FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví B5345

Marie Sluková

Studijní obor: Zdravotní laborant 5345R020

DIAGNOSTIKA RESPIRAČNÍCH VIRŮ

Bakalářská práce

..

Vedoucí práce: MUDr. Jarmila Kudová

PLZEŇ 2017

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a všechny použité prameny jsem uvedla v seznamu použitých zdrojů.

V Plzni dne 31. 3. 2017

……

vlastnoruční podpis

Poděkování
Děkuji MUDr. Jarmile Kudové za odborné vedení práce, poskytování rad a materiálních podkladů.
.

Anotace

Příjmení a jméno: Marie Sluková
Katedra: Katedra teoretických oborů
Název práce: Diagnostika respiračních virů
Vedoucí práce: MUDr. Jarmila Kudová
Počet stran: číslované 40, nečíslované 11
Počet příloh: 0
Počet titulů použité literatury: 29
Klíčová slova: viry, chřipka, přímý průkaz, nepřímý průkaz

Souhrn:

Bakalářská práce se zabývá respiračními viry. V teoretické části je nejdříve vysvětleno, co jsou viry. Poté rozdělení druhů respiračních virů, z toho je největší část věnována viru chřipky, a nové respirační virové nákazy. V praktické části je pak popsán postup vyšetření respiračních virů. Praktická část je rozdělena na přímý a nepřímý průkaz viru, je zde také popsaná chřipková sezóna v roce 2015/2016.

Annotation

Surname and name: Marie Sluková
Department: Department of Theoretical Fields
Title of thesis: Diagnosis of respiratory viruses
Consultant: MUDr. Jarmila Kudová
Number of pages: numbered 40, unnumbered 11
Number of appendices: 0
Number of literature items used: 29
Key words: viruses, flu, direct detection, indirect detection

Summary:

This bachelor ´s thesis focuses on respiratory viruses. The theoretical section first defines viruses in general. Secondly, it explains in details the types of respiratory viruses, while focusing primarily on the flu virus. Lastly, covering new respiratory viral infections. The practical section of the thesis illustrates an examination procedure of respiratory viruses. The practical section is divided into the part about a direct detection of virus and the part about an indirect detection of virus. In this section I also elaborate on the flu season of 2015/2016.

OBSAH

OBSAH **7**

ÚVOD **9**

1 RESPIRAČNÍ VIRY **11**

1.1 STAVBA VIRIONU 11
1.2 REPRODUKCE VIRŮ 12

2 DRUHY RESPIRAČNÍCH VIRŮ **13**

2.1 VIRUS CHŘIPKY 13
2.1.1 Historie *13*
2.1.2 Charakteristika *14*
2.1.3 Klinický obraz *14*
2.1.4 Příčiny vzniku epidemií a pandemií *15*
2.1.5 Terapie *15*
2.1.6 Rozdíl mezi chřipkou a nachlazením *16*
2.2 RESPIRAČNÍ SYNCYCIÁLNÍ VIRUS 16
2.2.1 Charakteristika *16*
2.2.2 Klinický obraz *17*
2.2.3 Terapie *17*
2.3 RHINOVIRY 18
2.3.1 Charakteristika *18*
2.3.2 Klinický obraz *18*
2.4 KORONAVIRY 19
2.4.1 Charakteristika *19*
2.5 VIRUS PARAINFLUENZY 19
2.5.1 Charakteristika *19*
2.6 ADENOVIRY 20
2.6.1 Charakteristika *20*

3 NOVÉ VIROVÉ RESPIRAČNÍ INFEKCE **21**

3.1 MERS COV - MIDDLE EAST RESPIRATORY SYNDROME CORONAVIRUS. 21
3.2 SARS – SEVERE ACUTE RESPIRATORY SYNDROME 22
3.3 PTAČÍ CHŘIPKA 22

4 CÍLE PRÁCE **25**

5 ZÁSADY VIROLOGICKÉ DIAGNOSTIKY **26**

5.1 VÝBĚR VHODNÉ METODY PRO DIAGNOSTIKU 26
5.2 NEPŘÍMÝ PRŮKAZ 26
5.3 PŘÍMÝ PRŮKAZ 26
5.4 DOPORUČENÝ POSTUP ODBĚRU BIOLOGICKÉHO MATERIÁLU PRO DIAGNOSTIKU RESPIRAČNÍCH VIRŮ 26
5.4.1 Postup při odběru nazofaryngeálního výtěru *26*
5.4.2 Postup při odběru sekčního materiálu *27*

6 PŘÍMÝ PRŮKAZ RESPIRAČNÍCH VIRŮ **29**

6.1 KULTIVACE NA TKÁŇOVÝCH KULTURÁCH 29
6.1.1 Odběrová média *29*
6.1.2 Tkáňové kultury *29*
6.1.3 Práce s buňkami *30*
6.2 MDCK IZOLACE CHŘIPKY 32

6.2.1 Nasazení buněk ... *32*
6.2.2 Infikování ... *32*
6.2.3 Pasážování ... *32*
6.2.4 Příprava krvinek na průkaz viru ... *33*
6.2.5 Průkaz viru ... *33*
6.2.6 Titrace antigenu ... *33*
6.3 PCR – POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE ... 34
6.3.1 PCR Chřipka ... *35*
6.3.2 Imunochromatografický test pro rychlou diagnostiku antigenu viru chřipky A a B v nasofaryngeálních výtěrech ... *36*
7 NEPŘÍMÝ PRŮKAZ RESPIRAČNÍCH VIRŮ ... **38**
7.1 KOMPLEMENT FIXAČNÍ REAKCE ... 38
7.2 HEMAGLUTINAČNĚ INHIBIČNÍ TEST – HIT ... 39
7.3 ELISA, EIA ... 39
7.3.1 Anti-Adenoviru ELISA (IgG) ... *40*
8 CHŘIPKOVÁ SEZÓNA 2015/2016 ... **41**
DISKUZE ... **46**
ZÁVĚR ... **47**
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY A INFORMAČNÍCH ZDROJŮ ... **48**
SEZNAM OBRÁZKŮ ... **50**
SEZNAM TABULEK ... **51**
SEZNAM GRAFŮ ... **52**

ÚVOD

Respirační infekce jsou nejčastější příčinou, pro kterou přichází pacient do ordinace praktického lékaře. Většina akutních respiračních infekcí je vyvolána viry, frekvence jejich výskytu je udávána od 80 do 95 procent. V České republice má většina respiračních infekcí sezónní charakter, s vyšším výskytem od jara do podzimu.

Akutní respirační infekce vyvolává až 200 různých virů, ti nejčastější viroví původci patří do čeledí Paramyxoviridae, Pikornaviridae, Koronaviridae a Adenoviridae. Každoroční epidemie vyvolávají viry chřipky typu A a B z čeledi Orthomyxoviridae, které byly v minulosti už příčinou několika pandemií, ty vedly k úmrtí miliónů lidí. Chřipka je však často život ohrožujícím onemocněním, v podvědomí laické veřejnosti je od dob tzv. „španělské chřipky“ z roku 1919, která si vyžádala více obětí na životech než první světová válka.

Riziko virových respiračních infekcí je také pravidelně připomínáno vždy po identifikaci nových patogenů respiračního traktu (těžký akutní respirační syndrom – SARS, MERS – CoV, lidský metapneumovirus – hMPV), vypuknutí ptačí chřipky v Asii a obecně celkový vzestup akutních respiračních infekcí v posledních letech.

Laboratorní diagnostika respiračních virů má význam nejen epidemiologický, je v mnoha případech důležitá pro stanovení původce respiračního onemocnění a pro zahájení antivirové terapie. Významnou úlohu má laboratorní diagnostika chřipkových virů také s ohledem na jejich genetickou nestabilitu. Je základem pro vývoj protichřipkových vakcín pro další respirační sezónu.

TEORETICKÁ ČÁST

1 RESPIRAČNÍ VIRY

Respirační viry se vyskytují převážně sezónně a postihují všechny věkové kategorie lidí. Můžou mít banální charakter, avšak někdy mohou být i život ohrožující. Respirační viry patří k nejčastějším příčinám vzniku nemocí. Díky novým mutacím těchto virů se často objevují epidemie, které se velmi rychle šíří. Dělíme je na onemocnění horních a dolních cest dýchacích, s onemocněním horních dýchacích cest přicházejí často pacienti k praktickým lékařům. Respirační infekce jsou nejčastěji vyvolány obalenými RNA viry. Obal viru dovoluje přilnutí k respiračnímu epitelu, ten je chráněn hlenovou vrstvou. Pouze rhinoviry jsou neobalené a nejdříve napadají oblast nosu, zde není souvislá hlenová vrstva díky přítomnosti čichového orgánu. Tyto viry napadají respirační epitel, ale za normálního průběhu se v hlubších tkáních nemnoží. Při destrukci epitelu může dojít k vzniku virémie, která způsobuje těžký průběh nemoci. To je spojené s vyplavením cytokinů a celkovou reakcí. K nakažení ostatních orgánů dochází pouze výjimečně. Nákazy vzniklé těmito viry mají akutní povahu, krátkou inkubační dobu, rychlý průběh a nepřechází do chronických forem. Při ochraně organismu pracuje především interferon, specifická imunita se spíše neaktivuje nebo jen krátkodobě. Projevy respiračních virů jsou velice podobné a nedají se rozlišit jednotlivé druhy. Jen onemocnění chřipkou typu A má specifický průběh. [1,2,3]

1.1 Stavba virionu

Virovou částici nazýváme virion. Nukleotid tvoří vnitřní část virionu, ten obsahuje nukleovou kyselinu a je obalen bílkovinou kapsidou. Celé dohromady tvoří nukleokapsidu. Některé viry jsou tvořené pouze nukleokapsidou. Jiné mají nukleokapsidu uloženou ve virovém obalu. Kapsida je tvořena stejnými bílkovinnými podjednotkami tzv. protomery. Podle uspořádání protomer rozlišujeme kapsidu se symetrií kubickou nebo spirální. Obal se většinou skládá z vnitřního proteinu neboli matrix a zevního lipoproteinového komplexu. Komplex tvoří lipidová dvojvrstva z buněčných membrán a virové glykoproteiny. Viry mají různou velikost a tvar. Obsahují nukleovou kyselinu, která je nositelkou genetické informace pro svoji tvorbu a nositelkou infekčnosti, schopnost zmnožení v hostitelské buňce. Rozlišujeme DNA viry a RNA viry. [3]

1.2 Reprodukce virů

V buňce se viry rozmnožují pomocí reprodukčního cyklu, který je rozdělený do několika kroků. Nejdříve virus vstoupí do vhodného místa v buňce a poté začne syntéza jednotlivých virových složek a dozráním nových virionů cyklus končí. Cyklus doběhne do konce pouze ve vnímavé buňce a poté se z ní vyplaví nové infekční viriony. Pokud je buňka nevnímavá, cyklus neproběhne vůbec. [3]

2 DRUHY RESPIRAČNÍCH VIRŮ

2.1 Virus chřipky

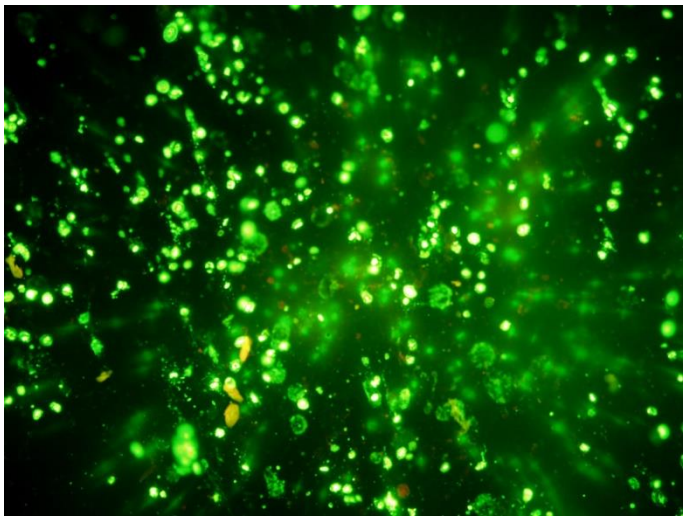
2.1.1 Historie

Chřipka je v literatuře popisována již velice dlouho, spolehlivé popisy pocházejí z 16. století. Ve středověku se v Itálii používal název influenza, aniž by se věděl původce výskytu nemoci. Virus chřipky se dělí na typ A, B a C. V roce 1933 objevili virus chřipky A W. Smith, P. Laidlaw a C. H. Anders. Poté virus chřipky B objevil v roce 1939 T. Jr. Francis a v roce 1950 byl objeven typ C. Po objevu viru A a B se začalo s výrobou očkovací látky. [1]

2.1.1.1 Viry skupiny A

H1N1	V roce 1918 Španělská chřipka, v letech 1977 – 1978 Ruská chřipka a v letech 2009 – 2010 Prasečí chřipka
H1N2	Tento virus je přenosný na člověka, prasata a ptáky
H2N2	V roce 1957 Asijská chřipka
H3N2	V roce 1968 Honkongská chřipka
H3N8	V letech 1889 – 1890 chřipková pandemie
H5N1	V roce 1996 ptačí chřipka objevena v Asii, poté v roce 2004
H7N7	Koňská chřipka, nebyl zaznamenán přenos na člověka
H7N2	
H7N3	
H7N9	Tento kmen byl objeven v Číně
H9N2	
H10N7	

Tabulka 1 Viry chřipky A [4]



Obrázek 1Chřipka B

2.1.2 Charakteristika

Virus chřipky patří do čeledi Orthomyxovididae, která se dělí do rodu Influenzavirus, kam patří typ A a B, a virus chřipky C je jako zvláštní rod. Virus chřipky C nikdy nevyvolává epidemie a způsobuje pouze lehké infekce horních cest dýchacích. Viry chřipky jsou částice o průměru 80 – 120 nm, které mohou být pleomorfní, sférické nebo vláknité. Zevní vrstvy obalu chřipkového viru jsou proměnlivé, tvoří je povrchové glykoproteinové antigeny – neuraminidáza a hemaglutinin. Variabilita zevní vrstvy podmiňuje rozlišení antigenních subtypů a variant. U chřipky C chybí neuraminidáza, vrstvu tvoří stabilní hemaglutinin a podobný enzym jako neuraminidáza acetylesteráza. Je popsáno 16 různých druhů hemaglutininů virů chřipky A (H1 – H16) a 9 různých typů neuraminidáz (N1 – N9). Obal viru je tvořen osmi koncentrickými vrstvami. Protein M1 tvoří vnitřní vrstvu obalu. Je to stabilizátor virové částice a je velmi potřebný pro dozrání virionu a uvolnění z hostitelské buňky. Nejmenší transmembránový protein M2 je vložen do obalu, zajišťuje výměnu virového obalu s membránou endosomu a uvolnění nukleokapsidy do cytoplazmy. Funkci proteinu M2 inhibují virostatika 1. generace, čímž dojde blokaci odpláštění viru uvnitř infikované buňky. Tento protein najdeme pouze u viru chřipky A, proto antivirotika nejsou účinná u viru chřipky B a C. V jádře viru najdeme nukleokapsidy, které jsou tvořené částmi jednoduchých RNA – šroubovic s negativně nabitou polaritou obklopené nukleoproteinem (NP – antigen). Těchto části v každém viru najdeme 8 nebo 7. Antigenní shift neboli zlom vzniká někdy výměnou za gen zvířecí (ptačí nebo prasečí) virů chřipky, tím vznikne nový subtyp a může dojít ke vzniku pandemie. Drift čili posun trochu zamění povrchové antigeny. Tím dojde k vzniku menší epidemie a dojde k proudění viru v populaci. [1,3,4]

2.1.3 Klinický obraz

Onemocnění virem chřipky má rychlý nástup, z plného zdraví náhle začne horečkou mezi 38 - 40˚C, kterou doplňuje zimnice, nepříjemná bolest kloubů a svalů a také velká únava pacienta. Někdy se může objevit bolest hlavy, dráždivý kašel, bolest za očima, atd. U oslabených osob může dojít ke komplikacím, které mohou vést až ke smrti pacienta, v podobě rozšířené chřipkové infekce do vnitřních orgánů (primární chřipková pneumonie, chřipková encefalitida), závažné bakteriální superinfekce (bakteriální tracheobronchitida nebo pneumonie) nebo strav plynoucí z prudkosti

infekce. Sekundární bakteriální infekce způsobují zejména stafylokoky, pneumokoky či Hemophilus inluenzae. Toto onemocnění postihuje všechny věkové skupiny. U kojenců a seniorů může dojít k závažné formě nemoci, jelikož kojenci nemají úplně vyvinutý imunitní systém a senioři ho mají oslabený. U těchto dvou skupin se může chřipka dostat až k zápalu plic či zánětu srdečního svalu. [1,5,6]

2.1.4 Příčiny vzniku epidemií a pandemií

Viry jsou bezjaderné mikroorganismy a velice rychle mutují. Díky mutacím dočasně naruší imunitní systém, který má vytvořené protilátky proti určitému druhu, ale ne proti mutacím, které vznikají. Proto imunitní systém potřebuje nějaký čas, aby si vytvořil nové protilátky. U virů dochází k tzv. bodovým mutacím a podle jejich rozlohy je označujeme jako drift a shift. K malým mutacím v genetické informaci dochází u driftu. Jde o změny na H proteinu, který umí imunitní systém rozpoznat. U těchto virů může dojít k reinfekci, i když osoby chřipku již prodělali. Větší změna probíhá u shiftu, který mění povrchové antigeny. Mnohdy jde o mezidruhové rekombinace virů, ty jsou pak původci velmi rozsáhlých pandemií. Proto je nutné tyto změny sledovat, aby mohlo dojít k výrobě nových vakcín. Ty se vyrábí podle toho, jaký typ viru se předpokládá pravděpodobný v další sezóně chřipky. [4]

2.1.4.1 Chřipková epidemie

Pokud je evidováno minimálně 1600 nakažených na 100 000 obyvatel, tak je vyhlášena epidemie. Při těchto epidemiích dochází i k úmrtí některých nemocných. Nejčastěji jsou to lidé, kteří mají poruchy imunity nebo nějaké závažné onemocnění. Hlavní hygienik vyhlašuje chřipkovou epidemii. Na stránkách Státního zdravotního ústavu je možné sledovat stav vývoje chřipkových onemocnění.[4]

2.1.4.2 Chřipková pandemie

Postihuje velké skupiny lidí v různých státech i kontinentech. Pandemie nastává, pokud dojde k zřetelné mutaci viru a zvýšení jeho virulence. V roce 1918 – 1919 se z USA rozšířila pandemie Španělské chřipky, která dostala název podle státu, ve kterém byla nejvíce rozšířena. Ve Španělsku v jednom měsíci zemřelo asi 8 miliónů lidí. [4]

2.1.5 Terapie

V případě nekomplikované formy chřipky je doporučován klid na lůžku a symptomatická terapie, která spočívá v podání antipyretik, analgetik a antitusik. Je také velmi důležité dodržovat pitný režim. Při vysokých teplotách se doporučují chladivé obklady. Důležité je také doplňovat tělu potřebné vitamíny. Při ucpání dýchacích cest je možná inhalace solných a eukalyptových roztoků. Na rýmu můžeme použít nosní kapky. Pokud dojde k těžkému průběhu, je možné podat antivirotika amantadin nebo rimantadin, či modernější zanamivir a oseltamivir. Jako prevenci lze podat vakcínu, která se většinou aplikuje už před obdobím hrozící epidemie. Musíme vybrat nejnověji vyrobenou vakcínu, která bude namířená proti aktuálnímu nebezpečnému subtypu viru. [1, 6]

2.1.6 Rozdíl mezi chřipkou a nachlazením

Příznak	Nachlazení	Chřipka
	Prevence očkováním není možná	Prevence očkováním je možná
teplota	méně často (obvykle do 38º C)	vysoká (i přes 39º C)
bolest hlavy	zřídka	výrazná
rýma	často	někdy
kýchání	často	někdy
kašel	mírný	suchý, dráždivý, vyčerpávající
bolest v krku	často	někdy
bolest kloubů a svalů	mírná	velmi výrazná
celková únava, slabost a vyčerpanost	mírná	výrazná od počátku nemoci, může přetrvávat 2 -3 týdny
komplikace	zánět, vedlejších dutin nosních, zánět středního ucha	zánět plic, zánět středního svalu, mohou ohrožovat život
léčba	jednoduchá a krátkodobá	může být komplikovaná a dlouhodobá

Tabulka 2 Rozdíl mezi chřipkou a nachlazením [4]

2.2 Respirační syncyciální virus

2.2.1 Charakteristika

Patří do rodu Pneumovirus a je pro člověka patogenní. U velmi malých dětí je nejvýznamnějším původcem infekce dolních cest dýchacích. Nemocí jsou zasaženy děti, které jsou postiženy bronchopulmonální dysplasií a neuromuskulárním postižením. Vytváří syncycia, která jsou tvořena z mnohojaderných infikovaných buněk. Virus je velmi nestabilní a tvarově rozmanitý. Velikost je různá, od 150 až 300 nm. Od ostatních

paramyxovirů se liší tím, že spirála nukleokapsidy uvnitř virionu je užší a malé výběžky na povrchu obalu nemají hemaglutinační ani neuraminidasovou aktivitu. Výběžky obsahují protein F, ten odpovídá za splynutí napadených buněk, glykoprotein G, který zajišťuje přilnutí virionu na buněčné receptory a hydrofobní protein SH, u kterého neznáme jeho funkci. Hlavními antigeny jsou proteiny F a G, protilátky proti těmto antigenům chrání organismus před nákazou. Protein M je pod obalem. Replikasu RNA tvoří čtyři proteiny (N, P, L a M2) a s genomovou RNA tvoří nukleokapsidu. Virus je velmi náchylný a špatně se uchovává.[1,3]

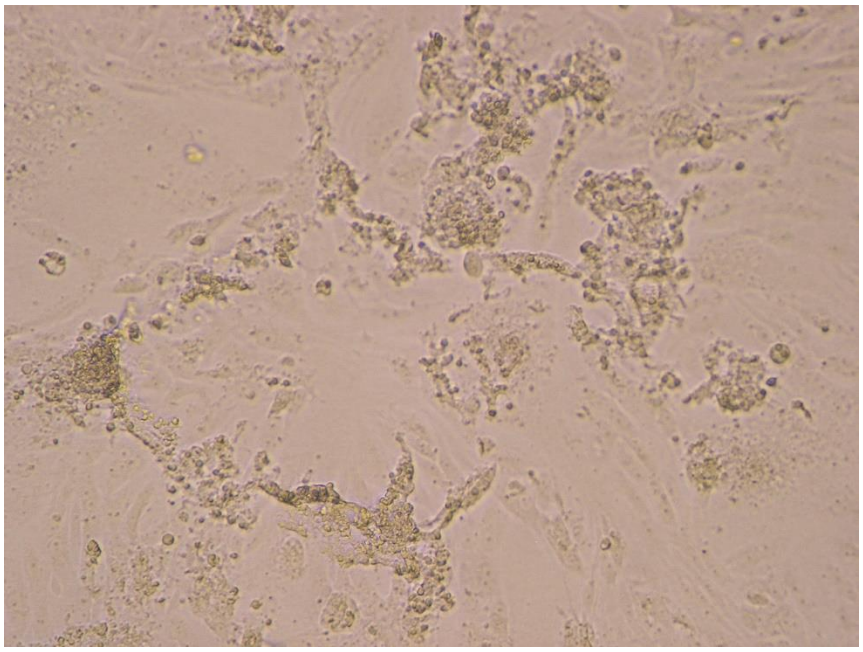
2.2.2 Klinický obraz

V prvních měsících života je velmi významným patogenem dolních cest dýchacích. V nosohltanu začíná jeho zmnožení a více jak v 50 % případů zůstane infekce v části horních dýchacích cest. Při vdechnutí nakaženého sekretu proniká do dolních cest dýchacích a šíří se do ostatních buněk. Tvoří soubuně, které umožňují šíření viru a odolnost proti protilátkám. Nákazy probíhají většinou v zimních měsících, objevují se jak v nemocnicích, tak různě komunitně. Zdrojem nákazy je člověk a je přenášena kapénkami a infekčníma rukama. Průběh je nejhorší u kojenců v období mezi 2. – 7. měsícem života. Respirační syncyciální viru začíná většinou jako normální nachlazení a projevuje se postižením horních cest dýchacích včetně zánětu středního ucha u velké části dětí. Pouze v závažných případech zhoršuje kašel a sípavé dýchání, což vede k dyspnoi, tachypnoi a cyanóze. U imunodeficitních dětí může nemoc skončit jako bronchiolitis nebo intersticiální pneumonie. I po skončení nemoci mají děti většinou poškozené dýchací ústrojí, dochází k opakovanému kašli, špatné ventilaci plic, pískání na hrudníku a někdy k rozvinutí bronchiálního astmatu. U starých lidí způsobuje respirační infekce a těžké pneumonie. Z nazofaryngeálního sekretu, aspirátu nebo bronchoalveolární laváže můžeme určit původce viru, nejčastěji metodou PCR. Pomocí sérologie můžeme udělat nepřímý průkaz. [1,3,5,7]

2.2.3 Terapie

Jako léčba se zatím doporučuje nespecifická podpůrná péče. Dále pasivní imunizace a podání ribvirinu v aerosolu. Intravenózní lidský imunoglobin nebo

humanizované[1] myší monoklonální protilátky proti proteinu F se podávají jako pasivní imunizace. [3]



Obrázek 2 Průkaz Respiračního syncyciálního viru pomocí fluorescence v tkáňové kultuře VERO

2.3 Rhinoviry

2.3.1 Charakteristika

Patří mezi pikornaviry, které jsou specifické pro dýchací ústrojí, z řeckého *rhinos* – nos. Jsou nebezpečné pouze pro lidskou populaci, nemnoží se ve střevě a při pH nižším než 6 jsou inaktivovány. Jsou stabilní při teplotě mezi 24 – 37 ˚C, v nosním sekretu i po zaschnutí vydrží být infekční i několik dní. Lidských antigenních typů rhinovirů je velmi mnoho, zatím byly popsány serotypy 1A, 1B a 2 – 100. Obtížně se kultivují a pro úspěšnou kultivaci je třeba napodobit situaci nosní sliznice. U lidské populace vyvolávají více než polovinu případů infekční rýmy, tedy běžného nachlazení. Někdy u malých dětí a starších lidí můžou vyvolat záněty bronchů a plic. Sliznice nosohltanu je pro ně vnímavější než sliznice dolních cest dýchacích. [3]

2.3.2 Klinický obraz

Je to nejběžnější akutní infekce u člověka a může minimálně za 50% případů onemocnění. Vysoký obsah virů nalezneme v nosním sekretu. Šíří se vzdušnou cestou

[1]Huminizace znamená, že naroubujeme místo na myší monoklonální protilátce, které rozpoznává F-antigen, na molekulu lidského imunoglobulinu.

pomocí kapének při kýchání, rukama nemocných a jinými kontaminovanými předměty v okolí nemocného. Nejčastěji se rýma objevuje v zimních měsících, zejména děti jsou vnímavější a infekce se u nich objevuje několikrát do roka. Díky mnoha existujícím sérotypům je velmi těžké vyvinout vakcínu. [3]

2.4 Koronaviry

2.4.1 Charakteristika

Jsou to obalené RNA – viry oválného tvaru se spirální symetrií, které jsou středně velké asi 100 – 150 nm. Jsou lemovány velkými výběžky, takže někomu mohou připomínat pod mikroskopem květ s korunou okvětních plátků. Glykoprotein S, který má řadu biologických funkcí a váže se na buněčné receptory, tvoří tyto výběžky. Někdy glykoprotein S může za splývání infikovaných buněk, někdy navozuje fusi virového obalu s buněčnou membránou a zajišťuje vznik neutralizačních látek i buněčné imunity. Někdy můžeme naleznout malé výběžky, které jsou tvořeny glykoproteinem HE. Ten se váže na kyselinu neuraminovou na buněčné membráně, čímž odpovídá za virovou hemaglutinaci a hemadsorpci. Lipidovou dvojvrstvu proplétá glykoprotein M. Spirála nukleokapsidy je uložena uvnitř virionu, ta obsahuje fosfoprotein N, který nukleokapsidu ve spojení s glykoproteinem M stabilizuje. Jsou citlivé k vnějším podmínkám a většinou jsou dezinfekčními prostředky usmrceny.[3]

2.5 Virus Parainfluenzy

2.5.1 Charakteristika

Lidské viry parainfluenzy 1 a 3 patří do rodu Respirovirus. Název je odvozen podle toho, že vyvolává respirační infekce, ale je rozdílný od virů chřipky a začal se používat v 50. letech. Parachřipkové viry se mění pomalu a né tak jako virus chřipky. V těle se obvykle množí ve vstupní bráně infekce, tedy na sliznici dýchacího traktu a odtud se i poté vylučují. U dospělých osob většinou probíhá mírně. Za vznik neutralizačních protilátek jsou zodpovědné protekční antigeny, které tvoří proteiny HN a F. Sekreční protilátky IgA jsou velmi důležité, aby nedošlo k reinfekci. Protilátky IgA často u malých dětí selhávají, a proto u nich častěji dojde k reinfekci. V dětském věku působí různorodé respirační infekce, jde o lehké horečnaté katary dýchacích cest až o těžké stavy, jako croup (stenozující laryngotracheitis), bronchitis, bronchiolitis a pneumonie. Pneumonie je častější u typu 3. U dospělých jde většinou o lehké

nachlazení bez zvýšené teploty. U imunosuprimovaných nemocných může být průběh vážný až smrtelný. Jediným zdrojem tohoto onemocnění je člověk a přenáší se kapénkami. Funkční vakcína proti parachřipce dosud nebyla vyrobena.

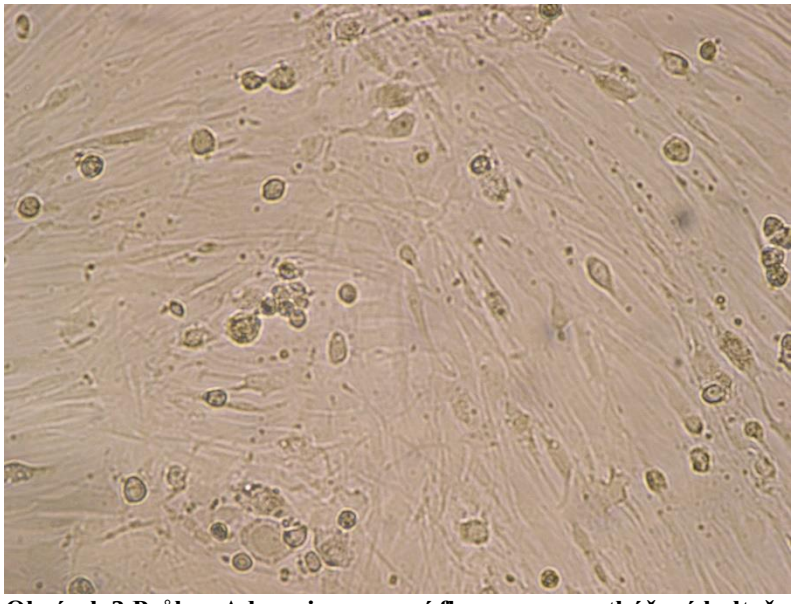
Virus parainfluenzy 2, 4a a 4b patří do rodu Rubulavirus spolu s virem příušnic. Do této skupiny byly přeřazeny na základě rozdílu v genomu, i když se typům 1 a 3 podobají. Tyto typy parachřipky jsou méně patogenní a typy 4a a 4b se vyskytují spíše vzácně. U dětí je někdy typ 2 častějším původcem croupu. [1,3,7]

2.6 Adenoviry

Jsou zařazovány mezi respirační viry, avšak jejich chování v lidském těle je jiné. Mají pestré klinické projevy díky tomu, že snadno přilnou k různým druhům sliznice a vnitřním lidským orgánům. Lidský adenovirus je spojen s 7 až 8 % případů všech identifikovaných virových příčin akutních onemocnění horních cest dýchacích, hlavně u dětí mladších pěti let. [1,3,8]

2.6.1 Charakteristika

Byly objeveny v roce 1953 Rowem v chirurgicky odnětích adenoidních tkáních. Jsou to DNA viry, které nemají obal. Mají střední velikost a jsou poměrně stabilní. V dnešní době známe asi 51 typů antigenních adenovirů. Tento virus se šíří kapénkami, stolicí, z oka do oka kontaminovanými ručníky, rukama a očními kapkami. Infekce horních cest dýchacích u malých dětí je způsobena především typy 1, 2, 5 a 6, které mají afinitu k lymfatickým tkáním, hlavně Waldeyerova lymfatického okruhu. [1,3]



Obrázek 3 Průkaz Adenoviru pomocí fluorescence v tkáňové kultuře LEP

3 NOVÉ VIROVÉ RESPIRAČNÍ INFEKCE

Díky očkovacím programům jsou tradiční infekční choroby na ústupu, ale objevují se nové patogeny, které pocházejí ze zvířecích rezervoárů a postupně se začínají adaptovat na lidskou populaci. Tyto nové respirační infekce nejčastěji vyvolávají různé RNA viry. Antivirotika působí je na malou část virů a příprava očkovacích vakcín je zdlouhavá a drahá, je jedinou nadějí pro odvrácení epidemie zničení nebezpečných patogenů dříve, než se přizpůsobí. To znamená epidemiologickou bdělost, kterou zajišťují národní i nadnárodní programy, izolace nakažených osob a také vymýcení zvířecího rezervoáru v místě, kde byl zjištěn nový výskyt. Pacienti s podezřením na nákazu nebezpečným onemocněním musejí být izolováni na oddělení, které je vybaveno ochrannými prostředky na úrovni BSL 3 – 4 (biosafety level 3 – 4). Oddělení musí mít speciální stavební úpravu kvůli bariérovému systému ošetřování a filtrovací zařízení, aby nedocházelo k úniku kontaminovaného vzduchu. [6]

3.1 MERS CoV - Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus

Jde o formu koronaviru, který patří do rodu Betacoronavirus stejně jako virus SARS. Jde o respirační virové onemocnění, které bylo v roce 2012 poprvé identifikováno v Saudské Arábii. Projevuje se stejně jako běžné nachlazení, ale někdy i multiorgánovým selháním. Typickým projev onemocnění je horečka, kašel a dechové obtíže. Někdy může být přítomna pneumonie a poměrně časté jsou i gastrointestinální příznaky. Okolo 36 % nahlášených případů následkem onemocnění zemřelo. Většinou je nákaza způsobena lidskými zdroji, avšak velbloudi představují podstatný rezervoár. Jde tedy o zoozónu, ale není jednoznačné, že za nákazu mohou zvířecí původci (velbloud, netopýr). Mezi lidmi se tento virus šíří pouze velmi blízkým kontaktem. V roce 2013 se virem nakazilo 49 lidí, z toho 27 onemocnění podlehlo. V České republice se v tomto roce nevyskytl žádný případ nákazy tímto virem. Další nákaza se objevila poté v roce 2014. První úmrtí bylo v Íránu a poté bylo hlášeno, že následkem viru zemřelo již 187 nakažených, tento počet byl později upřesněn na 282 lidí. Do května roku 2015 bylo virem infikováno 1250 lidí a z toho 450 lidí nemoci podlehlo. Nákaza se rozšířila do Jižní Koreje ze zemí blízkého východu. V České republice byl v nemocnici na Bulovce 16. června hospitalizován první pacient, u

kterého měli lékaři podezření na toto onemocnění. Po vyšetření zjistili, že nejde o MERS – CoV. V primární fázi je velmi těžké nemoc diagnostikovat, jelikož začíná stejnými příznaky jako nachlazení a teplotou kolem 38º C. Poté dojde k vážnému onemocnění plic a může způsobit i akutní selhání ledvin. Letalita neboli smrtnost je u této nemoci velmi vysoká. K smrti dojde až u 50% nemocných. Zatím pro nikdy neobjevil pro toto onemocnění žádný lék. [9,10]

3.2 SARS – Severe Acute Respiratory Syndrome

Toto onemocnění bylo poprvé zjištěno v roce 2003 v Číně. Poté téhož roku v jihovýchodní Asii došlo k rozsáhlé epidemii, která zasáhla více než 8000 lidí. Také v Kanadě došlo k menší epidemii. Jen díky drastickým opatřením se podařilo epidemii zastavit. Šlo například o zabíjení drobných šelem, u kterých se předpokládalo, že jsou zdrojem nákazy. Onemocnění vzniká díky novému viru, který patří mezi koronaviry, jde o SARS – CoV. Nejdříve jsou zasaženy pneumocyty a poté další orgány (ledviny, střeva, atd.). Tento syndrom se přenáší aerosolem z dýchacího traktu, ale i ze stolice a moči. Inkubační doba je zhruba 2 – 10 dní od styku s infekční agens. [6]

3.3 Ptačí chřipka

Patogenem ptáků je hlavně virus chřipky A. Rezervoár nových antigenních variant viru se objevuje u mnoha různých divoce žijících druhů a i u domácích ptáků. V roce 1997 byly zjištěny důkazy o možnosti přímého přenosu viru z ptáka na člověka. V jihovýchodní Asii došlo k mutaci kmenů chřipky H5N1 (H7N7, H9N2) mezi divokým a domácím ptactvem. U lidí, kteří byli s nemocnými ptáky v přímém kontaktu, došlo k onemocnění. Avšak přenos z člověka na člověka je velmi ojedinělý, pouze u osob, které byli s nemocnými v přímém kontaktu a nepoužívali ochranné pomůcky. Příznaky se podobají klasické chřipce a navíc se objevuje nausea, zvracení a průjem. U těžkého průběhu, který někdy vede až ke smrti nemocného, se na stav projeví primární chřipková pneumonie nebo selhání více orgánů. Ptačí chřipku rozdělujeme na dva typy podle charakteru onemocnění. První typ je vysoce patogenní ptačí chřipka HPAI[2] a druhým je nízkopatogenní ptačí chřipka LPAI[3]. Typ HPAI se velmi rychle šíří a způsobuje závažné onemocnění, které velmi často vede k úmrtí nemocného. Mortalita

[2] HPAI – highly pathogenic avian influenza
[3] LPAI – low pathogenic avian influenza

někdy může dosahovat až 100 % do 48 hodin. Druhý typ vyvolává spíše mírné onemocnění, pacient často ani neví, že neměl normální chřipku. Patogenita u HPAI je velmi vysoká a je to způsobeno přítomností receptorů u vnímavého zvířete a virový hemaglutinin je rozkládán nespecifickými proteázami. Zatímco LPAI jsou štěpeny specifickými proteázami, proto je virových partikulů, které se přichytávají k receptoru, velmi málo. V současnosti je nejznámější virus H5N1, který patří k vysoce patogenním formám a hemaglutinin je také štěpen nespecifickými proteázami. U lidí najdeme receptor pro H5N1 až v terminálních bronchiolech, takže průnik nákazy je velmi obtížný. Pacient, u kterého je podezření na nákazu ptačí chřipkou, musí být léčen v izolačním režimu BL 3. Jako prevence se používají přísná protiepidemiologická opatření, které spočívají ve vybití nakažených chovů drůbeže, a tím odvrácení lidské pandemie. [1,6]

PRAKTICKÁ ČÁST

4 CÍLE PRÁCE

Cílem mé práce je popsat možnosti diagnostiky respiračních virů. V práci bych chtěla popsat vyšetření respiračních virů pomocí přímého a nepřímého průkazu. Nejvíce bych se chtěla zaměřit na vyšetření viru chřipky. Dále bych chtěla graficky znázornit chřipkovou sezónu 2015/16 podle informací zjištěných na Ústavu mikrobiologie FN Plzeň na Oddělení Virologie.

5 ZÁSADY VIROLOGICKÉ DIAGNOSTIKY

5.1 Výběr vhodné metody pro diagnostiku

U některých virových onemocnění není diagnostika třeba, jelikož mají typický průběh, podle kterého je velice jednoduché určit, o jaké onemocnění jde. Ale často se projevy onemocnění u některých osob liší, proto je důležité zjistit, o jaké virové onemocnění jde. Virologická diagnostika je důležitá spíše pro celou společnost, jelikož slouží spíše k epidemiologickým účelům a rozšiřuje povědomí o virových infekcích. Doporučení k virologickému vyšetření je tedy spíše za účelem epidemiologickým a z části výzkumným. V současné době se velice často virologická diagnostika využívá u pacientů, kteří mají virové onemocnění, aby lékař zjistil, jaká antivirotika může nasadit. A to zejména u imunosuprimovaných a polymorbidních pacientů. [11]

5.2 Nepřímý průkaz

Toto vyšetření není pro pacienta zatěžující a je lepší i pro personál a laboratoř. Vyšetření nepřímým průkazem je levnější, rychlejší a jednodušší. Ale nevýhodou je, že výsledek je k dispozici obvykle až po vyšetření druhého vzorku séra. Výsledek tedy není úplně přesný a nemůžeme se podle něj řídit. Dá se použít pouze, jestliže má laboratoř vhodné antigeny do serologického vyšetření. Nepřímý průkaz lze použít u respiračních infekcí, neuroinfekcí, exanteatických a ostatních infekcí. [11]

5.3 Přímý průkaz

Skoro ve všech případech, až na některé výjimky, je indikován i přímý průkaz. Je velmi důležité, aby odběr pro přímý průkaz proběhl na začátku onemocnění. Platí to v případě hepatitidy B, virů chřipky, virů parainfluenzy, atd. Například u virových průjmů je indikován pouze přímý průkaz. [11]

5.4 Doporučený postup odběru biologického materiálu pro diagnostiku respiračních virů

5.4.1 Postup při odběru nazofaryngeálního výtěru

Materiál vhodný pro odběr je výtěr nosohltanu, aspirát tracheální, bronchiální, bronchoalveolární laváž nebo tkáň z pitvy (plíce, trachea). Veškerý materiál pro odběr biologického materiálu musí být sterilní. Odběrová souprava se skládá ze dvou

vatových tampónů, záznamové karty a zkumavky s virologickým odběrovým sérem. Médium pro odběr se musí uchovávat v mrazničce při teplotě -20 ± 5º C. Před odběrem je nutné médium rozmrazit. Médium poskytované NRL[4]se skládá z PBS[5] o pH 7,4, 2% roztok BSA[6] a antibiotika. Pro chřipkové a nechřipkové respirační viry NRL doporučuje 2000 j/l penicilinu, 1000 µg/ml streptomycinu a 25µg/ml amphotericinu. Média, která se dodávají komerčně, musí mít podobné složení. V prvních třech dnech od rozvoje klinických příznaků, tj. v akutní fázi infekce, má odběr největší výtěžnost. Proto je velmi důležité znát začátek onemocnění. Nejdéle lze však výtěr provést maximálně do sedmi dnů od zjištění klinických příznaků onemocnění. Výtěr je nejlepší provést po ránu nalačno. Před výtěrem nesmí být použity kloktadla a jiné dezinfekční prostředky, protože by mohly vyšetření zkreslovat. To můžou způsobit i zubní pasty. Pacient před výtěrem zakašle a jedním vatovým tampónem provedeme stěr zadní stěny nosohltanu krouživým pohybem, abychom setřeli co nejvíce epiteliálních buněk. Nemělo by se vatovým tampónem dotýkat mandlí. Po provedení výtěru vložíme tampon do virologického odběrového média a špejli zlomíme o okraj zkumavky. Druhým vatovým tampónem vytřeme nosní dírky, špejli opět vložíme do zkumavky a zlomíme asi v polovině o okraj zkumavky. Oba tampóny vkládáme do stejné zkumavky, tento materiál slouží k PT PCR a poté i pro izolaci viru, příp. detekci virového antigenu. Do záznamové karty musíme přesně zapsat údaje o pacientovi, tj. jméno, rodné číslo, kód zdravotní pojišťovny, všechny symptomy onemocnění, dosavadní léčbu, jméno, odbornost a IČZ odesílajícího lékaře a telefon. Materiál se nesmí zmrazit, ihned ho uložíme do chladničky o teplotě +2 až + 8º C. Výtěr by měl být co nejdříve po odběru transportován do laboratoře a to při teplotě +2 až + 8º C, je tedy nutné použít chladící termobox. Doba od odběru do přijetí do laboratoře nesmí přesáhnout 48 hodin. [12]

5.4.2 Postup při odběru sekčního materiálu

Odběr biologického materiálu z pitvy provádíme co nejdříve po úmrtí, nejdéle do 24 hodin od smrti. Jestliže nalezneme hemorhagickou tracheitidu provedeme stěr z více nakažených míst a uložíme do virologického odběrového média. Poté malou část trachey se slizní, asi 1x1 cm, vložíme do šroubovací odběrové zkumavky

[4] NRL – Národní referenční laboratoř
[5] PBS – Phosphate Buffered Saline neboli fosfátový pufr
[6] BSA – Bovine Serum Albumin neboli hovězí sérový albumin

s virologickým médiem. Pokud máme k dispozici marginální zónu pneumonického ložiska také uložíme do média. Pro vzorky z pitvy platí stejný způsob transportu i uskladnění. [12]

6 PŘÍMÝ PRŮKAZ RESPIRAČNÍCH VIRŮ

V odebraném biologickém materiálu hledáme přítomnost infekčního angens. To lze identifikovat elektronmikroskopicky, kultivačně, imunologicky nebo geneticky.

6.1 Kultivace na tkáňových kulturách

6.1.1 Odběrová média

Média pro odběr je nutné připravit. Universální médium na chřipku i ostatní virózy je s 0,5 % želatiny, které se připravuje pomocí 20 % želatiny. Tu připravíme smícháním 2g želatiny a 8 ml redestilované vody. Vložíme do autoklávu 1at./20 minut. Takto připravenou želatinu uchováváme v lednici a před použitím rozehřejeme ve vodní lázni. Poté smícháme 97,5 ml E-MEM[7], 2,5 ml 20 % želatiny a přidáme 1 ml PNC[8] s 200 000 j. PNC a 1 ml GNT. Směs poté rozpipetujeme do odběrových zkumavek po 4 ml, médium vydrží v mrazáku při -20º C asi 3 měsíce. [13]

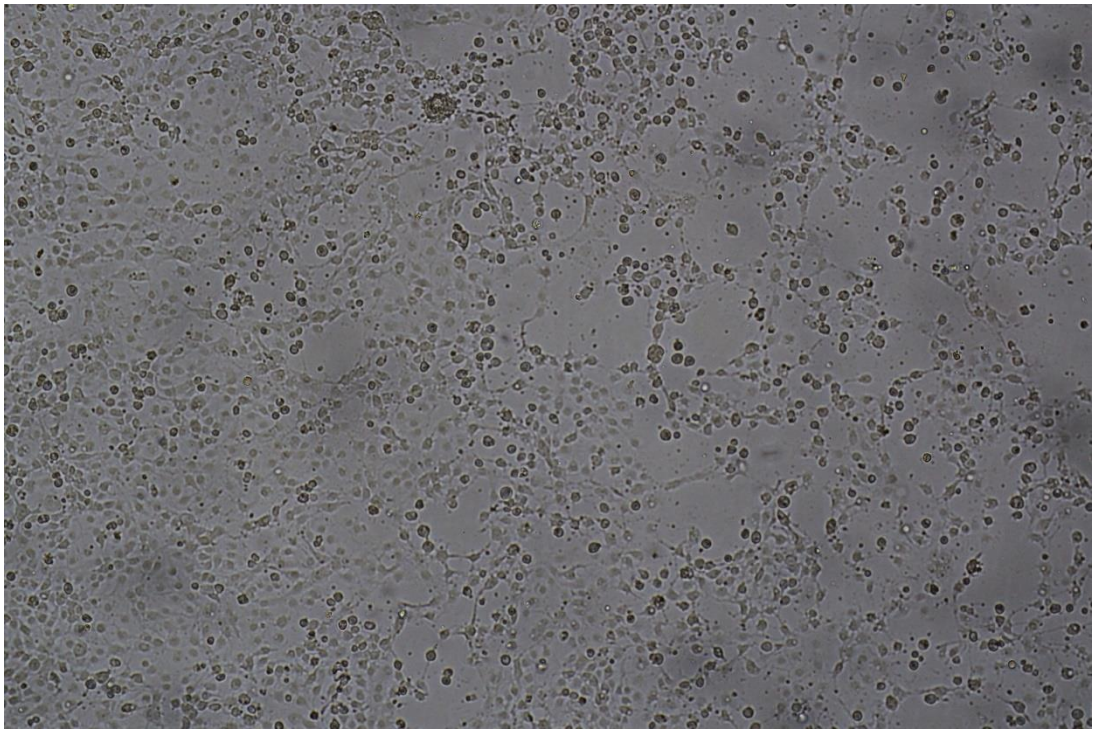
6.1.2 Tkáňové kultury

- LEP (lidské embryonální plíce) – jde o fibroblastoidní diploidní buňky, které jsou izolovány trypsinací lidských embryonálních plic. Plíce jsou získány z lidských plodů zdravých žen při interrupci. Kultury jsou konzervovány v tekutém dusíku a jsou namnoženy do 5. pasáže. V této pasáži se provádí chromosomální vyšetření a test na mykoplasmata. Takto vytvořené konzervy lidských diploidních buněk jsou výchozím materiálem pro expedici kultur LEP. Tyto kultury rostou v monolayerech. Médium se připraví smícháním MEMD[9]s 10 % FTS[10]. Buněčná populace se pasážuje v poměru 1:2 a dosahuje density $3x10^4/cm^2$. Kultivační teplota je 37º C. Pasáž provedeme trypsinisací. Toto médium se hodí pro respirační viry, ale ne pro viry chřipky. Populace LEP může být použito pouze do 20 pasáže, poté se jeho citlivost k virům velmi snižuje.
- MDCK – je to stabilní kultura, která je izolována z ledviny normálního zdravého kokršpaněla. K první takto provedené izolaci došlo v roce

[7] E-MEM - Minimální Esenciální Médium
[8] PNC – zkratka pro antibiotikum Penicilin
[9] MEMD – Dulbekovo modifikované Eaglovo médium
[10] FTS – Fetální telecí sérum

1958. Je to jedna z nejlépe charakterizovaných epiteloidních buněčných linií. Tato linie se udržuje v kultuře více než 37 let, současná buněčná populace se stále původní populaci podobá. Buňky rostou v monoleyeru. Médium se připraví smícháním MEMD s 5 % FTS. Buněčná populace se pasážuje v poměru 1:3 až 1:6, aby dosáhla density 2-4x10^4/cm^2. Kultivační teplota je opět 37º C a pasáž se provádí trypsinizací. Jedna pasáž trvá 10 dnů. Tato tkáňová kultura se používá pro viry chřipky.

- VERO – stabilní buněčná linie z ledvin afrického kočkodana zeleného (green monkey). Tyto buňky mají fibroblastoidní charakter a rostou pevně přichyceny ke kultivačnímu substrátu. Příprava média probíhá smícháním MEMD s 10 % FTS. Pasáž probíhá stejně jako u MDCK. Tato kultura se používá pro vyšetření respiračního syncyciálního viru. [13]



Obrázek 4 Na tkáňové kultuře MDCK virus chřipky B

6.1.3 Práce s buňkami

Nasazování buněk

a) Trypsinování – pro tkáňové kultury LEP, MK2 a VERO používáme trypsin v PBS nebo trypsin-versen. Pro tkáňovou kulturu MDCK používáme pouze trypsin-versen. Dobře narostlou tkáňovou kulturu promyjeme sterilním PBS, přidáme 0,15% - 0,20% trypsin v PBS trypsin-verzen dle druhu buněk

- Skleněné kultivační nádoby

  Nahřejeme nad plamenem opačnou stranu zkumavky nebo lahve než jsou buňky. Kontrolujeme teplotu rukou. Opatrným kolíbáním omýváme tkáň. V tu chvíli kdy se začne tkáň uvolňovat, tak slijeme zbytek trypsinu a lahví zatřepeme o dlaň.

- Umělohmotné kultivační nádoby

  Omyjeme celou plochu monomeru trypsinem, slijeme nadbytek a opakujeme ještě jednou. Nádobu se zbytkem trypsinu dáme do termostatu, každých pět minut kontrolujeme a vždy lahví zatřepeme od dlaň.

  Když se uvolní celý buněčný list, tak přidáme část růstového média, opláchneme buňky a rozvolníme pipetou. Přeneseme suspenzi buněk do celkového množství růstového média a láhev ještě jednou propláchneme. Zamícháme buňky v celém médiu a rozpipetujeme dle potřeby. Množství buněk při nasazování určujeme buď přesně, tj. počítáním, a nebo přibližně dle zkušenosti. Na tkáňovou kulturu LEP použijeme asi 500 000 buněk, na MK2 a VERO asi 1 000 000 buněk.

b) Buněčné suspenze dodané výrobcem buněčných kultur – změříme objem dodané suspenze buněk válečkem, rozvolníme pomocí pipety a spočítá množství buněk v 1 ml.

- Počítání buněk: 0,1 ml suspenze si odpipetujeme do zkumavky, k tomu přidáme 0,2 ml 0,5 % vodního roztoku tropanové modři, po 10 minut počítáme v Bürkerově komůrce (2x9 velkých čtverců, tj. obě části komůrky) a z toho uděláme průměr. Počítají se pouze neobarvené buňky. Shluky do 3 buněk počítáme jednotlivě, větší shluky jako jeden kus. Výsledek počítání krát 10 000, děleno třemi nám dá počet buněk v 1 ml. Naředíme suspenzi buněk růstovým médiem, aby v 1 ml bylo 100 000 buněk, a rozplníme do kultivačních nádobek. Kultivační nádoby popíšeme a dáme do termostatu 37º C.

c) Výměna média – normálně tkáň plně naroste zhruba za 3 – 7 dní, to se odvíjí od množství nasazených buněk a od charakteru tkáňové kultury. Výměnu provádíme po nárůstu monoleyru. Odsajeme růstové médium a vyměníme ho za médium udržovací, použijeme stejné množství jako u růstového média. Poté do zkumavek, které budeme následně infikovat, dáme tolik udržovacího média, aby s infikujícím materiálem bylo ve zkumavce 1, 5 ml.

d) Infikování – materiál pro vyšetření musíme skladovat, dokud není vyšetření dokončeno. Z biologického materiálu si musíme vytvořit suspenzi. Z hutného

materiálu, např. stolice, připravíme 10-20 % suspenzi v odběrovém médiu. 10% suspenze vznikne smícháním 0,4 g stolice s 4 ml média. Suspenzi tvoříme ve zkumavkách pomocí skleněných perliček, do zkumavky dáme asi 1,5 cm. Třepeme na třepačce 15 minut a na noc uložíme do mrazáku. Druhý den suspenzi centrifugujeme při 8000 – 10 000 otáčkách půl hodiny. Z ostatního hutného materiálu, jako je pitva či biopsie, vyrábíme suspenzi v třecí misce pomocí mořského písku či skla. Podle potřeby můžeme suspenzi zmrazit nebo hned centrifugovat. K infikování používáme supernatant[11]. Tekutý materiál smícháme v poměru 1:1 s odběrovým mediem. [13]

6.2 MDCK izolace chřipky

6.2.1 Nasazení buněk

100 000 buněk smícháme s 1 ml růstového média E-MEM, které připravíme smícháním 5% TS, 1% PNC, 1% Genta, 1,25 % Amphotericinu 1000j. Po nárůstu buněk vyměníme medium na udržování, tj. GAP – MEM, které připravíme smícháním 2% TS a antibiotik. [14]

6.2.2 Infikování

Po příjmu materiálu začneme infikovat. Tkáňovou kulturu, která je plně narostlá na zkumavkách, dvakrát opláchneme PBS a nainfikujeme 3-4 zkumavky dávkou asi 0,1 ml materiálu. Absorbujeme 20 minut při pokojové teplotě na nízkém platu. Poté se přidá 1 ml média, které je připraveno ze 100 ml E-MEM, 0,2-0,33 ml 0,15% trypsinu, 1 ml Genta, 1 ml PNC a 0,125 ml Amphotericinu 1000j./ml. Poté inkubujeme při 34ºC. Jestliže buňky vydrží v dobrém stavu 10 dnů, tak se nemusí pasážovat. Pokud ne, je třeba pasážovat 2x-3x, aby se dodrželo kultivace 10 dní. [14]

6.2.3 Pasážování

To provádíme dvakrát za týden a to v pátek a úterý. Hustota suspenze se musí upravit podle kvality buněk a času, který máme na nárůst monoleyru. Používá se 0,2% roztok trypsinu ve versenu. Vzorek se musí přemrazit v -70º C, poté se slije a očkuje se

[11] Supernatant – tekutina nad sedimentem

dávkou 0,2-0,33 ml na 3 nové zkumavky. Používá se médium bez trypsinu, médium s trypsinem se používá při infikování. [14]

6.2.4 Příprava krvinek na průkaz viru

Na výrobu použijeme MK krvinky, tedy morčecí krvinky nebo lidské krvinky krevní skupiny 0 Rh negativní. Krvinky stočíme v centrifuze 10 minut při 3000 otáčkách, třikrát promyjeme ve fyziologickém roztoku. Slijeme a ve fyziologickém roztoku promícháme sediment, tím si připravíme 5% krvinky. Před hemaglutinačním testem připravíme 0,5 % roztok krvinek ve fyziologickém roztoku. [14]

6.2.5 Průkaz viru

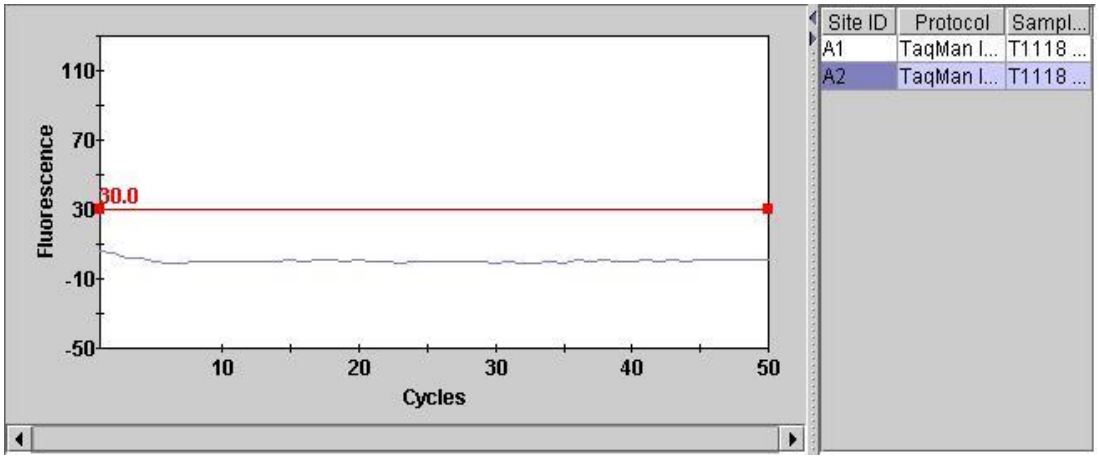
Provádí se 3., 6. a 10. den kultivace. Médium z kultivačních zkumavek slijeme do pomocné špičaté zkumavky. Dáme je do stojánku a za ně dáme řadu aglutinačních zkumavek. Do aglutinačních zkumavek dáme 0,2 ml fyziologického roztoku a přidáme 0,2 ml slitého média z pomocné zkumavky. Poté napipetujeme 0,4 ml 0,5 % krvinek a protřepeme. Při použití morčecích krvinek inkubujeme 1, 5 hodiny a při použití lidských 45 minut. Zároveň zpracováváme negativní kontrolu z media slitého z nenainfikovaného monoleyru MDCK. Do slitých zkumavek nalijeme 1,1 ml chřipkového média. Při zjištění pozitivity odpipetujeme část média z pomocné zkumavky a uděláme imunochromatický test na průkaz antigenu Coris chřipka A, B. Nebo uděláme sklíčko z pozitivní kultivační zkumavky a odbarvíme na imunofluorescenci pomocí soupravy IMAGEN. Na destičce s jamkou V uděláme titraci antigenu (médium z pomocné zkumavky). [14]

6.2.6 Titrace antigenu

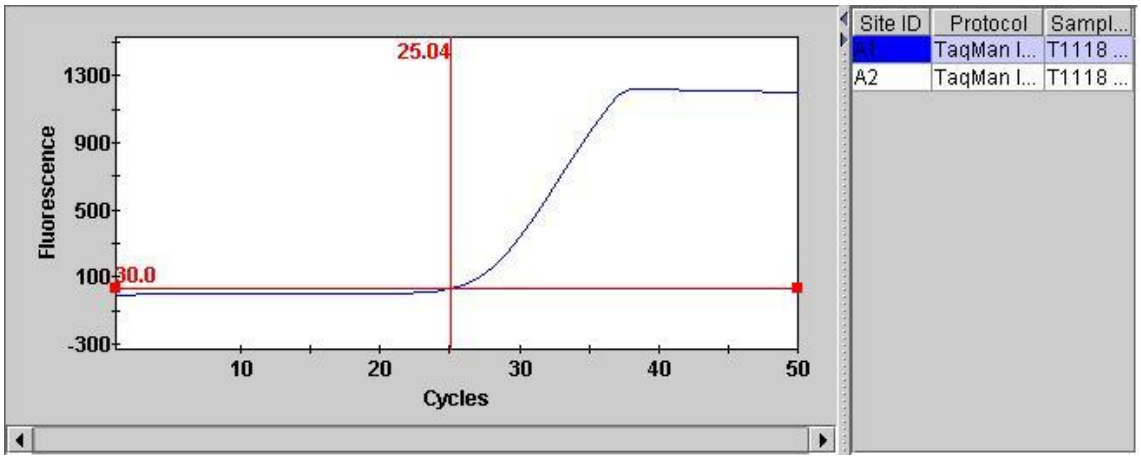
Od druhé jamky destičky nakapeme 0,05 ml fyziologického roztoku, do první a druhé jamky nakapeme 0,05 ml média z pomocné zkumavky. Rotatiterem s velkými kličkami rozředíme antigen. Přidáme 0,05 ml krvinek. Inkubujeme dle příslušných krvinek a přečteme titr antigenu. Při zjištěném titru 1:8 a výše, posíláme část média z pomocné zkumavky do NRL pro chřipku Praha na identifikaci. [14]

6.3 PCR – Polymerázová řetězová reakce

PCR z aglického Polymerase Chain Reaction. Jde o metodu rychlého a jednoduchého zmnožení úseku DNA, která je založena na principu replikace nukleových kyselin. Úsek DNA, který chceme zmnožit, neboli amplifikovat, musí být ohraničený primery. Primer je krátký oligonukleotid DNA. Z vzorového úseku DNA vznikne až milion kopií o maximální délce 10 tisíc nukleotidů. Aby syntéza vlákna mohla začít, je nutné použít termostabilní DNA polymerázu bakterie Thermus aquaticu, tedy Taq polymerázu. Celý proces probíhá v přístroji, který se nazývá termocykler. Tento přístroj je vyrobený tak, aby uměl během několika sekund zvýšit či snížit teplotu i o desítky stupňů Celsia. Na konci procesu PCR získáme veliké množství kopií původní sekvence DNA. PCR je velmi citlivá metoda, umí najít i jednu molekulu DNA ve vzorku. Proces PCR se skládá ze tří kroků a to z denaturace, nasednutí primerů a syntézy DNA. Při denaturaci se po dobu 20 – 30 sekund DNA zahřívá na teplotu 94 – 98º C. V tomto kroku dochází k porušení vodíkových můstků a rozvolnění dvoušroubovice DNA. Poté primery nasednou na jednovláknovou molekulu DNA. Teplota se sníží na 50 – 65ºC a tím dojde k nasednutí primerů na určitá místa DNA. Poté na dvouvláknové úseky DNA-primer nasedne DNA polymeráza. Posledním krokem je syntéza DNA. Teplota v této části je nastavena podle použité DNA polymerázy, nejvíce používaná Taq polymeráza, která má optimum aktivity při 78 - 80º C. Dojde k syntéze ve směru od 5´konce ke 3´konci přirůstá vlákno DNA komplementární k původní molekule DNA. Všechny tyto kroky se opakují cyklicky za sebou, nejčastěji je za sebou 30 cyklů, což postačí k namnožení původní molekule DNA. [15]



Obrázek 5 PCR



Obrázek 6 PCR

6.3.1 PCR Chřipka

Vzorky pro PCR s podezřením na chřipku před zpracováním uchováváme do dvanácti hodin od odběru v lednici a poté v boxu při -80ºC. [16]

6.3.1.1 Izolace

Při otevření nové izolační soupravy je nutná příprav reagencií. Poté si připravíme potřebný počet alikvótů roztoku AVL s RNA, který se musí před použitím nechat rozmrazit, zvortexovat a krátce centrifugovat. Nejdříve smícháme 560 µl AVL s RNA, které před pipetováním musíme opět zvortexovat, se 140 µl vzorku, to dohromady musíme 15s vortexovat a poté stočit na centrifuze. Inkubace probíhá 10 minut, po této době musíme vzorek opět zvortexovat a nechat stočit. Dále přidáme 560 µl ethanolu, který je 96 – 100 %, zvortexovat a stočit. Do popsané kolonky si přepipetujeme 630 µl suspenze, centrifugovat 8000 RPM/1min. Poté nádobku pod kolonkou vylít a do kolonky znovu napipetovat zbylých 630 µl a znovu centrifugovat. Nádobku pod kolonkou vyhodíme a kolonku dáme do čisté nádobky. Do kolonky přidáme 500 µl promývacího roztoku AW 1, poté opět zcentrifugovat a přendat do čisté nádobky. Poté do kolonky opět napipetujeme 500 µl promývacího roztoku AW 2, centrifugujeme na maximum 3 minuty a přendáme do čisté nádobky. Centrifugovat na maximum 1 minutu, čímž dojde k sušení a poté přendat do sterilní popsané 1,5 ml eppendorfky. Přímo na střed kolonky napipetujeme 60 µl AVE pufru, necháme inkubovat 1 minutu při pokojové teplotě a centrifugujeme 8 000 RPM/1 min. Nakonec kolonku odstraníme a k následné amplifikaci použijeme eluent v eppendorfce. Eluent je izolát RNA z vzorku pacienta. Mělo by se uchovávat do ukončení amplifikačního testu včetně případné typizace v lednici. Typizaci provádíme co nejdříve, nejlépe ten den.

Dlouhodobě skladujeme při -80º C včetně původního materiálu. Biologický materiál vyhazujeme až po ukončení tkáňové kultivace. [16]

6.3.1.2 Amplifikace

Před začátkem amplifikace je nutné si připravit reagencie, nejdříve si naředit primery, pokud je nemáme připravené v zásobních zkumavkách v mrazáku a připravit Master Mix, který se připravuje před každou samotnou amplifikací. MasterMix připravíme smícháním 12,5 µl RT PCR buffer, 5 µl Nucleasse-free Water a 1 µl RT PCR enzyme MIX. Na vlastní amplifikaci si připravíme dvě Smart zkumavky na každý vzorek, který jsou označené stejným identifikačním číslem, ale jsou odlišené písmeny R a I (podle přidávaných primerů). Do všech zkumavek napipetujeme 18,5 µl připraveného MasterMixu. Do zkumavek označených písmenem R přidáme 1,5 µl naředěného zásobního primeru R. Do zkumavek I dáme stejné množství naředěného primeru I. Do dvou zkumavek stejného čísla dáme 5 µl vyizolovaného vzorku RNA. Vše musíme před pipetováním zvortexovat a krátce centrifugovat. Při pipetování nutno měnit špičky, aby nedošlo ke kontaminaci vzorků. Po dokončení zkumavky centrifugujeme a vložíme do SMART CYCLERU dle připraveného pořadí v ranu. Výsledné hodnoty kontrolního (R) vzorku a indentifikačního (I) vzorku odečítáme ve FAM. K validnímu odečtení identifikačních vzorků je nutná pozitivita kontrolního (R), což je interní kontrola přítomnosti biologické RNA vzorku. Pokud není kontrolní vzorek pozitivní, je nutné opakovat izolaci, po opakované negativitě nutno opakovat odběr. [16]

6.3.2 Imunochromatografický test pro rychlou diagnostiku antigenu viru chřipky A a B v nasofaryngeálních výtěrech

Tyto testy jsou velmi málo citlivé, proto je důležité mít dostatečnou virovou nálož. Tento typ testu je určený pro rychlou orientační diagnostiku chřipky A a B v nasofaryngeálnzích výtěrech, aspirátech či buněčných supernatantech. Nejvyšší citlivosti je dosaženo v časné fázi onemocnění, tj. v blízké době od objevení příznaků. Test se skládá ze dvou proti sobě jdoucích stripů, jeden je pro typ A a druhý pro typ B. Princip testu je založen na imunochromatografickém systému. V jednotlivých stripech jsou navázaný specifické monoklonální protilátky proti antigenům chřipky A a B. Specifita testů je zaručena monoklonálními protilátkami, které jsou zaměřené přímo proti nukleoproteinovým antigenům chřipky typu nebo B. Tyto protilátky jsou

konjugované s částicemi koloidního zlata. Na polyesterové membráně je imobilizován konjugát. Konjugát i vzorek se stěhuji kapilární vzlínavostí po ponoření testu do tekutého vyšetřovaného vzorku. Pokud se ve vzorku nacházejí antigeny chřipky typu A nebo B, dochází při kontaktu protilátek vpitých na stripu k vzniku červené linky. Spojení vzorek-konjugát pokračuje ve stěhování stripem, který obsahuje další část systému, tj. polyklonální protilátka proti kuřecímu IgY. Na protilátku se naváže přebytek konjugátu a tím vznikne druhá červená linka. V případě že proběhl reakce správně, dojde k vzniku druhé linky i u negativních vzorků, čímž se potvrdí validita testu. Pokud vzniknout obě červené linky hodnotí se reakce jako pozitivní na přítomnost antigenu chřipky A nebo B ve vyšetřovaném materiálu. [16]

7 NEPŘÍMÝ PRŮKAZ RESPIRAČNÍCH VIRŮ

Ve vzorku hledáme známky imunitní odpovědi na infekční agens. Hledáme tedy vytvořené protilátky proti konkrétnímu typu onemocnění.

7.1 Komplement fixační reakce

Specifická protilátka aktivuje specifický antigen za vzniku komplexu, na který se váže komplement, ten poté ztrácí svojí schopnost hemolyzovat krvinky. Proto přidaný indikátorový systém, čímž jsou beraní krvinky a hemolyzin) zůstane bez změny a krvinky se usadí na dně jamek destičky. Reakce je velmi citlivá na teplotu, pH, pufr a dodržení poměru jednotlivých složek. Je nutné je přesně vytitrovat. Reakce se provádí na mikrotitračních destičkách typu U. Používají se automatické pipety jedno a osmikanálové s nastavitelným objemem na 25 µl a 50 µl a příslušné špičky.

Komplement je součástí krevního séra, z toho jej odstraníme inaktivací. V serologii se používá morčecí komplement. Je velmi citlivý na zevní vlivy, nejvíce na teplo. Je nutné ho uchovávat lyofilizovaný v +4º C. Naředěný uchováváme zmražený rozplněný po alikvotech. Komplement se může rozmrazit pouze jednou, poté už se nemůže použít. V reakci použijeme dvě jednotky komplementu. Jednotka znamená nejmenší množství komplementu, které způsobí úplnou hemolýzu senzibilizovaných krvinek. U nových šarží je nutné provést titraci komplementu. Naředíme 2 ředění komplementu 1:25 a 1:50. Pokud je k dispozici kvalitní komplement je možné ho naředit i 1:100. Ředí se ve vychlazeném KFR pufru, který je naředěný 1:5. Ke každému z těchto ředění je nutné připravit pomocné ředění ve zkumavkách.

číslo zkumavky	1	2	3	4	5	6	7	8	9
ředení komplementu	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9
KFR pufr	0,9	0,8	0,7	0,6	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1
množství komplementu v 0,2 ml	0,02	0,04	0,06	0,08	0,1	0,12	0,14	0,16	0,1

Tabulka 3 [17]

Tyto hodnoty komplementu v 0,02 ml platí pro makroreakci. Pro mikroreakci (0,05ml) to přesně neodpovídá, ale výpočet jednotek je jednodušší brát to stejně. Výsledek je stejný.

Vlastní titraci provádíme na destičkách typu U. 50 µl komplementu z výše uvedených ředěních kapeme dopředu. Dvě řady po devíti jamkách s počátečním

ředěním komplementu 1:25, 1:50. Poté napipetujeme 25 µl antigenu nebo fyziologického roztoku. Vše protřepeme a přes noc inkubujeme v igelitovém sáčku při +4º C. Poté inkubujeme ještě jednu hodinu v termostatu při 37º C bez sáčku. Přidáme 50 µl hemolytického systému, protřepeme a uložíme na třicet minut do termostatu. Dále jednu hodinu inkubujeme přikryté druhou destičkou při teplotě + 4º C. Odečítáme proti zrcátku, jestli došlo k hemolýze. Jamka s hemolýzou obsahuje jednu jednotku komplementu. V testu používám dvě jednotky komplementu. Dvě jednotky vypočítáme ředění komplementu krát deset děleno dvě jednotky komplementu krát sto. Použitý antigen ředíme podle návodu, který udává výrobce.

Hemolytický systém působí jako detektor volného komplementu. Jde o směs stejných dílů 2% beraních krvinek a 2 – 3 jednotek hemolyzinu, což je králičí imunní sérum proti beraním krvinkám. Pří míchání lijeme vždy hemolyzin do beraních krvinek. Hemolytický systém předehřejeme půl hodiny ve vodní lázni 37º C, musí být připraven vždy čerstvý. [17]

7.2 Hemaglutinačně inhibiční test – HIT

Principem testu je vazba protilátky v séru na přidaný specifický antigen. Touto vazbou antigen ztrácí schopnost hemaglutinace přidaných krvinek. Proto lze test provést pouze u virů, které mají schopnost hemaglutinace.

Na mikrotitrační destičce typu V provedeme titraci viru. Od druhé jamky nakapeme 50 µl fyziologického roztoku. Do první a druhé jamky dáme 50 µl antigenu naředěného 1:10. Od druhé jamky ředíme pipetou po 50 µl na 10 ředění. Přiřadíme jednu kontrolní řádku jen pro fyziologický roztok. Poté do všech jamek přidáme 50 µl 0,5% krvinek, různé podle typu viru. Protřepeme a necháme inkubovat. Doba a teplota je různá podle druhu použitých krvinek. Do reakce dáváme čtyři jednotky antigenu, to se rovná hemaglutinační titr děleno osmi. Odečítání provedeme tím, že zvedneme destičku, otočíme a necháme stékat neaglutinované krvinky. Pozitivní výsledek je kompletní aglutinace a negativní stékající krvinky. [18]

7.3 ELISA, EIA

Toto vyšetření se používá pro diagnostiku adenovirů, respiračního syncytiálního virusu a parainfluenzy.

Jde o metodu, která je využívaná ke kvantitativnímu stanovení řady antigenů. Metoda má různé varianty provedení. Je založena na interakci protilátky a antigenu.

Protilátka nebo antigen jsou navázány na enzym. Nejběžněji jsou používané enzymy peroxidáza nebo alkalická fosfatáza. Chemickou přeměnu substrátu katalyzuje enzym, substrát je přidán do reakční směsi. Substrát se přemění na produkt, který je barvený. Poté se stanovuje spektrofotometricky nebo fluorescenčně. Koncentrace produktu je přímo úměrná koncentraci protilátky nebo antigenu ve vzorku. Na povrchu mikrotitrační destičky je nerozpustný nosič, na který se váže antigen nebo protilátky. To poté zjednodušuje oddělení imunochemicky navázaných molekul.

Postup sendvičové ELISA pro stanovení koncentrace antigenu. Nejdříve se na dno destičky naváže protilátka. Po přidání vzorku proběhne inkubace, při které dojde k vzniku komplexu antigen – protilátka. Poté je nutné nenavázaný antigen odmýt. Přidáme druhou protilátku, která váže antigen, na kterém je kovalentní vazbou připevněn enzym. Dále proběhne inkubace a odmytí přebytečné protilátky s enzymem. Nakonec do reakce přidáme substrát. Proběhne katalyzovaná reakce enzymem. Poté dojde k měření výsledku reakce. [19]

7.3.1 Anti-Adenoviru ELISA (IgG)

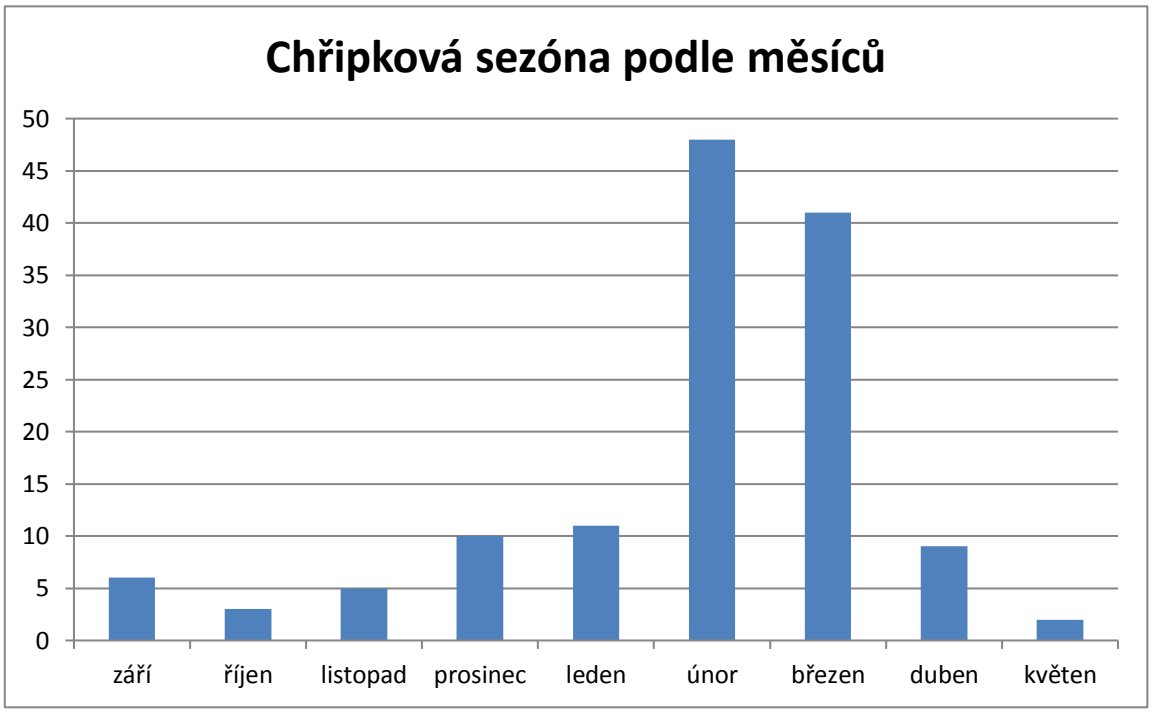
Souprava pro test umožňuje kvantitativní nebo semikvantitativní zkoušku in vitro na lidské protilátky IgG proti adenoviru v séru nebo plazmě pacienta. Jde o osm titračních proužků s odlomitelnými reagenčními jamkami, ty jsou potažené antigenem adenoviru. Nejdříve se v jámkách inkubují pacientské vzorky. Pokud je vzorek pozitivní, dojde k navázání specifické IgG protilátky na antigeny. Poté dojde k inkubaci s enzymově značenými anti – lidskými IgG, to vyvolá barevnou reakce. [20]

8 CHŘIPKOVÁ SEZÓNA 2015/2016

V grafu můžeme vidět počet vyšetřovaných pacientů na virus chřipky v jednotlivých měsících.

Chřipková sezóna podle měsíců								
září	říjen	listopad	prosinec	leden	únor	březen	duben	květen
6	3	5	10	11	48	41	9	2

Tabulka 4 [21]

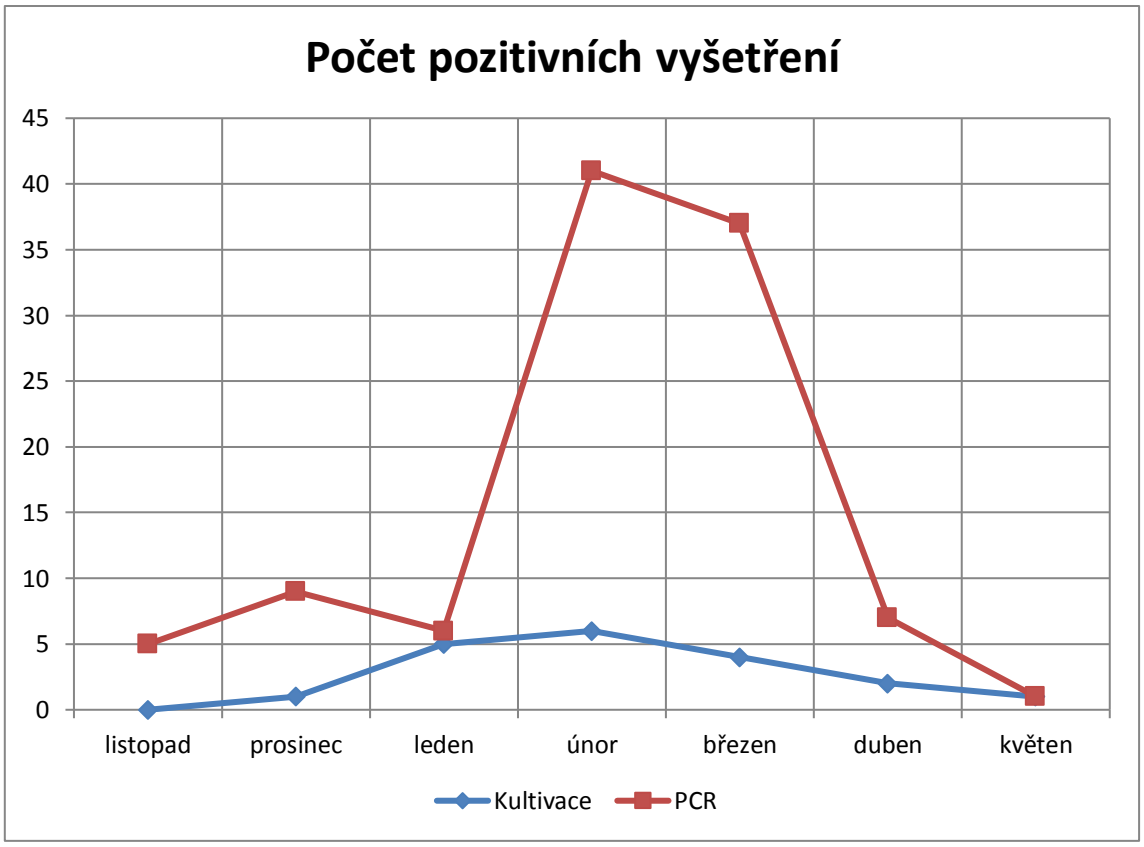


Graf 1 [22]

Zde můžeme vidět počet pozitivních vyšetření u PCR a kultivace na virus chřipky

Počet pozitivních vyšetření							
měsíc	listopad	prosinec	leden	únor	březen	duben	květen
Kultivace	0	1	5	6	4	2	1
PCR	5	9	6	41	37	7	1

Tabulka 5 [21]

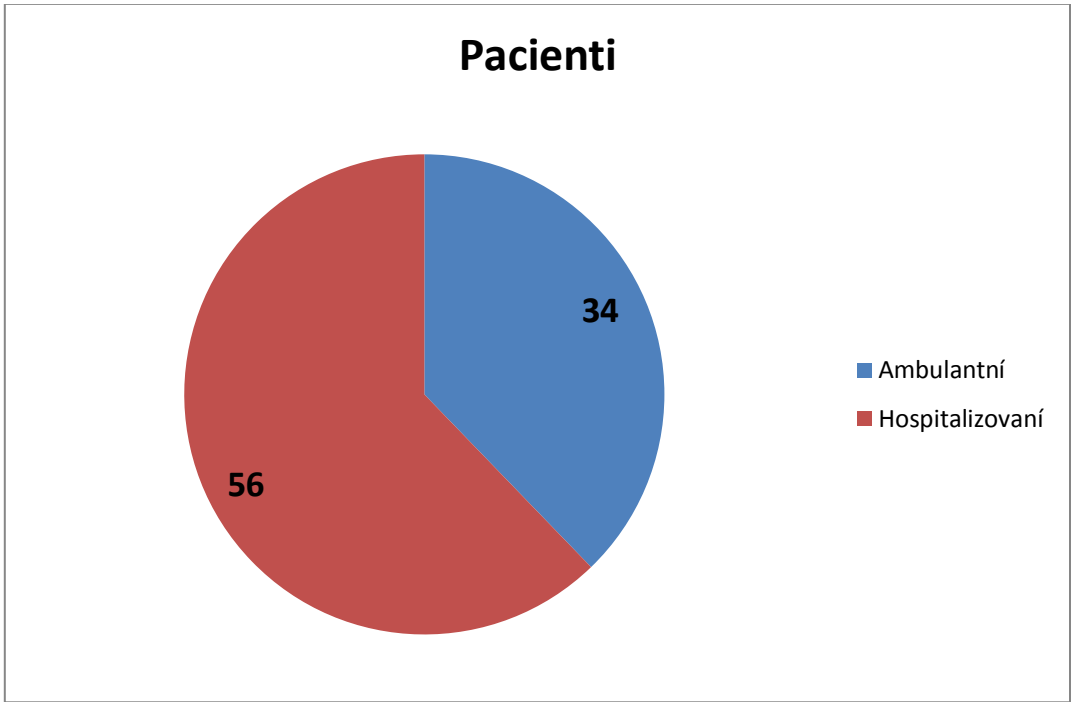


Graf 2 [22]

V tomto grafu je zobrazeno, zda bylo vyšetření indikováno u pacientů, kteří byli ošetřeni pouze ambulantně, či šlo o pacienty, kteří byli z nějakého důvodu hospitalizovaní v nemocnici.

Pacienti	
Ambulantní	34
Hospitalizovaní	56

Tabulka 6 [21]

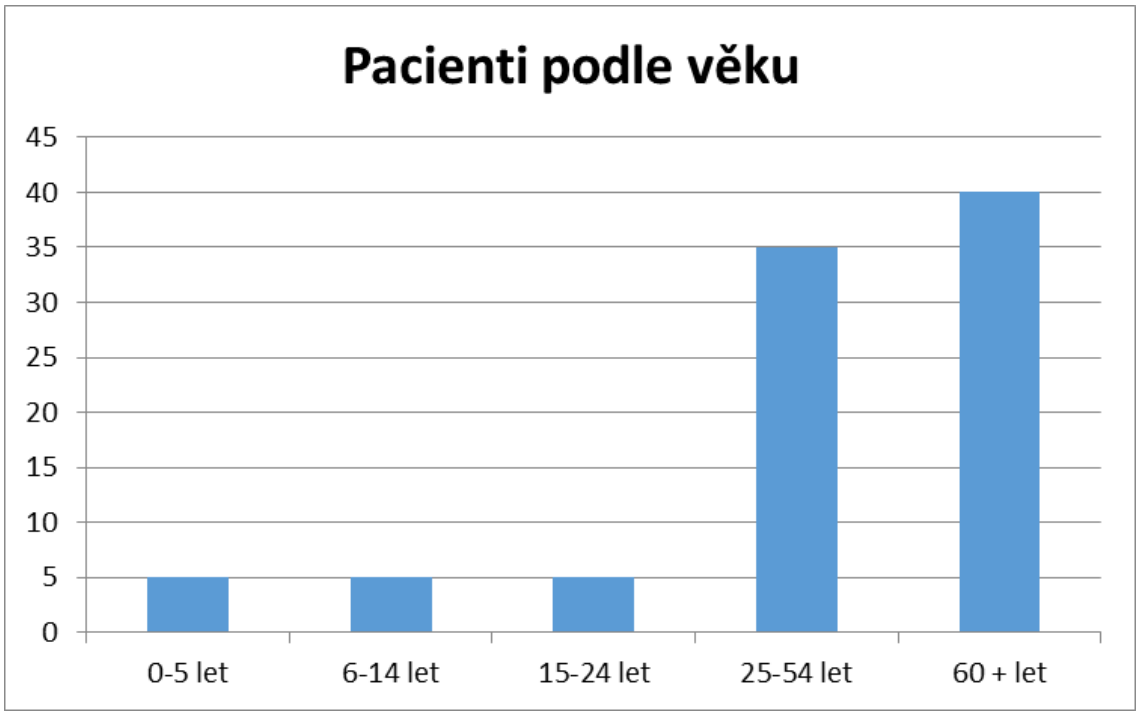


Graf 3 [22]

Vyšetřování pacienti na virus chřipky podle rozpětí věku.

Pacienti podle věku	
0-5 let	5
6-14 let	5
15-24 let	5
25-54 let	35
60 + let	40

Tabulka 7 [21]

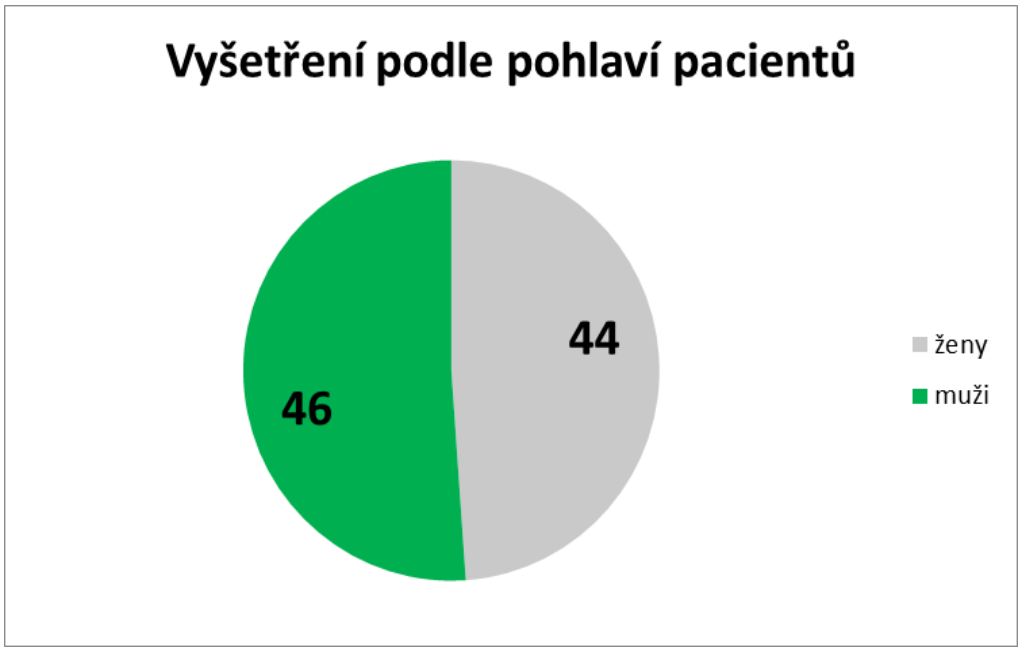


Graf 4 [22]

Zde můžeme vidět, kolik bylo v poměru na virus chřipky vyšetřeno mužů a žen.

Vyšetření podle pohlaví pacientů	
ženy	44
muži	46

Tabulka 8 [21]



Graf 5 [22]

DISKUZE

Cílem mé práce bylo popsat diagnostiku respiračních virů. V práci jsem popsala přímý a nepřímý průkaz viru. Zjistila jsem, že přímý i nepřímý průkaz má v diagnostice své místo. Obě metody jsou používané. Pří přímém průkazu používáme k vyšetření kultivaci nebo PCR. U nepřímého průkazu se opíráme o komplex antigen-protilátka.

Dalším cílem bylo zhodnotit graficky chřipkovou sezónu 2015/2016. Z informací z jištěných na Ústavu mikrobiologie FN Plzeň na Oddělení virologie jsem zpracovala několik grafů, které zobrazují, jak chřipka v této sezóně probíhala.

ZÁVĚR

Laboratorní diagnostika respiračních virů se opírá o metody přímého průkazu, zároveň ale i o metody nepřímé, serologické, které detekují protilátky proti jednotlivým respiračním agens.

Mezi metody přímého průkazu virů patří kultivace (izolace) virů na tkáňových kulturách, průkaz virové nukleové kyseliny metodou RT-PCR a průkaz virových antigenů pomocí technik imunochromatografie nebo imunofluorescence. Podmínkou pro úspěšný přímý průkaz viru je správně odebraný materiál z dýchacích cest, který je načasován na začátek onemocnění, optimální je 3. až 5. den od začátku infektu. Respirační materiály odebrané s větším časovým odstupem od začátku onemocnění nejsou vhodné hlavně pro kultivaci životaschopného viru, ale i pro RT-PCR diagnostiku nukleové kyseliny vzhledem k poklesu přítomné virové nálože. Průkaz virového antigenu ustupuje v posledních letech do pozadí pro malou citlivost a výtěžnost této metody.

Metody nepřímého průkazu mají v laboratorní diagnostice respiračních virů rovněž své opodstatnění a jdou ruku v ruce s metodami průkazu přímého. Enzymatická imunoanalýza patří jako reakce se značenými složkami mezi nejčastěji používanou metodu průkazu protilátek v jednotlivých třídách (IgG, IgM, IgA). Komplementfixační reakce (KFR) a hemaglutinačně inhibiční test (HIT) patří mezi klasické serologické metody k průkazu Ig total protilátek. Tyto dvě klasické metody mají nezastupitelnou úlohu především při serologické diagnostice chřipky, pro tuto diagnostiku jsou doporučovány. Národně referenční laboratoří pro chřipku a nechřipkové respirační viry. Serologický (nepřímý) průkaz vychází z vyšších titrů protilátek, ale především z dynamiky protilátek mezi sérem prvním (akutním) a sérem druhým (rekonvalescentním). Druhé sérum je odebíráno s časovým odstupem přibližně 5 – 7 dní od séra prvního, kdy je zde časový prostor k vytvoření protilátek.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY A INFORMAČNÍCH ZDROJŮ

[1] BENEŠ, Jiří. *Infekční lékařství*. Praha: Galén, c2009. ISBN 978-80-7262-644-1.

[2] Popis systému ARI. *Www.szu.cz* [online]. 2009 [cit. 2017-01-29]. Dostupné z: http://www.szu.cz/publikace/data/popis-systemu-ari

[3]VOTAVA, Miroslav. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun, 2014. ISBN 80-902896-6-5.

[4] Chřipka. *Www.symptomy.cz* [online]. 2014 [cit. 2017-01-20]. Dostupné z: http://www.symptomy.cz/priznaky/chripka

[5] GOERING, Richard V., Hazel M. DOCKRELL, Mark A. ZUCKERMAN a Peter L. CHIODINI, JULÁK, Jaroslav, ed. *Mimsova lékařská mikrobiologie*. 5. vydání. Přeložil Jan BOBEK, přeložil Renáta ČERMÁKOVÁ, přeložil Karel HOLADA, přeložil Zora MĚLKOVÁ, přeložil Tibor MOŠKO, přeložil Jan NOVÁK, přeložil Ludmila PROKEŠOVÁ, přeložil Jiřina SUCHANOVÁ. Praha: Stanislav Juhaňák - Triton, 2016. ISBN 978-80-7387-928-0.

[6] KLENER, Pavel. *Vnitřní lékařství*. 4., přeprac. a dopl. vyd. Praha: Galén, c2011. ISBN 978-80-7262-705-9.

[7] ROZSYPAL, Hanuš. *Základy infekčního lékařství*. V Praze: Univerzita Karlova, nakladatelství Karolinum, 2015. ISBN 978-80-246-2932-2.

[8] *Journal of Clinical Microbiology*. USA: American Society for Microbiology, 2016, 54(6).

[9] MERS. *Www.wikipedia.org* [online]. [cit. 2017-02-19]. Dostupné z: https://cs.wikipedia.org/wiki/MERS

[10] *Zprávy centra epidemiologie a mikrobiologie: MERS CoV*. Praha: Státní zdravotní ústav - Praha, 2015, 24(6,7). ISSN 1804 - 8668.

[11] VOTAVA, Miroslav. *Lékařská mikrobiologie - vyšetřovací metody*. Brno: Neptun, c2010. ISBN 978-80-86850-04-8.

[12] Standartní operační postup pro odběr na virologické vyšetření Ústav mikrobiologie FN Plzeň, virologie, 2017

[13] Standartní operační postup pro kultivaci na tkáňových kulturách Ústav mikrobiologie FN Plzeň, virologie, 2017

[14] Standartní operační postup pro MDCK izolaci chřipky Ústav mikrobiologie FN Plzeň, virologie, 2017

[15] Polymerázová řetězová reakce. *Www.wikipedia.org* [online]. [cit. 2017-03-01]. Dostupné z:https://cs.wikipedia.org/wiki/Polymer%C3%A1zov%C3%A1_%C5%99et%C4%9Bzov%C3%A1_reakce

[16] Standartní operační postup pro PCR chřipky Ústav mikrobiologie FN Plzeň, virologie, 2017

[17] Standartní operační postup pro kultivaci na komplement fixační reakci Ústav mikrobiologie FN Plzeň, virologie, 2017

[18] Standartní operační postup pro hemaglutinačně inhibiční test Ústav mikrobiologie FN Plzeň, virologie, 2017

[19] ELISA. *Www.wikiskripta.eu* [online]. [cit. 2017-03-01]. Dostupné z: http://www.wikiskripta.eu/index.php/ELISA

[20] Standartní operační postup pro test Anti-Adenoviru ELISA (IgG)
Ústav mikrobiologie FN Plzeň, virologie, 2017

[21] Data zjištěná na Ústavu mikrobiologie FN Plzeň, virologie, 2017

[22] Vlastní zdroj

SEZNAM OBRÁZKŮ

OBRÁZEK 1CHŘIPKA B 13
OBRÁZEK 2 PRŮKAZ RESPIRAČNÍHO SYNCYCIÁLNÍHO VIRU POMOCÍ FLUORESCENCE V TKÁŇOVÉ KULTUŘE VERO 18
OBRÁZEK 3 PRŮKAZ ADENOVIRU POMOCÍ FLUORESCENCE V TKÁŇOVÉ KULTUŘE LEP 20
OBRÁZEK 4 NA TKÁŇOVÉ KULTUŘE MDCK VIRUS CHŘIPKY B 30
OBRÁZEK 5 PCR 34
OBRÁZEK 6 PCR 35

SEZNAM TABULEK

TABULKA 1 VIRY CHŘIPKY A [4] 13
TABULKA 2 ROZDÍL MEZI CHŘIPKOU A NACHLAZENÍM [4] 16
TABULKA 3 [17] 38
TABULKA 4 [21] 41
TABULKA 5 [21] 42
TABULKA 6 [21] 43
TABULKA 7 [21] 44
TABULKA 8 [21] 45

SEZNAM GRAFŮ

GRAF 1 [22]..... 41
GRAF 2 [22]..... 42
GRAF 3 [22]..... **CHYBA! ZÁLOŽKA NENÍ DEFINOVÁNA.**
GRAF 4 [22]..... 44
GRAF 5 [22]..... 45