

PŘÍMÉ A NEPŘÍMÉ PRŮKAZY VIRŮ

IMUNOFLUORESCENČNÍ TEST (IF)

- **Přímý:** průkaz Ag

Způsob provedení:

- Příprava konjugátu:

Ab se označí fluorescenčním barvivem: **fluorescein**
nebo jeho derivát- izothiokyanát **FITC**

- Vyšetřovaný preparát na podložním skl. je převrstven konjugátem
- Nenavázaný konjugát se vymyje
- Preparát pozorujeme pod fluorescenčním mikroskopem

Fluorescenční mikroskop

Vzorek je osvětlen fluorescenčním světlem
→ dojde k absorpci částic světla (**fotonů**)
molekulami fluoroforů → dojde k **excitaci**
těchto molekul a k vyzáření (**emisi**) fotonů
z nich → návrat do klid. stavu.

Toto světlo o určité vlnové délce
je zachycováno vhodnými filtry.

Při využití FITC můžeme
v pozitivním případě sledovat
inkluze světla zelené barvy
v cytoplazmě buněk

Kvantitativní i kvalitativní test

Využití:

průkaz virů v otiskových preparátech
nebo na buněčných kulturách

Nepřímá imunofluorescence:

průkaz Ab

Způsob provedení:

- vzorky sér inkubovány s Ag (virem) fixovanými na mikroskopických podložních sklech.
- Přidání fluoresceinem značených Ab proti Ig daného vyšetřovaného zvířete.
- navázané spec. protilátky jsou označeny konjugátem
- fluorescenční mikroskop

Využití: průkaz **autoimunitních Ab**

IMUNOBLOT (WESTERN BLOT)

- Detekuje virus s vysokou specifitou, citlivější než ELISA

X Nutná vysoká koncentrace viru → využití buněčných kult.

Provedení:

- Virus je nejprve **detergentem**(dodecylsulfátsodný) rozbit na strukturální proteiny.
- Nanesení do polyakrylamidového gelu a rozdělení v el. poli dle mol. hm. – elektroforéza → proteiny vytvoří **proužky**
- Gel se přiloží na nitrocelulosovou membránu a pomocí blotovacího zařízení dojde působením el. proudu k přenosu proteinů z gelu na povrch membrány → **vznik kopie**
- **Blokace membrány** levným pufrům- např. BSA – zablokování zabrání tomu aby se Ab navazovaly na prázdný povrch

Metody detekce:

Daný protein se zviditelní pomocí specifické protilátky.

Vizualizace

▪ Kolorimetrická

Reakce enzymu s chromogenním substrátem. Enzym přeměňuje rozpustný substrát na nerozpustný a barevný produkt.

Množství proteinu je stanoveno semikvantitativně: denzitometrem-
jak moc barevná je daná skvrna

• Chemiluminiscenční způsob

Enzym přeměňuje chemiluminiscenční substrát na nestabilní produkt, který se stabilizuje vyzářením kvanta světla. Uvolňované světlo je detekováno použitím denzitometru nebo CCD kamer

Využití: detekce Ag i detekce Ab- jako Ag pak používáme ref. kmen viru

ELISA

(**Enzyme linked immunosorbent assay**)

Nejpoužívanější imunologická metoda

- **přímý i nepřímý průkaz**- častější

ELISA využívá 2 vlastností Ig:

1. schopnost proteinů vázat se na povrch plastů
2. schopnost vázat enzymy na Fc fragmenty Ab

Základní složky reakce:

- **Ag, Ab:** detekované/známé
- **Konjugát**- Ab proti proti druhově spec. Ab s navázaným enzymem:
křenová peroxidáza nebo alk. fosfatáza
- **Substrát**- reakcí s enzymem mění barvu nebo reaguje s chromogenem

**Křenová peroxidáza/H₂O₂, Alkalická fosfatáza/
PNPP(paranitrofenylfosfát)**

+ chromogeny: 5 aminosalicylová kys.

tetramethylbenzidin, diaminobenzidin

VYUŽITÍ ELISY K DETEKCI PROTILÁTEK

Metoda provedení:

- Známý Ag je navázán na plast. titr. plotnu
- Přidání testovaného séra → vymytí
- Přidání konjugátu → vymytí
- Přidání detekčního systému: substrát → vymytí
- Zastavení enzym. reakce- H_2SO_4

Pozitivní výsledek: zbarvení jed. jamek dle charakteru substrátu (*modrá barva se po přidání stop roztoku změní na žlutou*)

Negativní výsledek: jamky zůstanou beze změny barvy

VYUŽITÍ ELISY K DETEKCI VIRU

- podobný postup
- na mikrotitr. destičku jsou nejprve navázány **specifické Ab** a následně se přidá vyš. vzorek → konjugát → substrát

Vyšetřovaným materiálem mohou být všechny tělní tekutiny, kde předpokládáme výskyt viru.

Metody detekce:

- Barevné změny v jamkách lze pozorovat pouhým okem nebo pomocí spektrofotometru (kvalitativní, semikvantitativní metoda).

*Alternativou je automatizovaná metoda ELFA
- rozdíl je v substrátu- štěpen na fluoresc.
produkt- detekce pomocí fluorimetru*

ELISA a její modifikace

Sendvičová ELISA- přímá (detekce Ag) a nepřímá(Ab)

Přímá ELISA

Na mikrotitr. destičku se váže přímo
vyšetř. Ag, poté se přidá pouze konjugát.

Dvojitá sendvičová ELISA

Hledaný Ag- neznačená Ab + konjugát

Kompetitivní ELISA

- Známe množství značeného Ag soutěží o vazebná místa na Ab (limitovaný počet) s neznámým množstvím vyšetř. Ag

Pozitivní výsledek: útlum barevné reakce

- Využitelné k průkazu **Ag i Ab**

RIA

- Ag nebo Ab se označí radioaktivním izotopem

Výhody: vysoká citlivost

Nevýhody: práce s radioizotopy, cena

Využití: INFEKČNÍ ANEMIE U KONÍ, ENZOOTICKÁ LEUKÓZA SKOTU, MAEDI-VISNA, BLUETONGUE

Diagnostika vztekliny

V den poranění:

- kontrola platnosti očkování
- anamnéza – změny chování
- Klinické vyšetření

Izolace zvířete 5 dní

Pátý den po poranění: opakované vyšetření

↔ vylučování slinami 3-5 dní před klinickými projevy onemocnění

- **Důležitá prevence:**
ve věku 3 – 6 M, revakcinace dle výrobce
- **Terapie neexistuje**, v případě podezření – nutné utracení
- **VZORKY:** malá zvířata – celý kadáver,
velká: pouze hlava za 2. krčním obratlem
- Referenční laboratoř: SVU Praha

PŘÍMÁ IMUNOFLUORESCENCE

- **Základní metoda diagnostiky vztekliny**
- z otisků řezů mozku (Amonův roh)
- Průkaz Ag přímo ve tkáni nakaženého jedince
- **Výhody:**

vysoce senzitivní, specifická, rychlá, přesná a levná metoda.

- **Nevýhody:** pouze postmortálně, NE u lidí

IMUNOHISTOCHEMIE

ELISA – serologické vyšetření není průkazné

Dříve: histologické řezy: průkaz intracytoplazm. tělísek (Babes-Negriho těl.)

Biologický pokus na myších:

- suspenze z vyšetřované tkáně inokuluje 3–5 D myškám → přímá imunofluorescence z jejich mozkové tk.
- Dříve v případě negativního či dubiozního výsledku
- **Dnes nahrazovány buněčnými kulturami**
myšího neuroblastom či juvenilní ledvinové b. křečka
Po namnožení viru v b. kulturách stejný postup.

Intravitální metody

- méně přesné a specifické, pouze u lidí.
- otiskové preparáty z rohovky → IF
- izolace viru ze slin nemocného, sérologické průkazy Ab v krvi nebo mozkomíšním moku
- Negativní výsledky X vzteklinu nevyklučují Protilátky se často nestihnou vytvořit

PCR

- průkaz virové RNA

3) Bakteriální onemocnění

Bakterie - mikroorganismy jednobuněčné, které nemají pravé jádro s jadernou membránou, DNA (**prokaryota**)

jsou **schopné vlastní reprodukce**
množí se zpravidla mimo hostitelskou buňku -
extracelulárně
některé i v hostitelské buňce - intracelulárně

vytváří imunitní odpověď

Morfologie

buněčná stěna

cytoplasmatická membrána

cytoplasma

nukleoid

plazmidy (DNA extrachromosomální)

ribosomy, vakuoly, inklusní tělíška, granula

bičíky, fimbrie

velikost

mykoplasmata - 0,2 μm

chlamydie - 0,3 μm

rickettsie - 0,5 μm

ostatní bakterie 0,5 až 1,0 až 3,0 μm

Množení

fáze růstu

fáze vytváření septa

fáze dělení buňky (mateřská a dceřinná)

Vegetativní forma x spory

Potřeba kyslíku

aerobní - potřebují kyslík (*Pseudomonas*)

fakultativně anaerobní - nepotřebují kyslík, ale
s kyslíkem rostou rychleji (*Escherichia*)

anaerobní - nepotřebují kyslík (*Clostridium*)

podle barvitelnosti

dle Grama G+ a G-

G+ si podrží komplex barvivo s jodem a jsou tmavomodré

Staphylococcus (hnisavé infekce, mastitidy)

Streptococcus (hnisavé infekce, mastitidy, hřібěcí)

Erysipelothrix (červenka prasat)

Lactobacillus (nepatogenní)

Bacillus (antrax, hniloba včelího plodu)

Clostridium (tetanus, botulismus)

G- se rychle odbarví a jsou pak **červené**

Escherichia (edémová choroba prasat)

Salmonella (pulorová nákaza)

Pseudomonas (mastitidy, septikemie včel)

Moraxella (infekční keratokonjunktivitida skotu)

Materiál k bakteriologickému vyšetření:

výtěry

stěry z postižených tkání

sekrety

sekční materiál

krev

mozkomíšní mok

moč

výkaly

Bakteriologické vyšetření

Přímý průkaz bakterie

1) mikroskopie (přímý průkaz bakterie)

- nativní preparát (výjimečně, jen pro průkaz živých treponem – syfilis)
- fixovaný a barvený preparát
 - barvení základní - podle Grama = G+, G-
 - barvení speciální - podle Ziehl Neelsena (mykobakteria)

2) kultivace na agarových půdách (Petriho misky) a bujonech (zkumavky)

- 3) Konečná identifikace druhu a určení dalších potřebných vlastností bakterií
(citlivost a rezistence na antibiotika, průkaz toxinu, metabolitu)
- 4) PCR

Nepřímý průkaz bakterií

a) průkaz protilátek (IF, ELISA, RIA)

b) průkaz specifické buněčné imunity
(tuberkulinace)