

Obecná virologie, sérologické vyšetřovací metody, základy imunologie

MUDr. Markéta Hanslianová
Masarykova univerzita,
Katedra laboratorních metod

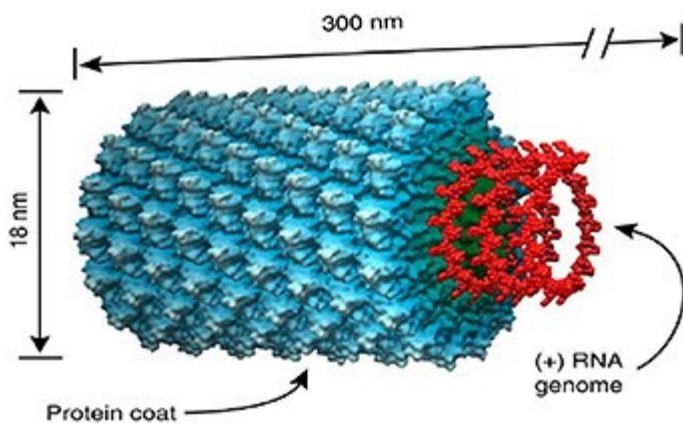
- Dotazy k prezentaci:
- 109293@mail.muni.cz

Viry

- lat. *virus* – „šťáva, jed“, v lékařské terminologii „infekční činitel“
- 1676- Anton van Leeuwenhoek- první pozorování bakterií vlastnoručně vyrobeným mikroskopem
- 1879 – 1882: první pokusný přenos virového onemocnění- Adolf Mayer (mozaiková choroba tabáku),
- Dimitrij Ivanovskij- filtrace viru
- Beijerinck-použit termín virus

- 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

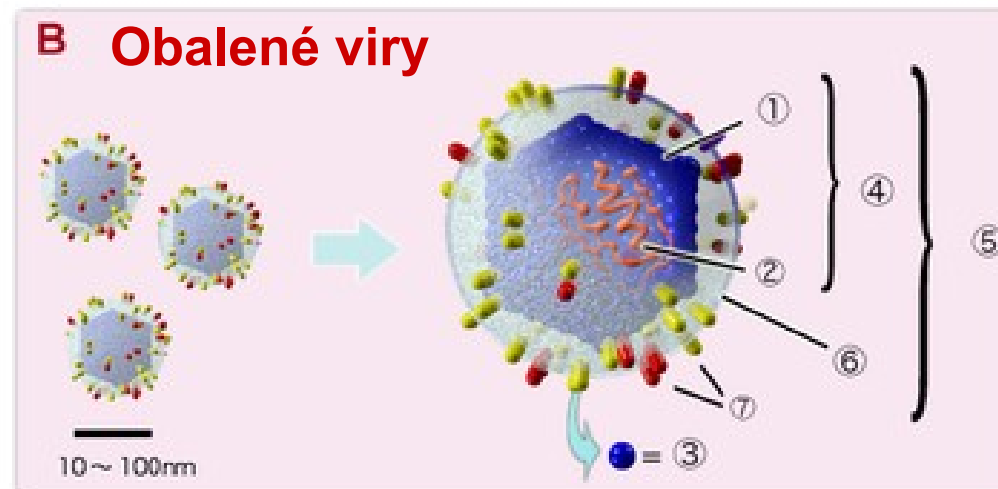
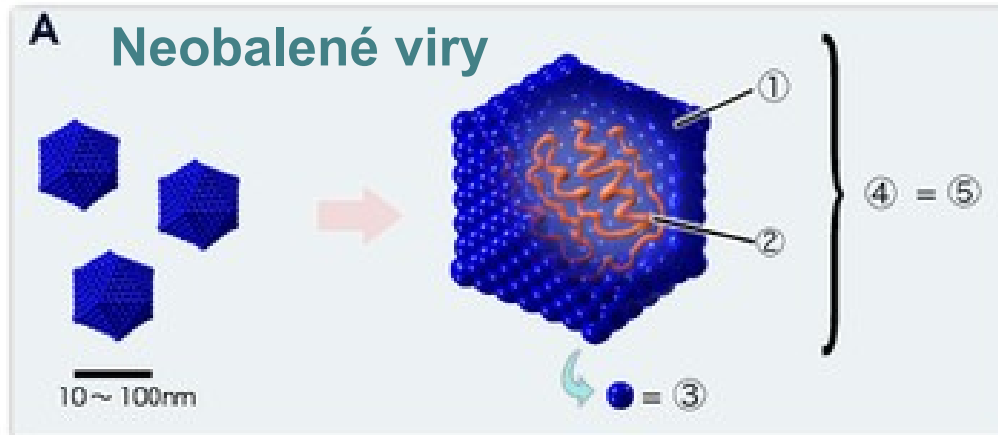
Stavba virionu

virion = virová částice

- vnitřní část – **dřeň** neboli **nukleoid** obsahuje nukleovou kyselinu
- zevní část – **kapsida** obsahuje bílkovinu

nukleoid + kapsida = **nukleokapsida**
(**neobalené viry**, např. pikornaviry, adenoviry)

nukleokapsida může být uložena ve virovém obalu (**obalené viry**, např. herpesviry)



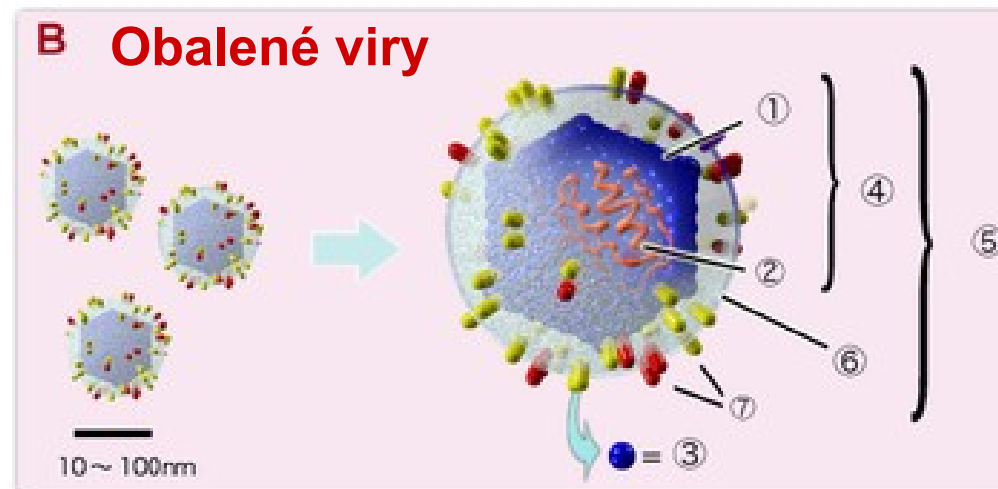
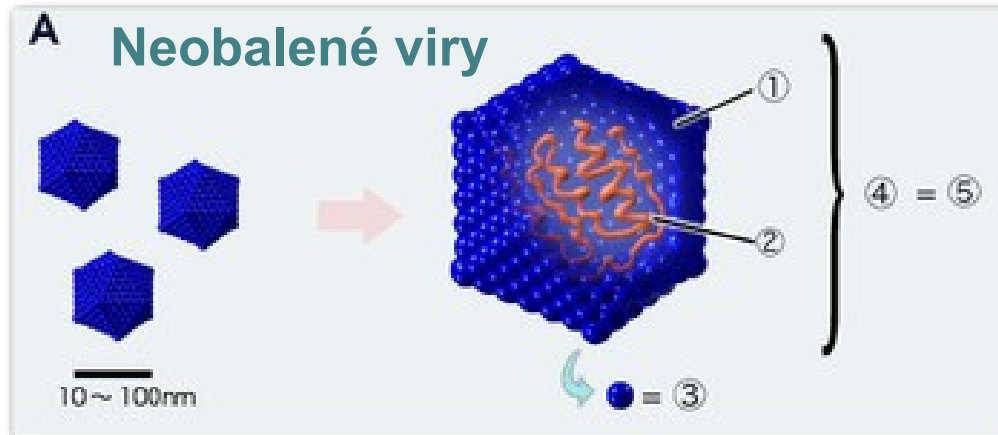
1 – kapsida, 2 – nukleoid, 3 – protomera, 4 – nukleokapsida, 5 – nukleokapsida s obalem, 6 – lipoproteinový obal, 7 - glykoproteiny

Nukleová kyselina

- Typ a organizace virového genomu:
 - RNA nebo DNA
 - jednořetězcová nebo dvouřetězcová
 - segmentovaná nebo nesegmentovaná
 - lineární nebo kruhová

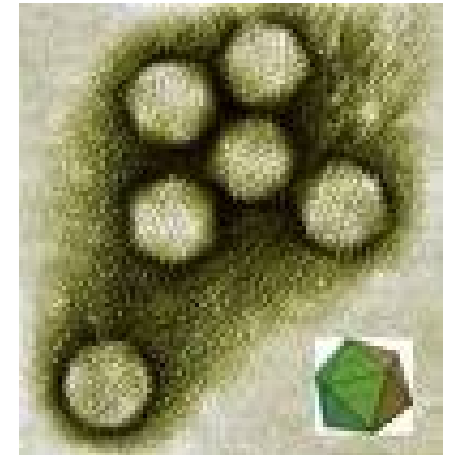
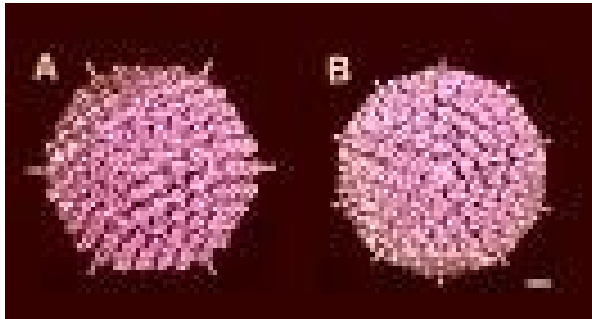
Kapsida

- sestavena z bílkovinných podjednotek neboli **protomer** uspořádaných symetricky
 - kapsida s kubickou (ikosaedrání) symetrií – tvar dvacetistěnu (např. herpesviry, adenoviry)
 - kapsida se spirální (helikální) symetrií – tvar válce (např. orthomyxoviry)
 - kapsida s komplexní symetrií – např. bičíkaté fágy, poxviry

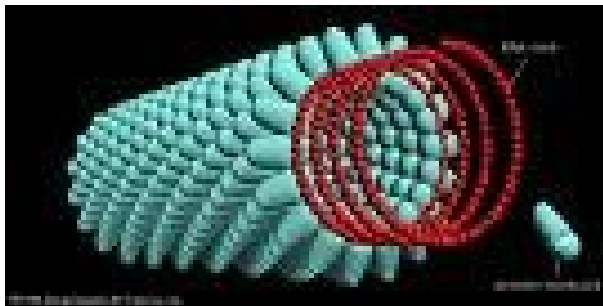


1 – kapsida, 2 – nukleoid, 3 – protomera, 4 – nukleokapsida, 5 – nukleokapsida s obalem, 6 – lipoproteinový obal, 7 - glykoproteiny

Kubická (ikosaedrální) symetrie

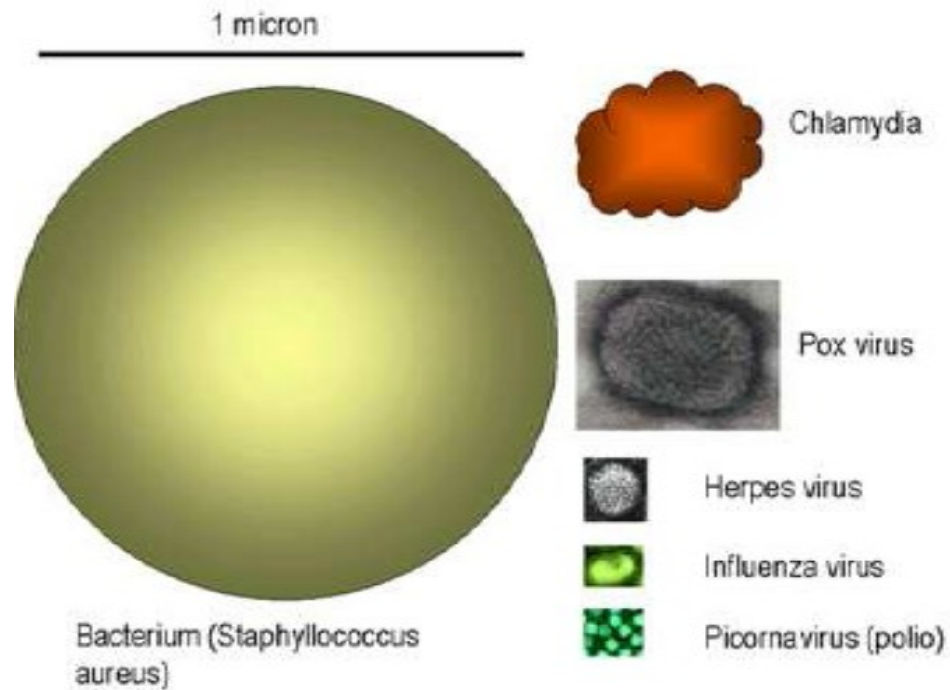


Spirální (helikální) symetrie



Komplexní symetrie

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



Třídění virů

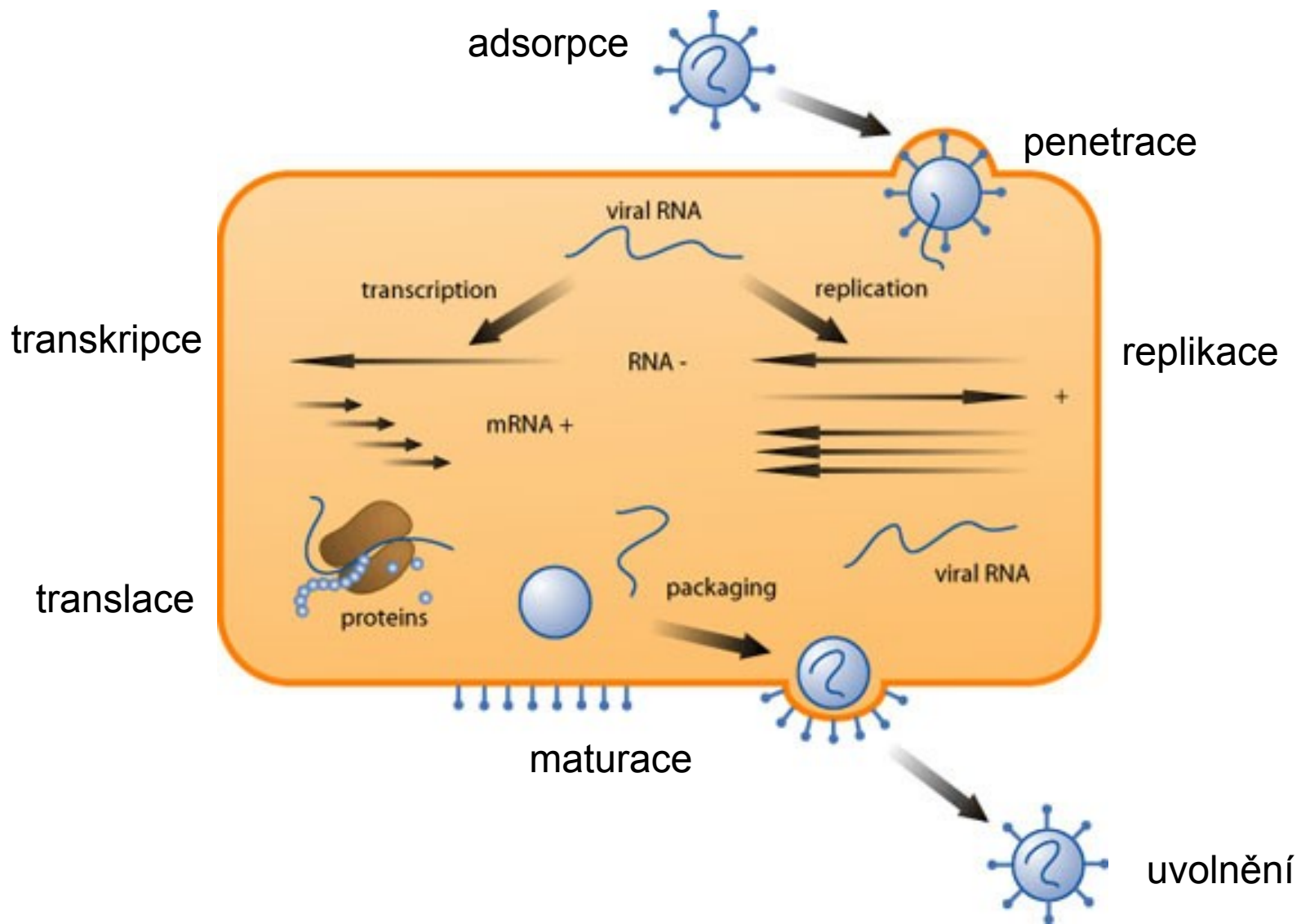
- a) dle charakteru genomu: RNA viry, DNA viry
- b) dle přítomnosti obalu: neobalené viry, obalené viry
- c) dle symetrie kapsidy: viry s kubickou symetrií, spirální symetrií, komplexní symetrií
- d) dle povahy hostitele: viry bakterií (bakteriofágy), kvasinek, prvoků, rostlin, hmyzu, obratlovců
- e) 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
Vazba na buňky, ve kterých se viry nemnoží -
erythrocyty- hemaglutinace
- 1. Penetrace** (průnik) virionu do buňky
- 2. Rozbalení** virionu- ztráta kapsidy a virového obalu-uvolnění nukleové kyseliny

Reprodukce virů

- 1. Replikace** virového genomu- viru využije metabolismus hostitelské buňky k tvorbě virových bílkovin a NK
- 2. Maturace** (dozrávání) virionů- organizace virových bílkovin kolem NK viru, tvorba kapsidy
- 3. Uvolnění** nových virionů z buňky



Buněčné změny při virové infekci

- Cytocidní infekce- virová 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 nákaz

- 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

- Mikroskopický průkaz- elektronový mikroskop
- Izolace viru na tkáňových kulturách- pěstování viru na kulturách buněk (opičí ledviny)- cytopatický efekt
Viry nelze pěstovat na běžných kultivačních půdách!

Přímý průkaz viru

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

PCR (Polymerase Chain Reaction)

- polymerázová řetězová reakce
- přímý průkaz NK virů (bakterií, kvasinek, parazitů)
- různé modifikace
- výhody: vysoká specificita, 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)

PCR – LightCycler (Roche)



Serologické reakce

Nepřímý průkaz

✓ průkaz protilátek

Serologické reakce

- Reakce mezi antigeny a protilátkami in vitro
- Srážlivá krev, likvor, synoviální tekutina

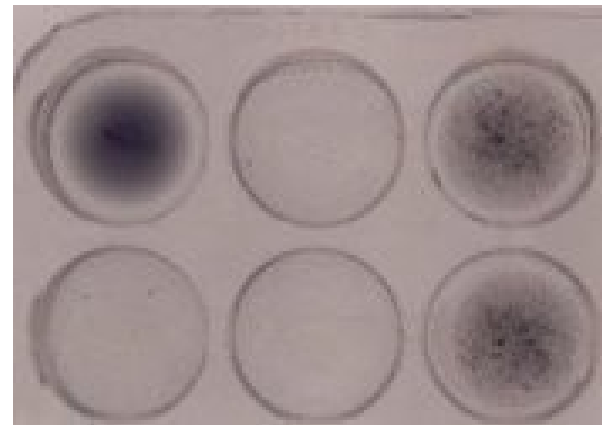
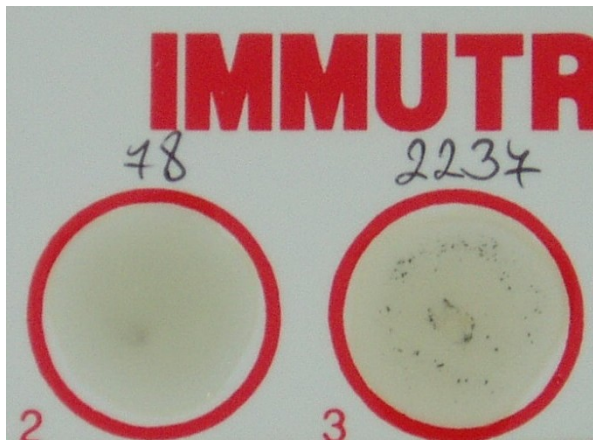
Přehled serologických metod

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

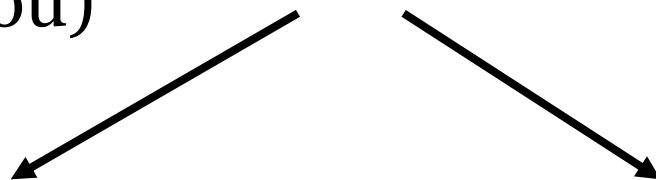


Aglutinace

- 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

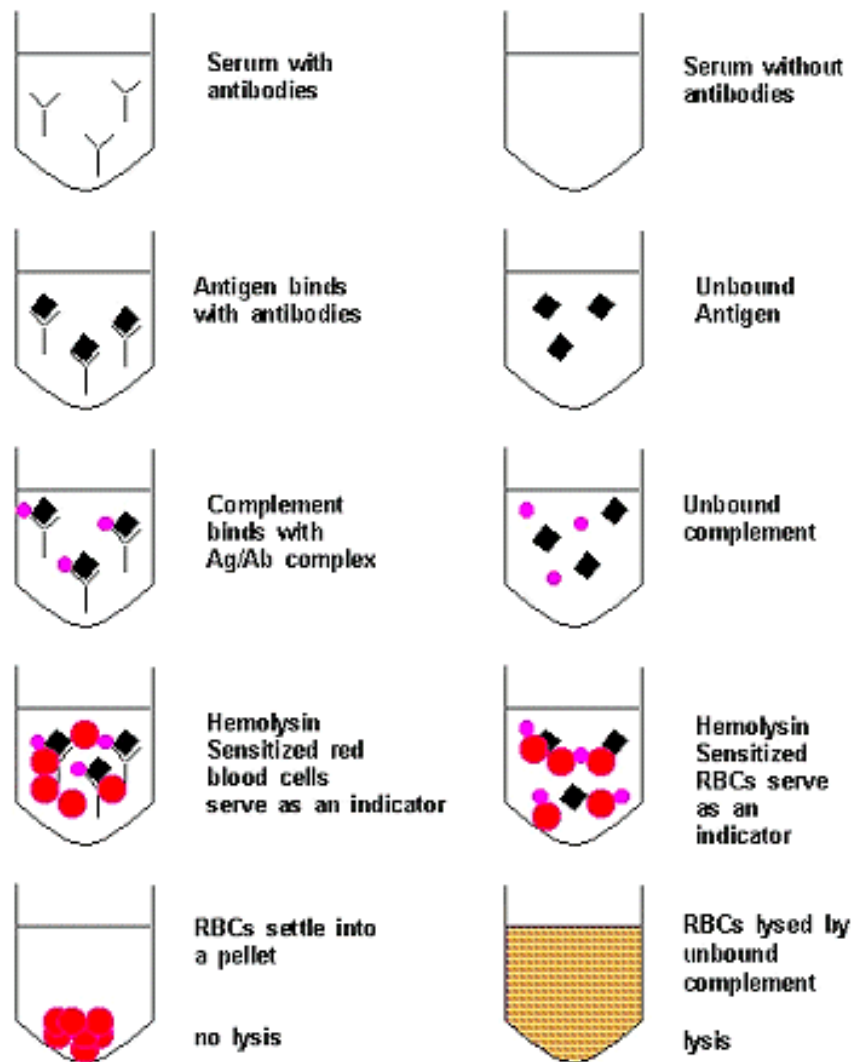
- ✓ komplex antigen + hledaná protilátka
- ✓ komplement
- ✓ indikátorový neboli hemolytický systém
(beraní erytrocyty senzibilizované králičí protilátkou)



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

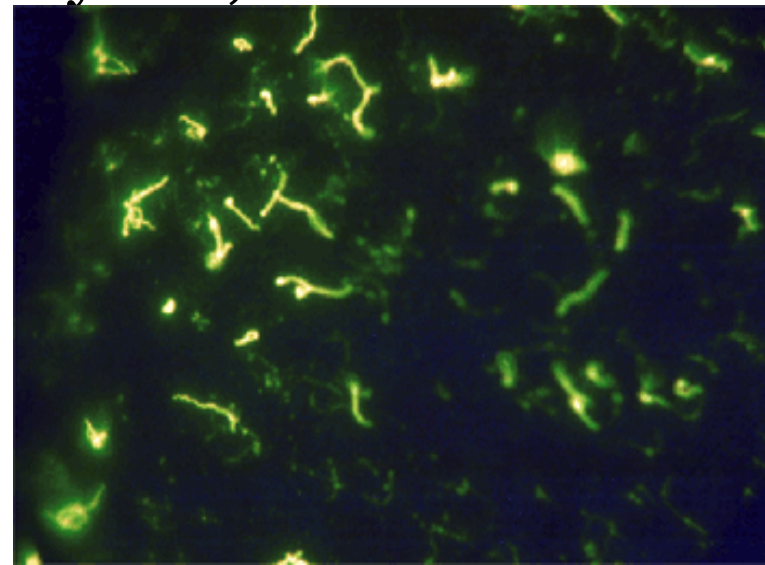


zábrana hemolýzy
pozitivní reakce

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

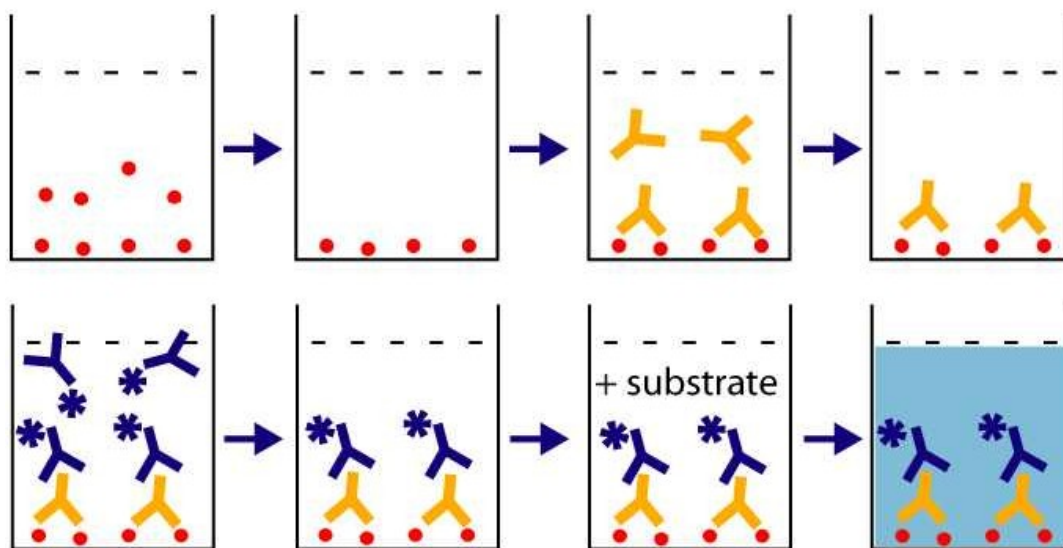
Nepřímá imunofluorescence
- protilátky proti *T.pallidum*

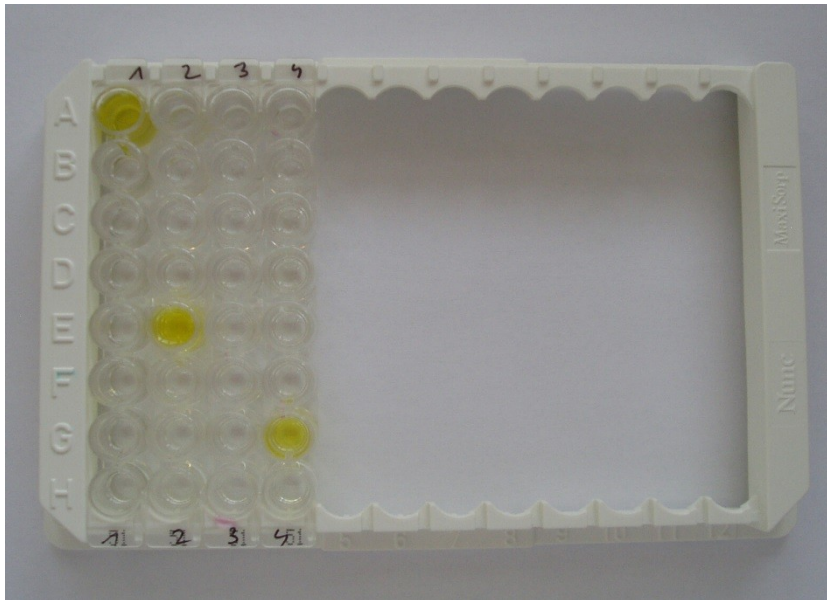


Reakce se značenými složkami- enzymová imunoanalýza

- 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

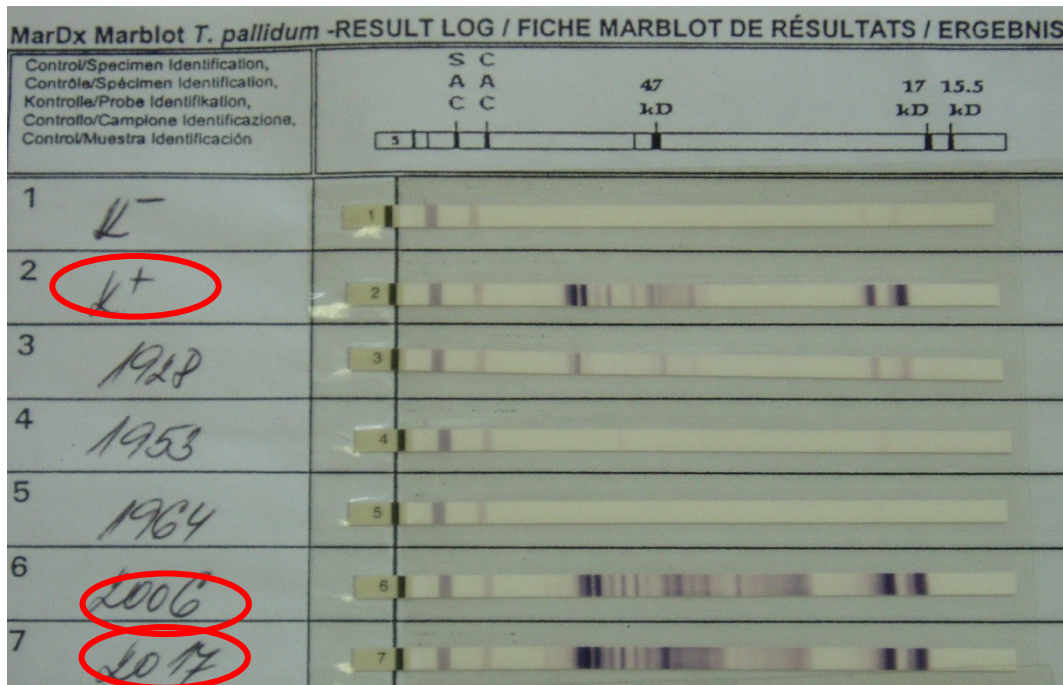


Reakce se značenými složkami - Western blot

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:

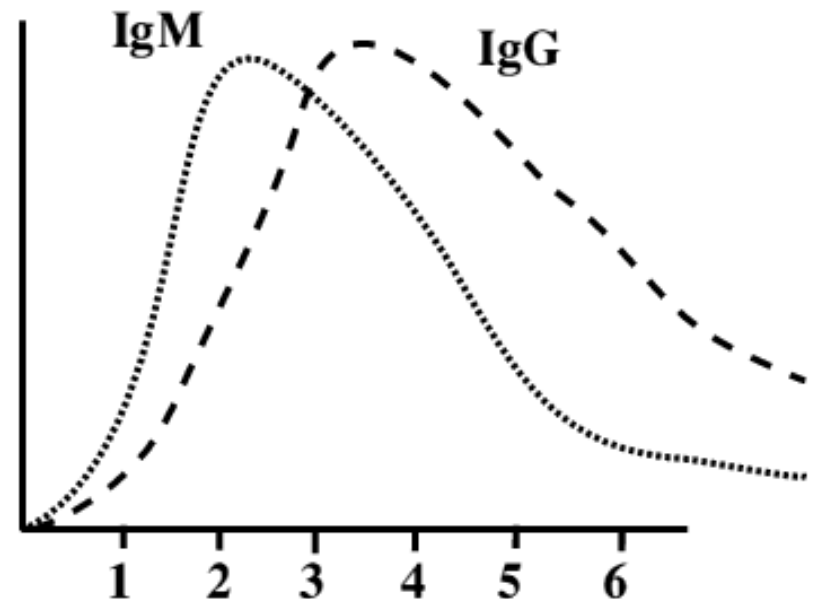
setkání s antigenem  průkaz protilátek

Serologický průkaz infekce

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

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



Prevence a terapie virových nález

- antivirová chemoterapeutika – antiherpetika, antiretrovirotika, protichřipková chemoterapeutika
- pasivní imunizace (podání imunoglobulinů) – antirabické sérum, profylaxe hepatitidy A a B, varicelly, cytomegalovirové infekce
- aktivní imunizace (očkování)

Obrana proti infekci

- **nespecifická**
(vrozená, přirozená)

- ✓ proti mnoha různým patogenům
- ✓ již při narození
- ✓ působí okamžitě
- ✓ probíhá vždy stejně

- **specifická**
(získaná, adaptivní)

- ✓ proti konkrétnímu patogenu
- ✓ vyvíjí se postupně
- ✓ nástup účinku pomalejší
- ✓ při opakovaném kontaktu výraznější

Nespecifická imunita

1. Bariéry vůči usazení a průniku mikrobů: kůže, ochranné reflexy, běžná mikroflóra
2. Vnitřní mechanismy nespecifické imunity (buněčné- fagocytóza, humorální- komplement, cytokiny)
3. Horečka
4. Zánět

Bariéry proti usazení a průniku mikrobů

- Kůže: pro mikroby neprostupná (výjimka leptospiry, papilomaviry, larvy parazitů)
- Sliznice: hlen, sliny, slzy, obměna buněk
- Ochranné funkce a reflexy: kýchání, kašel, zvracení, zrychlená střevní peristaltika, mrkání
- Normální mikroflóra: brání usídlení patogenních mikrobů

Vnitřní mechanismy nespecifické imunity

```
graph TD; A[Vnitřní mechanismy nespecifické imunity] --> B[Buněčné]; A --> C[Humorální];
```

Buněčné

- ✓ fagocyty
- ✓ NK buňky
- ✓ eosinofily ...

Humorální

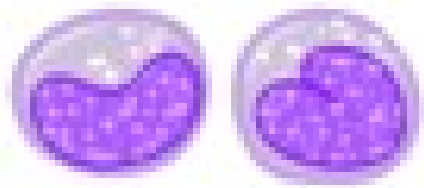
- ✓ komplementový systém
- ✓ interferony
- ✓ cytokiny, proteiny akutní fáze...

Fagocyty

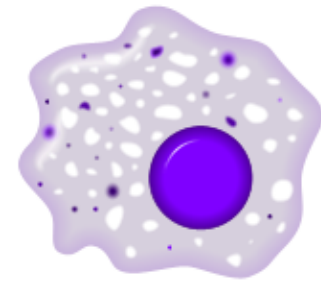
neutrofil



- Pohlcování a likvidace cizorodých částic
- Neutrofily (polymorfonukleáry) – proti původcům hnisavých infekcí (většina bakterií)
- Makrofágy – proti intracelulárně se množícím agens (intracelulární bakterie, viry)



monocyt



makrofág

Fagocytóza

1. Chemotaxe

pohyb fagocytů směrem k místu infekce; chemotaxiny: C5a, C3a, IL-8, bakteriální oligopeptidy

2. Adherence

přichycení cizorodé látky na povrch fagocytů; fagocytární lektiny, nespecifické opsoniny (C3b), specifické opsoniny (protilátky)

3. Vlastní pohlčení

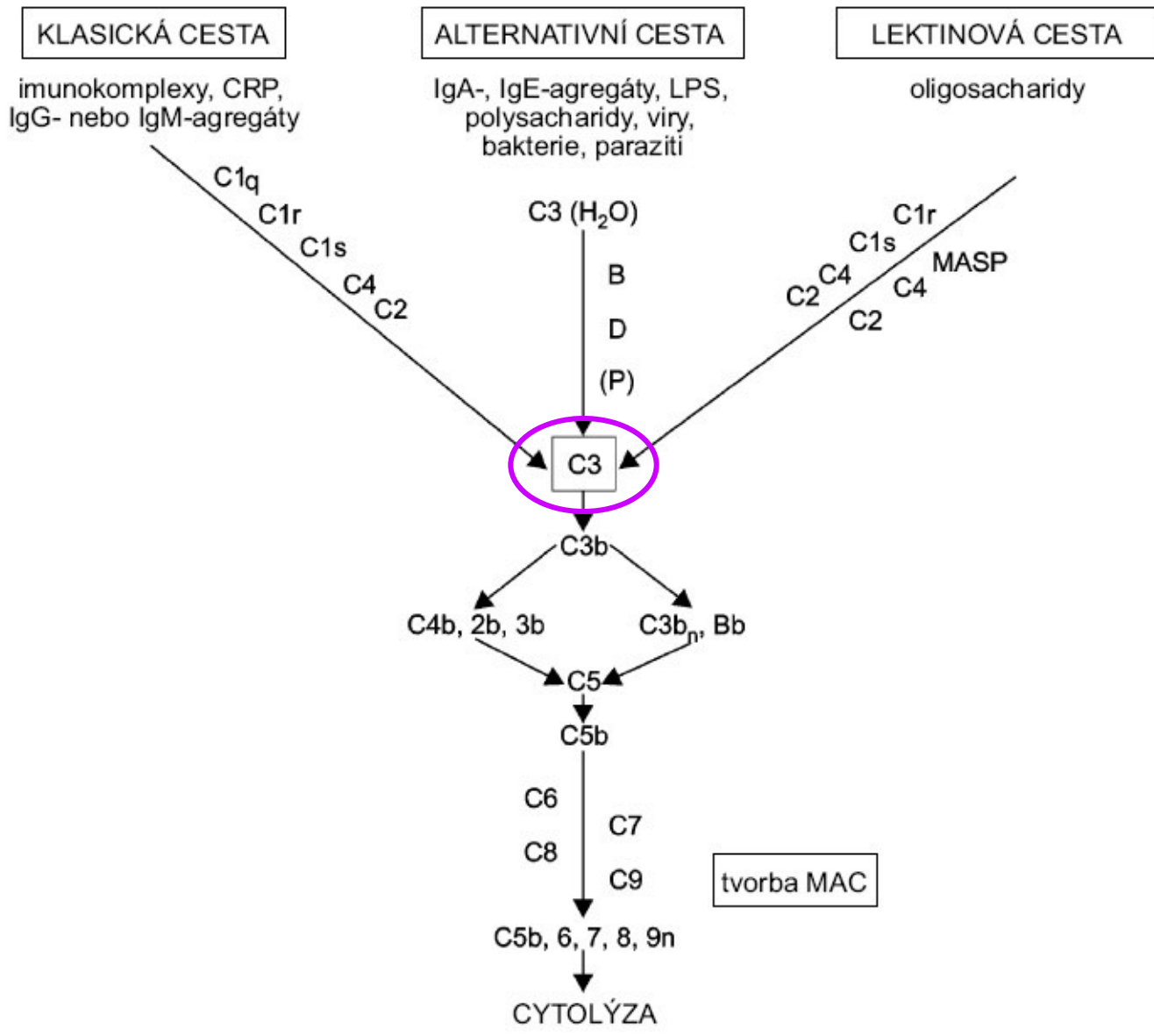
fagosom-fagolysozom

4. Nitrobuněčné ničení


enzymy, laktoferin, bazické proteiny, reaktivní kyslíkové metabolity

Komplementový systém

- systém bílkovin přítomných v krevním séru C1 – C9 (fragmenty a, b)
- kaskádový jev – produkt jedné reakce katalyzuje další reakci
- aktivace klasickou, alternativní a lektinovou drahou
- Význam: chemotaxe (C5a, C3a), opsonizace (C3b), lýza buněk (membránový útočný komplex C56789)



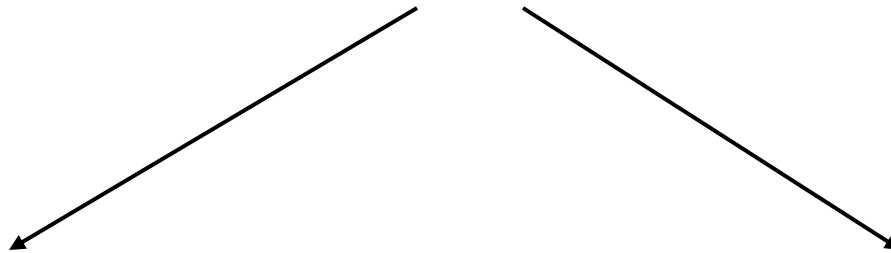
Mechanismy nespecifické imunity

- Horečka: exogenní pyrogeny (mikrobiální produkty)  endogenní pyrogeny (interleukiny, makrofágový zánětlivý protein)



- Zánět

Specifická imunita



Buněčná

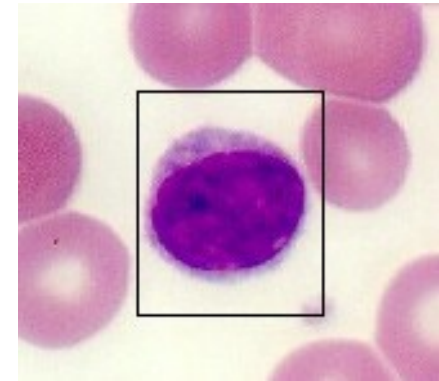
✓ T lymfocyty

Humorální

✓ B lymfocyty

✓ protilátky

T lymfocyty

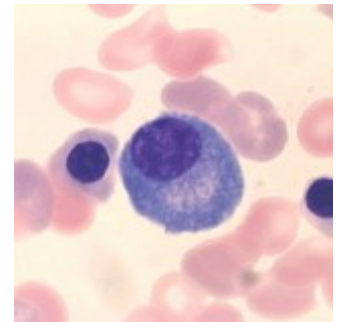
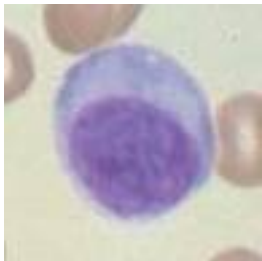


- kmenové buňky z kostní dřeně
- **T** - dozrávání v thymu
- ✓ cytotoxické T buňky (Tc) – zabíjejí antigenně změněné buňky (buňky infikované viry)
- ✓ pomocné T buňky (Th) – produkují cytokiny, Th1 (aktivace makrofágů, intracelulární patogeny), Th2 (aktivace B buněk, extracelulární patogeny)
- ✓ supresorové T buňky (Ts) – tlumí imunitní reakci

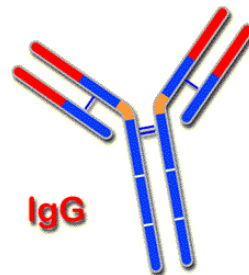
B lymfocyty

- **B** – u ptáků dozrávání ve Fabriciově **b**urse, u savců v kostní dřeni (**b**one marrow)

- lymfocyty B → plazmatické buňky

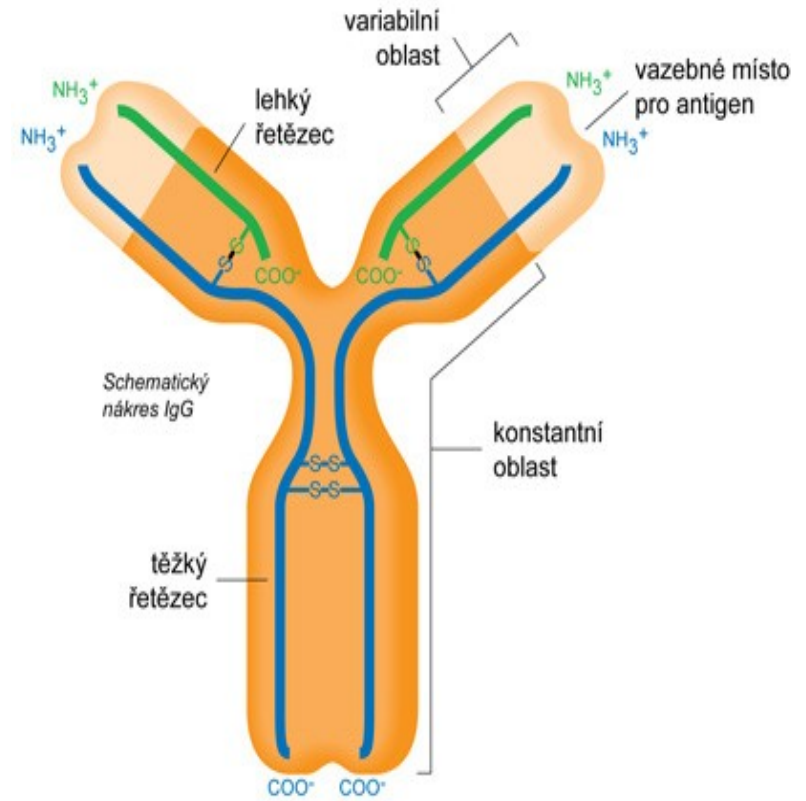


produkce protilátek(imunoglobulinů)



Protilátky

- imunoglobuliny schopné specificky se vázat na antigen
- tvořeny plazmatickými buňkami (plazmocyty)
- třídy imunoglobulinů: IgG, IgM, IgA, IgD, IgE



Význam protilátek

- **IgG**: opsonizace, neutralizace toxinů a virů, aktivace komplementu klasickou drahou, přestup přes placentu
- **IgM**: začátek imunitní reakce, aktivace komplementu klasickou drahou
- **IgA**: slizniční imunita
- **IgE**: ochrana proti parazitům
- **IgD**: receptor B buněk pro příslušný antigen

Imunizace

= proces vedoucí ke vzniku imunity

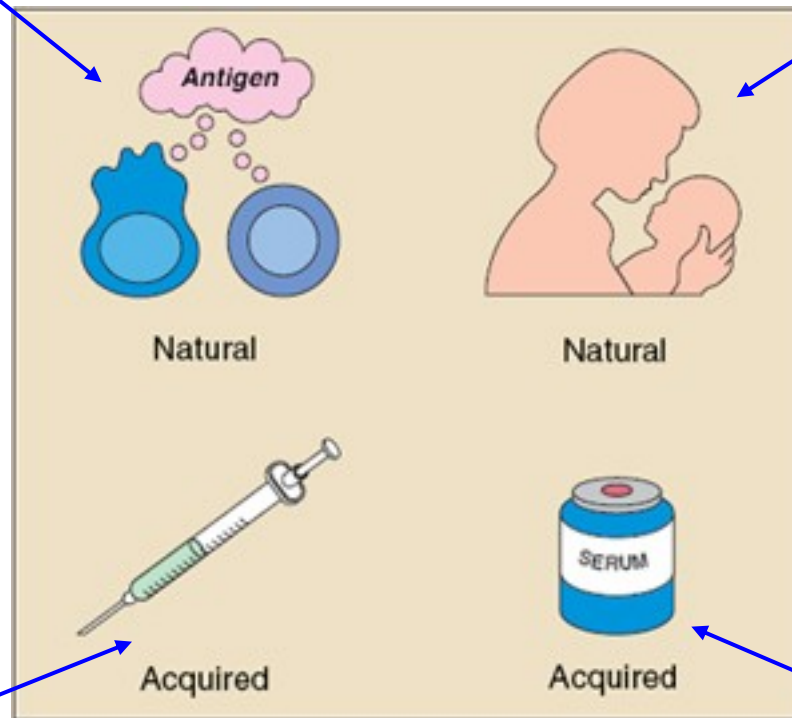
```
graph TD; A[Imunizace] --> B[přirozená]; A --> C[umělá];
```

přirozená

umělá

Imunizace přirozená aktivní
– po infekci

Imunizace přirozená pasivní
– transplacentární



Imunizace umělá aktivní
– po očkování

Imunizace umělá pasivní –
po podání imunoglobulinu

Imunizace aktivní

- Vakcíny:
 1. Živé oslabené (TBC)
 2. Inaktivované (celobuněčné, subjednotkové, polysacharidové, anatoxiny)
 3. Rekombinantní (VHB)

- Dotazy k prezentaci:
- 109293@mail.muni.cz