



# Lékařská virologie - přímý průkaz



Pro posluchače PF MU Brno, 2006

Doc. MUDr. Vlastimil Obdržálek, CSc,  
Mikrobiologický ústav LF MU

# Diagnostika virových infekcí

- Přímý průkaz virů :  
kultivace (je zdlouhavá a drahá)  
průkaz antigenů imunologickými nebo  
genetickými metodami
- častěji je užíván nepřímý průkaz virů, tedy  
stanovení protilátek proti nim



## Metody přímého průkazu viru

- Elektronová mikroskopie - v rutinní dg. se neužívá
- Optickým mikroskopem prokazujeme jen poxviry a virům podobné bakterie (chlamydie a rickettsie)
- V buňce vidíme virové inkluse (vzteklina, trachom, cytomegalie)

# Průkaz virových antigenů-ELISA

- v jamce je výrobcem navázána protilátka
- z klin. materiálu (např. séra) se naváže na protilátku antigen viru, promyjeme
- přidáme tzv. konjugát (protilátka proti imunoglobulinu s navázaným enzymem
- po promytí přidáme substrát, který je štěpen enzymem, přičemž vzniká zbarvení, reakci zastavíme kyselinou, zbarvení měříme fotometrem.

- - 
  -
- Naměřenou extinkci srovnáváme s hraniční hodnotou tzv. cut off
  - Výsledek udáváme jako pozitivní nebo negativní, v některých případech jako Index positivity, tj.. podíl extinkce a cut off
  - Použití: u hepatitidy B (HBsAg australský antigen), u viru chřipky, parachřipky, RS- viru a u chlamydií

•  
•  
•

## Jiné metody přímého průkazu

- Imunofluorescenční metody nahradily průkaz inkluzí
- australský antigen se dříve prokazoval precipitací v gelu
- RIA - radioimmunoassay se nevžila, diagnostické laboratoře nejsou většinou vybaveny pro práci s izotopy

# Genetické metody

- Genetické sondy - užití papilomaviry, rozeznáme vysoce onkogenní typy, u HCV prokazuje akutní infekci, v době kdy nejsou prokazatelné protilátky
- PCR - HIV, HBV, HCV, EBV, HHV6 a 7, CMV

## Izolace viru (kultivace)

- Viry nerostou na bezbuněčných půdách
- Izolovat je můžeme:
  - na zvířatech
  - na kuřecích zárodcích
  - na tkáňových kulturách
- virologické metody rozvíjeny významněji až po 2. světové válce



# Pokusná zvířata, očkování

- Bílá myš je symbolem nejen psychiatra, ale virologa
- intracerebrálně - virus klíšť. encefalitidy  
virus herpes simplex, u ornitosy  
intraperitoneálně
- sající myšata - coxsackieviry sk. A, reoviry
- morčata - virus kulhavky a slintavky
- pokusné zvíře uhynie, změny na orgánech

# Kuřecí zárodek

- Struktura:
  - pod skořápkou membrana papyracea
  - pod ní chorioalantoidní membrána
  - alantoidní vak (10 ml)
  - amniový vak (3 ml) v něm
  - zárodek (velké oko a zobák), na břišní straně
  - žloutkový vak (dg. chlamydií, rickettsií)
- Vejce prosvítíme a zubařskou vrtačkou odbrousíme skořápku nad vzduchovou bublinou

# Očkování kuřecího zárodku

- Do amnia: Virus chřipky- aplikujeme 0,2 ml jehlou (směrem k oku), zalepíme leukoplastí a voskem, inkubace 3 dny
- Do alantois: aplikujeme až 0,5 ml (jen adaptované kmeny viru chřipky). Po 3 dnech vejce asepticky otevřeme a v tekutině prokazujeme Hirstovým testem viry (aglutinují erytrocyty)
- Na choriolalantoidní membránu: Užíváme u poxvirů, očkujeme pod skořápku, vytvoří se poky.

# Tkáňové kultury I

- Buňky primární - připravené z orgánů, dají se jen 2-3x pasážovat
- Buňky liniové - lze pasážovat mnohokrát (často nádorové buňky)
- Pro kultivaci TK nutné nejčistší chemikálie, redestilovaná voda ve skle, speciální sklo dnes užíváme plasty, zkumavky nebo Rouxovy (čti Ru) láhve

## Tkáňové kultury II

- Media : Parker, Eagle, MEM medium.
- Media obsahují : soli, AA, glukosu, růstové faktory, ATB, fenol. červeň, pH indikátor, + až 20 % telecího séra
- Liniové buňky: HeLa (ca cervicis uteri)
- Primární buňky: OL (opičí ledviny), LEP (lidské embr. plíce) - dodáváno z Prahy

# Tkáňové kultury III

- TK kultivujeme při 37 C několik dnů
- Buňky vytvoří na stěně Rouxovy láhve jednovrstevný list buněk (monolayer)
- Po naočkování materiálem dochází k morfol. změně buněk (cytopatický efekt)
- Tento pozorujeme malým zvětšením přes stěnu láhve nebo zkumavky.
- CPE je charakteristický, jindy se nevytvoří

## CPE a dourčení viru

- Pikornaviry: Zakulacené bb., alkalizace
- RS-virus a viry parainfluenzy: Syntitia
- Poxviry: Ložiskový CPE
- Herpesviry: Malá syntitia, balonovité bb.
- Virus chřipky: Bez CPE, hemadsorbce
- Virus zarděnek: Bez CPE, interference
- Enteroviry: Přežití 80 C s Mg ionty
- Obalené viry: Citlivost k eteru