

# Základy virologické diagnostiky





*16. stol*

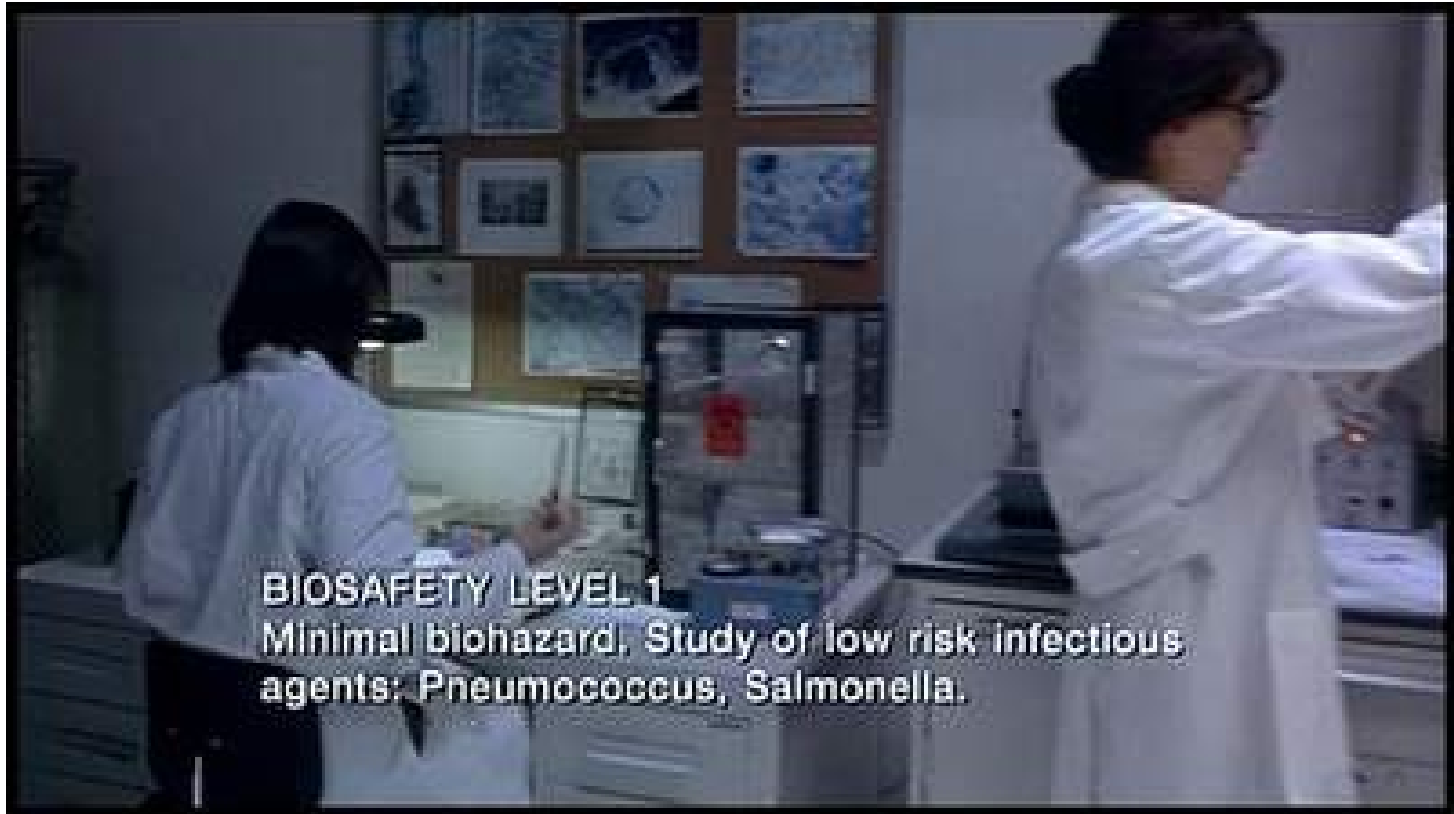


*17. stol.*



*21. stol.*

# BSL-1



1. Stupeň biologické ochrany – Biosafety level 1 (BSL1) – je určen pro práci s málo infekčními a nebezpečnými původci infekčních onemocnění, mezi které patří převážně bakterie například Salmonella a mnohé ostatní enterobakterie, Stafylokoky a Streptokoky, Pneumokoky

pouze ochranné oděvy (běžné bílé pláště) a ochranné rukavice

Podobnými laboratořemi disponuje každá nemocnice.

## BSL-2



Pracovníci na této úrovni používají vždy ochranné oděvy a rukavice, doplněné o prostředky pokročilé ochrany – o respirační filtry, obličejové štíty a jiné. Laboratoře na BSL2 vyžadují pro manipulaci s infekčními původci speciální přístrojové vybavení například boxy s laminárním prouděním vzduchu

# BSL-3



Biosafety level 3 (BSL3) – je určen pro rutinní manipulaci s nebezpečnými původci nákaz. Protože proti těmto původcům mnohdy neexistuje účinná léčba je vyžadováno mnohonásobné očkování. Mezi původce zařazené na BSL 3 patří virus HIV, virus klíšťové encefalidity či bakteriální původci tyfu a anthraxu.

Ochranné prostředky na úrovni BSL3 jsou rozšířeny na kompletní ochranné kombinézy s kapucí doplněné pasivní respirační přístroj pracující na podobném principu jako plynové masky (vzduch prochází speciálním tzv. HEPA filtrem, který zachytí infekční původce a propustí jen vzduch).

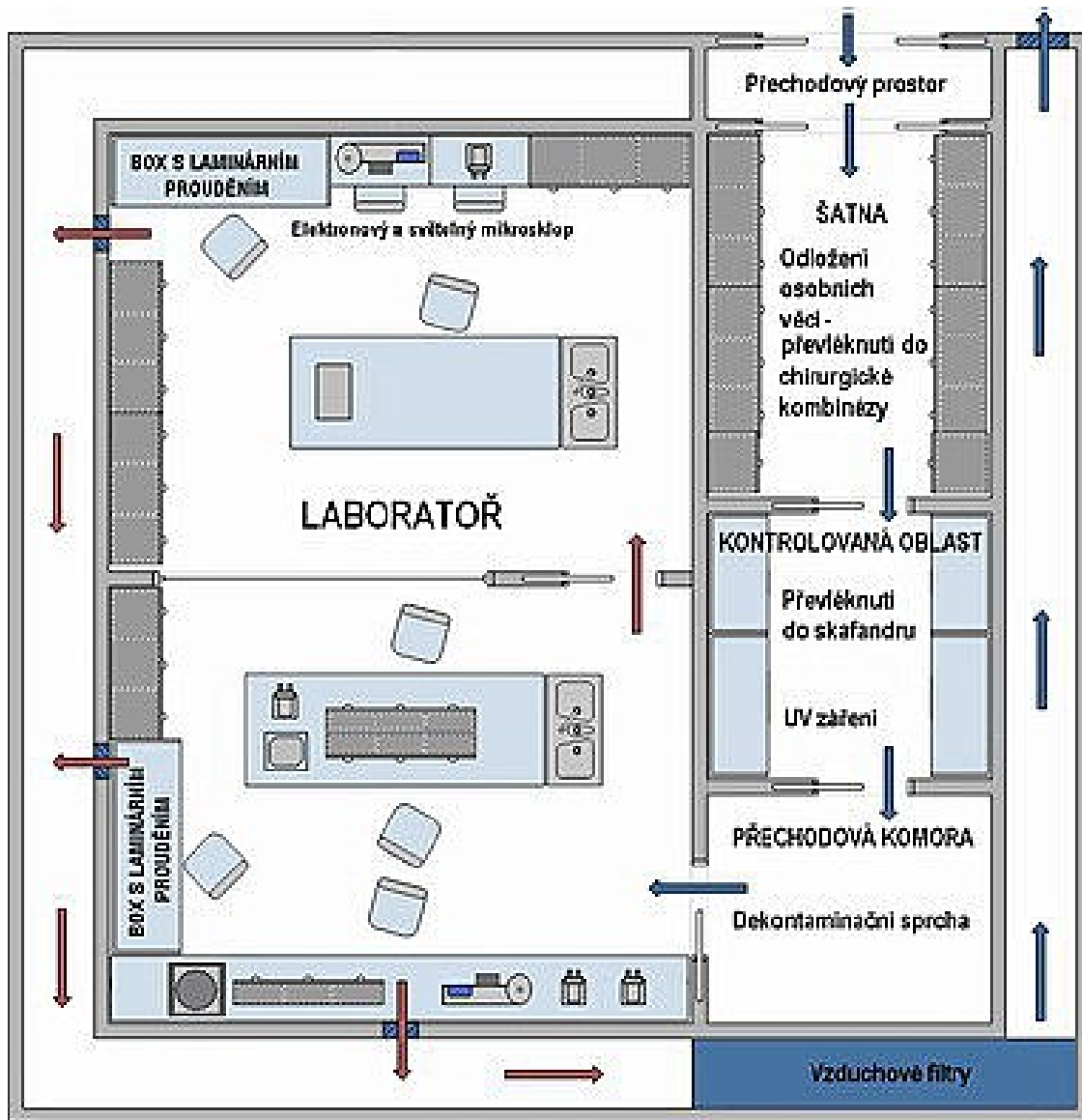
## BSL-4



Biosafety level 4 (BSL4) – je určen pro speciální manipulaci s vysoce infekčními původci onemocnění proti nimž neexistuje účinná léčba ani očkování. Sem řadíme například virus Eboly, virus Lassa, virus SARS, hantaviry, ruské kmény viru klíšťové encefalitidy a mnohé ostatní převážně virové původce

Ochranné prostředky na těchto úrovních spočívají v použití speciálních skafandrů (kompletních hermeticky uzavřených obleků) s vlastním oběhem kyslíku pocházejícího buď z centrálního rozvodu, nebo aktivního respiračního přístroje. Trojnásobná vrstva rukavic.

















## **Kdy je laboratorní virologická diagnostika nutná nebo přínosná?**

1. U onemocnění, u kterých jsou dostupná vhodná chemoterapeutika (nejen cílená antivirotika, ale třeba i interferon, hyperimunní séra apod.)
2. Správná diagnostika některých chorob vede k úpravě režimu pacienta a prognóze
3. Protiepidemická opatření
4. Sledování virových onemocnění – výskyt, šíření, epidemiologie

<b>Onemocnění</b>	<b>Odebrané vzorky</b>
Respirační infekce	Výtěry z krku nebo nosu
	Postnasální výplachy
Gastrointestinální infekce	Stolice
Měchýřkovitá vyrážka	Vesikulární tekutina, výtěr
	z krku, stolice
Hepatitida	Sérum, stolice
CNS infekce	Mozkomíšňní mok, výtěr
	z krku, stolice
AIDS	Nesrážlivá krev

Zdravotní ústav se sídlem v Ostravě	
Odbor mikrobiologie a parazitologie Ostrava Partyzánské náměstí 7, 702 00 Ostrava, www.zuova.cz Pracoviště je akreditováno ČIA dle normy ČSN EN ISO 15189 jako zdravotnická laboratoř číslo 8014	Číslo vyšetření: (nevyplňuje)
<b>ŽÁDANKA O VIROLOGICKÉ VYŠETŘENÍ</b>	
 Vyšetření provede <b>VIROLOGICKÉ ODDĚLENÍ</b> tel.: 596 200 111, fax: 596 118 661 IČZ: 91 866 000 	
<b>PACIENT:</b> Příjmení, jméno: _____	
Rodné číslo: _____ / _____	Kód pojišťovny: _____ Kód diagnózy: _____
Bydliště: _____	
Vzorek (specifikovat): _____	Diagnóza nebo příznaky onemocnění: _____
Datum odběru, čas (hh.mm): _____	Začátek onemocnění: _____
<b>Přímý průkaz agens - kultivace, elektronová mikroskopie, průkaz antigenů, genomu</b>	
<u>Kultivace - izolační pokus:</u> <input type="checkbox"/> Kultivační průkaz virů (veškerý materiál) na: tkáňových kulturách, k. embryu, saj. myši <u>Elektronmikroskopický průkaz agens:</u> <input type="checkbox"/> Negativní barvení virů (veškerý materiál) <u>Průkaz antigenů:</u> <input type="checkbox"/> Rotaviry (stolice) <input type="checkbox"/> Adenoviry (stolice) <input type="checkbox"/> Noroviry (stolice) <input type="checkbox"/> Astroviry (stolice) <input type="checkbox"/> Respirační viry (výtěr z nosohltanu) <input type="checkbox"/> p24 HIV-1 - antigenemie + a-HIV-1, 2 (krev - sérum)	<u>Průkaz genomu:</u> <input type="checkbox"/> <i>Chlamydia trachomatis</i> (hybridizace DNA) a <i>Neisseria gonorrhoeae</i> (hybridizace DNA) (spec. výtěr z cervixu nebo uretry, ev. spojivky) <input type="checkbox"/> Papillomaviry (HPV) (hybridizace DNA) (spec. výtěr z cervixu) <input type="checkbox"/> Cytomegalovirus (DNA-PCR) <input type="checkbox"/> Herpes simplex v. typ 1, 2 (DNA-PCR) <input type="checkbox"/> Epstein - Barrové v. (DNA-PCR) <input type="checkbox"/> Varicella - zoster v. (DNA-PCR) <input type="checkbox"/> Enteroviry (RNA-PCR) <input type="checkbox"/> <i>Mycoplasma pneumoniae</i> (DNA-PCR) <input type="checkbox"/> <i>Chlamydia pneumoniae</i> (DNA-PCR) <input type="checkbox"/> <i>Chlamydia trachomatis</i> (DNA-PCR)
<b>Průkaz protilátek - sérologická vyšetření (krev – sérum, likvor)</b>	
<input type="checkbox"/> Respirační agens (Influenza v. A, B, Parainfl. vv., Adenoviry, RS-virus, <i>Mycoplasma pneumoniae</i> ) <input type="checkbox"/> Herpetické viry: (CMV, EBV, HSV, VZV) <input type="checkbox"/> Cytomegalovirus (CMV) <input type="checkbox"/> Epstein - Barrové v. (EBV) <input type="checkbox"/> Herpes simplex v. (HSV) <input type="checkbox"/> Varicella-zoster v. (VZV) <input type="checkbox"/> Herpes hominis v. typ 6 (HHV-6) (6. nemoc) <input type="checkbox"/> Parvovirus B-19 (5. nemoc) <input type="checkbox"/> Morbilli v. (1. nemoc) <input type="checkbox"/> Rubeola v. (3. nemoc) <input type="checkbox"/> Parotitis v. <input type="checkbox"/> Enteroviry, Coxsackie vv. B1-6 <input type="checkbox"/> Enteroviry	<input type="checkbox"/> Klíšťová encefalitis v. (TBE) <input type="checkbox"/> Dengue v. (DEN) <input type="checkbox"/> West Nile v. (WN) <input type="checkbox"/> Žlutá zimnice v. (YF) <input type="checkbox"/> Japonská B encefalitis v. (JBE) <input type="checkbox"/> Chikungunya v. (CHIK) <input type="checkbox"/> Lymfocytární choriomeningitis v. (LGM) <input type="checkbox"/> Hantaviry <input type="checkbox"/> HIV-1, HIV-2 (AIDS) (vyšetření i na antigen p24 HIV-1) <input type="checkbox"/> Chlamydie - rod. specif. (bez diferenciace druhů) druh. specif. ( <i>C. trachomatis</i> , <i>C. pneumoniae</i> ) <input type="checkbox"/> Chlamydie - druh. specif., vyř. Western Blot <input type="checkbox"/> <i>Coxiella burnetii</i> (Q-horečka)
Vyšetření požaduje: _____ Razítko s adresou a podpis lékaře: _____	
IČP: _____	
Odbornost: _____	
Telefon: _____	

Zdravotní ústav se sídlem v Ostravě				
Odbor mikrobiologie a parazitologie Ostrava, VIROLOGICKÉ ODDĚLENÍ, Partyzánské nám. č. 7, 702 00 OSTRAVA Tel.: 596 200 111, e-mail: Jiri.Januska@zuova.cz, IČZ - IČL: 91866312, http://www.zuova.cz				
Odběr a zasílání biologického materiálu				
Typ vzorku (biologický materiál)	Doporučená sterilní odběrová souprava	Teplota úschovy do transportu	Maximální doba a teplota transportu	Vyšetření
srážlivá krev na sérologické vyšetření	skleněná zkumavka nebo komerční souprava pro odběr srážlivé krve	po odběru 18 - 25°C 2 hod., pak 2 - 8°C	2 - 8°C do 2 dnů, 18 - 25°C lze až do 12 hod.	vyšetření protilátek (sérologická vyšetření)
výtěr suchým dakron. tamponem z nosu, nosohltanu, spojivky a j.	virologické odběrové/transportní médium ve zkumavce s gumovou zátkou	2 - 8°C	2 - 8°C do 24 hod.	izolační pokus, průkaz antigenů
stolice cca 1 cm <sup>3</sup>	zkumavka nebo nádobka s těsným uzávěrem	2 - 8°C	2 - 8°C do 24hod. 8 - 25°C do 12hod.	izolační pokus, průkaz antigenů
likvor	zkumavka nebo nádobka s těsným uzávěrem	2 - 8°C	2 - 8°C do 24 hod.	izolační pokus, vyšetření protilátek
moč doplnit po rysku (cca 4 ml moči)	odběrové/transportní médium na moč ve zkumavce	2 - 8°C	2 - 8°C do 12 hod.	izolační pokus (na CMV)
výtěr z uretry nebo ze spojivky na chlamydie a gonokoky	souprava Gen-Probe: tamponěk pro výtěr z uretry nebo z konjunktivy a transportní médium	2 - 25°C	2 - 25°C do 7 dnů	průkaz genomu genovou sondou (specif. DNA)
výtěr z cervixu na a) chlamydie a gonokoky b) papillomaviry	souprava Digene: Cervical Sampler (pro těhotné dakronový tampon) a transportní médium	2 - 25°C	2 - 25°C do 7 dnů	průkaz genomu genovou sondou (specif. DNA)
nesrážlivá krev (pro PCR s EDTA, bez heparinu!)	komerční souprava pro odběr nesrážlivé krve (pro PCR s EDTA!)	2 - 8°C	2 - 8°C do 24 hod. 2 - 8°C do 48 hod. bez chlazení do 12 hod.	izolační pokus průkaz antigenů průkaz genomu - PCR (specif. DNA, RNA)
výtěr suchým dakron. tamponem a další jiný materiál na PCR	v prázdné zkumavce (nebo s virologickým odběrovým/transport. médiem) s gumovou zátkou	2 - 8°C	2 - 8°C do 48 hod. bez chlazení do 12 hod.	průkaz genomu - PCR (specif. DNA, RNA)
Odběrové soupravy a žádanky (kromě souprav pro odběr krve) vydá na požádání virologické oddělení zdarma				
TELEFON: 596 200 111 (ústředna Zdravotního ústavu se sídlem v Ostravě)				automatické linky:
MUDr. Jiří JANUŠKA, vedoucí virologického oddělení, vedoucí NRL ČR pro arboviry				310, 311
RNDr. Jan RASZKA, zást. ved. odd., virologická sérologie, diagnostika HIV				342, 341, 355, 349
RNDr. Petr ČERVENKA, virologická diagnostika na tkáňových kulturách				316, 341, 355
MUDr. Hana ZELENÁ, genové sondy, NRL pro arboviry, elektronová mikroskopie				311, 340, 334
Mgr. Markéta POMIKLOVÁ, virol. diagnostika na tkáňových kulturách, elektron. mikroskopie				316
Alena HLADÍKOVÁ, vedoucí laborantka virologického oddělení				334, 316

## Metody diagnostiky virových infekcí

- a. Přímá detekce (obvykle kultivace v buněčných kulturách – izolace viru; elektronová mikroskopie, imunofluorescence, PCR)
- b. Nepřímá – serologické metody – identifikace a kvantifikace specifických protilátek v séru pacienta

Oba způsoby přinášejí značné nevýhody – v prvním případě pracnost, nákladnost a časová náročnost (kromě PCR), ve druhém malá vypovídací hodnota a spolehlivost



## Přímý

- kultivace na TK
- kuřecí embrya
- pokus na zvířeti
- elektronová mikroskopie
- světelná mikroskopie, imunofluorescence
- hemaglutinace
- hemadsorpce
- ELISA
- latexová aglutinace
- průkaz virové NK

## Nepřímý

- ELISA
- komplement-fixační test
- virus-neutralizační test
- inhibice hemaglutinace
- imunoblotting

## Přímý

- **kultivace na TK**
- kuřecí embrya
- pokus na zvířeti
- elektronová mikroskopie
- světelná mikroskopie, imunofluorescence
- hemaglutinace
- hemadsorpce
- ELISA
- latexová aglutinace
- průkaz virové NK

## Nepřímý

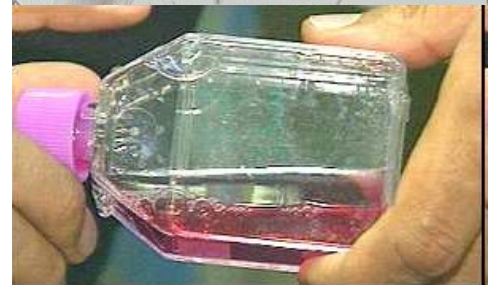
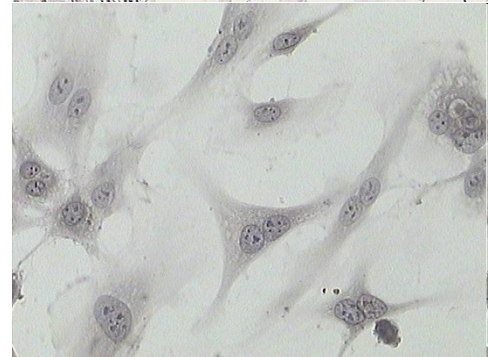
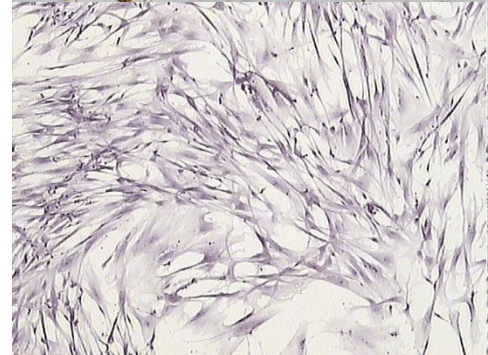
- ELISA
- komplement-fixační test
- virus-neutralizační test
- inhibice hemaglutinace
- imunoblotting

# Kultivační metody

- Kultivace na buněčných (tkáňových) kulturách (TK) – použitelné jen pro některé viry
  - Klasická s cytopatickým efektem (dlouhá doba vyšetření až 4 týdny)
  - Zrychlená s průkazem virových antigenů imunohistochemicky (cca 2 – 4 dny)
- Kultivace na kuřecím embryu – použitelné jen pro některé viry
- Pokus na zvířeti – na konkrétním vhodném zvířeti lze kultivovat většinu virů

# Buněčné kultury

- 1949 – poprvé pozorováno, že poliovirus se množí v kultuře buněk za produkce charakteristických histologických změn
- Práce za aseptických podmínek (přesto časté problémy s kontaminacemi bakteriemi, mykoplasmaty, kvasinkami či houbami)
- Buněčné kultury posloužily k objevu řady nových virů a virových čeledí (např. adenovirů, echovirů, rhinovirů apod.)
- Cenná pomůcka při diagnostice virových onemocnění či pro vývoj vakcín (dětská obrna, spalničky, zarděnky)



# Virová infekce v buněčné kultuře

Normální TK – mikroskop.



Množení viru – mikroskop.



# Rychlé kultivační vyšetření

Při těchto rychlých technikách lze v TK nalézt virové antigeny již za 2-4 dny. Dobrým příkladem je CMV DEAFF (detection of early antigen fluorescent foci):

- Tkáňová kultura roste v mediu v plastové lahvi lahvi na krycím sklíčku.
- Po inokulaci se lahví pro urychlení adsorpce viru hodinu pomalu kýve a láhev se pak inkubuje 2-4 dny.
- Sklíčko se pak vyndá a imunofluorescenční metodou se buňkách TK hledají časně virové antigeny CMV.

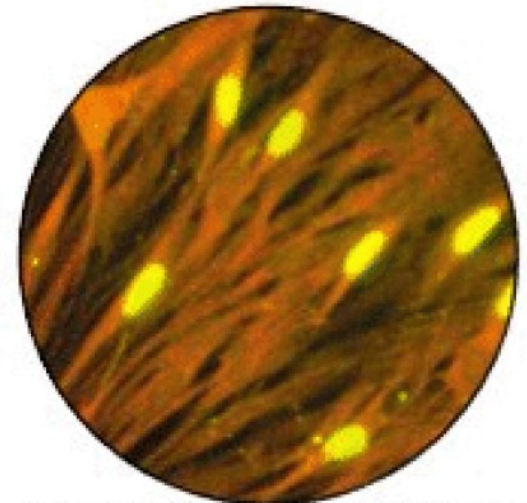


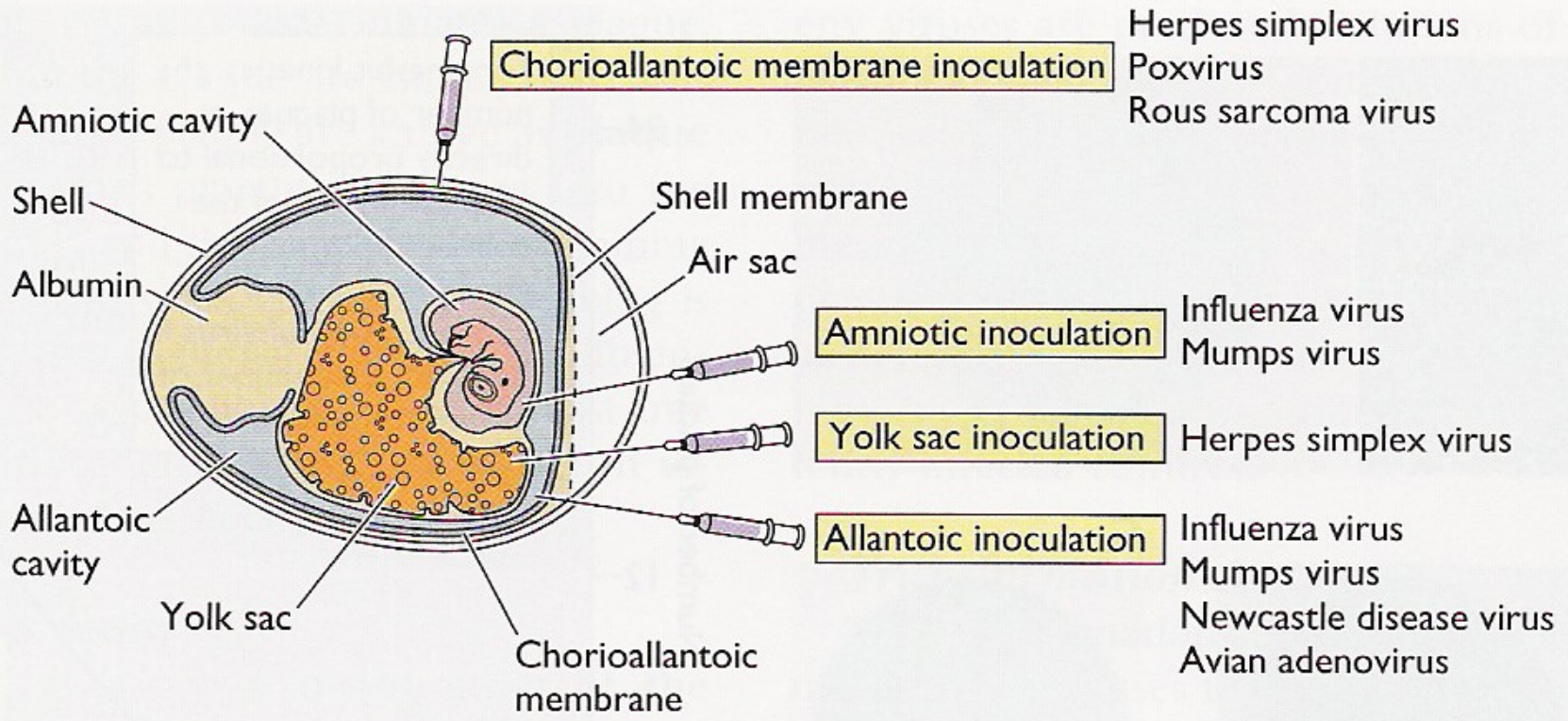
Fig. 2, CMV centrifugation culture fixed and stained 16 hrs after inoculation showing viral proteins in nuclei of infected human fibroblast cells

## Přímý

- kultivace na TK
- **kuřecí embrya**
- pokus na zvířeti
- elektronová mikroskopie
- světelná mikroskopie, imunofluorescence
- hemaglutinace
- hemadsorpce
- ELISA
- latexová aglutinace
- průkaz virové NK

## Nepřímý

- ELISA
- komplement-fixační test
- virus-neutralizační test
- inhibice hemaglutinace
- imunoblotting





Produkce velkého množství viru pro přípravu vakcín - chřipka



## Přímý

- kultivace na TK
- kuřecí embrya
- **pokus na zvířeti**
- elektronová mikroskopie
- světelná mikroskopie, imunofluorescence
- hemaglutinace
- hemadsorpce
- ELISA
- latexová aglutinace
- průkaz virové NK

## Nepřímý

- ELISA
- komplement-fixační test
- virus-neutralizační test
- inhibice hemaglutinace
- imunoblotting

# Laboratorní zvířata

- Laboratorní myši, potkani, morčata, primáti
- Nutno pracovat na základě zvláštního povolení, pouze pracovníci se zvláštní kvalifikací
- Zvláštními právními předpisy a vyhláškami stanoveno, jaké mají mít osvětlení, hladina hluku, denní režim, potrava (i zastoupení jednotlivých výživových látek), velikost chovných nádob, způsob nakládání...



## Přímý

- kultivace na TK
- kuřecí embrya
- pokus na zvířeti
- **elektronová mikroskopie**
- světelná mikroskopie, imunofluorescence
- hemaglutinace
- hemadsorpce
- ELISA
- latexová aglutinace
- průkaz virové NK

## Nepřímý

- ELISA
- komplement-fixační test
- virus-neutralizační test
- inhibice hemaglutinace
- imunoblotting

# Elektronová mikroskopie

Pro úspěšnou vizualizaci musí být ve vzorku alespoň  $10^6$  virových partikulí v 1 ml. Použité zvětšení bývá 50,000 - 60,000x. Viry lze prokázat v těchto typech vzorků:

<b>Stolice</b>	rotaviry, adenoviry viry skupiny Norwalk astroviry, kaliciviry
<b>Tekutina z puchýřů</b>	HSV VZV
<b>Kožní seškrab</b>	papillomaviry, orf virus, virus molluscum contagiosum

# Elektronová mikroskopie

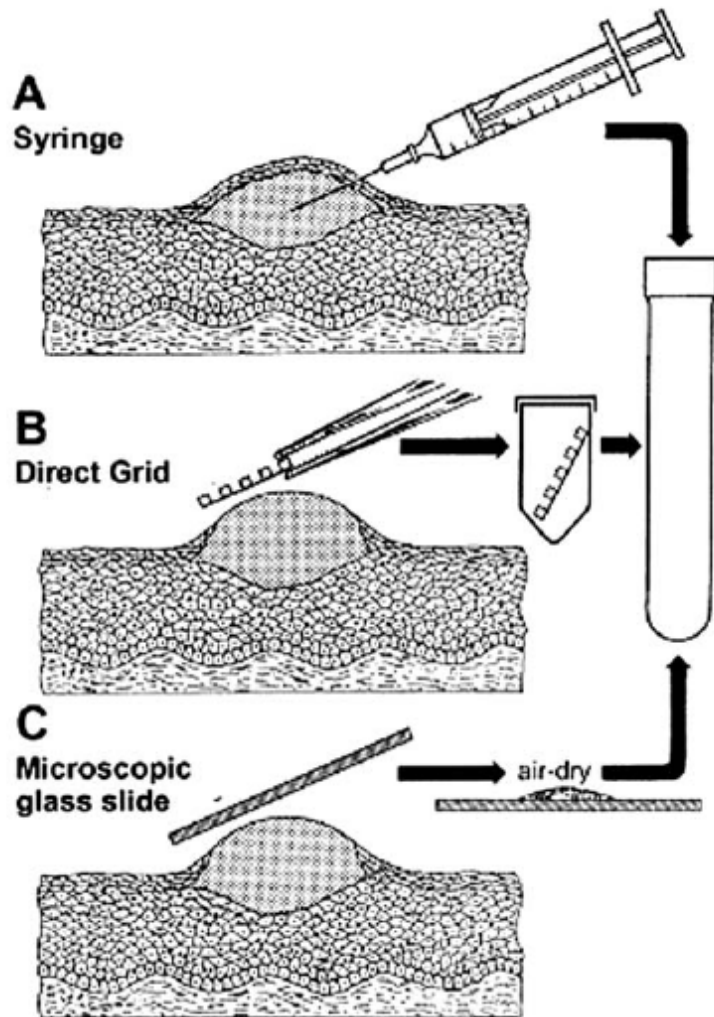


Figure 3. Three methods for efficient collection of vesicular and blister fluids for diagnostic electron microscopy. A. The contents of a vesicle are collected into the barrel of a needle. B. After the blister is opened, a coated electron microscope grid is touched to the fluid and air-dried (direct electron microscopy). C. A glass microscope slide is touched directly to an unroofed lesion and a smear prepared. Samples are then placed in rigid containers for transport to the electron microscopy laboratory.

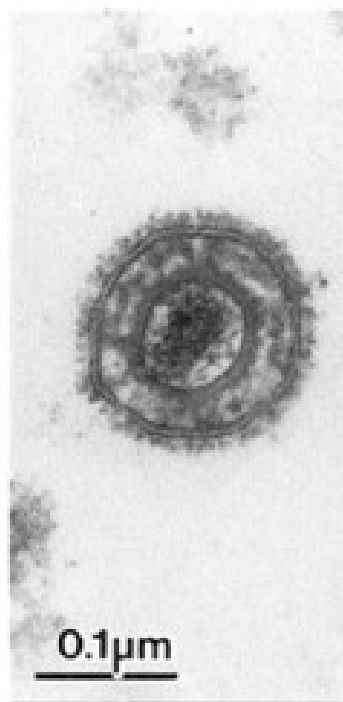
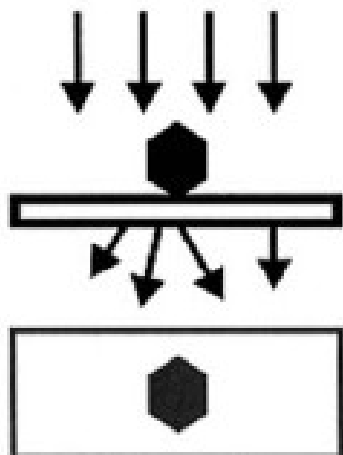


Hlavní nevýhoda spočívá v nízké citlivosti detekce, nákladnosti. Nutná značná zkušenost s rozlišením virových částic od jiných částí buněk či artefaktů.

# Elektronová mikroskopie

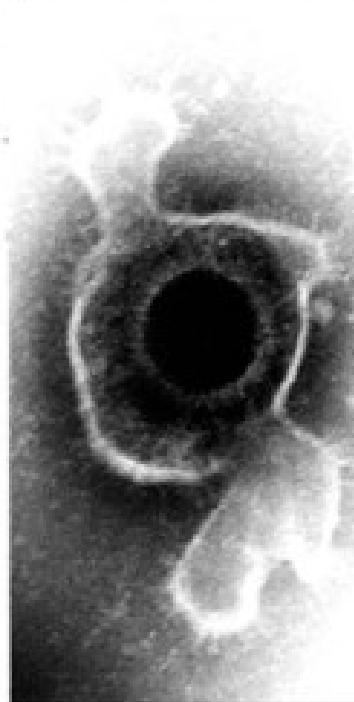
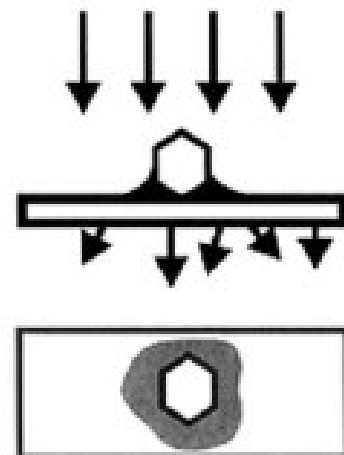
**A**

Positive Contrast



**B**

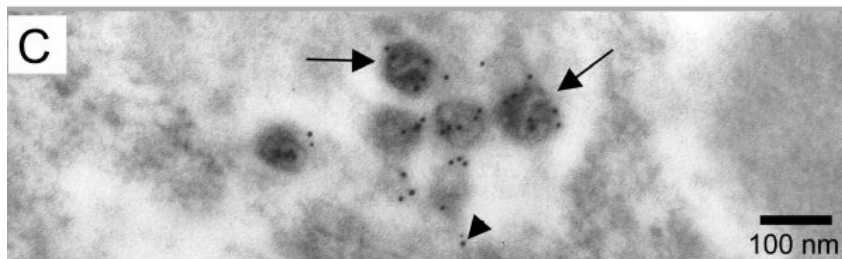
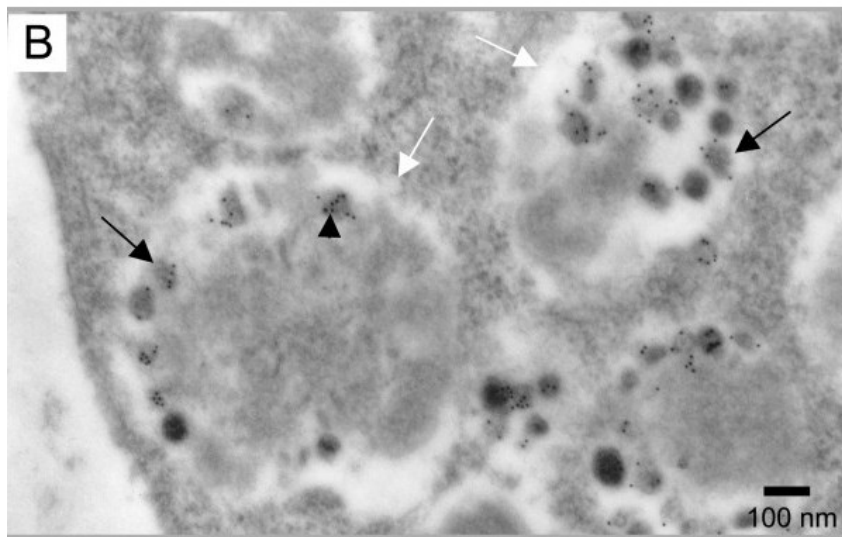
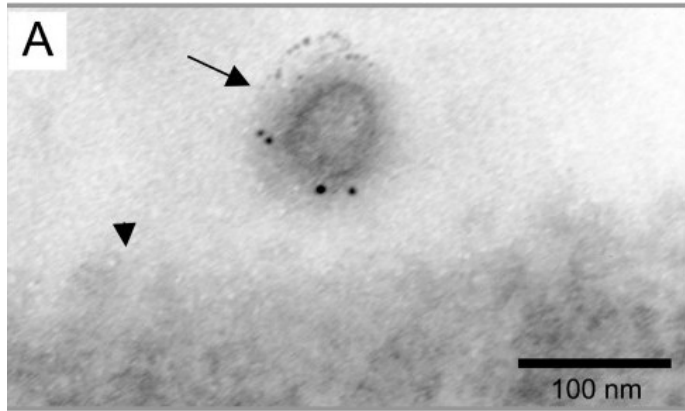
Negative Contrast



*Odběr primárních vzorků pro elektronovou mikroskopii*

Primární vzorek	Způsob odběru
moč, likvor, BAL, sérum, plazma, vezikulární tekutina, nazofaryngeální výtěr	odběr vzorků do sterilních zkumavek nebo transportních nádobek s pevným uzávěrem. Min. množství kapalných vzorků je 0,2 ml, max. 2 ml
stolice	odběr vzorků do sterilních zkumavek nebo transportních nádobek s pevným uzávěrem. Vzorek o velikosti lískového oříšku nebo max. 2 ml
krusty, biopsie, autopsie	odběr vzorků do sterilních zkumavek nebo transportních nádobek s pevným uzávěrem. Vzorky o velikosti 5 mm <sup>3</sup>

# Imunoelektronová mikroskopie



Na protilátky navázány částky koloidního zlata; možno současná detekce více patogenů – použijí se kuličky různé velikosti.

Imunoelektronová mikroskopie vykazuje mnohem vyšší citlivost v porovnání s klasickou elektronovou mikroskopií; v diagnostice se však obvykle nepoužívá.



## Přímý

- kultivace na TK
- kuřecí embrya
- pokus na zvířeti
- elektronová mikroskopie
- **světelná mikroskopie, imunofluorescence**
- hemaglutinace
- hemadsorpce
- ELISA
- latexová aglutinace
- průkaz virové NK

## Nepřímý

- ELISA
- komplement-fixační test
- virus-neutralizační test
- inhibice hemaglutinace
- imunoblotting

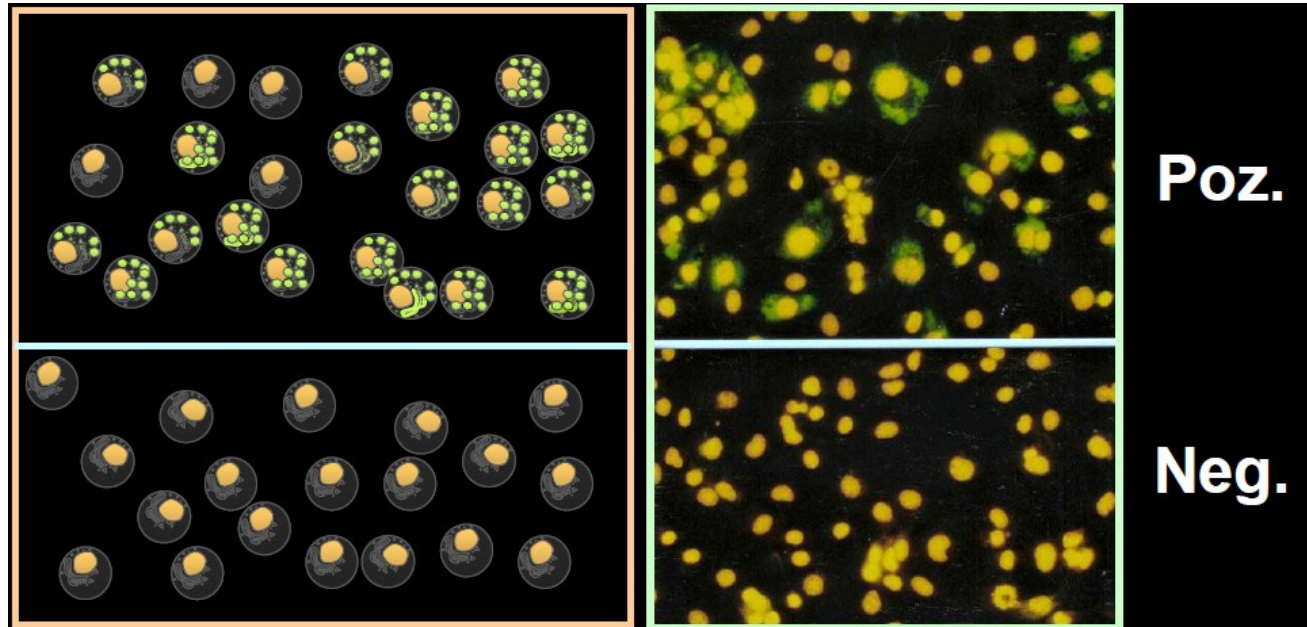
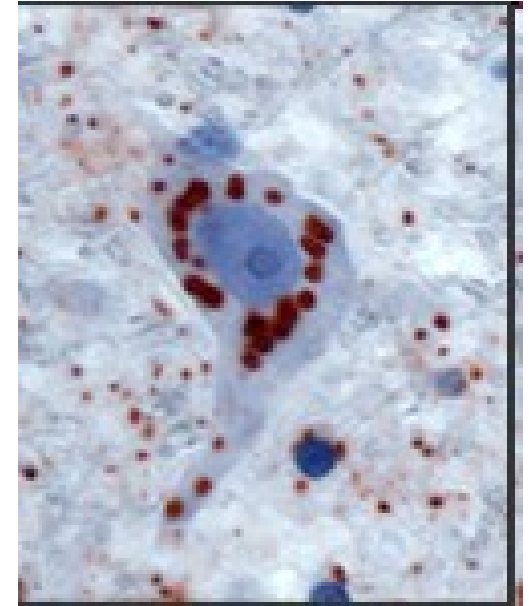
- Světelná mikroskopie

- Normální histopatologie

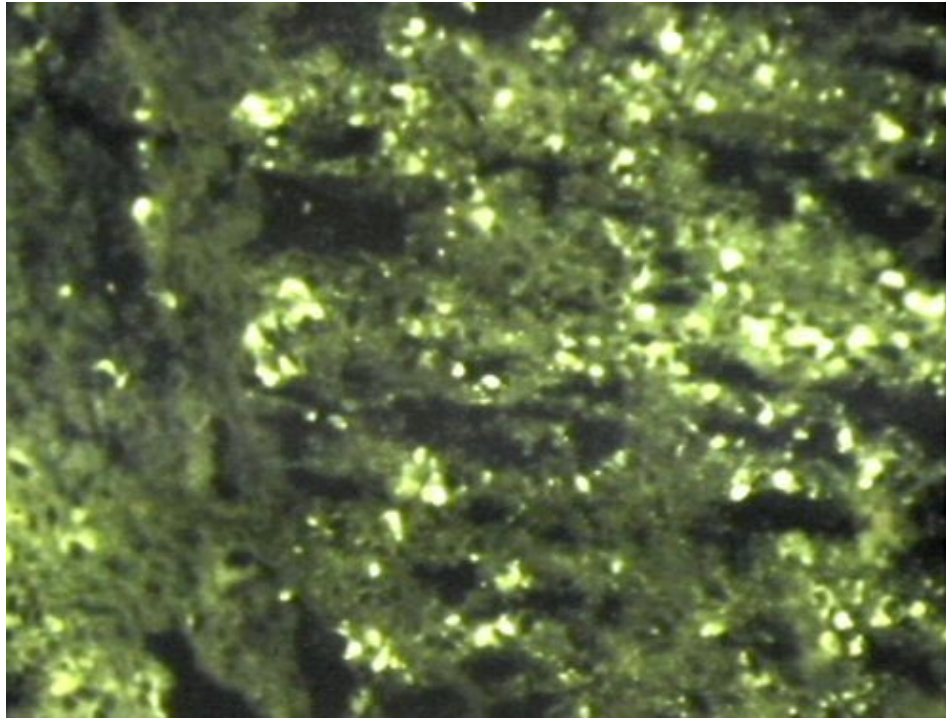
- Průkaz intracytoplazmatických inkluzí v běžně barveném preparátu

- Průkaz viru imunohistochemicky

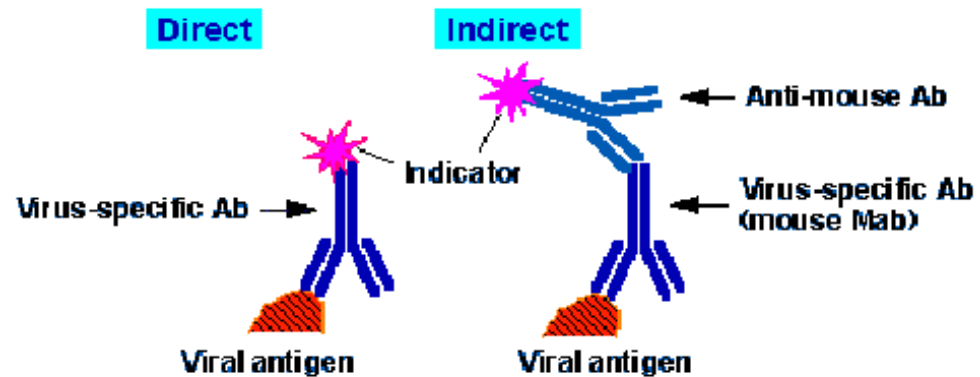
- Je potřeba specifická značená protilátka



# Imunofluorescence



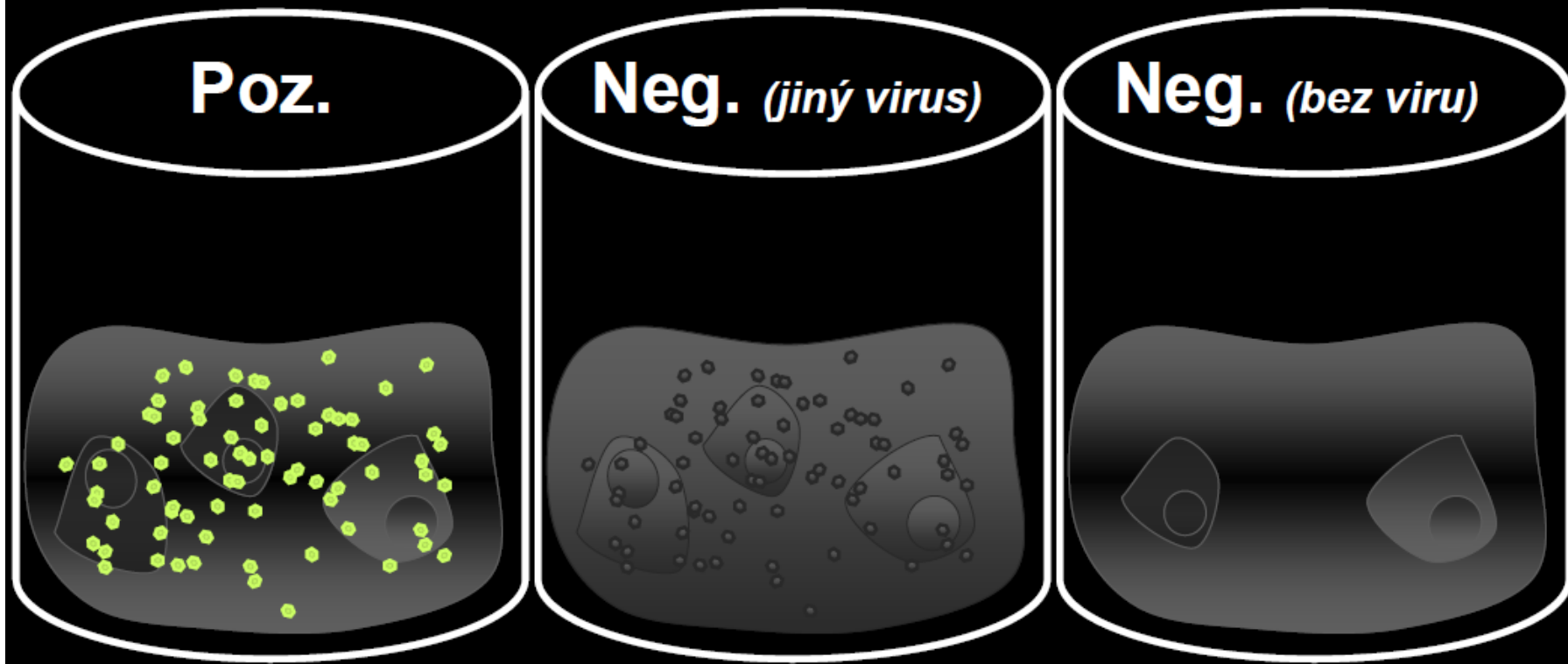
Průkaz přítomnosti viru v klinickém materiálu nebo v buněčné kultuře inokulované patientským vzorkem.



- **Prokazovat lze virový antigen**
  - Ve tkáni – imunohistochemie
  - V séru – ELISA na průkaz Ag
  - V likvoru – ELISA na průkaz Ag
  - V sputu – přímá imunofluorescence
  - Ve výtěrech – přímá imunofluorescence
  - V moči – přímá imunofluorescence
  - Ve stolici – latexová aglutinace

# Imunofluorescence

- Protilátkou značenou fluorescenční barvou
  - Na rozdíl od ELISA se dá použít i v klinických materiálech pevnější konzistence (sputum, hlen...)



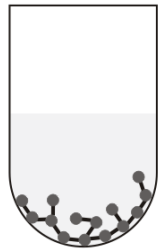
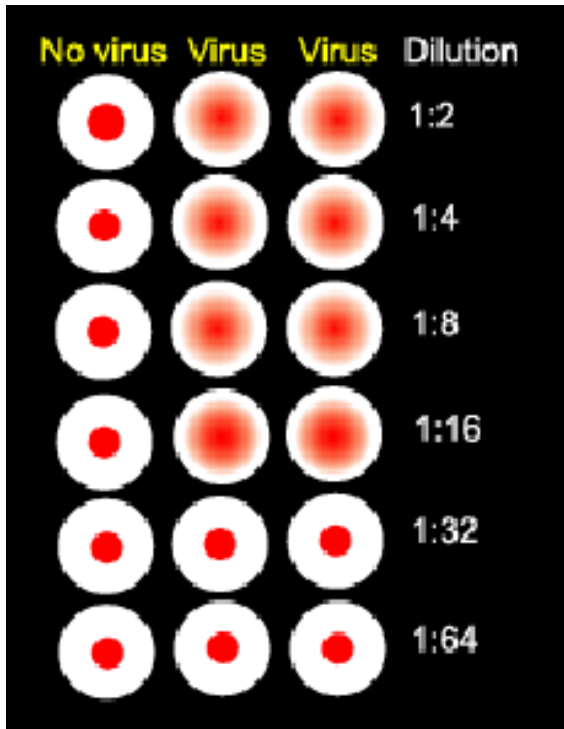
## Přímý

- kultivace na TK
- kuřecí embrya
- pokus na zvířeti
- elektronová mikroskopie
- světelná mikroskopie, imunofluorescence
- **hemaglutinace**
- hemadsorpce
- ELISA
- latexová aglutinace
- průkaz virové NK

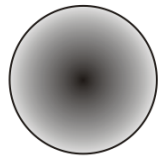
## Nepřímý

- ELISA
- komplement-fixační test
- virus-neutralizační test
- inhibice hemaglutinace
- imunoblotting

# Hemaglutinační testy



aspect du  
fond du tube



résultat positif

résultat négatif

- Prokazujeme přítomnost jednoho nebo úzké palety agens reakcí antigen – protilátka
- Časově i technicky nenáročné – společně se sérologií dnes nejvýznamnější metody virologické diagnostiky
- Kvalitativní stanovení
  - Odpovídáme zda je nebo není přítomno (někdy lze alespoň částečně kvantifikovat)



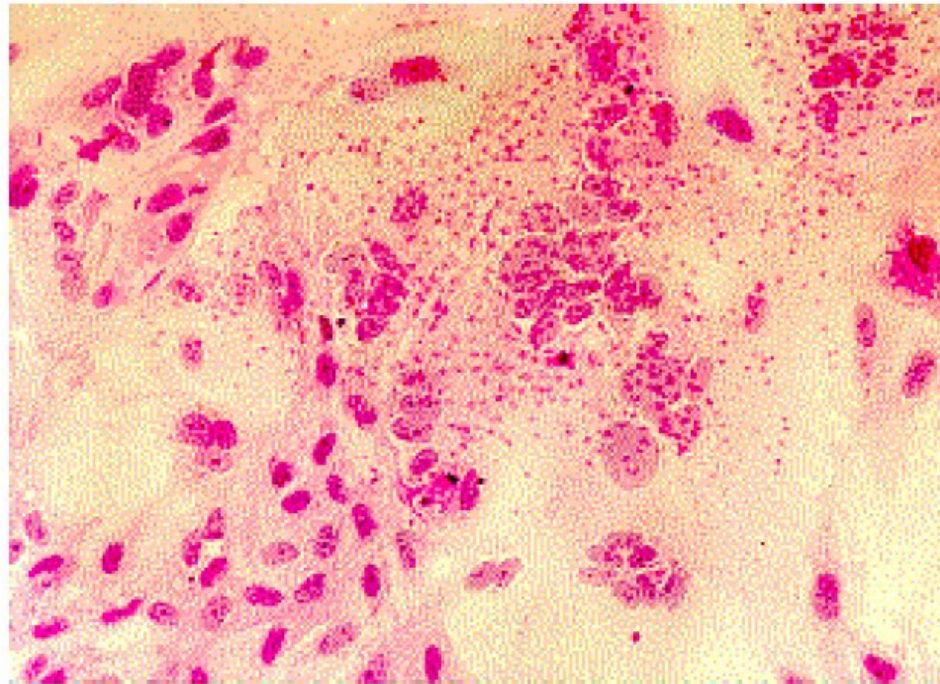
## Přímý

- kultivace na TK
- kuřecí embrya
- pokus na zvířeti
- elektronová mikroskopie
- světelná mikroskopie, imunofluorescence
- hemaglutinace
- **hemadsorpce**
- ELISA
- latexová aglutinace
- průkaz virové NK

## Nepřímý

- ELISA
- komplement-fixační test
- virus-neutralizační test
- inhibice hemaglutinace
- imunoblotting

# Hemadsorpce



Tvorba syncyzií účinkem viru příušnic a současně hemadsorpce po přidání erytrocytů k buněčné kultuře a následném promytí.  
(courtesy of Linda Stannard, University of Cape Town, S.A.)

## Přímý

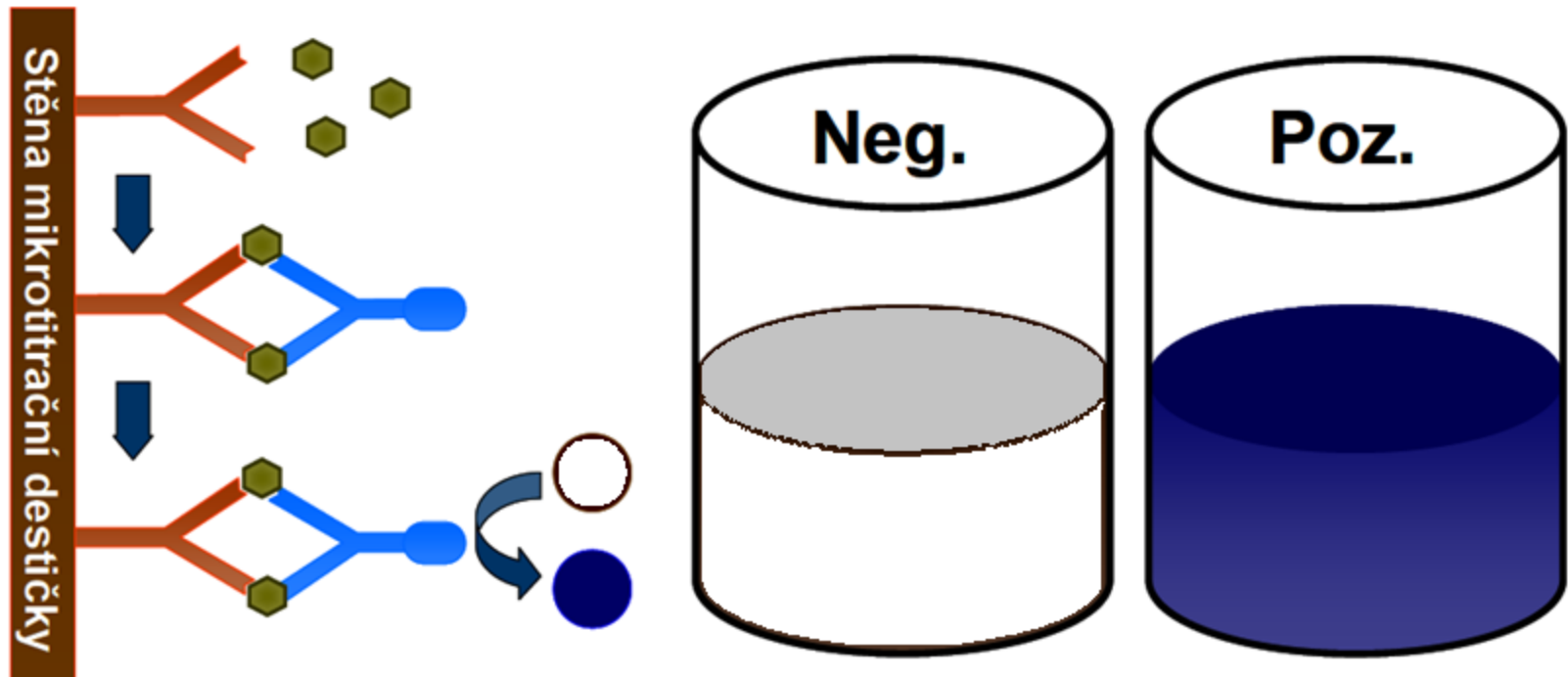
- kultivace na TK
- kuřecí embrya
- pokus na zvířeti
- elektronová mikroskopie
- světelná mikroskopie, imunofluorescence
- hemaglutinace
- hemadsorpce
- **ELISA**
- latexová aglutinace
- průkaz virové NK

## Nepřímý

- ELISA
- komplement-fixační test
- virus-neutralizační test
- inhibice hemaglutinace
- imunoblotting

# ELISA na průkaz antigenu

- Sandwichová reakce s protilátkou značenou enzymem, který ve finálním kroku mění barvu barevného substrátu



## Přímý

- kultivace na TK
- kuřecí embrya
- pokus na zvířeti
- elektronová mikroskopie
- světelná mikroskopie, imunofluorescence
- hemaglutinace
- hemadsorpce
- ELISA
- **latexová aglutinace**
- průkaz virové NK

## Nepřímý

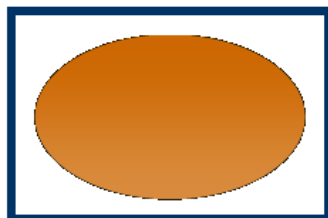
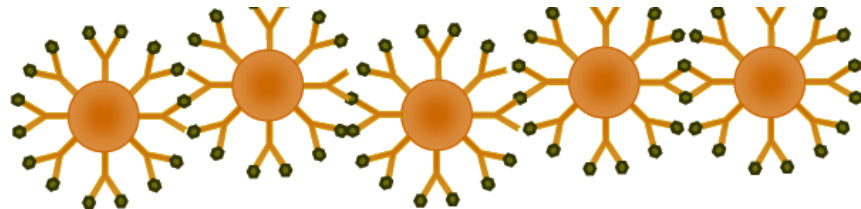
- ELISA
- komplement-fixační test
- virus-neutralizační test
- inhibice hemaglutinace
- imunoblotting

# Latexová aglutinace



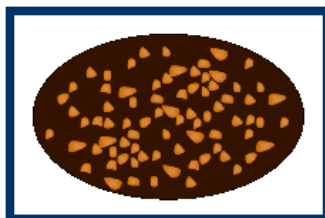
Protilátky jsou vázány na latexové částice. Po smíchání s virem dojde k pouhým okem viditelné agutinaci latexových částic.

Užití: zejména u průjmových onemocnění (rotaviry, adenoviry)



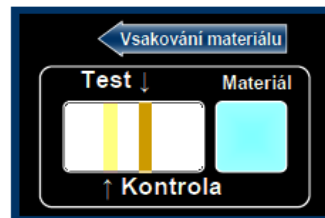
V tekutině

**Neg.**



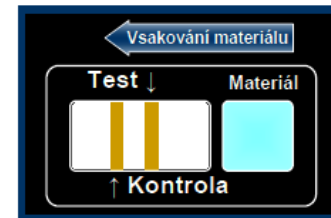
V tekutině

**Poz.**



V setu

**Neg.**



V setu

**Poz.**

## Přímý

- kultivace na TK
- kuřecí embrya
- pokus na zvířeti
- elektronová mikroskopie
- světelná mikroskopie, imunofluorescence
- hemaglutinace
- hemadsorpce
- ELISA
- latexová aglutinace
- **průkaz virové NK**

## Nepřímý

- ELISA
- komplement-fixační test
- virus-neutralizační test
- inhibice hemaglutinace
- imunoblotting

# Průkaz virové nukleové kyseliny

- Hledáme selektivně jedno nebo několik agens
- Rychlé a perspektivní metody
- Amplifikační –
  - Průkaz konkrétních specifických úseků NK
  - Technicky náročné, ale velmi přesné
    - PCR – kvalitativní
    - RT PCR – kvantitativní !
- Bez amplifikace
  - Průkaz genomové NK
  - Málo citlivé, méně náročné

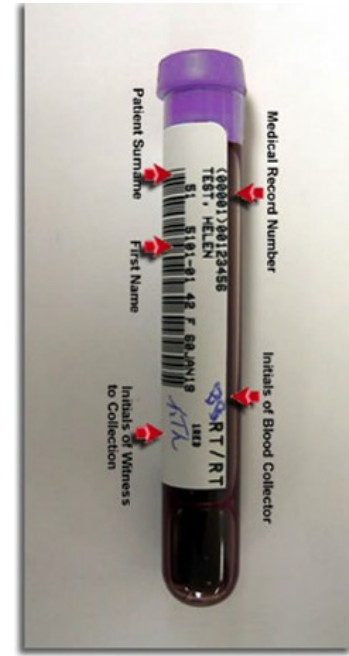


# Průkaz protilátek

- **Klasické metodiky**
  - Neutralizační test
  - Hemaglutinačně inhibiční test – viz. chřipka
  - Komplement fixační reakce
- **Nové metodiky**
  - ELISA
  - Western blot

# Sérologické vyšetření protilátek

**Sérologické vyšetření protilátek** proti adenovirům (AV), cytomegaloviru (CMV), viru Epstein a Barrové (EBV), enterovirům, hantavirům, virům hepatitidy, herpetickým virům, viru lidského imunodeficitu (HIV), virům chřipky, viru klíšťové encefalitidy, viru lymfocytární meningitidy, papillomavirům, parvoviru B19, virům parainfluenzy (PIV), polyomavirům, viru průšnic, Respiračnímu syncytiálnímu viru (RSV), viru spalniček, viru varicella zoster (VZV), viru zarděnek, chlamydiím



Pro sérologické vyšetření se odebírá žilní krev bez použití protisrážlivých prostředků s dodržováním všech bezpečnostních pravidel (dezinfekce místa vpichu, stříkačky a jehly pro jedno použití, rukavice pro jedno použití pro odebírající personál). Odběr by se měl provádět nejlépe ráno nalačno za aseptických podmínek.

- Vyšetření párových sér

- **Prokazuje reakci imunitního systému na infekci**
  - Lze prokazovat jednotlivé třídy imunoglobulinů
    - IgM – časné protilátky
    - IgG – pozdní protilátky
- **Není vhodný k monitorování léčby – nevypovídá o postupu onemocnění**

## Přímý

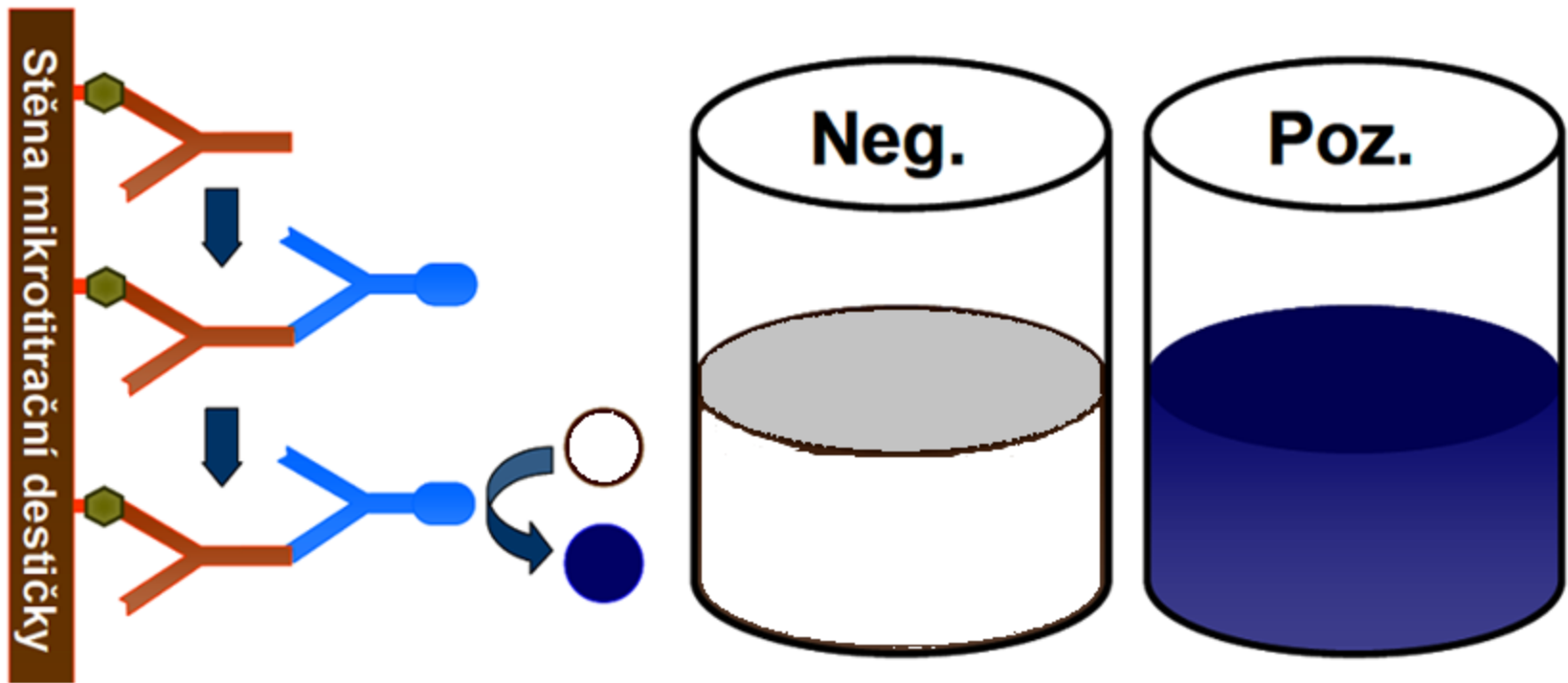
- kultivace na TK
- kuřecí embrya
- pokus na zvířeti
- elektronová mikroskopie
- světelná mikroskopie, imunofluorescence
- hemaglutinace
- hemadsorpce
- ELISA
- latexová aglutinace
- průkaz virové NK

## Nepřímý

- **ELISA**
- komplement-fixační test
- virus-neutralizační test
- inhibice hemaglutinace
- imunoblotting

# ELISA

- Sandwichová reakce s protilátkou značenou enzymem, který ve finálním kroku mění barvu barevného substrátu



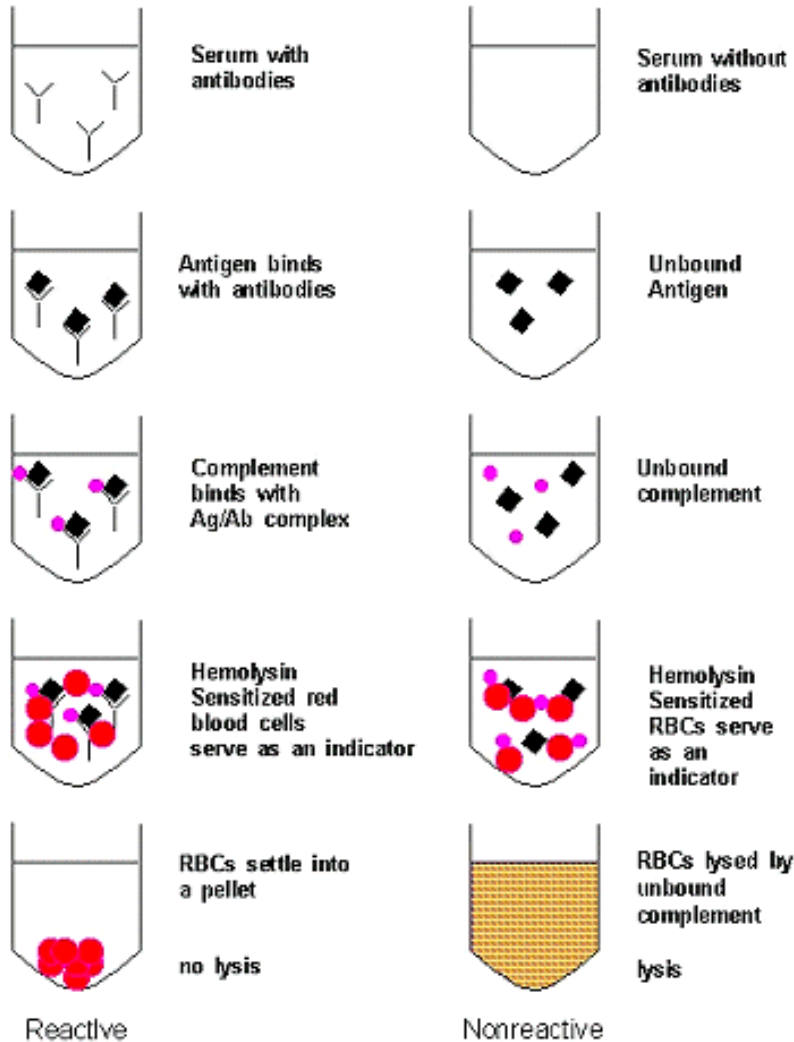
## Přímý

- kultivace na TK
- kuřecí embrya
- pokus na zvířeti
- elektronová mikroskopie
- světelná mikroskopie, imunofluorescence
- hemaglutinace
- hemadsorpce
- ELISA
- latexová aglutinace
- průkaz virové NK

## Nepřímý

- ELISA
- **komplement-fixační test**
- virus-neutralizační test
- inhibice hemaglutinace
- imunoblotting

# Complement Fixation Test



# Metoda vazby komeplementu

- 3 kroková reakce
  - 1) přidá se sérum s antigenem komplementárním k hledaným protilátkám
  - 2) přidá se komplement
  - 3) přidá se hemolytický komplex (beraní erytrocyty a králičí protilátky proti nim)

## Přímý

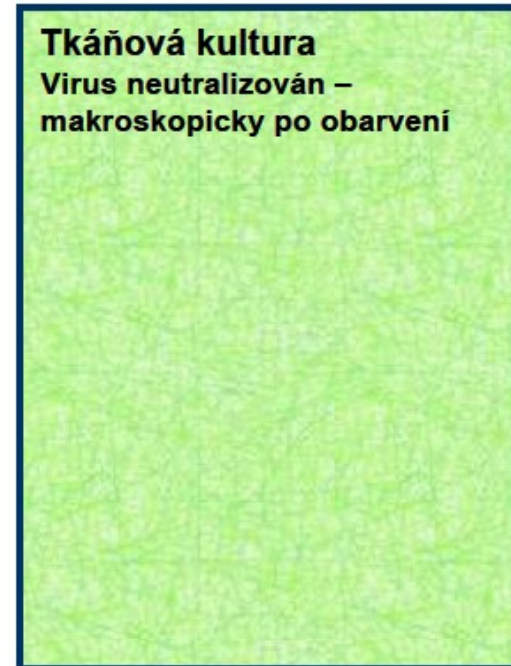
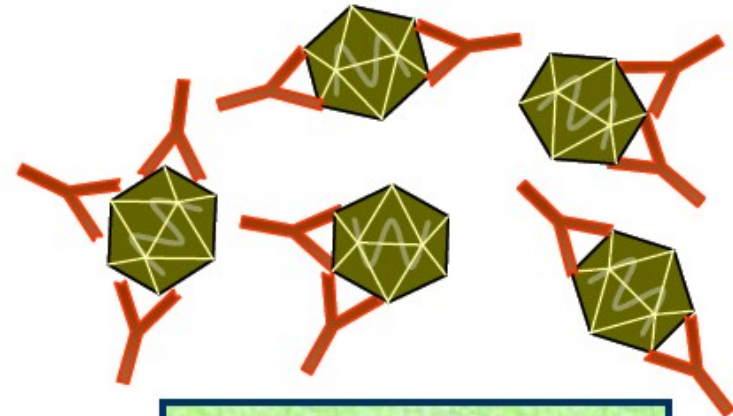
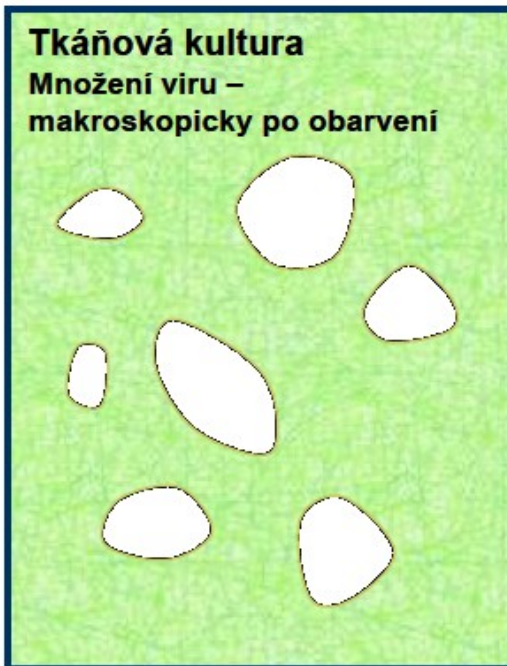
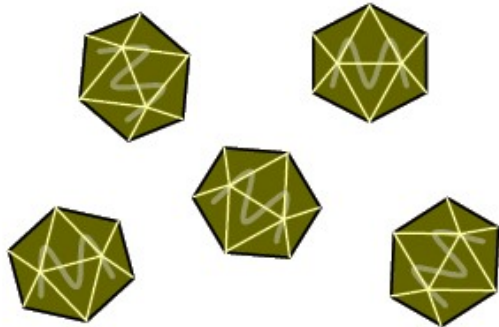
- kultivace na TK
- kuřecí embrya
- pokus na zvířeti
- elektronová mikroskopie
- světelná mikroskopie, imunofluorescence
- hemaglutinace
- hemadsorpce
- ELISA
- latexová aglutinace
- průkaz virové NK

## Nepřímý

- ELISA
- komplement-fixační test
- **virus-neutralizační test**
- inhibice hemaglutinace
- imunoblotting



# Neutralizační test



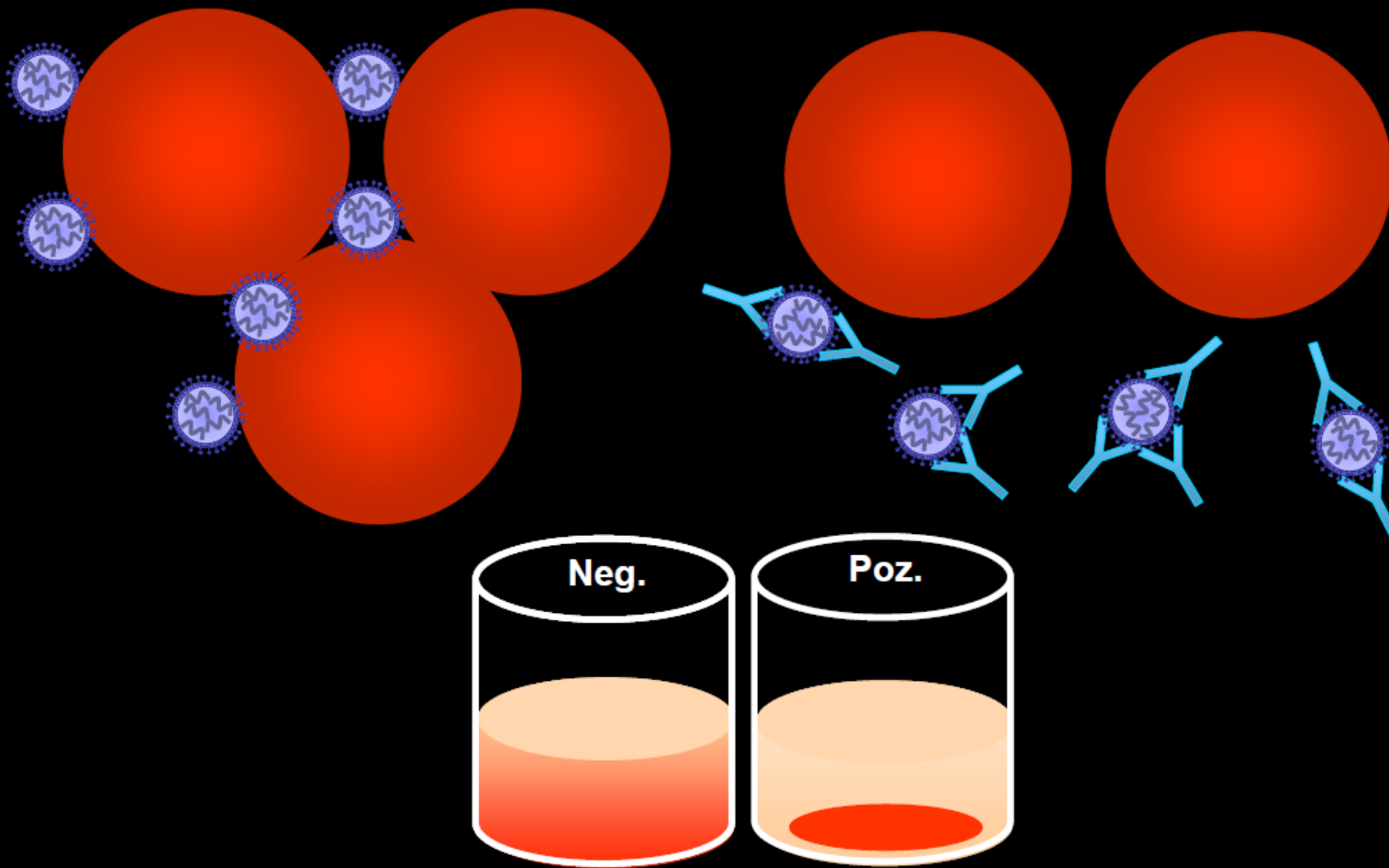
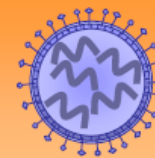
## Přímý

- kultivace na TK
- kuřecí embrya
- pokus na zvířeti
- elektronová mikroskopie
- světelná mikroskopie, imunofluorescence
- hemaglutinace
- hemadsorpce
- ELISA
- latexová aglutinace
- průkaz virové NK

## Nepřímý

- ELISA
- komplement-fixační test
- virus-neutralizační test
- **inhibice hemaglutinace**
- imunoblotting

# Hemaglutinačně inhibiční test



## Přímý

- kultivace na TK
- kuřecí embrya
- pokus na zvířeti
- elektronová mikroskopie
- světelná mikroskopie, imunofluorescence
- hemaglutinace
- hemadsorpce
- ELISA
- latexová aglutinace
- průkaz virové NK

## Nepřímý

- ELISA
- komplement-fixační test
- virus-neutralizační test
- inhibice hemaglutinace
- **imunoblotting**

# Imunoblotting

- Diagnostický strip obsahuje elektroforeticky rozdělenou směs kompletního virových antigenů
- Tyto proužky se inkubují se sérem pacienta
- Při inkubaci dojde k navázání konkrétních protilátek na konkrétní antigeny
- Strip se dále inkubuje s protilátkou značenou enzymem, který se naváže na všechny oblasti obsahující navázanou protilátku
- Po inkubaci s barvivo obsahující substrátem enzymu dochází k místní barevné reakci v oblastech komplexů

4. Indeterminate profile

5. Indeterminate profile (highly suggestive)

## Přímý

- **kultivace na TK**
- kuřecí embrya
- pokus na zvířeti
- elektronová mikroskopie
- světelná mikroskopie,  
**imunofluorescence**
- hemaglutinace
- hemadsorpce
- ELISA
- latexová aglutinace
- **průkaz virové NK**

## Nepřímý

- **ELISA**
- komplement-fixační test
- virus-neutralizační test
- inhibice hemaglutinace
- **imunoblotting**

# Multiplicita infekce – multiplicity of infection (MOI)

$$P(n) = \frac{m^n \cdot e^{-m}}{n!}$$

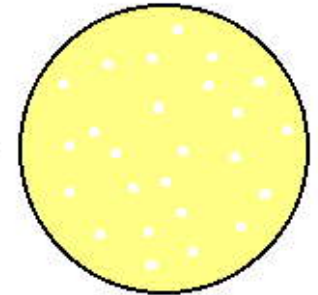
kde:

$m$  = multiplicita infekce (MOI)

$n$  = počet virů infikujících buňku

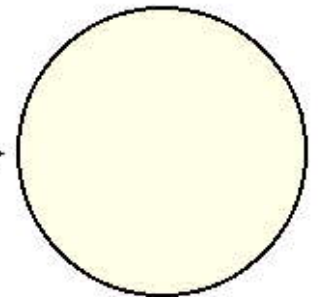
$P(n)$  = pravděpodobnost, že buňka bude infikována počtem  $n$  virionů

At low M.O.I. →



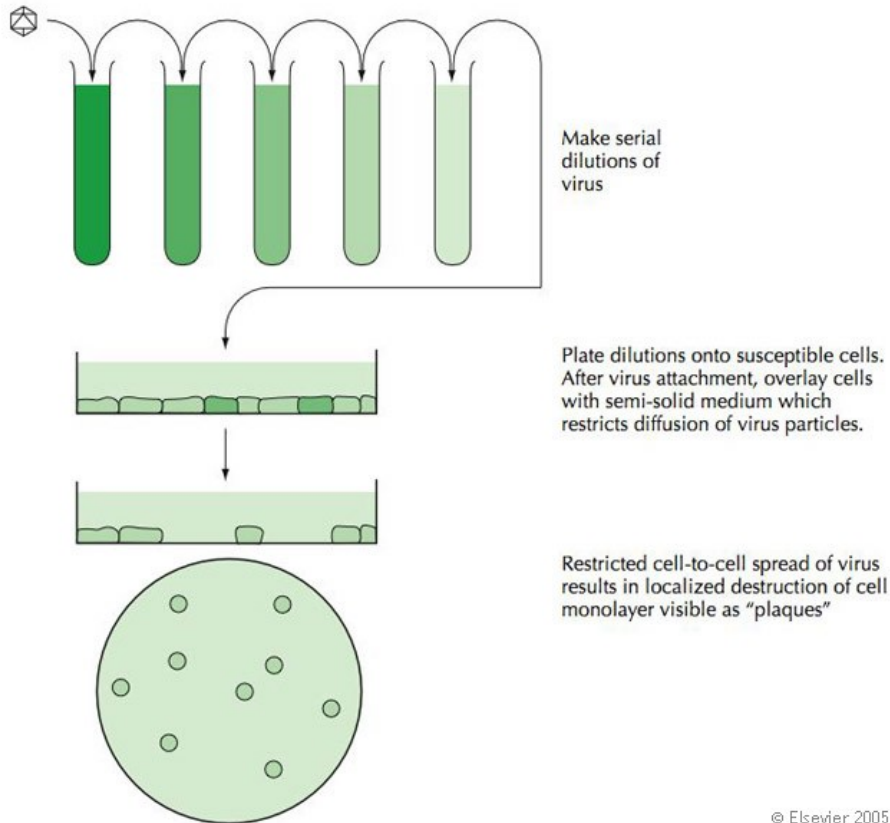
Bacterial Lawn  
with plaques

At higher M.O.I. →

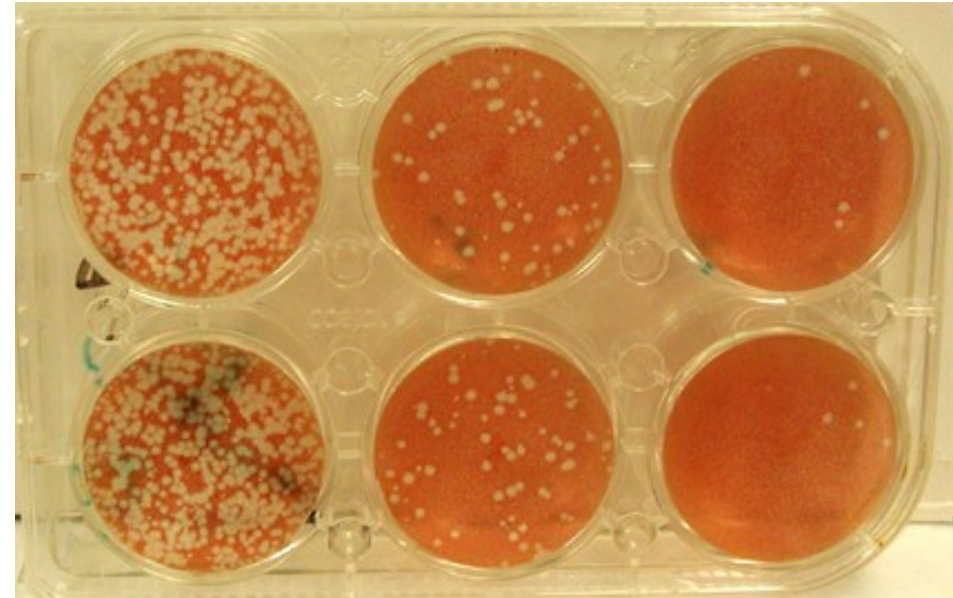


Confluent Lysed Plate

# Plaková titrace – plaque assay



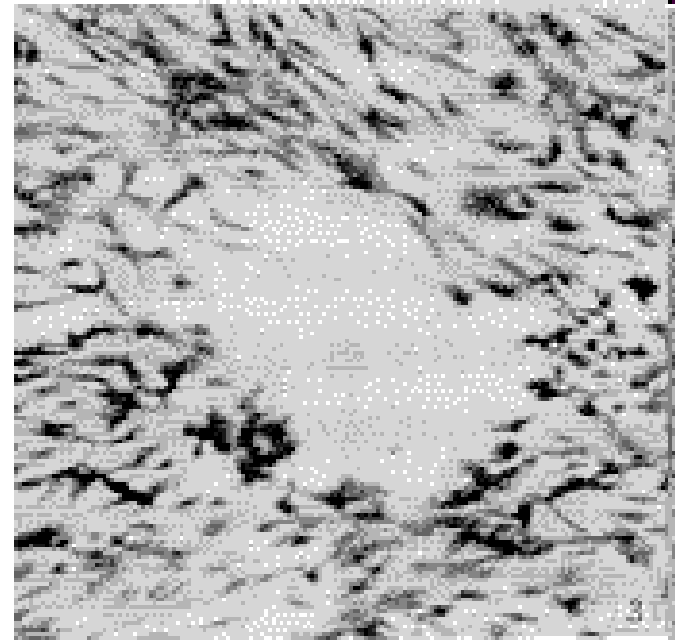
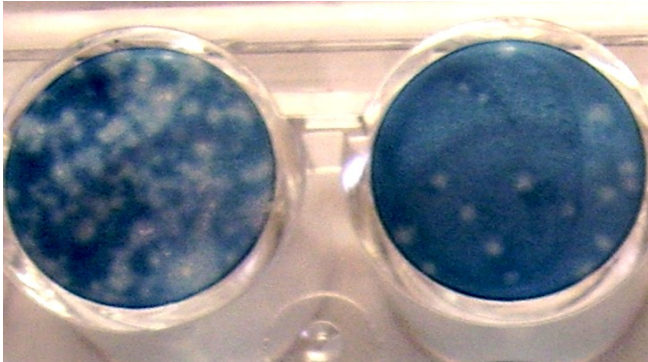
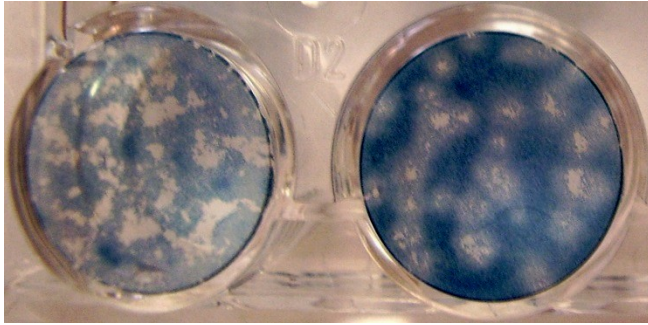
© Elsevier 2005



**Plaková titrace.** Virová suspenze ředěná určitým faktorem se přidá k jednovrstvě buněk. Buňky se barví v okamžiku, kdy virus infikuje jednu buňku, tu zlyzuje a nakazí okolní buňky za vzniku plaku. Každý plak je tedy výsledkem původně infekce jedné buňky jedním virem.

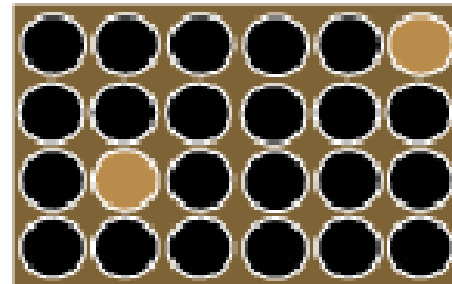
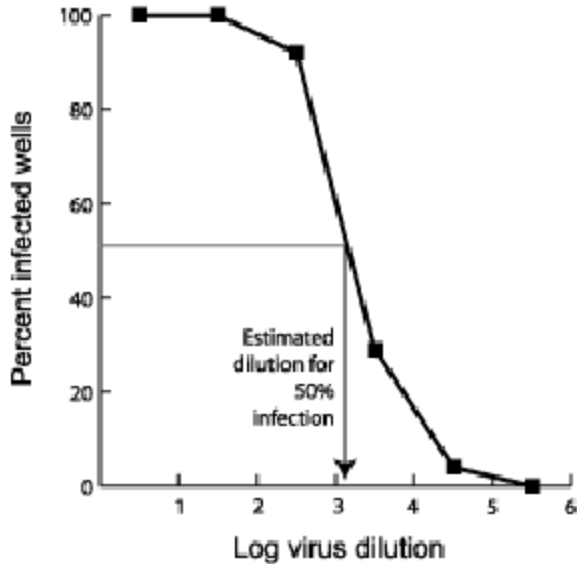


# Velikost a morfologie plaků

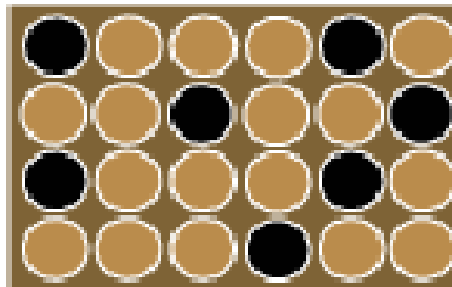


# Reed & Munch endpoint calculation method

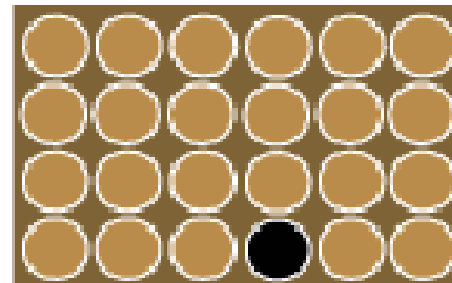
Add serial dilutions of virus to cells in a multiwell plate



22/24 wells infected (92%)



7/24 wells infected (29%)



1/24 wells infected (4%)

## Formulae

$$I = \left\{ \begin{array}{l} \frac{(\% \text{ of wells infected at dilution above } 50\% - 50\%)}{(\% \text{ of wells infected at dilution above } 50\% - \% \text{ of wells infected at dilution below})} \end{array} \right\}$$

$$50\% \text{ endpoint titer} = 10^{\log \text{ total dilution above } 50\% - (I \times \log h)}$$

## Definitions

I = Interpolated value of the 50% endpoint (*also known as the proportional distance*)

h = dilution factor