



Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU



Národní
plán
obnovy

VETUNI pro 21. století: Rozvoj VETUNI v oblasti digitalizace činností, profesionálního vzdělávání a flexibilních forem vzdělávání

Projekt NPO registrační číslo NPO_VETUNI_MSMT-16594/2022

Specifický cíl A3: Tvorba nových profesně zaměřených studijních programů

Studijní program:

Veterinární asistence

Návaznost na výstup:

☐ č. 1 ☐ č. 2 ☐ č. 3 ☐ č. 5 ☒ č. 6 ☐ č. 7 ☐ č. 8 ☐ č. 10

Předmět:

V2MP - Mikrobiologie a parazitologie zvířat

Typ výstupu:

Studijní opory pro praktickou výuku

Autor výstupu:

MVDr. Martina Masaříková, Ph.D., MVDr. Věra Vaibarová, Mgr. Lucie Janíček -Hrubá,
MVDr. Dobromila Molinková, Ph.D., Prof. Břetislav Koudela



Veterinární univerzita Brno

Palackého tř.1946/1 ● 612 42 Brno ● tel.: +420 541 561 111 ● e-mail: podatelna@vfu.cz ● www.vfu.cz ● IČ 62157124



Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní
plán
obnovy

Virologie cvičení č. 3

Mgr. Lucie Janíček Hrubá – janicekhrubal@vfu.cz

Mikrobiologie a parazitologie zvířat



- **Virus** (z latinského „virus“ – jed)
 - Nebuněčná „neživá“ částice
 - Závislý na hostitelské buňce – replikace = intracelulární parazit
 - Bílkovinový obal + NK – DNA x RNA viry
- Viditelný pouze v **elektronovém mikroskopu**
 - 20 – 300 nm
 - 20 nm – koronavirus
 - 300 nm - paramixovirus

- Typy vzorků (invazivní, neinvazivní)
 - krev, sekrety, exkrementy, biopsát, stěry, výtěry, části orgánů (celé) post mortem
- 0,2 – 10 g nebo ml vzorku
- Ve správnou dobu – v akutní fázi onemocnění
- Pro spolehlivější průkaz:
odebrat více typů vzorků (více typů tkání/ sekrety, exkrementy)
- **Popis vzorku, anamnéza, vyplnění žádanky**
- Ochrana před kontaminací
 - Sterilní nástroje, transportní médium, mrazicí box

- Transport
 - Co nejdříve po odběru (24h – 48h)
 - Standardně při 4 ° C
 - Uchovávání
 - DNA: -20 ° C
 - RNA: -80 ° C
 - V tekutém dusíku: -196 ° C

- **Fáze preanalytická**
 - Příprava pacienta a odběrového materiálu
 - Vlastní odběr vzorku
 - Transport, uchovávání
- **Fáze analytická**
 - V laboratoři
 - Příprava vzorku na stanovení výsledků
- **Fáze postanalytická**
 - Interpretace výsledku, odeslání výsledků, archivace

Stabilita viru ve vnějším prostředí



- Stabilita je ovlivněna vlastností proteinů a NK
- Inaktivace viru:
 - Teplota: 55 – 60 ° C/ 30 min
 - pH: 5 – 0 (acidostabilní - enteroviry, citlivé SLAK)
 - UV a ionizující záření
 - Chemická činidla - detergenty, aldehydy, chlornany, alkoholy

- **Přímý průkaz = průkaz viru, antigenu**
 - Izolace NK
 - Molekulární biologické metody
 - PCR - kvalitativní
 - qPCR - kvantitativní
 - Sekvenování
 - Izolace viru na buněčné kultuře
 - Fluorescenční mikroskopie – virus vztekliny, atg se naváže v mozku na protilátku = záření

Polymerázová řetězová reakce - PCR



- Metody založené na amplifikaci (zmnožení) NK
- Princip podobný replikaci
- Komplementarita bází
 - PCR (1993 NC za chemii)
 - Mastermix (nukleotidy, DNA polymeráza), primery, NK vzorku
 - Termocykler – denaturace, annealing, extenze
 - Elektroforéza
- qPCR
 - Kolik tam je NK
 - Real-time PCR
 - Použití specifické sondy
 - Vizualizace na PC monitoru – amplifikační křivka

Polymerázová řetězová reakce - PCR



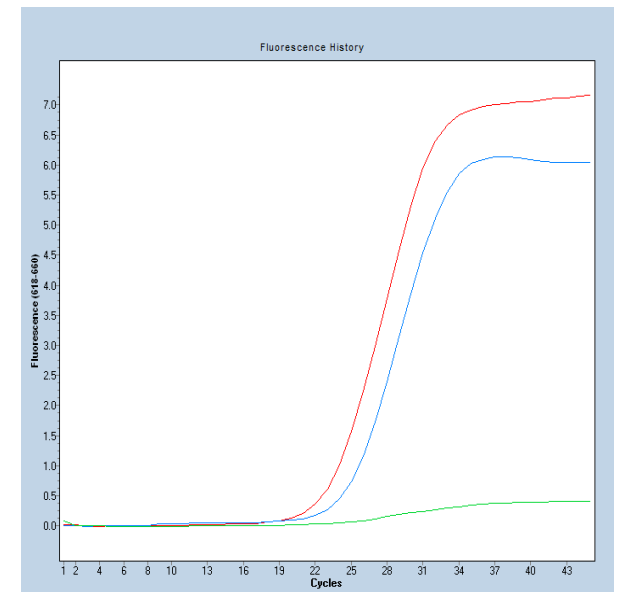
Termocykler



qPCR-lightcycler



Výsledek qPCR



Izolace viru na buněčných kulturách



- Buněčné kultury – tvořeny izolovanými buňkami
 - Rostou v kultivačních nádobách = Roux lahvích
 - Roux láhve naplněny kultivačním médiem
 - Kultivace v termostatu – 37 ° C v atmosféře s 5 % CO₂
 - Růst v jedné vrstvě = monolayer
- Použití ve virologii:
 - Virus se může replikovat pouze v živých buňkách
 - Izolace viru byla dříve používána na pokusných zvířatech
 - Dnes nejvíce využívány buněčné kultury – izolace i identifikace viru

Kultivační médium



- MEM = minimální esenciální médium
- Poskytuje zdroj živin
- Obsahuje přesné množství solí, glukózy, AMK, vitamínů, inzulínu, transferinu, růstových faktorů a fetálního bovinního séra
- FBS neobsahuje gamaglobuliny a jeho součástí mohou být virové inhibitory
 - Důležitá je hodnota pH – 7,4
 - Pokud klesne pod 6,5 – zánik buněk
 - Fenolová červeň – indikátor změny pH



Kultivace buněk a pasážování



- Pasážování probíhá ve sterilním boxu – vše, co jde do boxu postříkat ethanolem
- Nutno buňky rozsadit, pokud překrývají přibližně 80 % dna Roux láhve
- Potřeba uvolnit adherentní buňky ze dna nádoby (i od sebe) do média
 - Odstranění starého média
 - Aplikace EDTA (odstraní Mg^{2+} a Ca^{2+}) + Trypsinu (částečně natráví a odlepí buňky ode dna)
 - Trypsinace se zastaví přidáním nového séra nebo inhibitoru trypsinu
 - Půlka směsi se aplikuje do nové kultivační nádoby



- CPE = charakteristické morfologické změny buněk po infekci virem, jeho pomnožením a následným rozpadem buněk
- Typy CPE
 - Difúzní destrukce (Kalicivirus)
 - Plaky (Herpesvirus)
 - Syncytium (Respirovirus)
 - Zakulacení (Picornavirus)
 - Zakulacení a shlukování (Adenovirus)
 - Absence CPE (klasický mor prasat, vzteklna)
- Nutno obarvit
 - Inkluzní tělíka – agregáty produktů virové replikace

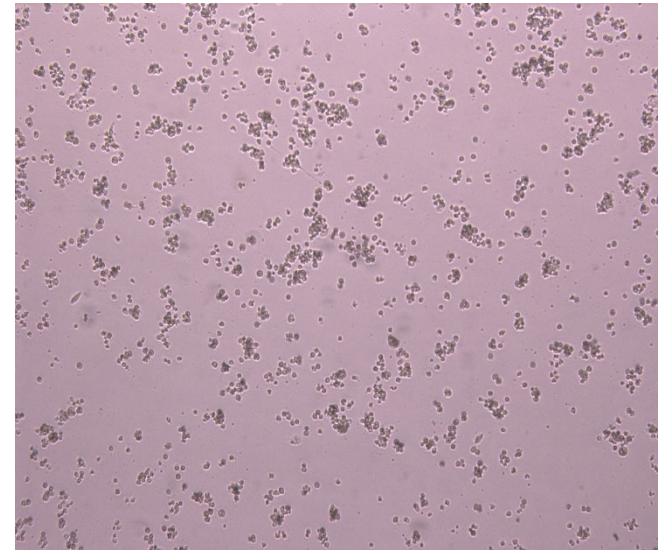
Cytopatický efekt felinního kaliciviru



Monolayer buněčné linie CRFK



Začínající CPE po 24h kultivace



CPE po 48h kultivace



**Financováno
Evropskou unií**
NextGenerationEU

