

Metoda: Přímý průkaz viru na tkáňových kulturách

Michaela Hahnová, 2. ročník

Školitelka: Lenka Ebenstreitová, DiS.

Ve virologických laboratořích se užívají tkáňové kultury k přímému průkazu viru. Z materiálu od pacienta se laborant snaží vyizolovat a pomnožit živý virus. Viry nejsou schopné se množit na neživých půdách a potřebují k množení živé buňky, které jsou jim poskytnuty právě ve tkáňových kulturách.

Tkáňové či jinak řečeno buněčné kultury také mohou představovat způsob, jak in vitro kultivovat eukaryotní buňky mimo jejich přirozené podmínky. Buněčné kultury představují nejvýznamnější způsob produkce monoklonálních protilátek využívaných jak diagnosticky, tak terapeuticky. Kromě již zmíněného užitku ve virologii tkáňové kultury nacházejí uplatnění ještě jako prostředek k získání proliferujících buněk v cytogenetické diagnostice, mají své místo také na poli výzkumu a jsou nedocenitelným zdrojem materiálu v podobě nukleových kyselin či proteinů pro řadu molekulárně biologických metod.

Ve virologické laboratoři v Plzni na Borech se používají 3 druhy buněk, a to diploidní buňky (LEP), VERO buňky a MDCK buňky.

Diploidní buňky mají dvojitou sadu chromozomů, která je zachovalá tak, jak za sebou jdou geny v organismu. Buňky vydrží 50 pasáží a pak zahynou. Do laboratoře je zasílá Klinlab od 24. pasáže a v provozu se používají do 32. pasáže. Poté už je riziko, že buňky začnou degenerovat (změna genomu buněk, degenerativní množení, buňky neplní svoji funkci). VERO buňky jsou z opičích ledvin, konkrétně kočkodana zeleného, a jsou geneticky pozměněné (sled chromozomů je upraven). Tyto buňky lze neomezeně pasážovat, ale čím více se pasážují, tím větší je šance k degeneraci. MDCK buňky jsou izolovány ze psích ledvin a mají jednu sadu chromozomů. Stejně jako VERO buňky je lze donekonečna pasážovat. Tyto buňky jsou hojně používány při kultivaci viru chřipky.

Kultivační podmínky odebraných buněk jsou jasně stanovené. Pro zajištění dobré kvality buněk je důležité dbát na rychlý přenos odebraných buněk do živného roztoku nebo média. Toto médium se svým chemickým složením snaží co nejvíce přiblížit přirozenému prostředí in vivo. Kontrolují se koncentrace organických živin, solí, hodnota pH a teplota prostředí. Stálé a ideální pH v médiu zajišťuje kyselý NaHCO₃, nádobka s tímto pufrům musí být pevně uzavřena, aby nedocházelo k úniku CO₂. V médiu jsou přítomná ATB.

Kultura roste v plastové zkumavce s šikmo zařízlým dnem, na dně nádoby se v médiu vytvoří monovrstva tkáně. Obecně trvá kultivace virů 2*10 dní při 37°C. Kultivace influenza viru trvá 2*7 dní při 34°C. Kultivace močí trvá 42 dní při 37 °C, ale lze provést i zrychlený izolační průkaz.

Pokud dojde k pomnožení viru, další určení probíhá na základě cytopatického efektu a pomocí monoklonálních protilátek pro příslušný virus. Kultura se prohlíží pod inverzním mikroskopem, kde je osvětlení shora a objektiv zespod.

V poslední době se ovšem od tohoto přímého průkazu hodně ustupuje a většina virů se stanovuje pomocí PCR. Důležité toto stanovení ale zůstává u průkazu cytomegaloviru.