

Vírusizolálás, sejt- és szövettenyésztés

A vírusok önálló életre nem képes élőlények, vagyis egy gazdaszervezet szükséges a szaporodásukhoz. Ennek megfelelően nem tudjuk őket táptalajon tenyészteni, Tenyésztésükre különféle rendszerek alkalmasak.

1. Állatoltás

Főleg történeti jelentősége van

Problémák:

nehéz fogékony állatot találni

általában nem specifikusak a tünetek

a kísérleti állatban jelen lehet látens (megbújó fertőzés, amiről nem tudunk)

fertőzés

Használatos állatfajok: egér, patkány, hörcsög, madarak, ritkán főemlős

Fontos lehet az állat kora: a Coxsackie vírusok pl. csak szopós egerekben szaporodnak

A vírusok oltási módja a vírustól függ: agyba (intracerebrális), hasüregbe

(intraperitoneális), orrba (intranazális) stb. is oltható az állat.

2. Embrionált tojás

7-12 napos, embrionált tojást használnak

Sokfajta, de nem minden emberi vírus szaporítható bennük

Fontos a tojás származása, olyan tenyészetből kell beszerezni, ahol nincs jelen a salmonella, campylobacter, madárleukémia vírus

A csirkeembrió, zárt rendszer, immunológiailag inaktív

Az egyes vírusok ideális oltási helye eltérő lehet:

chorioallantois-membránra oltjuk a poxvírusokat és a herpesvírusokat

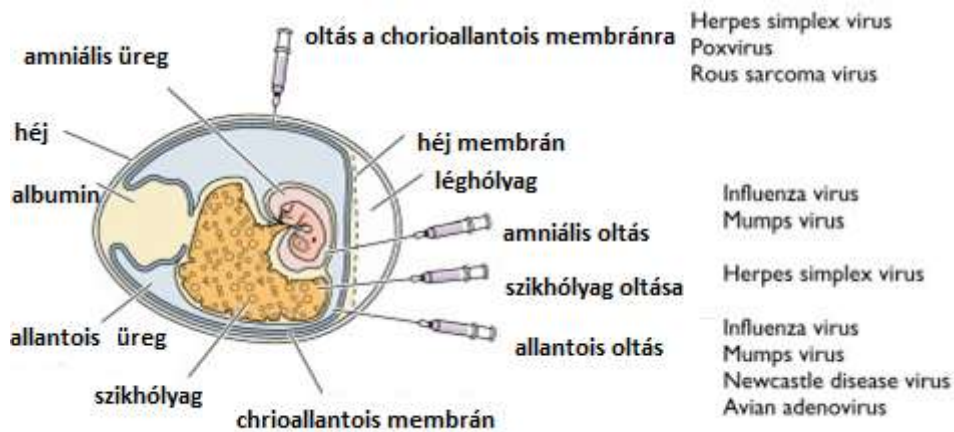
amnionba oltjuk az influenzavírusokat és a mumpszvírust

az **allantois üregbe** oltjuk a mumpsz a kanyaró valamint az adaptálás után az influenzavírusokat

a **szikhólyag** alkalmas a különböző arbovírusok (ezeket a vírusokat különféle rovarok terjesztik) tenyésztésére

Az embrionált tojással steril, aszeptikus (kórokozó mentes) körülmények között kell dolgozni.

Az embrionált tyúktojást főleg a védőoltások előállításához szükséges vírus előállításához használják.



1. ábra. Az embrionált tyúktójas szerkezete

3. Sejtkultúrák

Primer tenyészetek és abból származó fibroblaszt

Állati szervekből vagy emberi embriókból készítik

A feldarabolt szövetdarabot tripsinnel (enzim) emésztik, majd a sejteket tápoldatba helyezik

A sejtek kitapadnak a tenyésztőedény aljához és osztódni kezdenek, ez addig tart még elérik egymást, ezek után a kontakt gátlás miatt a szaporodásuk leáll.

A sejteknek ugyanazok a tulajdonságai, mint az eredeti sejteknek

Ezt követően a sejteket tovább passzálhatjuk, ez azt jelenti, hogy pl. tripszin segítségével leemésztjük a tenyésztőedényről a sejteket és centrifugálást követően friss tápfolyadékban nagyobb területű edénybe visszük át, ahol újra osztódhatnak. Így egy folyamatosan osztódó sejtkultúrát kaptunk.

Amennyiben ez egy normális kariotípussal rendelkező szövetből indult, kb. 40-50 alkalommal tudjuk passzálni. Ezt követően a sejt elöregszik, nem képes további mitosisra.

Az immortalizált sejtvonalak, korlátlanul passzálhatók

Eredetük lehet:

embriionális

felőttből eredő

tumoros

a kromoszómaszám változó, heteroploid sejtvonalak

gyakran használt sejtvonalak:

majom-veseszövetből: Vero, BSC-1

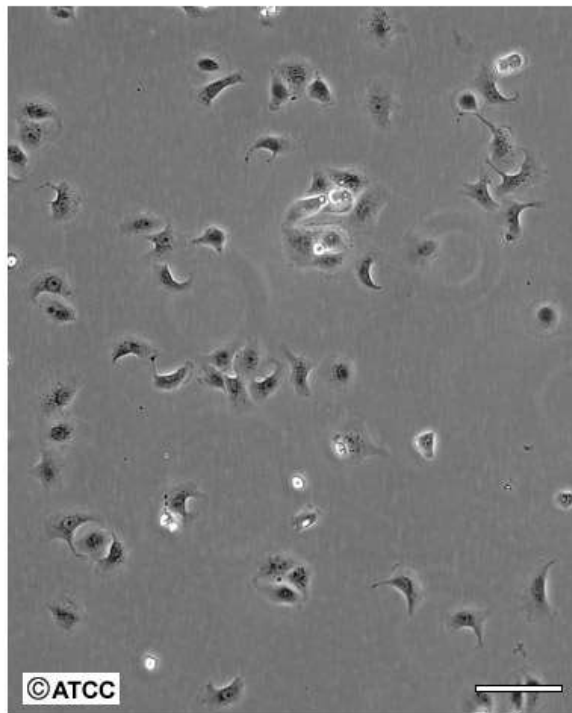
emberi méhnyakrákból: HeLa

emberi gégerákból: HEp-2

Szuszpenziós sejtkultúra:

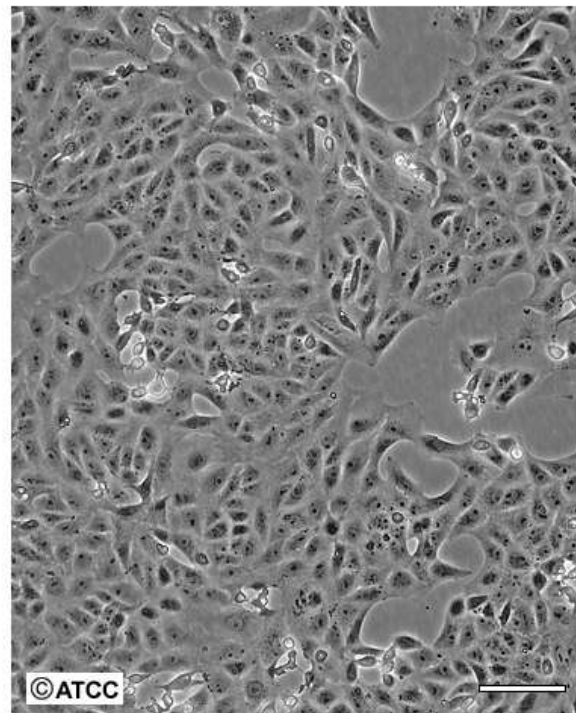
emberi T-sejtes leukémia- vagy limfóma-eredetű sejtvonalakban is tenyésztenek vírusokat.

ATCC Number: **CCL-81**
Designation: **Vero**



Low Density

Scale Bar = 100µm



High Density

Scale Bar = 100µm

2. ábra. Vero sejt kultúra mikroszkópos képe

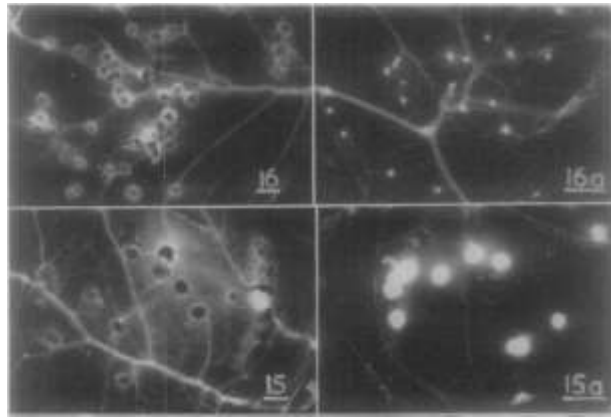
A víruszaporodás jelei

1. Kísérleti állatokban

- az állatok az adott vírusra jellemző tüneteket mutathatják
- az állatok elpusztulhatnak a vírus hatására
- ma is használják a Coxsackie A és B csoport elkülönítésére
- a vírust szopós egerekbe oltják
- az A csoport petyhüdt bénulást okoz (izomnecrosis)
- a B csoport spasticus bénulást (encephalitis)

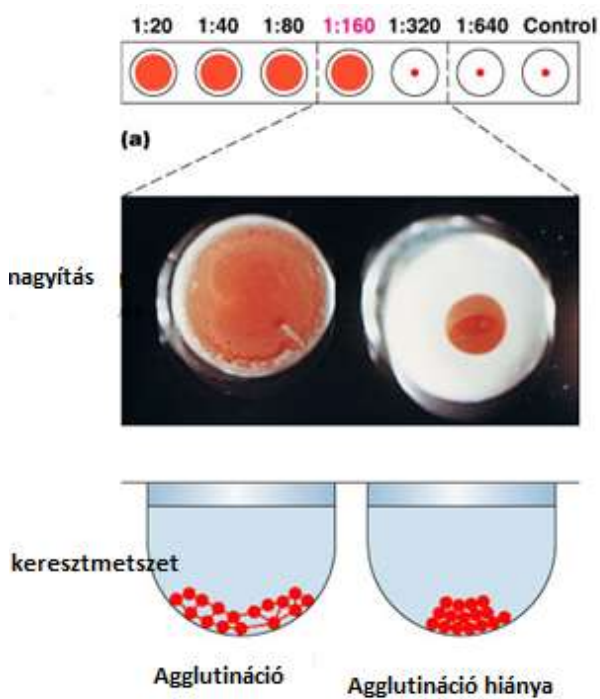
2. Embriónál tyúktojás

- az embrió bizonyos vírusok hatására **elpusztul** (arbovírusok)
- a fertőzött membránon szürkésfehér csomócskák, **pock-ok** jelennek meg (herpes, poxvírus hatására)
- amniális folyadékból pl. az influenzavírus indirekt kimutatható **hemagglutinációs** próbával
- (a próba során az amniális folyadékot összekeverjük csirke vörösvértestekkel, ha a vírus jelen van azt agglutinálja, ha nincs jelen vírus a vvt-k egy idő után leülepsznek).



3. ábra „pock-„ok chorioallantois membránon

Haemagglutinációs próba



a.) A lemez bemélyedései 1:2 arányban csökkenő vírus mennyiséget valamint állandó mennyiségű vörösvértestet tartalmaznak.

4. ábra. Vírus hemagglutináció

3. Sejtkultúrában

A sejtekben a vírusra jellemző cytopathiás (sejtkárosító) hatás alakul ki

A vírus hatására a sejtek zsugorodhatnak, lekerekedhetnek

Többmagvú szintitiumok jönnek létre (herpes vírus)

A sejtmagban szaporodó vírusok a magban hoznak létre zárványokat

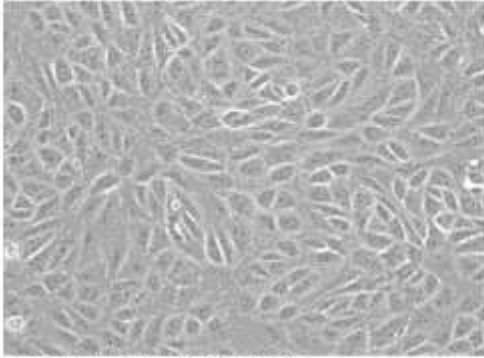
Couldry A típusú zárvány: *Herpes simplex*

B típusú zárvány: feltöredezett: adenovírus

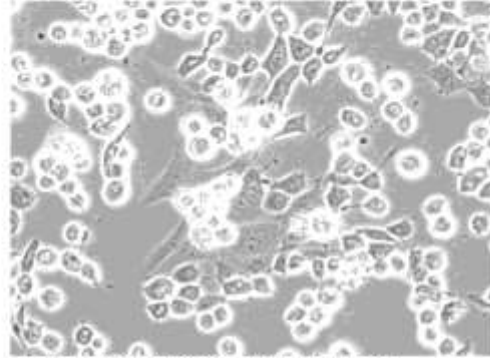
A cytoplasmában szaporodó vírusok ott hoznak létre zárványt.

Negri testek: rabiesvírus

ATCC® Number: **VR-734™**
Agent: **Human herpesvirus 2**
Strain: **G**



Uninfected host (ATCC® CCL-81™)



Infected host (ATCC® CCL-81™) showing CPE

5. ábra. Fertőzetlen és HSV-2-vel fertőzött Vero sejt kultúra