

Klinická virologie I (J12)



- Autor prezentace: Ondřej Zahradníček
- Praktika z lékařské mikrobiologie (VLLM0421c)
- Kontakt
- 777 031 969 zahradnicek@fnusa.cz
- ICQ 242-234-100



Přehled metod – a které využijeme:

- **Přímé metody** (*práce se vzorkem či kmenem*)
 - Mikroskopie (nativní preparát, barvení...)
 - Kultivace (na tekutých i pevných půdách)
 - Biochemické a podobné identifikační metody
 - **Průkaz antigenu (pomocí protilátky)**
 - Pokus na zvířeti (izolace, průkaz toxicity)
 - **Průkaz nukleové kyseliny**
- **Nepřímé metody**
 - **Průkaz protilátek (pomocí antigenu)**



Virologická diagnostika

- **Kultivace** → **izolace** Vyžaduje živé buňky.
- **Mikroskopie**: elektronoptická, optická jen k průkazu něčeho, co viry dělají in vivo či in vitro (inkluze, cytopatický efekt)
- **Biochemická identifikace** nepadá v úvahu
- **Pokus na zvířeti** zde splývá s izolací viru
- **Průkaz DNA** – u virů > u bakterií
- **Průkaz AG ve vzorku** – velmi běžný
- **Nepřímý průkaz** – **obvykle základem veškeré diagnostiky virů**



Izolace virů

- **Zvíře** se používá dnes již méně často. Klasickým zvířetem je sající myš.
- **Vaječný zárodek** je klasickou metodou
 - Amniová dutina
 - Alantois
 - Žloutkový vak
 - Chorioalantoidní membrána (pouze zde někdy pozorovatelný výsledek – tzv. poky)
- **Tkáňové kultury**: LEP, HeLa, opičí ledviny a různé jiné. Některé viry dělají na TK cytopatický efekt (CPE)



Jak prokážu virus, když ho není nijak vidět?

- **Bakterie** při kultivaci tvoří viditelné kolonie, nebo aspoň kalí bujón. Naproti tomu, jen někdy vidíme výsledek izolace **viru** (CPE, poky), mnohem častěji výsledek viditelný není
- Izolovaný virus tedy musíme nějak **prokázat**, třeba průkazem antigenu
- Klasickou metodou je **Hirstův test** – průkaz schopnosti viru shlukovat krvinky



Mikroskopie ve virologii

- **Elektronová mikroskopie** je vhodná k pozorování většiny virů. Je však velmi nákladná a není vždy dostupná
- **Optická mikroskopie** se dá použít
 - K pozorování **velikých virů** (poxviry)
 - K pozorování **buněčných inkluzí** in vivo (Negriho tělíska u vztekliny)
 - K pozorování **cytopatických efektů** in vitro (řada různých virů)



Úkol 1: aplikace inkoustu („viru“) do amniové dutiny

- Vejce prosviňte v ovoskopu
- Odřízněte skořápku nad vzd. bublinou
- Na papírovou blanku kápněte alkohol
- Vejce opět prosviňte v ovoskopu
- Jehlou se jakoby snažte vypíchnout oko kuřecímu zárodku (ono stejně uteče)
- Aplikujte inkoust
- *Případně si zkuste vejce zavíčkovat*
- Vejce rozklopte a sledujte výsledek



Další úkoly

- **Úkol 2:** Proved'te dle návodu. Po inkubaci by mělo být patrné virové shlukování krvinek
- **Úkol 3:** Proved'te nepřímý průkaz viru klíšťové encefalitidy pomocí HIT
- **Úkol 4:** Proved'te nepřímý průkaz několika virů pomocí KFR
- **Úkol 5:** Strčte si do mikroskopu celé zkumavky tak jak jsou, snažte se zaostřit na vnitřní stěnu. Možná uvidíte TK, v některých možná i s CPE.



Připomenutí k úkolům 4 a 5

- U HIT je pozitivní zábrana virového shlukování krvinek, negativní shlukování
- U KFR je pozitivní nepřítomnost hemolýzy, negativní hemolýza
- Titr je nejvyšší ředění, kde je ještě reakce pozitivní
- Čtyřnásobný vzestup/pokles titru se považuje za signifikantní při použití párových sér



Úkol č. 6 – shell-vials techniky (demonstrace)

- Jde o techniky urychlené kultivace. Jsou v poslední době velice populární. Je to přímý průkaz, a přitom není tak zdlouhavý a komplikovaný jako klasická izolace viru



Hezký den!

POKUK –
Starobrněnská 12,
19.30 h

31. 5. – téma
„Hynku, Viléme,
Jarmilo“

Další 22. 6. – téma
„Zprasdny“

