

ÚVOD DO LÉKAŘSKÉ VIROLOGIE, VIROLOGICKÉ A SEROLOGICKÉ VYŠETŘOVACÍ METODY

MUDr. Markéta Hanslianová
Masarykova univerzita,
Katedra laboratorních metod

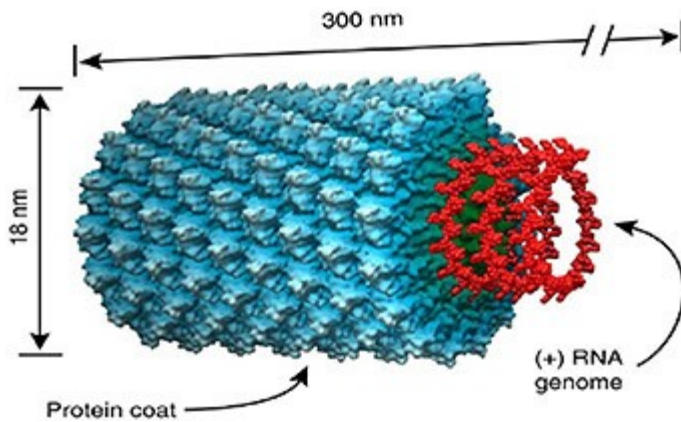
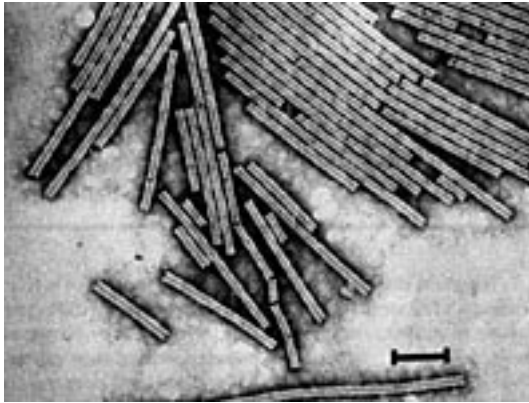


Viry

- Virologie= vědní obor zabývající se studiem virů
- 1676- Anton van Leeuwenhoek- první pozorování bakterií vlastnoručně vyrobeným mikroskopem
- 1879 – 1882: první pokusný přenos virového onemocnění- Adolf Mayer (mozaiková choroba tabáku)
- 1892: Dmitrij Ivanovskij, filtrace viru
- 1898: první pokusný přenos živočišného viru (virus slintavky a kulhavky)
- 1939: první elektronoptické snímky viru mozaikové choroby tabáku
- 40. léta 20. století: mohutný rozvoj virologie



Elektronoptický snímek viru mozaikové choroby tabáku



Mozaiková choroba tabáku



Schéma viru mozaikové choroby tabáku



Povaha virů

- viry nejsou organizovány jako buňky, ale jako částice (podbuněčné organismy)
- obsahují jediný typ nukleové kyseliny: buď RNA nebo DNA
- nemnoží se dělením, ale syntézou svých složek
- syntéza je závislá na ribosomech hostitelské buňky



Stavba virionu

virion = virová částice

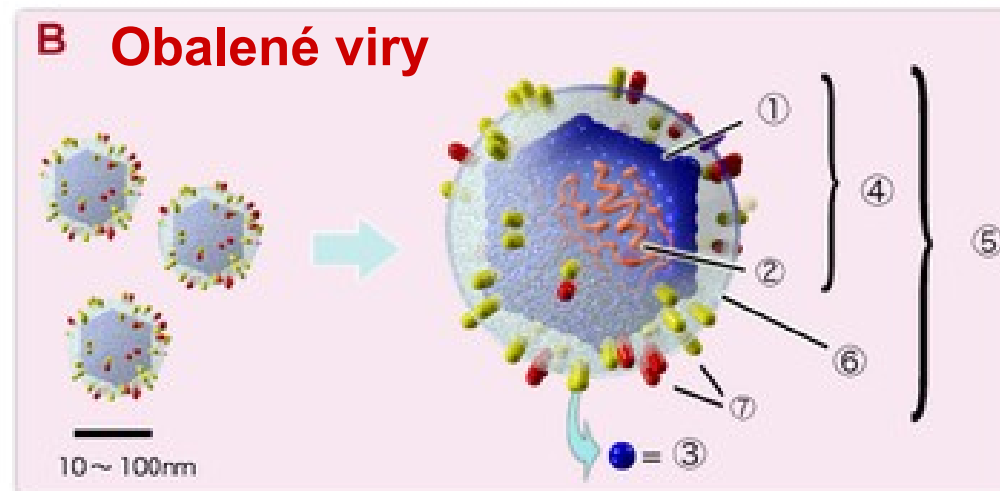
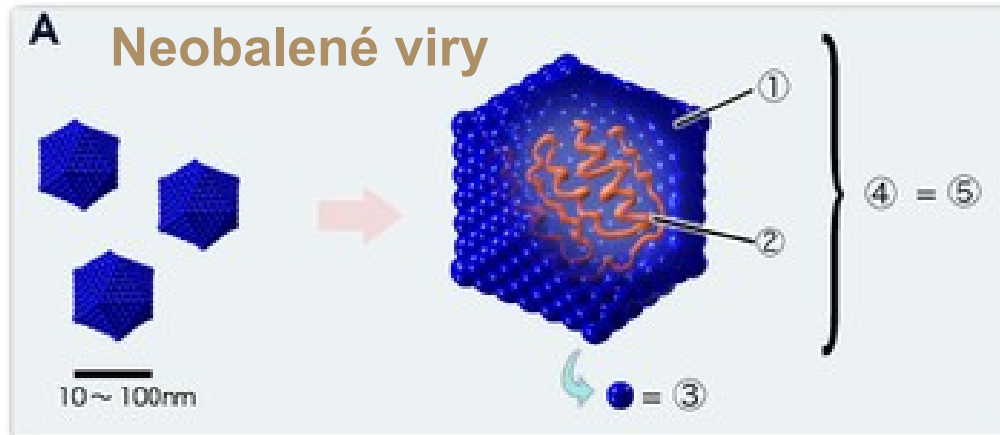
- vnitřní část – **dřeň** neboli **nukleoid** obsahuje nukleovou kyselinu
- zevní část – **kapsida** obsahuje bílkovinu, je sestavena z bílkovinných podjednotek (protomer) uspořádaných symetricky
- kapsida s kubickou (ikosaedrální) symetrií – tvar dvacetistěnu (např. herpesviry, adenoviry)
- kapsida se spirální (helikální) symetrií – tvar válce (např. orthomyxoviry)
- kapsida s komplexní symetrií – např. bičíkaté fágy, poxviry



Stavba virionu

- nukleoid + kapsida = **nukleokapsida** (**neobalené viry**, např. pikornaviry, adenoviry)
- nukleokapsida může být uložena ve virovém obalu (**obalené viry**, např. herpesviry)

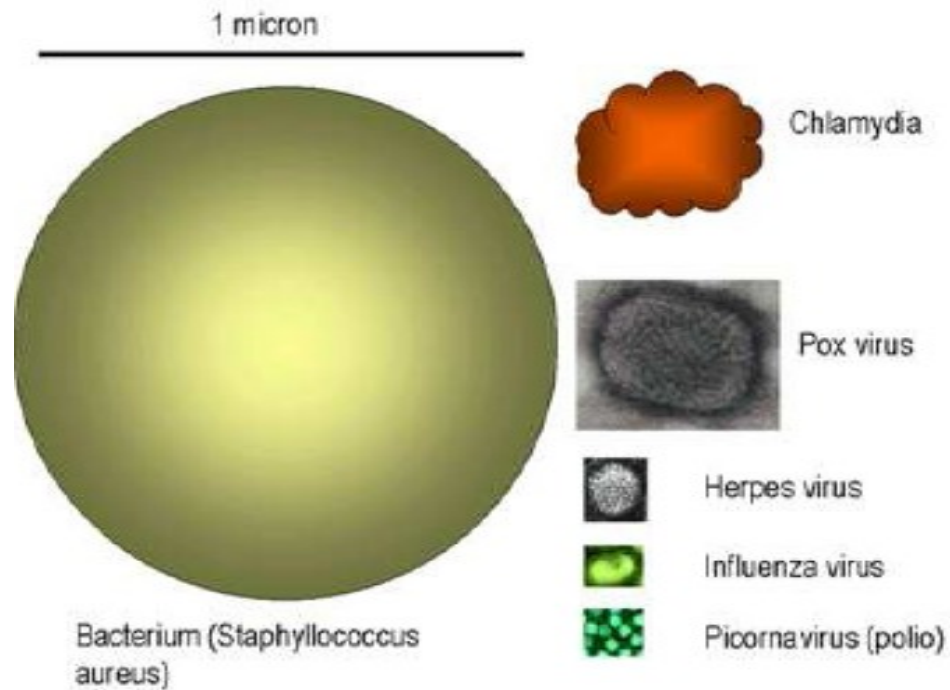




1 – kapsida, 2 – nukleoid, 3 – protomera, 4 – nukleokapsida, 5 – nukleokapsida s obalem, 6 – lipoproteinový obal, 7 - glykoproteiny



Velikost virů: 20 nm (pikornaviry) – 300 nm (poxviry)



Třídění virů

- a) dle charakteru genomu: RNA viry, DNA viry
- b) dle přítomnosti obalu: neobalené viry, obalené viry
- c) dle symetrie kapsidy: viry s kubickou symetrií, spirální symetrií, komplexní symetrií
- d) dle povahy hostitele: viry bakterií (bakteriofágy), kvasinek, prvoků, rostlin, hmyzu, obratlovců
- e) Dle vyvolávaných syndromů (klinicko-epidemiologické rozdělení): respirační viry, neuroviry, exantematické viry...



Reprodukce virů

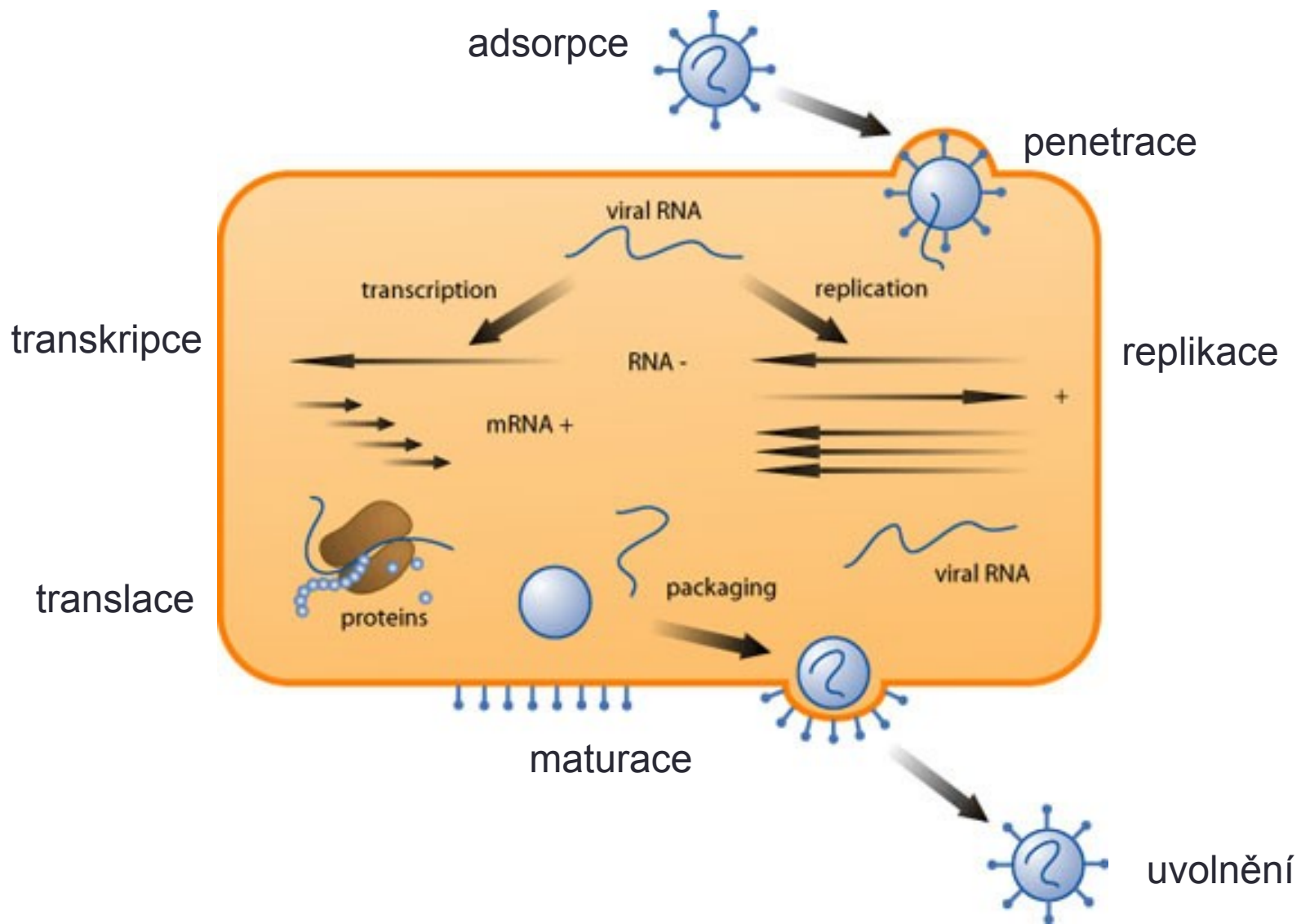
1. **Adsorpce** (přilnutí) na vnímavou buňku
Receptory na povrchu buněk, tkáňový tropismus
2. **Penetrace** (průnik) virionu do buňky
3. **Rozbalení** virionu- ztráta kapsidy a virového obalu-uvolnění nukleové kyseliny (svlékání viru)



Reprodukce virů

4. **Replikace** virového genomu- virus využije metabolismus hostitelské buňky k tvorbě virových bílkovin a NK (fáze eklipsy)
5. **Maturace** (dozrávání) virionů- organizace virových bílkovin kolem NK viru, tvorba kapsidy
6. **Uvolnění** nových virionů z buňky





Buněčné změny při virové infekci

- Cytocidní infekce- hostitelská buňka odumírá ke konci cyklu množení viru; enteroviry (cytopatický efekt viru)
- Necytocidní infekce- virová NK se množí nezávisle, ale dostatečně pomalu a nenarušuje metabolismus hostitelské buňky; herpesviry



Průběh a formy virových nález

- Vstupní brána infekce: respirační trakt, sliznice GIT, kůže a podkoží, sliznice urogenitálního traktu, spojivka
- Šíření viru- z buňky do buňky, pasivní šíření krví, lymfou, mozkomíšním mokem, sekrety
- Vylučování viru- viriony nebo infikované rozpadající se buňky



Průběh a formy virových nákaz

- infekce inaparentní (bezpříznaková)
- infekce manifestní:
 - forma klinická – všechny typické příznaky
 - forma abortivní – jen některé příznaky
 - forma subklinická – nespecifické příznaky
- infekce lokální, systémová, generalizovaná
- infekce akutní, chronická:
 - infekce perzistentní - nejsou klinické příznaky, virus lze prokázat
 - infekce latentní - nejsou klinické příznaky, virus nelze prokázat



Diagnostika virových infekcí

1. Přímá- mikroskopie, tkáňové kultury, průkaz antigenu nebo nukleové kyseliny viru
2. Nepřímá- průkaz protilátek



Přímý průkaz viru

1. Mikroskopický průkaz- elektronový mikroskop
2. Izolace viru na tkáňových kulturách- pěstování viru na kulturách buněk (opičí ledviny)- cytopatický efekt

Viry nelze pěstovat na běžných kultivačních půdách!

3. Průkaz antigenu- imunofluorescence (respirační viry, herpetické viry), ELISA (HBsAg)
4. Průkaz nukleové kyseliny viru- PCR



PCR (Polymerase Chain Reaction)

- polymerázová řetězová reakce
- přímý průkaz NK virů
- různé modifikace
- výhody: vysoká specifita, rychlost, ATB nejsou kontraindikací vyšetření
- nevýhody: vysoká cena, přístrojové vybavení, riziko kontaminace

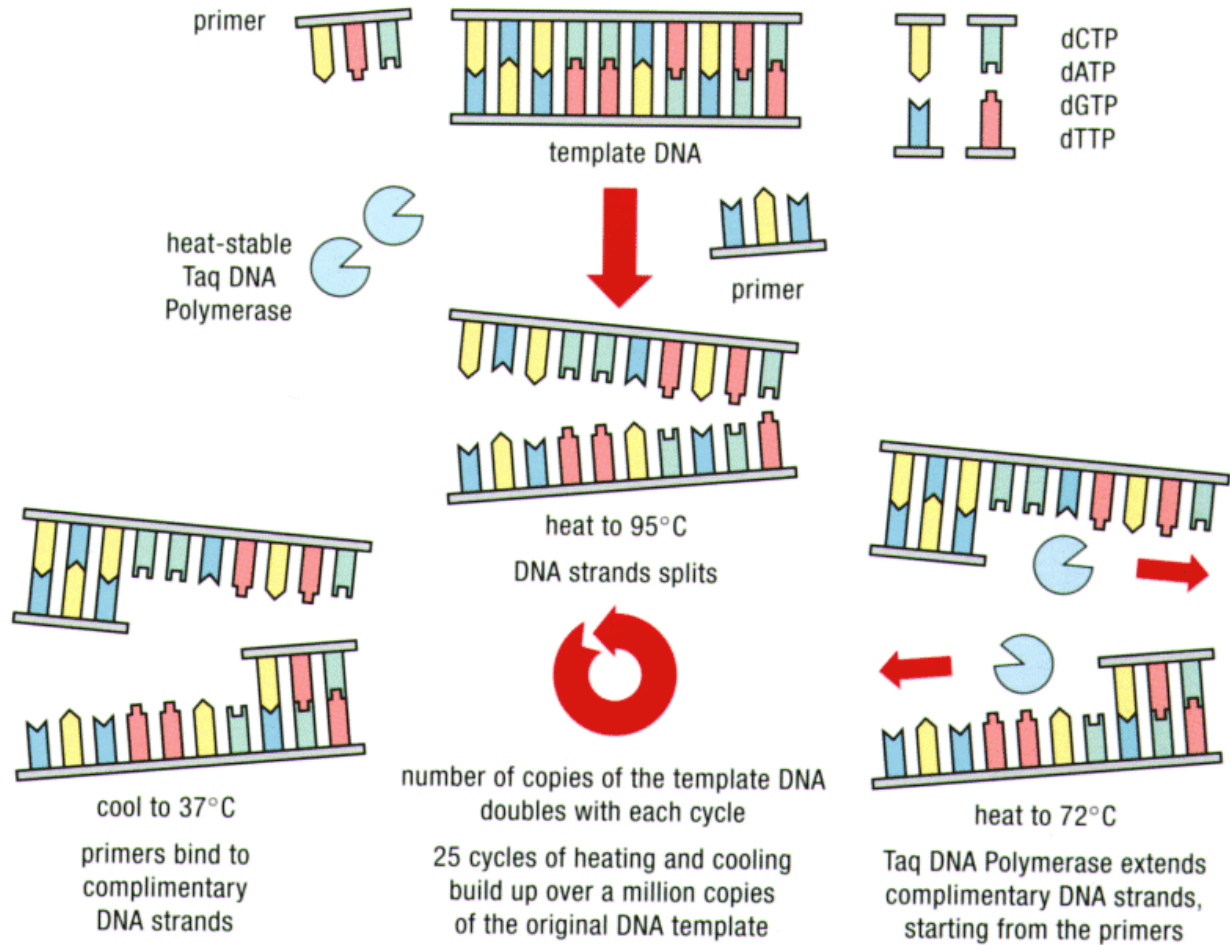


Princip PCR

- opakované cykly tří jednoduchých reakcí:
 - denaturace dvojšroubovice hledané DNA na dvě izolovaná vlákna (94 °C)
 - annealing - připojení dvou krátkých syntetických nukleotidů (primery) na tato vlákna (54 – 65 °C)
 - prodlužování primerů v přítomnosti vhodných reakčních složek a enzymu *Taq*-polymerasy za vzniku dvou kopií hledané DNA (72 °C)



Figure 1: Schematic diagram of the PCR reaction



Serologické reakce

Nepřímý průkaz

✓ průkaz protilátek



Přehled serologických metod

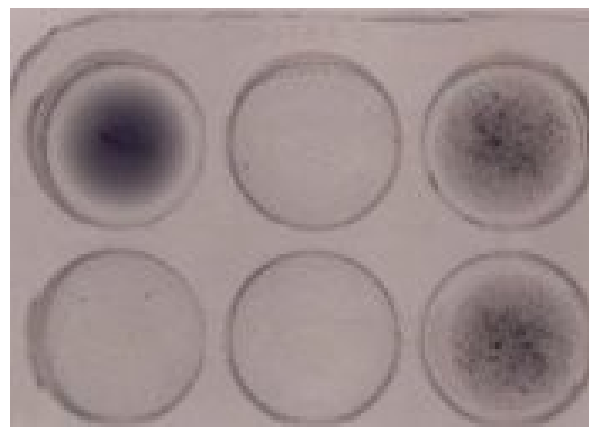
1. Precipitace
2. Aglutinace
3. Komplement fixační reakce (KFR)
4. Neutralizace
5. Reakce se značenými složkami:
 - imunofluorescence
 - enzymová imunoanalýza
 - Western blot (imunoblot)



Precipitace

- antigen koloidní povahy
- precipitační neboli vločkovací testy na lues
VDRL, RRR, RPR

kardiolipin + protilátky v séru → precipitace



Aglutinace

- antigen korpuskulární povahy
- antigen + hledaná protilátka → viditelný shluk (aglutinát)
- průkaz protilátek u salmonelózy (Widalova reakce), yersiniózy, listeriózy, tularémie
- přímá, nepřímá (na nosičích)- antigen je navázán na povrch vhodné částice (pasivní hemaglutinace- TPHA)



Komplement fixační reakce

- ✓komplex antigen + hledaná protilátka
- ✓komplement
- ✓indikátorový neboli hemolytický systém (beraní erytrocyty senzibilizované králičí protilátkou)

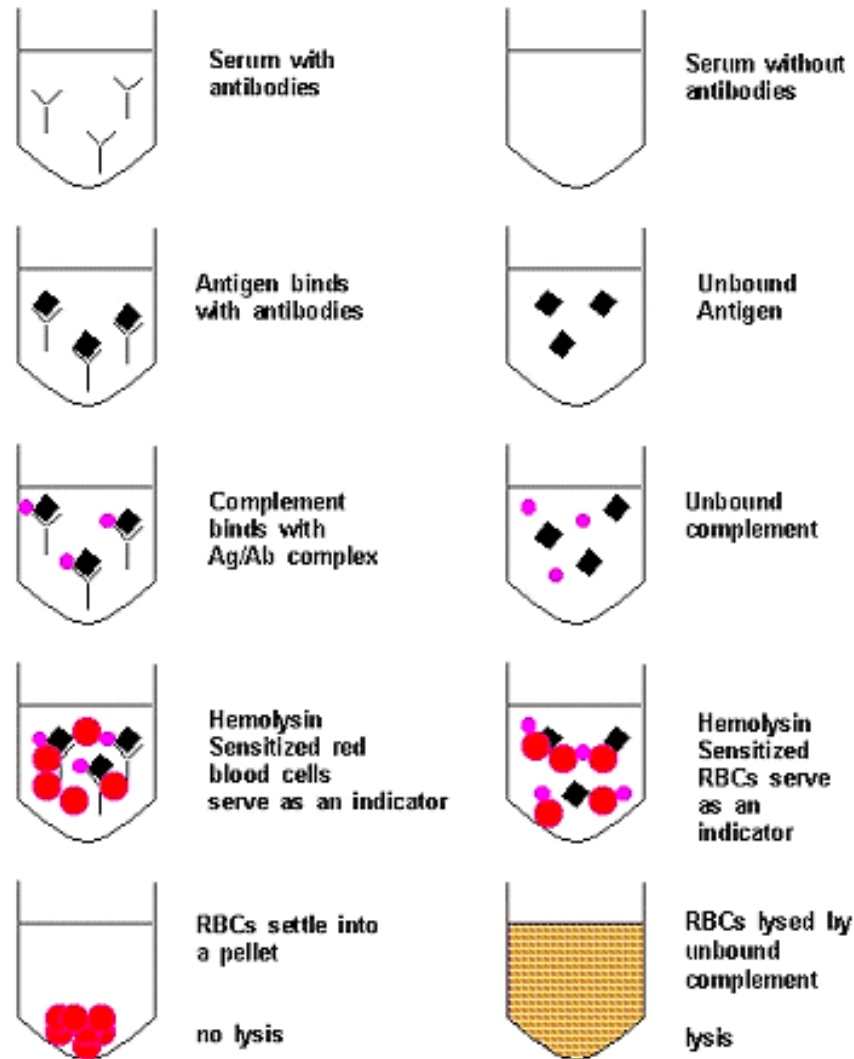


zábrana hemolýzy
pozitivní reakce

hemolýza
negativní reakce



Komplement fixační reakce



pozitivní

negativní



Neutralizační reakce

- protilátka brání biologickým účinkům antigenu
- ASLO – průkaz antistreptolyzinu O

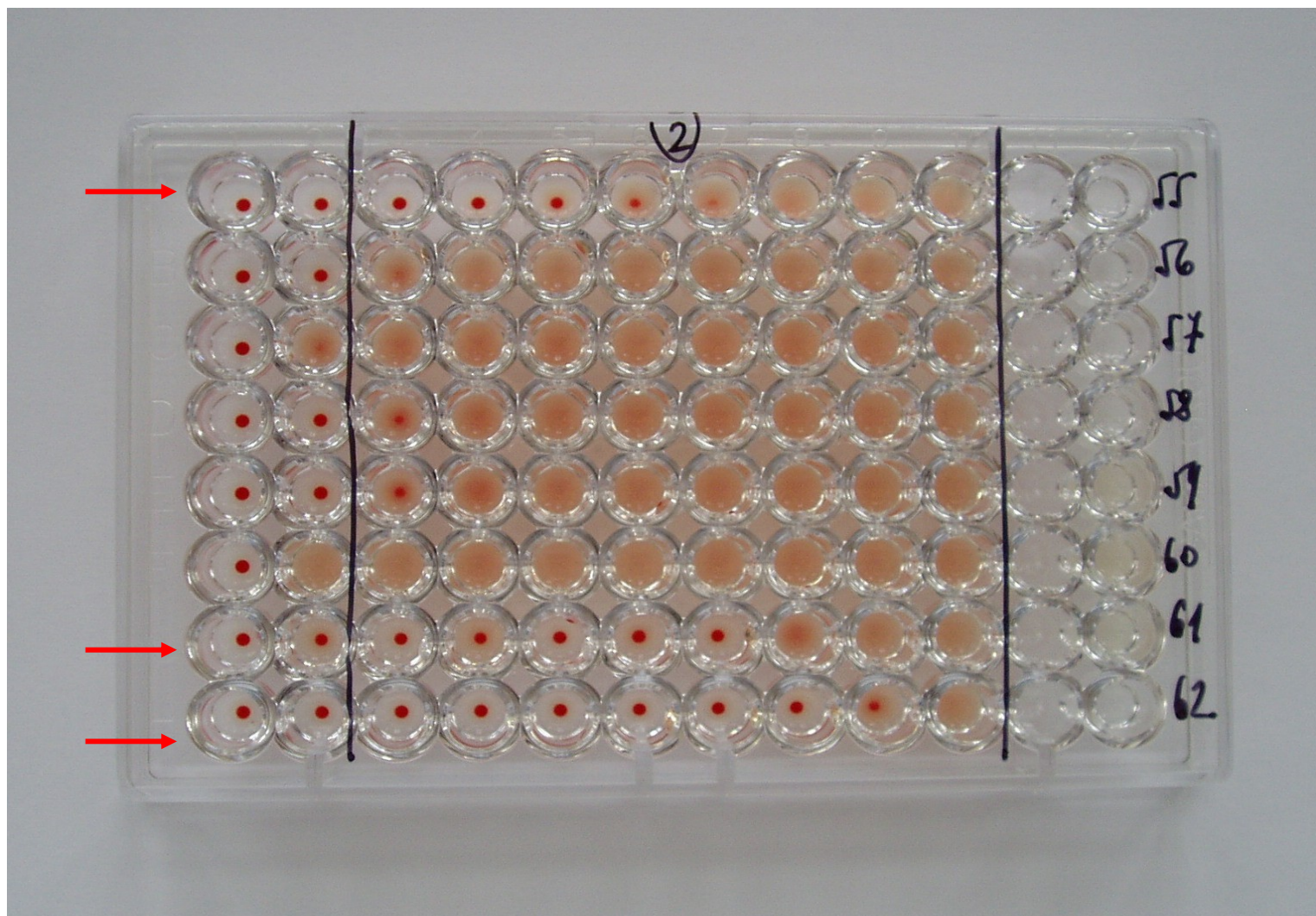
přítomnost ASLO ve vyšetřovaném séru



zábrana hemolýzy
pozitivní reakce



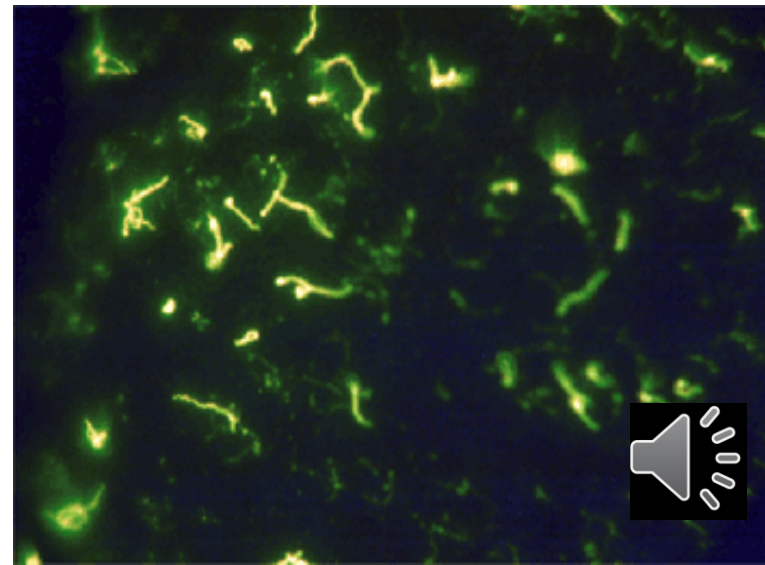
Neutralizační reakce - průkaz ASLO



Reakce se značenými složkami- Imunofluorescence

- jedna složka značena fluorescenčním barvivem, průkaz pomocí fluorescenčního mikroskopu
- přímá – průkaz antigenu: *T.pallidum*
- nepřímá – průkaz protilátek: syfilis, anaplazmóza, HHV6

Nepřímá imunofluorescence
- protilátky proti *T.pallidum*

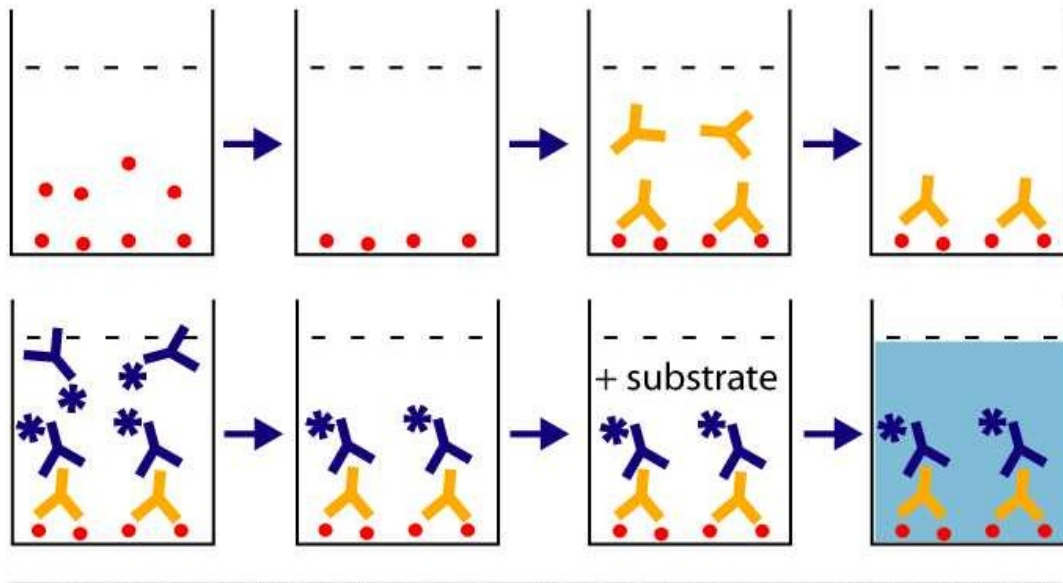


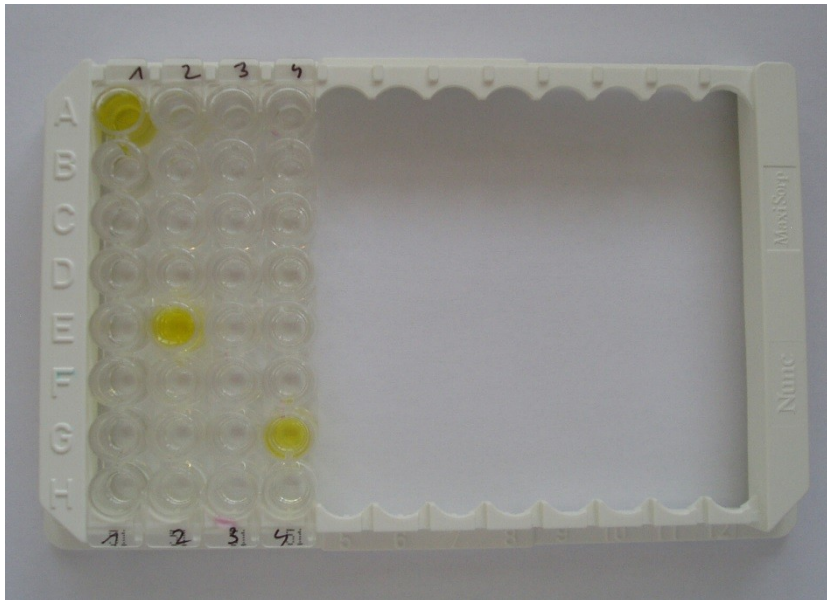
Reakce se značenými složkami- enzymová imunoanalýza

- jedna složka značena enzymem, který rozloží přidaný substrát za vzniku barevného produktu
- Výsledek: barevná reakce
- Hodnocení: měření absorbance
- ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)
- průkaz antigenu: HBsAg, respirační viry, chlamydie
- **průkaz protilátek: univerzální použití**



Princip metody ELISA





ELISA – průkaz HBsAg

Souprava pro vyšetření
metodou ELISA



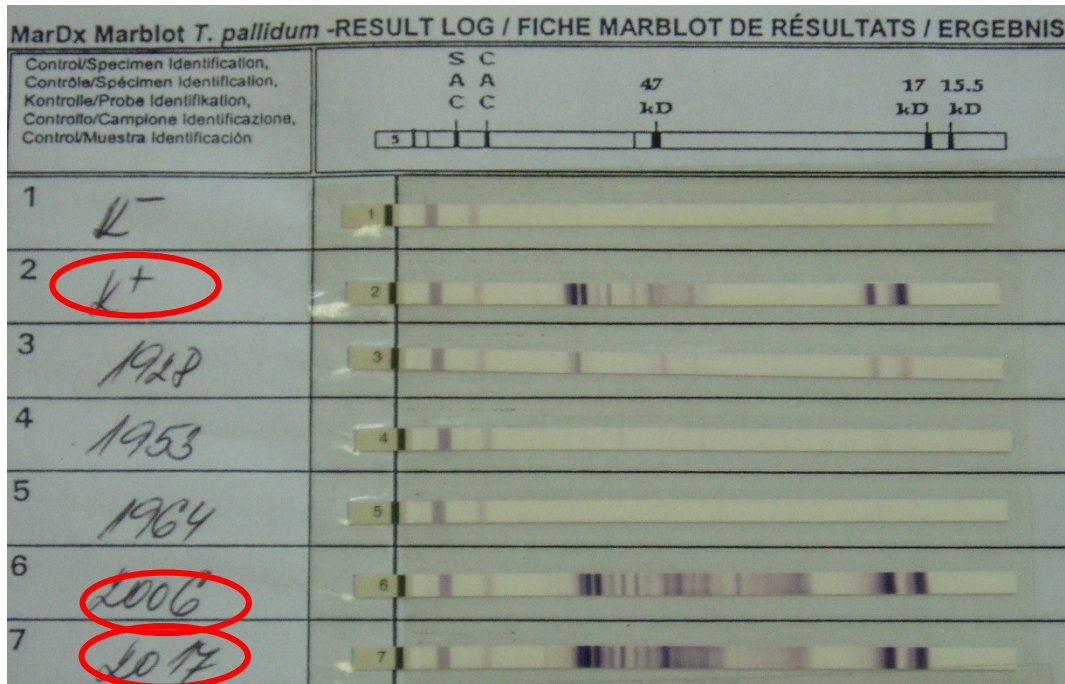
Reakce se značenými složkami - Western blot

Antigen rozdělený na jednotlivé polypeptidy dle molekulové hmotnosti na nitrocelulózovém pásku

1. vazba hledaných protilátek ze séra na příslušné antigenní frakce
2. přidání protilátky značené enzymem
3. přidání substrátu
4. výsledná reakce – barevný proužek



Western blot *T.pallidum* IgG



Interpretace serologických výsledků

- průkaz protilátek svědčí pro setkání s antigenem (kdy ?), k diagnóze infekce většinou nestačí
- dynamika imunitní reakce:

setkání s antigenem $\xrightarrow{10 \text{ dní}}$ průkaz protilátek



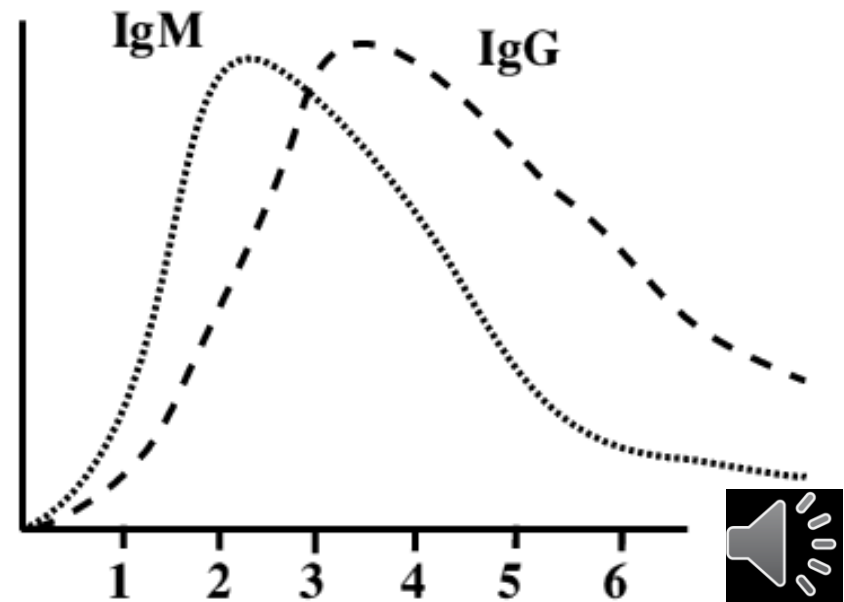
Serologický průkaz infekce

- vyšetření dvou vzorků séra: akutní na začátku onemocnění, rekonvalescentní za 10 až 14 dní
- průkazný nález: čtyřnásobný vzestup titru nebo serokonverze
- vzorky nutno vyšetřit záraz !

titr protilátek = nejvyšší ředění, v němž ještě došlo k prokazatelné serologické reakci



- **IgM** – první protilátky, přetrvávají týden až několik měsíců, svědčí pro čerstvou infekci
- **IgA** – přetrvávají o něco déle, svědčí pro čerstvou nebo nedávnou infekci
- **IgG** – nejvyšší hladina měsíc po začátku onemocnění, mohou přetrvávat roky



Virologie- shrnutí

- Virion
- Stavba virionu
- Reprodukce virů
- Průběh a formy virových infekcí
- Diagnostika virových onemocnění:

Přímá

Nepřímá



Děkuji za pozornost



Autor: MUDr. Petr Ondrovčík, CSc.