

576.858.11.077.3.078.13.093.4

IMUNOFLUORESCENČNÍ PRŮKAZ POXVIRŮ. ZKUŠENOSTI S PŘÍPRAVOU INGREDIENCÍ, TECHNIKOU BARVENÍ A HODNOCENÍM VÝSLEDKŮ

R. BENDA, O. PROCHÁZKA a L. DANEŠ

Vojenský ústav hygieny, epidemiologie a mikrobiologie, Praha

Imunofluorescenční (IF) metoda představuje významnou pomoc při diagnostice a výzkumu neštovičných infekcí. Protože jsme v posledních letech získali na tomto poli značné zkušenosti, domníváme se, že bude účelné seznámit pracovníky armádní protiepidemické služby s osvědčenými a definitivně přijatými laboratorními postupy, které zajišťují dostatečnou citlivost a zejména pak vysokou specifickou a spolehlivost fluorescenční vizualizace poxvirového antigenu v různém biologickém materiálu. Práce má především splnit jeden z požadavků vytvářejících předpoklady pro zabezpečení rychlé diagnostiky varioly.

Obecná doporučení

Zastáváme názor, aby při diagnostické i výzkumné činnosti s poxviry byla dávána přednost přímému (jednovrstevnému) IF barvení před nepřímým (dvouvrstevným či třívrstevným). Nepřímou IF techniku užíváme pouze ke zkoušení kvality imunních sér, z nichž se připravují protilátky pro konjugaci s fluorochrómem.

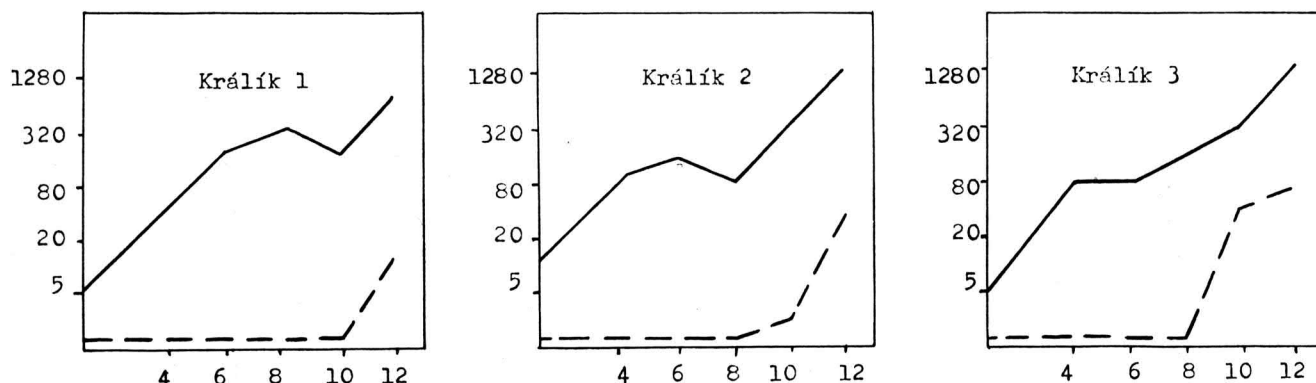
Volbu přímé IF metody pro identifikaci poxvirů zdůvodňuje několik skutečností: Základní z nich je to, že IF průkaz poxvirů představuje skupinovou imunologickou reakci, neboť antigenní vybavení všech zdravotnický významných druhů je blízce příbuzné. Vyplatí se proto jediným konjugátem pokrýt diagnostiku celé skupiny virů. Rozlišení důležitých patogenů (např. původce varioly maior a minor) od ostatních členů skupiny dosahujeme využíváním znalostí jejich jiných, zejména růstových vlastností (Carter 1965). Druhým významným argumentem pro volbu přímé IF techniky je skutečnost, že u poxvirů můžeme vyšetřovat na přítomnost

specifického antigenu biologický materiál bez předchozího předmnožení viru v kultivačním systému. Přímé IF barvení poskytuje lepší rozdíl specifické fluorescence oproti pozadí, které se pro rušivé substance v rozpadlé tkáni zhoršuje aplikací většího počtu ingrediencí při barvení nepřímou technikou. Kromě toho u přímé IF metody lze úspěšněji využívat předností tzv. kontrastního barvení, jímž dosahujeme barevného odtónování nespecifické fluorescence v preparátech. Je totiž všeobecně známo, že se hůře kontrastuje pozadí při práci s překonjugovanými antiglobulíny pro nepřímou metodu než při práci s překonjugovanými antivirovými imunoglobulíny pro přímou reakci. To má opět význam především při vyšetřování patologického materiálu ještě před provedením izolačního pokusu.

Příprava imunního séra

Získání vysoce kvalitního antivirového séra je jedním ze základních předpokladů úspěchu vypracování IF metody identifikace viru. V případě poxvirů doporučujeme toto sérum připravovat pomocí viru dermovakcíny na králících podle Noyese a Watsonové (1955). Je zbytečným rizikem k imunizaci užívat virus varioly, jak navrhuje Hahon (1965).

Králíky nejdříve infikujeme na větším okrsku skarifikované kůže (např. na obou uších) vakcinálním virem. Po odpadnutí krust (obvykle do tří týdnů) můžeme zahájit doimunizování, jež provádíme v týdenním intervalu dvěma až čtyřmi intravenózními injekcemi homologní, pomocí éteru částečně očištěné vakcinální kožní lymfy. (Není chybou aplikovat nepurifikovanou lymfu, která je bohatší na antigenní materiál než suspenze extrahovaná éterem; takové



sérum vizualizuje sice s menším kontrastem cytoplasmatické inkluze v infikovaných buňkách, ale naopak citlivěji deteguje difúzní cytoplasmatickou fluorescenci.) Králíky krvácíme za týden po aplikaci poslední dávky antigenu.

V grafu 1 jsou zakresleny hladiny hemagglutinačně-inhibičních (HI) a fluorescenčních protilátek u králíků po primoskarifikaci. Tabulka 1 zaznamenává tyto hodnoty ještě i v den zahájení hyperimunizace (21. den) a pak za jeden týden po druhé dávce purifikované homologní lymfy. HI titry 1:1280 (lépe 1:2560) a titry nepřímé IF od 1:80 do 1:160 u sér jsou garancí kvality získaného antipoxvirového konjugátu pro přímou IF reakci.

Příprava konjugátu pro přímou IF reakci

Z vybraných sér o vysokém titru protilátek získáváme celou globulínovou frakci. Pracujeme běžným postupem za užití síranu amonného. Neosvědčila se tzv. vsádková metoda (Baumstark a sp. 1964), která je sice rychlejší, ale ponechává v roztoku imunoglobulínů i stopy albumínu, který při konjugaci s fluoresceinizo-thiocyanátem (FITC) intenzívně přijímá barvivo, a zvyšuje tak nespecifické vlastnosti výsledného konjugátu.

K přípravě konjugátu jsme z počátku používali amorfní FITC různých značek: BDH (British Drug Houses), Serva (Heidelberg), VÚFB (Výzkumný ústav pro farmacii a biochemii v Praze), Gamaleja (Ústav vakcín a sér v Moskvě). Přípravky FITC od těchto firem se lišily svou aktivitou vůči bílkovinným molekulám

i absorbancí ve viditelné části spektra (490 nm). Všechny preparáty měly ve srovnání s krystalickým FITC firmy BBL (Baltimore Biological Laboratories) nižší aktivitu a nižší absorbanci při dané vlnové délce. Z těchto důvodů jsme museli zvýšit množství FITC vzatého do reakce, abychom vyrovnali nedostatek aktivní frakce fluorochrómu. Vycházeli jsme ze 4% koncentrace bílkoviny v roztoku globulínové frakce a do reakce jsme vnášeli 5% FITC v přepočtu na bílkovinu. Konjugovali jsme po dobu 20 hodin při 4 °C, při pH 9, zajišťovaném borátovým pufrům. Po odstranění nesvázaného FITC gelovou filtrací na koloně Sephadex G-25 nebo G-50 za použití 0,0175 M fosfátového pufru pH 7,2–7,4 jsme stanovili obsah bílkovin a FITC v konjugátu. V prvních pokusech jsme určovali množství FITC pomocí standardního roztoku fluoresceinu (Orndorff a Hemmer 1927), později jsme podle krystalického FITC firmy BBL jako standardu nastavili standard fluorescein-diacetátu (pro stálost roztoku této chemikálie). Kromě toho při stanovení FITC v konjugátech užíváme vlnové délky nikoli 490 nm, ale 496 nm, při níž má absorpce konjugátu své maximum (Jobbágy a Király 1966).

Aplikace málo aktivních a nestandardních preparátů FITC při přípravě konjugátu vedla k neregulovatelným výsledkům, a to i za podmínek zcela rutinně zvládnuté techniky konjugčního postupu a biochemické kontroly preparátů. Neaktivní frakce FITC totiž reaguje s molekulami protilátky stejně jako aktivní frakce. Protože do reakce jsme byli nuceni používat vyššího množství amorfního FITC, než je tomu

Tabulka 1

Výsledky paralelního vyšetřování HI a IF protilátek v sérech tří králíků po primoinokulaci viru dermovakcíny a za 1 týden po druhé intravenózní dávce parciálně purifikované králíčí vakcínální lymfy

Králík číslo	Protilátkové titry po primoinfekci vaku.				Protilátkové titry za 1 týden po druhé intravenózní dávce králíčí lymfy	
	HI	IF	HI	IF	HI	IF
1	640	10	640	10	1280	80
2	1280	40	1280	40	2560	160
3	1280	80	640	40	2560	160

Tabulka 2

Srovnání přípravy a vyhodnocení vlastností nejlepšího antipoxvirového konjugátu získaného s pomocí amorfního FITC (VÚFB) a jednoho z konjugátů získaného za použití krystalického FITC (BBL)

Konj. č.	Výchozí konc. bílko-viny mgP/ml	Druh FITC firma %	Biochemické vlastnosti konjugátu			Barvicí vlastnosti konjugátu s antigenem poxviru		Nespecifické přibarvení pozadí (neinfikované buňky)		
			koneč. konc. P mgP/ml	F : P		titr (+)	prac. ředění (+ + +)	neředěný konj. na jakémkoli materiálu	konjugát v pracovním ředění	
				x10 ⁻³	mol.				makrofágy	leukocyty
225	40	VÚFB amorf. 5	9,0	14,3	5,7	1 : 32 1 : 64	1 : 8 1 : 16	velmi silné	slabé	silné
255	20	BBL kryst. 1,7	3,2	6,6	2,8	1 : 16	1 : 4	slabé	žádné	velmi slabé

v případě krystalického preparátu, projevovala se vazba konjugátu s příslušným antigenem zhusta nižší intenzitou fluorescence nebo menším rozdílem intenzity specifické fluorescence a pozadí. Z těchto důvodů jsme v poslední době přešli výhradně ke konjugaci s krystalickým FITC firmy BBL. Vyhodnocení vlastností kvalitních antipoxvirových konjugátů získaných s amorfním a krystalickým fluorochrómem je zaznamenáno v tabulce 2.

Později jsme přešli ještě také k oddělení jednotlivých imunoglobulinů z konjugátu globulínové frakce. Zvolili jsme pro tento účel gelovou filtraci na Sephadex G-200. Metóda gelové filtrace na tomto materiálu umožňuje oddělení makroglobulínové části séra (IgM globulínů) od imunoglobulinů o molekulové váze kolem 160 000 (IgG), resp. o molekulové váze ještě nižší. (Při frakcionaci konjugátu na Sephadex G-200 jsme použili 0,1 M tris-HCl pufru o pH 8 s přidavkem 1,0 M NaCl.) Výsledky barvení preparátů jednotlivými frakcemi eluovanými ze sloupce Sephadex G-200 při hodnocení specifické fluorescence souběžně s nespecifickým přibarvením vyšetřovaných infikovaných buněk HeLa ukazují na to, že nejspecifičtější frakcí jsou IgG (graf 2).

V současné době pracujeme takto:

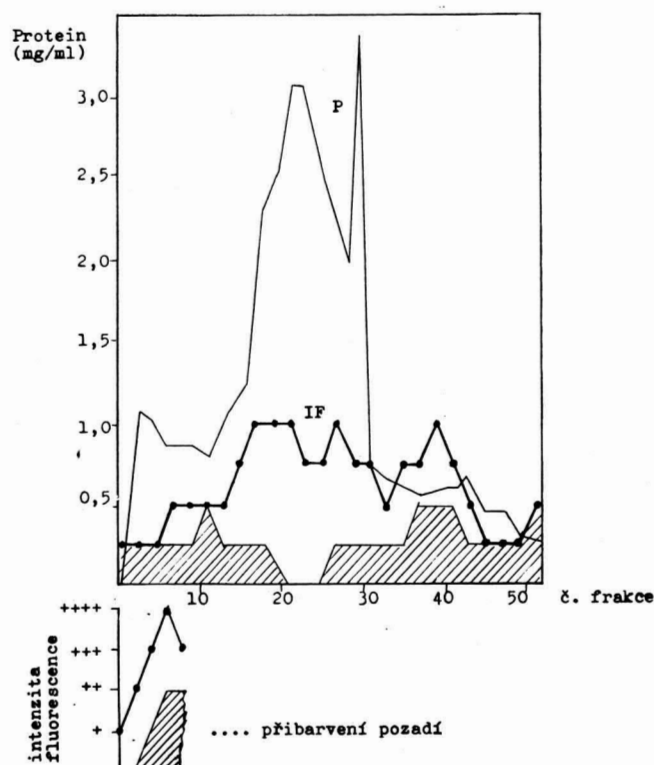
Používáme 4% nebo 2% roztok izolované bílkoviny (globulínové frakce séra). Koncentrace krystalického FITC je pouze 1,5 až 1,8 %. Reakce probíhá přes noc (18 hodin) při 4 °C v podmínkách borátového pufru o pH 9. Jednotlivé imunoglobuliny oddělíme na koloně Sephadex G-200. Jímáme frakci IgG. Získaný konjugát má nízký poměr F:P (FITC : protein) a po navázání na poxvirový antigen intenzivně specificky fluoreskuje. Nepřibarvuje příliš substrát, neobsahující virový antigen. Tato vlastnost se projevuje i při práci s leukocyty nebo makrofágy.

Technika IF barvení

Preparáty k IF vyšetření (po zaschnutí na vzduchu) zásadně fixujeme acetonem při pokojové teplotě po 10 minut. U varioly zabezpeču-

jeme plnou inaktivaci viru dodatečným ozářením preparátů UV světlem (zářivka Phillips 15 W ze vzdálenosti asi 50 cm po 20 minut). Neosvědčil se metylalkohol ani jiná silná fixační činidla, např. dioxan. Ta sice ničí životnost viru bez potřeby ozářením, ale současně i virový antigen denaturují, takže se podstatněji zmenšuje intenzita i množství specifické fluorescence.

Konjugáty k barvení vysycujeme jaterním práškem, extrahovaným acetonem, v množství 50 mg na 1 ml. Vždy titrujeme barvicí schopnost na známém materiálu, např. na infikovaných buňkách. Většinu ingrediencí je možno ředit k práci od 1:4 do 1:16. Stanovením pracovní dávky konjugátu dosahujeme maximálního kontrastu. Barvíme při pokojové teplotě za vlhka po 30 minut a po vymytí montujeme do tris-glycerinového média o pH 9 (Mrenová a



Albrecht 1966]. Konzervujeme tím fluorescenci zejména malých objektů (elementárních tělísek).

Konjugáty musí pracovat specificky (s maximální intenzitou fluorescence antigenu oproti pozadí) bez ohledu na to, zda hodláme dobarvovat či nikoli. Kontrastní barvení je významné zejména při zpracování kryotomových řezů tkáně nebo při vyšetřování biologického materiálu ještě před tím, než s ním provádíme izolační pokus.

Dříve jsme dobarvovali pomocí sulfofluoridu rodaminu, konjugovaného s albuminem [Noskov a sp. 1965, Benda a sp. 1968, Benda 1968]. Aplikovali jsme antivirový konjugát FITC ve směsi s rodaminovým albuminem ana partes, oba v pracovních ředěních. V současné době jsme však přešli na ekonomičtější dobarvování pozadí pomocí Evansovy modře [Nichols a McComb 1962] v ředění obvykle 1:50 000; na rozdíl od rodaminu-albuminu se barví dvoufázově, tj. po 30 minut s konjugátem antipoxvirovým a po vymytí 3 minuty s Evansovou modří. Barevné odtónování ve fluorescenčním mikroskopu je podobné jako při užití konjugátu albuminu s rodaminem (tedy červenavé).

Protokol paralelní titrace antipoxvirového konjugátu bez dobarvení a s dobarvením pomocí rodaminu-albuminu je zapsán v tabulce 3. Výsledky ukazují, že kontrastním barvením se snižuje titer konjugátu (jeho barvicí schopnost).

Možnosti aplikace IF metody k průkazu poxvirů a hodnocení základních fluorescenčních nálezů

K výčtu možností IF vizualizace různých forem poxvirového antigenu v biologickém ma-

teriálu poslouží nejlépe popis stadií reprodukčního cyklu viru varioly (kmene Kúrka), jak jsme jej sledovali v HeLa buňkách na krycích sklech (obr. 1—5). V iniciační fázi novotvorby viru vidíme v cytoplasmě buněk specificky fluoreskující, okrouhlé, jednotlivé i vícečetné inkluze. Odpovídají rozvoji tzv. antigenu NP [Loh a Riggs 1961] a v našem případě jsou často nacházeny v buňkách fixovaných za 10 hodin po infekci. Později přibývá v cytoplasmě homogenní fluorescence. V ní se někdy primární inkluze i jakoby rozpouštějí. V terminálním stadiu infekce začíná buňka degenerovat, virový antigen v ní přítomný fragmentuje postupně v korpusele různých rozměrů; nejmenší z nich odpovídají elementárním tělískům viru či jejich konglomerátům. Tato fáze je v popisovaném pokuse zachycena z preparátů fixovaných za 15—20 hodin po infekci.

Ve vyšetřovaném biologickém materiálu (nátery a otisky z kožních eflorescencí, buněčné suspenze z tělních tekutin, suspenze leukocytů a jiných buněk, seškraby z rohovky, mozkové otisky a tkáňové řezy) můžeme pak vizualizovat pomocí IF barvení všechny uvedené formy virového antigenu. Nejčastější a nejcharakterističtější jsou cytoplazmatické inkluze s nepatrným nebo větším homogenním zářením cytoplazmy buněk. Téměř patogenomické jsou takové nálezy v plicních makrofázích z infikovaného organismu i infikovaných *in vitro*, v Kupferových buňkách jater, v kapilárním endotelu různých orgánů, v leukocytárních koncentrátech z periferní krve nebo v leukocytech infikovaných *in vitro*. Několik nálezů je zřejmo z obrázků 6—10. V některých typech buněk nacházíme masivní cytoplazmatickou fluorescen-

Tabulka 3

Protokol z titrace barvicí schopnosti jednoho z antipoxvirových konjugátů, který byl testován na různém materiálu s obsahem homologního a heterologního (herpetického) antigenu, bez dobarvení a s dobarvením pomocí rodaminu-albuminu. Specifičnost nálezů byla ověřena paralelním použitím antiherpetického konjugátu

Materiál	Intenzita specifické fluorescence při barvení										Optimální pracovní ředění konjugátu	
	bez rodaminu					s rodaminem**)					bez rodaminu	s rodaminem
	4*)	8	16	32	64	4	8	16	32	64		
	Konjugát antivakcinální											
Dermovakcína HeLa b.	+++	+++	+++	+	+	+++	+++	+++	++	+	1:16	1:16 — 1:32
Neurovakcína otisky mozku	+++	+++	++	++	=	+++	+++	+++	++	+	1:16 — 1:32	1:16 — 1:32
Variola kmen Kúrka HeLa b.	+++	+++	+++	++	+	+++	+++	+++	+ až ++	+	1:16 — 1:32	1:16
Herpes simpl. HeLa b.	=	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—
	Konjugát antiherpetický											
Dermovakcína HeLa b.	=	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—
Herpes simpl. HeLa b.	+++	++	+	=	0	+++	+++	+	+	0	1:8	1:8

*) ředění konjugátu

= + ++ +++

intenzita specifické fluorescence

**) rodamin v jedné dávce (pracovní ředění)

ci bez dominujících inkluzí (obr. 11–13) a v okolí výsev elementárních tělísek a jejich nakupenin (obr. 14–17). V tekutině vezikul a v otiscích kožních eflorescencí zcela převládají elementární tělíska a malé korpuskule antigenu uloženého mimo buňky (obr. 18).

Při malém zvětšení můžeme pomocí IF barvení vizualizovat v tkáňových řezech a orgánových otiscích souvislé skupiny infikovaných buněk (obr. 19–21). V tkáňové kultuře na sklíčkách pak vidíme (v období od 24 do 72 hodin po nízce multiplicitní infekci) ložiska infikovaných buněk, znázorňující velmi přesně a sugestivně cytopatický efekt poxvirů. Jak je zřejmo z obrázků (22–24), můžeme využívat IF znázornění cytopatického fenoménu v kultuře i k rozlišení některých druhů skupiny Poxvirus (např. *P. variolae* a *P. officinale*).

Různé dílčí aplikační možnosti IF vizualizace poxvirového antigenu popsali Noyes a Watsonová (1955), Mims (1959), Kato a sp. (1959), Cairns (1960), Avakjan a sp. (1961), Loh a Riggs (1961), Roberts (1962), Murray (1963), Kirsch a Kissling (1963), Netter a Lapeyre (1964), Kratchko a sp. (1964), Schaeffer a sp. (1964), Bals a Caruntu (1965), Hahon (1965), Benda a sp. (1968) a jiní.

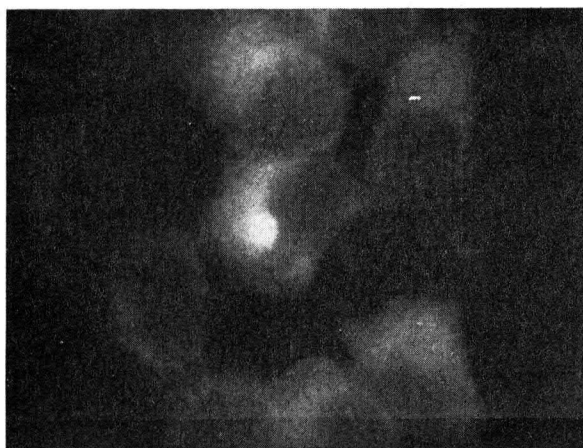
Souhrnně řečeno je základním důkazem vysoké kvality antipoxvirových konjugátů nejen jejich vysoká barvicí potencia a specifčnost [možnost jejich užívání k průkazu viru v leukocytech a makrofázích v ředěném stavu], ale i schopnost vizualizovat jimi cytoplazmatické inkluze a elementární, extracelulárně uložená virová tělíska.

Souhrn

V příspěvku jsou shrnuty několikaleté zkušenosti s IF metodou průkazu poxvirů. Je popsána příprava a laboratorní kontrola ingrediencí, jsou uvedeny osvědčené barvicí postupy a krátce jsou shrnuty rovněž možnosti aplikace přímé IF metody při výzkumné a diagnostické práci s poxviry.

Literatura

- Avakjan, A. A., Altštejn, A. D., Kirillova, F. M., Bykovskij, A. F.: Puti usoveršenstvovanija laboratornoj diagnostiki ospy. Vopr. virusol. 1961, 7: 196–203.
- Bals, M., Caruntu, F.: Contribution to the rapid diagnosis by immunofluorescence of infection and immunity in variola-vaccinia. Rev. Roum. D'Inframicrob. 1965, 2: 187–193.
- Baumstark, J. S., Laffin, R. J., Bardawill, W. A.: A preparative method for the separation of 7S gamma globulin from human serum. Arch. Biochem. Biophys. 1964, 108: 514–522.
- Benda, R.: Užití albuminu značeného sulfofluoridem rodaminu ke kontrastnímu barvení při imunofluorescenčním průkazu virů. Čs. Epidem. 1968, 17: 276–279.
- Benda, R., Noskov, F. S., Daneš, L., Serbezov, V. S., Goldin, R. B.: Visualization by immunofluorescence of elementary bodies and their aggregates in materials from skin lesions in poxvirus infections. Acta virologica 1968, 12: 229–232.
- Cairns, J.: The initiation of vaccinia infection. Virology 1960, 11: 603–623.
- Carter, G. B.: The rapid detection, titration and differentiation of variola and vaccinia viruses by a fluorescent antibody-coverslip cell monolayer system. Virology 1965, 25: 659–661.
- Hahon, N.: Assay of variola virus by the fluorescent cell-counting technique. Appl. Microb. 1965, 13: 865 až 871.
- Jobbágy, A., Király, K.: Chemical characterization of fluorescein isothiocyanate-protein conjugates. Biochem. Biophys. Acta 1966, 124: 166–175.
- Kato, S., Takamashi, M., Kameyama, S., Kamahora, J.: A study of new inclusion bodies of cowpox virus. Biken J. 1959, 2: 93–96.
- Kato, S., Takamashi, M., Kameyama, S., Kamahora, J.: A study on the morphology and cytoimmunological relationship between the inclusions of variola, cowpox, rabbitpox, vaccinia (variola origin) and vaccinia IHD and a consideration of the term „Guarnieri body“. Biken J. 1959, 2: 353–363.
- Kirsh, D., Kissling, R.: The use of immunofluorescence in the rapid diagnosis of variola. Bull. W.H.O. 1963, 29: 126–128.
- Kratchko, A., Netter, R., Thivolet, J.: Méthode rapide de recherche du virus vaccinal par mise en culture sur cellules et identification par immunofluorescence directe. Ann. Inst. Pasteur 1964, 107: 184–191.
- Loh, P. C., Riggs, J. L.: Demonstration of the sequential development of vaccinia antigens and virus in infected cells: observation with cytochemical and differential fluorescent procedures. J. Exp. Med. 1961, 114: 149–160.
- Mims, C. A.: The response of mice to large intravenous injections of ectromelia virus. I. The fate of injected virus. II. The growth of virus in the liver. Brit. J. Exp. Pathol. 1959, 40: 533–542 and 453–550.
- Mřenová, M., Albrecht, P.: Stabilization of fluorescence in prepreparates treated by the fluorescent antibody technique. Nature 1966, 212: 1256–1257.
- Murray, H. G. S.: The diagnosis of smallpox by immunofluorescence. Lancet 1963, I (April): 847–848.
- Netter, R., Lapeyre, D.: La diagnostique de la variole au laboratoire. Rev. Hyg. Med. Soc. 1964, 12: 475 až 490.
- Nichols, R. L., McComb, D. E.: Immunofluorescent studies with trachoma and related antigens. J. Immunol. 1962, 89: 545–554.
- Noskov, F. S., Boldasov, V. K., Goldin, R. B., Jermakov, N. V., Volkova, L. A.: Kontrastnyj sposob immunofluorescentnogo vyjavlenija adenovirusov v kultuře kletok počki morskoy svinki. Vopr. virusol. 1965, 10: 613–614.
- Noyes, W. F., Watson, B. K.: Studies on the increase of vaccine virus in cultured human cells by means of the fluorescent antibody technique. J. Exp. Med. 1955, 102: 237–241.
- Orndorff, W. R., Hemmer, A. J.: Fluorescein and some of its derivatives. J. Am. Chem. Soc. 1927, 49: 1272.
- Roberts, J. A.: Histopathogenesis of mousepox. I. Respiratory infection. II. Cutaneous infection. Brit. J. Exp. Pathol. 1962, 43: 451–461 and 462–468.
- Schaeffer, M., Orsi, E. V., Widelock, D.: Applications of immunofluorescence in public health virology. Bact. Rev. 1964, 28: 402–408.



Obr. 1

HeLa buňky za 10 hodin po vysoce multiplinitní infekci virem varioly. Kulatá fluoreskující cytoplazmatická inkluze v jedné z buněk. Zvětš. asi 1500krát



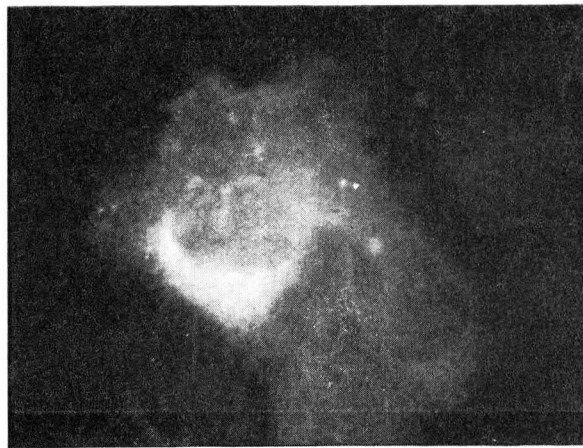
Obr. 2

HeLa buňky za 15 hodin po infekci virem varioly. Tři různé veliké, marginálně dezintegrované a specificky fluoreskující cytoplazmatické inkluze v mírně fluoreskující cytoplazmě jedné z buněk zorného pole. Zvětš. asi 1500krát



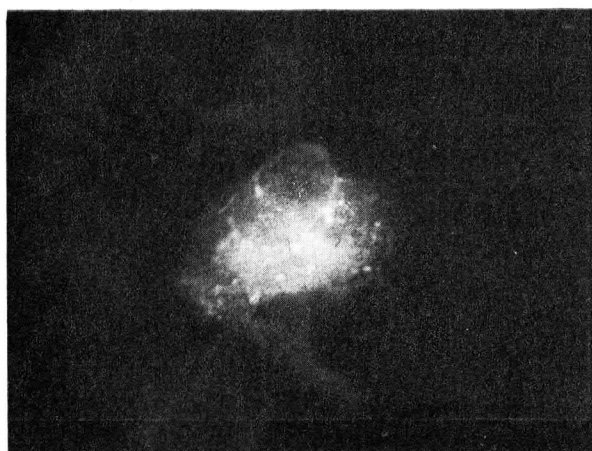
Obr. 3

HeLa buňky za 15 hodin po infekci virem varioly. Intenzivně fluoreskující perinukleární zóna buňky s „rozpouštějící“ se inkluzí dále v cytoplazmě. Zvětš. asi 1500krát



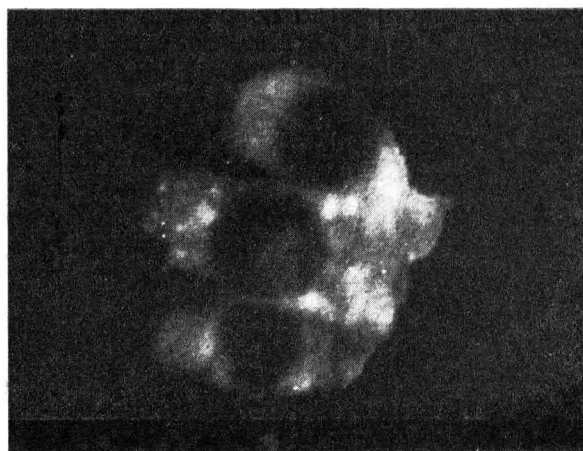
Obr. 4

HeLa buňky za 15 hodin po infekci virem varioly. Pokročilejší stadium rozvoje specifického antigenu v jedné z buněk – počínající fragmentace antigenu cytoplazmy. Zvětš. asi 1500krát



Obr. 5

HeLa buňky za 20 hodin po infekci virem varioly. Korpuskulární fluorescence v jedné z buněk, která má již poškozenou buněčnou membránu. Zvětš. asi 1500 krát



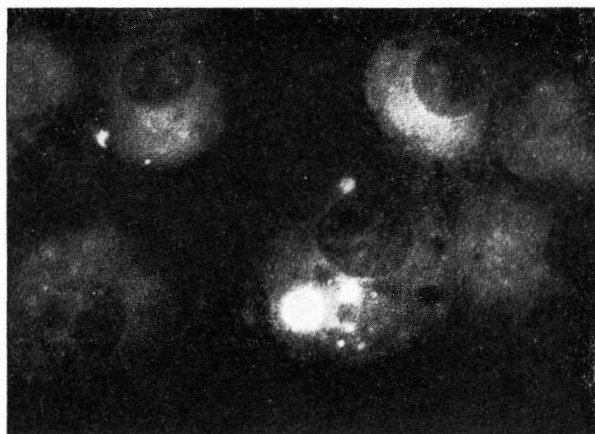
Obr. 6

Skupina tří epitelálních specificky fluoreskujících buněk z výplachu plic králíka, který byl před šesti dny infikován masivně aerosolem z viru dermovakcíny. Nezřetelné inkluze v buňkách. Zvětš. asi 1200krát



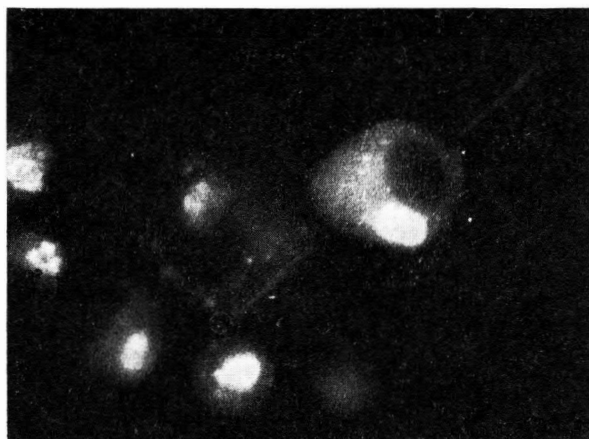
Obr. 7

Dvě primární cytoplazmatické inkluze v jedné z velkých buněk kultury tzv. plicních makrofágů, které byly in vitro infikovány před dvěma dny virem králičí neurovaccíny. Zvětš. asi 1200krát



Obr. 8

Vícečetné cytoplazmatické inkluze v jedné z buněk kultury králičích plicních makrofágů, získaných z imunního zvířete a infikovaných před dvěma dny virem králičí neurovaccíny. Zvětš. asi 1200krát



Obr. 9

Několik buněk výplachu plic králíka, infikovaného před několika dny inhalačně virem králičí neurovaccíny. Zvětš. asi 1200krát



Obr. 10

Specificky fluoreskující inkluze v lymfocytu z periferní krve králíka infikovaného před šesti dny virem králičí neurovaccíny. Zvětš. asi 1200krát



Obr. 11

Dvojice epitelálních buněk se specificky fluoreskujícím antigenem v cytoplasmě ze seškrabu spodiny tuhé papuly opice Rhesus, která byla před sedmi dny intrakutánně infikována virem varioly. Zvětš. asi 1500krát



Obr. 12

Specificky fluoreskující skupina buněk seškrabu z rohovky králíka, který byl korneálně infikován virem dermovaccíny. Zvětš. asi 1500krát



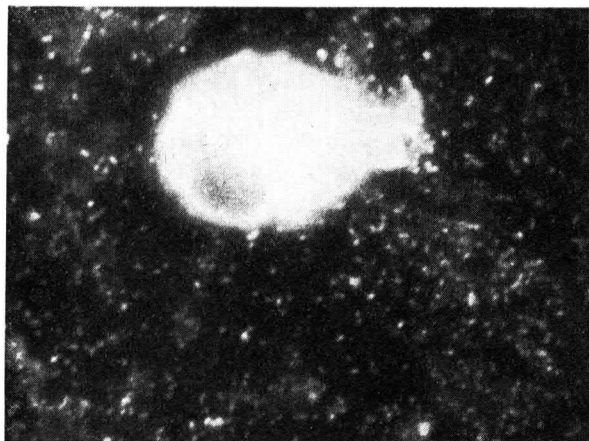
Obr. 13

Specificky fluoreskující HeLa buňky, infikované na krycím skle virem vakcíny, izolovaným z pacienta na virologickém oddělení KHES v Ostravě. 48 hodin po infekci, nález při IF identifikaci kmene. Zvětš. asi 1200krát



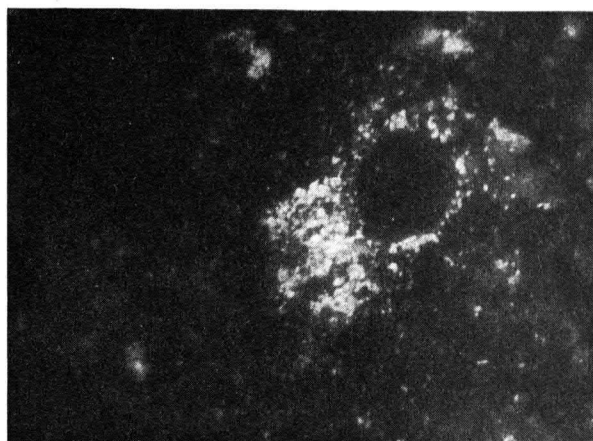
Obr. 14

Specificky fluoreskující buňka seškrabu rohovky králíka, který byl korneálně infikován virem dermovakcíny; v okolí buňky je dobře vidět elementární virová tělíska. Zvětš. asi 1500krát



Obr. 15

Specificky fluoreskující antigen *P. officinale* v epitelioidní buňce plovoucí v tekutině z čerstvé vezikuly králíka. V okolí buňky jsou početné fluoreskující korpulkule, představující extracelulární virový materiál. Zvětš. asi 1600krát



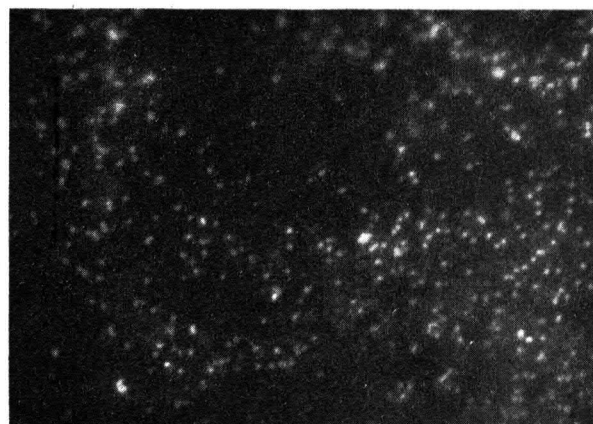
Obr. 16

Specifická fluorescence v otisku z mozku myšky, která byla očkována i. cer virem neurovakcíny. Neurální buňka, naplněná korpulkulemi antigenu; korpulkule se vyskytují i v okolí buňky a jenom někde mají vzezření elementárních virových tělísek. Zvětš. asi 1500krát



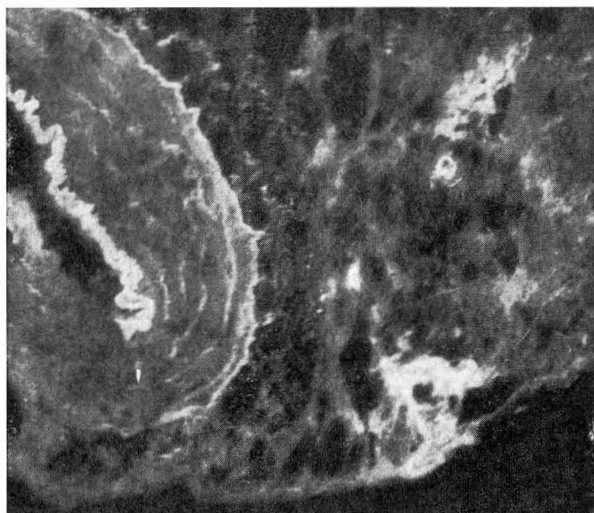
Obr. 17

Granulocyt, obsahující v cytoplasmě fluoreskující antigen viru varioly, se specificky fluoreskujícími, většinou velikými korpulkulemi v okolí. Zorné pole z preparátu, který byl pořízen seškrabem spodiny tuhého infiltrátu opice Rhesus, infikované před sedmi dny mnohotnými intrakutánními vpichy. Zvětš. asi 1600krát



Obr. 18

Specificky fluoreskující extracelulární korpulkule, většinou menších rozměrů, v preparátu z rozetřeného punktátu tuhé papuly opice Rhesus, infikované před sedmi dny virem varioly. Zvětš. asi 1600krát



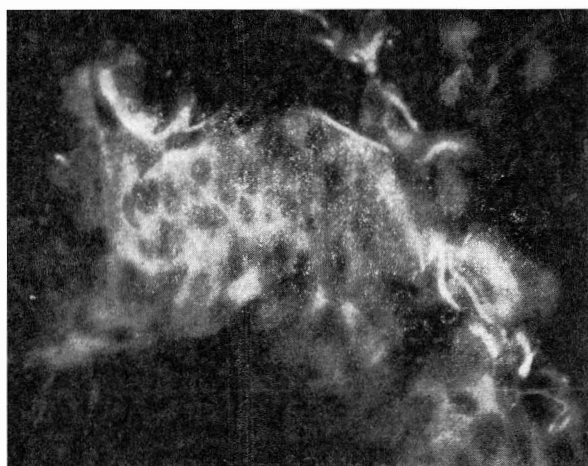
Obr. 19

Rez plícemi králíka, infikovaného před čtyřmi dny středně vysokou dávkou viru králičí neurovakučiny ve formě aerosolu. Dvě fluoreskující ložiska s arteriolou v blízkosti velké arterie, jejíž vnitřní intima září nespecificky (oranžově), zatímco povrchové vrstvy stěny vykazují – podobně jako ostatní místa řezu – specifickou fluorescenci. Zvětš. asi 200 krát



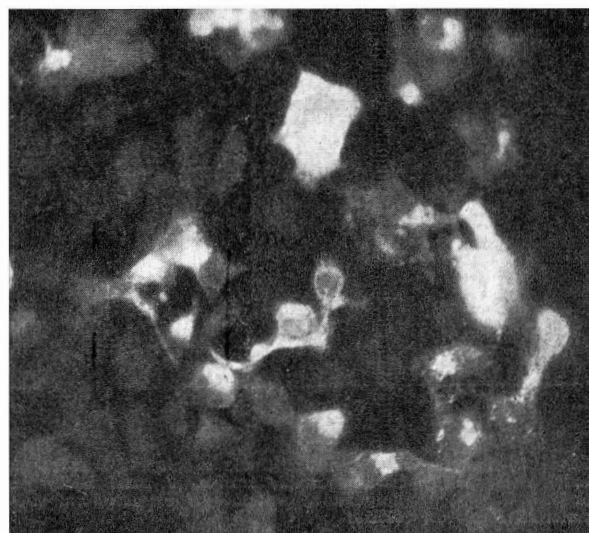
Obr. 20

Rez plícemi králíka, infikovaného před dvěma dny středně vysokou dávkou viru králičí neurovakučiny ve formě aerosolu. Fluorescence větviček se bronchiolů, které byly histologicky identifikovány pomocí následného dobarvení hematoxylinem a eozinem. Zvětš. asi 650 krát



Obr. 21

Rez plícemi králíka infikovaného inhalačně před čtyřmi dny středně vysokou dávkou viru králičí neurovakučiny. V obrázku je detail z vícevrstvého bronchu s postiženými a specificky fluoreskujícími buňkami. Zvětš. asi 800krát



Obr. 22

Cytopatický efekt viru dermovakučiny v HeLa buňkách, vizualizovaný pomocí IF. Nález za 40 hodin po níže multiplicitní infekci. Zvětš. asi 350–400krát



Obr. 23

Cytopatický efekt viru varioly v HeLa buňkách, vizualizovaný pomocí IF. Nález za 48 hodin po níže multiplicitní infekci. Na obr. v rohu je vidět jednu sekundárně infikovanou buňku. Zvětš. asi 350krát



Obr. 24

Cytopatický efekt viru varioly v HeLa buňkách, vizualizovaný pomocí IF. Typický tzv. proliferativní uzlík. Zvětš. asi 350krát