

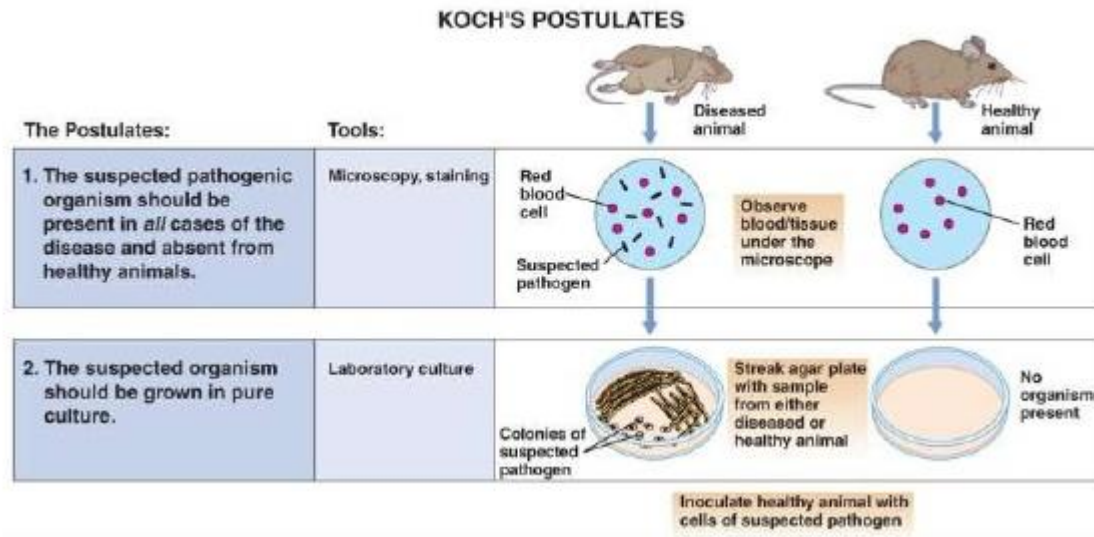
Diagnostyka wirusologiczna w praktyce klinicznej

- Ponad 60% zakażeń w praktyce klinicznej jest wywołana przez wirusy.
- Rodzaj i jakość materiału diagnostycznego (transport!) oraz interpretacja wyników badań jest podstawą dalszego postępowania.

Postulaty Kocha

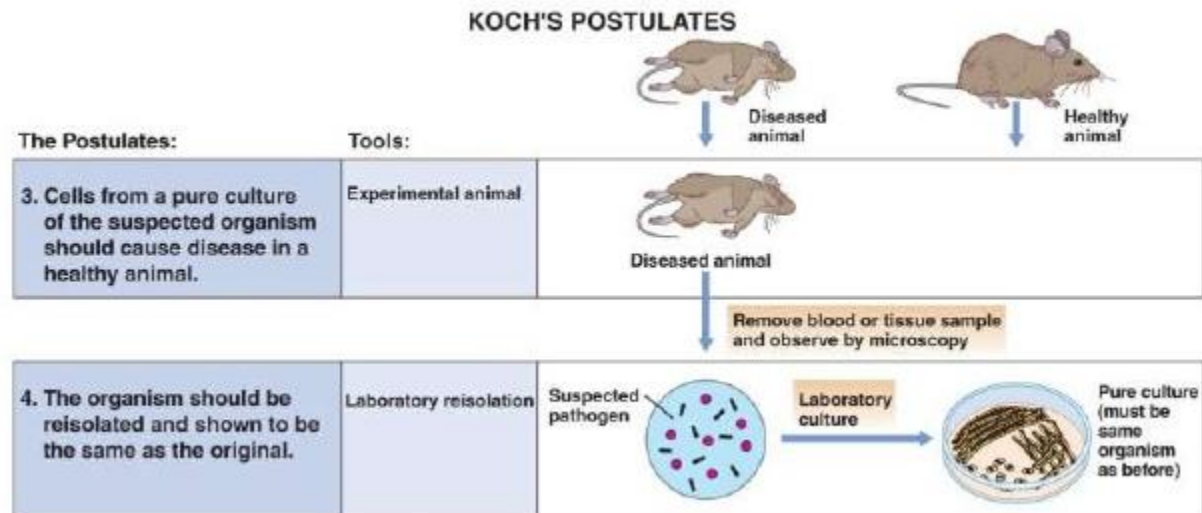
Odnoszą się do zakażeń bakteryjnych

1. Czynniki zakaźny wykrywa się u chorego osobnika;
2. Czynniki zakaźny hoduje się *in vitro* z materiału pobranego od chorego osobnika.



Postulaty Kocha

3. Czynniki zakaźny wywołuje chorobę po zakażeniu zdrowego osobnika;
4. Czynniki zakaźny może być znowu izolowany od zakażonego osobnika (pkt. 3.)



Postulaty Rivera

- T.M. River, 1937
 - Zmodyfikowane postulaty Kocha
1. Wyizolowanie czynnika zakaźnego od chorego, hodowla w komórkach, przesączalność czynnika zakaźnego.
 2. Pojawienie się podobnych objawów u zwierząt laboratoryjnych zakażonych patogenem z hodowli.
 3. Ponowna izolacja tego samego wirusa od zakażonego zwierzęcia.
 4. Wykrycie swoistej odpowiedzi immunologicznej względem wirusa.

Metody diagnostyczne w wirusologii

1. Badania bezpośrednie
2. Badania pośrednie
3. Serologia



Badania bezpośrednie

1. Wykrywanie antygenów - immunofluorescencja, ELISA etc.
2. Mikroskop elektronowy - morfologia cząstek wirusa.
3. Mikroskop świetlny - preparaty histologiczne (wtręty).
4. Badanie sekwencji genetycznych wirusa - hybrydyzacja, PCR

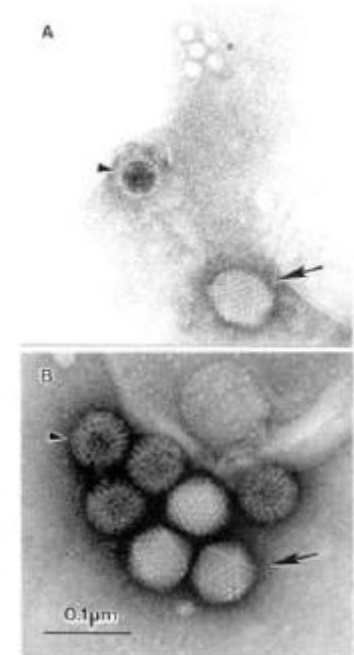
Mikroskopia

- Mikroskop świetlny — wtręty
- Mikroskop elektronowy (Rotawirus)
- Mikroskopia fluorescencyjna (bezpośrednia/pośrednia)



Bezpośrednie wykrywanie wirusa

- Mikroskop elektronowy
- bezpośrednio wykrywanie wirionów w próbce



Badania pośrednie

- 1. Hodowle komórkowe: efekt cytopatyczny, immunofluorescencja**
- 2. Zakażenie zarodków kurzych**
- 3. Zakażenie zwierząt laboratoryjnych**

Badania ilościowe

- Test „tysinkowy” – tylko wirusy lizujące - etapy
- Wykonanie szeregu rozcieńczeń materiału wirusowego
- Przygotowanie płytek z hodowlą komórek
- Dodanie rozcieńczeń wirusa
- Zalanie agarem i hodowla
- Policzenie „tysinek” PFU



Plaque assays - PFU (Plaque Forming Unit)

Serologia

Wykrywanie narastania miana przeciwciał w okresie ostrym zakażenia vs. okresi zdrowienia

Wykrywanie przeciwciał w klasie IgM w ostrym okresie zakażenia pierwotnego.

Techniki klasyczne

1. Test wiązania dopełniacza (CFT)
2. Test zahamowania hemaglutynacji
3. Techniki immunofluorescencji (IF)
4. Test neutralizacji
5. Immunoelktroforeza

Techniki współczesne

1. Radioimmunoassay (RIA)
2. ELISA
3. Western blot (WB)
4. RIBA

Izolacja wirusa

Hodowle komórkowe:

1. Komórki nerki małpy
2. Ludzkie komórki płodowe nerki i fibroblasty skóry
3. Linie komórkowe - HeLa, Vero, Hep2, LLC-MK2, MDCK

Pkt. 1. Umożliwiają zakażenie wieloma typami wirusów (kosztowne, mało dostępne).

Pkt. 3. Najwygodniejsze w użyciu, ale wykazują ograniczoną wrażliwość na zakażenie.

Efekt cytopatyczny

- **Widoczny efekt zakażenia**
- **Powody uszkodzenia komórek**
 - Replikacja wirusa
 - Zahamowanie syntezy DNA, RNA lub białek komórki
 - Zaburzenia przepuszczalności błony komórkowej
- **Efekt cytopatyczny obserwuje się w mikroskopie „odwróconym”**
 - Zmiana kształtu komórek (obkurczenie, kulistość)
 - Fuzja komórek / tworzenie syncycji
 - Zwiększona refrakcja
 - Agregacja
 - Utrata przylegania do podłoża
 - Liza komórki
 - Wtręty w cytoplazmie/jądrze komórkowym

Serologia

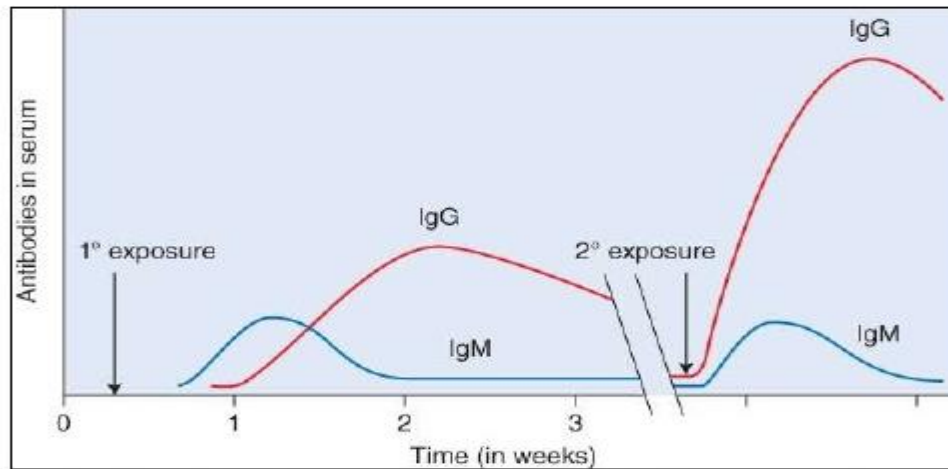


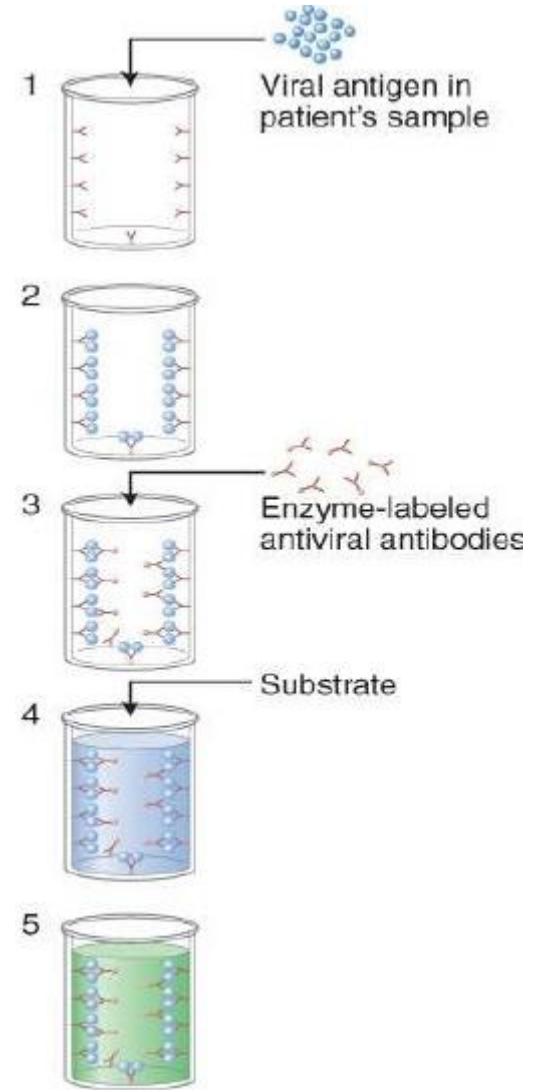
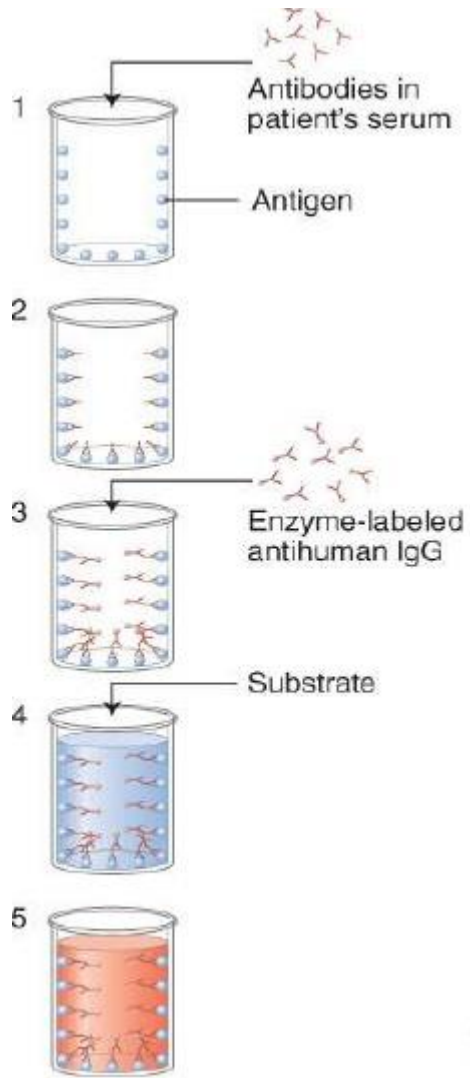
Figure 5.18: Primary (1 degree) and secondary (2 degree) antibody responses toward a viral pathogen.

Test ELISA w kierunku anty-HIV

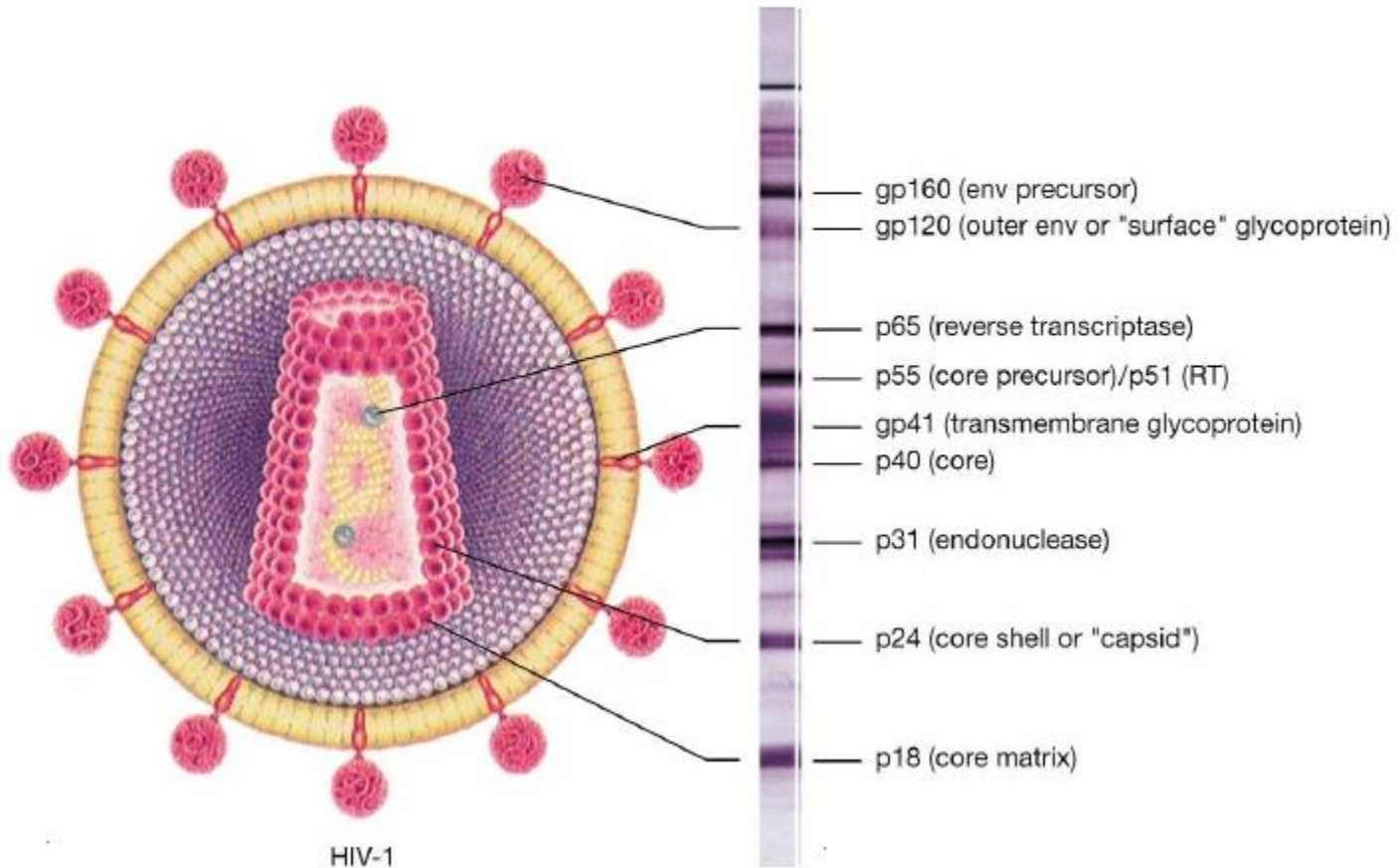


Micro plate ELISA for HIV antibody: colored wells indicate reactivity

ELISA



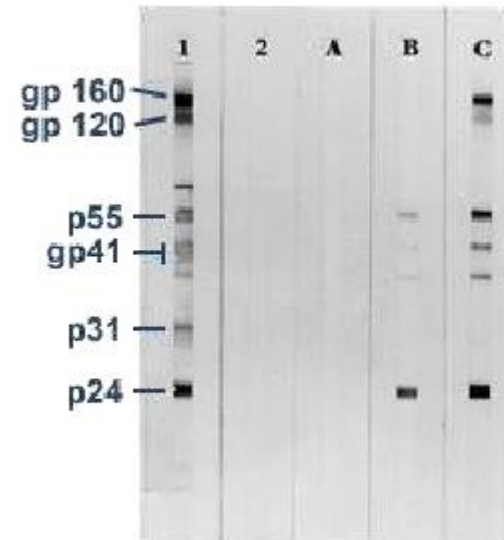
HIV particle



Western Blot

HIV-1 Western Blot

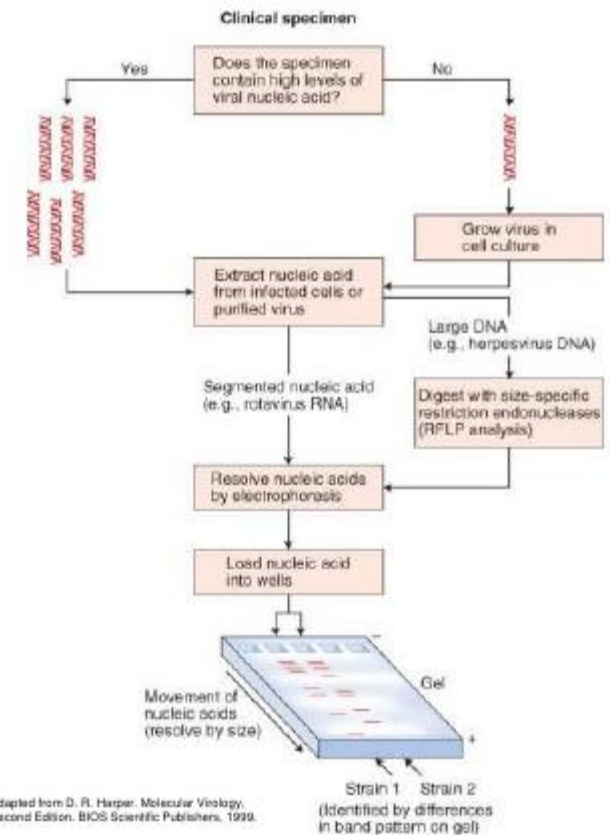
- Lane 1: Positive Control
- Lane 2: Negative Control
- Sample A: Negative
- Sample B: Indeterminat
- Sample C. Positive



Wykrywanie wirusa

— Wykrywanie kwasów nukleinowych

- PCR (DNA), RT-PCR (RNA)
- Wykrywanie wirusów niemożliwych do hodowli w komórkach
- Szybka identyfikacja
- Niezbędne w terapii



PCR

- Zalety:

- Duża czułość (nawet 1 kopia wirusa w próbce)
- Prosta procedura
- Szybki wynik
- Możliwość badań ilościowych

- Wady:

- Skrajnie wrażliwa na zanieczyszczenia.
- Wymaga wyszkolonego personelu i wyposażenia
- Niekiedy trudności interpretacyjne (np. wirusy latentne – czy ich obecność jest związana z objawami).

Efekt czynników fizycznych i chemicznych

- Ogrzewanie: większość wirusów patogennych dla człowieka jest inaktywowana w 60°C przez 30 min;
- Wirusy są stabilne w niskich temperaturach: przechowywanie próbek w -40 to -80°C;
- Część wirusów ulega inaktywacji w trakcie wysuszenia;
- Promieniowanie UV inaktywuje wirusy;
- Wirusy otoczkowe (lipidy w otoczce) są inaktywowane przez rozpuszczalniki organiczne;
- Fenol i alkohole;
- Najbardziej aktywne są: chlor, podchloryn, jodyna, aldehydy, tlenek etylenu.