Základy virologické diagnostiky

Financováno Evropskou unií
NextGenerationEU
NÁRODNÍ PLÁN OBNOVY
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

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 baktérie 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 specielní přístrojové vybavení například boxy s laminárním prouděním vzduchu

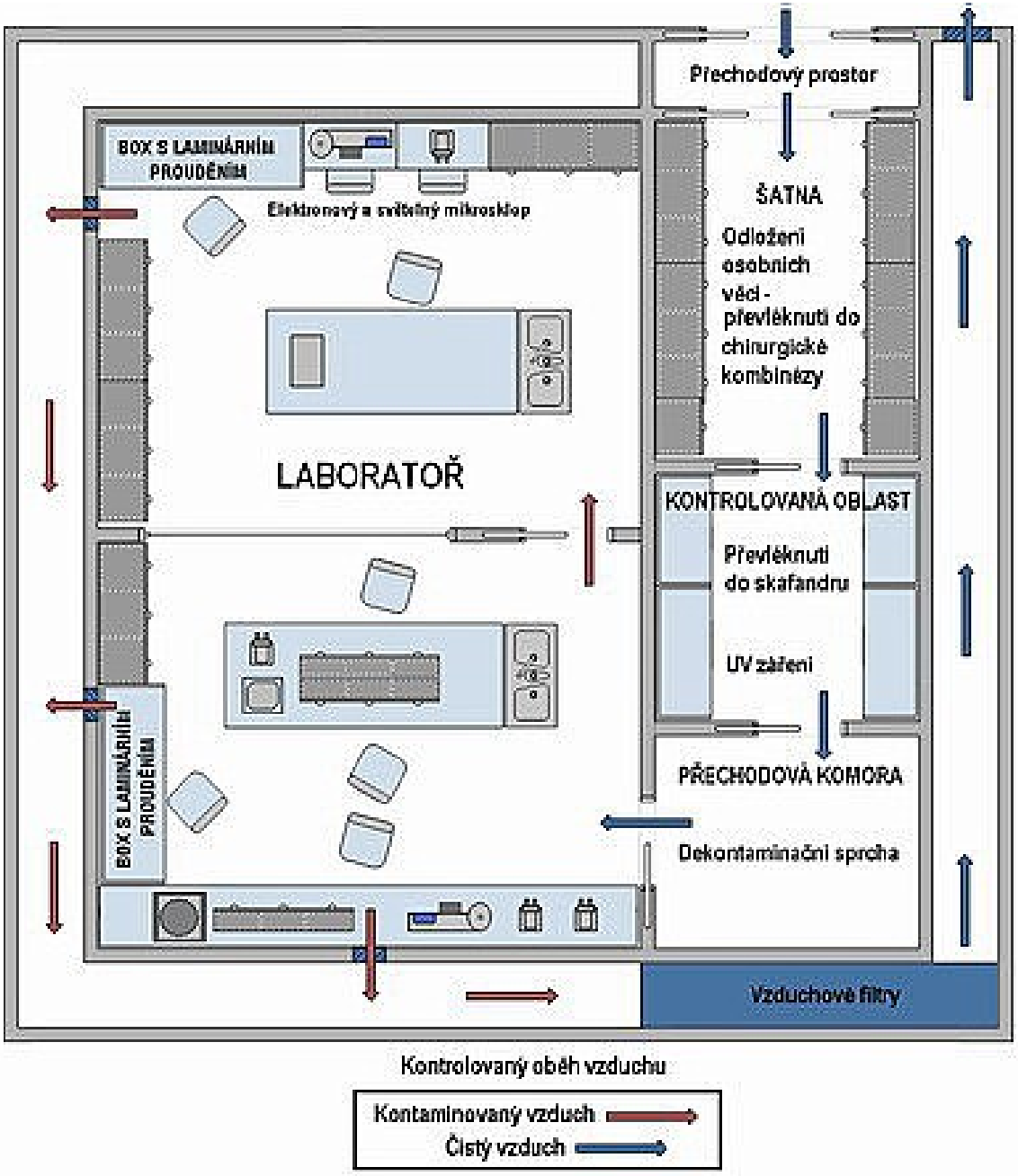
BSL-3

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 encefalitidy 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).

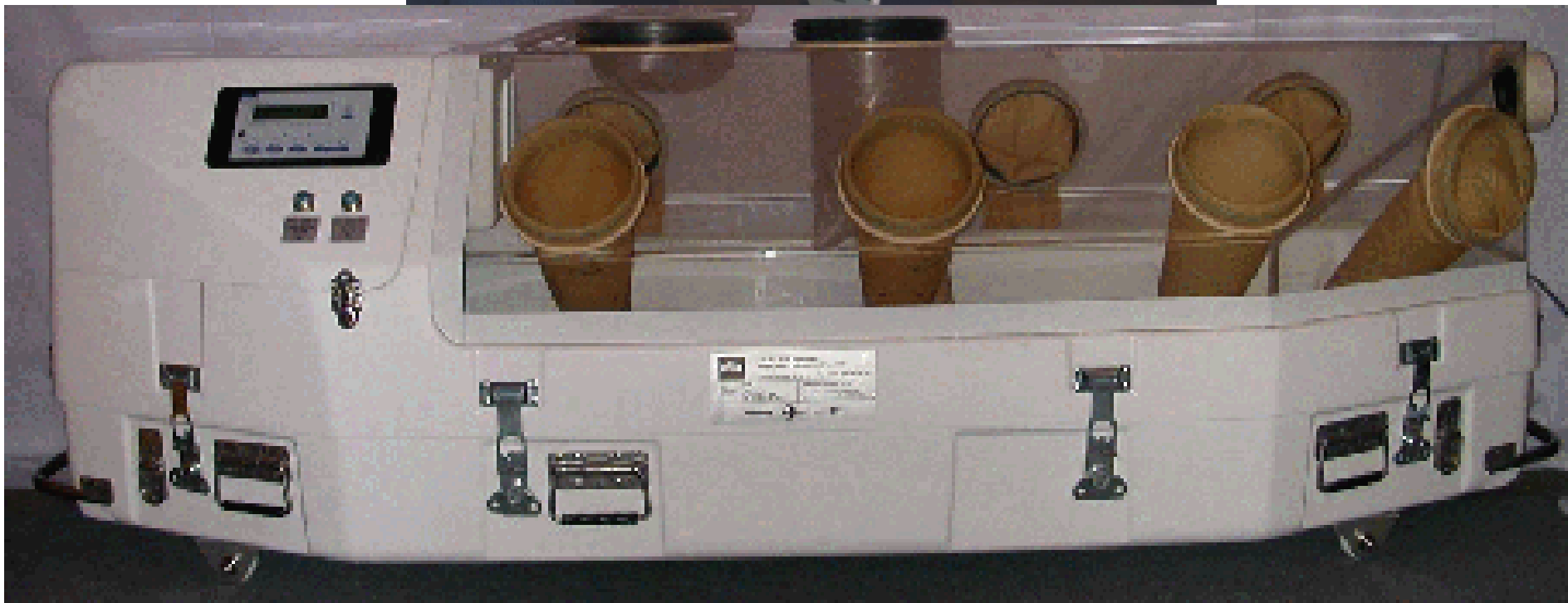
BSL-4

Biosafety level 4 (BSL4) – je určen pro specielní manipulaci s vysoce infekčními původci onemocnění proti nimž neexistuje účinná léčba ani očkování. Sem řadíme například virus Eboly, virus Lassa, virus SARS, hantaviry, ruské kmeny 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.


Přechodový prostor
BOX S LAMINÁRNÍM PROUDĚNÍM
Elektronový a světelný mikroskop
ŠATNA
Odložení osobních věcí - převlečnutí do chirurgické kombinézy
LABORATOŘ
KONTROLOVANÁ OBLAST
Převlečnutí do skafandru
UV záření
BOX S LAMINÁRNÍM PROUDĚNÍM
PŘECHODOVÁ KOMORA
Dekontaminační sprcha
Vzduchové filtry
Kontrolovaný oběh vzduchu
Kontaminovaný vzduch
Čistý vzduch

REPUB



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

Onemocnění	Odebrané vzorky
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	Mozkomíšní 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: (nevyplňujte)

ŽÁDANKA O VIROLOGICKÉ VYŠETŘENÍ

Vyšetření provede
VIROLOGICKÉ ODDĚLENÍ
tel.: 596 200 111, fax: 596 118 661
IČZ: 91 866 000

M 8014

PACIENT: Příjmení, jméno:

Rodné číslo: _ _ _ _ _ _ / _ _ _ _ Kód pojišťovny: _ _ _ Kód diagnózy: _ _ _ _

Bydliště:

Vzorek (specifikovat): Diagnóza nebo příznaky onemocnění:

Datum odběru, čas (hh.mm): Začátek onemocnění:

Přímý průkaz agens - kultivace, elektronová mikroskopie, průkaz antigenů, genomu

Kultivace - izolační pokus:
- ☐ Kultivační průkaz virů (veškerý materiál) na: tkáňových kulturách, k. embryu, saj. myši

Elektronmikroskopický průkaz agens:
- ☐ Negativní barvení virů (veškerý materiál)

Průkaz antigenů:
- ☐ Rotaviry (stolice)
- ☐ Adenoviry (stolice)
- ☐ Noroviry (stolice)
- ☐ Astroviry (stolice)
- ☐ Respirační viry (výtěr z nosohltanu)
- ☐ p24 HIV-1 - antigenemie + a-HIV-1, 2 (krev - sérum)
- ☐
- ☐
- ☐

Průkaz genomu:
- ☐ *Chlamydia trachomatis* (hybridizace DNA) a *Neisseria gonorrhoeae* (hybridizace DNA) (spec. výtěr z cervixu nebo uretry, ev. spojivky)
- ☐ Papillomaviry (HPV) (hybridizace DNA) (spec. výtěr z cervixu)
- ☐ Cytomegalovirus (DNA-PCR)
- ☐ Herpes simplex v. typ 1, 2 (DNA-PCR)
- ☐ Epsteina - Barrové v. (DNA-PCR)
- ☐ Varicella - zoster v. (DNA-PCR)
- ☐ Enteroviry (RNA-PCR)
- ☐ *Mycoplasma pneumoniae* (DNA-PCR)
- ☐ *Chlamydophila pneumoniae* (DNA-PCR)
- ☐ *Chlamydia trachomatis* (DNA-PCR)
- ☐

Průkaz protilátek - sérologická vyšetření (krev – sérum, likvor)

- ☐ Respirační agens (Influenza v. A, B, Parainfl. vv., Adenoviry, RS-virus, *Mycoplasma pneumoniae*)
- ☐ Herpetické viry: (CMV, EBV, HSV, VZV)
- ☐ Cytomegalovirus (CMV)
- ☐ Epsteina - Barrové v. (EBV)
- ☐ Herpes simplex v. (HSV)
- ☐ Varicella-zoster v. (VZV)
- ☐ Herpes hominis v. typ 6 (HHV-6) (6. nemoc)
- ☐ Parvovirus B-19 (5. nemoc)
- ☐ Morbilli v. (1. nemoc)
- ☐ Rubeola v. (3. nemoc)
- ☐ Parotitis v.
- ☐ Enteroviry, Coxsackie vv. B1-6
- ☐ Enteroviry
- ☐
- ☐

- ☐ Klíšťová encefalitis v. (TBE)
- ☐ Dengue v. (DEN)
- ☐ West Nile v. (WN)
- ☐ Žlutá zimnice v. (YF)
- ☐ Japonská B encefalitis v. (JBE)
- ☐ Chikungunya v. (CHIK)
- ☐ Lymfocytární choriomeningitis v. (LCM)
- ☐ Hantaviry
- ☐ HIV-1, HIV-2 (AIDS) (vyšetření i na antigen p24 HIV-1)
- ☐ Chlamydie - rod. specif. (bez diferenciace druhů)
- druh. specif. *(C. trachomatis, C. pneumoniae)*
- ☐ Chlamydie - druh. specif., vyš. Western Blot
- ☐ *Coxiella burneti* (Q-horečka)
- ☐
- ☐
- ☐

Vyšetření požaduje:
IČP: _ _ _ _ _ _ _
Odbornost: _ _ _
Telefon:

Razítko s adresou a podpis lékaře:

Pozn.: Zadatel souhlasí s tím, že vybrané metody molekulární mikrobiologie jsou prováděny na laboratořích Odboru imunologie a alergologie centra MPI. *24.10.2006*
Pozn.: markery virových hepatitid vyšetří na laboratořích Odboru imunologie a alergologie centra MPI

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^3	zkumavka nebo nádobka s těsným uzávěrem	2 - 8°C	2 - 8°C do 24hod.	izolační pokus,
			8 - 25°C do 12hod.	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: tamponek 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.	izolační pokus průkaz antigenů
			2 - 8°C do 48 hod. bez chlazení do 12 hod.	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

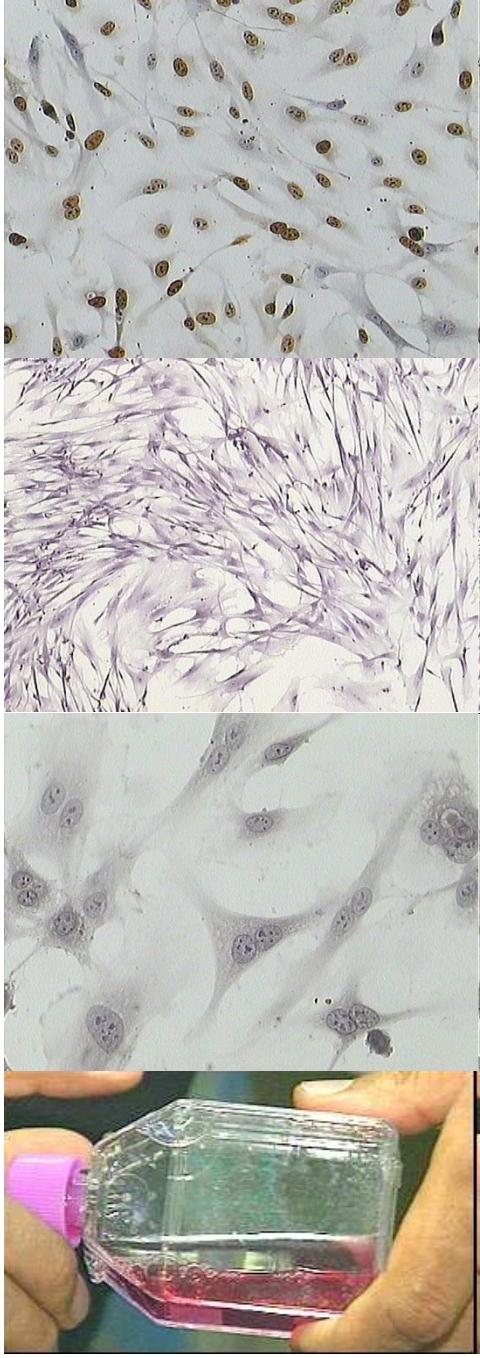
Buněčné kultury

-1949 – poprvé pozorováno, že poliovirus se množí v kultuře buněk za produkce charakteristických histologických změn

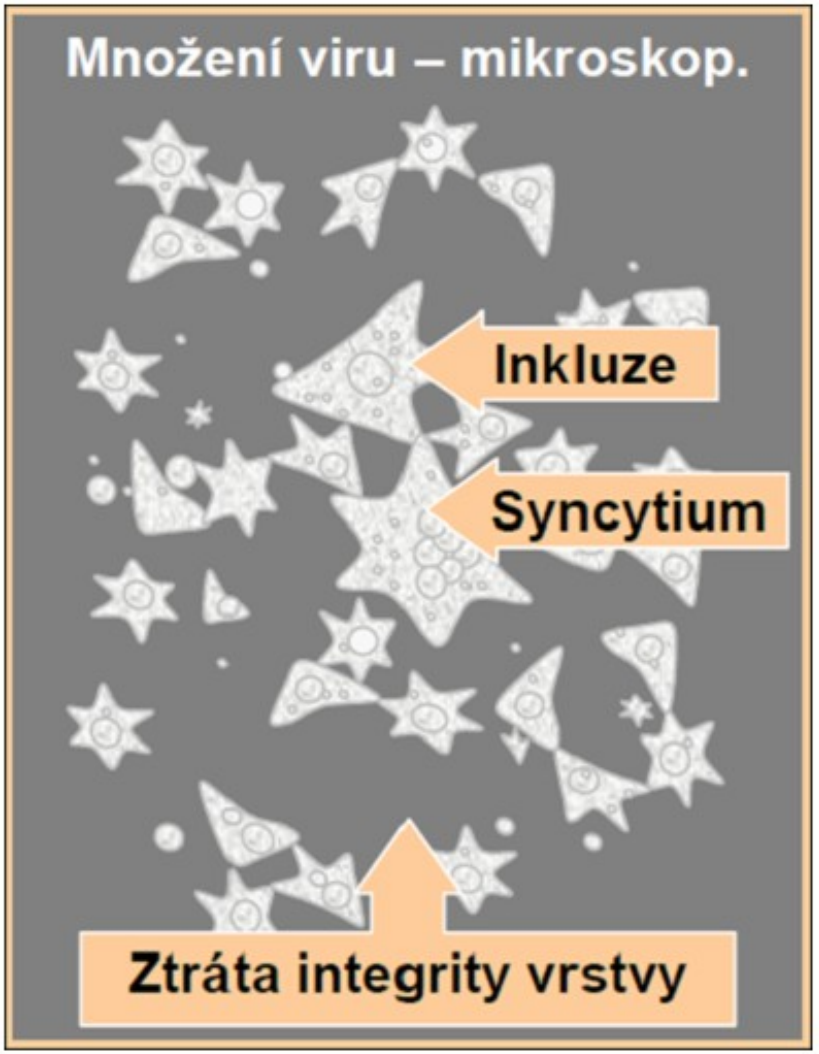
-Práce za aseptických podmínek (přesto časté problémy s kontaminacemi bakteriemi, mykoplasmaty, kvasinkami či houbami)

-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



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 časné virové antigeny CMV.

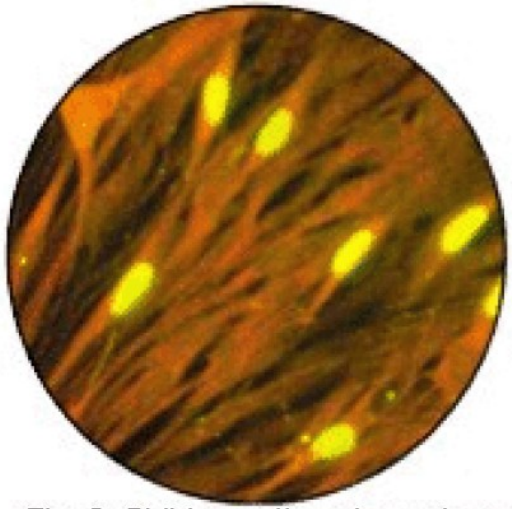


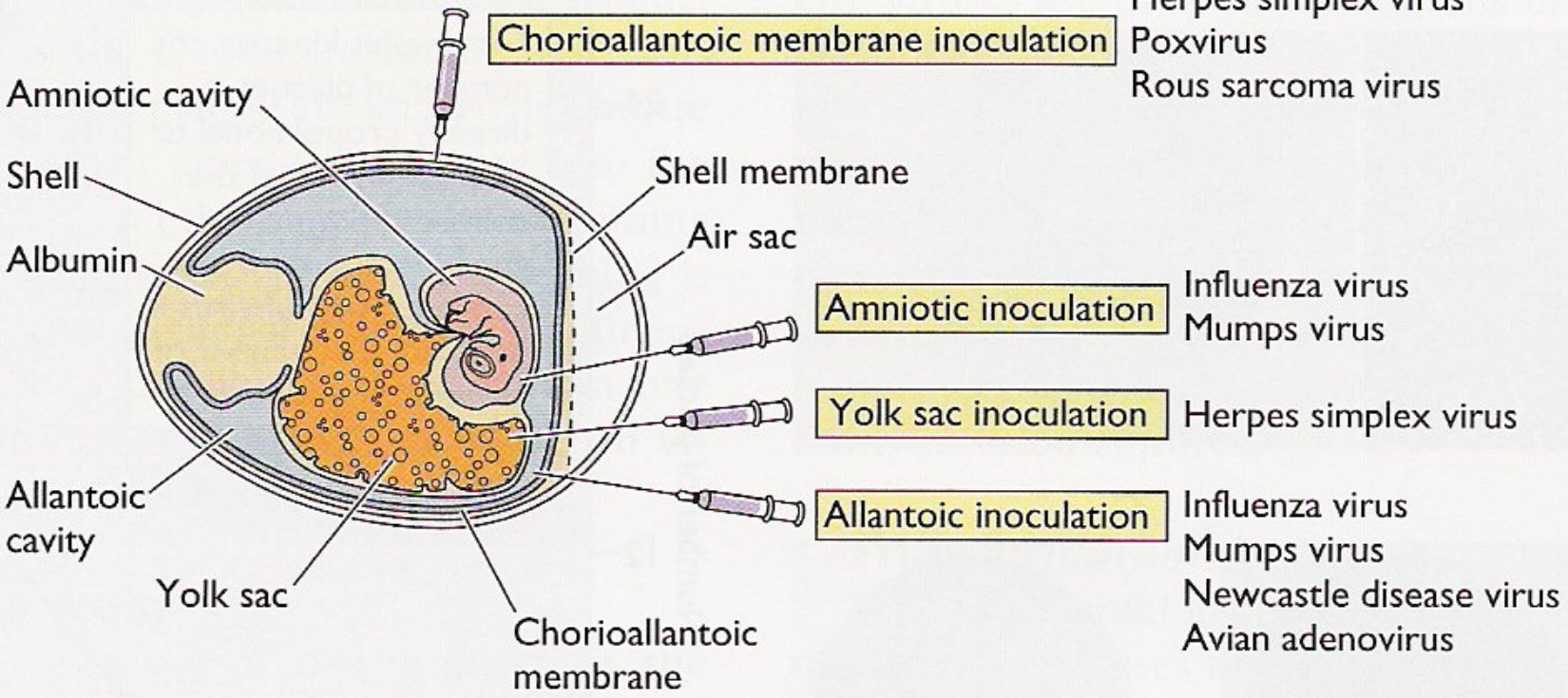
Fig. 2, CMV centrifugation culture fixed and stained 16 hrs after inoculation showing viral proteins in nuclei of infected human fibroblast cells

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


Chorioallantoic membrane inoculation
Herpes simplex virus
Poxvirus
Rous sarcoma virus
Amniotic cavity
Shell
Albumin
Shell membrane
Air sac
Amniotic inoculation
Influenza virus
Mumps virus
Yolk sac inoculation
Herpes simplex virus
Allantoic cavity
Allantoic inoculation
Influenza virus
Mumps virus
Newcastle disease virus
Avian adenovirus
Yolk sac
Chorioallantoic membrane

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:

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

Elektronová mikroskopie

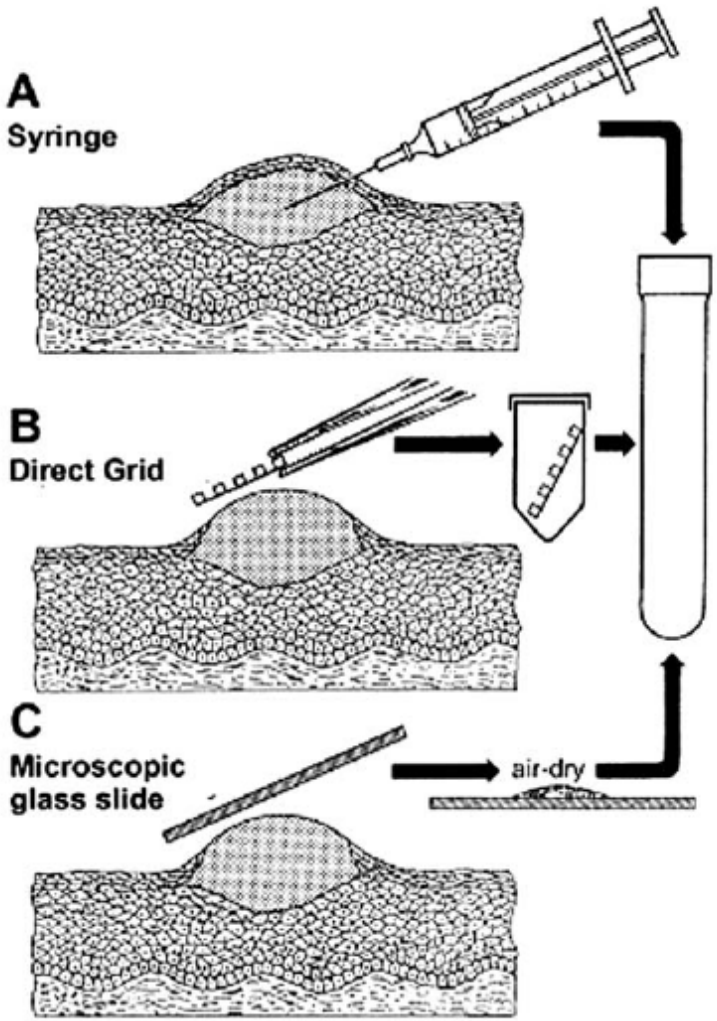
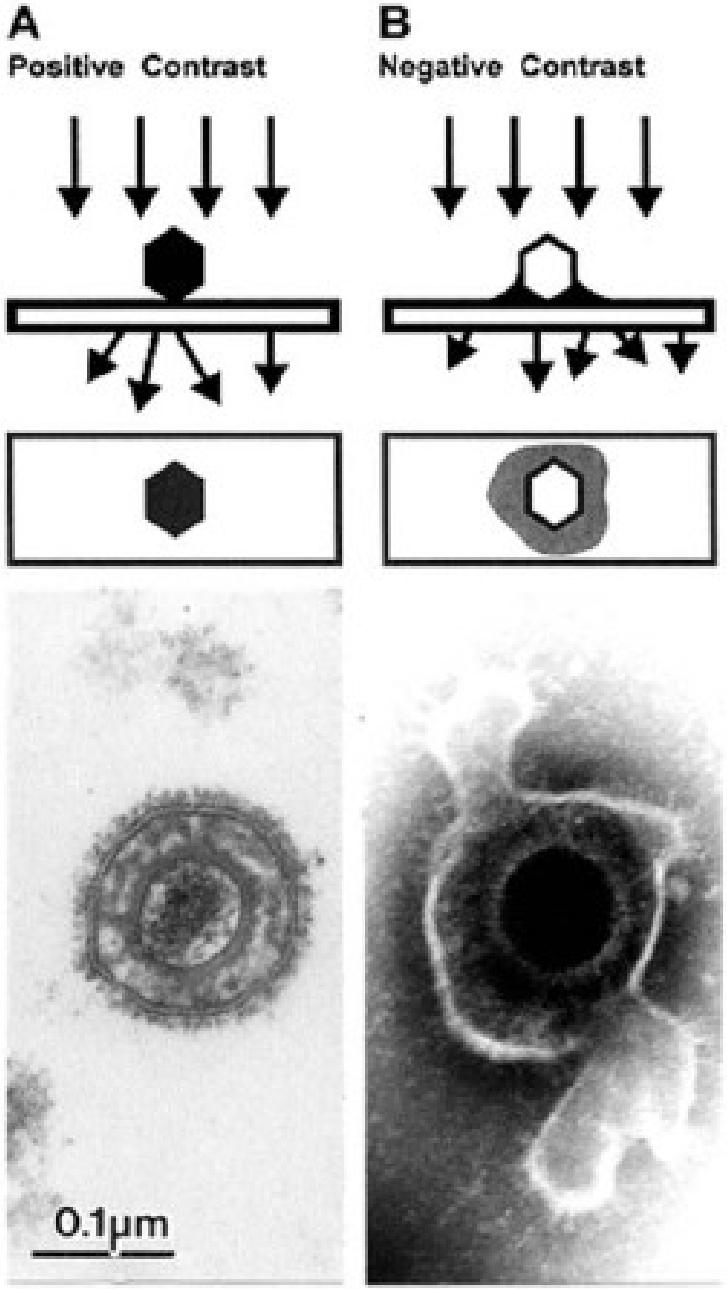


Figure 3. Three methods for efficient collection of vesicular and blister fluids for diagnostic electron microscopy. A. The contents of a vesicle are collected into the barrel of a needle. B. After the blister is opened, a coated electron microscope grid is touched to the fluid and air-dried (direct 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.

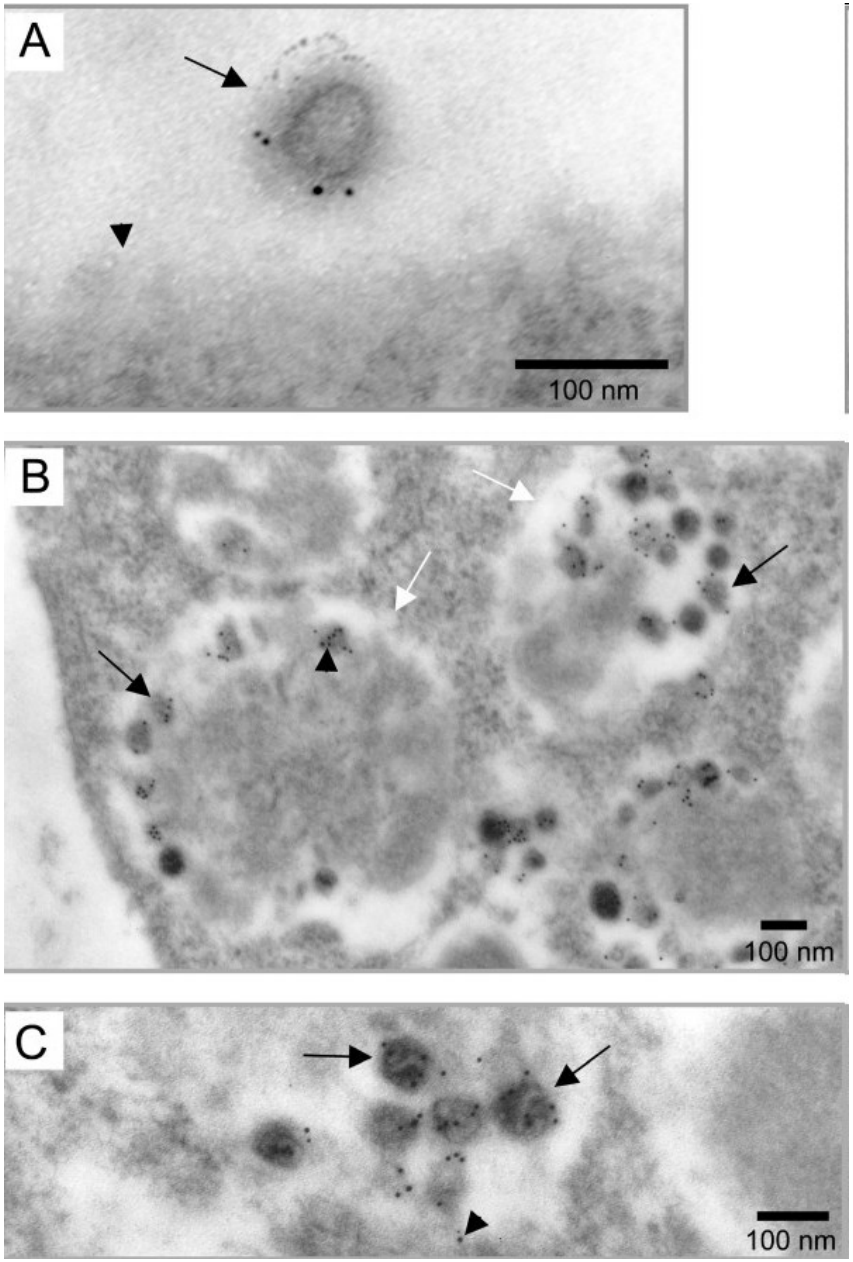
Elektronová mikroskopie



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^3

Imunoelektronová mikroskopie



Na protilátky navázány částečky 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.

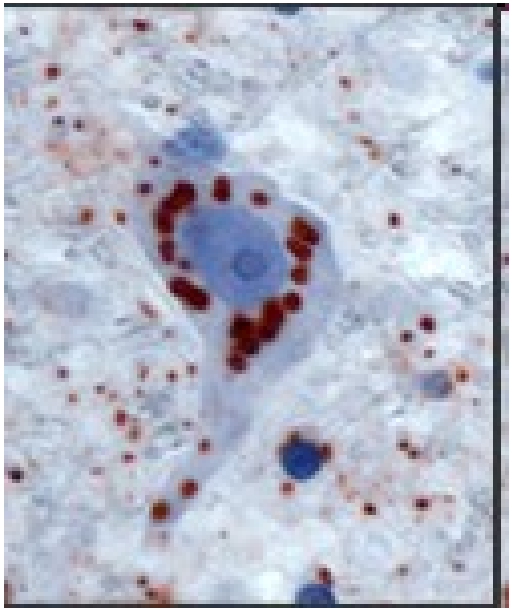
Přímý

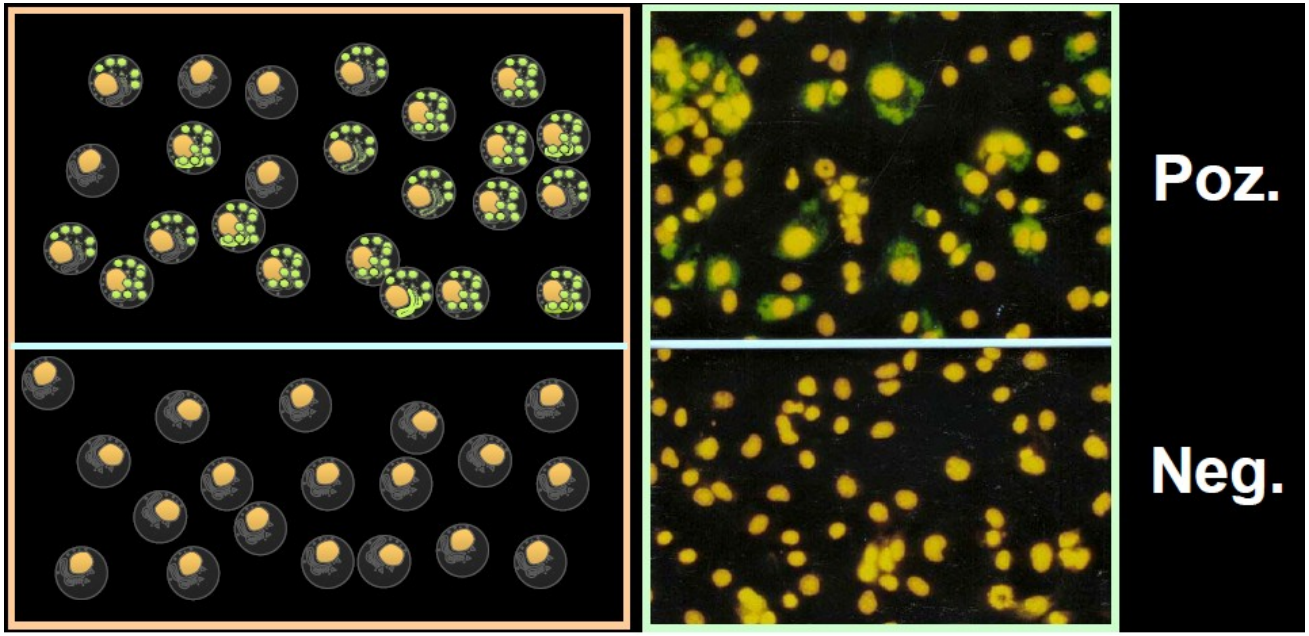
- kultivace na TK
- kuřecí embrya
- pokus na zvířeti
- elektronová mikroskopie
- **světelná mikroskopie, imunofluorescence**
- hemaglutinace
- hemadsorpce
- ELISA
- latexová aglutinace
- průkaz virové NK

Nepřímý

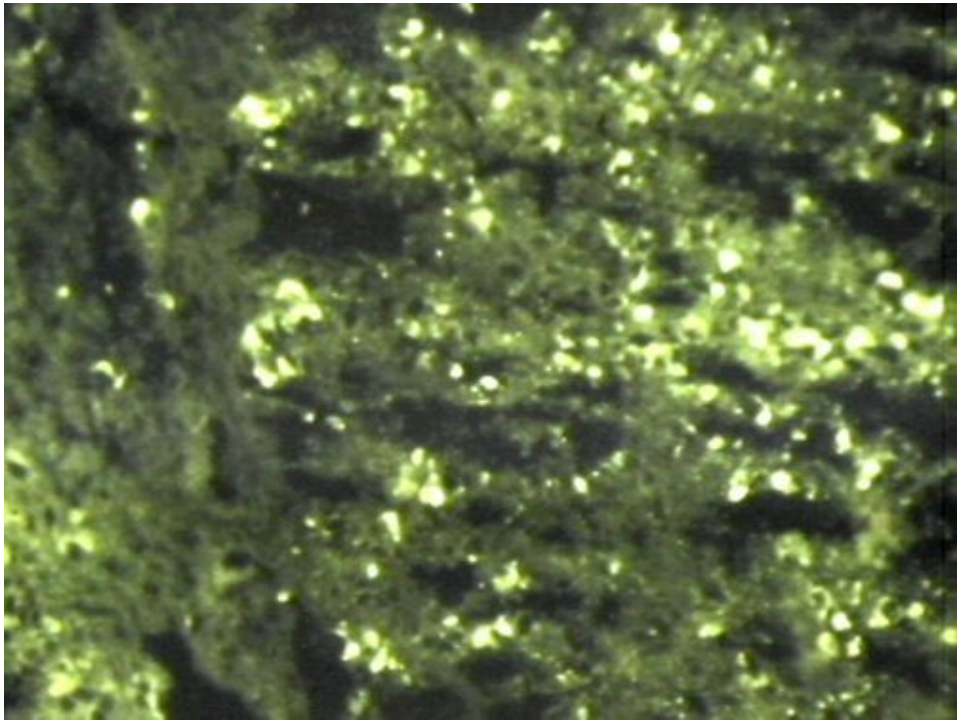
- ELISA
- komplement-fixační test
- virus-neutralizační test
- inhibice hemaglutinace
- imunoblotting

- Světelná mikroskopie
  - Normální histopatologie
    - Průkaz intracytoplazmatických inkluzí v běžně barveném preparátu
  - Průkaz viru imunohistochemicky
    - Je potřeba specifická značená protilátka

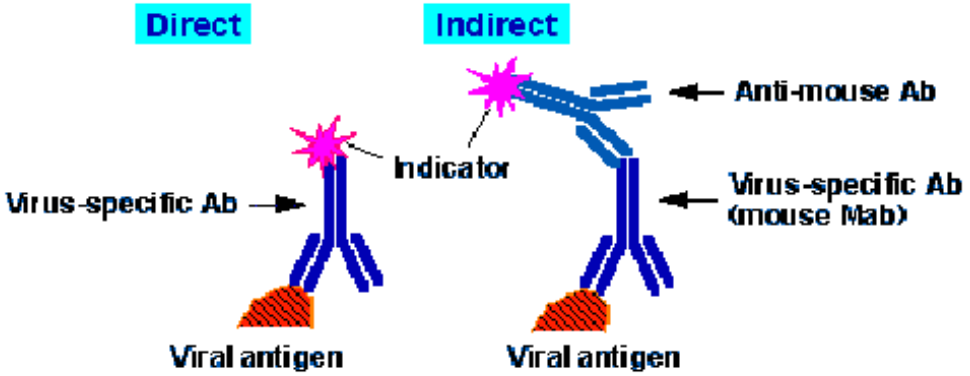




Imunofluorescence



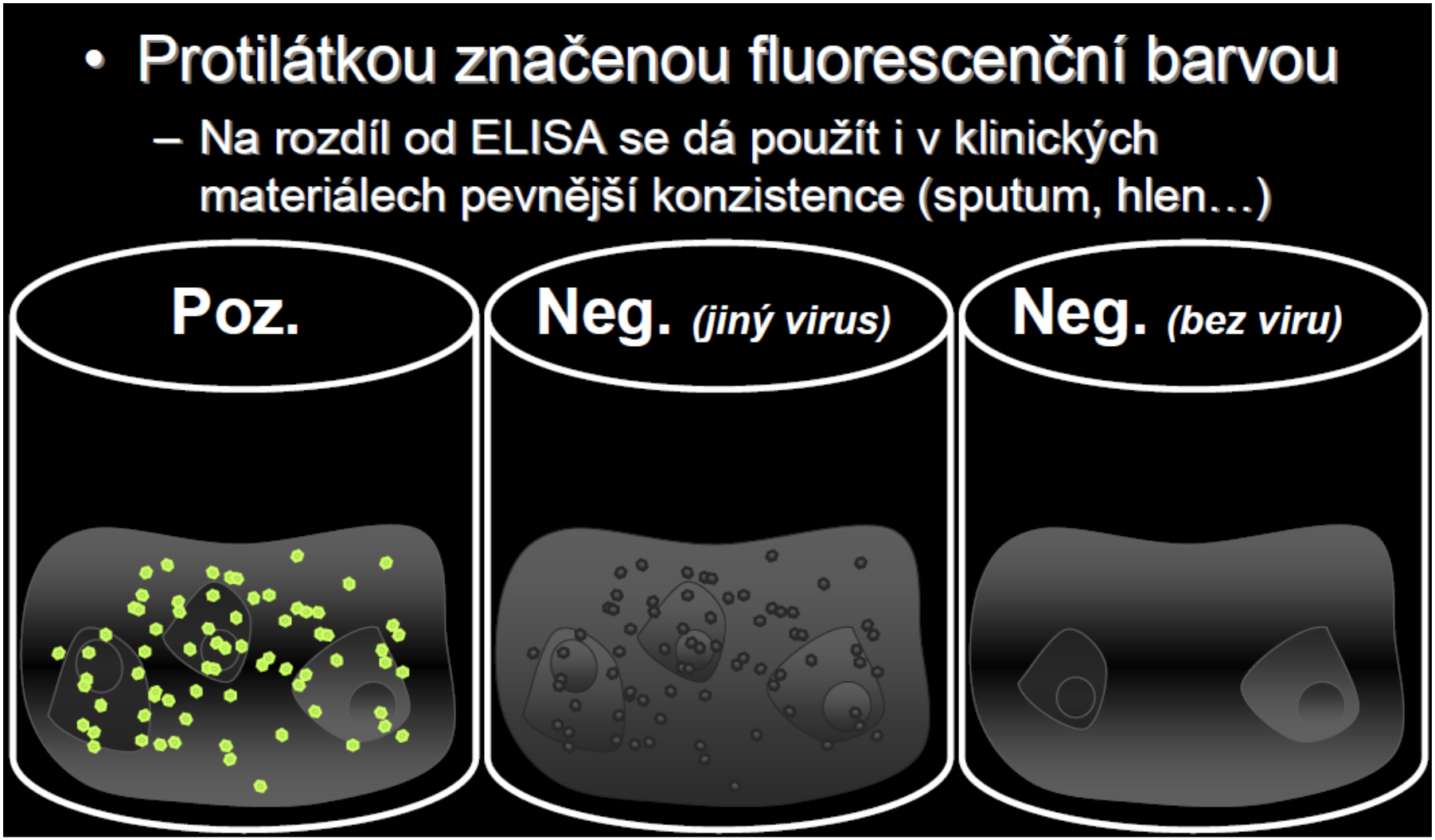
Průkaz přítomnosti viru v klinickém materiálu nebo v buněčné kultuře inokulované pacientským vzorkem.



- 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…)



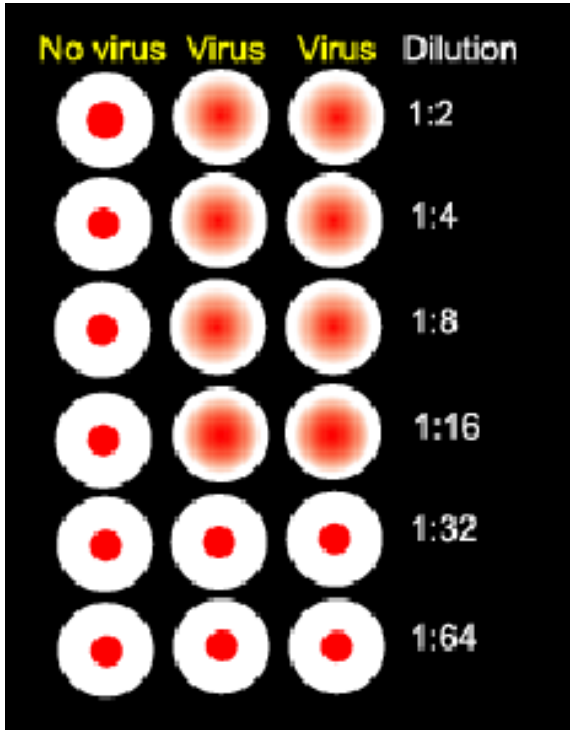
Přímý

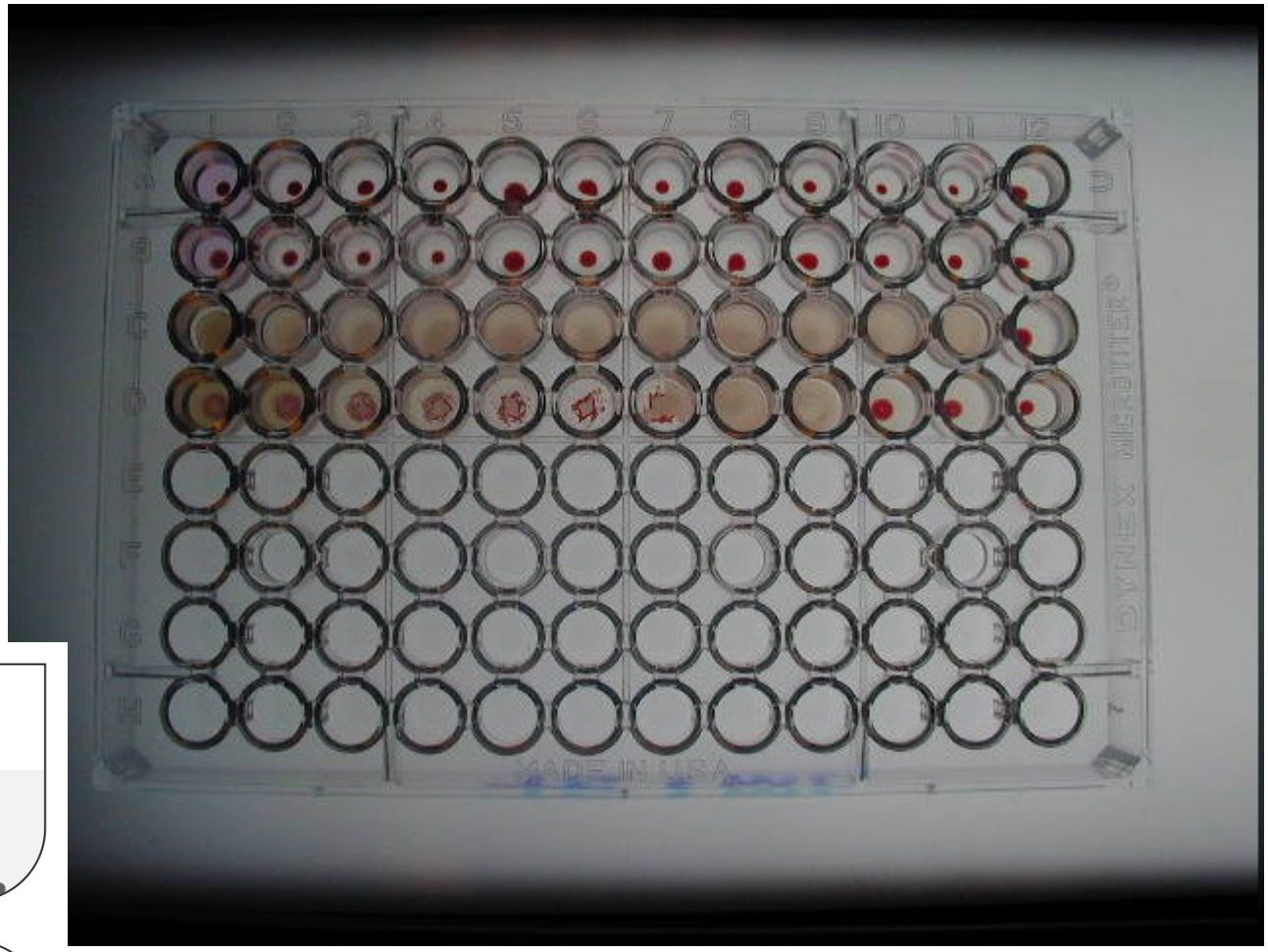
- kultivace na TK
- kuřecí embrya
- pokus na zvířeti
- elektronová mikroskopie
- světelná mikroskopie, imunofluorescence
- **hemaglutinace**
- hemadsorpce
- ELISA
- latexová aglutinace
- průkaz virové NK

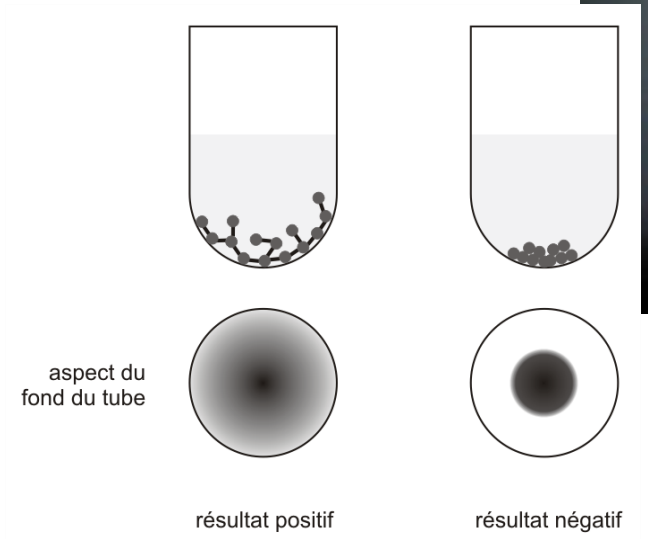
Nepřímý

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

Hemaglutinační testy







- 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)

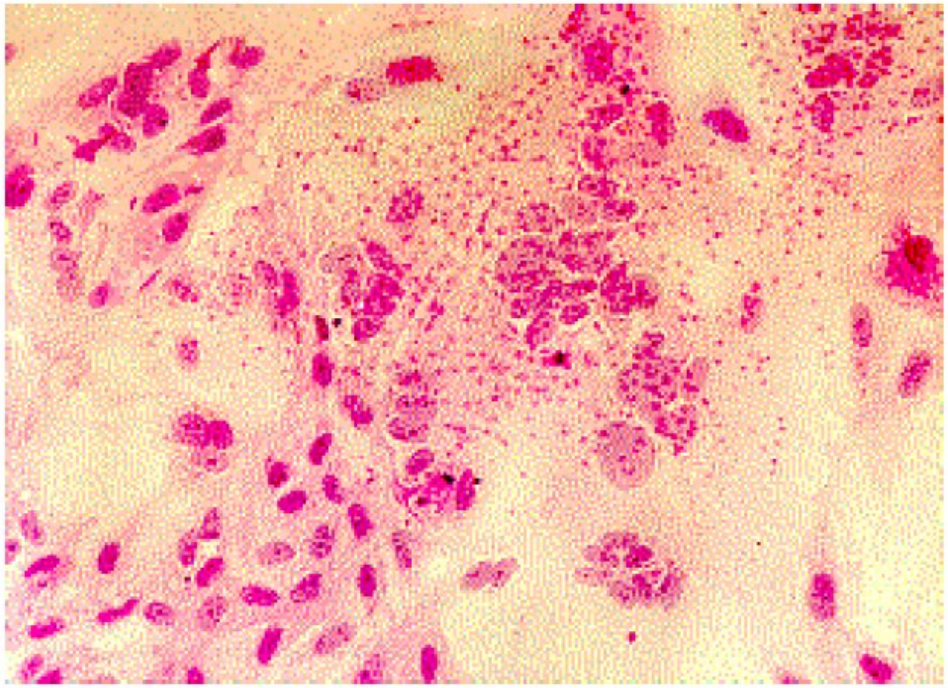
Přímý

- 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 syncycií 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

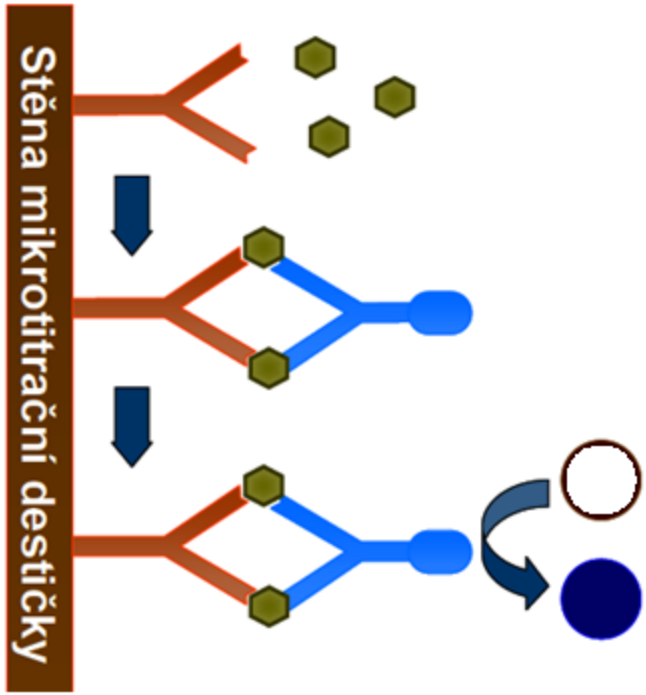
- kultivace na TK
- kuřecí embrya
- pokus na zvířeti
- elektronová mikroskopie
- světelná mikroskopie, imunofluorescence
- hemaglutinace
- hemadsorpce
- **ELISA**
- latexová aglutinace
- průkaz virové NK

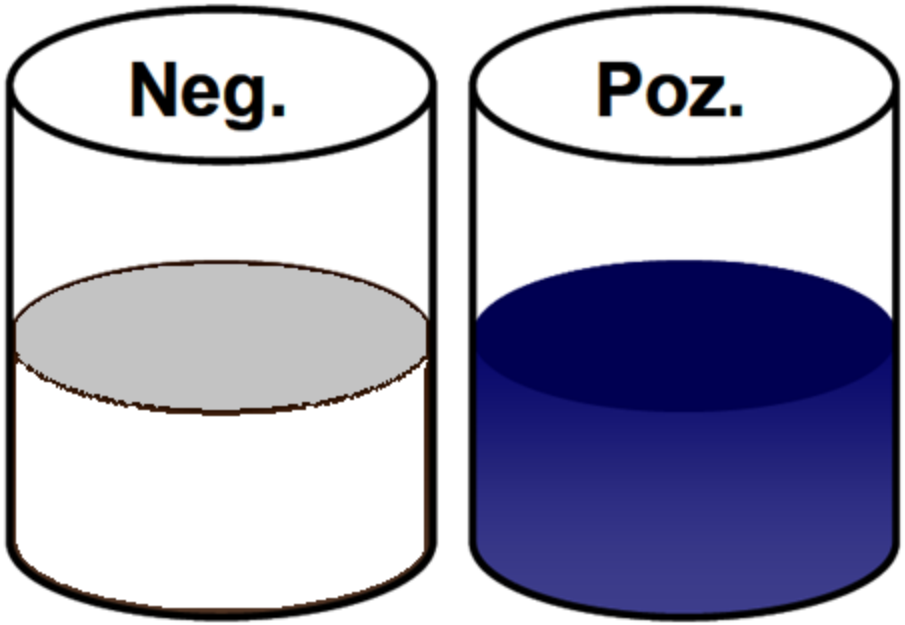
Nepřímý

- 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

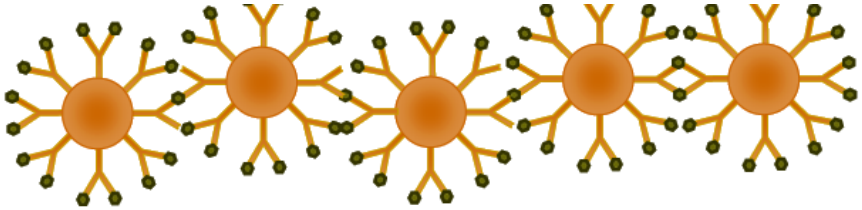
Nepřímý

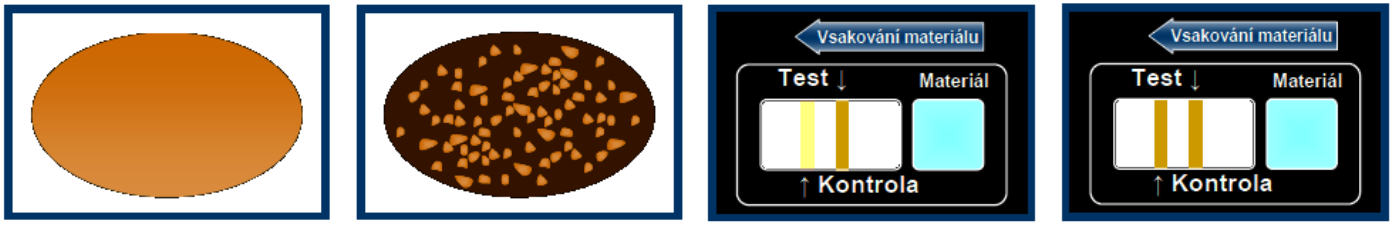
- ELISA
- komplement-fixační test
- virus-neutralizační test
- inhibice hemaglutinace
- imunoblotting

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	V tekutině	V setu	V setu
Neg.	**Poz.**	**Neg.**	**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

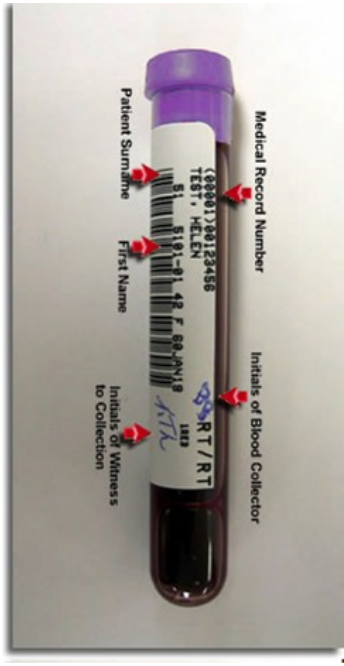
Průkaz virové nukleové kyseliny

- 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 Epsteina 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 příušnic, 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

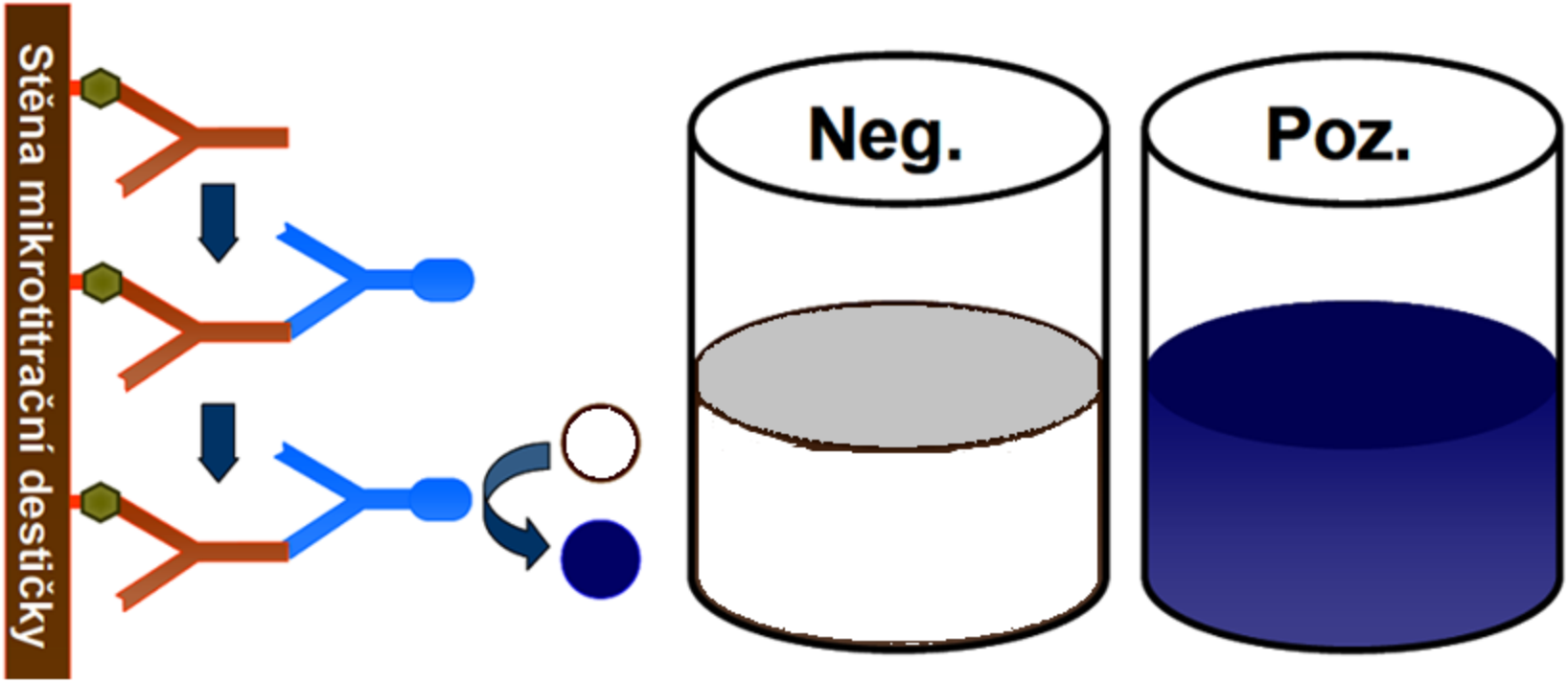
- kultivace na TK
- kuřecí embrya
- pokus na zvířeti
- elektronová mikroskopie
- světelná mikroskopie, imunofluorescence
- hemaglutinace
- hemadsorpce
- ELISA
- latexová aglutinace
- průkaz virové NK

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



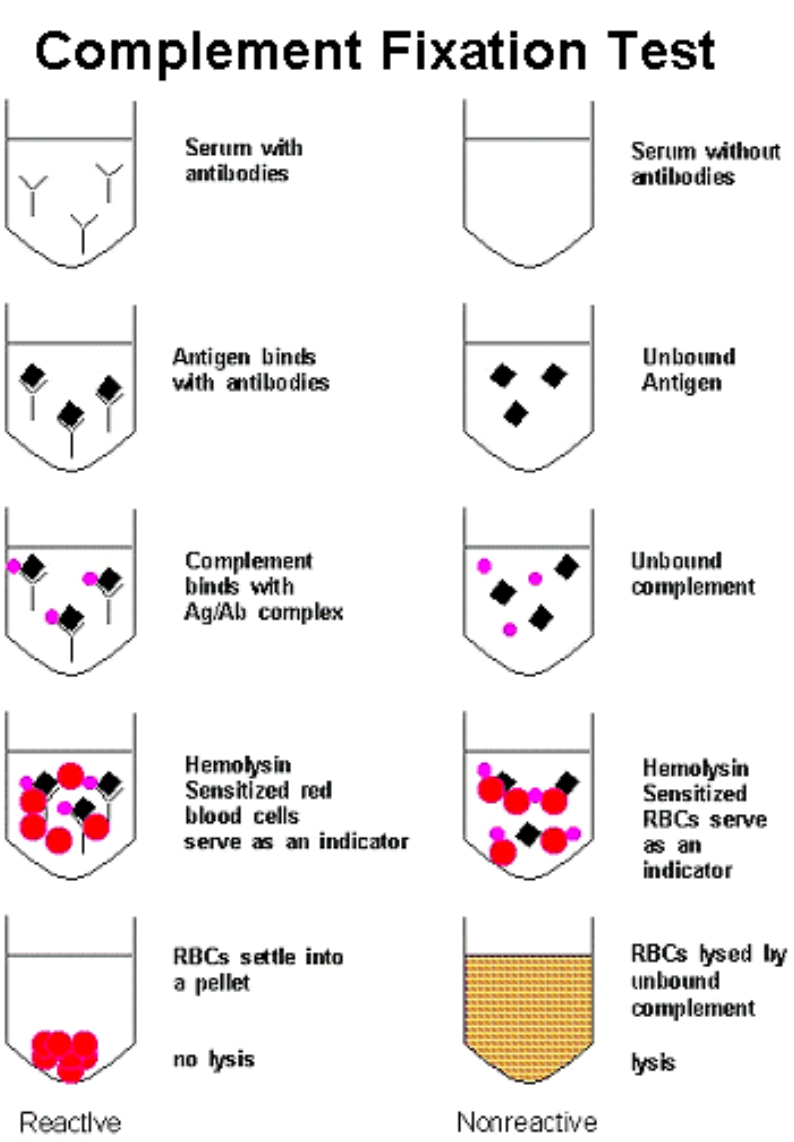
Přímý

- 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

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)

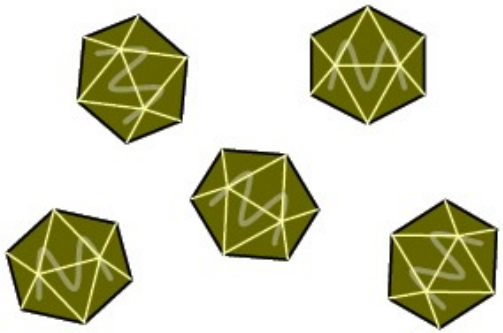
Přímý

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

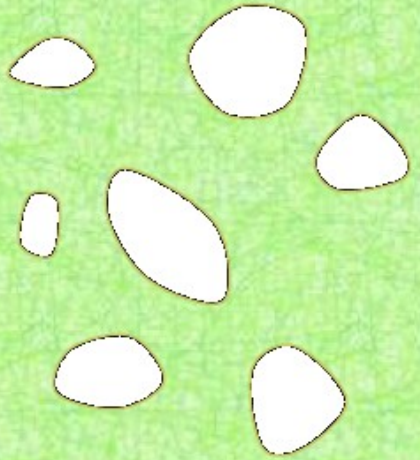
Nepřímý

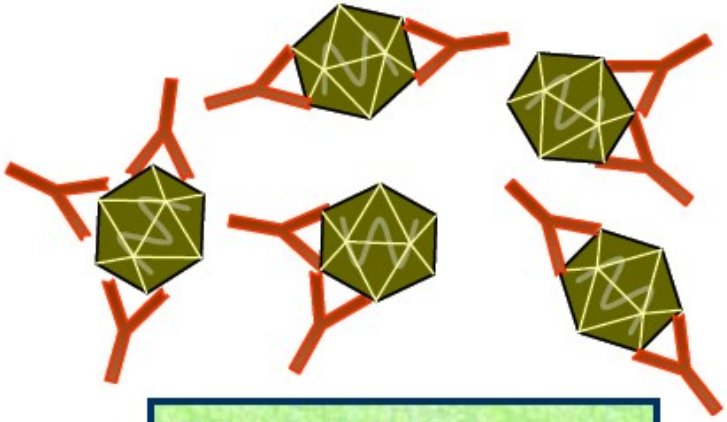
- ELISA
- komplement-fixační test
- **virus-neutralizační test**
- inhibice hemaglutinace
- imunoblotting

Neutralizační test



Tkáňová kultura
Množení viru –
makroskopicky po obarvení





Tkáňová kultura
Virus neutralizován –
makroskopicky po obarvení

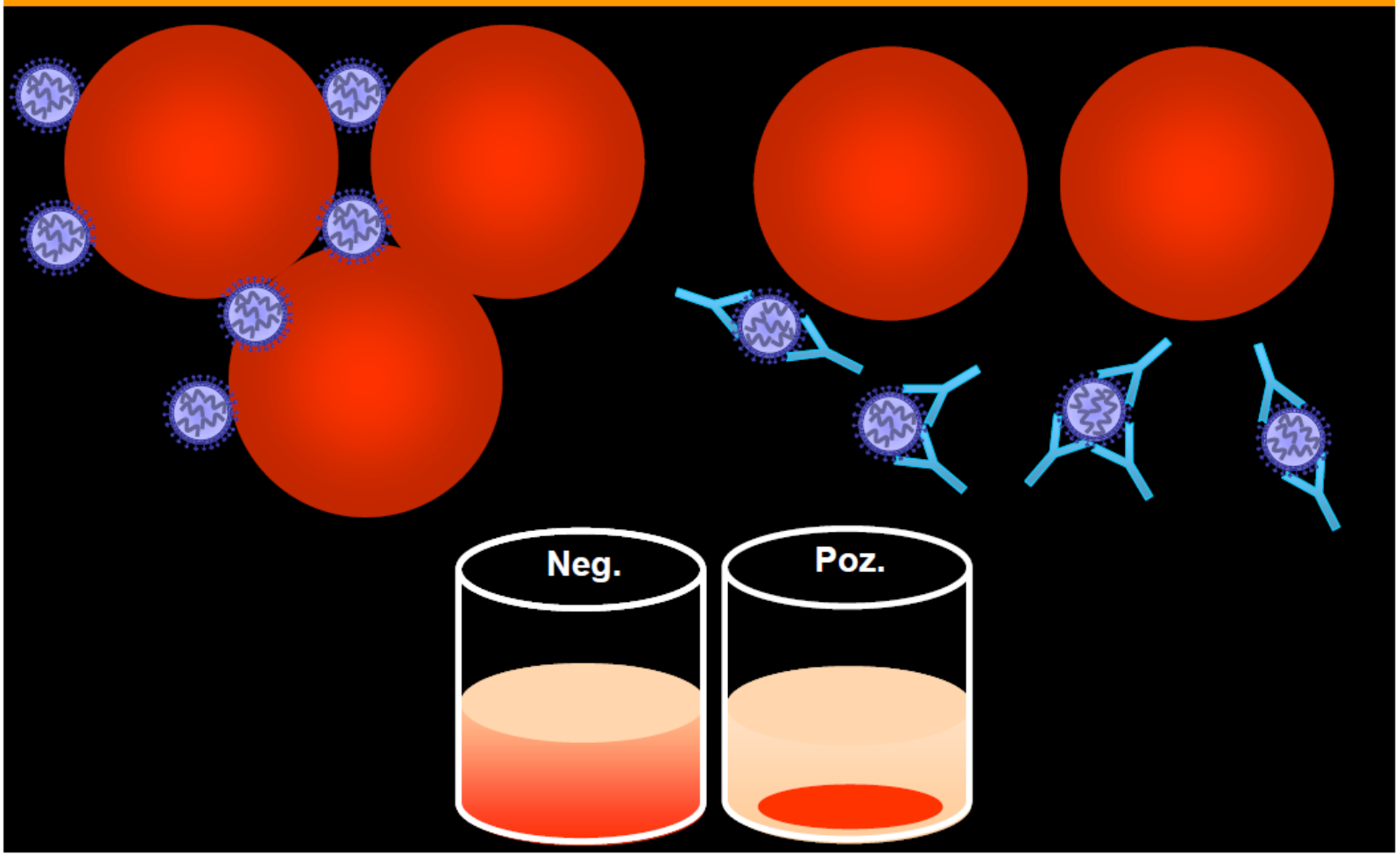
Přímý

- 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**

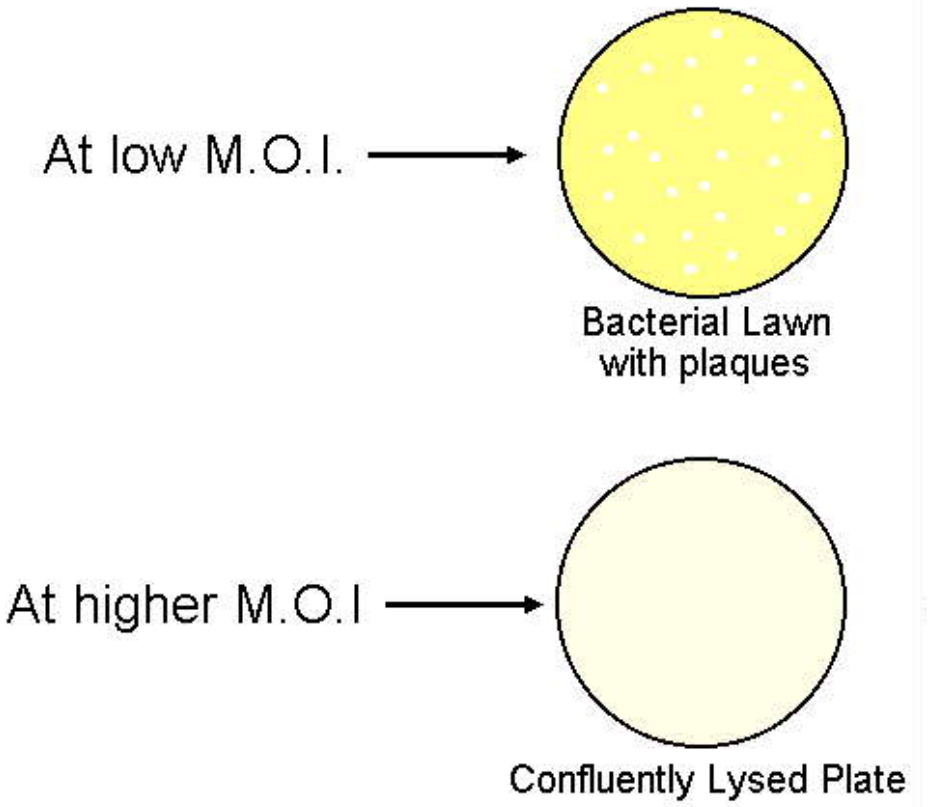
Nepřímý

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

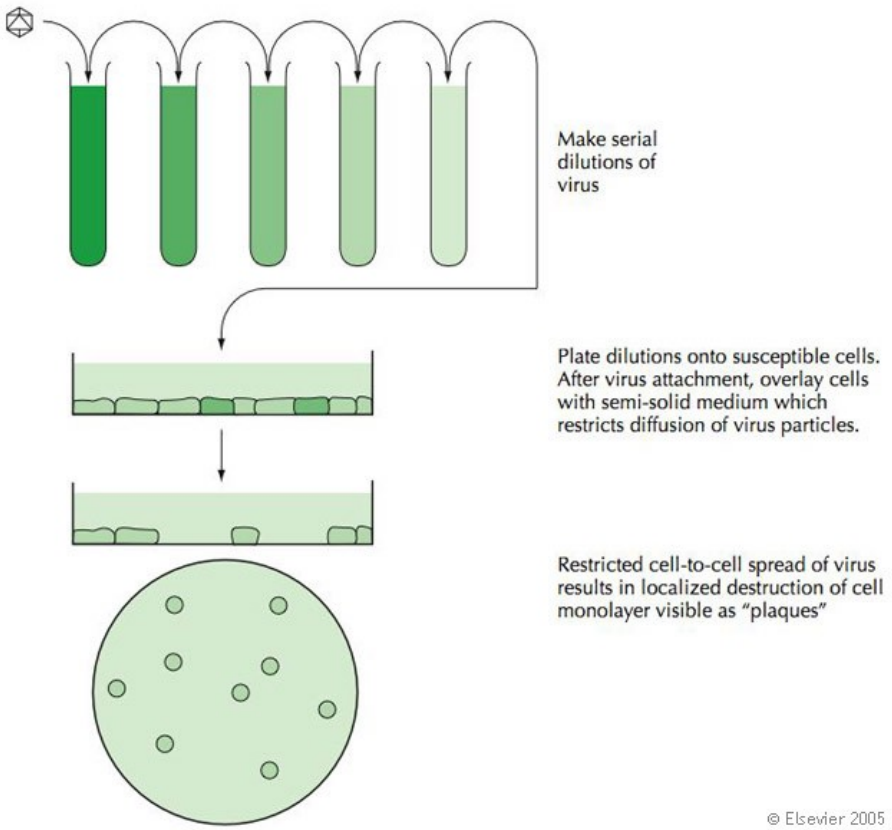
Multiplicita infekce – multiplicity of infection (MOI)

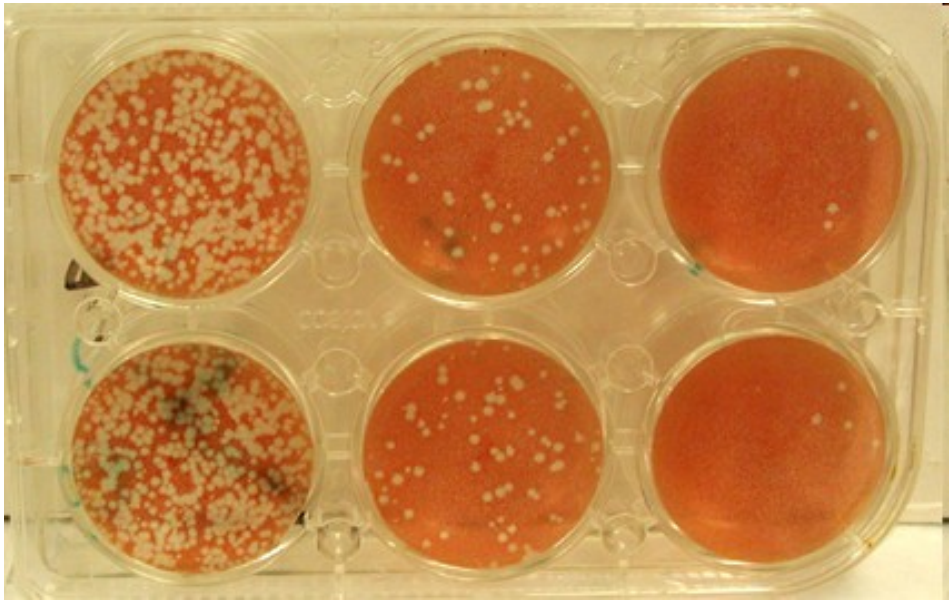
$$P(n) = \frac{m^n \cdot e^{-m}}{n!}$$

kde:
m = multiplicita infekce (MOI)
n = počet virů infikujících buňku
P(n) = pravděpodobnost, že buňka bude infikována počtem n virionů



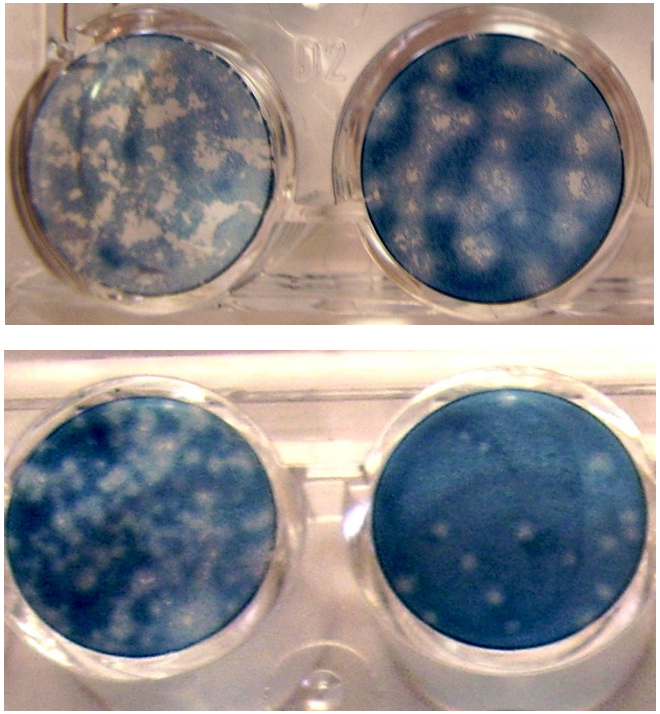
Plaková titrace – plaque assay

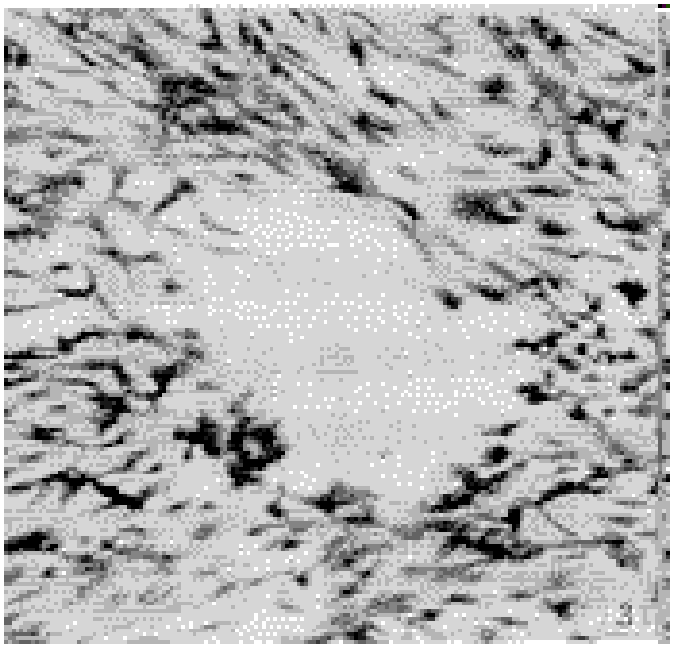




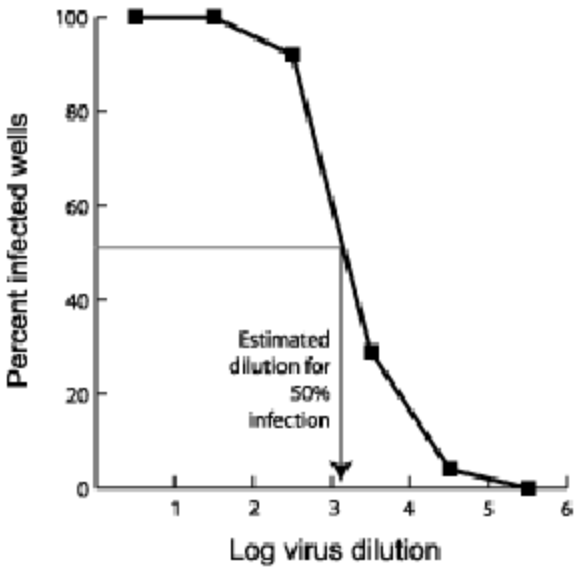
Plaková titrace. Virová suspenze ředěná určitým faktorem se přidá k jednovrstvě buněk. Buňky se barví v okamžiku, kdy virus infikuje jednu buňku, tu zlyzuje a nakazí okolní buňky za vzniku plaku. Každý plak je tedy výsledkem původně infekce jedné buňky jedním virem.

Velikost a morfologie plaků

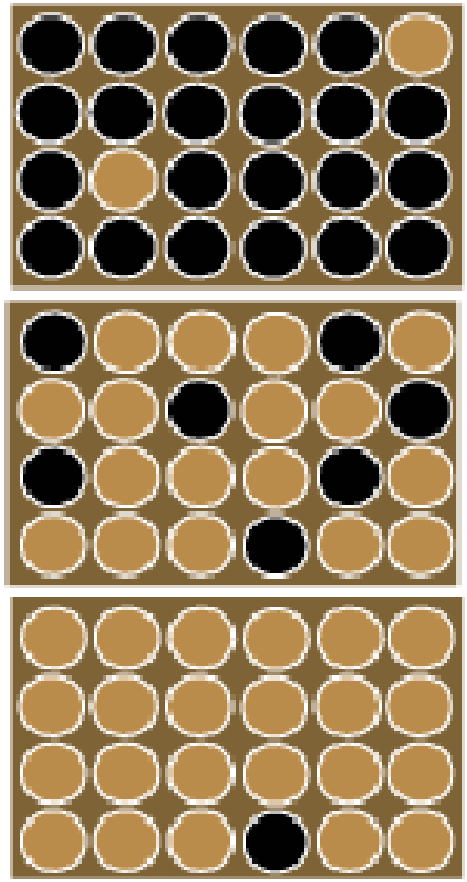




Reed & Münch endpoint calculation method



Add serial dilutions of virus to cells in a multiwell plate



10^{-3} Dilution

22/24 wells infected (92%)

10^{-4} Dilution

7/24 wells infected (29%)

10^{-5} Dilution

1/24 wells infected (4%)

Formulae

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

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

Definitions

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