

537.533.35 „1973/1983“

10 LET ELEKTRONOVÉ MIKROSKOPIE — PŘÍSTUPY A VÝSLEDKY

MUDr. Alexandra SEICHERTOVÁ

Vojenský ústav hygieny, epidemiologie a mikrobiologie Praha

(náčelník: plk. MUDr. Vladimír Kotlář, CSc.)

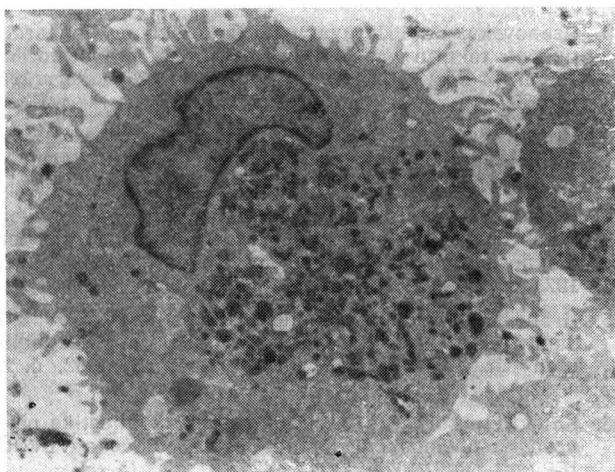
Elektronová mikroskopie patří k nejúspěšnějším metodám moderní biologie. O jejím významu v mikrobiologii a zejména ve virologii netřeba psát, některé možnosti vyplynou i z této zprávy. Je to již 12 let od ustavení laboratoře elektronové mikroskopie (EM) ve VÚHEM, první tři roky v rámci oddělení experimentálně patologického a dále až dosud jako samostatné morfologické jednotky při stálém personálním složení. 10 let jsme pracovali s japonským transmisním elektronovým mikroskopem (EM) JEM 7A a uváděné obrázky byly zhotoveny tímto přístrojem.

Úvodem bych chtěla shrnout hlavní přístupy v práci laboratoře EM za uplynulé období. Po zvládnutí základních laboratorních metodik, ovládnutí přístrojového vybavení a zhotovování fotodokumentace se práce laboratoře EM zaměřila na sledování rozvoje infekce různými skupinami virů po inhalační nákaze; nejdříve byly zpracovány pokusy in vitro, později in vivo a tato práce byla cílena zejména na studium interakce různých virů s některými buňkami. Po těchto experimentech byly zavedeny dvě nové metody: metoda negativního barvení a metoda

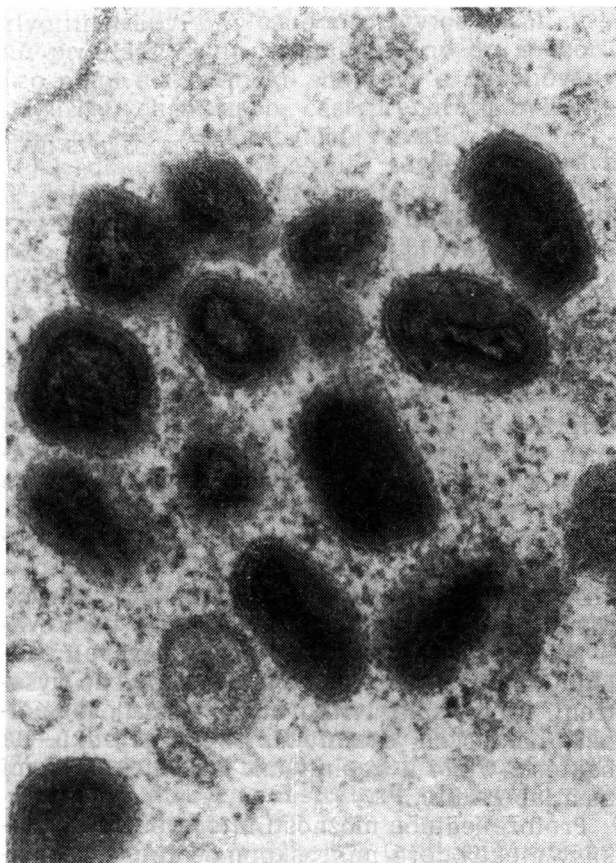
přípravy a krájení ultratenkých zmrazených řezů. První metodu jsme používali a používáme dosud při studiu virových hepatitid, což je hlavní náplní laboratoře EM posledních let. Převážná většina prací byla umožněna spoluprací s virology, zejména pod vedením plk. MUDr. Rudolfa Bendy, CSc. Vzhledem k servisnímu charakteru laboratoře EM jsme pocítovali jako nedostatek, že jsme nezpracovávali uceleně bakterie pro elektronmikroskopické vyšetření. Proto jsme uvítali možnost sledovat účinek některých dezinfekčních prostředků na bakterie v EM a doplnit tak metodické zázemí naší laboratoře.

Protože jedinou možností interpretace výsledků v elektronové mikroskopii je fotodokumentace, chtěla bych na obrazové příloze přiblížit některé výsledky uvedených přístupů. V pokusech in vitro jsme sledovali rozvoj infekce Poxvirus officinale v kultuře alveolárních makrofágů elektronovým mikroskopem. Hodnotili jsme buněčné populace získané výplachem plic králíků, které byly infikovány dvěma rozdílnými kmeny Poxvirus officinale, dermolapinou a nerolapinou v osmi časových intervalech do 72

hodin po infekci. Rozdíly v interakci obou kmenů byly porovnávány kvalitativně i kvantitativně. Na obr. 1 je makrofág obsahující zralé i ne-

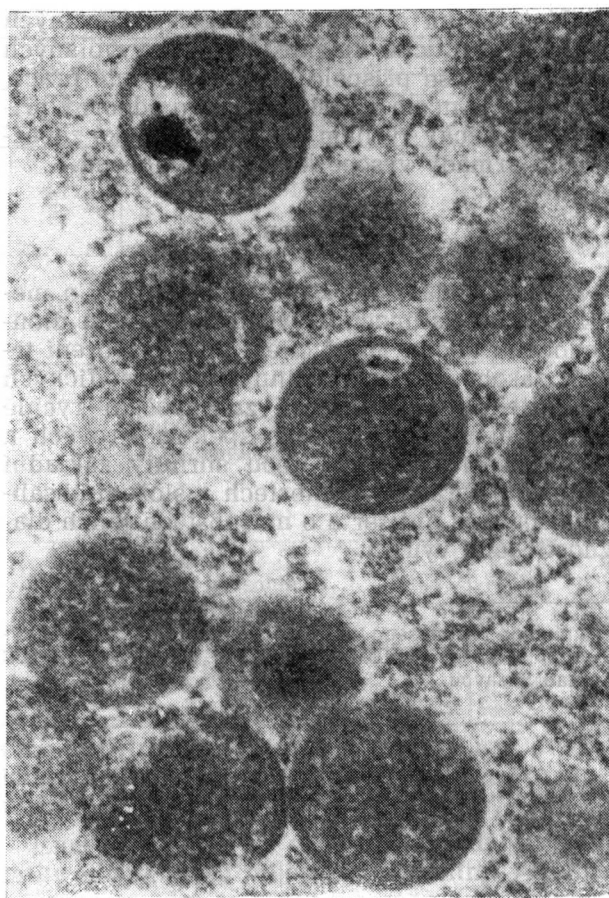


Obr. 1. Alveolární makrofág 48 hodin po infekci neurolymphotropickým virem, nezralé částice vakcinálního viru jsou přítomny v cytoplasmě, zralé viriony jsou hlavně na povrchu buňky mezi mikrovilky. Zvětšení 10 000krát

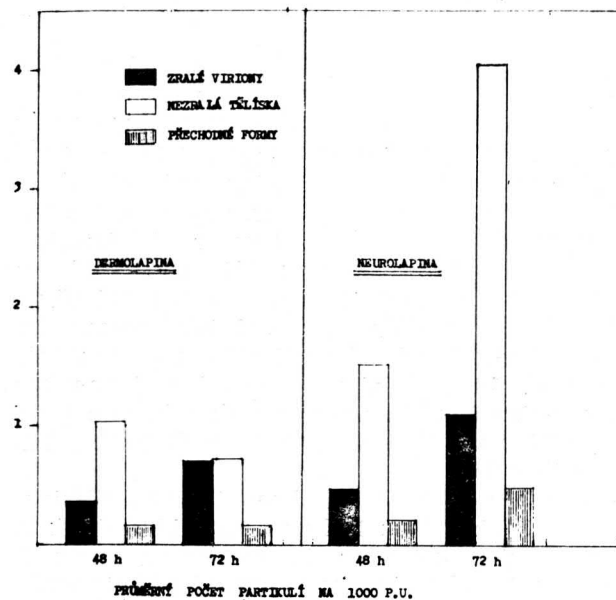


Obr. 2. Zralé částice vakcinálního viru v cytoplasmě alveolárního makrofága 72 hodin po infekci neurolymphotropickým virem. Zvětšení 80 000krát

zralé částice vakcinálního viru, na obr. 2 jsou ukázány zralé částice v cytoplasmě alveolárního makrofága a na obr. 3 jsou demonstrovány nezralé částice uvedeného viru. Zjistili jsme, že buňky, ve kterých byl virus nalezen, měly vý-



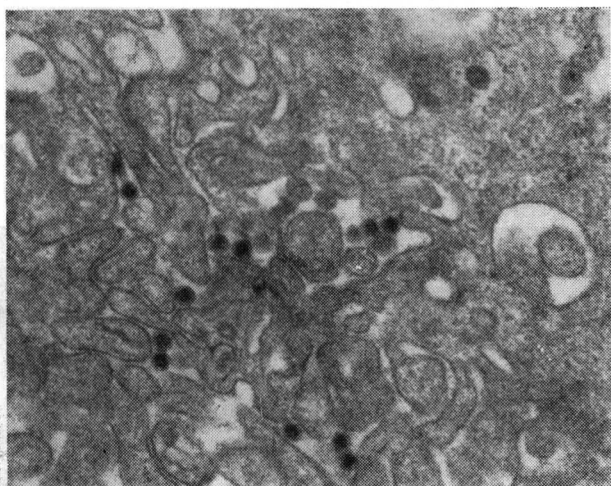
Obr. 3. Nezralé částice vakcinálního viru v cytoplasmě alveolárního makrofága 72 hodin po infekci dermolapinovým virem. Zvětšení 80 000krát



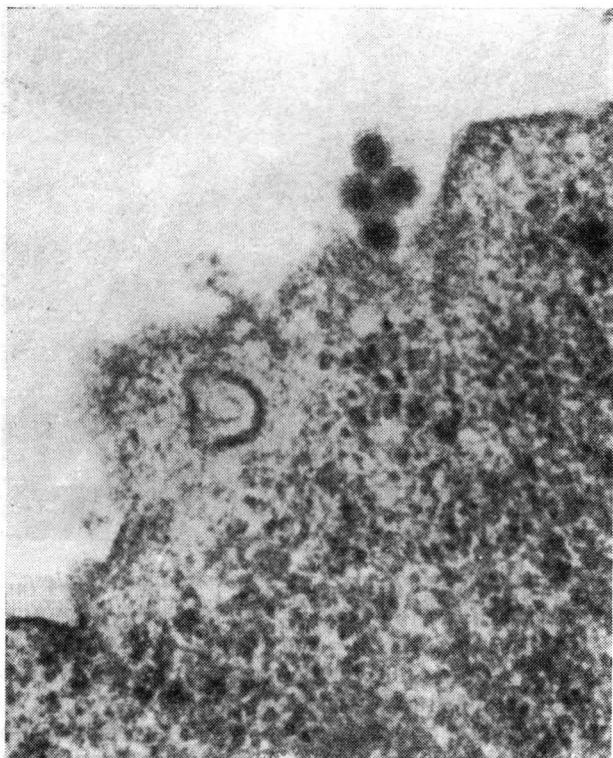
Obr. 4. Průměrný počet virových částic zachycených v cytoplasmě makrofágů na 1000 p.u. ve dvou časových intervalech při infekci dermolapinovým a neurolymphotropickým virem. Plný sloupec: zralé částice
Prázdný sloupec: nezralé částice
Šrafovaný sloupec: přechodné formy
P.u.: planimetrická jednotka při zvětšení 6000krát
Abscisa: časový interval od inokulace v hodinách
Ordinata: počet partikulí na 1000 p.u.

hradně charakter makrofágů a rozdíly mezi účinkem obou kmenů byly jen kvantitativní, a to ve prospěch neuropilapiny; na obr. 4 je kvantitativní vyhodnocení pomocí planimetru: zastoupení vývojových forem vakcinálního viru v průběhu replikačního cyklu.

Pozoruhodnou prací z tohoto období byla elektronmikroskopická demonstrace viru Krymské hemorrahické horečky v opičích buňkách linie CV-1. Virus Krymské hemorrahické horečky (KHH) jsme v tkáňových kulturách v EM zobrazili poprvé (obr. 5). Ve všech zpra-

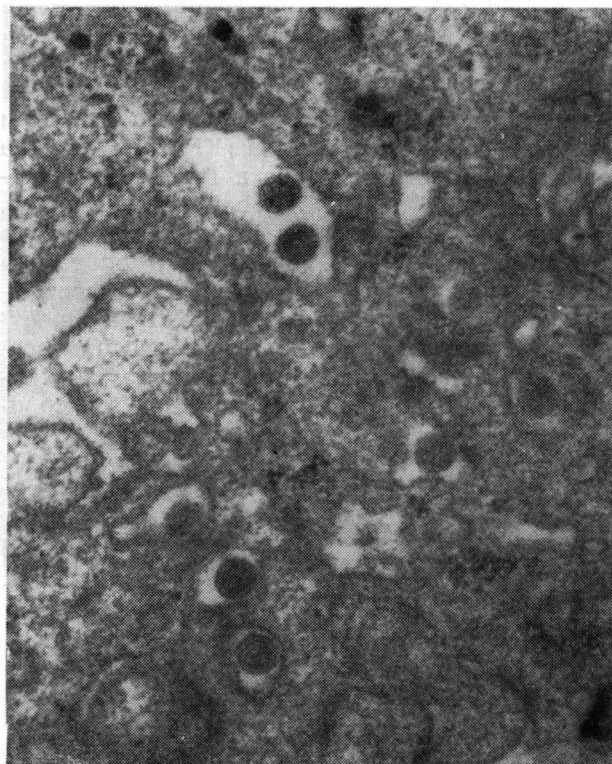


Obr. 5. Částice viru Krymské hemorrahické horečky (KHH) 1. a 2. typu s obsahem různé elektrondensity v buňce a mezi buňkami linie CV-1 72 hodin po infekci. Zvětšení 76 250krát

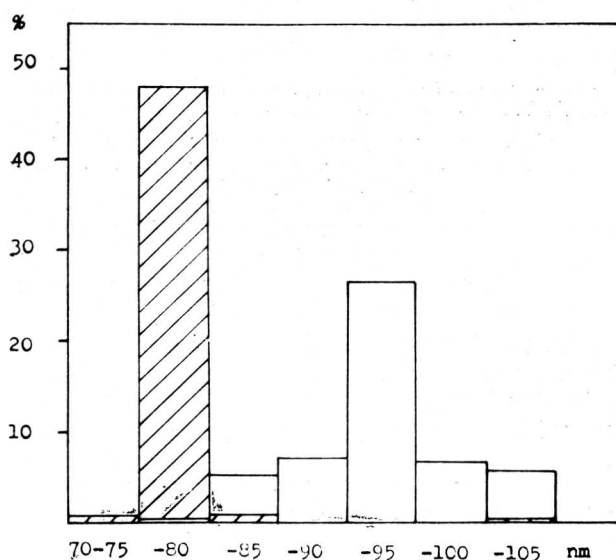


Obr. 6. Čtyři extracelulárně lokalizované částice viru KHH 1. typu 48 hodin po infekci. Zvětšení 76 250krát

covávaných časových intervalech jsme našli částice dvojího typu intra i extracelulárně. Na základě měření jejich velikosti a vzhledem k densitě jejich obsahu jsme mohli opravdu vymezit předtím nepopsané dva typy částic (obr. 6, 7), pravděpodobně prezentující různé fáze reprodukčního cyklu viru KHH. Na obr. 8 je uveden frekvenční histogram znázorňující roz-



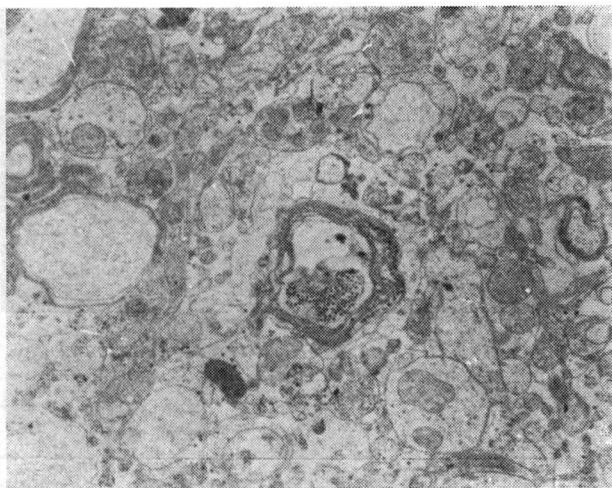
Obr. 7. Částice viru KHH 2. typu lokalizované v cytoplazmatických vřecích 24 hodin po infekci. Zvětšení 76 250krát



Obr. 8. Frekvenční histogram znázorňující rozložení velikostí virových částic. Šrafovaný sloupec: částice se zřetelným nukleoidem. Prázdný sloupec: částice s kolísající densitou obsahu nukleoidu.

ložení velikosti virových částic: šrafované sloupce vyjadřují procentuální zastoupení částic se zřetelným nukleoidem, prázdné sloupce znamenají částice s kolísající densitou obsahu nukleoidu. Zřetelně dvouvrcholová distribuce velikosti částic spolu s rozdíly v densitě jejich obsahu nám dovolila uzavřít, že se skutečně jedná o dva distinktně rozlišitelné typy.

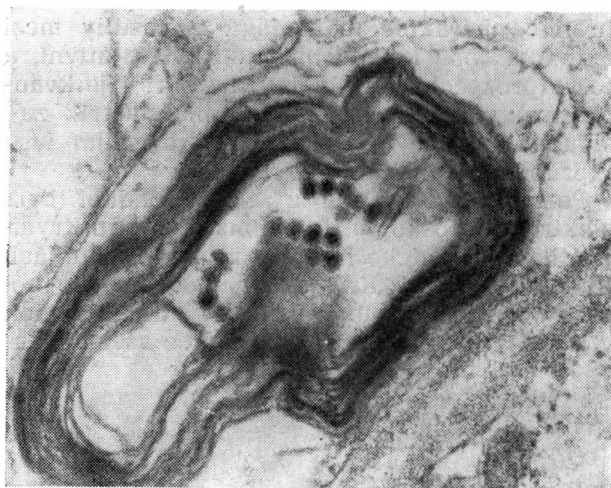
Po experimentech in vitro následovaly pokusy in vivo zaměřené na elektronmikroskopické sledování infekce arbovirů po inhalační nákaze v čichové dráze. Pracovali jsme s experimentálně infikovanými opicemi virem Venezuelské encefalomyelitidy koní (VEE) a křečky virem choroby Kyasanurského lesa (KFD). V EM jsme vyšetřovali čichový bulbus a traktus infikovaných zvířat. Virus VEE, jehož kulaté částice, kde vnější vrstva virionu je tvořena jednoduchou elektrondensní membránou oddělenou méně densní vrstvou stejné tloušťky od centrálního nukleoidu, průměrné velikosti 50 nm, byl nejčastěji lokalizován v extracelulárním prostoru (obr. 9) a hlavně v myelinizovaných vláknech (obr. 10), což ukazuje na šíření tohoto vi-



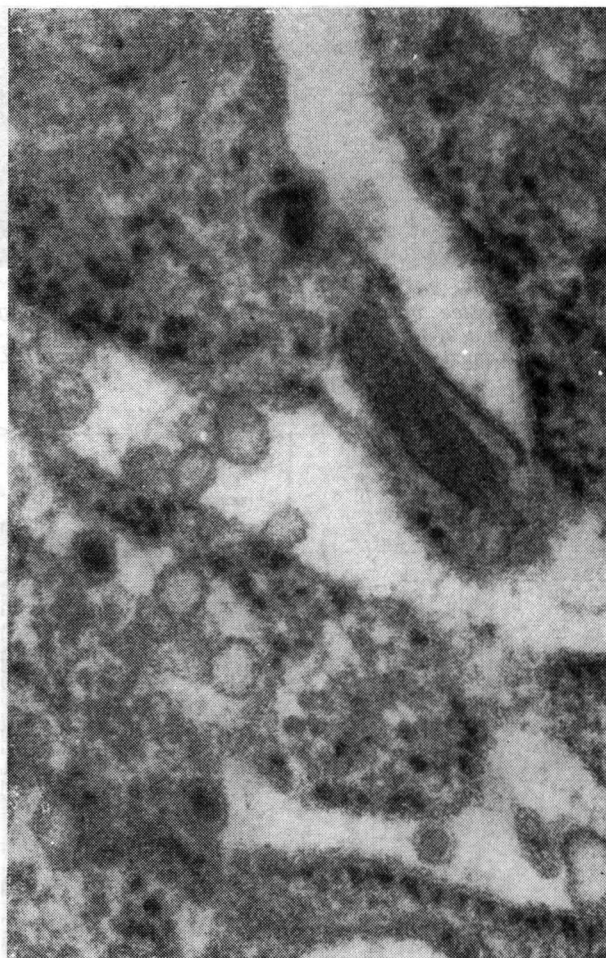
Obr. 9. Čichový bulbus opice intranasálně infikované virem Venezuelské encefalomyelitidy koní (VEE); 3. den po infekci. Viriony VEE se nacházejí v myelinizovaném vláknu uprostřed obrázku a v extracelulárním prostoru. Zvětšení 18 000krát.

ru v čichovém bulbu a traktu. Virus KFD, průměrné velikosti 40 nm, jsme našli většinou jednotlivě ve vakuolách a cisternách endoplazmatického retikula neuronů (obr. 11) spolu s četnými shluky membránou ohraničených váčků a vakuol (obr. 12). Tento virus jsme také našli v krystaloidním uspořádání v pericytu krevní kapiláry, což byl výjimečný nález ukazující schopnost viru KFD množit se v tomto druhu buňky a možnost přestupu viru do CNS z krevní kapiláry (obr. 13). Mimo tento nález jsme poprvé zobrazili virus KFD v EM vůbec.

Na obr. 14 je po pozitivním barvení a na obr. 15 po negativním barvení zobrazen vakcinální virus z infikované buněčné suspenze při použití nově zavedené metody ultratenkých zmrazených řezů. Touto metodou se zabýval s. Miloš Novák,



Obr. 10. Viriony VEE v myelinizovaném vláknu čichového bulbu 3. den po infekci. Zvětšení 120 000krát



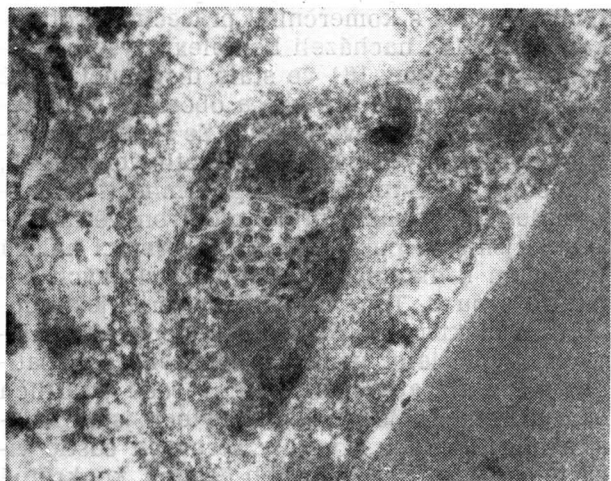
Obr. 11. Tři částice viru choroby Kyasanurského lesa (KFD) v rozšířeném endoplazmatickém retikulu neuronu. Zvětšení 164 000krát

který je i autorem vylepšení — zavedením polyetylen glykolu ke zpevnění vzorku.

Další nově zavedenou metodu — negativního barvení, která přešla do rutinního používání v laboratoři EM, budu dokumentovat na obrázcích ze studia virových hepatitid v EM při vi-



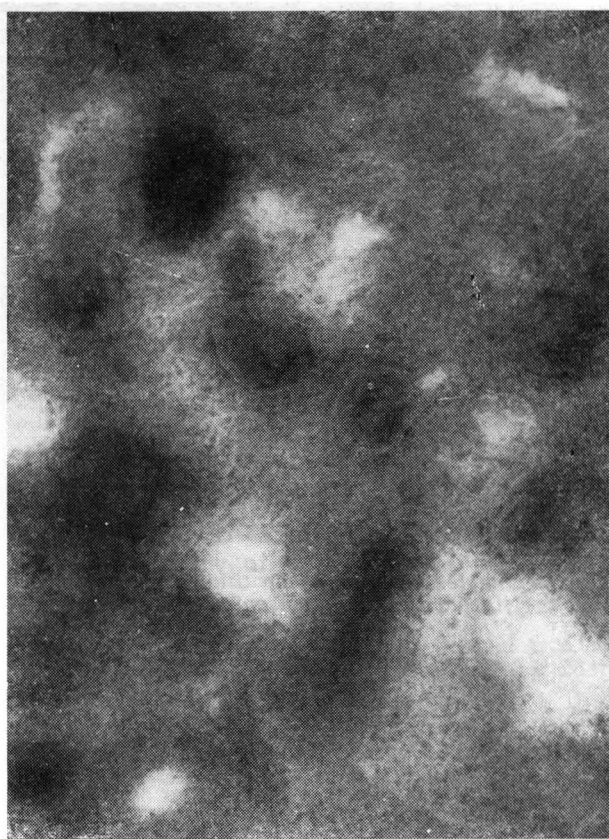
Obr. 12. Čtyři viriony KFD v rozšířeném endoplazmatickém retikulu a četné membránou ohraničené váčky a malé vakuoly; mezi nimi jedna částice viru KFD.
Zvětšení 125 000krát



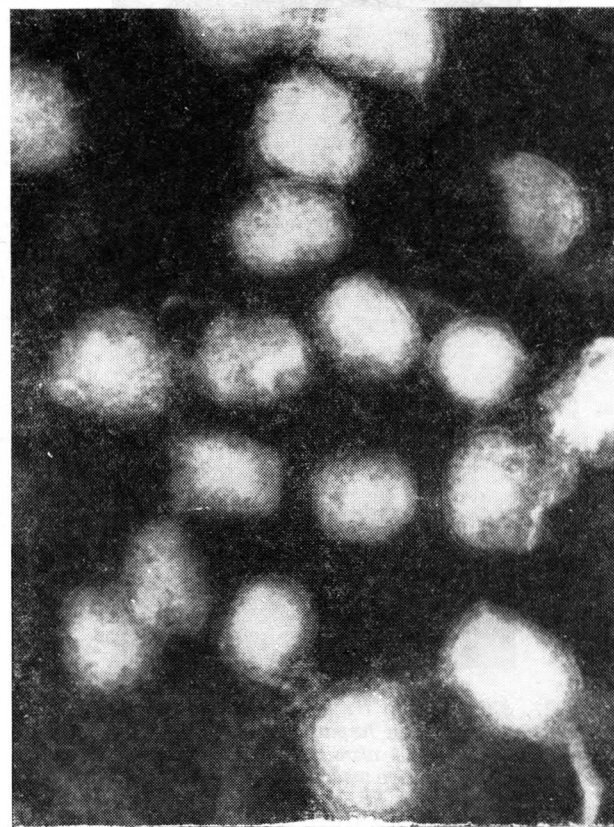
Obr. 13. Viriony KFD v krystaloidním uspořádání v cytoplasmě pericytu čichového bulbu křečka; 7. den po intranasální infekci. Zvětšení 108 000krát

zualizaci částic v sérech a ve stolicových filtrátech pacientů. Ve stolicových filtrátech se nám podařilo pomocí imunoelektronové mikroskopie zobrazit shluky virů hepatitidy A uniformní velikosti 27–28 nm kulatých částic převážně elektrondensního obsahu (obr. 16) a tím spolu se sérologickým vyšetřením potvrdit etiologii žloutenkové epidemie v létě 1979 v ČSLA.

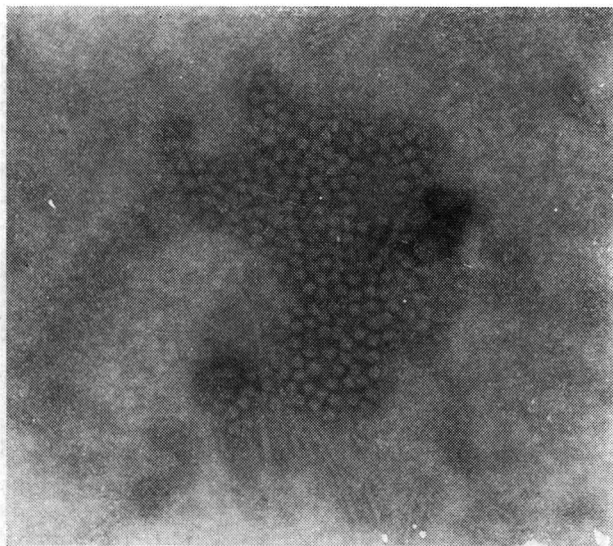
Od r. 1976 se zabýváme detekcí částic speci-



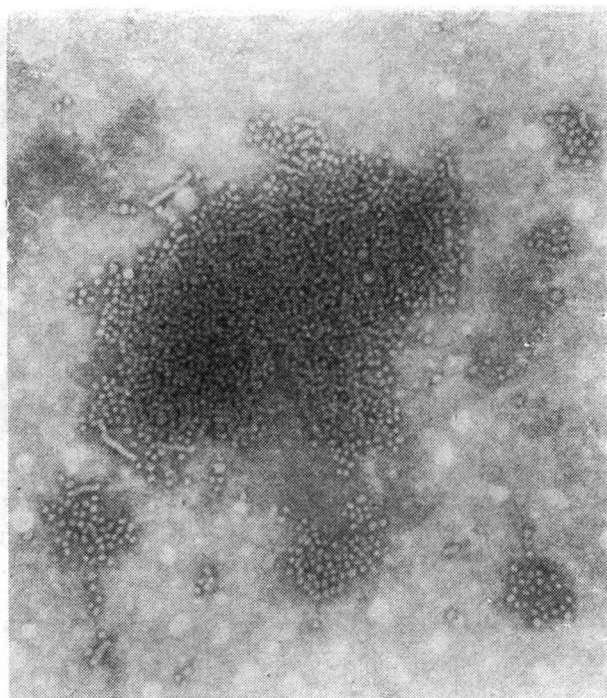
Obr. 14. Zralé částice vakcinálního viru v diploidních buňkách LEP 24 hodin po infekci. Zvětšení 65 000krát



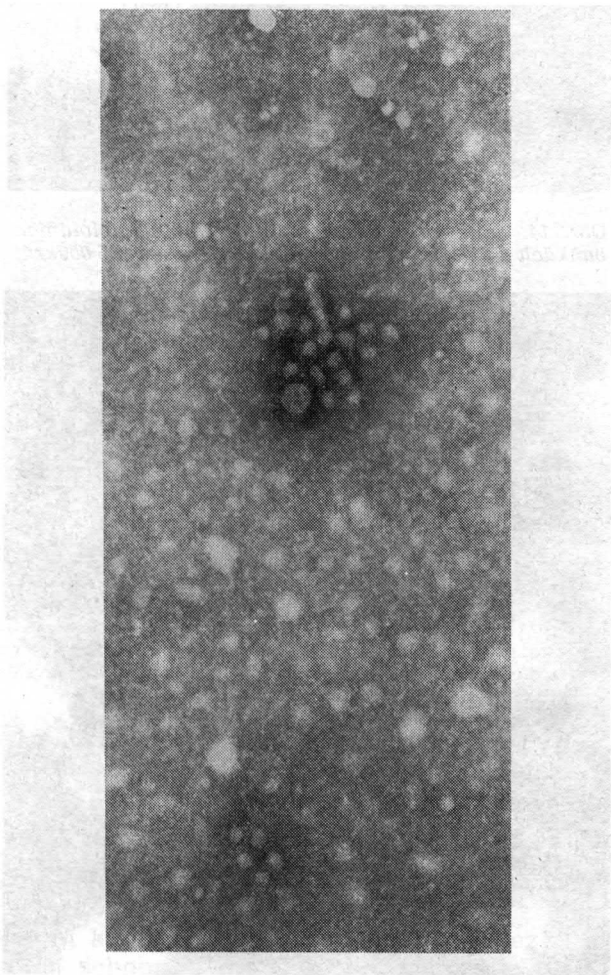
Obr. 15. Zralé částice viru vakcinie v diploidních buňkách LEP 24 hodin po infekci a po negativním barvení. Zvětšení 65 000krát



Obr. 16. Komplex částic viru hepatitidy A ze stolicového filtrátu pacienta. Zvětšení 120 000krát



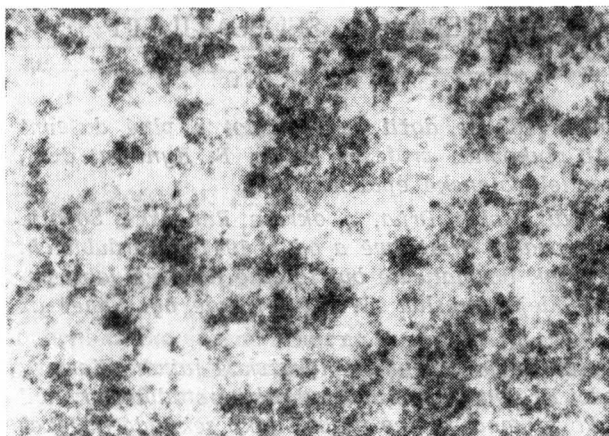
Obr. 18. Imunokomplex ze séra pacienta, ke kterému byly přidány specifické protilátky: jsou přítomny všechny tři morfologické formy, nejpočetnější jsou malé částice. Zvětšení 67 600krát



Obr. 17. Shluk všech tří morfologických forem HBsAg (povrchový antigen hepatitidy B), resp. HBV (virus hepatitidy B): malé okrouhlé částice, jedno vlákno a jedna Daneova částice v séru pacienta. Zvětšení 91 000krát

fických pro hepatitidu B v EM. Na obr. 17 jsou všechny tři morfologické entity zachycené v séru pacienta infikovaného virem hepatitidy B: Daneova částice veliká 42—45 nm (původce he-

patitidy B) a povrchové antigeny partikulárního charakteru — malé částice 17—22 nm a vlákno stejného průřezu, ale dlouhé v některých případech až několik set nm. Při studiu hepatitidy B jsme používali také imunoelektronovou mikroskopii, kdy jsme po inkubaci infekčního séra s komerčními prasečími protilátkami anti-HBs nacházeli komplexy výše uvedených částic (obr. 18) ve stálé distribuci: malé částice v naprosté převaze a občas se vyskytující vlákna a Daneovy částice. Ze sledované distribuce ukázaných částic v jednotlivých sérech, z hustoty výskytu částic a přítomnosti imunokomplexů při použití přímé elektronové mikroskopie jsme se pokoušeli o interpretaci nálezů vzhledem k diagnóze a prognóze virových hepatitid typu B. Toto vyšetřování jsme ještě doplnili o elektronmikroskopické sledování jehlových biopsií jater pacientů postižených hepatitidou B z ultratenkých řezů; v řadě jaterních vzorků, resp. v jejich hepatocytech jsme našli morfologické koreláty sérových částic viru hepatitidy B (Daneových částic), konkrétně jejich nukleokapsidy (obr. 19) jako 21—25 nm veliké neobalené částice. Nálezy v EM vyšetřovaných jehlových biopsií jater pacientů a nálezy v EM vyšetřovaných sérech těchto jsme pak uváděli do vztahu k závěrečným klinickým diagnózám jednotlivých pacientů. Potvrdil se, mimo jiné, zásadní předpoklad, že výskyt nukleokapsid v jádrech hepatocytů se vztahuje k neustálé replikaci infekčního viru a jeho uvolňování, to se obráží zvýšeným výskytem Daneových částic, případně imunokomplexů v séru. Dosavadní výsledky a zkušenosti význačně přispívají nejen k upřesnění diagnózy u jedno-



Obr. 19. Část jádra hepatocytu, kde jsou přítomny nukleokapsidy viru hepatitidy B. Zvětšení 100 000krát

vých nemocných, ale umožňují provést i některé obecné závěry týkající se diagnostického významu použitých metod vyšetřování a také kategorizace pacientů do skupin s chronickými formami virové hepatitidy B.

Uvedené výsledky jsou dokladem toho, že elektronový mikroskop je ve virologii nejen nezbytným nástrojem morfologické analýzy kvalitativní i kvantitativní, ale také slouží k zpřesnění a správné interpretaci faktů objevených jinými metodikami a přináší jejich konečný důkaz.

Souhrn

Ve zprávě je shrnuto zaměření a činnost laboratoře elektronové mikroskopie VÚHEM za posledních 10 let. Jsou uvedeny výsledky s fotodokumentací některých vybraných pokusných celků: elektronmikroskopické studium interakce různých virů s některými buňkami in vitro a in vivo a možnosti použití elektronového mikroskopu při vyšetřování virových hepatitid. Dále jsou zmíněny nově použité metodiky — metoda ultratenkých zmrazených řezů a metoda negativního barvení.

Literatura u autora.

Poznámka: Předneseno na vědecké konferenci k 25. výročí založení VÚHEM v září 1982 v Sázavě u Žďáru nad Sázavou.