

Pátráme po mikrobech
Díl XII.

Virologie – 2. část (P12!)

Ondřej Zahradníček

K praktickému cvičení pro VLLM0421c

Kontakty na mne:

777 031 969

zahradnicek@fnusa.cz

ICQ 242-234-100

Technická poznámka

- Logicky by se měl provést nejprve první úkol (izolace viru na vejci) a poté teprve druhý (průkaz přítomnosti viru v amniové tekutině Hirstovým testem).
- Z důvodu 90min inkubace druhého úkolu však **začneme druhým úkolem**, až poté provedeme úkol první. Druhý úkol dokonce předřadíme i teoretickému výkladu. Výsledek druhého úkolu pak odečteme na konci praktika a vyložíme si jeho význam.
- **Proved'te úkol přesně podle návodu.**

Příběh

- Pan Plicník ležel povadle už více než týden v nemocnici pro **dlouhodobé dýchací obtíže**. Shlukla se kolem něj skupinka mediků. Snaživě ho lechtali svými fonendoskopy a nesmělými prsty zkoušeli poklep. Nenašli však žádný patologický nález.
- Vtom se přihlásila studentka Pilňoušková. „Pacient má suchý kašel, fyzikální vyšetření nic neprokázalo. Nemohlo by jít o **atypickou pneumonii**?“ Asistent zazářil: „Výborně, no aspoň někdo že na to přišel!“

Atypické pneumonie

- se vyznačují **pomalejším nástupem**, spíše neproduktivním kašlem a častou absencí klasických fyzikálních příznaků
- Původci klasických zánětů plic (jako je např. *Streptococcus pneumoniae*) se tu neuplatní, **většinou je původcem některý z respiračních virů**. Může to však být i některá bakterie, zejména *Mycoplasma pneumoniae*, popř. *Chlamydia pneumoniae*.
- **V případě bakteriálních původců je možná antibiotická léčba** (doxycyklin, makrolidy)

Znovu tu máme viry

<http://vietsciences.free.fr/khao-cuu/nguyenlandung/virus01.htm>



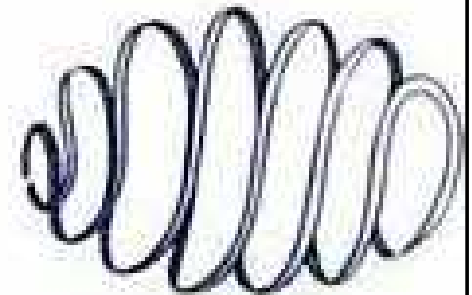
(a) Vaccinia virus



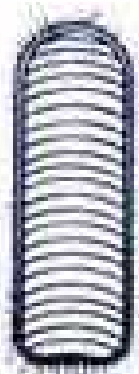
(b) Paramyxovirus (mumps)



(c) Herpesvirus



(d) Orbivirus



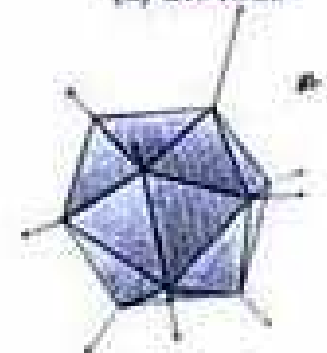
(e) Rhabdovirus



(f) T-even coliphage



(g) Flexuous-tailed phage



(h) Adenovirus



(i) Influenza virus



(m) Tubulovirus

Dnes se v našich úkolech setkáme s viry

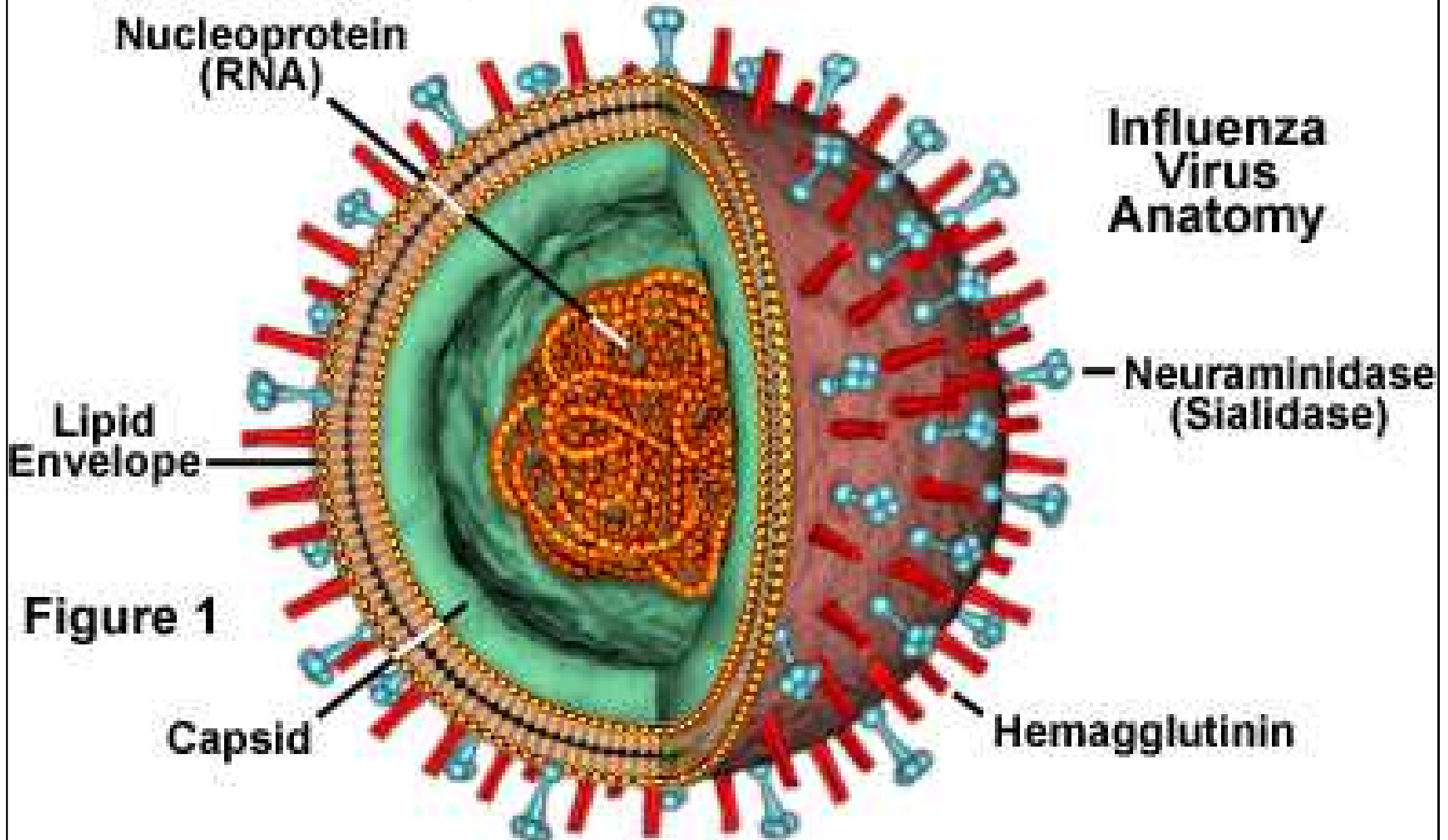
- respiračními
 - viry chřipky A a B
 - viry parachřipky
 - RS viry
 - adenoviry
 - *Mycoplasma pneumoniae* – není virus, ale diagnostikuje se virologickými metodami
- virem klíšťové encefalitidy

Chřipka

- Chřipka je **onemocnění celého těla**, ale především **dolních cest dýchacích**. K obrazu chřipky nepatří rýma ani bolesti v krku, ale suchý kašel, vysoké horečky, schvácenost a bolesti svalů. Začíná často velice prudce.
- **Nebezpečná** je chřipka u imunosuprimovaných (především delší trvání), těhotných, starších osob. Záleží ovšem také na konkrétním podtypu chřipkového viru
- Během 1. světové války zahynulo mnoho lidí na tzv. **španělskou chřipku**

Virus chřipky

<http://micro.magnet.fsu.edu/cells/viruses/influenzavirus.html>



Influenzavirus A – antigeny

- Z vlastností viru chřipky je nejdůležitější antigenní proměnlivost. U viru chřipky se rozeznává 15 podtypů podle hemagglutininového antigenu (H) a 9 podtypů podle různé neuraminidázy (N).
- Je možný lehký **antigenní posun – drift**, tedy drobné změny antigenních oblastí
- Je také možná **antigenní výměna – shift**: objeví se zcela nový podtyp s novým H, popřípadě N. Může dojít i ke genetickému přeskládání a vzniku nového hybridu.

Virus chřipky

M2 protein
(only on serotype
A virus)

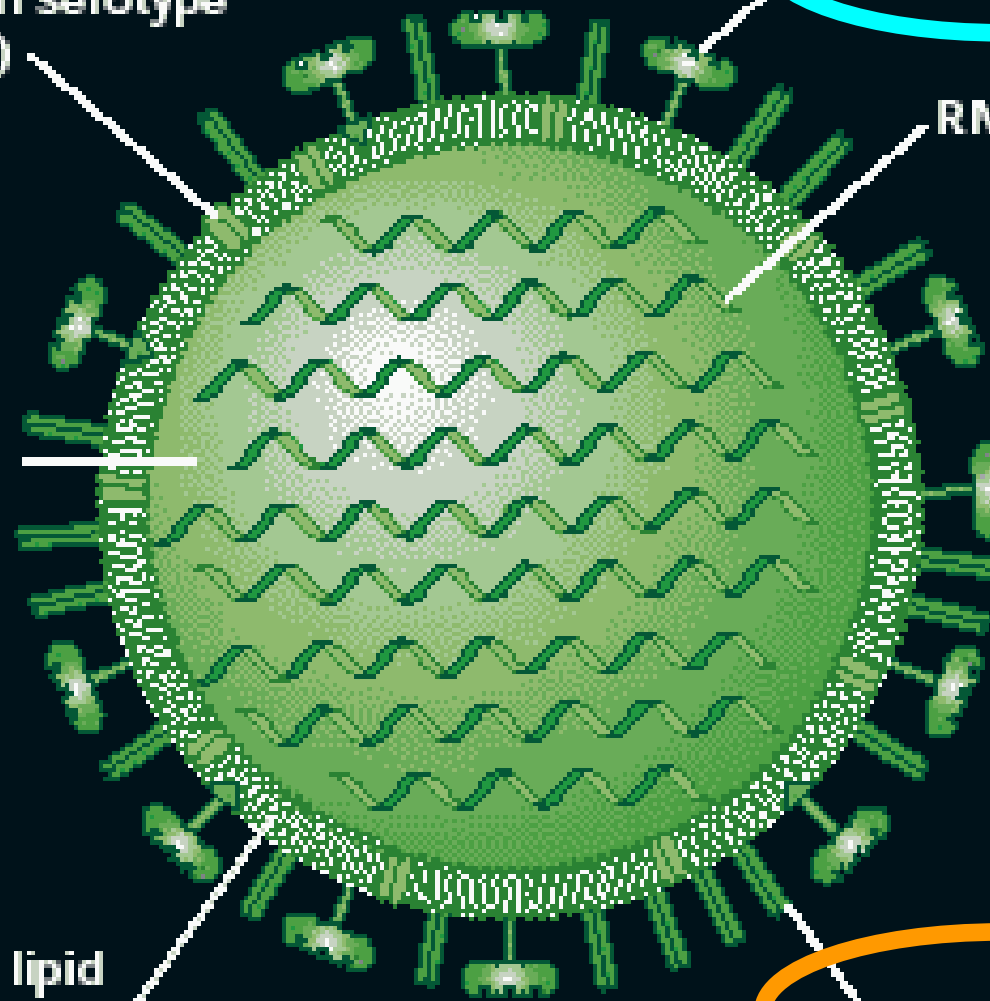
Neuraminidase

RNA

Capsid

Viral lipid
membrane

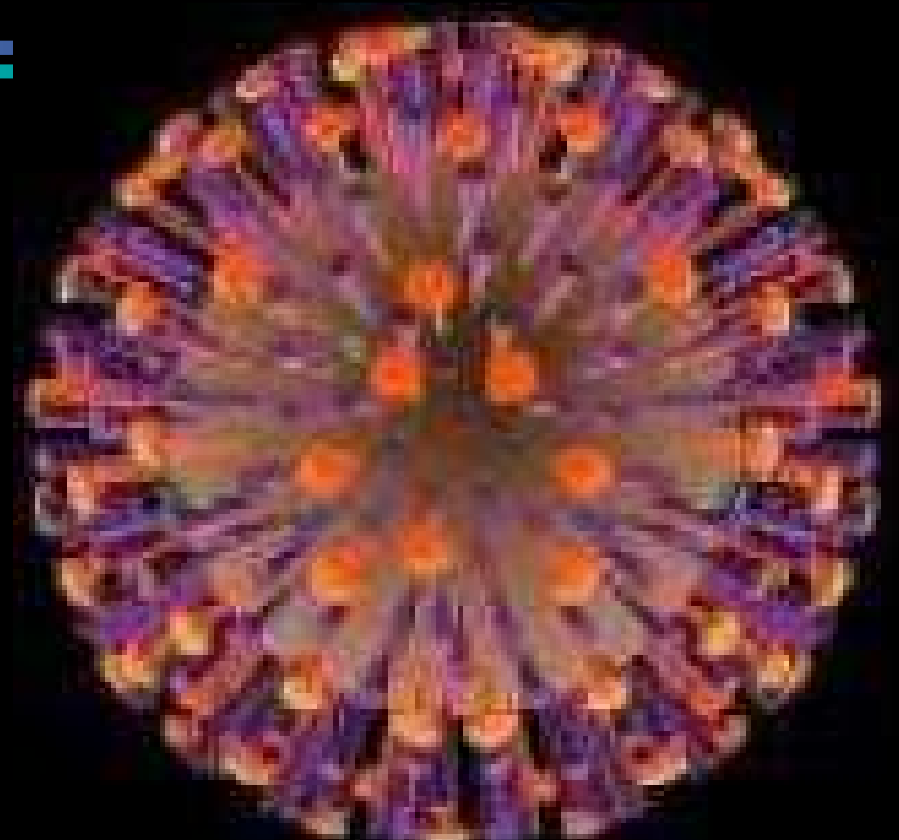
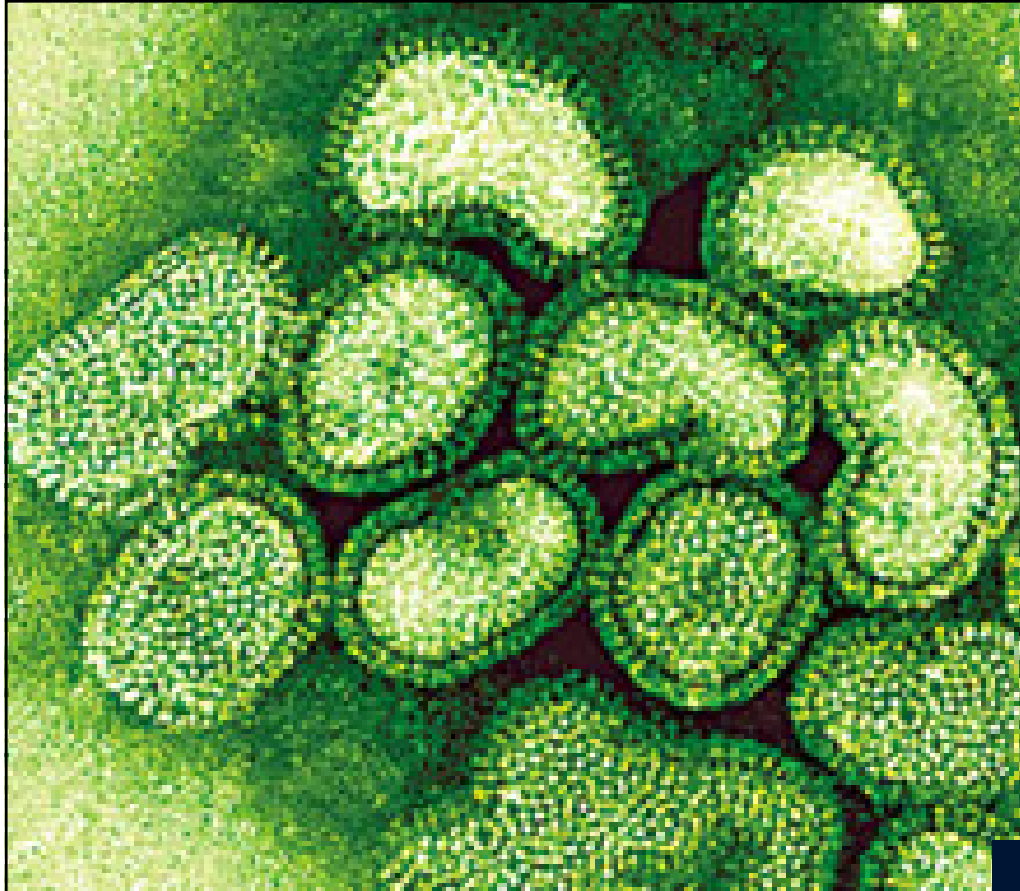
Hemagglutinin



Influenza A and B viruses have 2 surface glycoproteins: hemagglutinin, which is necessary for the virus to attach to host-cell membranes, and neuraminidase, an enzyme involved in viral penetration and release of virus from infected cells.

Chřipka – prevence, profylaxe, léčba

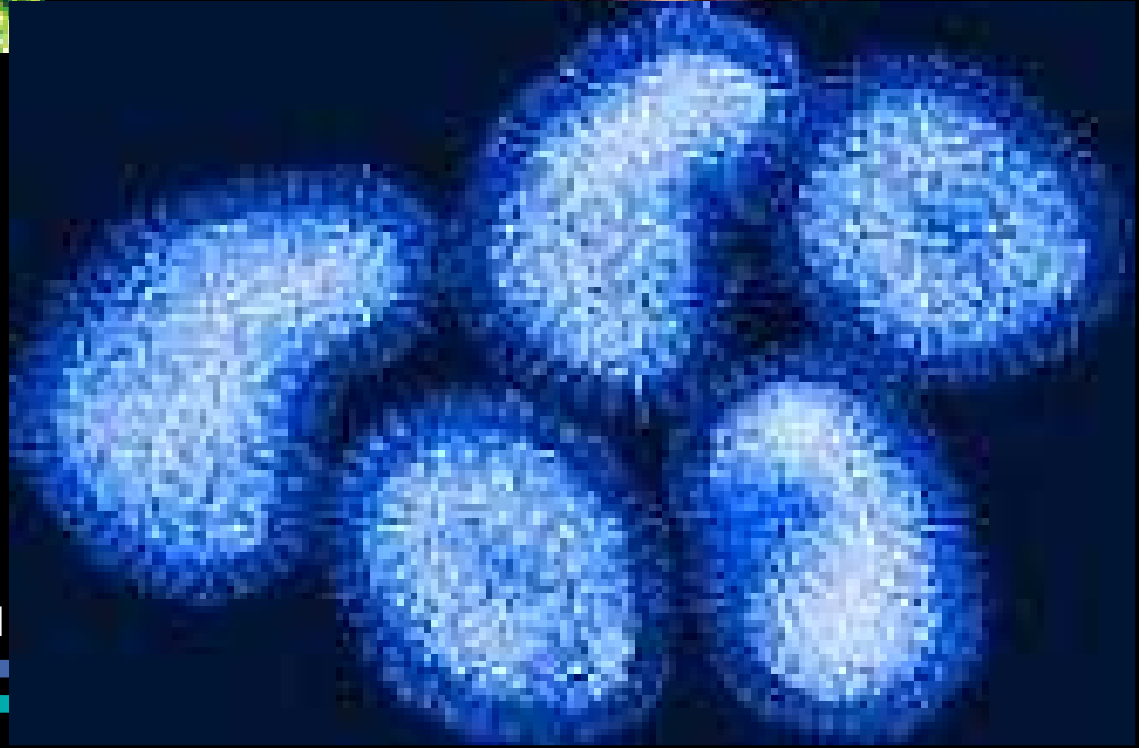
- **Prevence** je možná očkováním, které je doporučeno hlavně oslabeným osobám.
- K **profylaxi a léčbě** lze použít některá antivirotika, jednak **inhibitory proteinu M₂** (amantadin a rimantadin, některé kmeny jsou již na ně rezistentní), jednak **inhibitory neuraminidázy** (zanamivir a oseltamivir).
- Pouze poslední dva jmenované účinkují na kmeny **„ptačí chřipky“**, tj. **H5N1**.

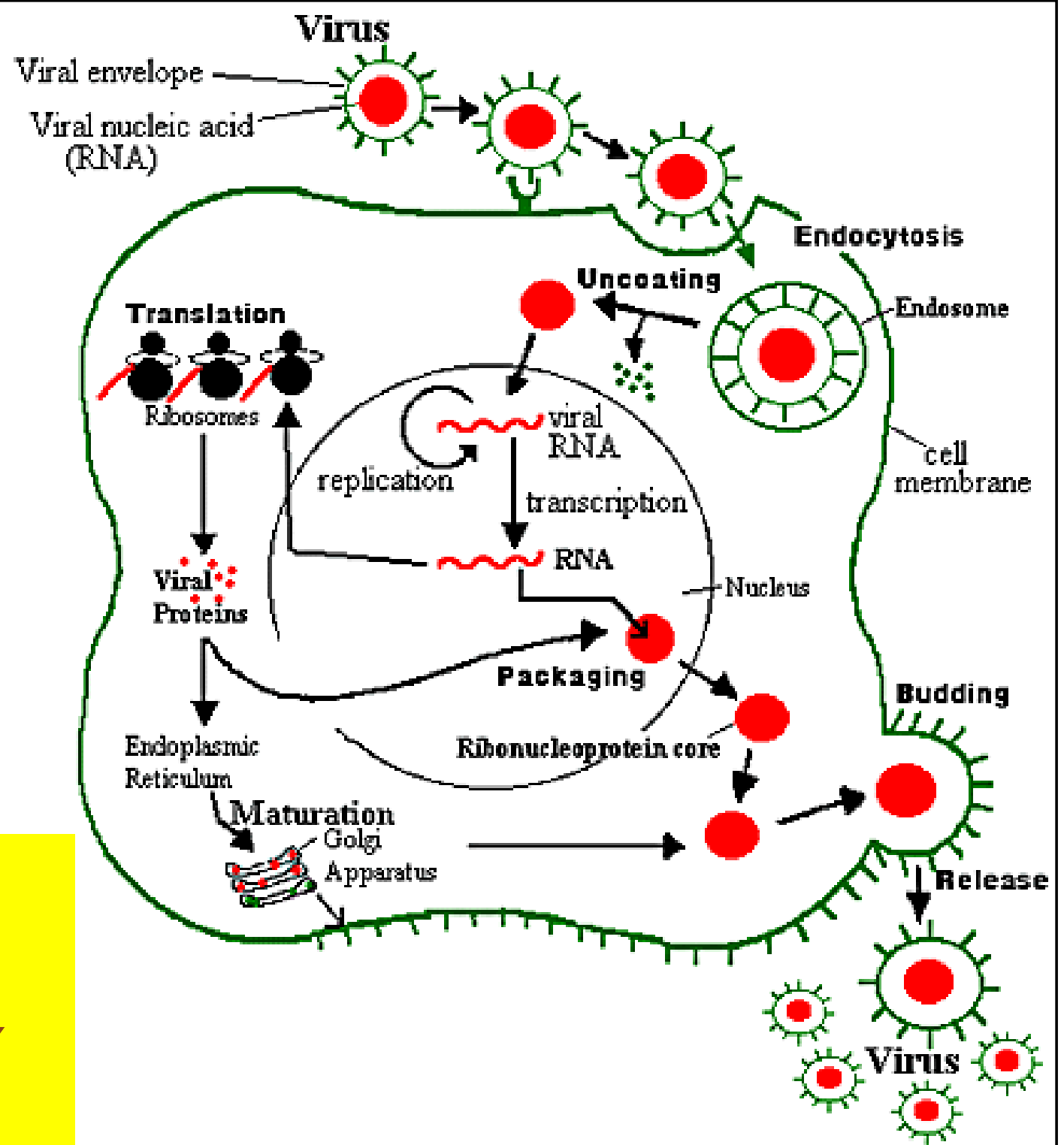


www.ontariogenomics.ca/education/episode6.asp

Virus chřipky

<http://www.bio-pro.de/en/region/rhein/magazin/01112/index.html>





Chřipka – životní cyklus

Slovní hříčka: „Otevřel jsem okno, a dovnitř vletěl Enza“. Dovnitř vletěl Enza – „in flew Enza“ se čte stejně jako „influenza“ = chřipka

Z knihy „A practical guide to clinical bacteriology“,
Pattison JR et al.,
Wiley, London 1995



Viry parachřipky

- Jsou to paramyxoviry, blízcce příbuzné viru příušnic (mumps) a vzdáleněji i viru spalniček (osýpok)
- Na rozdíl od pravé chřipky dělají často i katary **horních cest dýchacích**. Chřipce podobný **kašel** však může být též, většinou však (zvláště u dospělých) bez horečky.
- **Diagnostika:** KFR, HIT, ELISA; jsou zkřížené reakce. Je možný i přímý průkaz ve výplachu z nosohltanu izolací na TK.

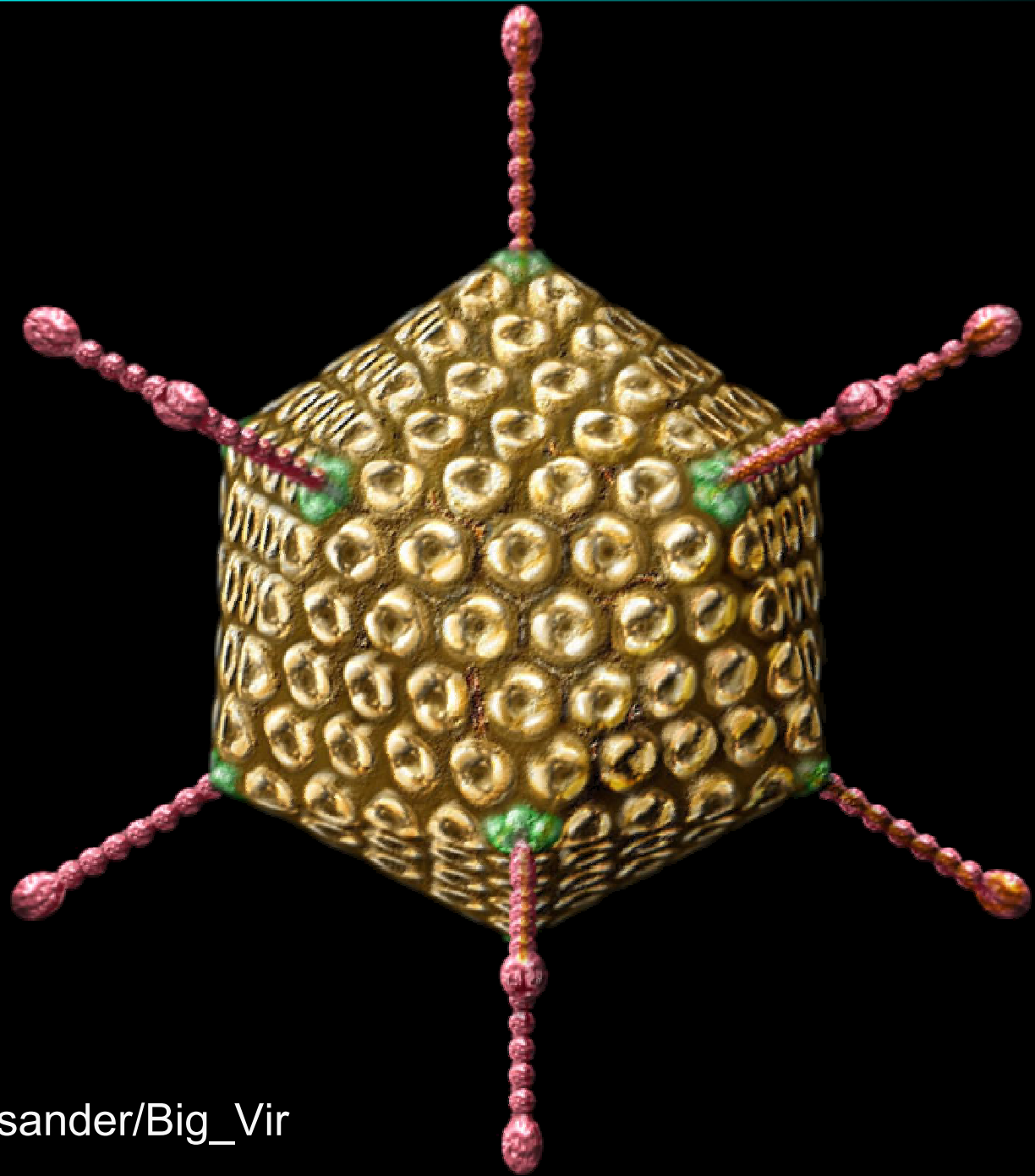
RS virus (respirační syncyziální virus, pneumovirus)

- Je vzdáleně příbuzný virům parachřipek
- RS-virus je **významným patogenem dolních cest dýchacích v prvním půlroce života**
- Jak napovídá název, způsobují **splývání nakažených buněk** (syncyia – soubuní)
- **Diagnostika** – ELISA, přímo tkáňové kultury

Adenoviry – Neobalené DNA viry

- Poprvé byly izolovány 1953 z vyříznuté adenoidní vegetace (nosní mandle)
- Zahrnuje viry lidské, zvířecí a ptačí
- Jsou středně velké (80 nm), neobalené, symetrie kapsidy je kubická. Mají tvar dokonale pravidelného dvacetistěnu. Kapsida je složena z 240 hexonů a 12 vrcholových pentonů.
- Je známo 47 serotypů adenovirů, které mohou být patogenní pro člověka. Ty se mohou lišit příznaky i možnostmi diagnostiky

Adenovirus

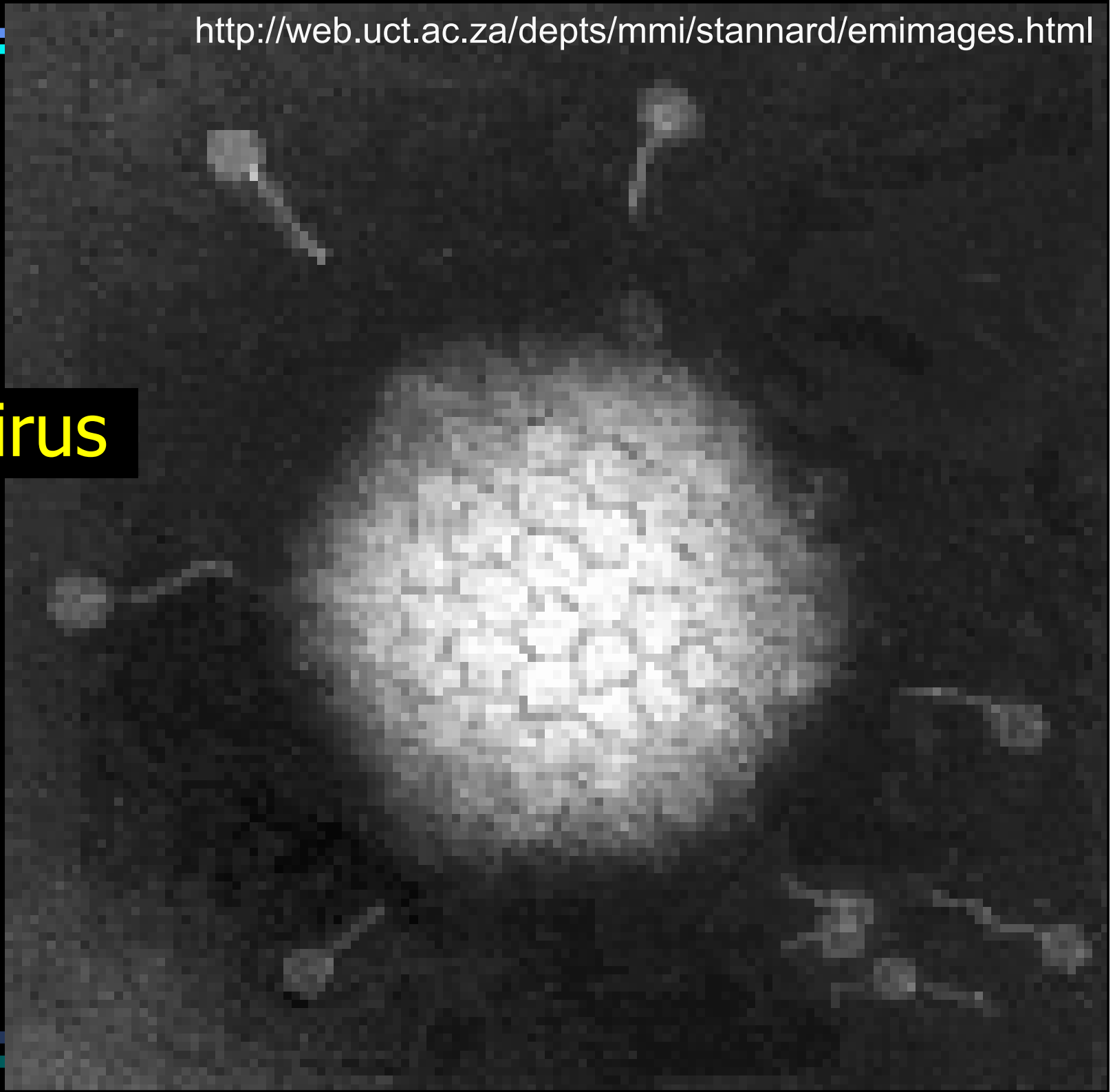


http://www.tulane.edu/~dmsander/Big_Virology/BVDNAadeno.html

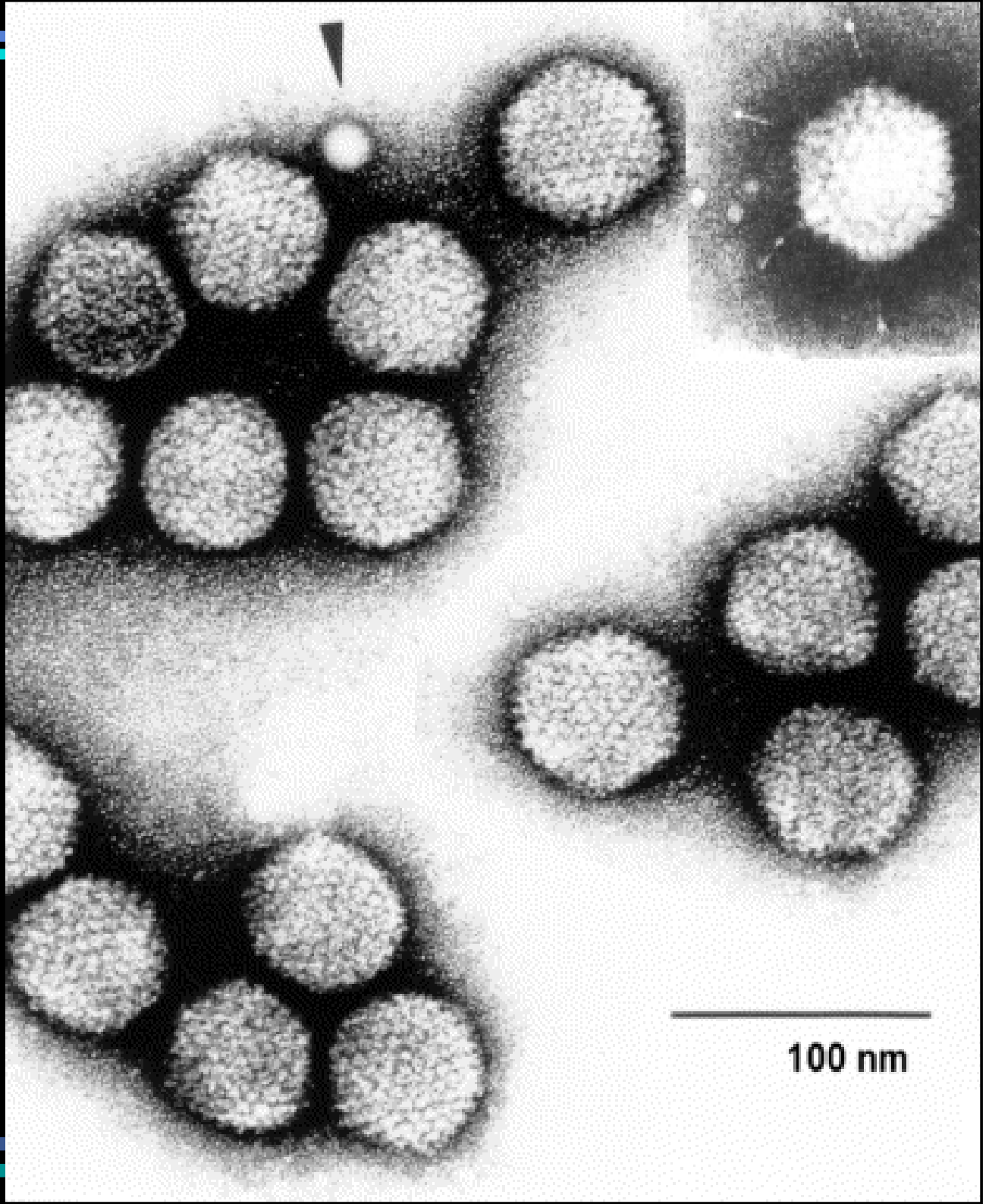
Lidské adenoviry

- Mohou vyvolávat **rýmy, záněty hltanu, záněty spojivek** (od lehčích po závažné)
- Typy 40 a 41 (lišící se také tím, že se nedají kultivovat) způsobují **průjmy (hnačky) malých dětí**
- Jeden typ také může způsobovat **zánět močového měchýře s krvácením**
- **Diagnostika** může být kultivační (na tkáňových kulturách) a serologická (komplementfixace)
- **Cílená léčba** není možná

Adenovirus



Adenoviry



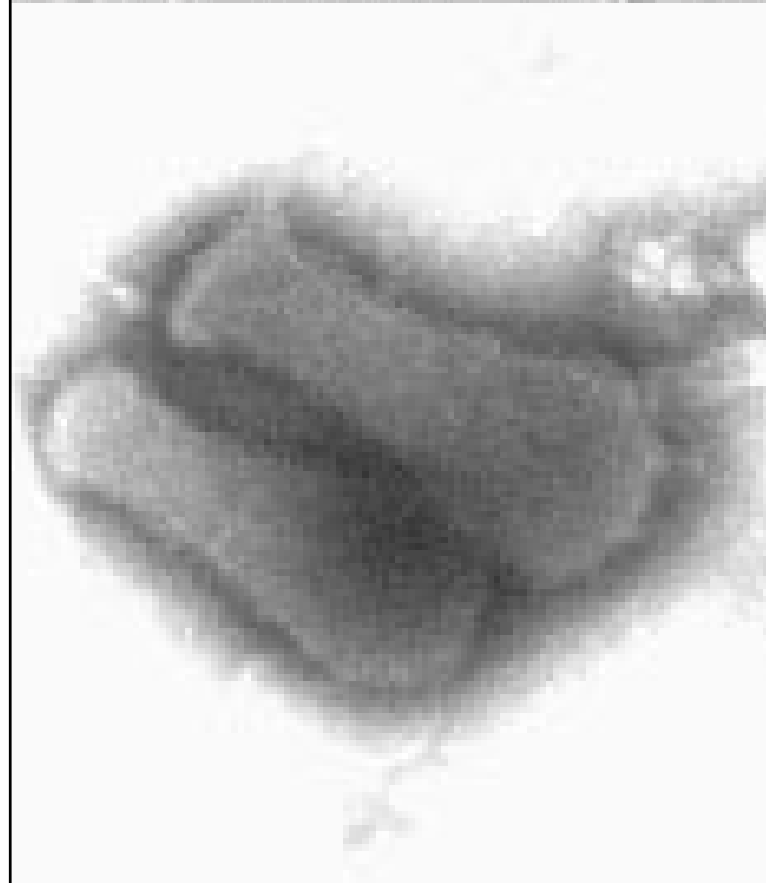
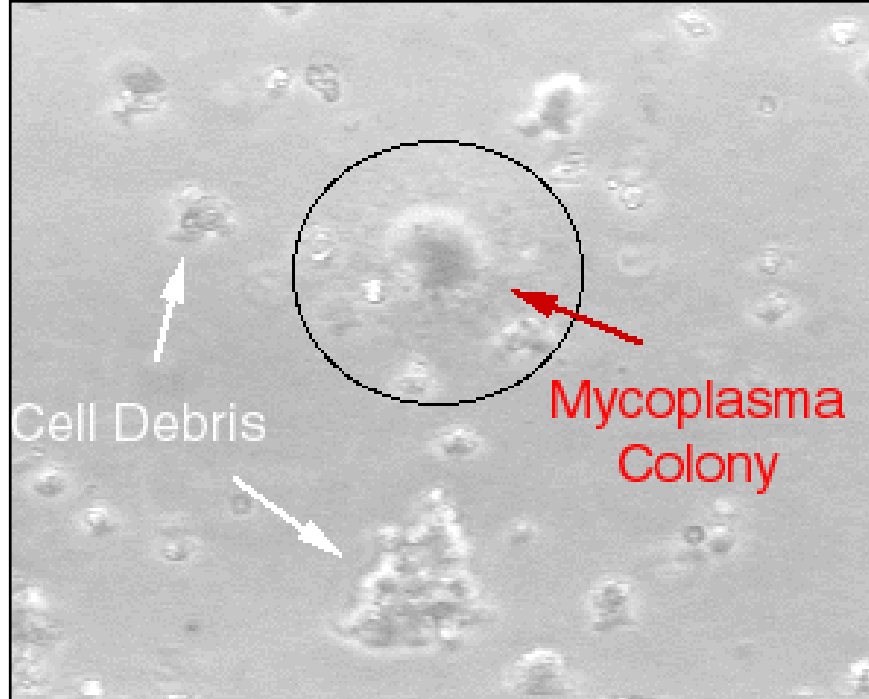
http://www.tulane.edu/~dmsander/Big_Virology/BVDNAadeno.html

Mykoplasmata



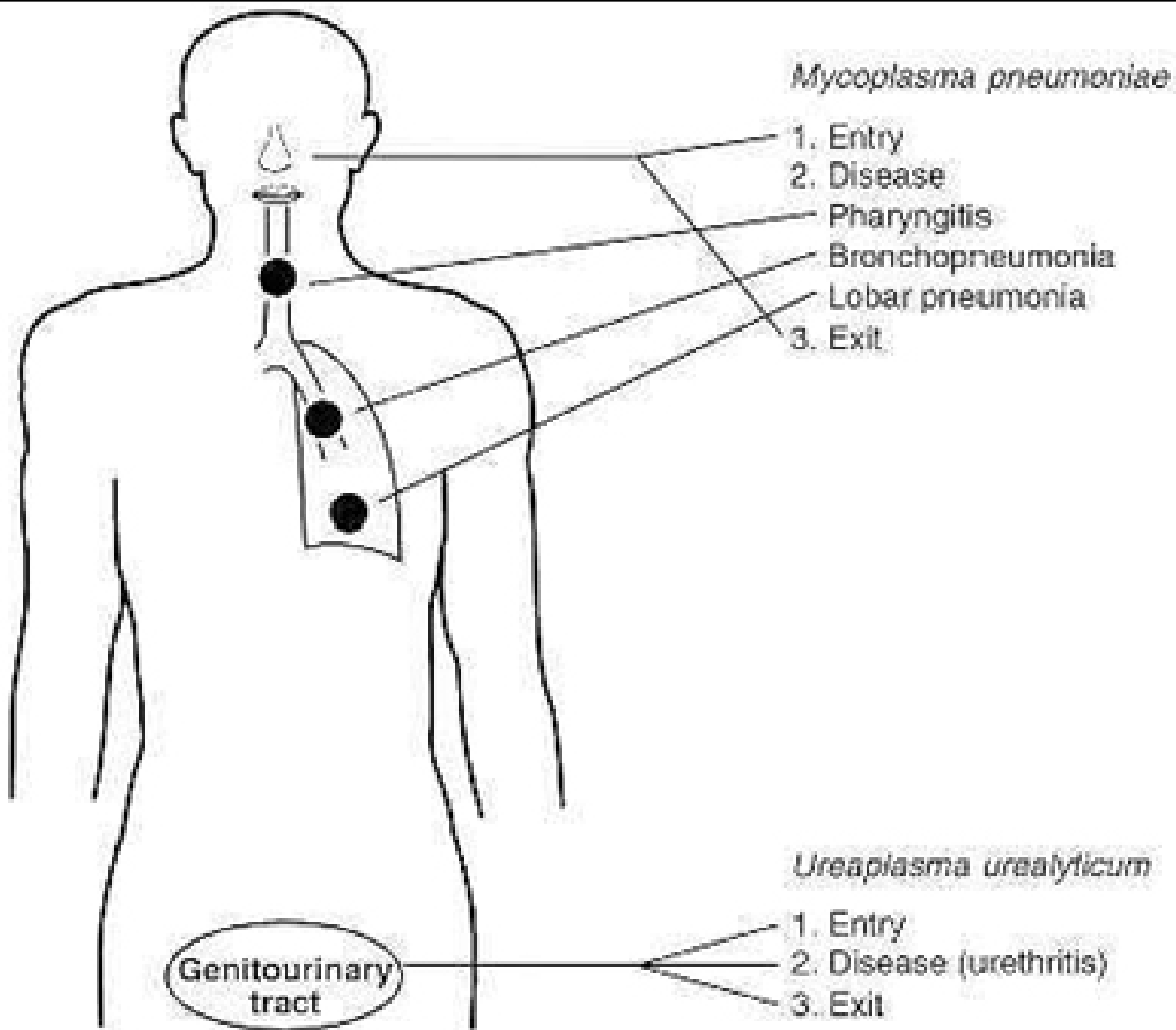
Mykoplasmata

- zvláštní skupina bakterií - Mollicutes - "ty s měkkou kůží"
- nemají buněčnou stěnu.
- nelze stanovit jejich tvar, který může být kulatý, oválný či vláknitý.
- u člověka jsou významné rody *Mycoplasma* a *Ureaplasma*
- nejmenší organismy, které ke svému růstu nepotřebují cizí buňku
- několikrát menší než běžné bakterie



Mycoplasma pneumoniae

- původcem tzv. atypických pneumonií.
- mohou nastat i mimoplicní komplikace (srdeční, nervové a jiné).
- často naopak jen jako rýma nebo úplně bez příznaků
- přenos vzduchem



Mycoplasma hominis, Ureaplasma urealyticum

- důležití původci pohlavně přenosných nákaz
- záněty pochvy, močové trubice aj.
- *Mycoplasma genitalium*: také na pohlavních orgánech, význam nejasný
- *Mycoplasma penetrans*: u nemocných AIDS jako oportunní infekce

Mykoplasmata

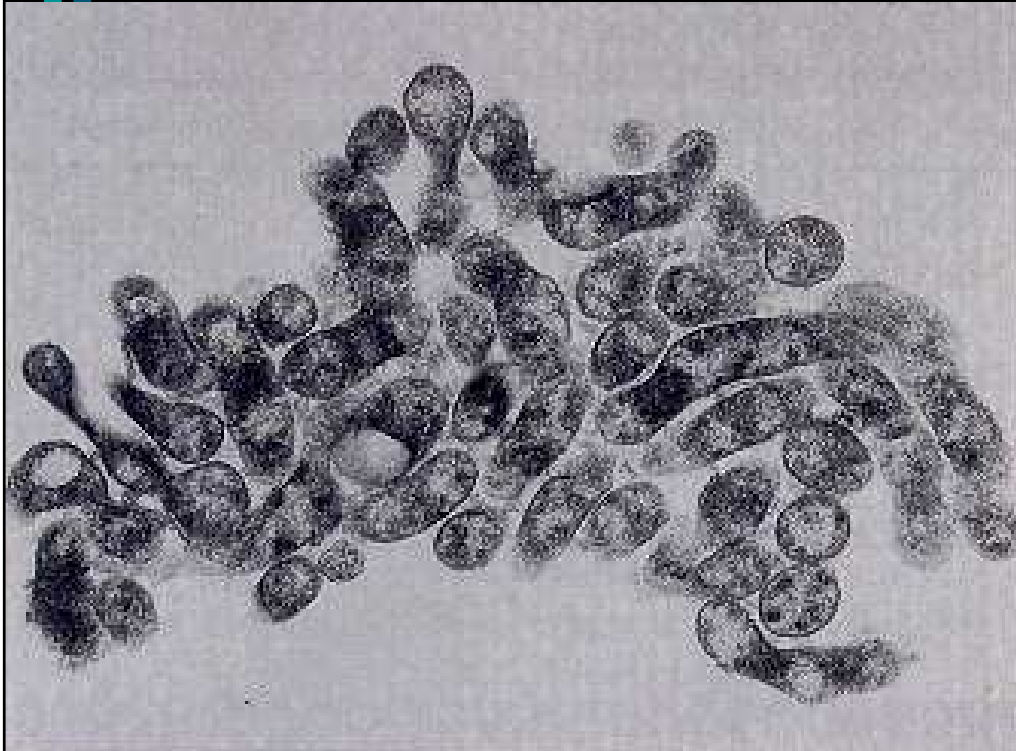


Fig. 17-83 *Mycoplasma*. Electron micrograph of *Mycoplasma pneumoniae*. The cell lacks a cell wall and is bounded by a cytoplasmic membrane that has a trilaminar structure.



PR
INC
net

Diagnostika mykoplasmat

- Kultivace na nebuněčných, avšak nicméně speciálních médiích
- KFR, ELISA aj. Obvykle zároveň se serologií respiračních virů

Léčba

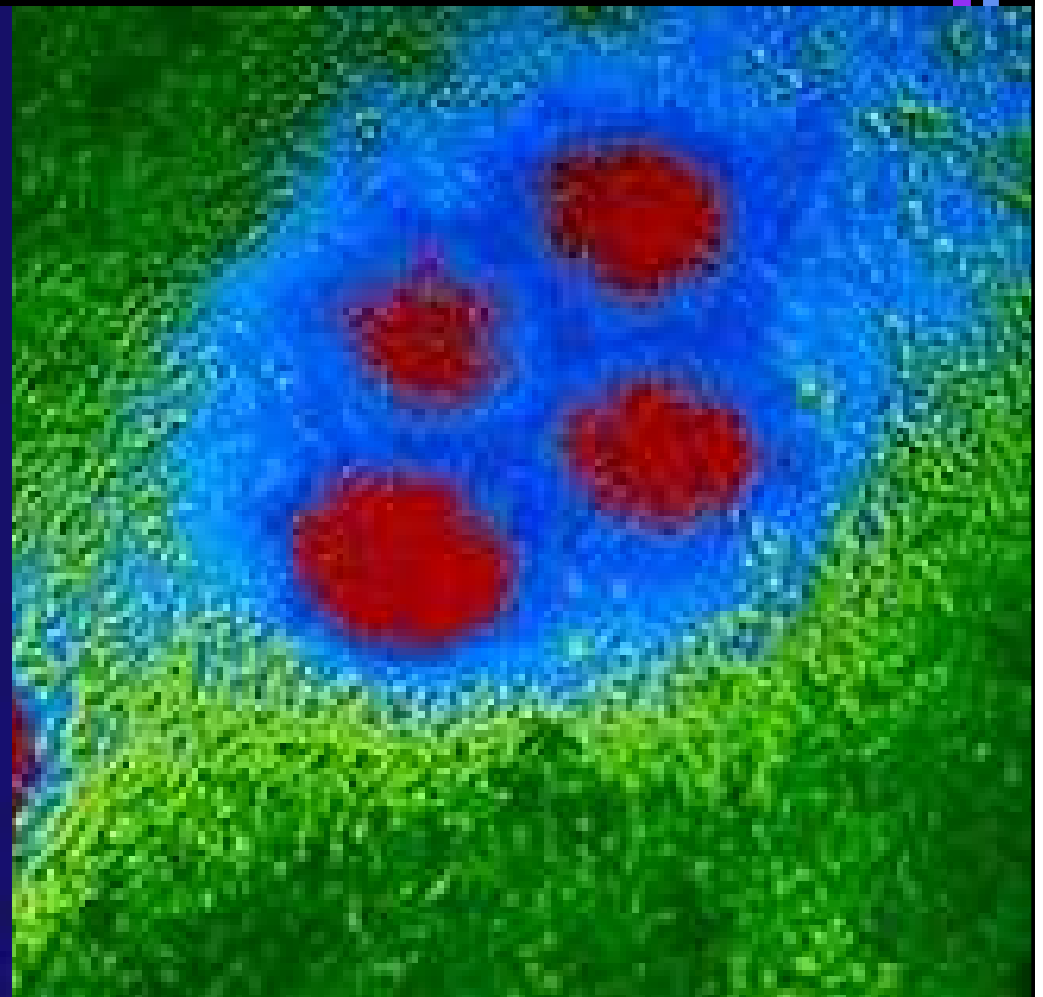
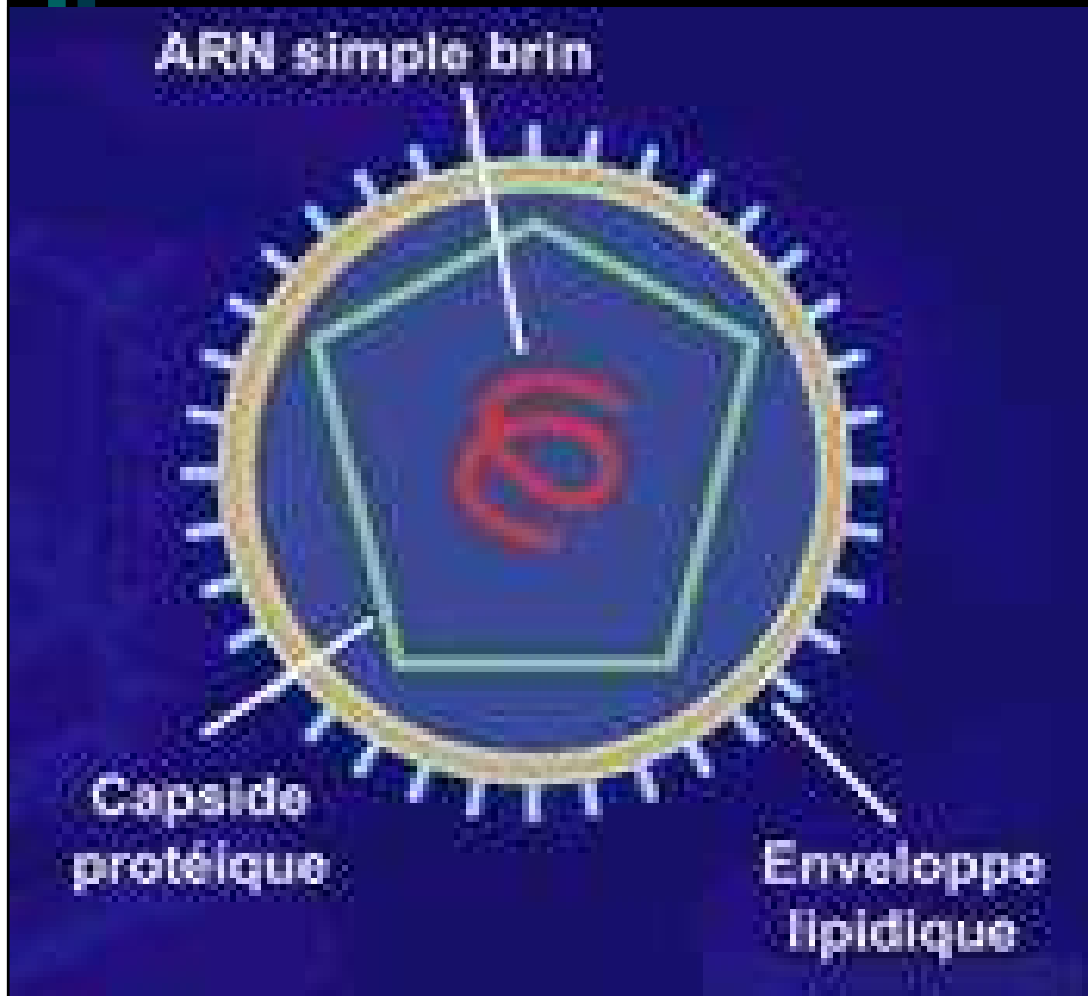
- Nelze použít antibiotika, působící na buněčnou stěnu.
- Účinné jsou makrolidy (tj. erytromycin a spol.) a tetracykliny.
- U *M. pneumoniae* se zkouší očkování – ve stádiu výzkumů.

Virus klíšťové encefalitidy

Vírus kliešťovej encefalitídy

- **RNA virus, patří mezi flaviviry**
- **Klíšťová encefalitida** sice postihuje často děti, závažné příznaky má však spíše u dospělých. Přesto se dospělí málokdy nechají **očkovat**. V první fázi připomíná chřipku, ve druhé příznaky meningeální či mozkové. Smrtnost (letalita) infekce je 1 – 5 %.
- Jde o typický **arbovirus**, zdrojem jsou hlodavci
- **Diagnostika** je nejčastěji nepřímý průkaz – KFR, HIT, ELISA. Lze použít také přímý průkaz izolací viru na sajících myšátek, případně PCR

Virus klíšťové encefalitidy



Z vlastností virů

- Víme již, že viry jsou nebuněčné částice, obsahující DNA či RNA v nukleokapsidě, a případně ještě obsahující virový obal
- Součástí tohoto obalu může být látka, která in vitro shlukuje červené krvinky. Tohoto jevu jsme ostatně už využili v praktiku J09 v **hemaglutinačně** inhibičním testu.
- Z dalších vlastností: **Virus potřebuje cizí buňky**. Takové nalezne např. ve tkáňové kultuře nebo ve strukturách oplodněného vejce s kuřecím zárodkem

Virologická diagnostika

- **Mikroskopie:** elektronoptická, optická jen k průkazu něčeho, co viry dělají in vivo či in vitro (inkluze, cytopatický efekt)
- **Kultivace → izolace** Vyžaduje živé buňky.
- **Biochemická identifikace** nepadá v úvahu
- **Pokus na zvířeti** zde splývá s izolací viru
- **Průkaz DNA** – u virů > u bakterií
- **Průkaz AG ve vzorku** – velmi běžný
- **Nepřímý průkaz** – obvykle základem veškeré diagnostiky virů

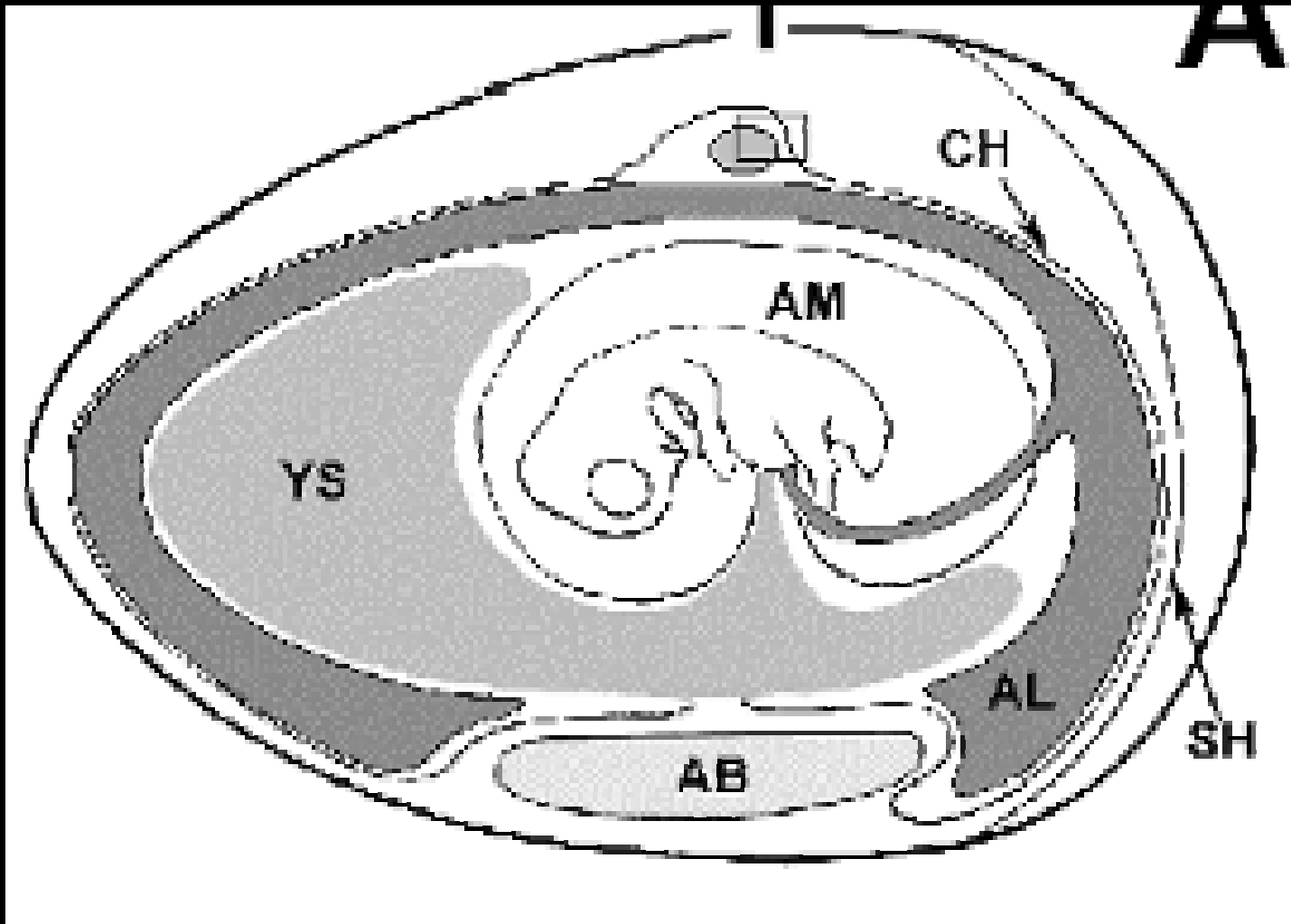
Mikroskopie ve virologii

- Elektronová mikroskopie je vhodná k pozorování většiny virů. Je však velmi nákladná a není vždy dostupná
- Optická mikroskopie se dá použít
 - K pozorování velikých virů (poxviry)
 - K pozorování buněčných inkluzí in vivo (Negriho tělíška u vztekliny)
 - K pozorování cytopatických efektů in vitro (řada různých virů)

Izolace virů

- **Zvíře** se používá dnes již méně často. Klasickým zvířetem je sající myš.
- **Vaječný zárodek** je klasickou metodou
 - Amniová dutina
 - Allantois
 - Žloutkový vak
 - Chorioalantoidní membrána (pouze zde někdy pozorovatelný výsledek – tzv. poky)
- **Tkáňové kultury**: LEP, HeLa, opičí ledviny (obličky) a různé jiné. Některé viry dělají na TK cytopatický efekt (CPE)

Oploďněné vejce a jeho části



SH –
skořápková
blanka

AB – bílek

http://www.scielo.cl/fbpe/img/bres/v38n4/fi_g02.gif

AM – amniový vak, YS – žloutkový vak, AL – allantois

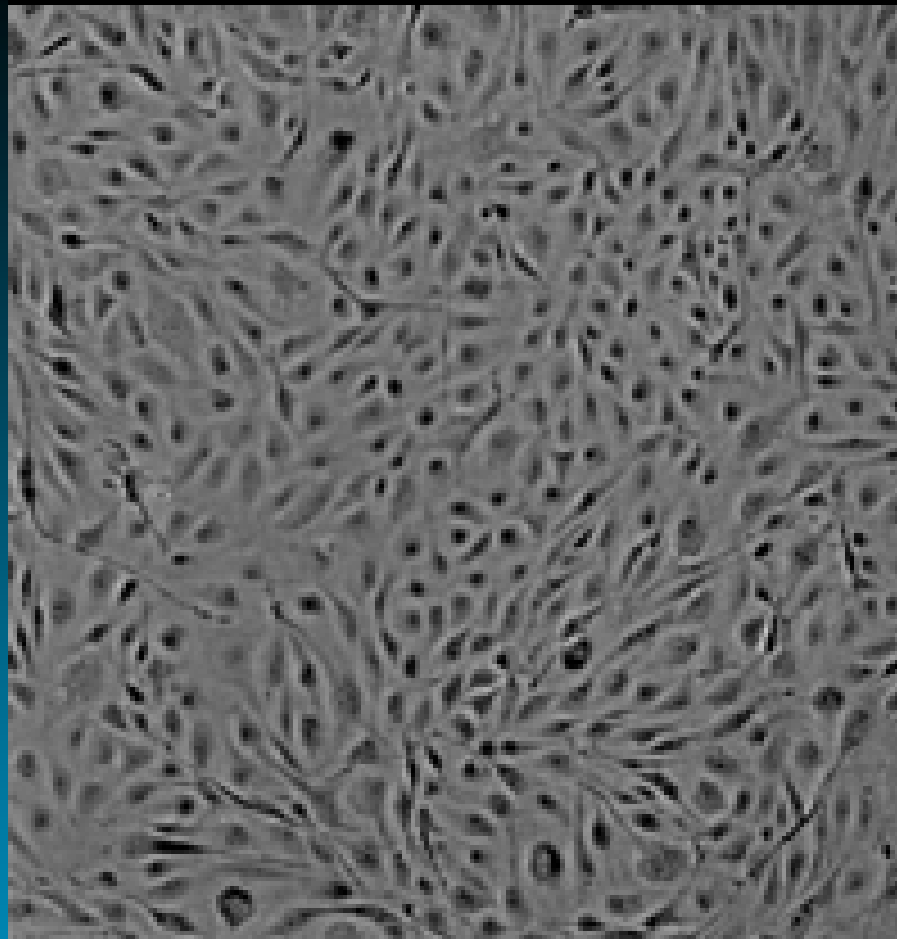
CH – chorioallantoidní membrána (CAM)

Jak prokážu virus, když ho není nijak vidět?

- **Bakterie** při kultivaci tvoří viditelné kolonie, nebo aspoň kalí bujón. Naproti tomu, jen někdy vidíme výsledek izolace **viru** (CPE, poky), mnohem častěji výsledek viditelný není
- Izolovaný virus tedy musíme nějak **prokázat**, třeba průkazem antigenu
- Klasickou metodou je **Hirstův test** – průkaz schopnosti viru shlukovat krvinky

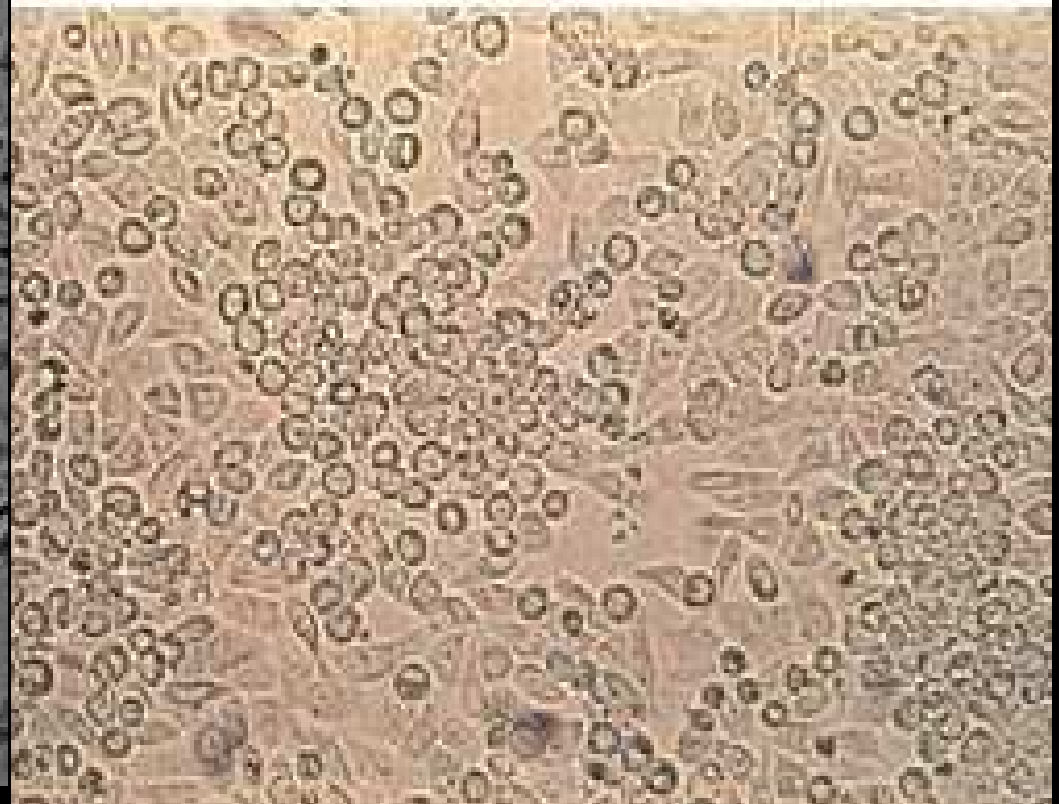
Cytopatický efekt (CPE)

- Jen zřídka se cytopatický efekt viru na buňku projeví podstatnou změnou metabolismu, která by se pak při přidání indikátoru projevila barevnou změnou (jak jsme viděli u virus neutralizačního testu)
- Zpravidla CPE pozorujeme v mikroskopu:
 - zakulacení buněk
 - ztráta desmosomů mezi buňkami
 - ztráta uspořádání jedním směrem
 - celkově nastává „místo řádu chaos“



http://cmir.mgh.harvard.edu/cellbio/cellculture.php?menuID_=122

HSV Growing in Tissue Culture



www.herpesdiagnosis.com/diagnose.html

Tento obrázek ještě uvidíte jednou...

(HSV je virus prostého oparu – HSV 1 způsobuje zpravidla herpes labialis, HSV 2 herpes genitalis)

Chřipka – diagnostika

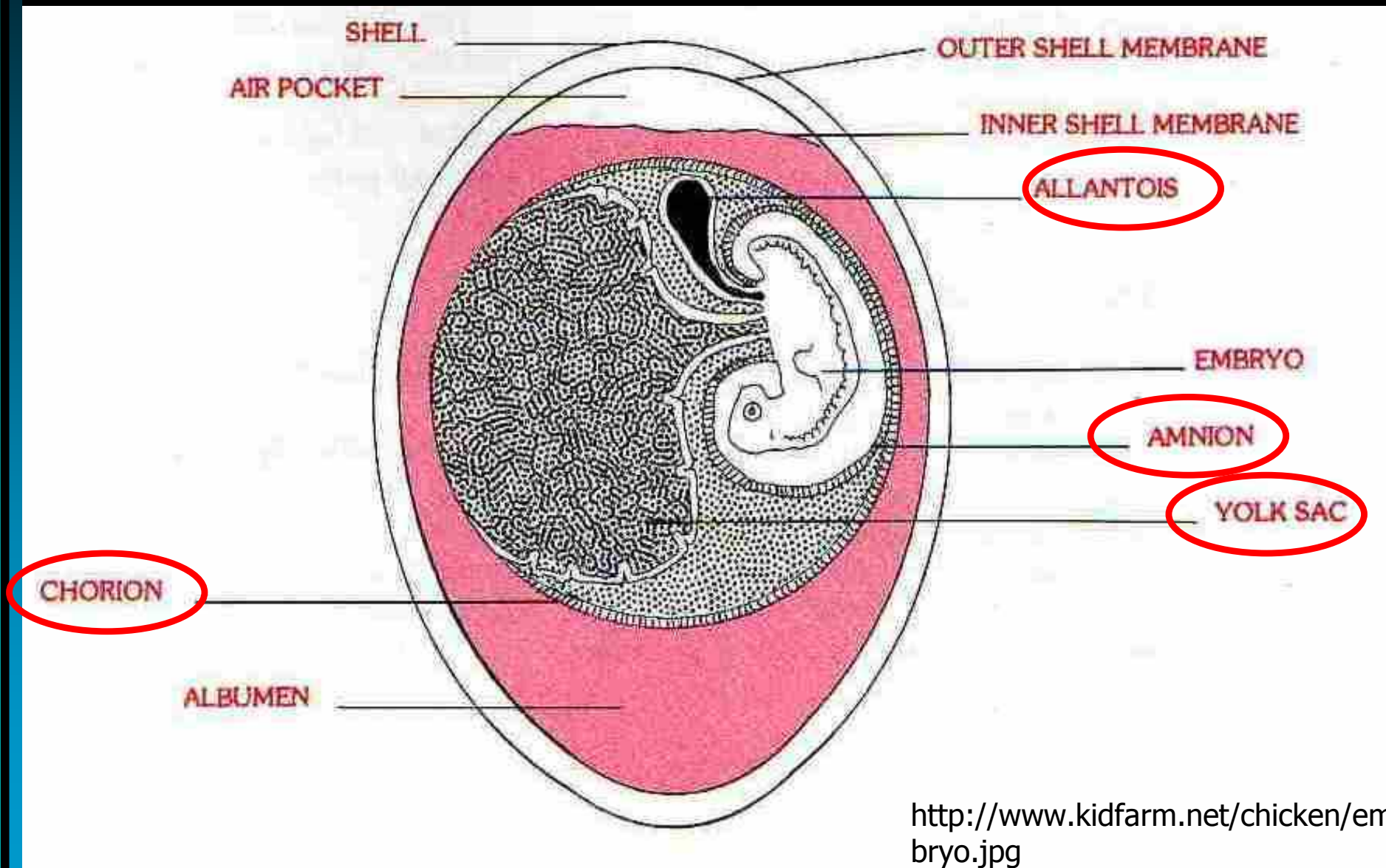
- Diagnostika má **epidemiologický význam** (důkaz, že epidemii působí opravdu chřipka)
- **Přímý průkaz chřipky** (výplach z nosohltanu)
 - průkazem **virového antigenu**
 - **izolace v amniové dutině** (virus se pak prokazuje Hirstovým testem)
 - **izolace na buňkách opičích ledvin**
 - průkaz virové RNA pomocí **PCR**
- **Nepřímý průkaz chřipky**
 - klasické vyšetření – párová séra, KFR, HIT
 - ELISA – IgM, IgA

A nyní již
jednotlivé
úkoly

Ovoskop (před prvním úkolem)

- V době, kdy svět přetéká technicky komplikovanými přístroji, kterými rozumí stále méně techniků, zůstává úžasným klasickým zařízením **ovoskop**. Skládá se z dřevěné bedničky, žárovky a posuvného prkénka s dvěma otvory.
- Jeden je kulatý k umístění vejce nastojato
- Druhý je oválný k umístění vejce naležato

Ještě jedno schéma oplodněného vejce



Izolace virů a podobných agens na vejci

- **Amniová dutina**, obklopující zárodek se používá často, např. u virů chřipky
- **Allantois**, tedy odpadní váček, je zejména u starších embryí snadno dosažitelnou strukturou. Je však málo výživný
- **Žloutkový vak** slouží např. k pěstování chlamydií (což jsou bakterie, ale vlastnostmi značně podobné virům)
- **Chorioalantoidní membrána** slouží k pěstování zejména poxvirů a herpesvirů
- *Při výrobě očkovací látky se virus pěstuje na allantois (což je možné až po několika pasážích v amniu)*

Úkol 1: aplikace inkoustu („viru“) do amniové dutiny

- Vejce **prosviňte v ovoskopu** a naznačte tužkou okraj vzduchové bubliny
- **Odřízněte skořápku** nad vzduchovou bublinou
- Na papírovou blanku **kápněte alkohol**
- Vejce opět **prosviňte v ovoskopu** a vyznačte pozici zárodku, resp. jeho oka
- **Jehlou se jakoby snažte vypíchnout oko kuřecímu zárodku** (ono stejně uteče) – buď přímo v ovoskopu, nebo případně mimo něj
- **Aplikujte inkoust (atrament)**
- *Případně si zkuste vejce zavíčkovat*
- **Vejce rozklopte** a sledujte výsledek



Po skončení
práce s vejcem...

- **...vyhodíte Petriho misku s vejcem a veškeré zbytky skořápky do polyetylenového sáčku (sáčky jsou na stole nejbliže k ovoskopu)**

Úkol 3: HIT – klíčová encefalitida

- Vedle KFR je HIT jednou z **klasických metod průkazu tohoto viru.**
- **Pozitivní** je **zábrana virového shlukování krvinek** (= sedimentace krvinek na dno)
- **Negativní** je **shlukování krvinek** (bramboroid či bramborák, jak je komu libo)
- **Titř je nejvyšší ředění, kde je ještě reakce pozitivní** (tedy kde krvinky sedají na dno)
- **Čtyřnásobný vzestup/pokles titru** se považuje za **signifikantní** při použití párových sér

Úkol 3 – praktické provedení

- V horním řádku je pozitivní kontrola, tu si nepřekreslujte do protokolu
- Dále vidíte pacienty K, L, M, N s dvojicemi jejich sér
- **Výsledek:** Jak se přesvědčíte, jeden pacient se s klíšťovou encefalitidou vůbec nesešel, dva ji prodělali (třeba i bez příznaků), a jeden je pravděpodobně ve fázi akutního onemocnění (16× vzestup titru)

Úkol 4 – KFR u respiračních virů

- Cílem je určit, který z šesti testovaných původců je zodpovědný za momentální respirační potíže našeho pacienta
- **Pozitivní je nepřítomnost hemolýzy → sedimentace krvinek na dno**
- **Negativní je hemolýza („malinová limonáda“)**
- **Titř je nejvyšší ředění, kde je ještě reakce pozitivní (= kde krvinky sedají na dno)**
- **Čtyřnásobný vzestup/pokles titru se považuje za signifikantní (při použití párových sér)**

Úkol 4 – správný výsledek reakce

- Řádek 1 – Chřipka A I 1 : 4
- Řádek 2 – Chřipka A II 1 : 4
- Řádek 3 – Chřipka B I – žádný titr
- Řádek 4 – Chřipka B II – žádný titr
- Řádek 5 – Parachřipka I – žádný titr
- Řádek 6 – Parachřipka II – žádný titr
- Řádek 7 – RS virus I 1 : 4
- Řádek 8 – RS virus II 1 : 8
- Řádek 9 – Adenovirus I – žádný titr
- Řádek 10 – Adenovirus II – žádný titr
- Řádek 11 – *Mycoplasma pneumoniae* I 1 : 8
- Řádek 12 – *Mycoplasma pneumoniae* II 1 : 128

Závěr

- *Mycoplasma pneumoniae* je pravděpodobným původcem onemocnění
- Je doporučena antibiotická léčba (např. doxycyklinem)
- Pacient se již za života setkal s chřipkou A a RS virem
- Pacient se nikdy neseťkal s ostatními testovanými viry

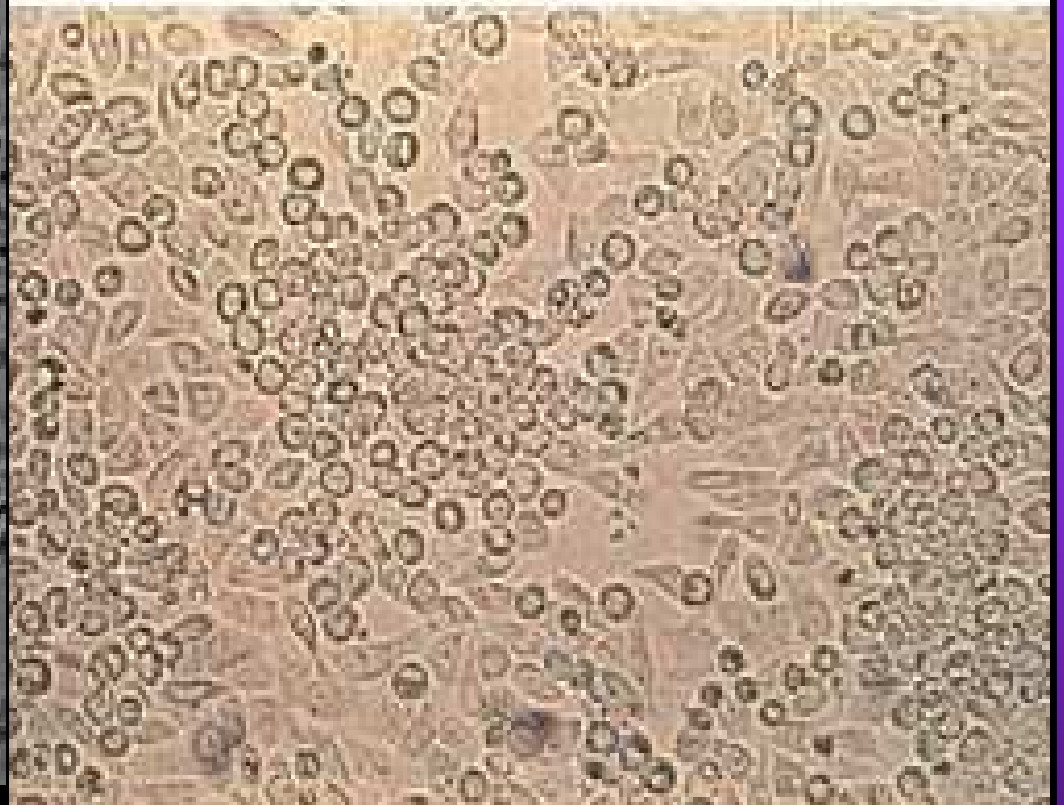
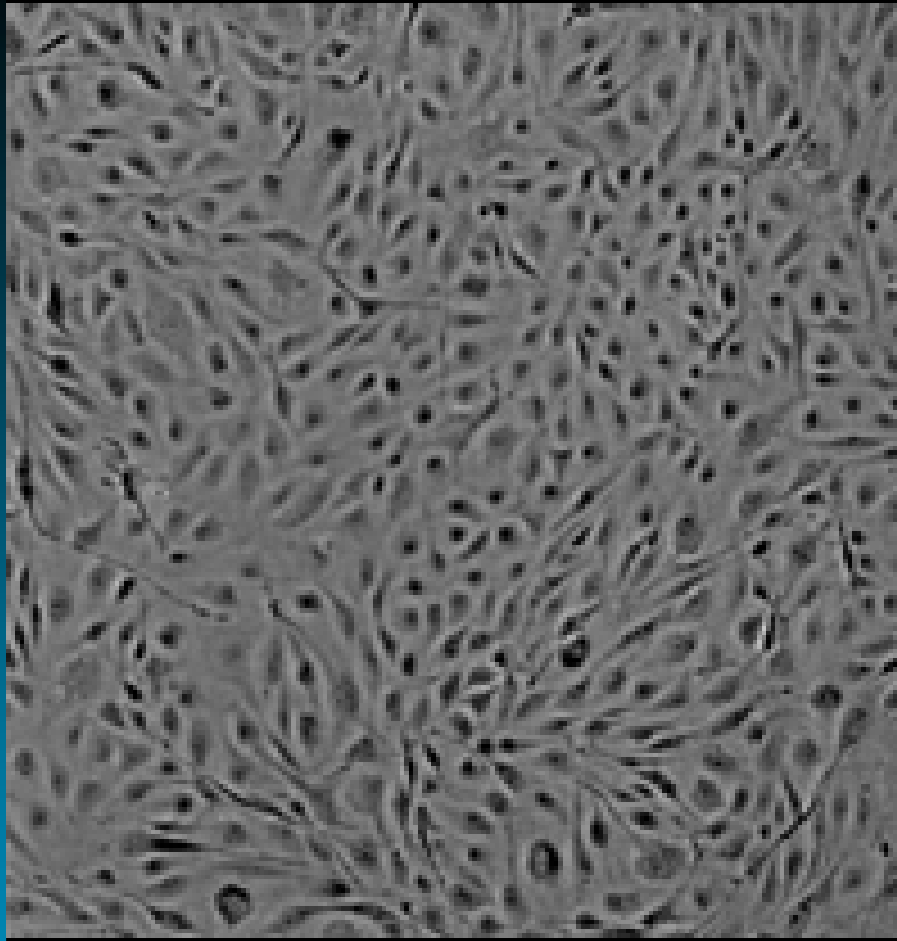
Do kolonek pro datum si napište 23. dubna 2007 a 14. května 2007

Úkol 5: Demontrace TK a CPE

- Strčte si do mikroskopu **celé zkumavky tak jak jsou**, snažte se zaostřit na vnitřní stěnu.
- Možná uvidíte **tkáňové kultury**, v některých možná i **s cytopatickým efektem**
- V případě, že nic neuvidíte, si mikroskopii tkáňové kultury bez cytopatického efektu a s ním nakreslete dle následujícího obrázku

(ale ne že to ani nezkusíte a budete hned kreslit podle obrázku! 😊)

HSV Growing in Tissue Culture



http://cmir.mgh.harvard.edu/cellbio/cellculture.php?menuID_=122

www.herpesdiagnosis.com/diagnose.html

(HSV je virus prostého oparu – HSV 1 způsobuje zpravidla herpes labialis, HSV 2 herpes genitalis)

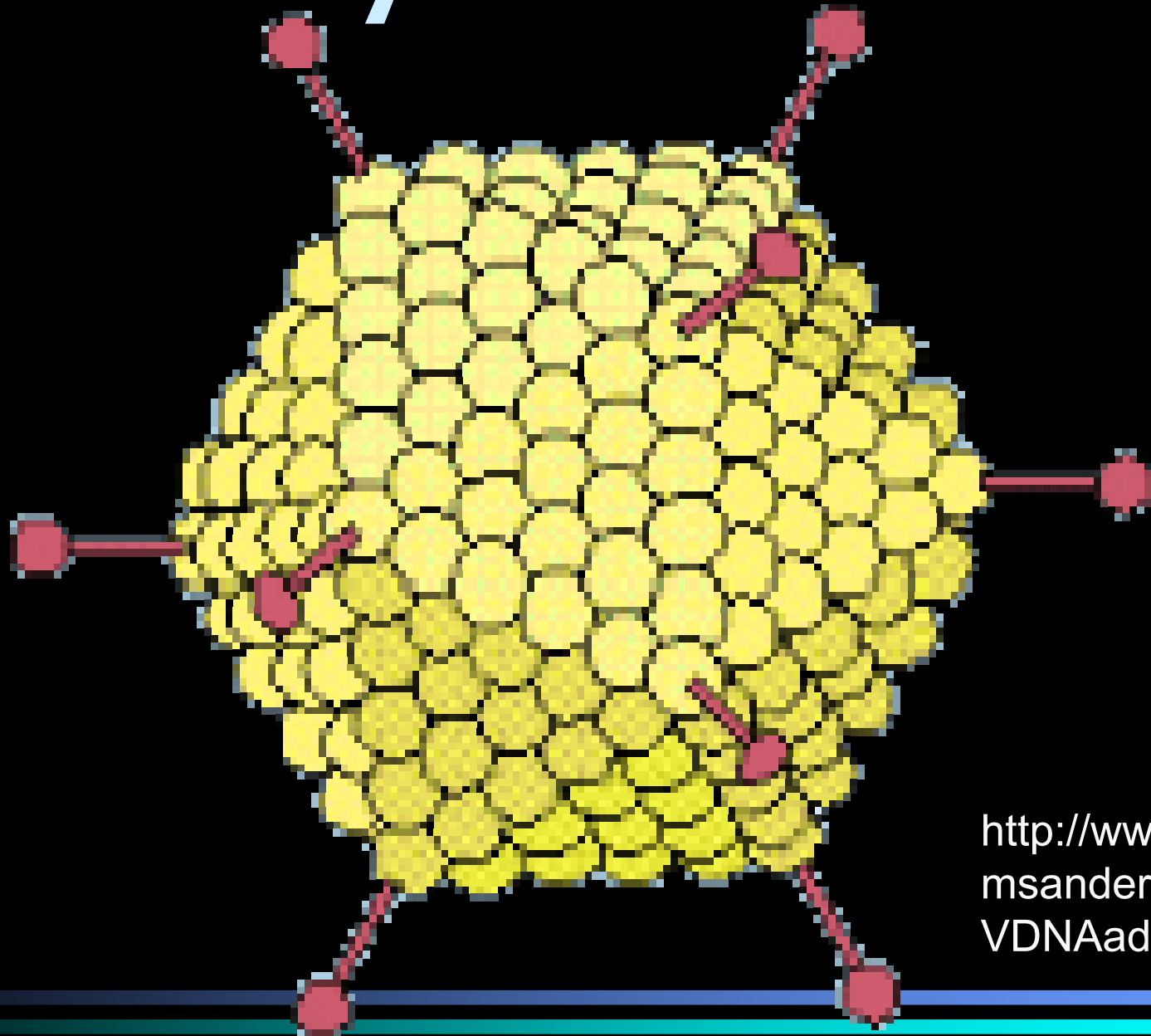
Úkol č. 6 – shell-vials techniky (demonstrace)

- Jde o techniky **urychlené kultivace**.
- Inokulum se centrifugací vmasíruje do **buněčné kultury narostlé na kulatém krycím sklíčku**
- Pomnožený virus se dokazuje pomocí **imunofluorescence monoklonálními protilátkami**
- Celý postup je hotov **do 24 h po přijetí vzorku** (zatímco klasická kultivace trvá několik týdnů)

Úkol 2 – vyhodnocení na závěr praktika

- **Hirstův test.** Pokud jsme provedli správně, nyní po inkubaci by mělo být patrné virem způsobené shlukování krvinek
- **Schopnost viru shlukovat krvinky** je jednou z možností, jak dokázat **přítomnost nějakého viru např. v amniové dutině.**
- Chceme-li dokázat, že to není **nějaký** virus, ale **konkrétní** virus, zkusíme **shlukování specificky inhibovat protilátkami** – jde pak vlastně o hemaglutinačně inhibiční test.

Hezký den!



http://www.tulane.edu/~dmsander/Big_Virology/BVDNAadeno.html