

Laboratorní diagnostika

Infekční onemocnění

Infekce

průnik mikroorganismu do organismu zvířete, jeho množení a působení v něm – vyvolání chorobných příznaků

Kolonizace

proniknutí mikroorganismu do organismu zvířete, jeho množení a působení v něm - nevyvolání chorobných příznaků

Vstupní brány infekce

- **TRÁVICÍ TRAKT:** alimentární infekce: Salmonelózy, koliinfekce, kolienteritidy, virové gastroenteritidy)
- **RESPIRAČNÍ TRAKT:** IBR, laryngeotracheitida, pasterelóza, mykoplasma
- **KŮŽE:** tetanus, klostridie, vzteklina, dermatomykózy, bodnutí členovci: piroplasmóza, Q- horečka
- **UGT:** chlamydia, brucelóza
- **MLÉČNÁ ŽLÁZA:** galaktogenní infekce: mastitidy
- **SPOJIVKA:** pastevní nákaza- IKS
- **PUPEK:** umbilikální infekce: pyogenní mikroby- sepse
- **UMĚLÉ INFEKCE:** iatrogenní

Přenos infekce

Přímý přenos

X prenatální: transplacentární
 transovariální

X postnatální:

- výhradně: vzteklina, hřebčí nákaza

Nepřímý přenos:

X nepřímý kontakt, aerogenně, krmivo, voda, vektory

- výhradně: antrax, snět šelestivá, piroplazmózy

Horizontální x vertikální

Původci onemocnění:

- 1) priony
- 2) viry
- 3) bakterie
- 4) plísně
- 5) parazité

Skutečnost, jestli vůbec onemocnění vznikne a jak závažný bude jeho průběh, je ovlivněna řadou faktorů.

Ze strany mikroorganismu:

- patogenita
- virulence
- infekční dávka

Ze strany hostitele:

- nespecifická imunita
- specifická imunita
- výživa, věk

Vlivy prostředí

Patogenita - schopnost vyvolat onemocnění

- **obligátně patogenní** - vyvolávají onemocnění
(*Yersinia pestis* - mor člověka)
- **fakultativně patogenní** - vyvolávají onemocnění
jen v určitých podmínkách (*Escherichia coli*)
- **nepatogenní** - nevyvolávají onemocnění
(laktobacily - potravinářské bakterie)

Virulence - stupeň patogenity, individuální
ovlivňuje: kontagiozita, agresivita, toxigenita

- vysoce virulentní
- středně virulentní
- málo virulentní
- avirulentní

oslabení virulence (atenuace)

pasážováním na méně vnímavých hostitelích

- využití pro vývoj vakcín

zesílení virulence

pasážováním na více vnímavých hostitelích

- nebezpečí při šíření nemoci (aviární influenza)

Infekční dávka - množství mikroba (počet), které vyvolá onemocnění

ID₅₀ - padesátiprocentní infekční dávka
= množství mikroba, které vyvolá onemocnění u 50% infikovaných zvířat

LD₅₀ - padesátiprocentní letální dávka
= množství mikroba, které usmrtí 50% infikovaných zvířat

Imunita

Schopnost organismu rozpoznat cizorodé látky, bránit jejich vniknutí do organismu a v případě jejich průniku zajišťovat jejich likvidaci

antigeny - cizorodé látky - bílkoviny, nukleové kyseliny,..

protilátky - specifické látky bílkovinné povahy proti antigenům

specifická imunita x nespecifická imunita

buněčná x humorální

vrozená x získaná

- aktivní - po prodělané nemoci, očkování
- pasivní - dodání již hotových protilátek

Nespecifická imunita

vrozená a její mechanismy mohou být v případě infekce použity okamžitě, chybí imuno.paměť,
opakovaně stejná reakce

Hlavní nástroje: BARIÉRY, FAGOCYTY, KOMPLEMENT

- **mechanické zábrany** (pokožka, řasinky v nose)
- **imunitu sliznic** (hlen, přítomnost symbiotických bakterií)
- **zvyšování tělesné teploty** (pyrogeny)
- **přítomnost baktericidních látek** v některých tělních tekutinách (slzy, sliny, žaludeční šťávy - HCl)
- **aktivace komplementu** (skupina proteinů z krevního séra)
- **schopnost fagocytózy** některých bílých krvinek

Specifická imunita

nastupuje později než imunita nespecifická,
individuální, + imuno.paměť

specificky rozeznávají antigeny, které nejsou tělu
vlastní,

rychlost a efektivnost je závislá na tom, po kolikáté se
imunitní systém s konkrétním antigenem setkává

Hlavní nástroje:

B-lymfocyty

zajišťují humorální odpověď - Ab

plazmatické buňky, paměťové buňky

T-lymfocyty

buněčná odpověď

cytotoxické, pomocné

Průběh infekce

inkubační doba - doba od proniknutí původce nemoci do organismu do prvních příznaků onemocnění - je to doba bez příznaků

- krátké: antrax, mory; střední; dlouhé: vzteklina, TBC

prodromální stadium - doba od prvních příznaků do objevení se typických příznaků pro danou nemoc
- je to doba nespecifických symptomů (zvýšená teplota, apatie aj.)

- EA v krvi: bakteriémie, virémie, parazitémie, toxémie

manifestní stadium - doba průběhu typických KP příznaků pro danou nemoc

- je to doba specifických symptomů

- Vylučování EA sekrety + extrety, ↓ v krvi

konečné - rekonvalescence, nosičství nebo smrt

Infekce přenosné na člověka

antroponózy - infekce přenosné z člověka na člověka
(břišní tyfus)

zoonózy - infekce přenosné ze zvířat na člověka
(salmonelóza, tularemie aj.)

-
sapronóza - infekce přenosné z prostředí (v němž
se původce množí) na člověka (anthrax)

1) Prionová onemocnění

Prion - je tvořen malou proteinovou částicí (**bez nukleových kyselin**) (tj. bílkovina podobná normální bílkovině ale v jiném prostorovém uspořádání)

není schopen vlastní reprodukce (k vytvoření vyžaduje hostitelskou buňku)

v hostitelské buňce dojde k vytvoření bílkoviny prionu, hromadí se v nervových buňkách, dochází k vakuolové degeneraci

nevytváří imunitní odpověď - jedná se o bílkovinu obvyklou v organismu jen s jiným prostorovým uspořádáním

Přehled prionových onemocnění

- Chronické neurodegenerativní onemocnění

X vakcína, terapie

- **Scrapie u ovcí**

- 1732, ve všech tkáních, i ve fétech a pl. vodách

- **Bovinní spongiformní encefalopatie (BSE) skotu**

- do roku 2009 třicet případů v ČR,
- Status zanedbatelného výskytu BSE
- mozek, mícha, prodloužená mícha, výjimečně: mandle, slezina, střevo
- Ne maso ani mléko

- **Transmisivní encefalopatie norků (TME)**

- **Chronické chřadnutí jelenovitých (CWD)**

- **Felinní spongiformní encefalopatie (FSE)**

- **Creutzfeldtova – Jakobova choroba (CJD) lidí**

Materiál k prionovému vyšetření

ODBĚR VZORKU: na jatkách prodloužená mícha poraženého nebo z uhynulého zvířete (přes týlní otvor), zmrazení VZ

Vyšetření: SVU Praha, Jihlava, Olomouc



RYCHLÉ TESTY:

- **imunotest** využívající chemický polymer k selektivnímu záchytu PrP^{Sc} a monoklonální detekční protilátku
- **imunochromatografický test** využívající 2 různé monoklonální protilátky k detekci frakcí PrP odolných proteináze K

+ VÝSLEDKY

- **metoda Western-blot** - bílkovina infekčního prionu je rezistentní k proteinázám, proto se biologický materiál (mozek) štěpí proteinázami a bílkovina prionu zůstane a prokáže se monoklonálními protilátkami

konfirmační (potvrzující) test

patohistologie - vakuolární degenerace neuronů
(způsobuje spongiformní - houbovitý vzhled mozku)

ELISA - průkaz markerových proteinů
v cerebrospinálním moku (metoda se vyvíjí)

PCR - determinaci polymorfismu kodonů 136, 141,
154 a 171 PrP genu u ovcí (PRNP genotypizaci)
metodami real-time PCR, a případně PCR-SSCP.

- Posouzení geneticky podmíněné vnímavosti

2) Virová onemocnění

Virus - mikroorganismus, který je tvořen jednou nebo několika molekulami **DNA nebo RNA**, obalené obvykle bílkovinnou složkou

není schopen vlastní reprodukce

- k množení vyžaduje
hostitelskou buňku

vytváří imunitní odpověď

velikost viru : 20 - 300 nm

nukleotid - DNA nebo RNA

kapsida - schránka z proteinů - zpravidla kubická (dvacetistěn) nebo helikoidální (spirálovitá)

membrána - složená z fosfolipidů, proteinů, glykopeptidů, polysacharidů
(jen u některých virů - obalené viry, vyšší odolnost k dezinfekčním prostředkům)

Množení viru

fáze adsorpce - vazba viru na povrch vnímavé buňky
(receptory)

fáze penetrace - proniknutí viru do buňky
(nejčastěji pinocytózou)

fáze dekapsidace - rozrušení povrchu viru a průnik
virové nukleové kyseliny do buňky

fáze eklipsy - vlastní reprodukce viru
předání genetické informace viru genomu buňky
a reprodukce virové DNA nebo RNA

fáze maturace - dovytvoření DNA nebo RNA viru a
také obalu viru

uvolnění viru z buňky - virus opouští buňku pučením
nebo po rozpadu buňky

Viry obsahující DNA - jednovláknitá

Parvoviridae (parvoviróza psů, prasat, skotu)

Circoviridae (cirkovirové onemocnění prasat)

Viry obsahující DNA - dvojitá vláknitá

Poxviridae (neštovice kravské)

Herpesviridae (Aujezského choroba, IBR skotu)

Viry obsahující RNA - jednovláknitá

Orthomyxoviridae (chřipka ptáků, prasat, koní)

Rhabdoviridae (vzteklina)

Viry obsahující RNA - dvojitá vláknitá

Reoviridae (mor koní, katarální horečka ovcí)

Materiál k virologickému vyšetření:

výtěry

stěry z postižených tkání

sekrety

sekční materiál

krev

mozkomíšní mok

moč

výkaly

Virologické vyšetření

Přímý průkaz viru

- 1) mikroskopie (obtížná pro malou velikost virů)
- 2) izolace viru (kultivace viru)
 - buněčné kultury
 - kuřecí embrya
 - pokusná zvířata
- 3) konečná identifikace viru (na základě analýzy DNA nebo RNA, určení dalších potřebných vlastností viru)
- 4) PCR

METODY

MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE

PCR– Polymerase Chain Reaction

Vyvinutá v roce 1983- Kary Mullis

- objasnil exponenciální průběh amplifikace DNA

Princip metody:

Amplifikace (zmnožení) DNA je zajištěno použitím 2 primerů, které nasedají na komplementární sekvence ve 2 templátových vláknech. **Primery** na tato vlákna nasedají v protisměrné orientaci, tímto vznikne ohraničení žádaného amplikonu o určité délce nukleotidové sekvence. Ke kopírování DNA se využívá **DNA-polymeráza**.

Provedení metody:

- Příprava templátové DNA- nutná izolace viru na tkáňových kulturách a následně izolace templ. DNA pomocí spec. kitů

- Příprava reakční směsi= **MASTER MIX**

PCR voda, prac. pufr, směs dNTPs, vlastní DNA-polymerasy a spec. primery

- Příprava vzorků: **vyšetřované vzorky** + master mix
pozitivní kontrola + master mix
negativní kontrola: master mix + PCR voda

- Vlastní PCR reakce

- probíhá v termocykleru

Celý reakce je založena na amplifikaci DNA do takového množství, abychom jej mohli detekovat. Takového namnožení je dosaženo opakováním 3 kroků:

1. **Denaturace**- teplota 95°C , dochází k rozvolnění dvoušroubovice DNA na 2 jednořetězcové šroubovice.
 2. **Hybridizace**- $50\text{-}60^{\circ}\text{C}$, dochází k navázání specifických primerů na úsek, který má být amplifikován protisměrně na obou vláknech
 3. **Syntéza nového vlákna**- 72°C - prodlužování nového vlákna podle templátu pomocí DNA polymerázy
- Celý proces se asi 30 x opakuje a trvá asi 2 – 3 h.

HORIZONTÁLNÍ GELOVÁ ELEKTROFORÉZA

- Příprava agarózového gelu
Agaróza + TBE (tris-EDTA-borátový pufr)
- Rozvaření v mikrovlnné troubě → zchlazení
- Nalítí do připravené vaničky a nasazení hřebínku
→ vytužení
- Gel se následně přenesse do elektroforetické vany a napipetují se zde vzorky (přidá se k nim pufr s barvou) + DNA marker.
- zaleje pufrem

ELEKTROFORÉZA

Jamky se vzorky musí být u katody, aby záporně nabitá mohla migrovat směrem k DNA anodě.

Rychlost migrace závisí na mol. hmotnosti fragmentů DNA.

Vyhodnocení PCR

- Po ukončení elektroforézy přeneseme gel do misky s roztokem **ethidium bromidu** a necháme barvit (asi 10 min)
- Po obarvení gel opláchneme v misce s vodou, abychom vymyli přebytek DNA barviva, a prohlédneme na transiluminátoru pod UV světlem, kde ethidium bromid oranžově fluoreskuje.

Velikost PCR produktu je v určitém velikostním rozmezí a udává se v **párech bází** (bp). K odhadu velikostí DNA produktů se používá **DNA marker** s fragmenty o známé velikosti.

modifikace metody PCR

multiplex-PCR

- detekci více genů současně. Podle počtu požadovaných PCR produktů obsahuje master mix a příslušný počet párů primerů.

real-time PCR (qPCR)

- umožňuje detekovat každý produkt PCR v reálném čase, nikoliv až po skončení

Pro stanovení využívá sledování fluorescenčního signálu, který je vysílán sondami navázanými specificky nebo nespecificky na amplifikované úseky

- metoda je jednodušší a rychlejší než klasická PCR. Velkou výhodou metody real-time PCR je možnost kvantifikace množství templátu.

RT-PCR = polymerázová řetězová reakce s reverzní transkripcí

- Umožňuje amplifikaci segmentu RNA
- Její řetězec je nejprve přepsán do cDNA a poté probíhá jako běžná PCR reakce

Využití PCR k detekci virů:

- průkaz spec. NK daného viru
- vysoká specifita a citlivost

X nebezpečí kontaminace

IZOLACE VIRU

- **buněčné kultury**
- kuřecí embrya: chřipkové, aviární viry
- lab. zvířata: vzteklina X **koncept 3R**

Typy buněčných kultur:

ORGÁNOVÉ KULTURY

- fragmenty tkání, původní strukt. zachována, pouze výjimečně

PRIMÁRNÍ B. KULTURY

- Zisk enzym. rozvolněním pův. tkáně, směs různých typů buněk (2n), skleněné(plast.) láhve
- Krátká životnost → **pasážování**
- vhodné pro izolaci viru
- sekundární b. kultury (2n)- více než 1 pasážované kultury, celkem 30 – 50 x (1 rok), dochází k selekci urč. typu buněk

BUNĚČNÉ LINIE

- Cílena selekce z prim. BK nebo nád. b. mutagenními vlivy, neomezené pasážování, nelze využít u všech virů

ELEKTRONOVÁ MIKROSKOPIE

- Od optického mikroskopu se liší přítomností elektromagnetických čoček a místo fotonů se využívají elektrony.
- **Vysoká rozlišovací schopnost** → **zvětšení až 1 000 000x**

Diagnostika virů: využití pro neselektivní i selektivní detekci-
imunoelektronová mikroskopie

TEM transmisní elektronový mikroskop

- Svazek elektronů vzorkem prochází, vnitřní struktury viru

SEM rastrovací elektronový mikroskop

- pohyblivý svazek, zobrazení povrchových struktur viru

IMUNOLOGICKÉ METODY

IMUNODIAGNOSTIKA

- založena na zákl. principu vazby

antigen-protilátka

Průkaz: **PŘÍMÝ** - Ag x **NEPŘÍMÝ** – specif. Ab

Metody:

- **kvalitativní**
- **semikvantitativní**
 - dohodnutá stupnice, bez přesných čísel
- **kvantitativní**- stanovení titru a signifikantního titru

Vyšetřovaný materiál: kr. sérum a jiné tělní tek., tkáň...

Metody:

- **serologické: aglutinace, precipitace a imunodifuze**

- **imunochromatografické**

Ag reaguje s konjugátem a migruje po nitrocel. destičce ke spec. proteinu, se kterým vytvoří spec. band.

- **imunochemické**

- **enzymoimunoanalýza**

- **imunofluoroanalýza**

- **radioimunoanalýza**

Imunologické metody využívané při detekci virů:

- Hemaglutinačně-inhibiční test (HIT)**

- Virus neutralizační test (VNT)**

- Imunoperoxidázový test (IPA)**

- Imunofluorescenční test (IF)**

- Imunoblot**

- ELISA**

Nepřímý průkaz viru

HEMAGLUTINAČNĚ- INHIBIČNÍ TEST

- serologická metoda založena na specifické schopnosti antivirových protilátek inhibovat hemaglutinační reakci

Využití: **PARVOVIRÓZA U PRASAT, PI-3**

- *Reakce může být komplikována přítomností virových inhibitorů (tepelná inaktivace 62^o C, 30 min) nebo nesp. protilátkami v kr. séru (vysycení Ery)*

Provedení:

Kr. sérum + ref. kmen viru- Ag → inkubace → přidání Ery
→ inkubace

Vyhodnocení:

- **Pozitivní reakce:**

inhibice hemaglutinace a sedimentace Ery

- **Negativní reakce:**

hemaglutinace (nepřítomnost protilátek)

- Kvantitativní metoda, závěrem je stanovení TITRU Ab = obrácená hodnota ředění, které ještě brání hemagl. rci.

VIRUS NEUTRALIZAČNÍ TEST (VNT)

Metoda založena na účinku spec. protilátky schopné virus **neutralizovat** → ztráta schopnosti viru infikovat host. buňku a způsobovat CPE

Neutralizační schopnosti se prokazují na lab. zvířatech, kuř. embryích nebo tk. kulturách.

Využití: **AUJESZKY CH., SLAK, IBR, BVD-MD**

Způsob provedení:

1. Stanovení neutralizační dávky (**ND₅₀**)
2. Stanovení neutralizačního indexu

inhibice vzniku CPE

= přítomnost **neutr. Ab**

IMUNOPEROXIDÁZOVÝ TEST (IPA)

Kvantitativní stanovení přítomnosti Ab ve vyšetřovaném séru proti virovému Ag.

- Virový Ag je fixován v buněčné kultuře v jamkách mikrotitračních destiček.
- K průkazu se využívá **konjugát**: antidruhové Ab + peroxidáza
- Nenavázaný konjugát se odstraní vymytím.

Pozitivní výsledek: přítomnost Ab je indikována tvorbou **hnědočerveného zbarvení** v cytoplazmě buněk(působením peroxidázy na substrát).

Kvantitativní stanovení: Intenzita odpovídá množství Ab
Výsledek je udáván v „titrech“.

= ředění séra, které ještě dává + reakci