

Téma P09: Přehled virologické diagnostiky









K nastudování: Vyhledejte si pojmy z virologické diagnostiky, zejména pojmy jako: izolace virů, cytopatický efekt, buněčná kultura, průkaz virových antigenů

Úkol 1: Stanovení hemaglutinační jednotky viru chřipky v amniové tekutině (Hirstův test)

Je-li virus izolován v amniové tekutině, není výsledek viditelný. Není tedy jasné, zda byla izolace pozitivní nebo ne. Jeden ze způsobů, jak ověřit přítomnost viru v amniové tekutině je spojena se schopností mnoha virů aglutinovat in vitro červené krvinky. Tato schopnost virů je používána také při HIT. Před HIT je nutno titrovat viry, aby se určila jejich „síla“. Měří se v tzv. hemaglutinačních jednotkách. Hemaglutinační jednotka je nejmenší množství viru, které je ještě schopno aglutinovat dané množství erytrocytů.

Studenti Bi7170 mají výsledek reakce předkreslen v protokolu.

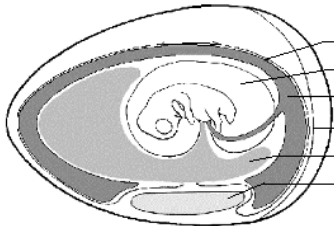

Zakreslete výsledky a запиšte, jaké ředění odpovídá jedné hemaglutinační jednotce (1 HU).

K-	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	
								1HU ~ 1:

Úkol 2: Izolace virů na kuřecím zárodku

Na obrázku a) v prvním sloupci přidejte popisky k příslušným strukturám. Do druhého sloupce **zapište NEUŽÍVÁ SE**, pokud se daná struktura neuzívá pro izolaci viru, **UŽÍVÁ SE** pokud se používá a **UŽÍVÁ SE – POKY** pro strukturu, na které některé poxviry a herpesviry vytvářejí poky.

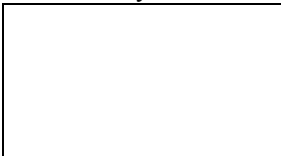
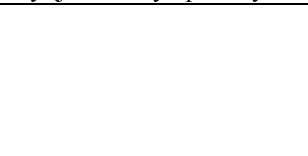
Na obrázku b) vpravo si prohlédněte obrázek kuřecího embrya, kterému byl do amniové dutiny vpraven inkoust, modelující virus. Vlevo je nepodařený výsledek, kdy se inkoust dostal do allantois.

a)	Struktura	Používá se k iz.?	b)
			

Úkol 3: Hodnocení buněčných kultur

Roux-láhve (čti: rú) nebo zkumavky s narostlými buněčnými kulturami (dříve také označovanými jako „tkáňové“) se prohlížejí pod mikroskopem při malém zvětšení (objektiv 10×).

Bohužel se v naší laboratoři izolace virů na buněčných kulturách neprovádí. Protože však jde o metodu z celosvětového hlediska stále důležitou, nechceme vás o tento úkol zcela připravit. Podle prezentace zakreslete dva obrázky buněčné kultury (jeden s cytopatickým efektem a jeden bez něj)

	
Buněčná kultura s CPE	Buněčná kultura bez CPE

Charakterizujte změny buněčné kultury v případě CPE: _____

Úkol 4: Diagnostika parotitidy reakcí ELISA

Parotitida (příušnice) se zpravidla prokazuje reakcí ELISA.

IgG: Hodnota cut off (počítána jako průměr jamek "STAND") je:		IgM: Hodnota cut off (počítána jako průměr jamek "STAND") je:	
90 % cut off	110 % cut off	90 % cut off	110 % cut off
Kontroly <input type="checkbox"/> jsou OK <input type="checkbox"/> nejsou OK		Kontroly <input type="checkbox"/> jsou OK <input type="checkbox"/> nejsou OK	
Výsledky: Oba vyšetřovaní pacienti jsou pozitivní-negativní ve třídě IgG a pozitivní-negativní ve třídě IgM			
Nejpravděpodobnější vysvětlení je:			

Upozorňujeme, že způsob hodnocení kontrol a patientských výsledků je ve skutečnosti u této reakce ELISA podstatně složitější. Pro účely tohoto praktika byl výrazně zjednodušen.

Úkol 5: Stanovení komplementfixačních protilátek proti nejčastějším původcům respiračních nákaz

Na destičce je vyšetřena dvojice sér jediného nemocného s atypickou pneumonií. V prvním sloupci kontrola antikomplementarity séra. Ve druhém důlku je ředění 1:4. Zakreslete výsledek a vyhodnoťte. U vzestupu/poklesu případně uveďte také o kolikanásobný vzestup/pokles jde.

Onemocnění								vzestup/pokles	diagnostický závěr	
	I	○	○	○	○	○	○	TITR = 1:		
	II	○	○	○	○	○	○	TITR = 1:		
	I	○	○	○	○	○	○	TITR = 1:		
	II	○	○	○	○	○	○	TITR = 1:		
	I	○	○	○	○	○	○	TITR = 1:		
	II	○	○	○	○	○	○	TITR = 1:		

Tuto část z časových důvodů neřešte.

Úkol 6: Zjištění titru protilátek proti viru klíšťové encefalitidy pomocí hemaglutinačně inhibičního testu (HIT)

Na mikrotitrační destičce jsou vyšetřeny dvojice sér několika pacientů se suspektní klíšťovou encefalitidou. V posledním řádku je kontrola antigenu a kontrola krvinek. Za titr považujeme nejvyšší ředění se zábranou hemaglutinace. V prvním důlku je ředění 1:5. Zakreslete výsledky reakce, doplňte chybějící ředění, zapište titry a vyhodnoťte.

Pacient	Vzorek	1:5	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	TITR (vyplňte jen u pozitivních sér)	Vzestup/pokles titru (kolikrát)	Diagnostický závěr
Pozitivní kontrola		○	○	○	○	○	○	TITR = 1:	Pozitivní kontrola je – není pozitivní	
Kamil	I	○	○	○	○	○	○	TITR = 1:		1 – kontrola antigenu (normální je hemaglutinace)
	II	○	○	○	○	○	○	TITR = 1:		
Laura	I	○	○	○	○	○	○	TITR = 1:		2 – kontrola krvinek (normální je nepřítomnost hemaglutinace)
	II	○	○	○	○	○	○	TITR = 1:		
Milena	I	○	○	○	○	○	○	TITR = 1:		Kontroly 1 a 2 v pořádku?
	II	○	○	○	○	○	○	TITR = 1:		
Naďa	I	○	○	○	○	○	○	TITR = 1:		ano – ne
	II	○	○	○	○	○	○	TITR = 1:		

K úkolům 11 až 15

Odečtete vždy výsledky vyšetření, nezapomeňte ověřit kontroly, pokuste se učinit závěr, je-li to možné.

Ke všem hepatitickým úkolům

Pracujeme s osmi pacienty – A, B, C, D, E, F, G, H. Všichni mají příznaky žloutenky, všichni byli testováni na markery hepatitid. Výsledky pište nejen k jednotlivým úkolům, ale i do tabulky v úkolu číslo 14 (jako + či –). Hodnoty cut off, 90 % a 110 % cut off máte kromě prvního případu spočítány, kontroly zkontrolovány.

Úkol 11: Diagnostika viru hepatitidy A (HAV)

a) vyšetření IgM: Cut off = $(C1 + D1) / 2$ Cut off = (+)/2 = _____ Všechny kontroly jsou v pořádku.		b) vyšetření celkových protilátek: Cut off = $(C1 + D1) / 2$ Cut off = $(0,425 + 0,422) / 2 = 0,424$ Všechny kontroly jsou v pořádku.	
90 % cut off	110 % cut off	90 % cut off	110 % cut off
		0,382	0,466
Pozitivní pacienti:		Pozitivní pacienti:	
Hraniční pacienti:		Hraniční pacienti:	
Negativní pacienti:		Negativní pacienti:	

Úkol 12: Diagnostika viru hepatitidy B (HBV)

a) vyšetření HBsAg: Cut off = 0,588 Všechny kontroly jsou v pořádku.		b) vyšetření HBeAg: Cut off = 0,477 Všechny kontroly jsou v pořádku.	
90 % cut off	110 % cut off	90 % cut off	110 % cut off
0,529	0,647	0,429	0,525
Pozitivní pacienti:		Pozitivní pacienti:	
Negativní pacienti:		Negativní pacienti:	
c) vyšetření anti-HBs: Cut off = 0,348 Všechny kontroly jsou v pořádku.		d) vyšetření anti-HBe: Cut off = 0,820 Všechny kontroly jsou v pořádku.	
90 % cut off	110 % cut off	90 % cut off	110 % cut off
0,313	0,383	0,738	0,902
Pozitivní pacienti:		Pozitivní pacienti:	
Negativní pacienti:		Negativní pacienti:	
Poznámky k jednotlivým markerům hepatitidy B:			

Úkol 13: Diagnostika viru hepatitidy C(HCV)

Úkol 13a) Polymerázová řetězová reakce v diagnostice HCV

Vyhodnoťte výsledek PCR (gelová elektroforéza), zakreslete a vyhodnoťte důsledky

Obrázek:	1 = pozitivní kontrola <input type="checkbox"/> OK (pozitivní) <input type="checkbox"/> není OK (negativní či inhibice)	
	2 = výsledek pacienta A:	6 = výsledek pacienta E:
	3 = výsledek pacienta B:	7 = výsledek pacienta F:
	4 = výsledek pacienta C:	8 = výsledek pacienta G:
	5 = výsledek pacienta D:	9 = výsledek pacienta H:
	10 = negativní kontrola <input type="checkbox"/> OK (negativní) <input type="checkbox"/> není OK (pozitivní či inhibice)	

Úkol 13b) Průkaz protilátek anti-HCV metodou ELISA

Cut off = 0,392	
Všechny kontroly jsou v pořádku.	
90 % cut off	110 % cut off
0,353	0,431
Pozitivní pacienti:	
Negativní pacienti:	

Úkol 14: Závěrečné hodnocení k úkolům, týkajícím se hepatitid (11, 12 a 13)

Podle informace učitele doplňte další poznámky ke svým pacientům. Poté se pokuste učinit celkový závěr.

Pac.	HAV		HBV				HCV		Další indicie (zkrat'te)	Závěr
	IgM	TOT	HBs	HBe	a-HBs	a-HBe	PCR	Ig		
A										
B										
C										
D										
E										
F										
G										
H										

TOT = total, HBs = HBsAg, HBe = HBeAg, a- = anti-

Úkol 15: Diagnostika viru lidského imunodeficitu (HIV)

Pozitivní či hraniční séra je třeba confirmovat (= zaslat do NRL v Praze k ověření)

Cut off = 0,596	
Všechny kontroly jsou v pořádku.	
90 % cut off	110 % cut off
0,536	0,656
Pacienti, kteří mají být confirmováni (pozitivní, hraniční):	

Úkol 16: Diagnostika virů čeledi *Herpesviridae*

Herpesviry jsou důležité viry, které zahrnují důležité druhy. Diagnostické metody jsou podobné těm používaným u virů hepatitid či HIV, ale u některých herpesvirů zahrnují také izolaci virů na buněčných kulturách, případně i na oplodněném vejci (s tvorbou tzv. *poků* – viditelných struktur na chorioalantoidní membráně – CAM)

Vyplňte prázdné buňky následující tabulky s pomocí prezentace a/nebo učitele:

Pro studenty Bi7170 jsou pole již vyplněna.

Virus	Zkratka	Nemoc	Hlavní přímé metody	Hlavní nepřímé metody
Herpes simplex virus (typ 1 a 2)	HSV1,2	Opar rtu Genitální opar	Kultivace na buněčných kulturách, PCR	ELISA a další reakce se značenými protilátkami (různé třídy protilátek, případně i různá avidita)
Varicella zoster virus	VZV	1) plané neštovice 2) pásový opar	Zejména PCR, jen výjimečně kultivace na buněčných kulturách (VZV)	
Epstein-Barrové virus	EBV	Infekční mononukleóza		
Cytomegalovirus	CMV	Cytomegaloviróza		
Lidské herpesviry 6 a 7	HHV6,7	Exanthema subitum čili roseola infantum		
Lidský herpesvirus 8	HHV8	Podíl na Kaposiho sarkomu (u HIV +)		

Úkol 17: Praktická diagnostika infekční mononukleózy

Infekční mononukleóza je nebezpečné onemocnění, které zahrnuje i onkogenní potenciál. Na druhou stranu má velká většina populace protilátky, protože se v předchozím životě setkala s onemocněním, respektive se nacházejí v jeho latentní fázi.

Nepřímá diagnostika zpravidla zahrnovala detekci takzvaných heterofilních protilátek pomocí reakce známé jako Paul-Bunnelova nebo Paul-Bunnel-Davidsohnova. Později byla tato reakce modifikována a začaly se používat její varianty OCH a IM. Ty se používají stále, i když ne příliš často.

V současnosti nejčastější způsoby diagnostiky zahrnují detekci specifických protilátek, zpravidla dvou typů:

Protilátky proti EBNA – Epstein-Barr (virový) nukleární antigen – nejsou přítomny u čerstvých infekcí, většinou jsou přítomny u latence a reaktivace

Protilátky proti VCA – virový kapsidový antigen – u čerstvých infekcí jsou typické protilátky IgM a nízkoavidní IgG

Základní interpretace je následující (*modifikováno ze standardních operačních postupů ústavu*):

	IgG anti-VCA	IgM anti-VCA	IgG anti-EBNA
Vnímavý jedinec (dosud neinfikován)	negativní	negativní	negativní
Běžný nález (kontakt v minulosti, zpravidla s následkem latence)	pozitivní	negativní	pozitivní
Akutní primární infekce	pozitivní/negativní	pozitivní	negativní
Reaktivace (případně některé akutní primární infekce)	pozitivní	pozitivní	pozitivní

Poznámka: Další často doporučené vyšetření je avidita IgG protilátek anti-VGA. U primární infekce protilátky zpravidla mají nízkou aviditu, v případě reaktivace či latence bývá avidita vyšší.

Zhodnoťte výsledky daných pacientů proti EB-virovým antigenům a vyplňte následující tabulky s výsledky

	Cut off	90 % c. o.	110 % c. o.	Kontroly OK?	Výsledky
IgG anti-VCA				ano – ne	Čísla negativních pacientů (pokud nějakí jsou):
IgM anti-VCA				ano – ne	Čísla pozitivních pacientů (pokud nějakí jsou):
IgG anti-EBNA				ano – ne	Čísla negativních pacientů (pokud nějakí jsou):

Závěrečné vyhodnocení je na další stránce.

Všimněte si, že dva pacienti mají výsledky odlišné od ostatních, ale odlišné i vzájemně.
Pokuste se o konečný závěr (výsledky vyznačte jako “+” či “-“ a pokuste se o interpretaci):

Pacienti		IgG anti-VCA	IgM anti-VCA	IgG anti-EBNA	Interpretace
Pacient číslo (napište číslo pacienta)					
Pacient číslo (napište číslo pacienta)					
Všichni ostatní pacienti					