

A virológiai diagnosztika alapjai

Dr. Mikó Éva
Dr. Reuter Gábor
2015.

AZ ÉLETTUDOMÁNYI- KLINIKAI FELSOŐOKTATÁS GYAKORLATORIENTÁLT ÉS HALLGATÓBARÁT
KORSZERŰSÍTÉSE A VIDÉKI KÉPZŐHELYEK NEMZETKÖZI VERSENYKÉPESSÉGÉNEK ERŐSÍTÉSÉRE
TÁMOP-4.1.1.C-13/1/KONV-2014-0001

A virológiai diagnosztika módszerei

- Tenyésztésen alapuló módszerek
- Szerológiai módszerek
- Nukleinsav kimutatásán alapuló módszerek
- Egyéb módszerek

Tenyésztésen alapuló módszerek I.

- Vírusok csak élő sejtekben tarthatóak fenn
 - A tenyésztés alapja a vírustartalmú anyaggal történő élő sejtek fertőzése
- Tenyésztés: ismert vírustartalmú anyaggal dolgozunk
- Izolálás: ismeretlen vírustartalmú anyaggal dolgozunk
- A vírusok tenyésztése veszélyeket jelenthet a laboratórium személyzetére, az állatok és a lakosság számára, ezért a biológiai biztonság szempontjából külön rendszabályok vonatkoznak rá
 - BioSafety (Laboratory) Level (BSL) 2,3,4

[Ugrás a módszerek felosztása diára](#)

AZ ÉLETTUDOMÁNYI- KLINIKAI FELSŐOKTATÁS GYAKORLATORIENTÁLT ÉS HALLGATÓBARÁT
KORSZERŰSÍTÉSE A VIDÉKI KÉPZŐHELYEK NEMZETKÖZI VERSENYKÉPESSÉGÉNEK ERŐSÍTÉSÉRE
TÁMOP-4.1.1.C-13/1/KONV-2014-0001

Tenyésztésen alapuló módszerek II.

Módszerek felosztása az élő sejt származása alapján:

- Tenyésztés/izolálás [állatokban](#)
- Tenyésztés/izolálás [embrionált tyúktojásban](#)
- Tenyésztés/izolálás [sejttenyészeteken](#)

Tenyésztés állatokban I.

- Más néven *in vivo* kultúra
- Ezt a technikát nagyrészt felváltotta a vírusok tojásban vagy sejt kultúrában való tenyésztése
- Etikai szempontból kényes terület
 - Állatok szándékos megbetegítése
- Indokolt módszer lehet ma is, ha:
 - a vírus nem vagy nehezen szaporodik sejtenyészeten
 - nem ismert a vírus fertőzőképessége, pathogenezise
 - védőoltások ártalmatlanságának és hatékonyságának vizsgálata a cél

[Ugrás a tenyésztési módszerek felosztása diára](#)

AZ ÉLETTUDOMÁNYI- KLINIKAI FELSŐOKTATÁS GYAKORLATORIENTÁLT ÉS HALLGATÓBARÁT
KORSZERŰSÍTÉSE A VIDÉKI KÉPZŐHELYEK NEMZETKÖZI VERSENYKÉPESSÉGÉNEK ERŐSÍTÉSÉRE
TÁMOP-4.1.1.C-13/1/KONV-2014-0001

Tenyésztés állatokban II.

- A siker előfeltétele a vírusra fogékony állatfaj megtalálása
 - Legtöbbször természetes gazdafajok vagy azok rokonai
- Állatoltás módszere:
 - Légúti vírusokat intranasalisan, KIR vírusokat intracerebrálisan, egyéb vírusokat intraperitonealisan vagy subcutan
 - Oltást követő szoros megfigyelés
 - Fertőzésre utaló jelek: görcs, bénulás, koordinációs zavar, elhullás
 - 24 órán belül elhullott állatok esetében általában nem a vírust tekintjük a halál okának
 - Tünetek kialakulása után az állatot le kell ölni, fel kell boncolni és az érintett szerveket feldolgozni további vizsgálatokra
 - Kontrollcsoport szükséges
 - Nem aktiválódik-e az állatok valamilyen lappangó, saját vírusa a beavatkozás hatására
 - Sikeres állatoltás bizonyítéka az állat vérében megjelenő vírus elleni specifikus ellenanyagok kimutatása

Tenyésztés állatokban III.

Gyakorlati példák:

- Neurotrop flavivírusok tenyésztése szopós egérben
 - Intracerebrálisan
 - 1-2 napos újszülött immunológiailag naiv egerek
 - szervezetükben nagy számban vannak osztódó sejtek
 - megfigyelésük nagy gyakorlatot igényel
 - Kb. 2 hetes periódus
 - Lényeges jelek: szokatlan szín, kis testméret, szokatlan aktivitás, remegés, oldalt fekvés

Tenyésztés állatokban IV.

- Hantavírusok tenyésztése rágcsálókban
 - Legtöbb patkánytörzs jó ellenanyagválaszt ad
 - Hantaan vírusra a legjobb az *Apodemus* egér intrapulmonalisan oltva
- Influenzavírus izolálása vadászgörényből
 - Intranasalisan
 - Ma már csak immunsavó előállítására, kutatásra
- Coxsackie vírus
 - Nem minden enterovírus izolálható szövettenyészetben, azokat a mintákat, ahol nem figyelhető meg cytopathiás hatás, szopós egerekbe lehet oltani

Tenyésztés embrionált tyúktojásban I.

Mai napig jól használható:

- Néhány vírus izolálására
- Nagy mennyiségű vírus felszaporítására
 - Vakcinagyártáshoz: influenza-, sárgalázvakcina
 - Vírusantigén előállítására

[Ugrás a tenyésztési módszerek felosztása diára](#)

AZ ÉLETTUDOMÁNYI- KLINIKAI FELSŐOKTATÁS GYAKORLATORIENTÁLT ÉS HALLGATÓBARÁT
KORSZERŰSÍTÉSE A VIDÉKI KÉPZŐHELYEK NEMZETKÖZI VERSENYKÉPESSÉGÉNEK ERŐSÍTÉSÉRE
TÁMOP-4.1.1.C-13/1/KONV-2014-0001

Tenyésztés embrionált tyúktojásban II.

A módszer főbb lépései:

- Tojások előkeltetése
 - Különböző vírusok izolálására különböző fejlettségi állapotú embriók szükségesek
- Lámpázás
 - Ellenőrizni kell, hogy élő-e az embrió, ill. hol van a légzsák
 - Fehérhéjú tojás a legalkalmasabb a fényáteresztés szempontjából

[Ugrás a tenyésztési módszerek felosztása diára](#)

AZ ÉLETTUDOMÁNYI- KLINIKAI FELSŐOKTATÁS GYAKORLATORIENTÁLT ÉS HALLGATÓBARÁT
KORSZERŰSÍTÉSE A VIDÉKI KÉPZŐHELYEK NEMZETKÖZI VERSENYKÉPESSÉGÉNEK ERŐSÍTÉSÉRE
TÁMOP-4.1.1.C-13/1/KONV-2014-0001

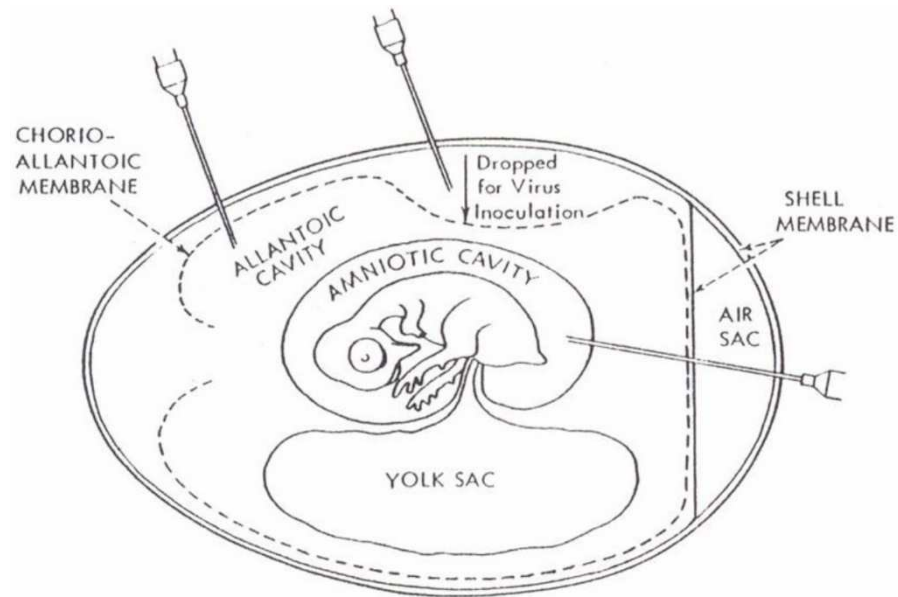
Tenyésztés embrionált tyúktojásban III.

- Tojásoltás
 - Vírustól függően különböző helyekre
 - Influenzavírus: amnion és allantois üreg
- Inkubáció (pl. 37 °C)
- Amnion és/vagy allantois folyadék kinyerése
- Vírusazonosítás
 - Szerológiai módszerrel: vvt-t agglutinálni képes vírusok esetében pl. hemagglutináció gátlás (HAG)
 - Molekuláris vizsgálatok: pl. polimeráz láncreakció (PCR)

[Ugrás a tenyésztési módszerek felosztása diára](#)

AZ ÉLETTUDOMÁNYI- KLINIKAI FELSŐOKTATÁS GYAKORLATORIENTÁLT ÉS HALLGATÓBARÁT
KORSZERŰSÍTÉSE A VIDÉKI KÉPZŐHELYEK NEMZETKÖZI VERSENYKÉPESSÉGÉNEK ERŐSÍTÉSÉRE
TÁMOP-4.1.1.C-13/1/KONV-2014-0001

Tenyésztés embrionált tyúktojásban IV.



© dr. Reuter Gábor

Az embrionált tojás sematikus képe. A minta vírustartalmától függően az oltás az embrionált tojás különböző részére történhet.

Tenyésztés sejtenyészeteken I.

Sejtenyészetek alkalmazhatósága

- Legbiztosabb módszer az aktív vírusfertőzés bizonyítására
- Vírusdiagnosztikumok készítése: antigéntermelés
- Kutatási célok
- Védőoltások előállítása
 - Csirkeembrió fibroblaszt kultúra: mumps, kanyaró, kullancsencephalitis elleni vakcinák
 - Humán embrionális tüdő fibroblaszt kultúra: veszettség, rubeola, VZV, HAV elleni vakcina
 - Afrikai zöld majom vesesejt (Vero) kultúra: IPV, H1N1

[Ugrás a tenyésztési módszerek felosztása diára](#)

Tenyésztés sejtenyészetekken II.



© dr. Reuter Gábor

A tenyésztésre szánt különböző sejtvonalakat fiolákba zárva folyékony nitrogén (-195,8°C) alatt tároljuk.

AZ ÉLETTUDOMÁNYI- KLINIKAI FELSŐOKTATÁS GYAKORLATORIENTÁLT ÉS HALLGATÓBARÁT
KORSZERŰSÍTÉSE A VIDÉKI KÉPZŐHELYEK NEMZETKÖZI VERSENYKÉPESSÉGÉNEK ERŐSÍTÉSÉRE
TÁMOP-4.1.1.C-13/1/KONV-2014-0001

Tenyésztés sejtenyészeteken III.

Sejtenyészetek csoportosítása:

- Primér sejt kultúra
 - A tenyészet a frissen eltávolított szerv/szövetből készül:
 - leölt állatok szervei
 - műtétileg eltávolított szervek, szervdarabok
 - megszakított emberi terhességből származó embrionális tüdő, placenta
 - csirkeembrió szövetek
 - Elsősorban adherens módon, monolayer formában szaporodnak
 - Hám/fibroblaszt/kevert típusok

[Ugrás a módszerek felosztása diára](#)

Tenyésztés sejtenyészeteken IV.

- Szekunder sejt kultúra
 - Primer kultúrák egyszeri átoltásával jön létre
- Sorozatos sejt vonalak
 - A szekunder sejt kultúrák egy része 40-50 passzázon keresztül tovább szaporítható
 - pl. embrionális tüdőeredetű diploid sejt kultúra (MRC5)
- Folyamatos sejt vonalak
 - Embrionális/felnőtt eredet
 - Egészséges/daganatos szövetekből
 - Korlátlanul szaporíthatóak
 - Heteroploid jellegű sejtek

Tenyésztés sejtenyészeteken V.

Sejtenyészetek felhasználása vírusok izolálására

- Konfluens vagy semikonfluens összefüggő sejtréteg alkalmas vírusfertőzésre
- Vírusok előkezelt fedőlemez-kultúrákon is szaporíthatóak, majd *in situ* fixálhatóak és festhetőek (shell vial culture)
- A beoltott kultúrákat naponta legalább egyszer fénymikroszkóppal ellenőrizzük
- A vírusok jelenléte direkt cytopáthiás hatás vagy indirekt jelek alapján állapítható meg

[Ugrás a módszerek felosztása diára](#)

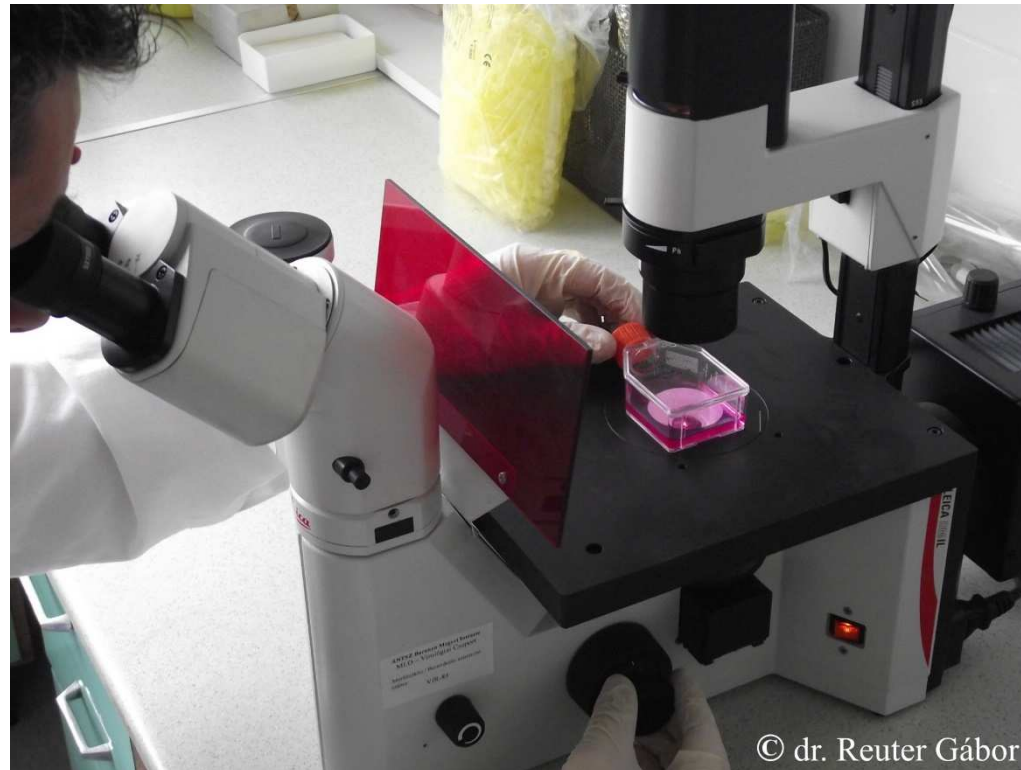
AZ ÉLETTUDOMÁNYI- KLINIKAI FELSŐOKTATÁS GYAKORLATORIENTÁLT ÉS HALLGATÓBARÁT
KORSZERŰSÍTÉSE A VIDÉKI KÉPZŐHELYEK NEMZETKÖZI VERSENYKÉPESSÉGÉNEK ERŐSÍTÉSÉRE
TÁMOP-4.1.1.C-13/1/KONV-2014-0001

Tenyésztés sejtenyészeteken VI.



Sejtenyésztéshez szükséges anyagok (tápfolyadékok) és eszközök (különböző térfogatú üveg és műanyag tenyésztő edények). A kép előterében fedőlemez-kultúra készítésére alkalmas műanyag lemez látható (shell vial culture).

Tenyésztés sejtenyészetekken VII.



A sejt kultúrákat és a beoltott sejt kultúrákat naponta fénymikroszkóppal ellenőrizzük. A vírusok szaporodása a sejt károsító hatás (cytopathic effect = CPE) jelei alapján észlelhető.

AZ ÉLETTUDOMÁNYI- KLINIKAI FELSŐOKTATÁS GYAKORLATORIENTÁLT ÉS HALLGATÓBARÁT
KORSZERŰSÍTÉSE A VIDÉKI KÉPZŐHELYEK NEMZETKÖZI VERSENYKÉPESSÉGÉNEK ERŐSÍTÉSÉRE
TÁMOP-4.1.1.C-13/1/KONV-2014-0001

Tenyésztés sejtenyészeteken VIII.

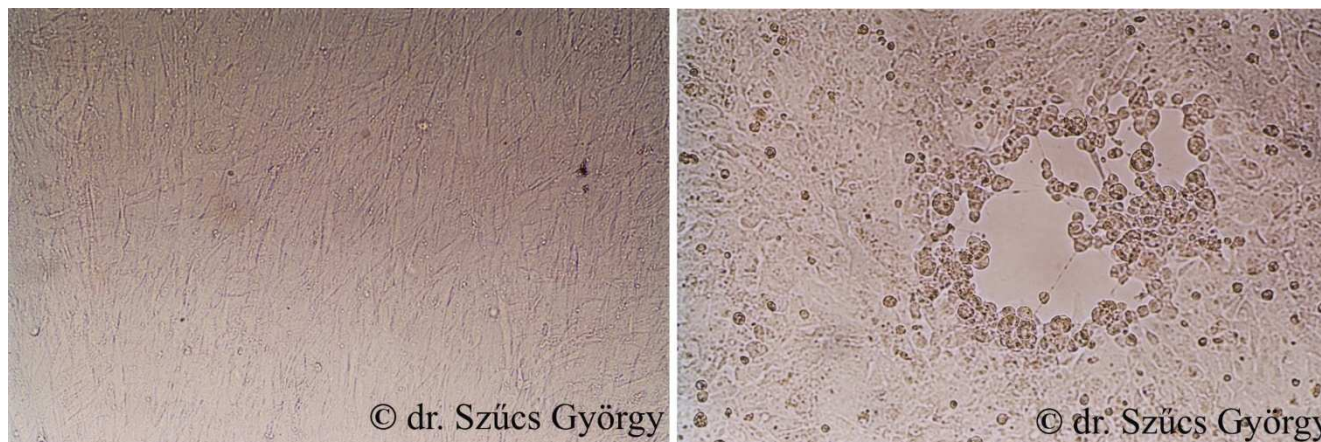
Cytopathiás hatások (CPE)

- A sejtenyészet vírushatásra bekövetkező morfológiai változásai
 - Sejtek destrukciója/lysis
 - Sejtek megnagyobbodása
 - Megváltozott refraktilitás
 - Óriássejtek kialakulása
 - Zárványok képződése
 - natívan nem vizsgálható, csak festett készítményen
 - vírusfehérjéket és sejtalkatrészeket tartalmaz
 - Magra vagy cytoplazmára lokalizálódó, magra és cytoplazmára lokalizálódó zárványok

[Ugrás a tenyésztési módszerek felosztása diára](#)

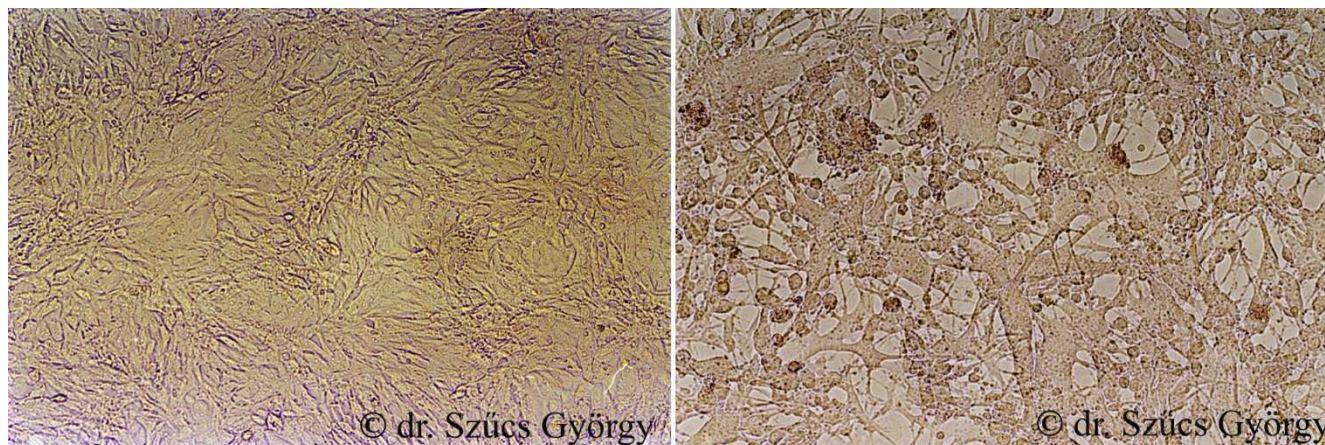
AZ ÉLETTUDOMÁNYI- KLINIKAI FELSŐOKTATÁS GYAKORLATORIENTÁLT ÉS HALLGATÓBARÁT
KORSZERŰSÍTÉSE A VIDÉKI KÉPZŐHELYEK NEMZETKÖZI VERSENYKÉPESSÉGÉNEK ERŐSÍTÉSÉRE
TÁMOP-4.1.1.C-13/1/KONV-2014-0001

Tenyésztés sejttenyészeteken IX.



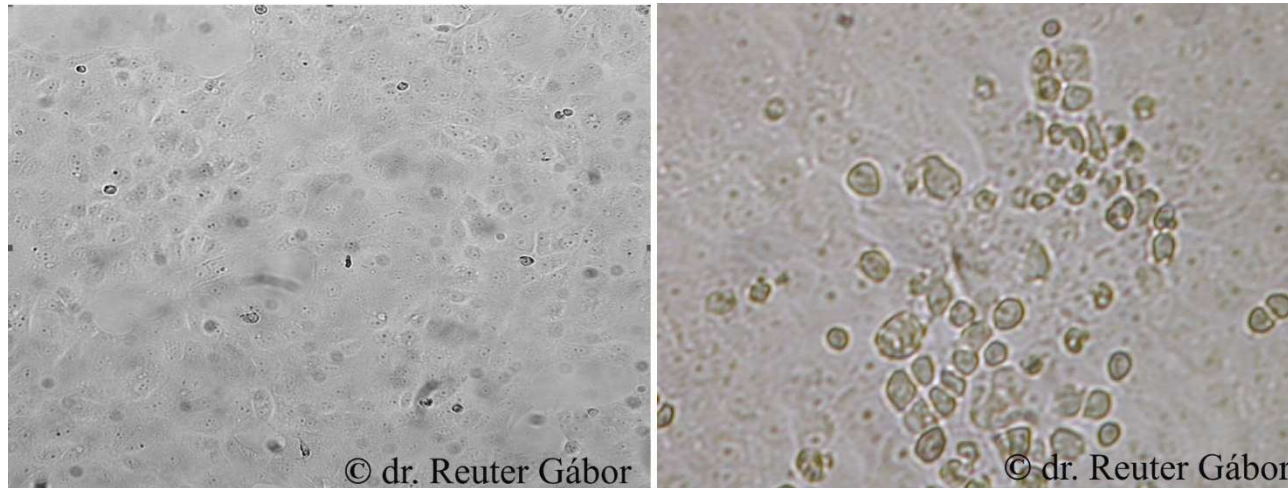
Humán herpes vírus 1 (HHV1, korábban HSV1, *Herpesviridae*) okozta cytopáthiás hatások (destrukció, lysis, a sejtek megnagyobbodása, megváltozott refraktilitás) afrikai zöld majomvese (Vero) sejttenyészetén (jobb oldali kép). A bal oldali kép a vírussal nem fertőzött kontroll szövetet mutatja.

Tenyésztés sejttenyészeteken X.



Kanyaróvírus (*Paramyxoviridae*) okozta cytopáthiás hatások (destrukció, a sejtek megnagyobbodása, több magvú órássejtek képződése, megváltozott refraktilitás) afrikai zöld majomvese (Vero) sejttenyészetén (jobb oldali kép). A bal oldali kép a vírussal nem fertőzött kontroll szövetet mutatja.

Tenyésztés sejtenyészeten XI.



Aichi vírus (*Picornaviridae*) okozta cytopáthiás hatások (destrukció, a sejtek megnagyobbodása, megváltozott refraktilitás) afrikai zöld majomvese (Vero) sejtenyészeten (jobb oldali kép). A bal oldali kép a vírussal nem fertőzött kontroll szövetet mutatja.

Tenyésztés sejttenyészeteken XII.

- Vírusazonosításra nem alkalmas, több vírus is létrehozhat hasonló CPE-t
- Vírusazonosítás CPE-s sejttenyészetből:
 - (RT)-PCR sejtekből vagy tápfolyadékból
 - Vírusantigének kimutatása: IF, vagy immunperoxidáz módszerrel
 - Legspecifikusabb a vírusneutralizáció (lásd szerológia)

[Ugrás a tenyésztési módszerek felosztása diára](#)

AZ ÉLETTUDOMÁNYI- KLINIKAI FELSŐOKTATÁS GYAKORLATORIENTÁLT ÉS HALLGATÓBARÁT
KORSZERŰSÍTÉSE A VIDÉKI KÉPZŐHELYEK NEMZETKÖZI VERSENYKÉPESSÉGÉNEK ERŐSÍTÉSÉRE
TÁMOP-4.1.1.C-13/1/KONV-2014-0001

Tenyésztés sejttenyészeteken XIII.



Rotavírussal (*Reoviridae*) fertőzött és indirekt immunofluorescenciás módszerrel vizsgált embrionális rhesus majomvese (MA-104) sejttenyészet. A rotavírus-tartalmú sejtek sárgászöld (citoplazmára lokalizálódó) fluorescenciát mutatnak. A háttérben rotavírussal nem fertőzött sejtek láthatók.

Tenyésztés sejttenyészeteken XIII.



Rotavírussal (*Reoviridae*) fertőzött és indirekt immunfluoreszcenciás módszerrel vizsgált embrionális rhesus majomvese (MA-104) sejttenyészet. A rotavírus-tartalmú sejtek sárgászöld (citoplazmára lokalizálódó) fluoreszcenciát mutatnak. A háttérben rotavírussal nem fertőzött sejtek láthatók.

Szerológiai módszerek

ugrás a Szerológiai reakciók c. fejezetre

- Vírusneutralizáció
- Immunfluoreszcencián alapuló módszerek
- ELISA-Enzym-Linked Immunosorbent Assay
- Komplementkötési reakció (KKR)
- Hemagglutináció-gátlási reakció (HAG)
- Western-blot
- Line Immunoassay
- Immunkromatográfia

[Ugrás a módszerek felosztása diára](#)

AZ ÉLETTUDOMÁNYI- KLINIKAI FELSŐOKTATÁS GYAKORLATORIENTÁLT ÉS HALLGATÓBARÁT
KORSZERŰSÍTÉSE A VIDÉKI KÉPZŐHELYEK NEMZETKÖZI VERSENYKÉPESSÉGÉNEK ERŐSÍTÉSÉRE
TÁMOP-4.1.1.C-13/1/KONV-2014-0001

Nukleinsav kimutatásán alapuló módszerek

ugrás a Molekuláris biológiai vizsgálatok c. fejezetre

- Polimeráz láncreakció (PCR)
- Real-time PCR
- Southern blot
- Line probe assay
- *In situ* hibridizáció
- Restrikciós fragmenthossz-polimorfizmus (RFLP)

[Ugrás a módszerek felosztása diára](#)

AZ ÉLETTUDOMÁNYI- KLINIKAI FELSŐOKTATÁS GYAKORLATORIENTÁLT ÉS HALLGATÓBARÁT
KORSZERŰSÍTÉSE A VIDÉKI KÉPZŐHELYEK NEMZETKÖZI VERSENYKÉPESSÉGÉNEK ERŐSÍTÉSÉRE
TÁMOP-4.1.1.C-13/1/KONV-2014-0001

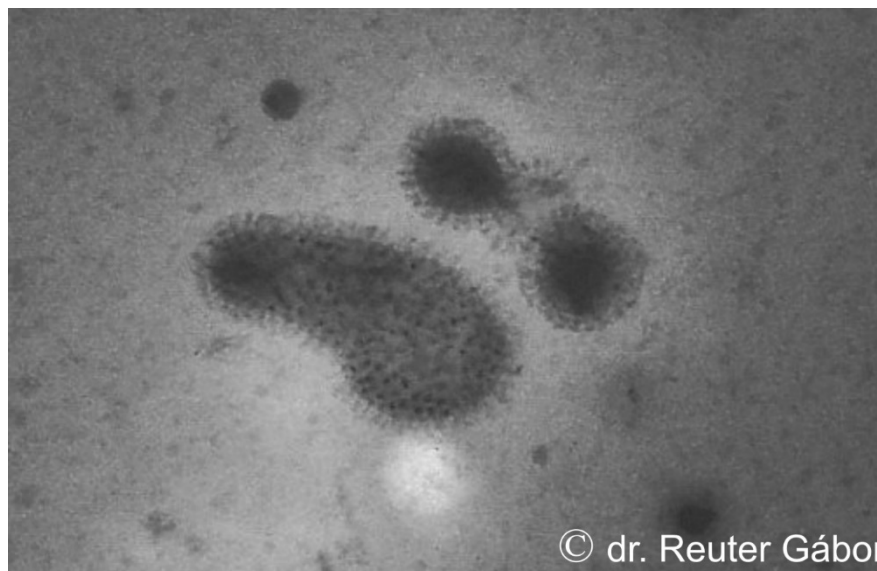
Egyéb módszerek

- Elektronmikroszkópia
- DNS-chip
- Protein-chip
- Tömegspektrometria

Uarás a módszerek felosztása diára

AZ ÉLETTUDOMÁNYI- KLINIKAI FELSŐOKTATÁS GYAKORLATORIENTÁLT ÉS HALLGATÓBARÁT
KORSZERŰSÍTÉSE A VIDÉKI KÉPZŐHELYEK NEMZETKÖZI VERSENYKÉPESSÉGÉNEK ERŐSÍTÉSÉRE
TÁMOP-4.1.1.C-13/1/KONV-2014-0001

Elektronmikroszkópia I.

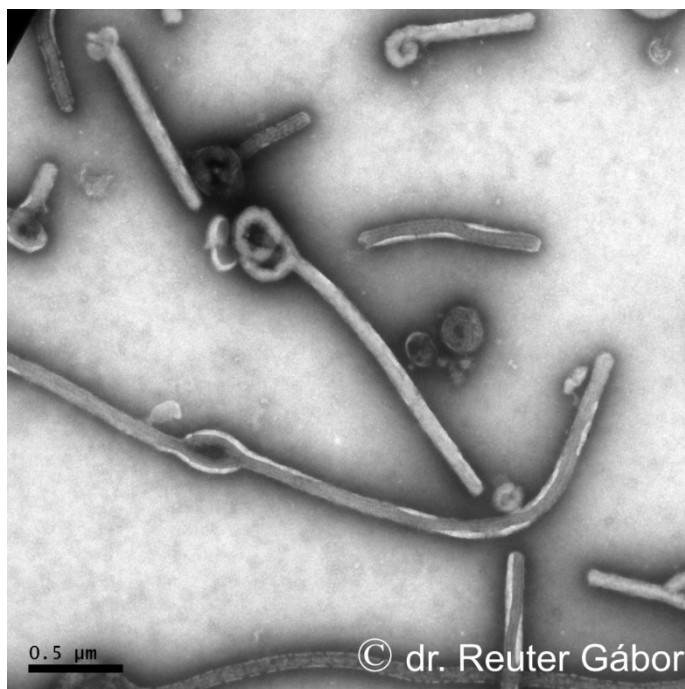


Influenza A/H3N2 elektronmikroszkópos képen

Ugrás a módszerek felosztása diára

AZ ÉLETTUDOMÁNYI- KLINIKAI FELSŐOKTATÁS GYAKORLATORIENTÁLT ÉS HALLGATÓBARÁT
KORSZERŰSÍTÉSE A VIDÉKI KÉPZŐHELYEK NEMZETKÖZI VERSENYKÉPESSÉGÉNEK ERŐSÍTÉSÉRE
TÁMOP-4.1.1.C-13/1/KONV-2014-0001

Elektronmikroszkópia II.



Ebola-vírus elektronmikroszkópos képen

Ugrás a módszerek felosztása diára

AZ ÉLETTUDOMÁNYI- KLINIKAI FELSŐOKTATÁS GYAKORLATORIENTÁLT ÉS HALLGATÓBARÁT
KORSZERŰSÍTÉSE A VIDÉKI KÉPZŐHELYEK NEMZETKÖZI VERSENYKÉPESSÉGÉNEK ERŐSÍTÉSÉRE
TÁMOP-4.1.1.C-13/1/KONV-2014-0001