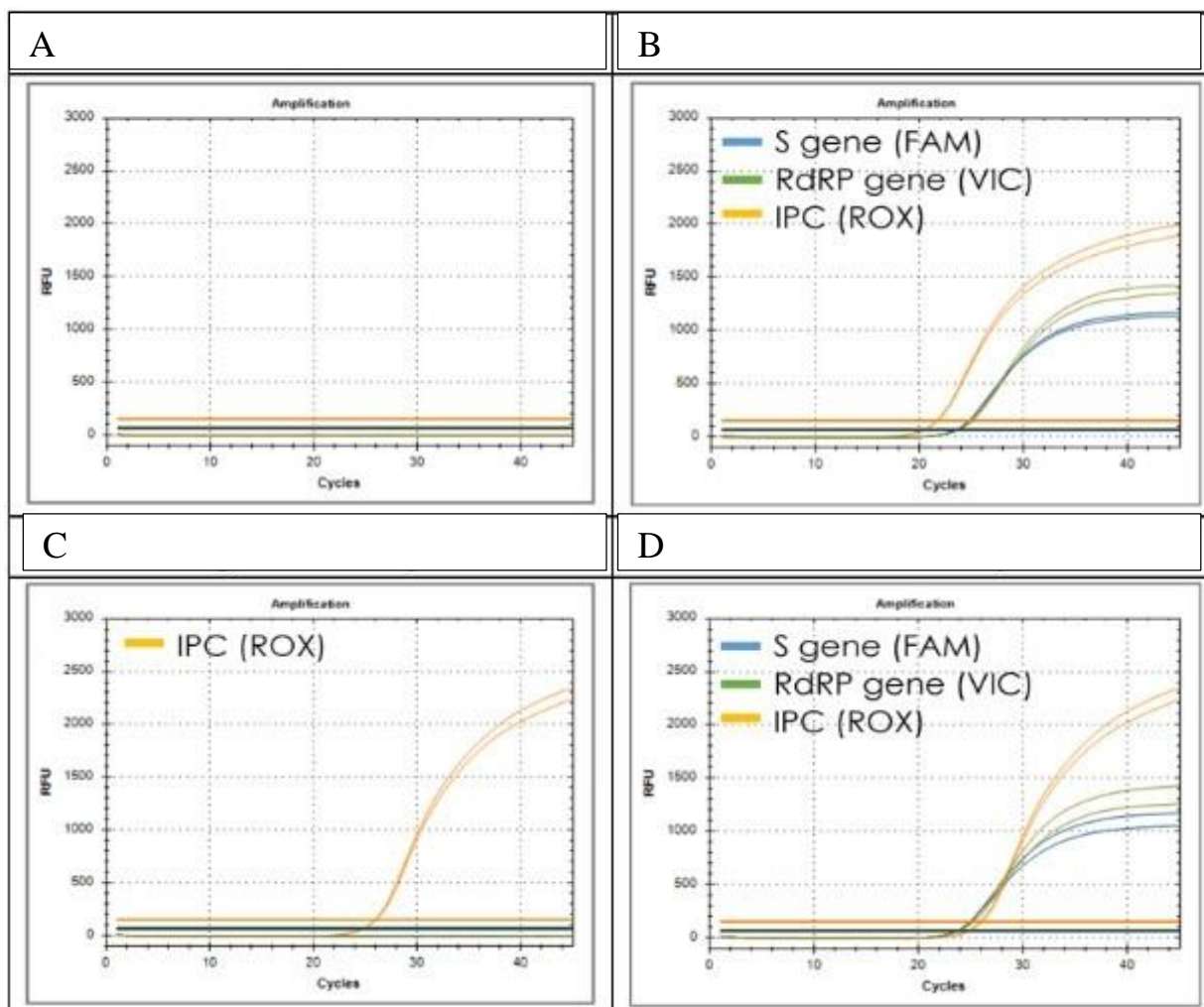


Рисунок 2.1 - Результати ЗТ-ПЛР-РЧ детекції SARS-CoV-2

2. Враховуючи характеристику методу діагностики збудників ГРВІ заповнити таблицю:

Вірусологічні методи	Серологічні методи	Молекулярні методи	Експрес методи

2. Запропонувати метод діагностики ГРВІ та обґрунтувати його вибір для пацієнта, який:

- А) має симптоми гострої респіраторної вірусної інфекції;
- Б) який контактував з хворим на ГРВІ місяць тому.

Практична робота 3. Лабораторна діагностика гострого вірусного гастроентериту. Ідентифікація збудників та виявлення антивірусних антитіл.

Мета роботи: ознайомитись з алгоритмом лабораторної діагностики гострого вірусного гастроентериту

Гастроентерит - це запалення слизової оболонки шлунку, тонкого і товстого кишечника. Більшість випадків є інфекційними. Зараження може відбуватися з їжею, водою, від людини до людини або при контракті з тваринами (зоонози). Діагноз встановлюється клінічно або за допомогою полімеразна ланцюгова реакції та серологічних методів. Лікування є підтримуючим і спрямованим на усунення симптомів, але деякі паразитарні та деякі бактеріальні інфекції вимагають спеціальної протівірусної терапії. Гострий гастроентерит є поширеним захворюванням, яке уражує людей будь-якого віку, з потенційно важкими ускладненнями у маленьких дітей і людей похилого віку, уразливих до зневоднення.

Збудників гострого вірусного гастроентериту поділяють на дві різні епідеміологічні групи: ті, що викликають поширену дитячу діарею в ранньому віці - ротавіруси, аденовіруси, каліцівіруси (норовірус і саповірус), астровіруси - і ті, що викликають епідемічні захворювання, насамперед норовіруси, а також астровіруси і ротавіруси групи В. Усі ці віруси викликають в основному схожий клінічний синдром діареї та блювання, позакишкові прояви захворювання зустрічаються нечасто.

Збудники гострого вірусного гастроентериту належать до різних родин, проникають у слизову оболонку кишкового тракту та розмножуються в ній. Їх можна згрупувати таким чином:

- віруси, що викликають локалізоване запалення на будь-якому рівні кишкового тракту, переважно на слизовій тонкій кишці, що призводить до гострого гастроентериту, наприклад, ротавіруси, каліцівіруси, аденовіруси, астровіруси;
- віруси, які розмножуються у будь-якому відділі ШКТ, і перш ніж викликати клінічне захворювання у органі-мішені спричиняють появу незначних кишкових симптомів або взагалі не викликаючи їх, наприклад, вірус кору, ентеровіруси (включаючи поліовіруси, віруси Коксакі, ентеровіруси, гепатит А та Е);
- віруси, які поширюються в кишково-шлунковий тракт на пізніх стадіях системного захворювання, як правило, у хазяїна з ослабленим імунітетом, наприклад, вірус імунодефіциту людини (ВІЛ), цитомегаловірус.

Відрізнити вірусний гастроентерит від гастроентериту, спричиненого бактеріальними агентами, лише за клінічними проявами часто буває важко, і

для встановлення конкретного діагнозу потрібні лабораторні дослідження. Як зазначалося раніше, ротавіруси, каліцівіруси, астровіруси та ентеральні аденовіруси є основними збудниками вірусних гастроентеритів. Їх розмір, морфологія віріонів і характеристика генома, класифікація та епідеміологічне значення підсумовані в таблиці 3.1, електронно-мікроскопічне зображення наведено на рисунку 3.1.

Таблиця 3.1 - Характеристика вірусів, які є причиною гастроентериту у людей

Вірус (родина) Класифікація	Морфологія та розмір	Геном	Таксономічне положення	Епідеміологія
Ротавіруси (<i>Reoviridae</i>)	Сферичні віріони 70-75 нм, без суперкапсидної оболонки	11 сегментів, дволанцюгові РНК	Групи А–Г, підгрупах групи А, типи G і P	Ендемічні у дітей, зимові спалахи в помірному кліматі, невеликі епідемії у людей похилого віку
Каліцівіруси (<i>Caliciviridae</i>)	Сферичні, ікосаедричного типу симетрії, без оболонки. Діаметром близько 30 нм.	1л РНК позитивної полярності	Два роди <i>Norovirus</i> <i>Sapovirus</i>	Епідемії в усіх вікових групах
Аденовіруси (<i>Adenoviridae</i>)	Сферичні, ікосаедричного типу симетрії, без оболонки. Діаметром близько 70 нм.	2л ДНК	Серотипи групи F 40, 41	Ендемічні у дітей
Астровіруси (<i>Astroviridae</i>)	Віріони сферичні, діаметром близько 30 нм. Ліпідна оболонка відсутня	1л РНК, позитивної полярності.	Вісім серотипів	Епідемії у дітей і дорослих

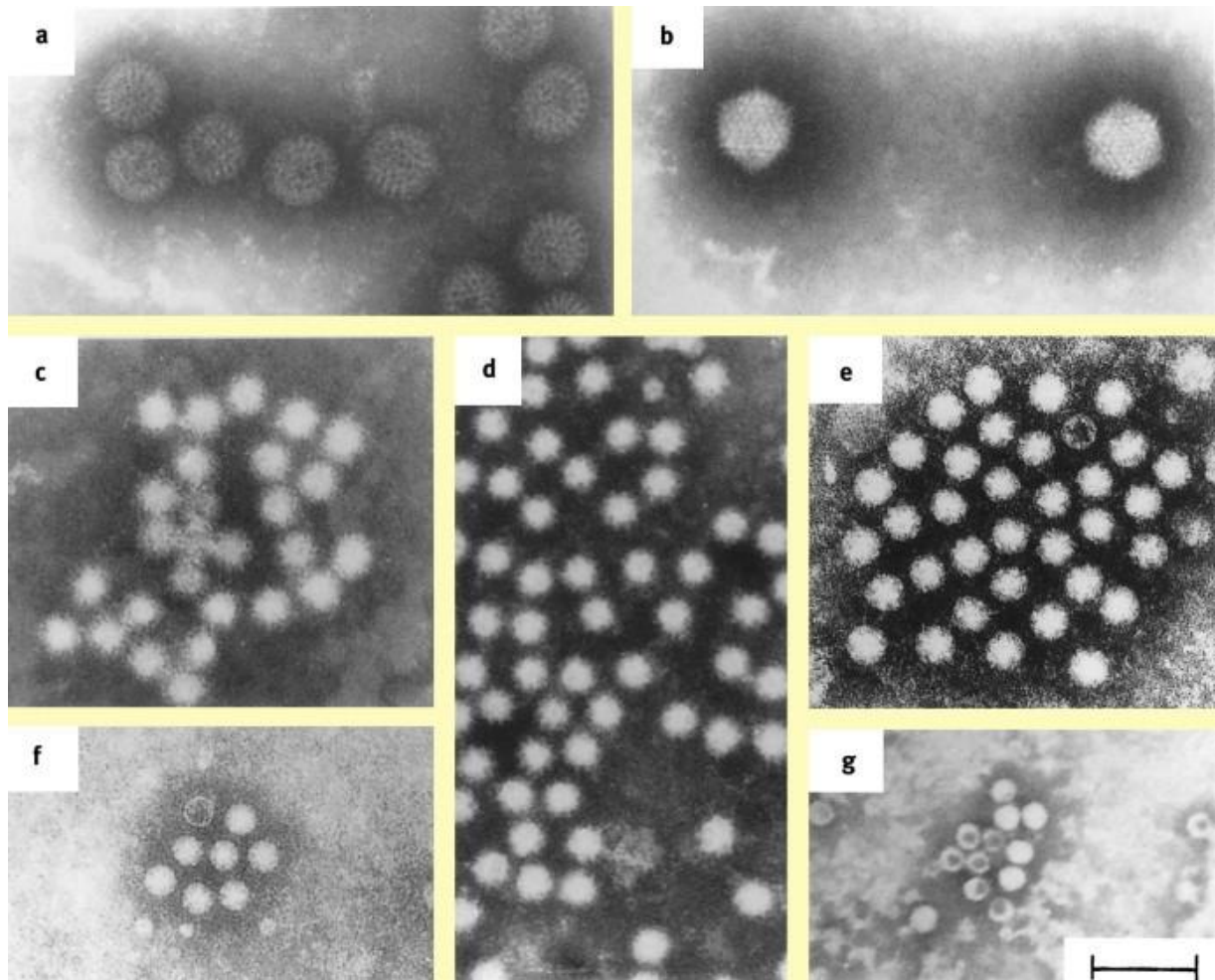


Рисунок 3.1 - електронні мікрофотографії: а - ротавірус, б - аденовірус, с - норовірус, d - каліцивірус, е - астровірус, f - ентеровірус, g - парвовірус, (Негативне контрастування 3% фосфорновольфрамисловою кислотою, рН 6,3; масштабна лінійка 100 нм). Джерело Zuckerman A, Banatvala J, Pattison J, eds. Principles and practice of clinical virology. 4th edn. Chichester: Wiley, 2000 © John Wiley & Sons Limited.

Діагностика вірусних гастроентеритів

Рутинне етіологічне обстеження пацієнтів, які звертаються для лікування гострого гастроентериту, не вимагається. Тестування може допомогти визначити специфічне лікування для пацієнтів із важким гастроентеритом, особливо з кривавим стільцем, хворобою (діареєю) мандрівників, тривалою хворобою або пацієнтам із хронічними захворюваннями.

Діагностика ротавірусної, астровірусної та ентеральної аденовірусної інфекцій відносно проста, оскільки велика кількість частинок утворюється та виділяється під час гострої фази захворювання. Норовіруси та саповіруси реплікуються в менших концентраціях і протягом коротших періодів. Діагностика здійснюється за допомогою електронної мікроскопії негативно забарвлених зразків, реакції пасивної аглютинації, вірусоспецифічного твердофазного

імуноферментного аналізу, а останнім часом виявлення вірусного генома за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) для аденовірусів і полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією (ЗТ)-ПЛР для ротавірусів, каліцівірусів і астровірусів.

Зразки для аналізу включають:

Кал – для прямого підтвердження наявності вірусу за допомогою серологічних методів (ELISA), молекулярних аналізів (ЗТ-ПЛР, ПЛР у реальному часі) або електронної мікроскопії. Також можна використовувати блювотні маси, продукти харчування, воду та зразки навколишнього середовища, але зі зниженою чутливістю.

Кров – на ознаки зневоднення, підвищення рівня Na^+ та креатиніну, вірусоспецифічні антитіла серологічним методом (ІФА).

Для лабораторної діагностики вірусів, що уражують кишково-шлунковий тракт використовують такі методи:

Ротавіруси - лабораторна діагностика інфекції базується на прямому виявленні вірусу у зразках фекалій, які можуть містити до 1×10^{10} вірусних частинок на грам калу. Комерційно доступні тести на основі імуноферментного аналізу демонструють високу специфічність і чутливість і є найбільш часто використовуваними в клінічних лабораторіях і лабораторіях закладів охорони здоров'я. Інші методи виявлення антигену, такі як латексна аглютинація та швидкі тести, доступні для діагностики на місці. Важливо, що наявністю захворювання краще корелює з виявленням антигенів ротавірусів, ніж з виявленням вірусних нуклеїнових кислот (наприклад, за допомогою ЗТ -ПЛР), тому що при виявленні вірусної нуклеїнової кислоти, також ідентифікуються субклінічні інфекції.

Каліцівіруси (рід *Norovirus*) - ЕМ (імуносорбент ЕМ), ЗТ-ПЛР, ЗТ-ПЛР у реальному часі, Саузерн-блот-гібридизація, серологічні методи, швидкі тести.

Аденовіруси - ЕМ, ІФА

Астровіруси - ЕМ, ІФА, ЗТ-ПЛР

Ентеровіруси (вірусний гепатит А, вірусний гепатит Е) - основним методом діагностики є виявлення у крові вірусоспецифічних антитіл IgM, що свідчать про гостре захворювання. З додаткових тестів може бути застосовано виявлення РНК вірусу за допомогою ЗТ-ПЛР.

Найчастіше з молекулярних методів діагностики вірусних гастроентеритів використовується мультиплексна панель ПЛР, яка дозволяє визначити декілька збудників одночасно.

Широкого застосування набули швидкі тести на основі касет і смужок, які доступні для ротавірусів, аденовірусів, норовірусів і астровірусів, включаючи мультиплексні варіанти.

Завдання

1. Виявлення антигену аденовірусу людини методом «сендвіч» ІФА

Матеріали:

Діагностичний набір для виявлення антигену аденовірусу людини, куди входять всі необхідні реагенти (окрім води), в т.ч.:

- планшет із іммобілізованими моноклональними антитілами до антигену аденовірусу людини
 - Позитивний контроль (К+) – буферний розчин, що містить інактивованій антиген аденовірусу людини.
 - Негативний контроль (К-) – буферний розчин, що не містить антиген аденовірусу людини.
 - кон'югат: моноклональні антитіла до аденовірусу людини, кон'юговані з пероксидазою хрому;
 - 25-кратний концентрат фосфатно-сольового буферу з твіном.
 - Концентрат розчину для зразків.
 - Розчин для розведення кон'югату
 - Субстратний буферний розчин
 - Стоп-реагент
 - Субстрат/хромоген: перекис водню/тетраметилбензидин.
- Самплери, наконечники, вода, фільтрувальний папір.

Хід роботи:

1. Перед роботою дістати набір з холодильника, відкрити та витримати при кімнатній температурі (18-25°C) не менш, ніж 1 год.
2. Приготувати екстракт 20%-ої суспензії калу на робочому розчині для зразків:
 - a. Зразки калу відібрати у стерильні пробірки з кришками, об'ємом 10 мл.
 - b. 1 г калу збовтати із 5 мл робочого розчину для зразків для отримання гомогенного завису.
 - c. Центрифугувати 3000 об/хв протягом 30 хв.
 - d. За допомогою піпетки обережно відібрати надосадову рідину у чисту пробірку
 - e. Свіжі зразки, приготовані таким чином, можуть зберігатись 24 год за температури 2-8°C, або 3 місяці при -20 °C, але при цьому слід уникати повторного заморожування.

3. Відкрити пакет з планшетом, установити в рамку потрібну кількість стріпів. Зайві стріпи зразу покласти знову в пакет, випустити повітря і застібнути його.
4. Приготувати 50 мл промивочного буферу (48 мл води + 2 мл розчину ФСБ-Т х25). Негативний та позитивний контролі, кон'югат (АТ2+фермент), хромоген (тетраметилбензидин) готові для використання.
5. Скласти схему ІФА.
6. У лунку В-1 внести 100 мкл позитивного контролю (К+).
7. У лунки С-1, D-1 внести по 100 мкл негативного контролю (К-).
8. В усі інші лунки (окрім А-1, залежно від кількості зразків) внести по 100 мкл відповідного зразку (кожний раз різним наконечником).
9. Додати в кожну лунку по 100 мкл робочого розчину моноклональних антивірусних антитіл кон'югованих пероксидазою хрому.
10. Заклеїти стріпи липкої плівкою. Інкубувати в термостаті (37°C) протягом 30 хв.
11. Зняти і утилізувати липку плівку. Вміст лунок ОБЕРЕЖНО видалити в дезрозчин. Промокнути стріпи фільтрувальним папером. Промити лунки, додавши в них по 400 мкл буферу відмивки(30 с, х5). Промокнути стріпи фільтрувальним папером.
12. Додати в усі контрольні/дослідні лунки та А-1 по 100 мкл робочого розчину тетраметилбензидину.
13. Витримати планшет в темряві при 18-25°C (37°C) протягом 25 хв.
14. Додати в усі контрольні/дослідні лунки та А-1 по 100 мкл стоп-реагента у тій же послідовності, що й тетраметилбензидин
15. Виміряти значення оптичної густини в лунках при довжині хвилі 450 нм (нуль виставляється по А-1).
16. Обрахувати результати, починаючи з контролів. Значення К+ повинно бути неменше 1,0. Середнє значення К- не повинно перевищувати 0,20. Обрахувати критичне значення поглинання: $OP_{крит} = OP_{сер.К-} + 0.2$.
17. Якщо контролі задовольняють умовам, обрахуйте зразки. Зразок вважається позитивним, якщо $OP_{зрз} \geq OP_{крит}$. Зразок вважається негативним, якщо $OP_{зрз} < OP_{крит}$.
18. Результати занотувати в робочому журналі. За результатами аналізу встановити номери зразків, які містять антигени аденовірусу людини.

2. Запропонувати метод діагностики ГКВІ та обґрунтувати його вибір для пацієнта, який:

- А) має симптоми гострої кишкової вірусної інфекції
- Б) який контактував з хворим на ГКВІ місяць тому

РОЗДІЛ 2. ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА ПЕРСИСТЕНТНИХ ВІРУСНИХ ІНФЕКЦІЙ

Практична робота 4. Лабораторна діагностика вірусного гепатиту серологічними та молекулярними методами.

Мета роботи: ознайомитись з алгоритмом лабораторної діагностики збудників вірусного гепатиту серологічними та молекулярними методами.

Вірусний гепатит – вірусне захворювання печінки, яке призводить до її запалення з наступним розвитком симптомів жовтяниці та підвищенням рівня печінкових ферментів. Вірусний гепатит – форма гепатиту, яка може бути гострою або хронічною. Він має різні прояви та різні наслідки залежно від конкретного збудника. Причиною вірусного гепатиту можуть бути щонайменше п'ять вірусів. Вірусні інфекції печінки, що вони спричиняють, відрізняються за шляхами інфікування, клінічною картиною та патогенезом. Визначення типу гепатиту проводять за допомогою спеціальних лабораторних тестів.

Існує 5 основних вірусів гепатиту, які відносяться до типів А, В, С, D і Е. Ці п'ять типів вірусів викликають найбільше занепокоєння через тягар хвороб і смертей, які вони спричиняють, а також потенціал виникнення спалахів і поширення епідемій. Більшість гепатотропних вірусів призводять до розвитку гострих інфекцій, що мають самообмежуючий перебіг, хоча перебіг гепатиту В, С та Е може бути хронічним. Існують різні генотипи вірусів, причому деякі з них більш помітні в певних географічних місцях, ніж інші. Більше того, різні генотипи мають різні показники сероконверсії до хронічного гепатиту та краще реагують на конкретне лікування порівняно з іншими. Хронічний гепатит може призвести до важких ускладнень, а саме до цирозу печінки та гепатоцелюлярної карциноми.

Більшість гепатотропних вірусів є РНК-вірусами, за винятком гепатиту В, який є ДНК-вірусом. Гепатити А і Е передаються фекально-оральним шляхом, тоді як гепатити В, С і D переважно передаються гемоконтактно.

Вірус гепатиту А (ВГА) зазвичай передається через воду та їжу, забруднену фекаліями інфікованої особи. Фактором ризику розвитку гепатиту є також неналежна особиста гігієна.

Вірус гепатиту В (ВГВ) унікальний тим, що він може передаватися вертикально. Інші способи включають передавання вірусу зі спермою та вагінальними виділеннями під час статевого контакту, з інфікованими рідинами,

зокрема кров'ю, в тому числі і під час ін'єкційного введення наркотиків або інвазивних медичних маніпуляцій, тощо.

Вірус гепатиту С (ВГС) до розробки протоколів скринінгу крові тривалий час був основною причиною проблем, пов'язаних з переливанням крові та її компонентів. Натепер в основному його передавання відбувається під час вживання наркотиків (внутрішньовенного або інтраназального), проведення медичних ін'єкційних маніпуляцій та статевим шляхом. Хоча в найменш розвинутих країнах передавання вірусу гепатиту С здебільшого пов'язане з переливанням крові.

Вірус гепатиту D (ВГD) за своїм механізмом передачі подібний до ВГВ і ВГV, оскільки в основному передається через кров або статевим шляхом. Однак ВГD є унікальним серед інших вірусів, тому що його реплікація залежить від вірусу гепатиту В – для успішної репродукції він потребує поверхневий антиген цього вірусу (HBsAg).

Вірус гепатиту E (ВГE), як і вірус гепатиту A, найчастіше передається через забруднені воду та продукти харчування. Існує 4 генотипи ВГE. Генотипи 1 і 2 зазвичай викликають спалахи, що передаються через воду, пов'язані з забрудненням фекаліями системи водопостачання, та фекально-оральним шляхом від людини до людини. Генотипи 3 і 4 зазвичай викликають спорадичні випадки захворювання. Передача відбувається аліментарним шляхом і може включати вживання сирого або недовареного м'яса; випадки були пов'язані з вживанням свинини, оленів і молюсків. Як правило ВГE викликає гострий вірусний гепатит. Однак було зафіксовано, що у пацієнтів з ослабленим імунітетом (включаючи реципієнтів трансплантованих органів, пацієнтів, які отримують хіміотерапію при онкологічних захворюваннях, та ВІЛ-інфікованих пацієнтів) генотип 3 ВГE може спричинити хронічний гепатит.

Діагностика вірусних гепатитів

Лабораторні дослідження зазвичай виявляють підвищення рівня амінотрансфераз і підвищений білірубін. Гострий гепатит проявляється зі збільшеними рівнями амінотрансфераз в 1000 разів. Хронічний гепатит проявляється по-різному з рівнями амінотрансфераз, як правило, підвищеними не більше ніж у 2-10 разів вище верхньої межі норми.

У діагностиці гострих і хронічних вірусних гепатитів використовують імуноферментний метод (ІФА) і полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР).

ВГА: основним методом діагностики є виявлення у крові специфічних для ВГА антитіл IgM, що свідчать про гостре захворювання. З додаткових тестів може бути виявлення РНК вірусу гепатиту А за допомогою ЗТ-ПЛР.

Наявність антивірусних IgG, але відсутність антивірусних IgM свідчить про зараження в минулому.

ВГВ: є декілька діагностичних маркерів ВГВ, які дозволяють встановити тип захворювання, це поверхневий антиген HBsAg, який локалізований у гідрофільному шарі на поверхні віріону, анти-HBs (IgM, IgG) – антитіла до поверхневого антигену HBsAg, анти-HBc IgM, анти-HBc IgG - антитіла до корового HBc-антиген, який ніколи не присутній у вільній формі в крові і є виключно внутрішнім компонентом віріонів. Його можна виявити в заражених вірусом гепатоцитах. HBeAg є також серцевинним антигеном, похідним HBc-антигену, його називають розчинним антигеном. Поява HBe-антигену в крові пов'язана з реплікацією вірусу, анти-HBe (IgM, IgG) - антитіла до HBe-антигену. HBx-антиген – трансактиватор, є ще одним антигеном ВГВ, накопичення якого в крові пов'язують з розвитком раку печінки.

Діагностика ВГВ має кілька етапів.

1. Визначення поверхневого антигену вірусу гепатиту В — HBsAg. Наявність HBsAg свідчить про гострий або хронічний гепатит, носійство вірусу.

2. Додаткові обстеження, зокрема: визначення anti-HBs, HBsAg, IgM anti-HBc, anti-HBc, HBeAg, anti-HBe, ДНК ВГВ, наявність антивірусних антитіл IgM та IgG до вірусу гепатиту D (HDVAb), РНК ВГД.

3. Ступінь пошкодження печінки (фіброз, цироз) визначають переважно за допомогою неінвазивних методів.

На гостру інфекцію вказує наявність поверхневого антигену HBsAg, антивірусних антитіла IgM до корового антигену anti-HBc та поверхневого антигену HBsAg та вірусного навантаження ДНК ВГВ. Однак існує також «період сереногативного вікна», протягом якого поверхневий антиген зникає ще до появи антитіл IgG до поверхневого антигену HBsAg. Хронічна інфекція ВГВ визначається наявністю поверхневого антигену HBsAg більше 6 місяців, антивірусних антитіл IgG до корового антигену anti-HBc і ДНК ВГВ, а також відсутністю антитіл до поверхневого антигену HBsAg.

Тести, спрямовані на виявлення ВГС:

Серологічні тести (спрямовані на виявлення анти-ВГС)

– ІФА

– Рекомбінантний імуноблотинг (Recombinant immunoblot assay - RIBA-2)

– Швидкі імунохроматографічні тести (ІХТ)

Молекулярні методи (РНК)

-- Кількісний метод виявлення РНК ВГС ЗТ-ПЛР (вірусне навантаження)

– Генотипування (визначення штамів ВГС)

На гостру інфекцію ВГС вказує наявність РНК ВГС з або без наявності антивірусних антитіл IgM. На хронічну інфекцію вказує наявність РНК ВГС з наявністю антивірусних антитіла IgG. Якщо пацієнт одужав (з наявністю або без наявності антитіл до ВГС), РНК ВГС у нього не детектується.

Отже, діагностика ВГС має кілька етапів.

1. Серологічний скринінг на антитіла до ВГС. Виявлення антитіл (IgG, IgM) до ВГС може свідчити як про гостру чи хронічну стадію захворювання, так і про перенесений у минулому вірусний гепатит С. Для виявлення антитіл можуть застосовуватись швидкі діагностичні тести.
2. Якщо підтверджено наявність антитіл до ВГС, для визначення діагнозу необхідно перевірити наявність РНК ВГС або вірусоспецифічних антитіл до ВГС. Це обстеження допомагає з'ясувати, чи наявна ВГС-інфекція у людини.
3. У разі підтвердження хронічної інфекції ВГС потрібно визначити генотип вірусу - важливо для обрання схеми лікування.
4. Ступінь пошкодження печінки (фіброз, цироз) визначають переважно за допомогою неінвазивних методів.

ВГD: наявність антивірусних антитіл IgM та IgG (HDVAb) вказує на інфікування вірусом, що підтверджують шляхом виявлення РНК вірусу в сироватці крові. Визначення гепатиту D є актуальним лише для осіб х носіїв вірусу гепатиту B.

ВГЕ: основним методом діагностики є виявлення у крові специфічних для ВГЕ антитіл IgM, що свідчать про гостре захворювання. З додаткових тестів може бути виявлення РНК вірусу гепатиту E за допомогою ЗТ-ПЛР. Наявність антивірусних IgG, але відсутність антивірусних IgM свідчить про минуле зараження.

Диференційна діагностика вірусних гепатитів включає інші форми гепатиту, такі як ішемічний, токсичний (в т.ч. алкогольний) гепатит, гостру непрохідність жовчовивідних шляхів, аутоімунні порушення.

Завдання

1. Провести виявлення HBeAg вірусу гепатиту B методом «сендвіч» ІФА

Матеріали:

Діагностичний набір для виявлення HBeAg в сироватці (плазмі) крові, куди входять всі необхідні реагенти (окрім води), в т.ч.:

- планшет з іммобілізованими на внутрішній поверхні лунок моноклональними антитілами до HBeAg;
- Позитивний контроль (K+) – буферний розчин на основі рекомбінантного HBeAg, готовий до використання;

- Негативний контроль (К-) – на основі інактивованої сироватки крові людини, що не містить HBeAg;
- Кон'югат: моноклональні антитіла до HBeAg, кон'юговані з пероксидазою хрому;
- 25-кратний концентрат фосфатно-сольового буферу з твіном;
- Концентрат розчину для зразків;
- Розчин для розведення кон'югату;
- Субстратний буферний розчин;
- Стоп-реагент;
- Субстрат/хромоген: перекис водню/тетраметилбензидин;
Самплери, наконечники, вода, фільтрувальний папір.

Хід роботи:

1. Перед роботою дістати набір з холодильника, відкрити та витримати при кімнатній температурі (18-25°C) не менш, ніж 1 год.
2. Відкрити пакет з планшетом, установити в рамку потрібну кількість стріпів. Зайві стріпи зразу покласти знову в пакет, випустити повітря і застібнути його.
3. Приготувати 50 мл промивочного буферу (48 мл води + 2 мл розчину ФСБ-Т х25). Негативний та позитивний контролю, кон'югат (АТ2+фермент), хромоген (тетраметилбензидин) готові для використання.
4. Скласти схему ІФА.
5. В лунку В-1 внести 50 мкл позитивного контролю (К+).
6. В лунки С-1, D-1 внести по 50 мкл негативного контролю (К-).
7. В усі інші лунки (окрім А-1, залежно від кількості зразків) внести по 50 мкл відповідного зразку (кожний раз різним наконечником).
8. Додати в кожен лунку по 100 мкл робочого розчину моноклональних антивірусних антитіл кон'югованих пероксидазою хрому.
9. Заклеїти стріпи липкої плівкою. Інкубувати в термостаті (37°C) протягом 60 хв або в термостатуючому шейкері протягом 30 хв з інтенсивністю перемішування 700 об/хв.
10. Зняти і утилізувати липку плівку. Вміст лунок ОБЕРЕЖНО видалити в дезрозчин. Промокнути стріпи фільтрувальним папером. Промити лунки, додавши в них по 400 мкл буферу відмивки (30 с, х5). Промокнути стріпи фільтрувальним папером.
11. Додати в усі контрольні/дослідні лунки та А-1 по 100 мкл робочого розчину тетраметилбензидину.
12. Витримати планшет в темряві при 18-25°C (37°C) протягом 25 хв.
13. Додати в усі контрольні/дослідні лунки та А-1 по 100 мкл стоп-реагента у тій же послідовності, що й тетраметилбензидин

14. Виміряти значення оптичної густини в лунках при довжині хвилі 450 нм (нуль виставляється по А-1).
15. Обрахувати результати, починаючи з контролів. Значення К+ повинно бути неменше 1,0. Середнє значення К- не повинно перевищувати 0,15. Обрахувати критичне значення поглинання: $OP_{крит} = OP_{сер.К-} + 0.2$.
16. Якщо контролі задовольняють умовам, обрахуйте зразки. Зразок вважається позитивним, якщо $OP_{зрз} \geq OP_{крит}$. Зразок вважається негативним, якщо $OP_{зрз} < OP_{крит}$.
17. Результати занотувати в робочому журналі. За результатами аналізу встановити номери зразків, які містять НВсАg вірусу гепатиту В та вказати при якому діагнозі детектується присутність цього показника.

2. Виявлення в крові людини антитіл IgG, специфічних до НВсАg антигену вірусу гепатиту В, методом непрямого ІФА

Матеріали:

Діагностичний набір для виявлення антитіл IgG, специфічних до НВсАg антигену вірусу гепатиту В у крові людини, куди входять всі необхідні реагенти (окрім води), в т.ч.:

- планшет з вже іммобілізованим на внутрішній поверхні лунки рекомбінантним НВсАg антигеном вірусу гепатиту;
- Позитивний контрольний зразок (К+) на основі інактивованої сироватки крові людини, що містить IgG до НВсАg;
- Негативний контрольний зразок (К-) на основі інактивованої сироватки крові людини, що не містить IgG до НВсАg;
- Кон'югат: моноклональні антитіла до IgG людини, кон'юговані з пероксидазою хрому, готовий до використання;
- Субстрат/хромоген: перекис водню/тетраметилбензидин;
- Стоп реагент, готовий до використання;
- Самплери, наконечники, вода, фільтрувальний папір.

Хід роботи:

1. Перед роботою дістати набір з холодильника, відкрити та витримати при кімнатній температурі (18-25°C) не менш, ніж 1 год.
2. Відкрити пакет з планшетом, установити в рамку потрібну кількість стріпів. Зайві стріпи зразу покласти знову в пакет, випустити повітря і застібнути його.
3. Приготувати 50 мл промивочного буферу (48 мл води + 2 мл розчину ФСБ-Т х25). Негативний та позитивний контролі, кон'югат (АТ2+фермент), хромоген (тетраметилбензидин) готові для використання.

4. Скласти схему ІФА.
 5. В лунку В-1 внести 100 мкл позитивного контролю (К+).
 6. В лунки С-1, D-1 внести по 100 мкл негативного контролю (К-).
 7. В усі інші лунки (окрім А-1, залежно від кількості зразків) внести по 90 мкл розчину для розведення сироваток (РРС) (одним наконечником). Розчин РРС перед нанесенням струсити!
 8. Додати в кожен лунку по 10 мкл відповідного зразку (кожний раз різним наконечником) та відпіпетувати.
 9. Заклеїти стріпи відповідним шматком липкої плівки. Інкубувати в термостаті (37°C) протягом 30 хв.
 10. Зняти і утилізувати липку плівку. Вміст лунок ОБЕРЕЖНО видалити саплером в дезрозчин. Промокнути стріпи фільтрувальним папером. Промити лунки, додавши в них по 200 мкл буферу відмивки (30 с, х5). Промокнути стріпи фільтрувальним папером.
 11. Додати в усі контрольні/дослідні лунки по 100 мкл кон'югата.
 12. Заклеїти стріпи відповідним шматком липкої плівки. Інкубувати в термостаті (37°C) протягом 30 хв.
 13. Промити планшет, як описано в п.10.
 14. Додати в усі контрольні/дослідні лунки та А-1 по 100 мкл розчину ТБМ плюс (хромоген).
 15. Витримати планшет в темряві при 18-25°C протягом 25 хв.
 16. Додати в усі контрольні/дослідні лунки та А-1 по 100 мкл стоп-реагенту в тій же послідовності, що й ТБМ плюс.
 17. Виміряти значення оптичної густини в лунках при довжині хвилі 450 нм (нуль виставляється по А-1).
 18. Обрахувати результати, почавши з контролів. Середнє значення К- не повинно перевищувати 0,20 одиниць оптичної щільності. Обрахувати критичне значення поглинання: $OP_{крит} = OP_{сер.К-} + 0.3$. значення К+ повинно бути не меншим за $OP_{крит} \times 3$ і не менше 1.0 одиниць оптичної щільності.
 19. Якщо контролі задовольняють умовам, обрахуйте зразки. Зразок вважається позитивним, якщо $OP_{зрз} \geq OP_{крит}$. Зразок вважається негативним, якщо $OP_{зрз} < OP_{крит}$. Зразок вважається невизначеним, якщо $OP_{зрз}$ знаходиться в діапазоні від $0.8 \times OP_{крит}$ до $OP_{крит}$.
 20. Результати занотувати в робочому журналі. За результатами визначення IgG та результатами визначення HBeAg вірусу гепатиту В в крові пацієнтів поставити їм діагноз.
- 3. За результатами імуноферментного аналізу встановити діагноз для трьох пацієнтів P1, P2 та P3 використовуючи данні про діагностичні маркери вірусних гепатитів***

Діагностичні маркери ВГА

Діагностичний маркер	Гострий гепатит А	Перенесена інфекція або вакцинація
Антивірусні IgM проти ВГА	+	-
Антивірусні IgG проти ВГА	-	+

Діагностичні маркери ВГВ

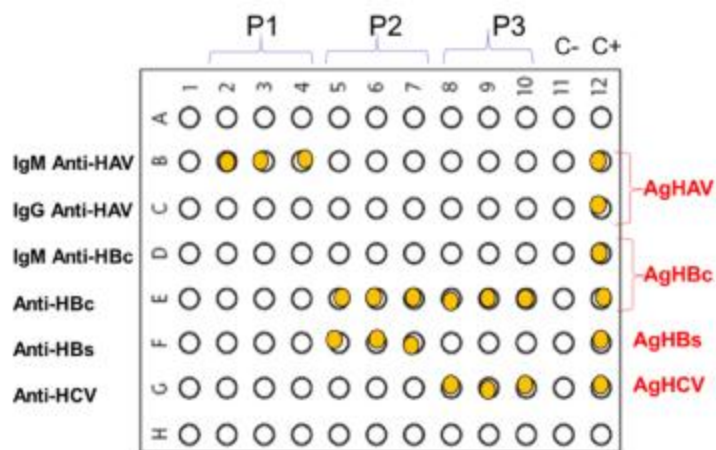
Діагностичний маркер*	Гострий гепатит В	Хронічний гепатит В	Реконвалесцент гепатиту В	Поствакцинальний імунітет
HBsAg	+	+	-	-
Anti-HBs	-	-	+	+
Anti HBc IgM	+	-	-	-
Anti HBc IgG	-	+	±	-
HBeAg	±	±	-	-
Anti HBe	-	±	±	-
HBV-DNA	+	+	-	-

*HBsAg поверхневий антиген ВГВ, HBeAg внутрішній антиген ВГВ, anti-HBs – антитіла до HBsAg, anti-HBc – антитіла до HBcAg, anti-HBe антитіла до HBeAg.

Діагностичні маркери ВГС

Діагностичний маркер	Гострий гепатит С	Хронічний гепатит С	Перенесена інфекція або вакцинація
Вірусспецифічні антитіла до ВГА	+		-
РНК ВГС	-		+

Результатами імуноферментного аналізу сироватки крові пацієнтів.



Завдання 4. Провести виявлення РНК вірусу гепатиту С методом ЗТ-ПЛР у реальному часі.

Загальна інформація:

До складу Набору «Віосоре® HCV кількість» входять такі компоненти:

ПЛР-РЧ суміш (4х)

Суміш праймерів та зондів

ПКЗ (позитивний контрольний зразок)

ТЕ буферний розчин

Всі компоненти Набору, за виключенням ПКЗ, зберігаються при температурі від - 18 0С до - 24 0С. Після першого розморожування ПКЗ зберігається при температурі від +4⁰С до + 8⁰С.

Етапи проведення аналізу:

1. Екстракція РНК з досліджуваного матеріалу

Набір дозволяє проводити *in vitro* детекцію РНК-послідовностей у таких зразках, як плазма крові, біоптат печінки тощо. Отримання зразків з організму пацієнта проводиться згідно Методичних рекомендацій «Порядок забору, транспортування та зберігання матеріалу для дослідження методом полімеразної ланцюгової реакції» МОЗ України, (Наказ МОЗ №662 від 30.07.2013, див. <https://zakon.rada.gov.ua/rada/show/v0662282-13/card2#Card>).

Після забору біологічний матеріал має зберігатися за температури, вказаної в Методичних рекомендаціях МОЗ щодо цього типу клінічного матеріалу, у стерильному й ретельно закритому лабораторному посуді. Транспортування клінічного зразка має проводитись у **лізуючому транспортному середовищі**, крім крові, що транспортується у відповідних вакуумних пробірках.

Екстракцію РНК з біологічного матеріалу проводять за допомогою будь-якого комерційного набору, призначеного для виділення РНК згідно інструкції виробника.

2. Проведення процедури ЗТ-ПЛР-РЧ

Попередньо слід розморозити всі компоненти Набору, ретельно перемішати та осадити краплини короткочасним центрифугуванням.

Реакційну суміш готувати із розрахунку:

5 мкл ПЛР-РЧ суміші (4х)

5 мкл суміші праймерів та зондів на один зразок.

5 мкл ТЕ буферний розчин

Суміш ретельно перемішати на вортексі, краплини осадити короткочасним центрифугуванням.

Використовуючи одноразові наконечники з аерозольним бар'єром, у відібрані ПЛР пробірки внести по 15 мкл реакційної суміші.

Додати по 5 мкл РНК досліджуваних зразків, а в пробірки контролю ПЛР по 5 мкл контрольних зразків-позитивного контрольного зразка (РС) і 5 ультрачистого ТЕ буферу в якості негативного контролю (NC).

При використанні будь-якої моделі термоциклера слід дотримуватися наступного температурного режиму при проведенні зворотної транскрипції / ампліфікації цільових фрагментів НК:

Стадія 1 (зворотна транскрипція): 50° С впродовж 5 хв.

Стадія 2 («гарячий старт» ДНК-полімерази): 95° С впродовж 10 хв.

Стадія 3 (ампліфікація цільової послідовності), 5 циклів:

Крок 1: 95° С впродовж 15 с.

Крок 2: 60° С впродовж 15 с

Крок 3: 72° С впродовж 20 с.

Стадія 4 (ампліфікація цільової послідовності), 30 циклів:

Крок 1: 95° С впродовж 5 с.

Крок 2: 60° С впродовж 5 с. (детекція відбувається на цьому етапі).

Крок 3: 72° С впродовж 20 с.

Детекція флуоресцентного сигналу відбувається за температури 60° С за двома каналами, зокрема:

за каналом FAM виявляють специфічні послідовності HCV;

за каналом Cy5 – внутрішній контроль.

Налаштування обладнання виконується за детальними інструкціями виробника приладу.

Контроль постановки ПЛР в реальному часі. Перед початком аналізу основного масиву даних, отриманих в постановці, необхідно оцінити загальну якість її проведення по позитивному (РС) та негативному (NC) контрольним зразкам. Значення Ct, які свідчать про валідність отриманих результатів, мають бути наступними:

Назва мішені	Канали флуоресценції	РС	NC
Специфічна послідовність HCV	FAM	Ct ≥ 30	відсутній
Внутрішній контроль	Cy5	Ct ≥ 30	відсутній

Інтерпретація результатів ЗТ-ПЛР-РЧ аналізу щодо виявлення РНК HCV проводиться згідно наступним показникам:

Дослідний зразок FAM	Внутрішній контроль Су5	Результат
Ct < 30	Будь які данні	Вірус виявлено
Відсутній	Ct ≤ 30	Вірус відсутній
Відсутній	Ct > 30	Сумнівний результат

У випадку виникнення сумнівного результату необхідно провести аналіз повторно, починаючи з етапу екстракції РНК.

Практична робота 5. Лабораторна діагностика герпесвірусних інфекцій.

Діагностичні маркери герпесвірусних інфекцій.

Мета роботи: ознайомитись з алгоритмом лабораторної діагностики збудників герпесвірусних інфекцій.

Дев'ять видів герпесвірусів, які інфікують людину, належать до родини *Orthoherpesviridae*. Для представників цієї родини характерні сферичні віріони розміром 150–200 нм, до складу яких входять щільно конденсована лінійна двохланцюгова ДНК, ікосаедричний капсид, тегумент та ліпідна оболонка, що містить глікопротеїни. Герпесвіруси добре адаптовані до своїх хазяїв, клінічно важкі форми захворювання спостерігаються в дуже ранньому віці, при інфікуванні плоду, імуносупресії або інфікуванні альтернативного хазяїна (наприклад, інфікуванні людей вірусом герпесу мавп). Характерною особливістю герпесвірусів є здатність до встановлення латентної інфекції в чітко визначених клітинах хазяїв після первинної гострої інфекції і можливість до реактивації з часом.

Клінічні синдроми, що виникають при первинній інфекції, можуть значно відрізнятися від синдромів, викликаних реактивацією цих вірусів. Герпесвіруси швидко інактивуються поза організмом хазяїна; таким чином, передача зазвичай вимагає тісного контакту. У осіб з латентною інфекцією вірус може реактивуватися, не викликаючи жодних симптомів; у таких випадках відбувається безсимптомне виділення і ефективне передавання збудника.

Незважаючи на те, що віруси герпесу генетично і структурно подібні, вони викликають широкий спектр клінічних синдромів, які загалом не збігаються. Натепер відомо, що деякі герпесвіруси здатні призводити до розвитку злоякісних новоутворень. Так, встановлено, що вірус Епштейна-Барр (EBV) спричинює лімфому Беркітта, назофарингеальну карциному, В-клітинні лімфоми і рак шлунка, а герпесвірус людини типу 8 (HHV-8) – саркому Капоші.

Лабораторна діагностика герпесвірусних інфекцій

Матеріал для дослідження:

- Клінічні – зіскоб із везикул рогівки, шкіри, слина при ураженні слизової рота, цереброспінальна рідина
- *Секційні* – шматочки головного та спинного мозку

Методи діагностики:

Вірусологічні – досліджують зібраний матеріал на наявність віріонів

Традиційна ізоляція вірусів на КК (HeLa, Vero) чи КЕ (12 денні, ХАО), на лаб. тваринах (миші – ураження у мозок, черевну порожнину).

У КК розвиток осередкових цитопатичних змін, заокруглення клітин, утворення синцитіїв.

У тварин – мишей – судоми, спастична хода, скуйовджена шерсть, смерть.

У КЕ через 40-48 годин множинні дрібні (1мм) опуклі або великі (3-5 мм) непрозорі бляшки на ХАО).

Пряма електронна мікроскопія – виявлення вірусу при морфологічному дослідженні.

Цитологічний метод дослідження (тест Тцанка). Під час проби Тцанка скальпелем зішкрібають основу та краї везикул, потім фарбують матеріал за Райтом або Гімзою. Наявність гігантських багатоядерних клітин є ознакою герпесвірусної інфекції.

Серологічні методи дослідження – визначення наявності вірусоспецифічних IgM, IgG та авідність IgG (табл.5.1).

Методи молекулярної гібридизації та ПЛР – детекція вірусної ДНК

Таблиця 5.1 - Діагностичні маркери при герпесвірусній інфекції

Маркери герпесвірусної інфекції	Опис
АТ класу IgM до вірусів простого герпесу 1/2 типів (Anti – HSV 1/2 IgM)	Маркери первинної інфекції
АТ класу IgG до вірусу простого герпесу 1 (Anti – HSV1 IgG)	Маркери наявності в організмі герпесвірусної інфекції
АТ класу IgG до вірусу простого герпесу 2 (Anti – HSV2 IgG)	Маркери наявності в організмі герпесвірусної інфекції
АТ класу IgM до капсидного антигену вірусу Епштейна-Барр (EBV VCA IgM)	Специфічні антитіла, що є маркером первинної інфекції або реактивації хронічної
АТ класу IgG до капсидного антигена вірусу Епштейна-Барр (EBV VCA IgG)	Перенесеної чи реактивованої хронічної інфекції
АТ класу IgG до нуклеарного антигену вірусу Епштейна-Барр (EBNA IgG)	Маркери перенесеної інфекції або реактивації хронічної

АТ класу IgM до цитомегаловірусу (Anti CMV IgM)	Маркери гострого первинного інфекційного процесу
АТ класу IgG до цитомегаловірусу (Anti CMV IgG)	Маркери пізньої стадії інфекції. Після перенесеної інфекції зберігаються пожиттєво

Завдання

1. Провести детекцію в крові людини антитіл IgG (IgM), специфічних до цитомегаловірусу людини (HCMV) методом непрямого ІФА

Матеріали:

Діагностичний набір для виявлення антитіл IgG (IgM) у крові людини, куди входять всі необхідні реагенти (окрім води), в т.ч.:

- планшет з вже іммобілізованим рекомбінантним білком HCMV (антигеном);
- кон'югат: антитіла до IgG (IgM) людини, кон'юговані з пероксидазою хрому;
- субстрат/хромоген: перекис водню/тетраметилбензидин.

Самплери, наконечники, вода, фільтрувальний папір.

Хід роботи:

1. Перед роботою дістати набір з холодильника, відкрити та витримати при кімнатній температурі (18-25°C) не менш, ніж 1 год.
2. Відкрити пакет з планшетом, установити в рамку потрібну кількість стріпів. Зайві стріпи зразу покласти знову в пакет, випустити повітря і застігнути його.
3. Приготувати 50 мл буферу відмивки (48 мл води + 2 мл розчину ФСБ-Т х25). Негативний та позитивний контролю, кон'югат (АТ2+фермент), хромоген (тетраметилбензидин) готові для використання.
4. Скласти схему ІФА.
5. В лунку В-1 внести 100 мкл позитивного контролю (К+).
6. В лунки С-1, D-1 внести по 100 мкл негативного контролю (К-).
7. В усі інші лунки (окрім А-1, залежно від кількості зразків) внести по 50 мкл розчину для розведення сироваток (PPC) (одним наконечником). Розчин PPC перед нанесенням струсити!
8. Додати в кожну лунку по 50 мкл відповідного зразку (кожний раз різним наконечником) та відпіпетувати.
9. Заклеїти стріпи липкою плівкою. Інкубувати в термостаті (37°C) протягом 30 хв.

10. Зняти і утилізувати липку плівку. Вміст лунок ОБЕРЕЖНО вилити в дезрозчин. Промокнути стріпи фільтрувальним папером. Промити лунки, додавши в них по 200 мкл промивочного буферу (30 с, х5). Промокнути стріпи фільтрувальним папером.

11. Додати в усі контрольні/дослідні лунки по 100 мкл кон'югата.

12. Заклеїти стріпи липкою плівкою. Інкубувати в термостаті (37°C) протягом 30 хв.

13. Промити планшет, як описано в п.10.

14. Додати в усі контрольні/дослідні лунки та А-1 по 100 мкл розчина ТБМ плюс (хромоген).

15. Витримати планшет в темряві при 18-25°C (37°C) протягом 25 хв.

16. Додати в усі контрольні/дослідні лунки та А-1 по 100 мкл стоп-реагента у тій же послідовності, що й ТБМ плюс.

17. Виміряти значення оптичної густини в лунках при довжині хвилі 450 нм (нуль виставляється по А-1).

18. Обрахувати результати, почавши з контролів. Середнє значення К- не повинно перевищувати 0,25. Обрахувати критичне значення поглинання: $OP_{крит} = OP_{сер.К-} + 0.3$. значення К+ повинно бути не меншим за $OP_{крит} \times 3$.

19. Якщо контролі задовольняють умовам, обрахуйте зразки. Зразок вважається позитивним, якщо $OP_{зрз} \geq OP_{крит}$. Зразок вважається негативним, якщо $OP_{зрз} < 0.8 \times OP_{крит}$. Зразок вважається невизначеним, якщо $OP_{зрз}$ знаходиться в діапазоні від $0.8 \times OP_{крит}$ до $OP_{крит}$.

20. Результати занотувати в робочому журналі. За результатами визначення IgG (IgM) в крові пацієнтів поставити їм діагноз щодо гострої чи перенесеної раніше хвороби (або повторного інфікування/реактивації/одужання).

2. Заповнити таблицю лабораторної діагностики герпесвірусних інфекцій.

Звернути увагу на етап відбору матеріалу для різних вірусів:

Назва вірусу	Матеріал для досліджень	Метод дослідження

Практична робота 6. Лабораторна діагностика, маркери ідентифікації ВІЛ та контролю розвитку і лікування ВІЛ-інфекції.

Мета роботи: ознайомитись з алгоритмом лабораторної діагностики ВІЛ-інфекції та маркерами контролю її розвитку та лікування.

Вірус імунодефіциту людини (ВІЛ) є ретровірусом. Ретровіруси — це РНК-віруси з оболонкою, для яких характерний механізм реплікації через зворотну транскрипцію для отримання копій ДНК, які надалі інтегруються в геном клітини-хазяїна.

Існує 2 типи ВІЛ: ВІЛ-1 і ВІЛ-2. ВІЛ-1 викликає більшість випадків ВІЛ-інфекції у всьому світі, а ВІЛ-2 - значну частку інфекцій у деяких частинах Західної Африки. У певних регіонах Західної Африки поширені обидва віруси, які можуть одночасно інфікувати пацієнтів. ВІЛ-2 є менш вірулентним, ніж ВІЛ-1.

За оцінками ВООЗ (UNAIDS: Глобальна статистика щодо ВІЛ та СНІДу — Інформаційний бюлетень <https://www.unaids.org/en/resources/fact-sheet>), у 2021 році приблизно 38 мільйонів людей у всьому світі, включаючи 1,7 мільйона дітей (<15 років), жили з ВІЛ; 54% становили жінки та дівчата. Приблизно 25,6 мільйонів (близько 67%) людей, які живуть з ВІЛ, живуть в країнах Африці, розташованих на південь від Сахари. Хоча натепер у цих країнах Африки, що розташовані на південь від Сахари, порівняно з дуже високими показниками 1990-х років рівень захворюваності на ВІЛ помітно знижується; незважаючи на це, залишаються важливі прогалини для виконання стратегії ВООЗ «Прискорена стратегія» щодо припинення епідемії СНІДу до 2030 року.

Завдяки міжнародним зусиллям станом на 2021 рік приблизно 28,7 мільйонів людей, які живуть з ВІЛ, мали доступ до антиретровірусної терапії (порівняно з 7,8 мільйонів у 2010 році), що значно зменшило смертність і передачу ВІЛ в багатьох країнах.

Стійкість ВІЛ в навколишньому середовищі

- У навколишньому середовищі, при висушуванні лімфоїдних клітин, інфікованих ВІЛ, вірусна активність зникає протягом декількох діб.
- При висушуванні безклітинної рідини з додаванням людської плазми вірус гине при температурі 23-27°C через 7 днів.
- У рідкому середовищі при температурі 23-27°C вірус зберігає активність протягом 15 днів, при 36-37°C - 11 днів.
- У крові, призначеній для переливання, вірус переживає роки, а в замороженій сироватці його активність зберігається до 10 років.

- ВІЛ швидко гине при використуванні дезинфікуючих засобів, ультрафіолетового опромінювання;
- При нагріванні вище 56°C втрачає активність через 30 хв.

Принципи профілактики ВІЛ-інфекції:

- Доконтактна профілактика ВІЛ (ДКП) — прийом антиретровірусних препаратів для зниження ризику інфікування ВІЛ. ДКП є додатковим до бар'єрної контрацепції методом профілактики для людей, які мають високий ризик інфікування ВІЛ. ДКП приймають перорально щодня по одній таблетці.
- Постконтактна профілактика ВІЛ— націлена на попередження розвитку ВІЛ-інфекції після ймовірного контакту.
- Постконтактну профілактику ВІЛ необхідно розпочати якомога швидше протягом перших годин та не пізніше 72 годин після контакту. Зазвичай курс постконтактної профілактики ВІЛ триває 28 днів.
- Лікування ВІЛ як профілактика – людина, яка має вірусне навантаження менше 40 копій РНК/мл, не може інфікувати іншу людину принцип Н=Н: «не визначається, значить не передається»
- Профілактика у немовлят- профілактика передачі ВІЛ-інфекції від матері до дитини

Методи лабораторної діагностики ВІЛ-інфекції поділяють на:

Методи діагностики інфекції:

- Скринінгові для визначення антитіл: імуноферментний аналіз (ІФА), в т.ч. швидкі тести
- Підтверджувальні для визначення антитіл: імунний блотинг (ІБ);
- Методи ампліфікації НК: якісна ПЛР (ДНК-ПЛР) в культурі лімфоцитів крові
- Методи контролю розвитку інфекції:
- Методи ампліфікації НК: кількісна ЗТ-ПЛР (РНК-ПЛР, вірусне навантаження) в плазмі
- Тестування з визначення резистентності ВІЛ до антиретровірусних препаратів системою генотипування ВІЛ-1 ViroSeq™HIV-1
- Визначення імунного статусу: CD4

Порівняно з клінічним або імунологічним спостереженнями, вірусне навантаження забезпечує раннє та більш точне виявлення неефективного лікування. Вимірювання вірусного навантаження може допомогти розрізнити медикаментозну резистентність і відсутність прихильності до лікування при поєднанні з надійною консультацією щодо посилення прихильності. Вірусне навантаження може бути непрямим показником ризику передачі та ефективності профілактичних втручань як на індивідуальному, так і на популяційному рівнях.

Молекулярні методи детекції ВІЛ дозволяють виявити як провірусну ДНК ВІЛ, так і геномну РНК. Деякі аналізи розроблені для переважного виявлення ДНК або РНК, але оскільки ДНК ВІЛ та РНК ВІЛ є копіями одного і того ж генетичного матеріалу, їх також важко розрізнити.

Однак дослідження з визначення рівня вірусного навантаження призначене для вимірювання **кількості РНК ВІЛ** у плазмі. Плазма є кращим типом зразка для проведення дослідження з визначення рівня вірусного навантаження. Існують альтернативні типи зразків з визначення рівня вірусного навантаження, включаючи сухі краплі крові, приготовані з цільної крові, сухі краплини плазми крові, сироватка крові та цільна венозна кров.

Як біологічний матеріал для вірусологічних тестів можуть використовуватися:

- для визначення провірусної ДНК ВІЛ – цільна кров або суха краплина крові;
- для визначення геномної РНК ВІЛ і антигену р24 – плазма крові або суха краплина крові.

Обстеження на ВІЛ-інфекцію передбачає проведення досліджень у декілька етапів: скринінговий етап (виявлення серологічних маркерів ВІЛ), верифікаційний етап для підтвердження наявності серологічних маркерів ВІЛ (підтверджувальний етап), ідентифікаційний етап (обстеження при взятті під медичний нагляд або перед призначенням АРТ особі з позитивним ВІЛ-статусом) (рис. 6.1).

1. Етап скринінгу А1. Результат скринінгу (А1–): надання довідки про негативний ВІЛ-статус.

2. Результат скринінгу (А1+): верифікаційний етап А2. Після отримання результату (А1+) слід провести тест А2.

3. У випадку отримання двох позитивних результатів тестів (А1+; А2+) слід провести верифікацію з використанням тесту А3.

Якщо отримано позитивний результат тестування (А1+; А2+; А3+): повідомлення про діагноз ВІЛ-інфекції. За результатами досліджень слід надати довідку про результати досліджень із виявлення серологічних маркерів ВІЛ.

Якщо отримано сумнівний результат тестування (А1+; А2+; А3–): повідомлення про невизначений ВІЛ-статус. Слід провести повторне тестування через 14 діб.

4. На етапі верифікації отримано результат тестування (А1+; А2–): проведення повторного тестування з використанням тесту А1.

Якщо отримано негативний результат повторного тестування А1 (А1–; А2–): повідомлення про негативний ВІЛ-статус.

Другій клінічній стадії притаманні легкі клінічні прояви: помірна втрата маси тіла невизначеної етіології (<10% ймовірної або визначеної маси тіла), рецидивуючі інфекції дихальних шляхів (синусит, тонзиліт, отит середнього вуха, фарингіт), оперізувальний герпес, ангулярний хейліт, рецидивуючі виразки ротової порожнини, папульозне свербляче висипання, грибкова інфекція нігтів, себорейний дерматит. Зазвичай такі хворі потребують амбулаторного супроводу. Кількістю клітин $350 \text{ клітин/мм}^3 \leq \text{CD4} \leq 500 \text{ клітин/мм}^3$

Третя клінічна стадія відповідає середньо важким і важким клінічним проявам, які вимагають спеціалізованих досліджень, таким як волосиста лейкоплакія ротової порожнини, легеневий туберкульоз, тяжкі бактеріальні інфекції (пневмонія, емпієма, піоміозит, інфекція кісток або суглобів, менінгіт, бактеріємія). Обстеження та лікування таких хворих потребує госпіталізації. Кількістю клітин $200 \text{ клітин/мм}^3 \leq \text{CD4} \leq 350 \text{ клітин/мм}^3$

Четверта клінічна стадія хвороби може супроводжуватися синдромом виснаження, спричиненим ВІЛ-інфекцією, пневмонією, спричиненою *Pneumocystis jirovecii*, рецидивуючою тяжкою бактеріальною пневмонією, хронічною інфекцією вірусу простого герпесу, кандидозом стравоходу, позалегеневим туберкульозом, саркомою Капоші, цитомегаловірусною інфекцією, важкими ураженнями внутрішніх органів та потребує термінового інтенсивного лікування. Кількістю клітин $\text{CD4} \leq 200 \text{ клітин/мм}^3$

Контроль розвитку та інфікування ВІЛ-інфекції включає:

визначення рівня вірусного навантаження через 6 місяців після початку АРТ, на 12-му місяці і надалі кожні 12 місяців для оцінювання ефективності лікування. Залежно від показників вірусного навантаження впроваджують подальші заходи відповідно до «Стандарту медичної допомоги «ВІЛ-інфекція»» (рис 6.2).

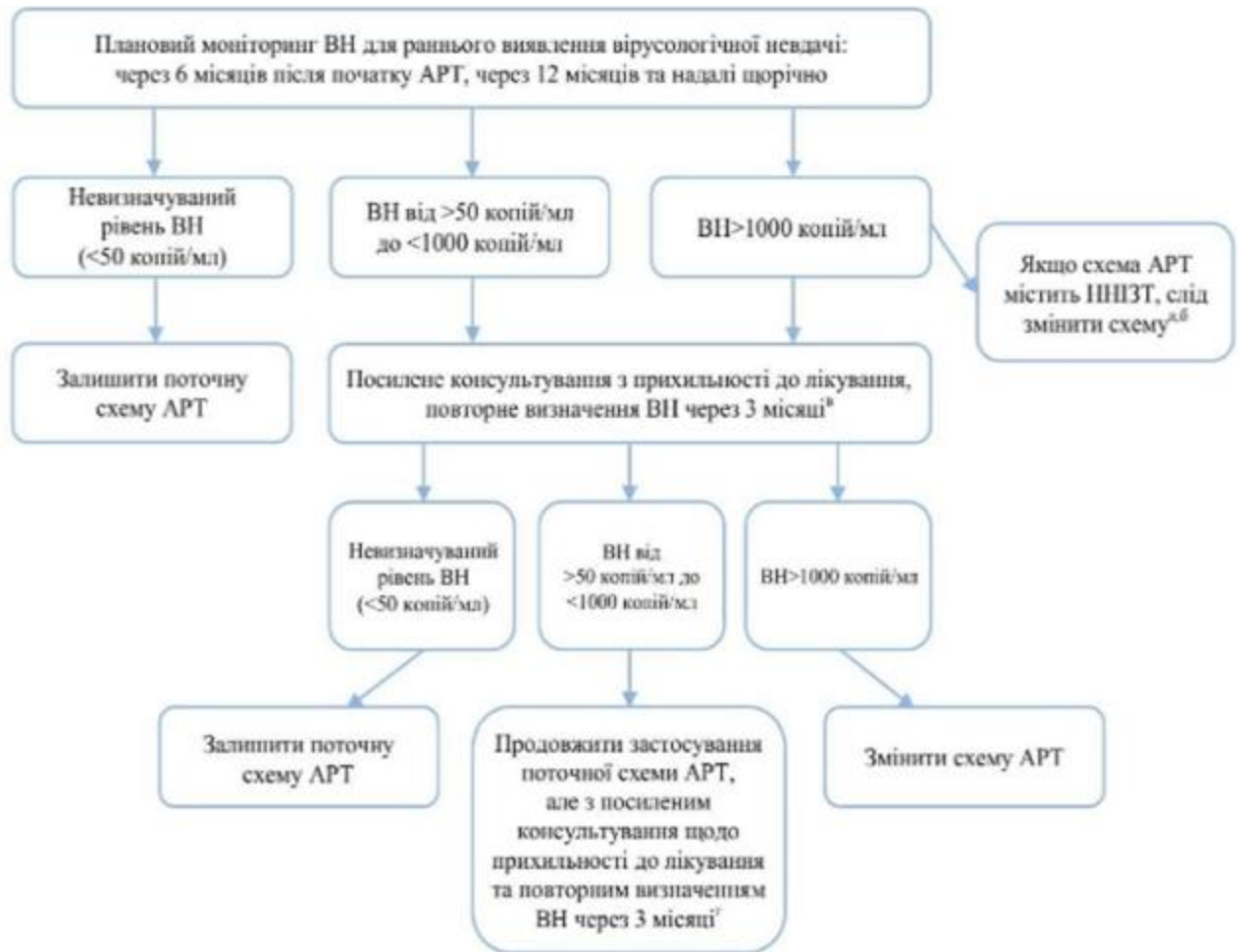


Рис.6.2 - Клінічний моніторинг ефективності лікування ВІЛ-інфекції.*

*«Стандарту медичної допомоги «ВІЛ-інфекція»».

Визначення кількості клітин CD4 слід проводити на початку АРТ та кожні 6 місяців до досягнення стабільності на фоні АРТ. За умови регулярного визначення рівня вірусного навантаження у дорослих та підлітків, досягнення вірусологічної супресії на фоні АРТ та показника кількості клітин CD4 > 350 клітин/мкл, моніторинг кількості клітин CD4 можна припинити.

- Якщо вірусне навантаження не завжди доступне, для оцінки неефективності лікування слід використовувати CD4-клітини та клінічний моніторинг.
- Крім того, для визначення вірусного навантаження можна використовувати зразки сухої краплі венозної або капілярної цільної крові.
- Поріг в 1000 копій/мл має використовуватись для визначення неефективності лікування при використанні зразків сухої краплі крові, як аналогічно визначено для тестування з використанням плазми.

При вірусологічній невдачі слід проводити тестування на резистентність до схеми антиретровірусної терапії другого ряду.

Пацієнтів, в яких змінено схему АРТ, один раз на місяць проводять оцінювання переносимості та дотримання режиму лікування. Дослідження з

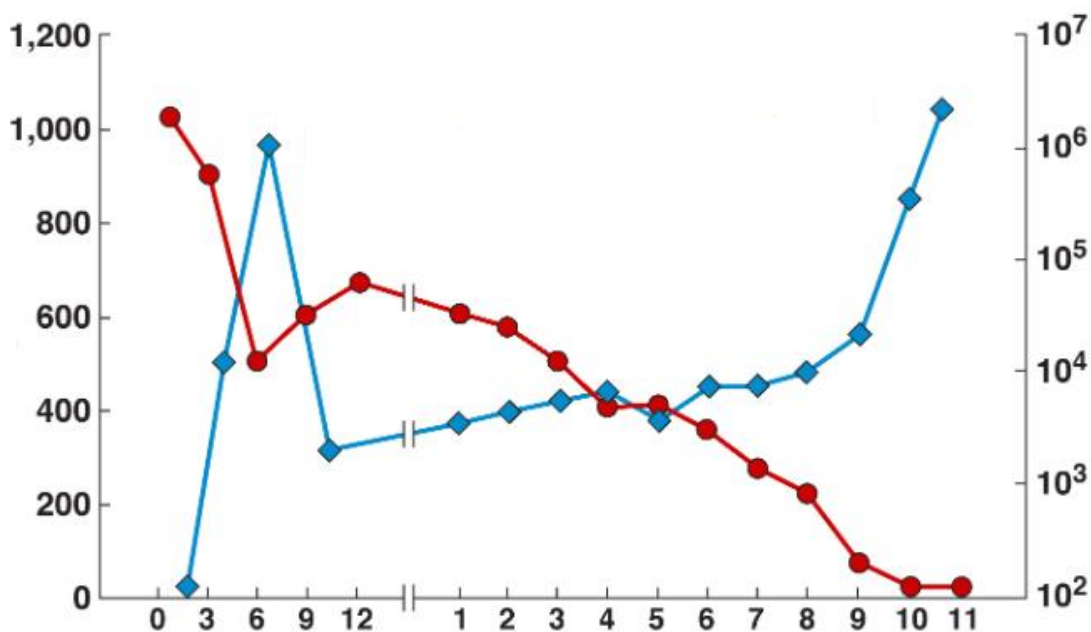
визначення рівня вірусного навантаження проводять через 3 місяці після початку прийому нової схеми АРТ. Якщо через 3 місяці після зміни схеми АРТ досягнуто невизначуваного рівня вірусного навантаження, відсутні нові скарги або відхилення у лабораторних показниках, повертаються до звичайного клінічного та лабораторного моніторингу. Якщо виявлено вірусологічну невдачу при застосуванні схеми АРТ другого ряду, проводять тестування на резистентність методом генотипування, аналізують повний анамнез АРТ, обирають схему АРТ третього ряду.

Завдання

1. Скласти протокол лабораторної діагностики ВІЛ-інфекції

Записати в протокол схему лабораторної діагностики ВІЛ для пацієнта, який отримав позитивний результат при проведенні першого аналізу на ВІЛ (А1+) та негативний результат при проведенні другого аналізу на ВІЛ (А2-) та зазначити можливі варіанти діагнозу.

2. Використовуючи графік розвитку ВІЛ-інфекції, виконати наступні завдання:



А) підписати вісі координат;

Б) за результатами вірусного навантаження та кількістю CD4 клітин підписати клінічні стадії ВІЛ інфекції.

Практична робота 7. Швидкі тести: сучасні серологічні методи діагностики вірусних інфекцій.

Мета роботи: ознайомитись з принципом виконання швидких тестів для лабораторної діагностики гострих та персистентних вірусних інфекцій

Історія швидких тестів бере свій початок при розробці методів для забезпечення портативних діагностичних інструментів, якими можуть керувати безпосередньо лікарі або навіть самі пацієнти. Перший швидкий тест датується 1962 роком, коли був розроблений новий метод вимірювання глюкози в крові. Наступна віха була досягнута в 1976 році, коли Управління з контролю за якістю харчових продуктів і медикаментів (FDA) США схвалило три домашніх тести на вагітність. Ці тести були випущені на ринок наступного року, і з того часу продажі постійно зростали.

Швидкі тести (ШТ) — це медичні діагностичні тести, які можна швидко та легко виконати. ШТ придатні для попереднього або екстреного медичного обстеження та для використання в медичних закладах з обмеженими ресурсами. Вони також дозволяють тестування на місці надання первинної медичної допомоги на те, що раніше можна було виміряти лише лабораторним тестом. Вони надають результати того ж дня протягом двох годин, зазвичай приблизно через 20 хвилин. ШТ використовуються як для визначення різних біологічно активних молекул, так і для етіологічної діагностики збудників інфекційних захворювань людини. Вони засновані на тих же принципах імунологічних реакцій, що і класичні ІФА тест-системи. Як це не парадоксально, але швидкість є лише однією (а не основною) зі списку ознак, які сприяють визначенню такого роду аналітичних методів. Зокрема, простота, портативність і низька вартість разом зі швидкістю є неминучими вимогами.

Вимоги до швидких тестів:

- Простота використання
- Реагенти та витратні матеріали стабільні при зберіганні та використанні
- Результати повинні відповідати встановленому лабораторному методу
- Пристрій разом із пов'язаними реагентами та витратними матеріалами безпечний у використанні

Переваги швидких тестів:

- Швидші результати тестів призводять до більш своєчасного сортування або лікування
- Менший об'єм зразка (новонароджених, педіатричних, у відділенні інтенсивної терапії)

- Тести в різних віддалених місцях відповідають різноманітним медичним потребам
- Зменшення перед-аналітичних проблем, пов'язаних з обробкою зразка (наприклад, згортання крові, центрифугування тощо)
- Скорочення тривалості перебування в лікарні
- Скорочення часу оформлення у приймальному відділенні лікарень
- Оптимізація прийому ліків
- Скорочення часу післяопераційної допомоги
- Скорочення часу у відділенні невідкладної допомоги
- Оптиміальна клінічна ефективність та використання часу персоналу

Існуючі швидкі тести можна розділити на декілька груп:

1. Швидкі тести засновані на принципах аглютинації еритроцитів, часточок латексу або желатину, вкритих антигенами (АГ) вірусу або специфічними антитілами (АТ).
2. Швидкі тести, які є дот-варіантом твердофазного ІФА ("Dot ELISA" - тести), і при використанні яких на тверду фазу наносять досліджуваний зразок у вигляді крапки.
3. Швидкі імунохроматографічні тести, використовують метод латерального або капілярного потоку (lateral flow test) при використанні яких досліджуваний зразок наносять на поверхню твердої фази-мембрани з попередньо нанесеним на ній реагентом, а результат аналізу має вигляд забарвленої смуги

Клінічним матеріалом для дослідження ІХА тестами є:

- для діагностики ГРВІ — мазок з носа, змив або виділення з носа;
- для діагностики ГКІ — фекалії;
- для діагностики гепатитів В і С — кров, сироватка крові, плазма крові;
- для діагностики ВІЛ інфекції — кров, сироватка крові, плазма крові, слина.

Швидкі діагностичні тести відносяться до групи діагностичних засобів, класифікованих за характеристиками продуктивності, а не за конкретним аналітом або тестовою платформою. Такі аналізи мають відносно короткий час виконання, дають результати для прийняття клінічних рішень і дозволяють вести лікування на місці надання медичної допомоги. ШТ доступні в різних тестових форматах і на платформах для різних цілей виявлення. ШТ призначені для виявлення патоген-специфічних антигенів або антивірусних антитіл хазяїна проти певних патогенів.

Отже, швидкі тести розроблені на основі імунологічної взаємодії АГ збудників та АТ до них, більшість з цих тестів імунохроматографічні. Їх точність, чутливість і специфічність досягає 99%. Результат тестування можна отримати вже через 10-15 хвилин. Вони не потребують дорогого лабораторного

устаткування і висококваліфікованого персоналу, а також метрологічного контролю. Ці тести раціональні (1 тест=1 людина) і прості у використанні.

Проте вони мають свої обмеження: застосовуються виключно, як методи якісної діагностики, і не можуть визначати концентрацію досліджуваних речовин. Швидкі тести не виявляють антигенів або антитіл, якщо вони присутні в зразку в кількості, яка знаходиться за межею чутливості методу.

Застосування швидких тестів дає можливість вчасно встановити діагноз, а це значить – своєчасно призначити адекватне лікування і запобігти розвитку ускладнень, і таким чином допомагає перешкодити подальшому поширенню інфекцій. Особливо необхідними вони є при наданні допомоги постраждалим в ургентних ситуаціях.

Завдання

1. Підібрати та виконати швидкі тест у залежності від збудника та стадії захворювання.

Використовуючи знання про збудників вірусних захворювань та інструкції виробників, підібрати та провести швидкі тести для наступних дослідних зразків:

А – зразок пацієнта з підозрою на гостру респіраторну вірусну інфекцію, 5-й день захворювання;

Б – зразок пацієнта з підозрою на гостру кишкову вірусну інфекцію, 5-й день захворювання;

В – зразок пацієнта з підозрою на вірусний гепатит з гемоконтактним механізмом передачі.

Перелік тестів: Швидкий тест для діагностики грипу А та В, швидкий тести для діагностики рота та аденовірусної інфекцій, швидкий тест для діагностики гепатиту С, швидкий тест для діагностики гепатиту А, швидкий тест HBV COMBO, швидкий тест для ідентифікації SARS-CoV2.

2. Використовуючи швидкі тести, провести діагностику ВІЛ-інфекції.

Використовуючи інформацію щодо діагностики ВІЛ-інфекції (практична робота №6), запропонувати алгоритм встановлення ВІЛ-статус особи з використанням швидких тестів та провести скринінговий етап дослідження при визначенні ВІЛ-статусу особи із застосуванням тесту першої лінії згідно СОПІ у «Збірнику стандартних операційних процедур з впровадження системи епіднагляду за недавною ВІЛ інфекцією» (2021р):

I. Скринінговий етап дослідження при визначенні ВІЛ-статусу особи із застосуванням швидкого тесту для виявлення антитіл до ВІЛ – це швидкий тест одноразового використання для якісного визначення антитіл до ВІЛ 1 та 2 типу в зразках сироватки, плазми чи цільної крові людини.

Послідовність виконання процедур при проведенні дослідження із застосуванням тесту:

1) Перед відкриттям, залиште тест касету для досягнення кімнатної температури. Відкрийте тест та, за допомогою маркера, позначте ID пацієнта та час початку тестування. Після вилучення касети з пакету, тестування необхідно провести якомога швидше (не більше ніж через 20 хвилин), щоб уникнути зволоження тесту. Нітроцелюлозна мембрана може поглинати вологу, що може вплинути на хроматографічні властивості тесту. Покладіть касету на плоску поверхню.

2) Забір капілярної крові медичний працівник здійснює наступним чином:

- обрати місце проколу на кінчику пальця особи (зазвичай взяття крові здійснюють з кінчика підмізинного пальця);
- протерти кінчик пальця спиртовою серветкою; чекає, поки поверхня пальця стане сухою;
- помістити ланцет на обране місце проколу і міцно притиснути його до кінчика пальця;
- витерти першу краплю крові стерильною сухою марлею; використовуючи одноразову піпетку, що входить до складу набору, набрати необхідну кількість крові.

3) Додайте 1 краплю зразку цільної крові, використовуючи надану піпетку, до лунки для зразка (S). негайно додайте одну краплю розчинника до лунки для зразка. Якщо зразок цільної крові мігрує занадто повільно по тестовій смужці, додайте одну додаткову краплю розчинника в касету.

4) Залишити на 15 хвилин, після чого необхідно зафіксувати результати. Не зчитувати результати через 30 хвилин.

Інтерпретація результатів (рис.7.1):

Одна червона смуга завжди має з'явитися в контрольній зоні (C), що свідчить про те, що тест є дійсним.

Недійсний: якщо червона смуга не з'являється, результат тесту вважається недійсним, необхідно повторити тестування з новим зразком та касетою. Зробити у формі № 498-5/о відповідний запис – позначку у графі 8 «нед».

Негативний результат: червона смуга не з'являється в тестовій зоні (T) протягом 30 хвилин, що свідчить про те, що антитіла до ВІЛ 1/2 не були виявлені під час тестування. Проте це не виключає можливість інфікування ВІЛ (період серонегативного вікна).

Позитивні результати: одна червона смуга з'являється в тестовій зоні (T) до 30 хвилин, що свідчить про те, що антитіла до ВІЛ 1+2 були виявлені під час тестування.

Результати дослідження обліковують у формі № 498-5/о. Заповнюють графу 8, де позначають результат дослідження «нег» або «поз».

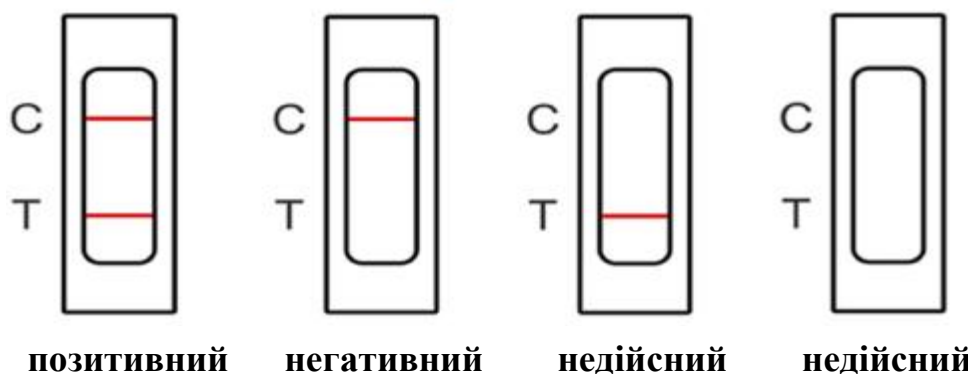


Рис.7.1 - Інтерпретація результатів швидкого тесту на наявність антивірусних антитіл до ВІЛ 1/2

У разі отримання негативного результату дослідження заповнюють графи 11-16 у формі 498-5/о та виписують Довідку про результат дослідження з виявлення серологічних маркерів ВІЛ-інфекції (форма № 503-10/о). У довідці підкреслюють «скринінгових» та п.1. «Антитіла до ВІЛ ½ не виявлено. Особа не потребує подальшого обстеження». Цей результат обліковують у «Журналі обліку учасників» .

У разі отримання позитивного результату переходять до верифікаційного етапу дослідження для підтвердження наявності серологічних маркерів ВІЛ-інфекції з використанням інших швидких тестів.

ЗАВДАННЯ ДЛЯ САМОСТІЙНОЇ РОБОТИ

1. Особливості різних категорії вірусологічних лабораторій.
2. Система управління якістю у вірусологічній лабораторії.
3. Основні нормативно-правові документи, що регулюють роботу вірусологічних лабораторій.
4. Бокавіруси. Респіраторна бокавірусна інфекція людини. Лабораторна діагностика.
5. Метапневмовіруси. Респіраторна метапневмовірусна інфекція. Лабораторна діагностика.
6. Хіміотерапія коронавірусної інфекції.
7. Вірус лімфоцитарного хориоменінгіту, характеристика, лабораторна діагностика.
8. Збудники вірусних інфекцій нервової системи.
9. Лабораторна діагностика пріонних захворювань.
10. Класифікація опортуністичних, ВІЛ-індикаторних хвороб.
11. Постконтактна профілактика ВІЛ при аварійних ситуаціях в лабораторії.

КОНТРОЛЬНІ ЗАПИТАННЯ ДО МАТЕРІАЛУ СПЕЦКУРСУ

1. Загальні поняття методів лабораторної діагностики вірусних захворювань.
2. Групи методів лабораторної діагностики вірусних інфекцій.
3. Види патологічно матеріалу для вірусологічних досліджень.
4. Загальні поняття про структуру вірусів людини.
5. Взаємозв'язок груп ризику вірусних патогенів та рівнів біобезпеки вірусологічних лабораторій.
6. Загальна характеристика групи збудників гострих респіраторних вірусних інфекцій (*Orthomyxoviridae*, *Paramyxoviridae*, *Pneumoviridae*, *Coronaviridae*, *Parvoviridae* (бокавіруси людини))
7. Загально-клінічні дослідження при вірусних інфекціях.
8. Специфічні маркери гострих респіраторних вірусних інфекцій, які використовуються в їх діагностиці.
9. Лабораторна діагностика гострих респіраторних вірусних інфекцій. Методи ідентифікації збудника та виявлення антивірусних антитіл.
10. Загальна характеристика групи збудників гострих вірусних гастроентеритів (*Reoviridae*, *Caliciviridae*, *Astroviridae*, *Picornaviridae*).
11. Специфічні маркери вірусного гастроентериту, які використовуються в його діагностиці.
12. Лабораторна діагностика гострого вірусного гастроентериту.
13. Профілактика гострого вірусного гастроентериту.
14. Приклади етіотропної терапії гострих вірусних інфекцій.
15. Особливості розвитку герпесвірусних інфекцій, спричинених вірусами з різних піродин.
16. Епідеміологія. Імунітет. Клінічні прояви герпесвірусної інфекції.
17. Лабораторна діагностика герпесвірусної інфекції.
18. Діагностичні маркери герпесвірусної інфекції.
19. Вірусний гепатит з парентеральним шляхом передачі.
20. Лабораторна діагностика вірусного гепатиту серологічними методами та молекулярними методами.
21. Лабораторна діагностика розвитку та лікування ВІЛ-інфекції.
22. Швидкі тести: сучасні серологічні методи діагностики вірусних інфекцій.

ПЕРЕЛІК РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. ВІЛ-ІНФЕКЦІЯ Клінічна настанова, заснована на доказах КН 2022-2092
2. Вірусний гепатит В. Клінічна настанова, заснована на доказах, 2020. Настанова, *КН 2021-48_49*
3. Вірусний гепатит С. Клінічна настанова, заснована на доказах, 2020 КН 2021-50_51
4. Вірусні гепатити з парентеральним шляхом передачі: збудники, маркери інфекції, поширення та лабораторна діагностика: навчальний посібник / за ред. І. В. Дзюблик. - Суми: Сум. держ. ун-т - 2018. - 236 с.
5. Вірусологія. Навчальний посібник для лабораторних занять / В.П. Поліщук, І.Г. Будзанівська, Т.П. Шевченко, О.М. Андрійчук, Т.А. Компанець, О.А. Кондратюк, Г.В. Коротєєва, О.В. Молчанець, А.В. Харіна, О.В. Шевченко. – К.: ЦП «Компринт», 2017. – 242 с.
6. Вірусологія: підручник / І.Г. Будзанівська, Т.П. Шевченко, Г.В. Коротєєва, О.В. Молчанець, А.В. Харіна, Т.А. Компанець, О.М. Андрійчук, О.В. Шевченко, О.А. Кондратюк. – К.: ВПЦ «Київський університет», 2019. – 351 с
7. Дзюблик І.В. Швидкі тести та їх місце в етіологічній діагностиці гострих кишкових вірусних інфекцій / І.В. Дзюблик, І.Ф. Самборська, С.О. Соловійов // *Здоров'я суспільства*. – 2013, № 2. – С. 50-57.
8. Дзюблик І.В., Обертинська О.В., Дзюблик Я.О., Самборська І.Ф., Степченкова Т.В., Ковалюк О.В., Вороненко С.Г., Ковалишин Г.Г. Швидкі ІХА-тести для етіологічної діагностики інфекційних захворювань людини. Методичні рекомендації.-К., 2013.-24 с.
9. Дзюблик І.В., Трохименко О.П., Ковалюк О.В. Принципи та методи лабораторної діагностики ротавірусної інфекції // *Український хіміотерапевтичний журнал*. — 2003. — № 1 (16). — С. 54-60.
10. Диференційна діагностика гострих респіраторних вірусних інфекцій у дітей : метод. вказ. для студентів 5–6-х курсів та лікарів-інтернів / упоряд. С. В. Кузнецов, Т. Г. Вовк, О. Н. Ольховська, А. Н. Татаркіна. – Харків : ХНМУ, 2019. – 36 с.
11. Діагностика, лікування та профілактика грипу: монографія / за ред. проф. І. В. Дзюблик. - К. : Медкнига, 2011. - 191 с.
12. ДСТУ EN ISO 22870:2015 Дослідження за місцем лікування (ДМЛ). Вимоги до якості та компетентності (EN ISO 22870:2006, IDT)
13. Дуда О.К. Герпетична та герпесвірусна інфекція. Навчальний посібник для лікарів / О.К. Дуда, М.І. Краснов, В.М. Козько. - Київ: НМАПО.-2 0 1 5 .-9 6 с.

14. Збірник стандартних операційних процедур з впровадження системи епідагляду за недавною ВІЛ інфекцією
15. Інфекційні хвороби : підручник для студентів вищих медичних навчальних закладів / О.А. Голубовська [та ін.] ; за ред. О. А. Голубовської. - 2-е вид., переробл. і допов. - Київ : Медицина , 2018. - 686 с. : табл., іл. - Бібліогр.: с. 677-681
16. Інфекційні хвороби: підручник. В.М. Козько, Г.О. Соломенник, К.В. Юрко та ін. Підручник. К: Всеукраїнське спеціалізоване видавництво «Медицина». – 2019. – 312с.
17. Мальцев Д.В. Проект Уніфікованого клінічного протоколу первинної, вторинної (спеціалізованої) та третинної (високоспеціалізованої) медичної допомоги «Герпетична інфекція». Клінічна імунологія. Алергологія. Інфектологія. № 4-5 (141-142) 2022 ISSN 2411-2852 www.kiai.com.ua
18. Медична мікробіологія, вірусологія та імунологія: підручник для студ. ВНЗ /Андріанова Т.В., Бобир В.В., Виноград В.О. [та ін.]; за ред. В.П. Широбокова. –Вінниця: «Нова книга», 2011 –951с
19. Методичні рекомендації «Порядок забору, транспортування та зберігання матеріалу для дослідження методом полімеразної ланцюгової реакції», затверджені наказом МОЗ України № 662 від 30.07.2013 р.
20. Наказ Міністерства охорони здоров'я України від 05 травня 2019 року № 794 «Про удосконалення системи управління якістю лабораторних досліджень у сфері протидії ВІЛ-інфекції/СНІДу», зареєстрований у Міністерстві юстиції України 01 липня 2019 року за № 698/33669 (зі змінами).
21. Наказ МОЗ України № 467 від 23.09.2004 "Про затвердження методичних рекомендацій щодо застосування швидких тестів для перевірки крові на інфекційні хвороби, облікової форми та інструкції щодо її заповнення
22. Наказ МОЗ України № 26 від 24.01.2008 «Про затвердження державних санітарних норм і правил «Організація роботи лабораторій при дослідженні матеріалу, що містить біологічні патогенні агенти I-IV груп патогенності молекулярно-генетичними методами».
23. Наказ МОЗ України від 05.04.2019 № 794 «Про удосконалення системи управління якістю лабораторних досліджень у сфері протидії ВІЛ-інфекції/СНІДу»
24. Наказ МОЗ України від 17.05.2019 № 1126 « Про затвердження Порядку організації проведення епідеміологічного нагляду за грипом та гострими респіраторними вірусними інфекціями, заходів з готовності в міжепідемічний період і реагування під час епідемічного сезону захворюваності на грип та ГРВІ».

25. Натрус Л.В. Основи лабораторної діагностики (для лікарів клінічних спеціальностей). Навчально-наочний посібник для студентів медичних факультетів. – Київ, НМУ імені О.О. Богомольця.- 2022.- 51 стор.
26. Порохницький В.Г. Вірусні гепатити від А до Сен. - К.: 2005
27. Порядок забору, транспортування, зберігання та оформлення біологічного матеріалу для діагностики ВІЛ/СНІДу РІ-8.5.1-41/2021 Згідно з наказом МОЗ від 05.11.2013 № 955
28. Шевченко Т. П., Харіна А. В., Коротеєва Г. В., Шевченко О. В. Будзанівська І. Г. Робочий зошит з дисципліни "Мікробіологія, вірусологія та імунологія" для студентів, що навчаються за спеціальністю "Медицина" (українська мова навчання). Частина II «Вірусологія» / Київський національний університет імені Тараса Шевченка, ННЦ «Інститут біології та медицини», кафедра вірусології. – Київ: 2023. - 100 с. <https://biomed.knu.ua/institute-activity/educational/kafedry/kafedra-virusology/biblioteka.html>.
29. Ширококов В. П., Дзюблик І. В., Вороненко С. Г., Порохницький В. Г., Вернер О. М., Міроненко А. П., Костенко О. О. Застосування швидких тестів в лабораторній діагностиці інфекційних хвороб. Методичні рекомендації. Київ.-2008.-34 с.
30. Al-Hajjar, S. (2012). Laboratory Diagnosis of Viral Disease. In: Elzouki, A.Y., Harfi, H.A., Nazer, H.M., Stapleton, F.B., Oh, W., Whitley, R.J. (eds) Textbook of Clinical Pediatrics. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-02202-9_75
31. Clinical virology / editors Douglas D. Richman, Richard J. Whitley, Frederick G. Hayden.- 4rd ed. Washington.DC: ASM Press. – 2017. – 1506 p
32. Desselberger U, Gray J. Viral gastroenteritis. *Medicine (Abingdon)*. 2009;37(11):594-598. doi:10.1016/j.mpmed.2009.08.005
33. Glass RI, Bresee J, Jiang B, et al. Gastroenteritis viruses: an overview. *Novartis Found Symp*. 2001;238:5-25. doi:10.1002/0470846534.ch2
34. Goura Kudesia, Wreghitt, T. Clinical and diagnostic virology. – Cambridge: Cambridge University Press, Cop.. – 2009. – 281p.
35. HIV molecular diagnostics toolkit to improve access to viral load testing and infant diagnosis. Geneva: World Health Organization; 2019. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
36. Louten, J Essential Human Virology. (2016). [online] Elsevier. doi:<https://doi.org/10.1016/c2013-0-19118-0>.