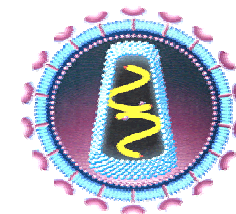
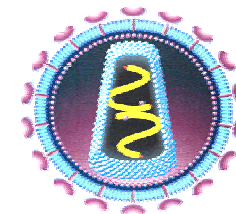
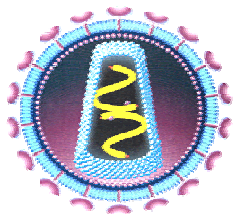
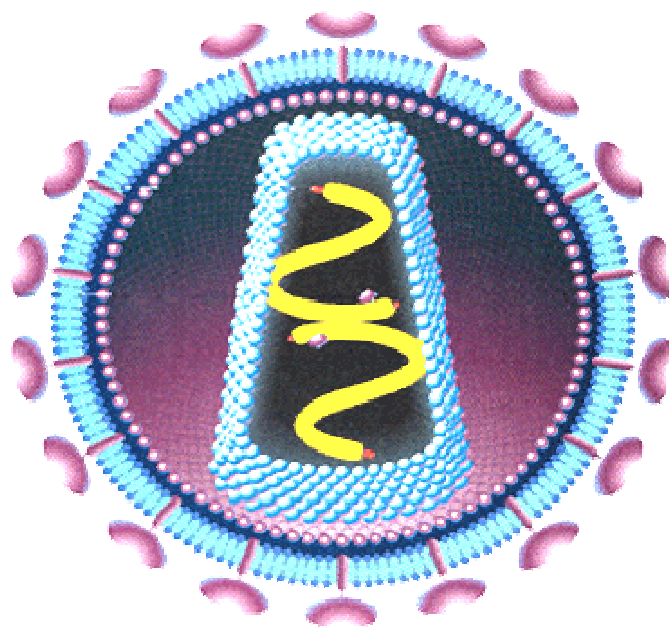


Diagnostika retrovirů

Lentiviry - HIV



Vladislava Růžičková



VI. Třída

RNA-viry se zpětnou transkriptázou – RT

Čeď: **Retroviridae** (hostitelé: **Obratlovci**)

Rody:

Alpharetrovirus

Betaretrovirus

Gammaretrovirus

Deltaretrovirus

Epsilonretrovirus

Jednoduché onkogenní retroviry

Lentivirus

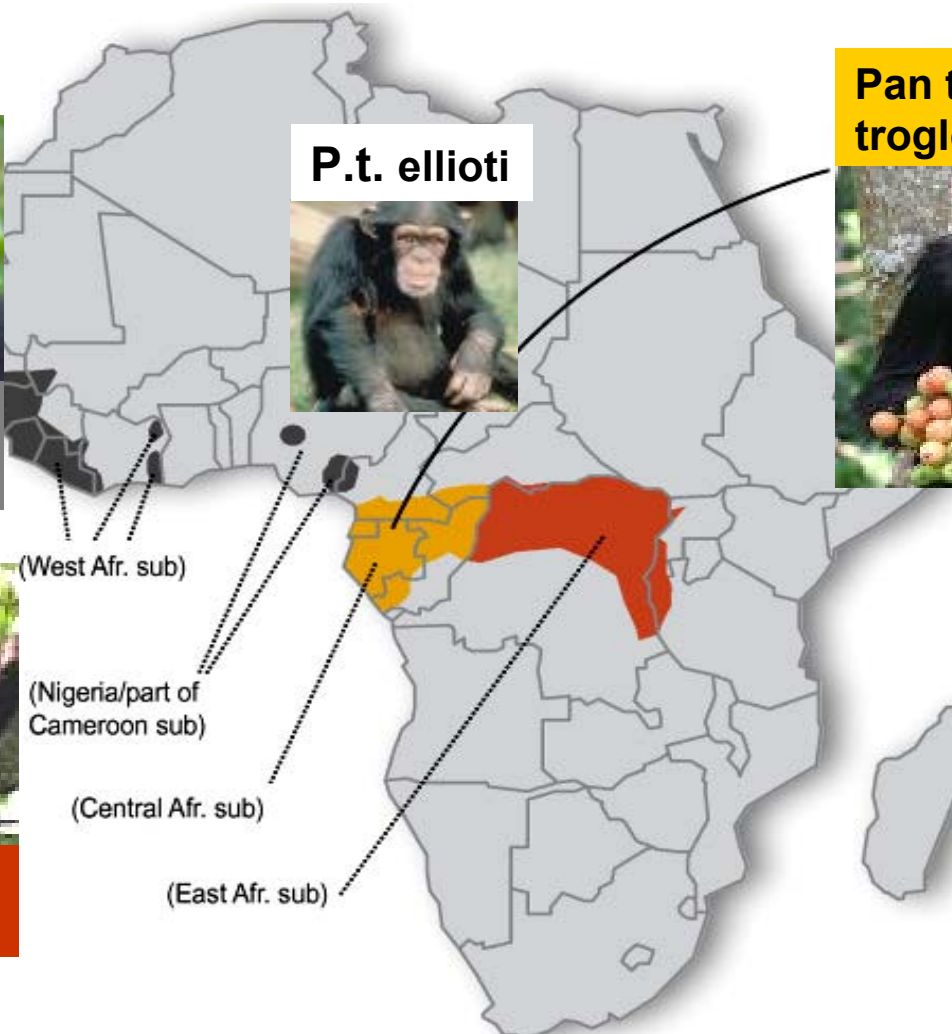
Human immunodeficiency virus 1

Spumavirus

Izolát z opic - nepatogenní

Původ HIV- přenos z opic na člověka

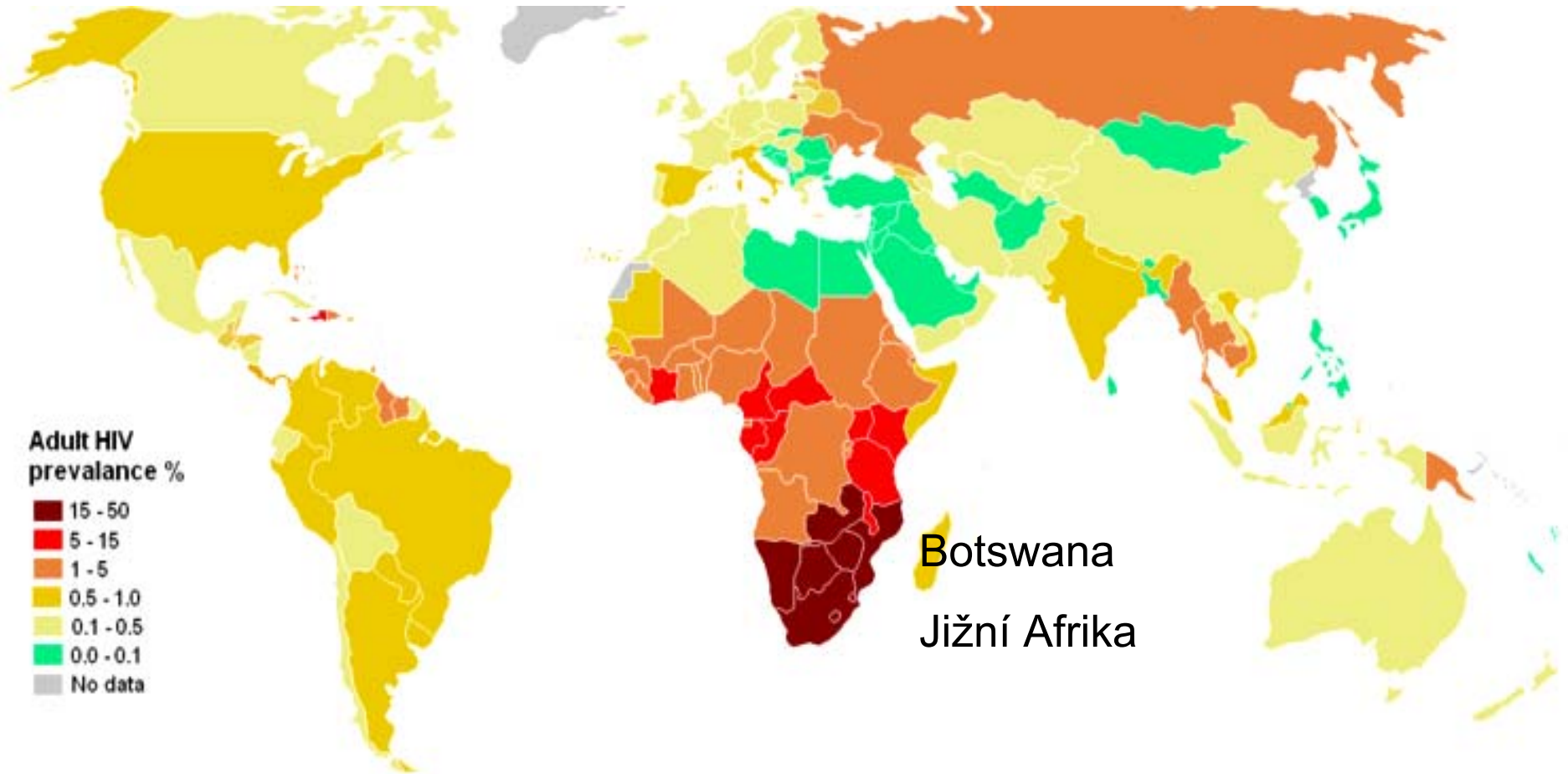
Důkaz: shoda v sekvencích humánního HIV a SIV

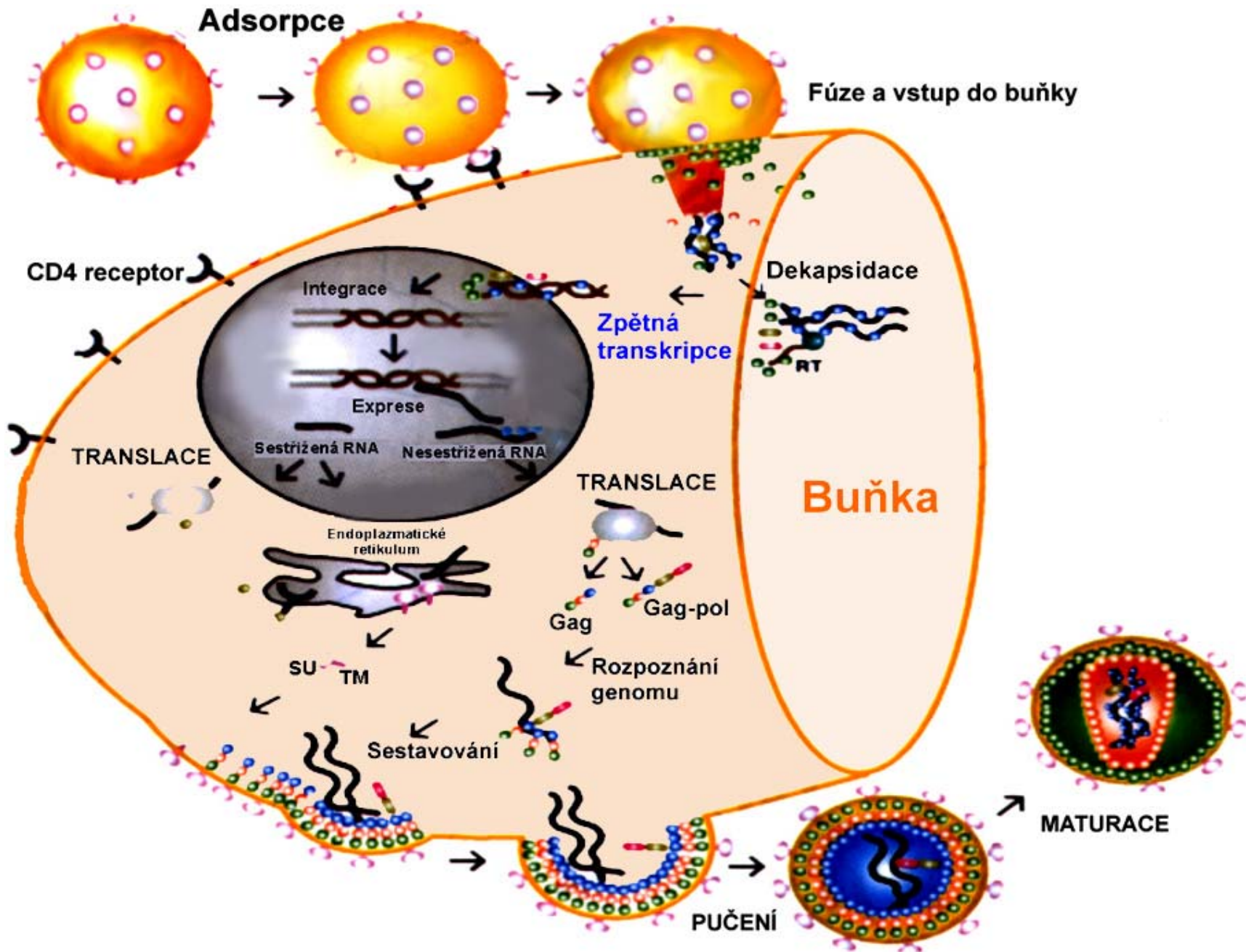


Střední Afrika (protilátky proti HIV v krevních sérech z 1950, 1960-70)

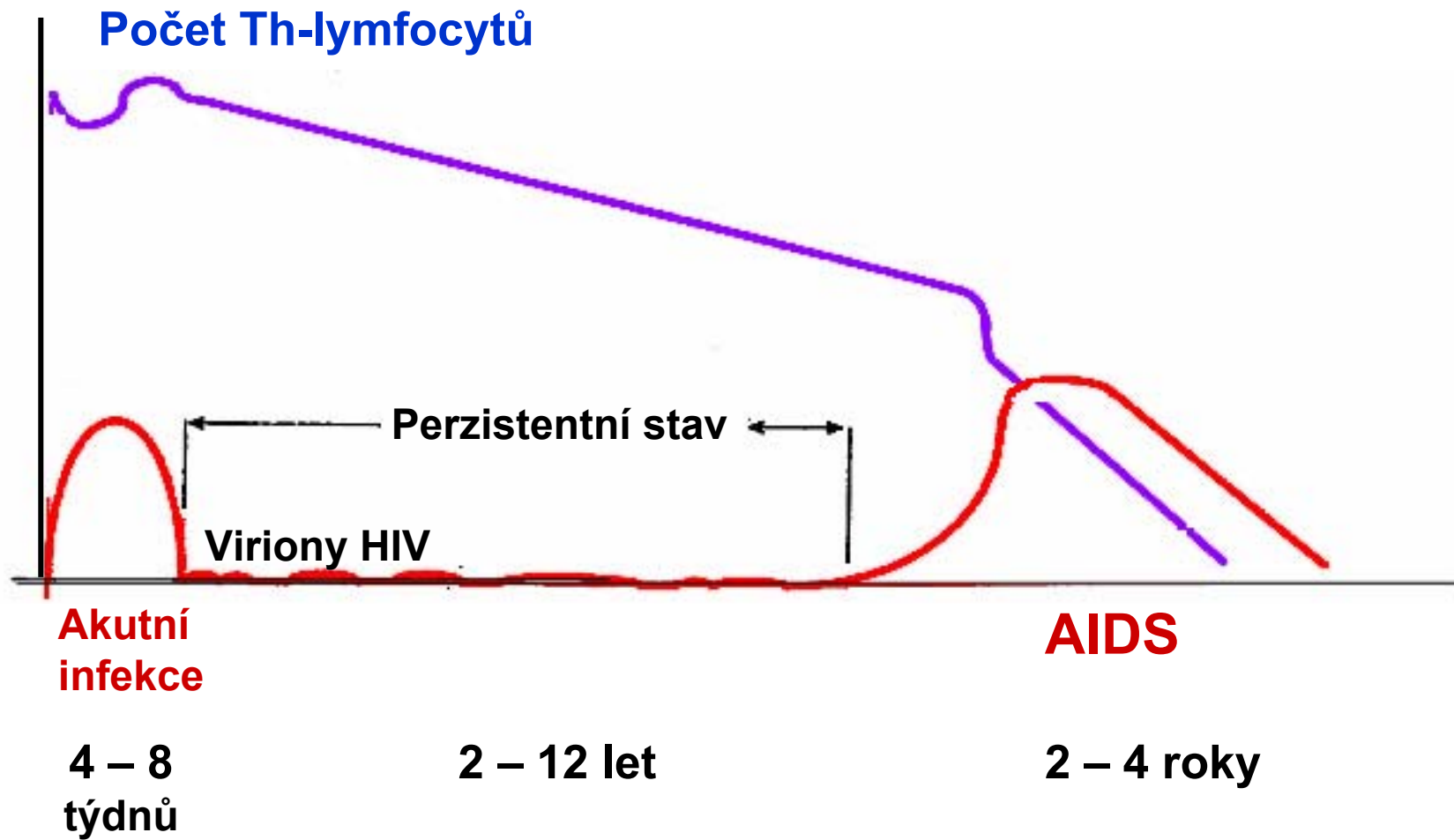
Vzplanutí pandemie AIDS v 1. polovině 70 let současně v USA a Střední Africe

Centra pandemie HIV





Průběh infekce HIV



Vyšetření na HIV-1

Děti

- první vyšetření - během 48 hodin po narození dále
 - za 2 týdny života
 - za 4 až 6 týdnů života
 - za 4 až 6 měsíců života
- **Dospělý pacient** – sérologické vyšetření opakované za 2 – 3 týdny po pozitivním testu na virus **HIV**.



Diagnostika HIV- vyšetřovaný materiál

Krev



plasma (sérum)



moč



Odběr vzorků a kultivace retroviru

HIV-1 viriony rychle odumírají

Zpracování plasmy během 6 hodin po odběru.

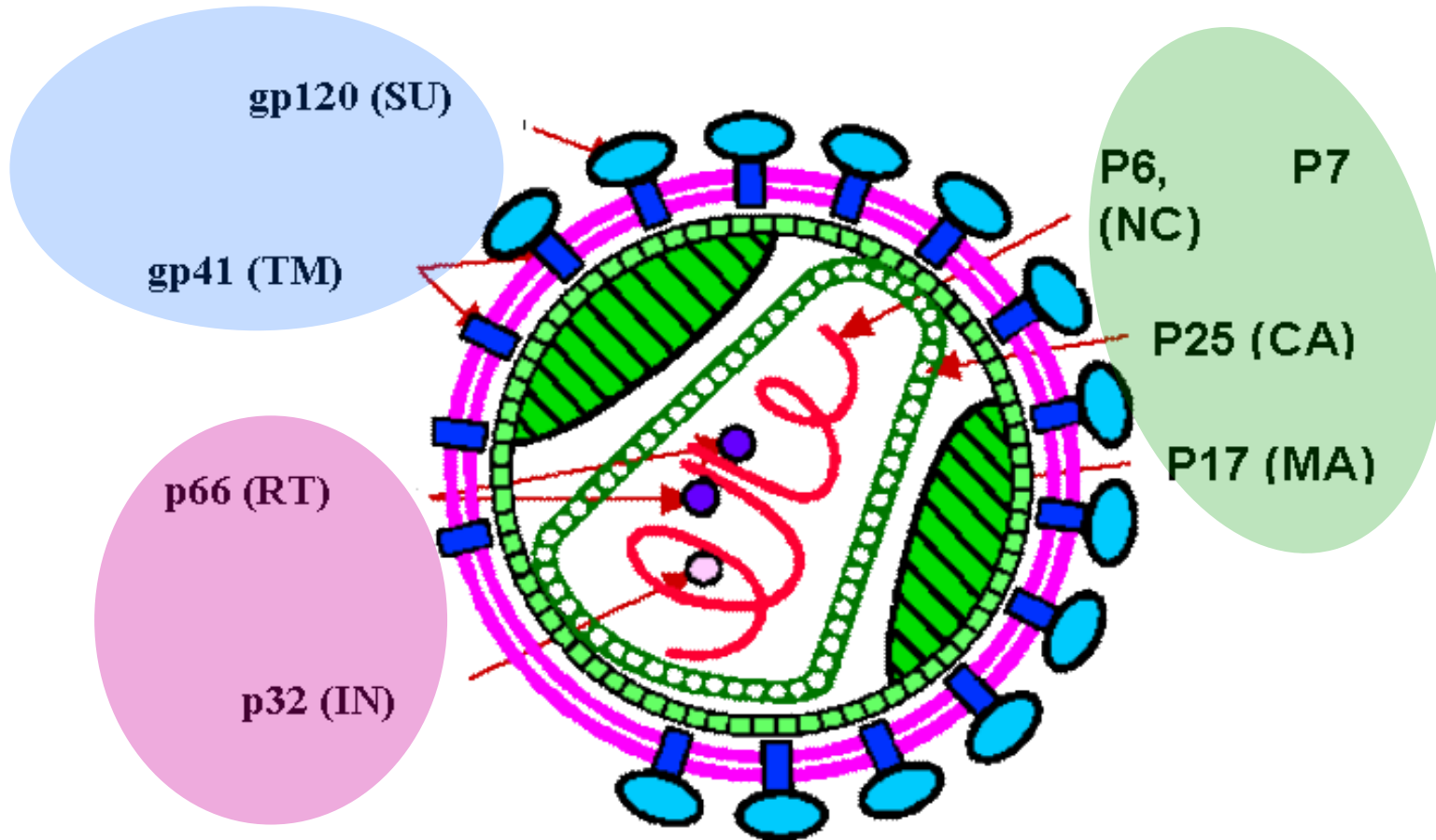
Úchova vzorku po oddělení plasmy a buněk
při **4° C 24 – 30** hod. nebo déle při **-80 °C**

Inkubace mononukleárních krevních buněk pacienta s
buňkami HIV-negativního jedince. Supernatant ze
směsného vzorku je testován na přítomnost antigenu **p24**
(**CA/gag**).

Pozitivní „kultura“ je znovu testovaná po 1 měsíci.

Sledované markery - proteiny HIV

Genom = RNA 11 kb



Diagnostika HIV- metody

Detekce přítomnosti:

- protilátek proti antigenům HIV,
- RNA/DNA

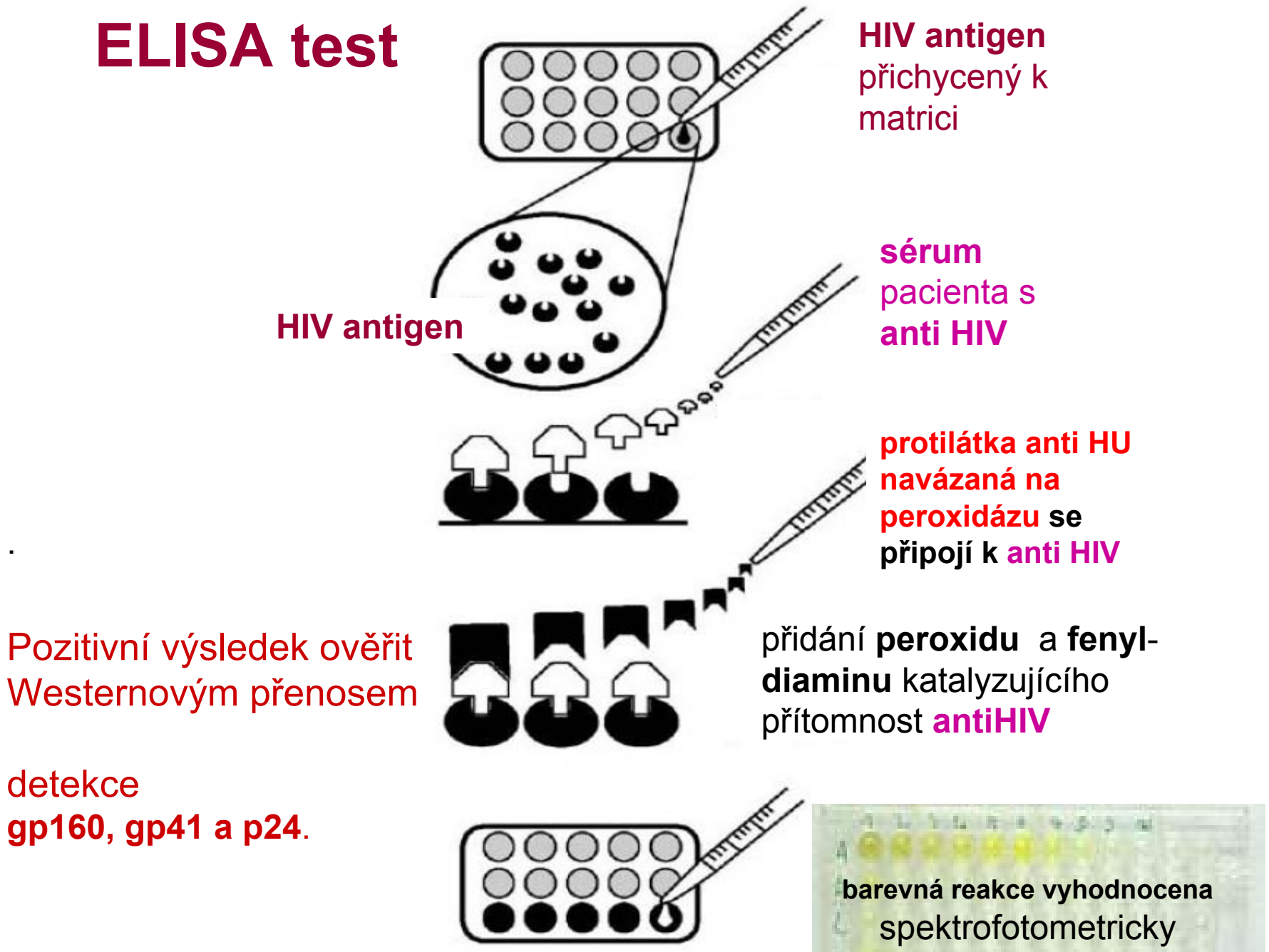
Sérologické metody - standard v diagnostice HIV
enzymoimunologická metoda ELISA test
(využití polyklonálních a nebo monoklonálních protilátek).

Molekulární metody

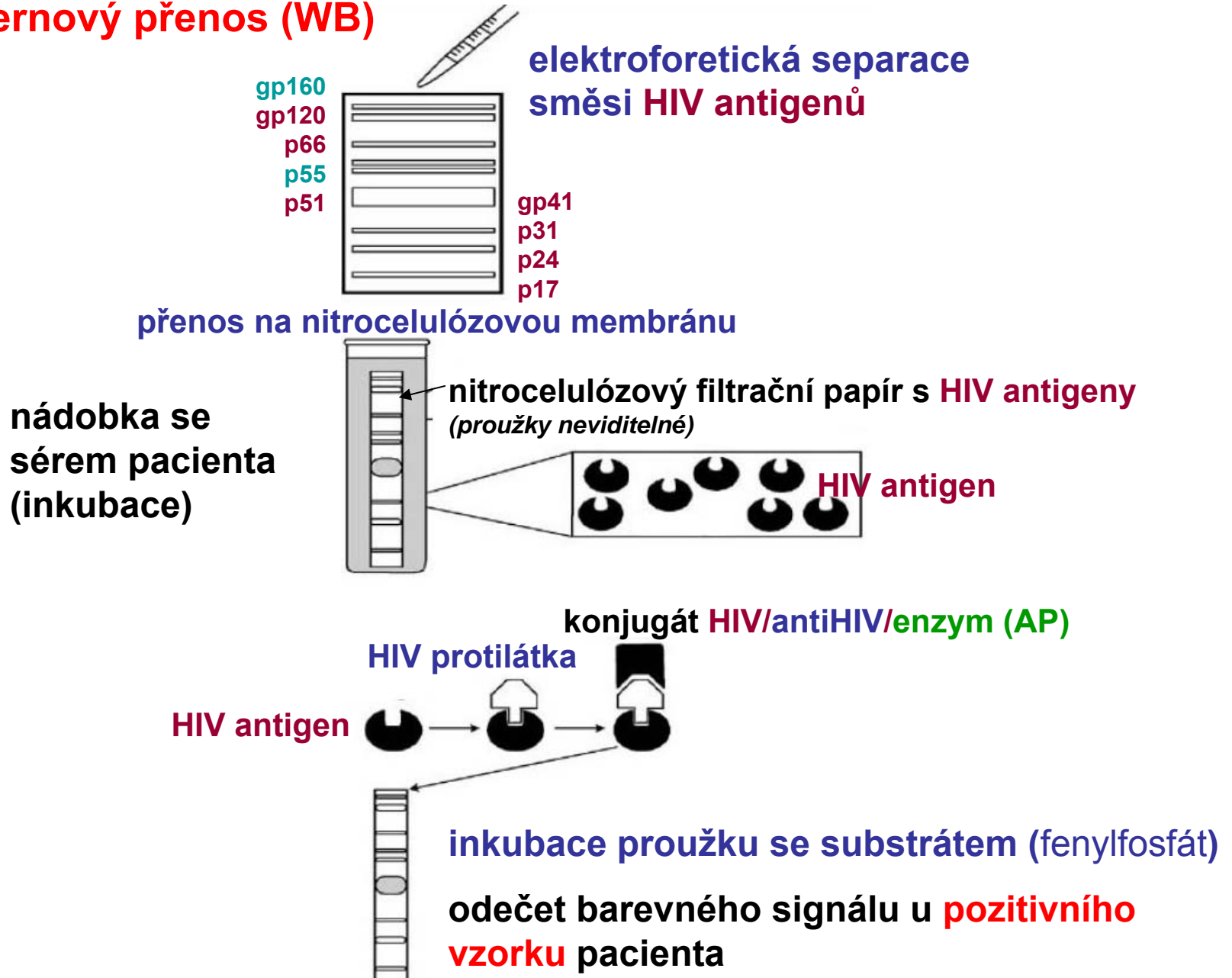
1. průkaz vertikálního přenosu (z matky na dítě)
2. monitorování dávky viru u pacienta (během léčby).
3. molekulární epidemiologie výskytu typů kmenů HIV-1

Studium evoluce HIV – oblast výzkumu

ELISA test



Westernový přenos (WB)



Molekulární analýza genomu viru

- Detekce cílových oblastí genomu a charakterizace genomu
- Typizace a stanovení příbuznosti kmenů HIV
- Stanovení nukleotidového složení genomu



RNA viry jsou mnohem citlivější k mutacím než **DNA viry**.

DŮVOD = RNA-polymerázy nemají 3' - 5' exonukleázovou aktivitu nemohou opravovat chyby vzniklé při replikaci.

Izolace RNA

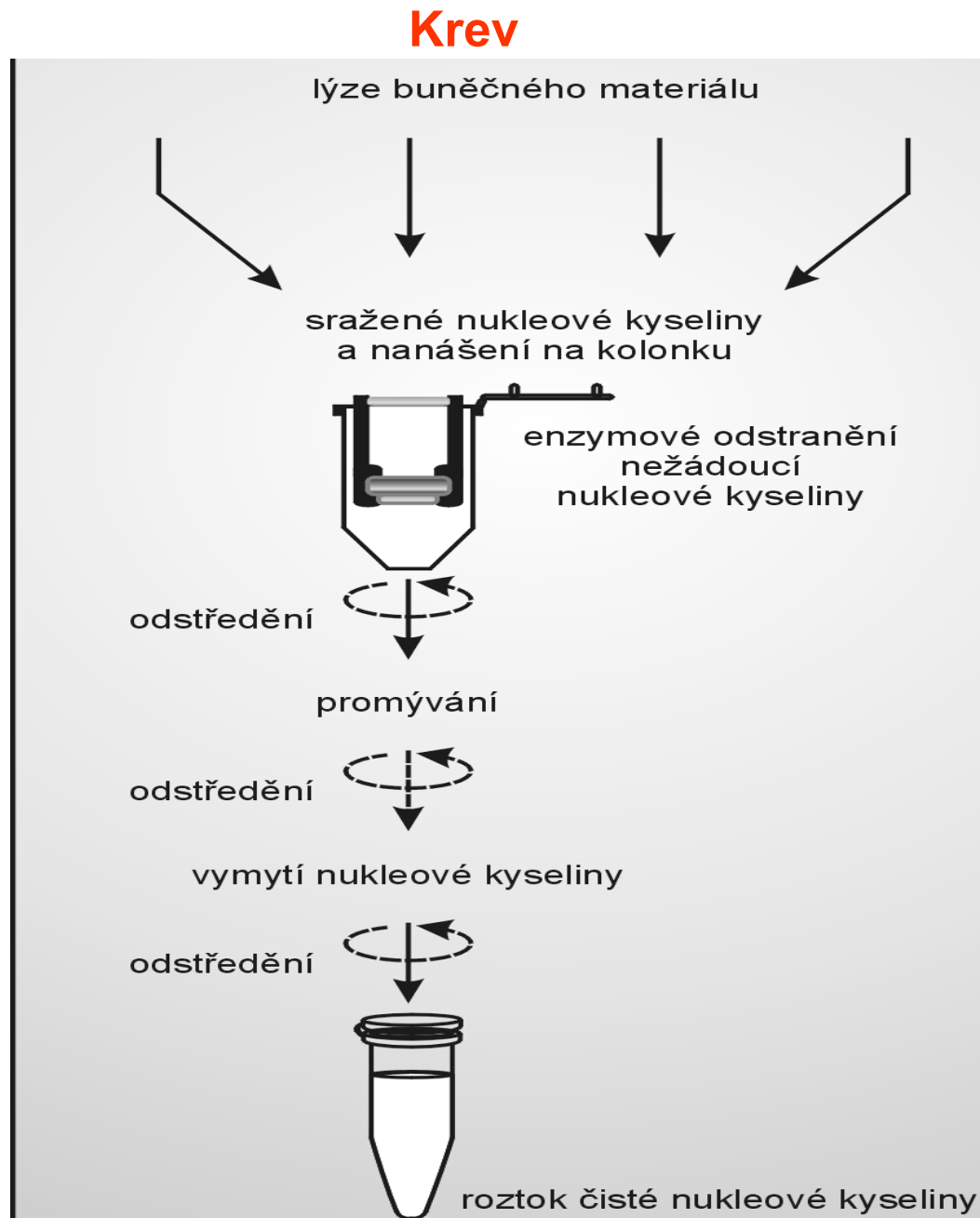
Zajištění ochrany RNA před rozkladem **RNázou**.

Nejčastěji se jako inhibitor RNázy používá **guanidin thiokyanát (GTC)**.

Úchova RNA o velikosti větší než 1 kb v etanolu při nízkých teplotách.

Manipulace s RNA

ledová lázeň,
za aseptických podmínek.

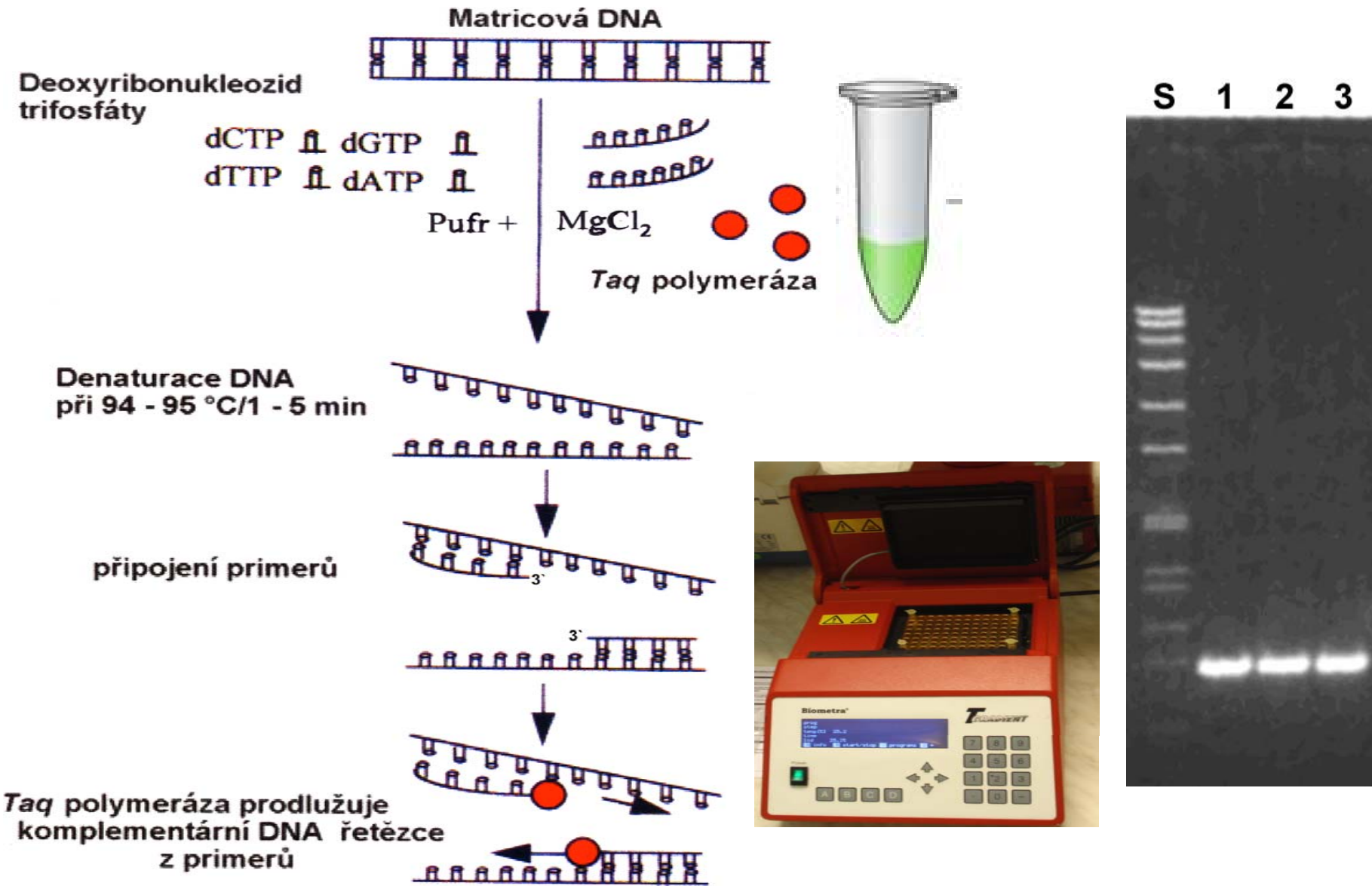


MOLEKULÁRNĚ-BIOLOGICKÉ METODY v diagnostice HIV

Techniky založené na detekci RNA/DNA

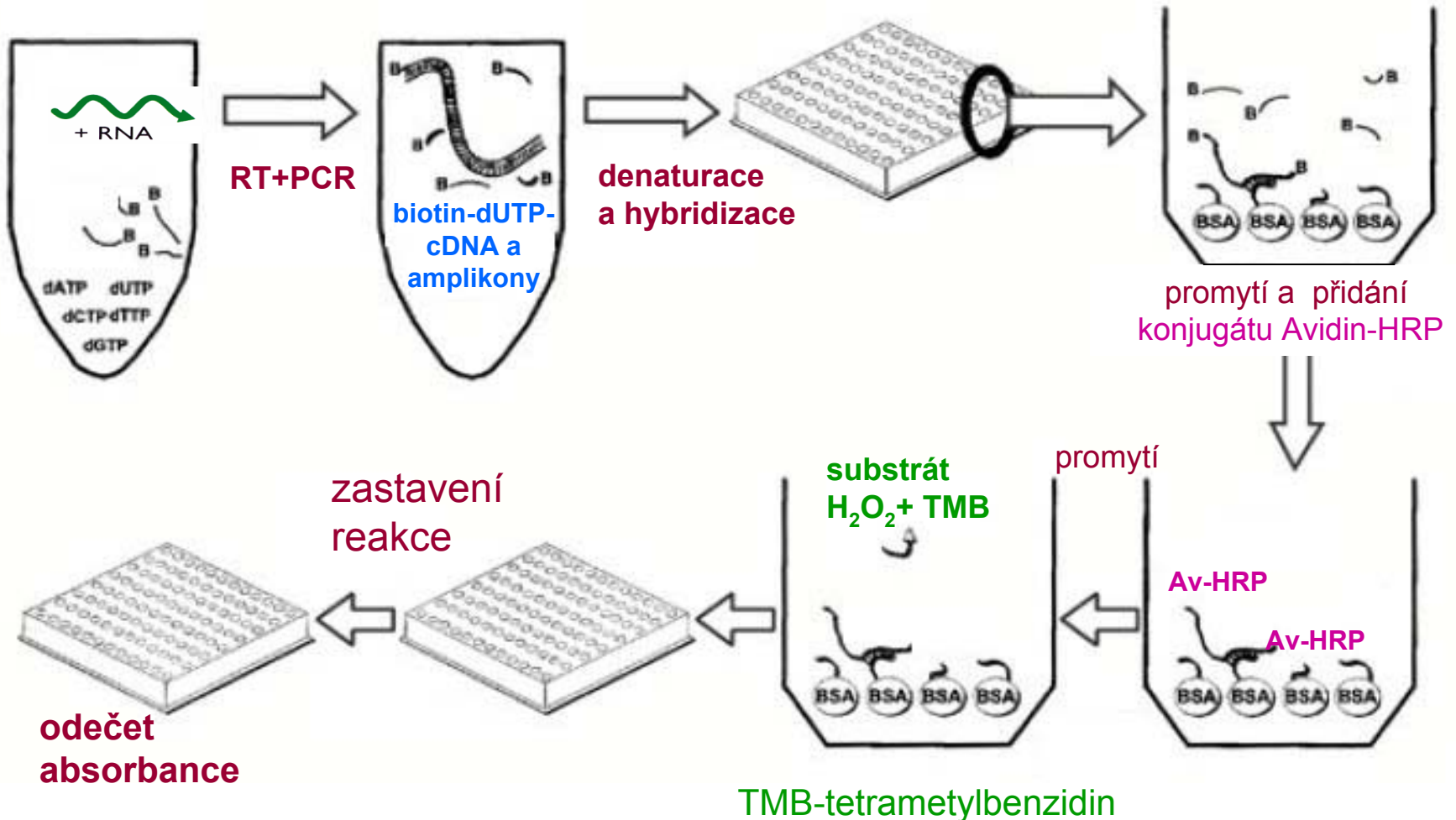
1. PCR – amplifikace specifických sekvencí
2. RT-PCR pro analýzu polymorfismů nukleové kyseliny
3. PCR v reálném čase (*Real time PCR*)
4. Hybridizační metoda bDNA (*branched Chain DNA*)
5. Analýza pohyblivosti heteroduplexů (HMA)
6. Sekvenování a analýza virového genomu

PCR-polymerázová řetězová reakce



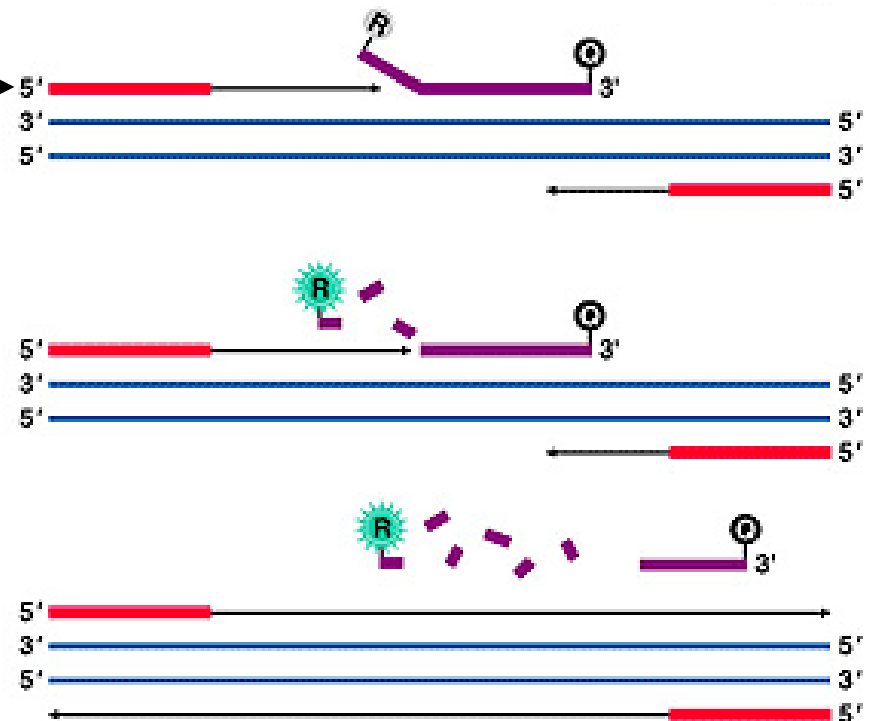
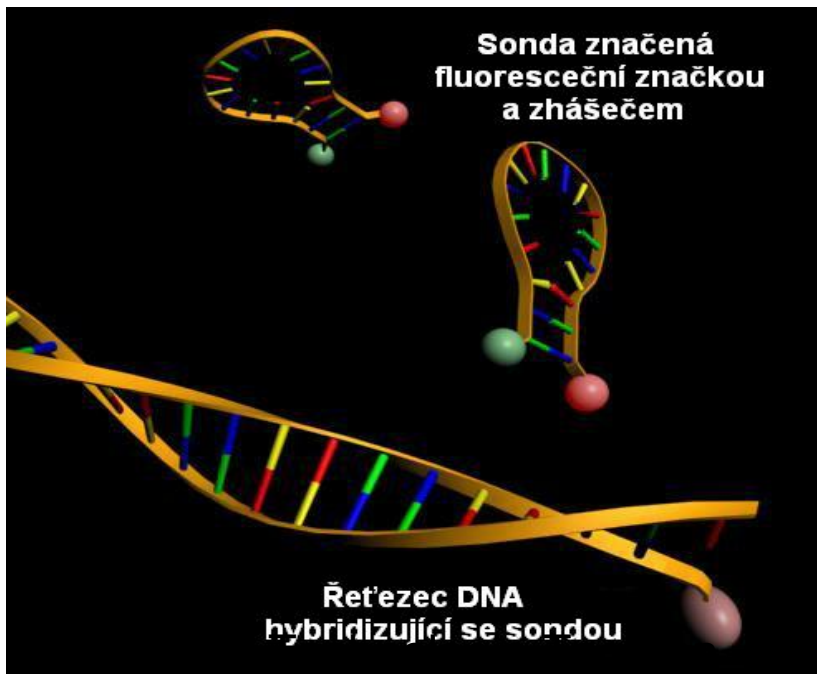
Zpětná transkripce (RT-PCR) a hybridizace

1. izolace RNA z krevní plazmy pacienta
2. **RT-PCR**
3. **Amplifikace cDNA**
4. **detekce - hodnocení**



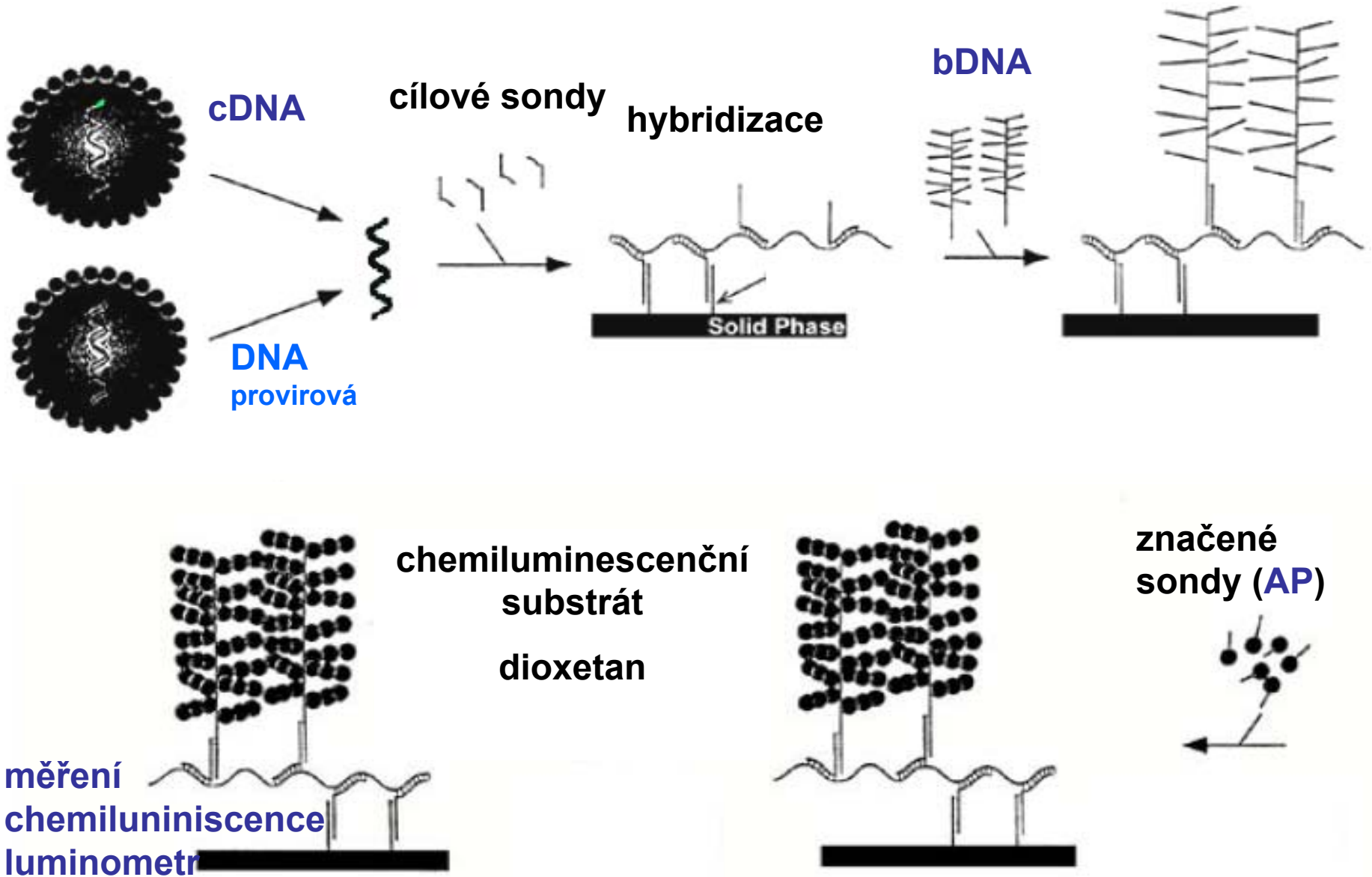
Real-time PCR - Technologie TaqMan

- kvantitativní analýza **cDNA**
- množství amplifikované **cDNA** je detekováno **intenzitou fluorescenčního záření** v reálném čase během každého cyklu reakce
- metoda umožňuje rychlou detekci konkrétního genu a stanovení množství ampliconu ve vzorku



Hybridizační metoda (bDNA)

Versant HIV-1 RNA Assay (Bayer, Tarrytown, NY)



Komerčně dostupné kity na detekci HIV-1

Producent	Název	metoda	cílový gen	skupina
Roche Diagnostics	Amplicor HIV-1 Monitor	RT-PCR	<i>gag</i>	Group M: A-H
	COBAS Amplicor HIV-1 Monitor	RT-PCR	<i>gag</i>	Group M: A-H
	COBAS AmpliPrep/COBAS Amplicor HIV-1 Monitor	RT-PCR	<i>gag</i>	Group M: A-H
	COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HIV-1 Test	RT-PCR	<i>gag</i>	Group M: A-H
	Bayer HealthCare	Versant HIV-1 RNA (bDNA)	branched DNA	<i>pol</i>
Abbott Laboratories	LCx HIV RNA Quantitative Assay	competetive RT-PCR	<i>pol</i> (integr)	Group M: A-G Group O
Abbott Laboratories	RealTime HIV-1 Assay	RT-PCR	<i>pol</i> (integr)	Group M: A-G Group O

COBAS – comprehensive bioanalytical systems (jsou robotické systémy)

ANALÝZA POHYBLIVOSTI HETERODUPLEXŮ (HMA)

Metoda:

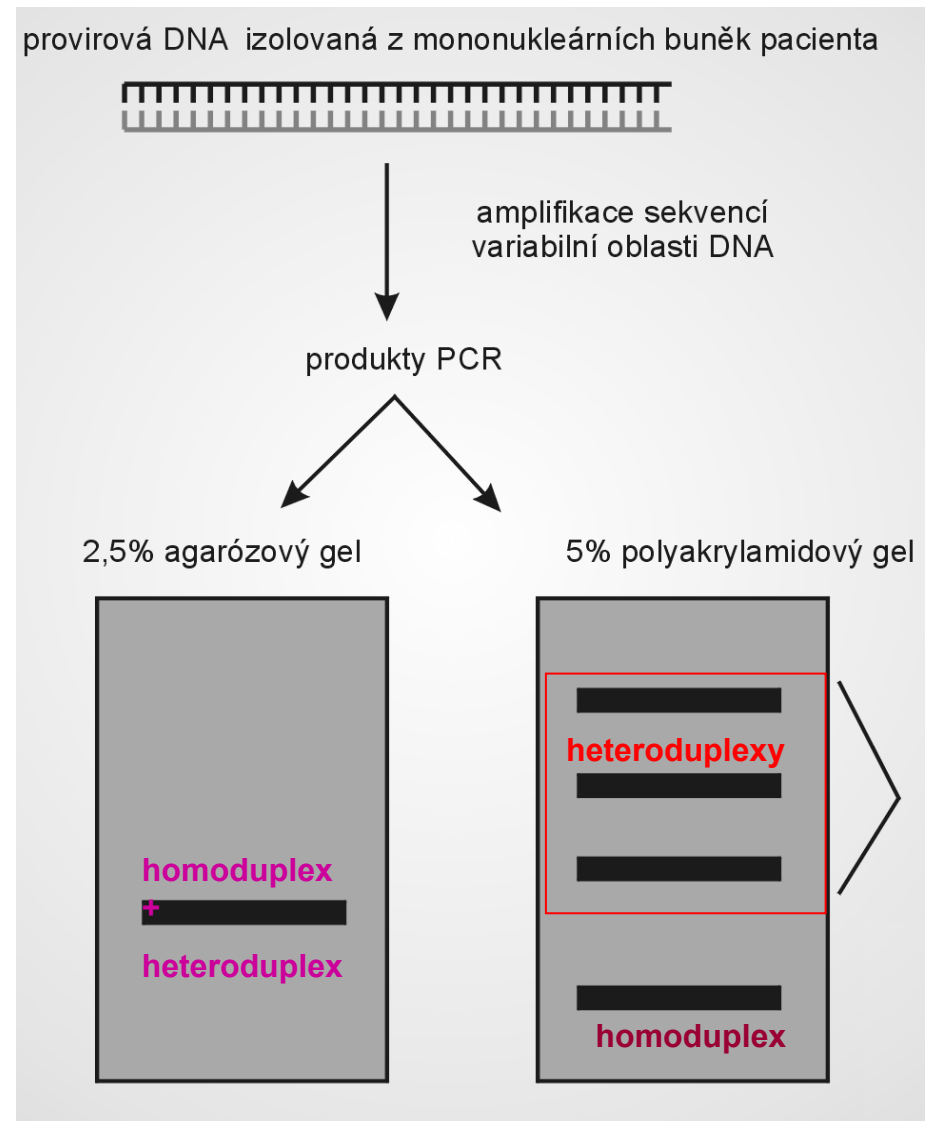
1. PCR amplifikace cílové sekvence

2. Elektroforéza- separace PCR produktů

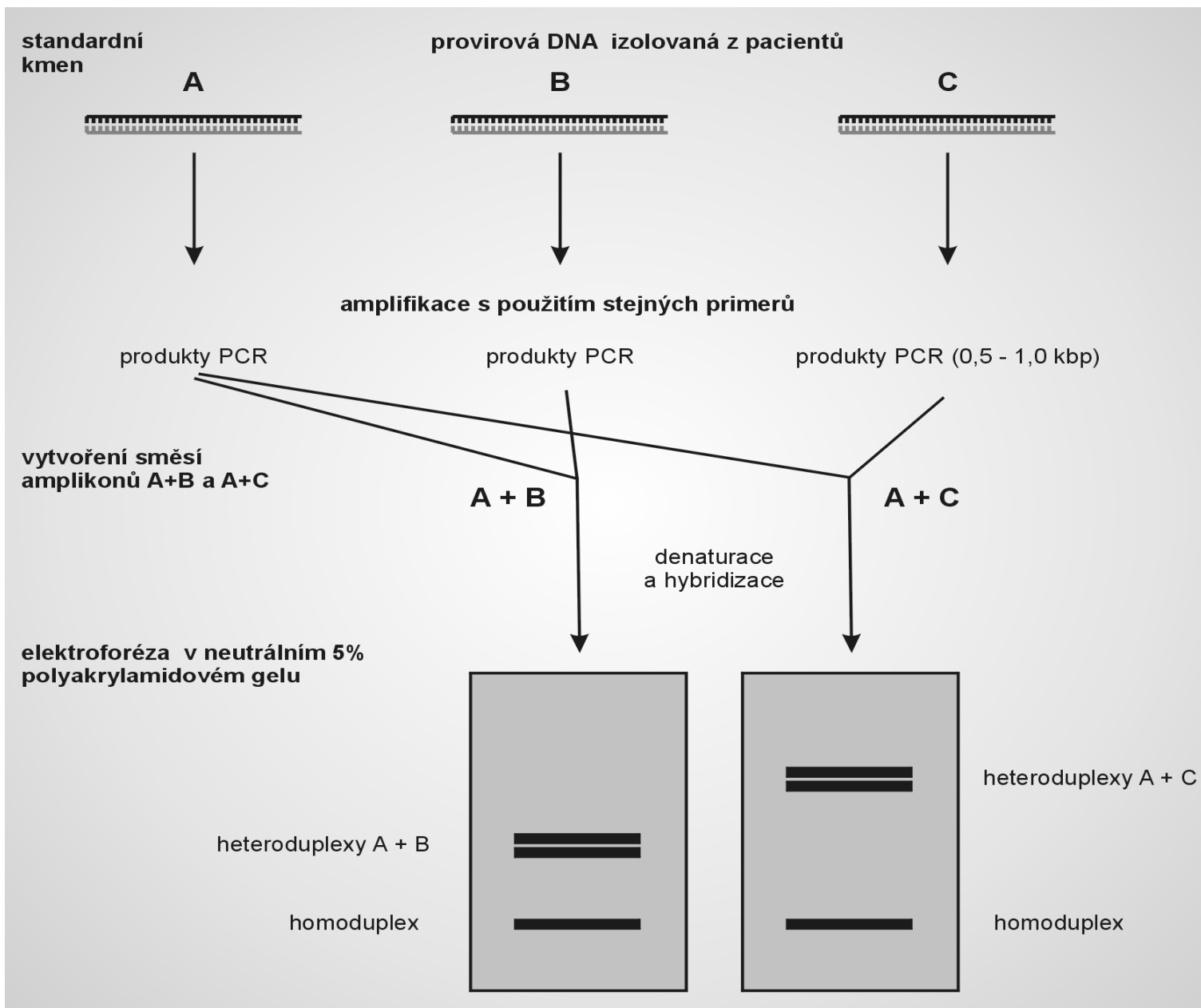
3. Hodnocení:

v agarózovém gelu se směs nedenaturovaných heteroduplexů i homoduplexů pohybuje stejnou rychlostí a zastaví se v jedné pozici,

v polyakrylamidovém gelu se heteroduplexy obsahující výdutě způsobené delecí nukleotidů pohybují pomaleji než homoduplexy



STANOVENÍ PŘÍBUZNOSTI KMENŮ HIV METODOU (HMA)



SEKVENOVÁNÍ GENOMŮ

U **RNA** genomů se použitím RT nejprve přepíše do **DNA**

Klasická je Sangerova metoda s terminačními **ddNTP**
1984 poprvé sekvenování genomu HIV

SEKVENOVÁNÍ PCR PRODUKTU

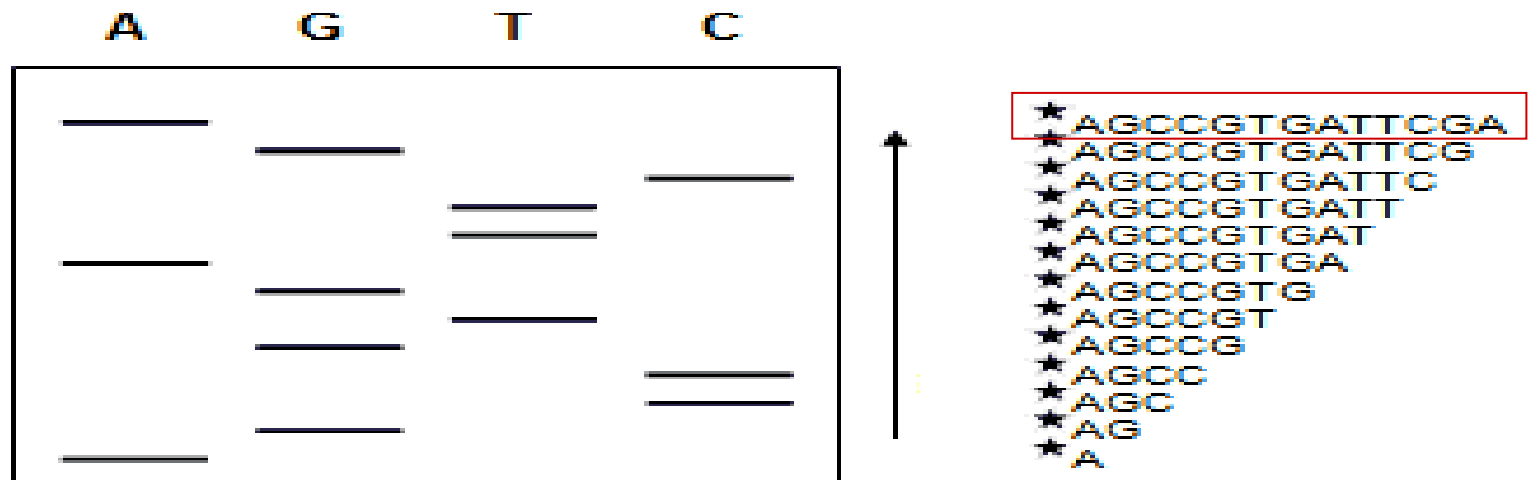
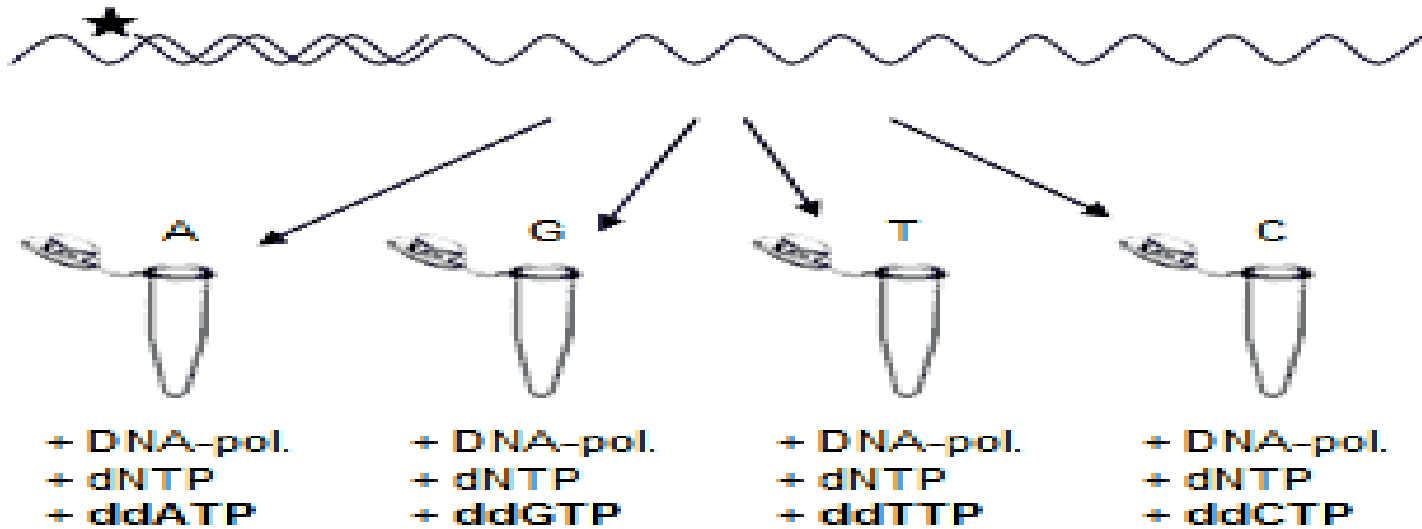
PCR + sekvenování - pro úseky (1 kb).

Nejčastěji jsou to geny pro **Ag** epitopy povrchových proteinů.

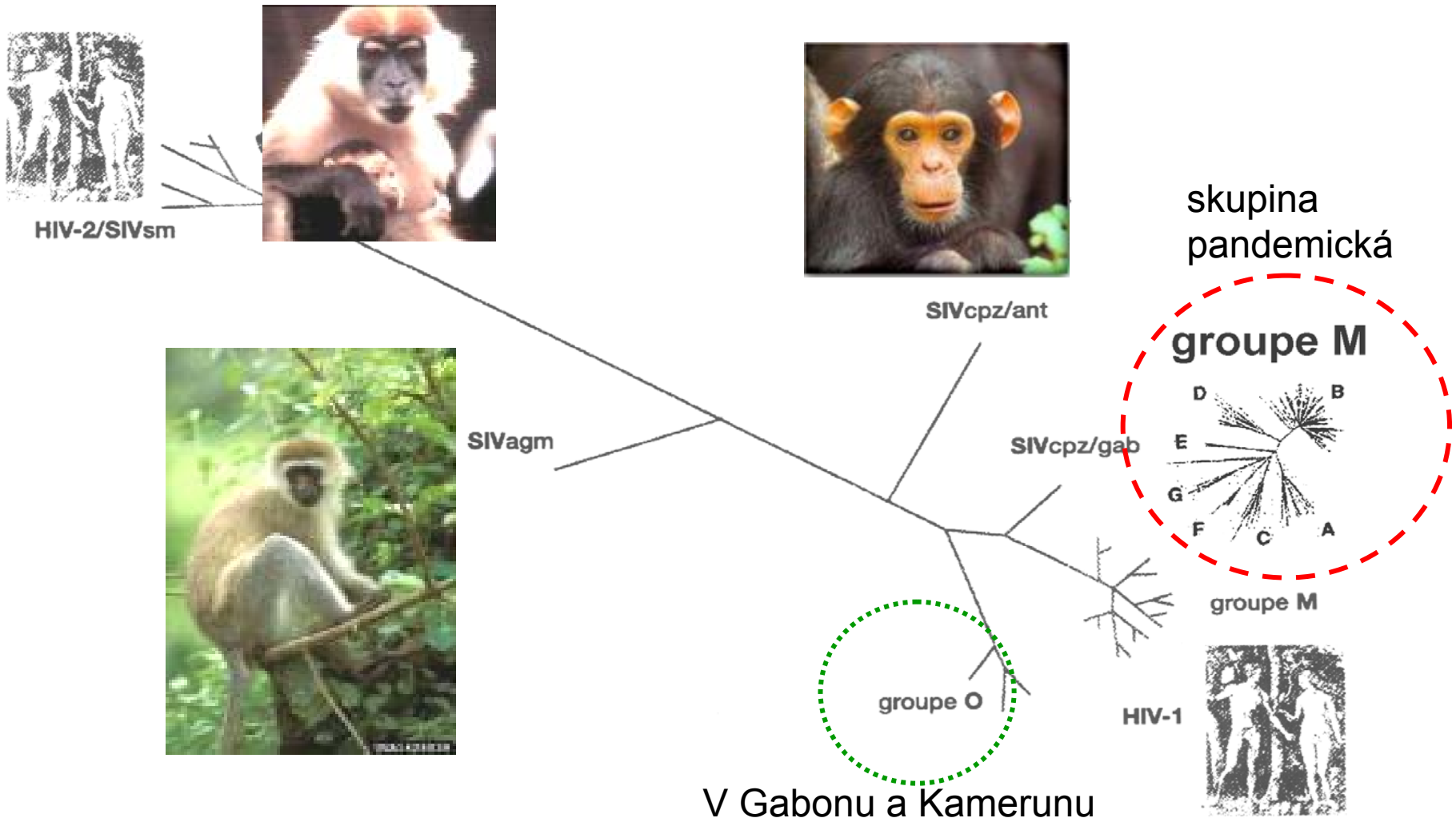
Význam: pro epidemiologii a výzkum evoluce HIV

Sangerova metoda sekvenování DNA

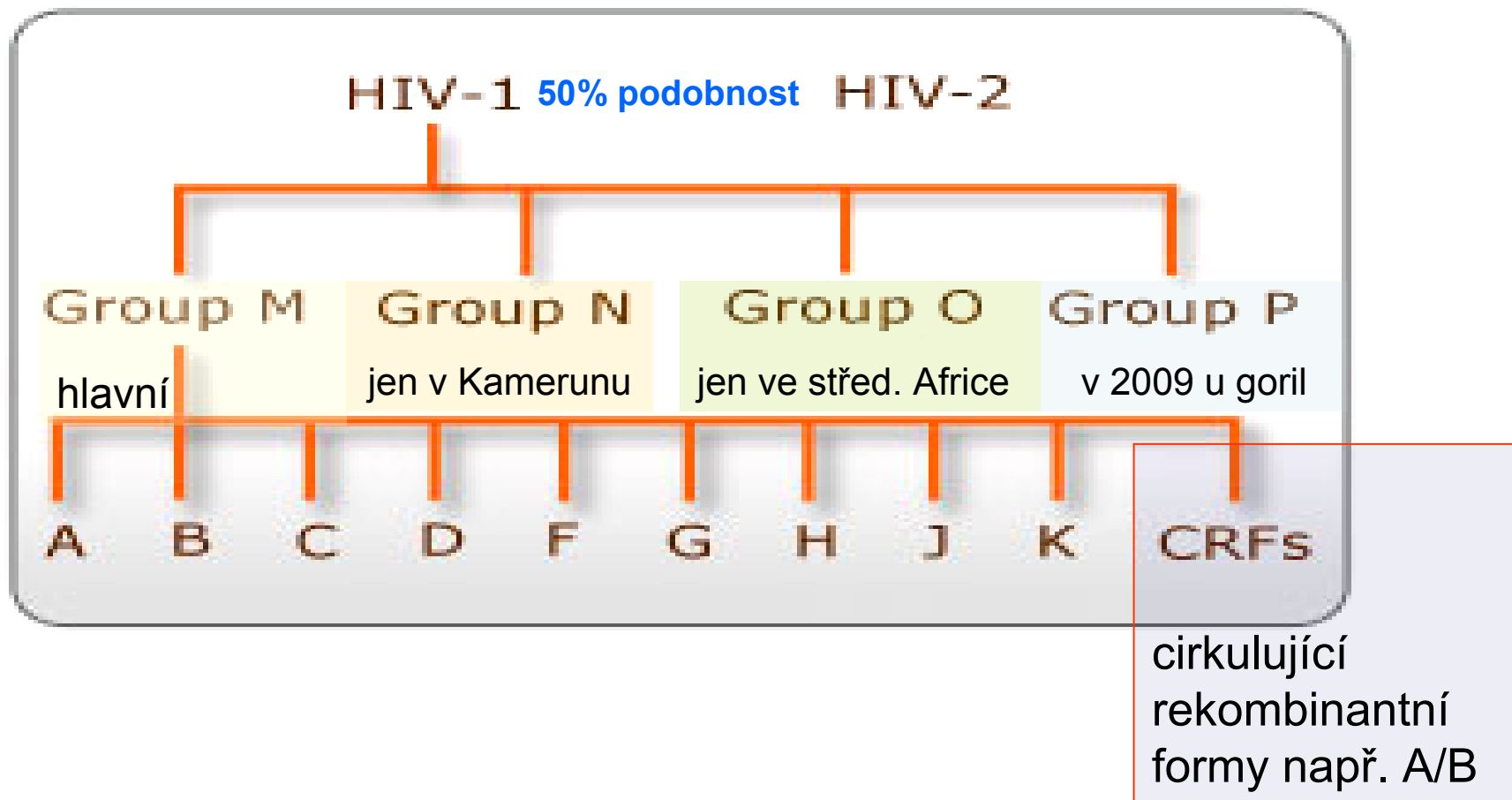
Připojení značeného primeru k matricové DNA



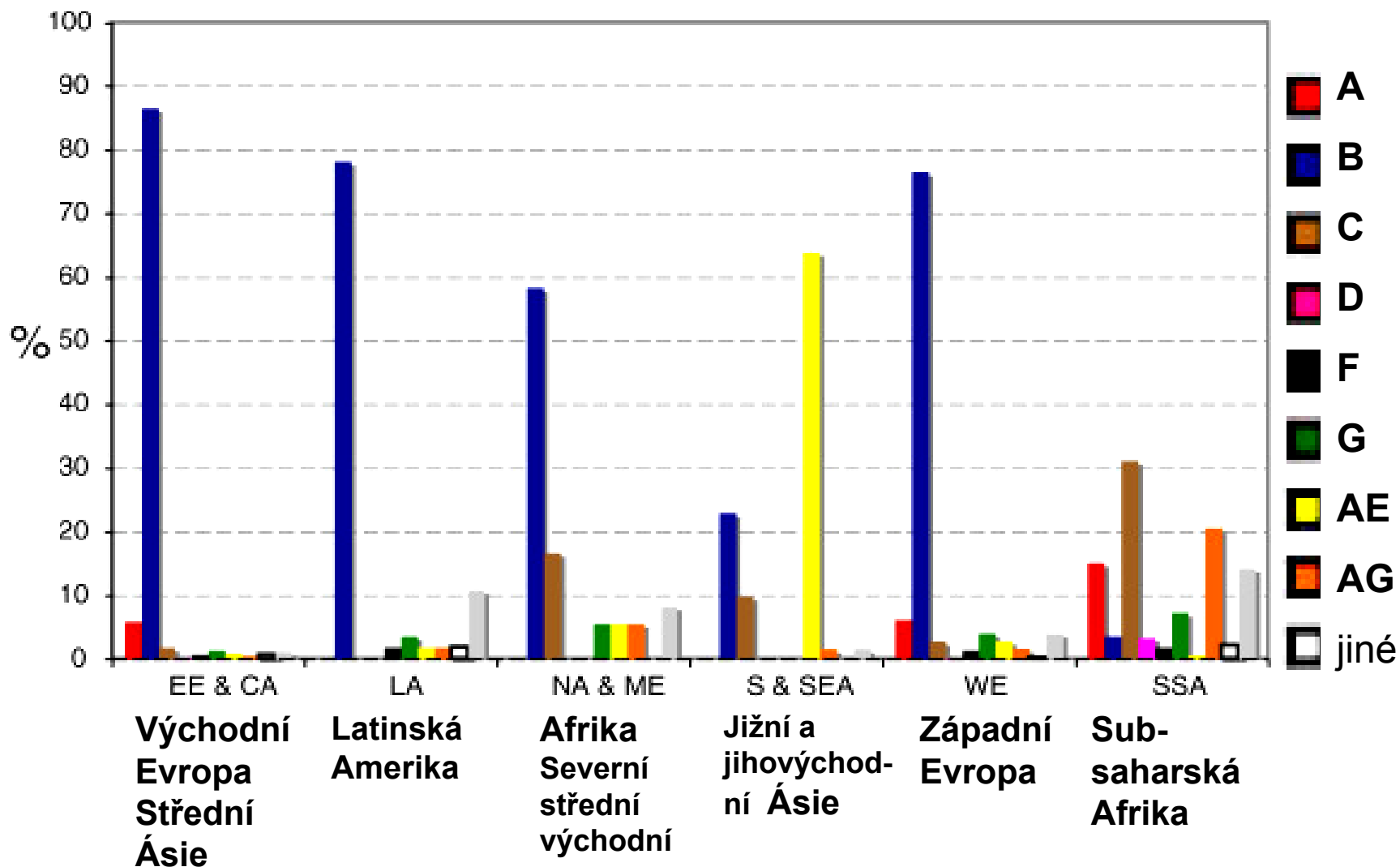
Příbuznost lentivirů – dle sekvenční „homologie“ v genech *gag* a *env*



Skupiny lentivirů rozlišené na základě sekvenční podobnosti



Geografická distribuce subtypů skupiny M (HIV-1) celosvětově



Případy HIV- pozitivních v ČR

Měsíc/Rok -	HIV pozitivních ČR/ cizinci/	AIDS	Úmrtí na AIDS
červen/2008	1120/294	252/22	137/10
květen/2014	2233/384	408/42	209/15

Muži > ženy, homosexuální > heterosexuální jedinci

Asi 1/6 tvoří cizinci