

Pátráme po mikrobech  
Díl XII.

**Virologie – 1. část (P13!)**

Ondřej Zahradníček

K praktickému cvičení pro VLLM0421c

Kontakty na mne:

777 031 969

[zahradnicek@fnusa.cz](mailto:zahradnicek@fnusa.cz)

ICQ 242-234-100

# Vysvětlení

- První část podle protokolu se stává částí druhou v realitě, a naopak
- Příčina tkví ve vejci, resp. oplodněném vaječném zárodku, které je nutné pro J12. Je nutno připravit na určitý týden – a kvůli státnímu svátku to nemůže být týden dvanáctý
- Proto jsme byli nuceni přistoupit ke změně v řazení praktik

# Co už umíme

- Umíme používat **mikroskopii, kultivaci, biochemickou identifikaci a průkaz DNA**
- Víme, jak diagnosticky využít reakci antigenu s protilátkou, a víme, čím se liší **precipitace, aglutinace, aglutinace na nosičích, komplementfixace, neutralizace a reakce se značenými složkami**
- Víme, **jak bojovat s mikroby pomocí dekontaminačních metod a antimikrobiálních látek** a umíme otestovat účinnost těchto postupů

# Příběh

- **Kupte si ty broskve**, paní, volal prodavač na exotickém trhu. Paní Jitka broskve koupila a odnesla do hotelu.
- V hotelovém pokoji si je chtěla oprat, ale ouha – **neteče voda**. Co teď? Paní Jitka zaváhala, ale **chuť na šťavnaté broskve byla silnější**. Několik jich sním, přece se nemůže nic stát.
- Po návratu z dovolené **paní Jitka nápadně zežloutla...**

## Viníkem byl

- **Virus hepatitidy A.** Ale mohl to být také virus hepatitidy E – oba dva se přenášejí špinavýma rukama či neomytými potravinami.
- Kromě těchto hepatitid známe ještě **jiné, které se přenášejí pouze krví či sexuálně**
- Virové hepatitidy jsou různé, různé jsou i viry, které je způsobují. Společné však mají to, že **jejich diagnostika musí respektovat skutečnost, že jsou to viry, a ne bakterie.**

# Jak vypadají viry

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



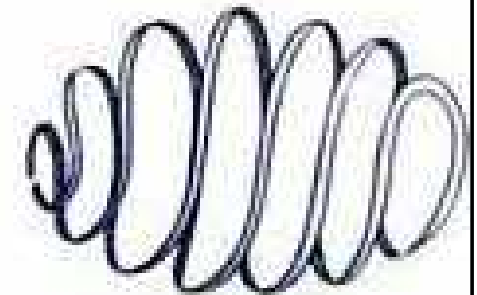
(a) Vaccinia virus



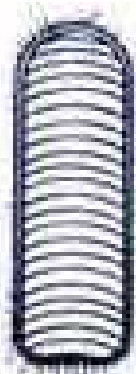
(b) Paramyxovirus (mumps)



(c) Herpesvirus



(d) Orf virus



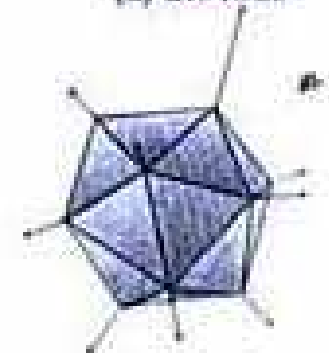
(e) Rhabdovirus



(f) T-even coliphage



(g) Flexuous-tailed phage



(h) Adenovirus



(i) Influenza virus



(m) Tubulovirus

# Co jsou to vlastně viry?

- Viry jsou **nebuněčné částičky**, vedou se diskutovat, zda se vůbec jedná o organismy
- O **původu virů** je několik teorií, není ani jisté, že vznikly všechny stejným způsobem
- Stejně jako buněčné organismy se snaží o „zachování rodu“, **potřebují** k tomu ale **buňku cizího organismu**
- Kromě lidských virů existují i viry zvířecí, rostlinné a viry bakterií (takzvané bakteriofágy)
- Mezi viry nepatří priony – chyby v bílkovině. Přesto je však zvykem probírat je ve virologii.

# Rozdělení virů

- Podle nukleové kyseliny rozdělujeme viry na **DNA viry a RNA viry**
- Podle počtu vláken DNA/RNA jednovláknové (**ss**) a **dvouvláknové (ds)**, u jednovláknových se ještě rozlišuje, zda se jedná o "plus" vlákno nebo "mínus" vlákno.
- Podle přítomnosti virového obalu se jak DNA, tak i RNA viry dělí na **obalené a neobalené**.
- Dále se klasifikují do **čeledí a rodů**, jako bakterie či živočichové; zato druhové názvy se zpravidla nepoužívají



# Virová částice – virion

- **Virion není buňka.** Viriony mají menší rozměry než většina buněk včetně bakteriálních: nejčastěji 20 – 300 nm
- **Skladba virionu**
  - nukleokapsida nebo jádro a kapsida
  - obal (u obalených virů)
  - u některých odlišná, atypická skladba (VHB)

*Je-li virus právě přítomen v hostitelské buňce, jeho struktura a uspořádání se mění*

# Nukleokapsida

- je přítomna u všech virů
- skládá se z nukleové kyseliny (DNA, RNA) a bílkovinné kapsidy
- kapsidy mohou mít helikoidální (šroubovicovou), kubickou či jinou symetrii.
- viry s kubickou symetrií tvoří tzv. pseudokrystaly – pravidelné útvary, přičemž jednotlivé viriony v nich jsou například tvaru pravidelného dvacetistěnu.

# Lipoproteionový obal

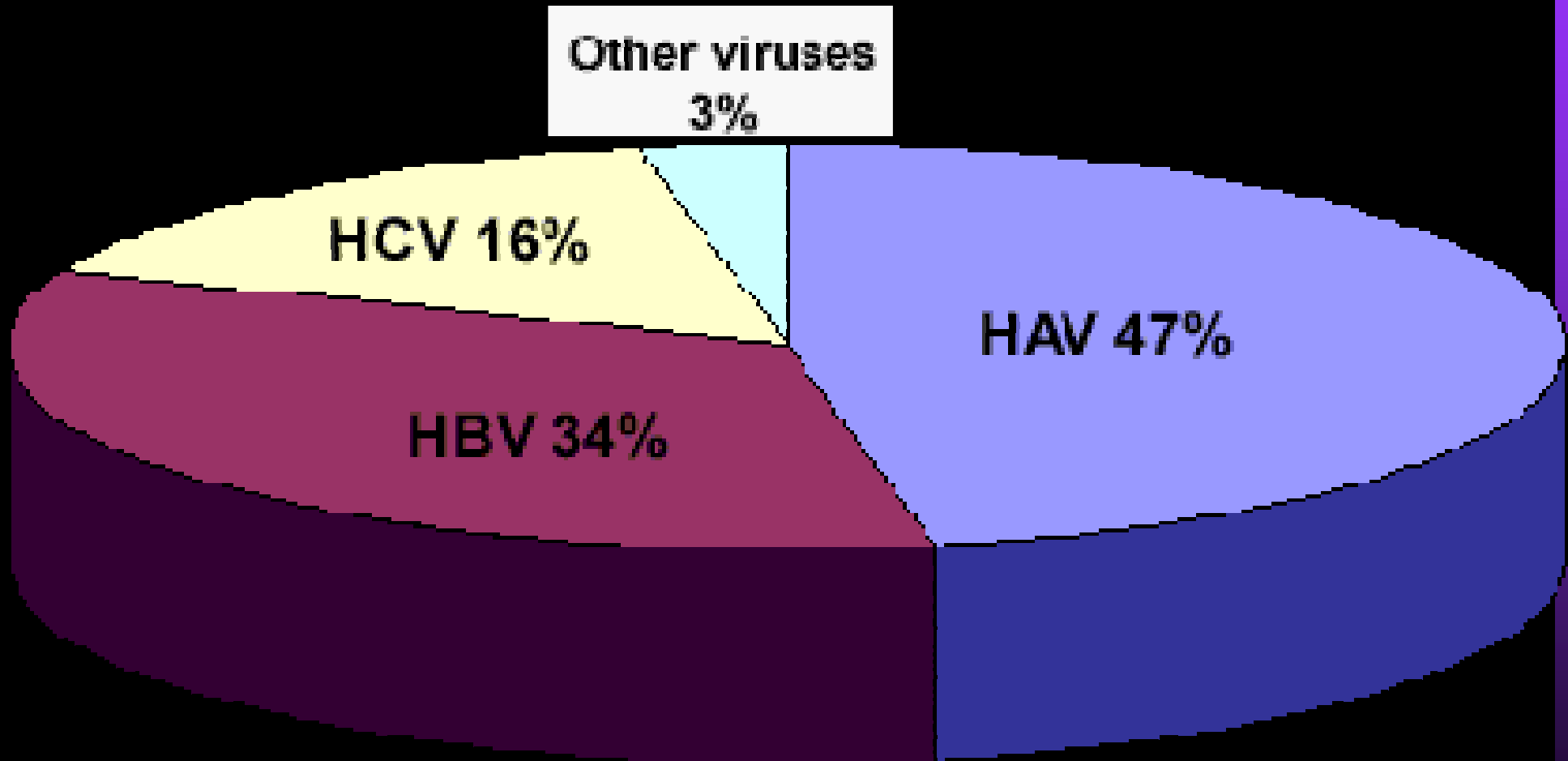
- mají jej pouze **obalené viry**.
- je tvořen **lipidickou dvojvrstvou**, která pochází z hostitelské buňky (původně např. cytoplazmatická, jaderná membrána apod.), do které jsou včleněny **virové proteiny**
- v některých případech je obal připojen specifickou bílkovinou k jádru.
- obalené viry jsou **méně odolné** (hynou totiž při porušení obalu např. vyschnutím)

# Viry hepatitid

- Existuje pět hlavních typů virových hepatitid VHA až VHE, které způsobují viry HAV až HEV. Každý patří do jiné skupiny, **většina jsou RNA viry, ale virus hepatitidy B je DNA virus**
- **VHA a VHE** (pomůcka: samohlásky) se přenášejí **fekálně orální cestou** (ruce), **nepřecházejí do chronicity**
- **VHB, VHC a VHD** – přenos **krví, popř. sexuální** (u VHC spíše nevýznamný), **mohou přecházet do chronicity**

*Kromě oněch pěti typů se občas hovoří i o dalších (viry hepatitidy G, GC, H apod.). Jejich zařazení a význam je však stále nejistý.*

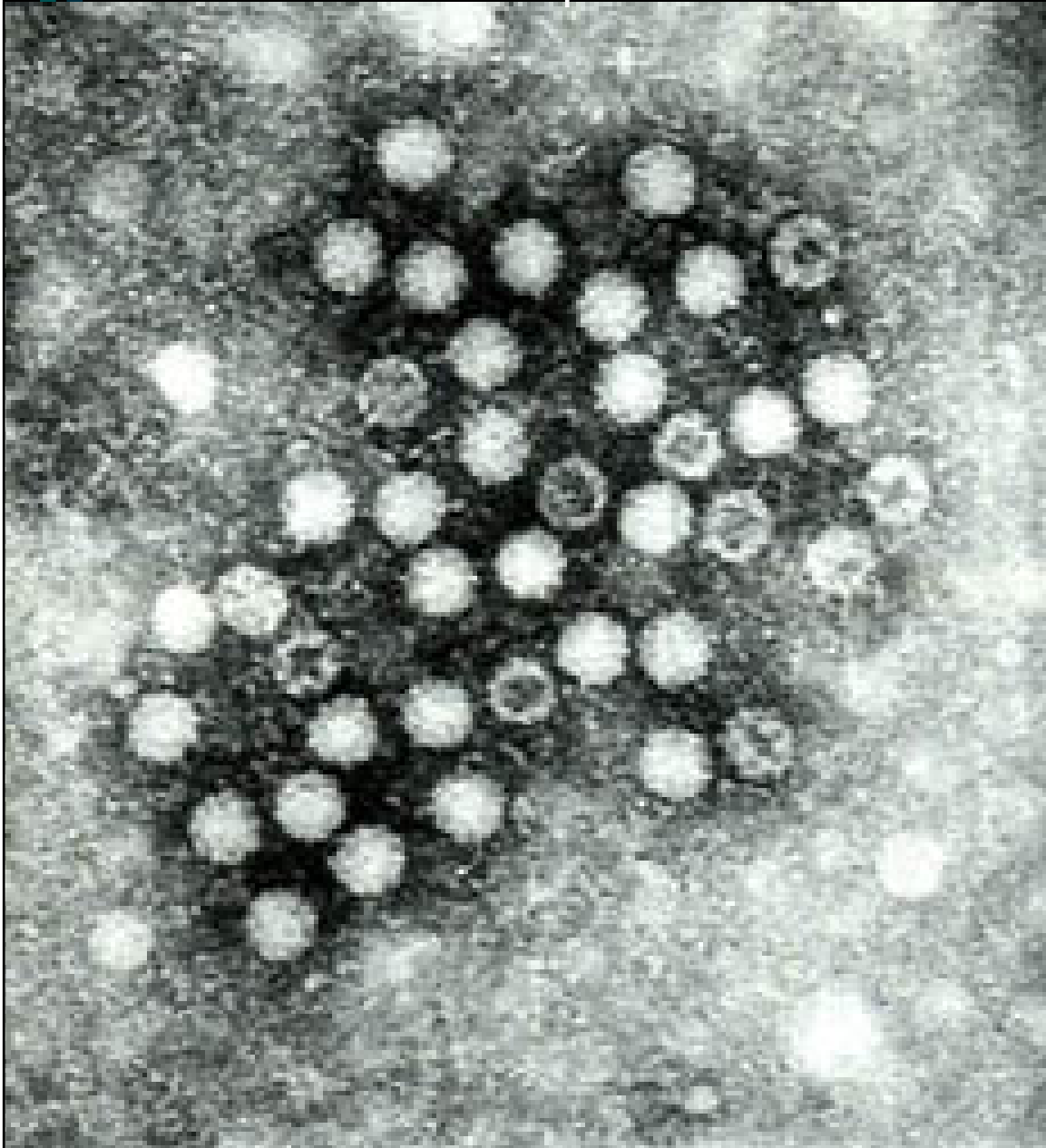
# Výskyt virových hepatitid v USA



# Přehled hepatitid

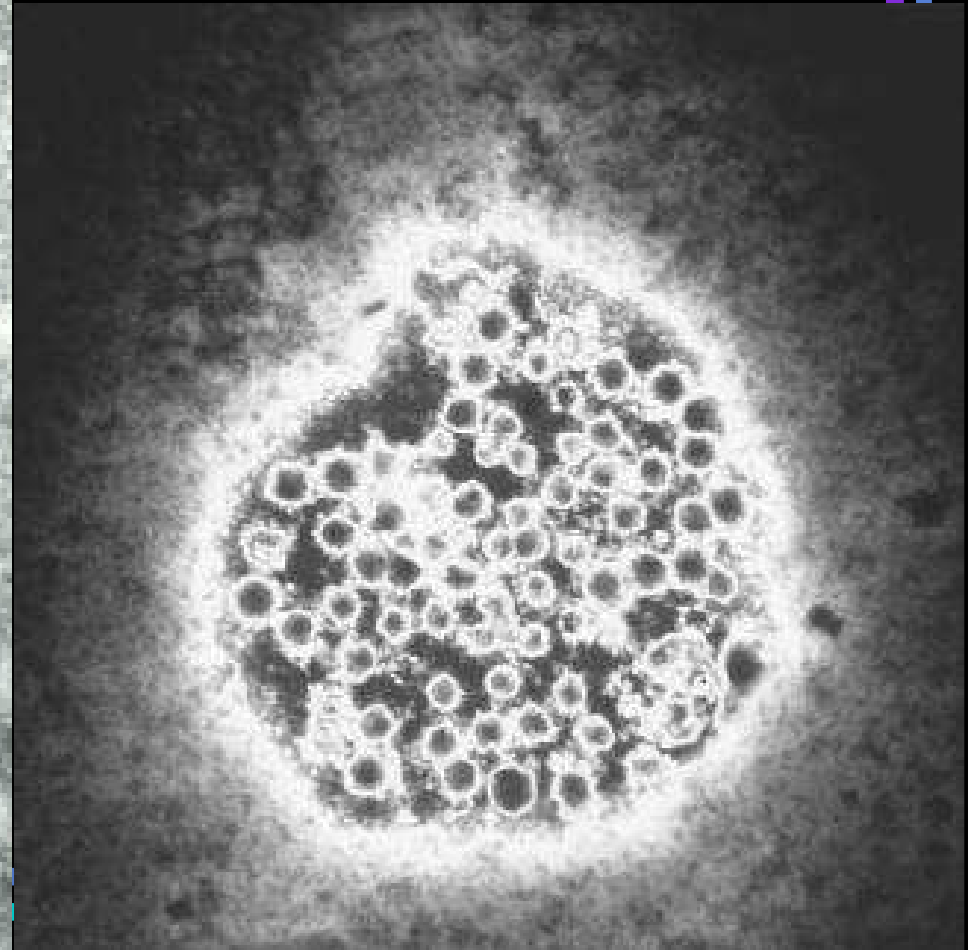
Hepatitida	Virus	Přenos
HAV	Picornavirus	fekálně-orální
HBV	Zvláštní skupina DNA virů	sexuální, krví
HCV (a HGV)	Flavivirus	krví
HDV	Delta agens – viroid	sexuální, krví
HEV	Příbuzný kalicivirům	fekálně-orální

<http://www.epidemic.org/cgi-bin/hepcglossary.cgi?query=HepatitisA&caller=theFacts/viruses/viralReplication.html>



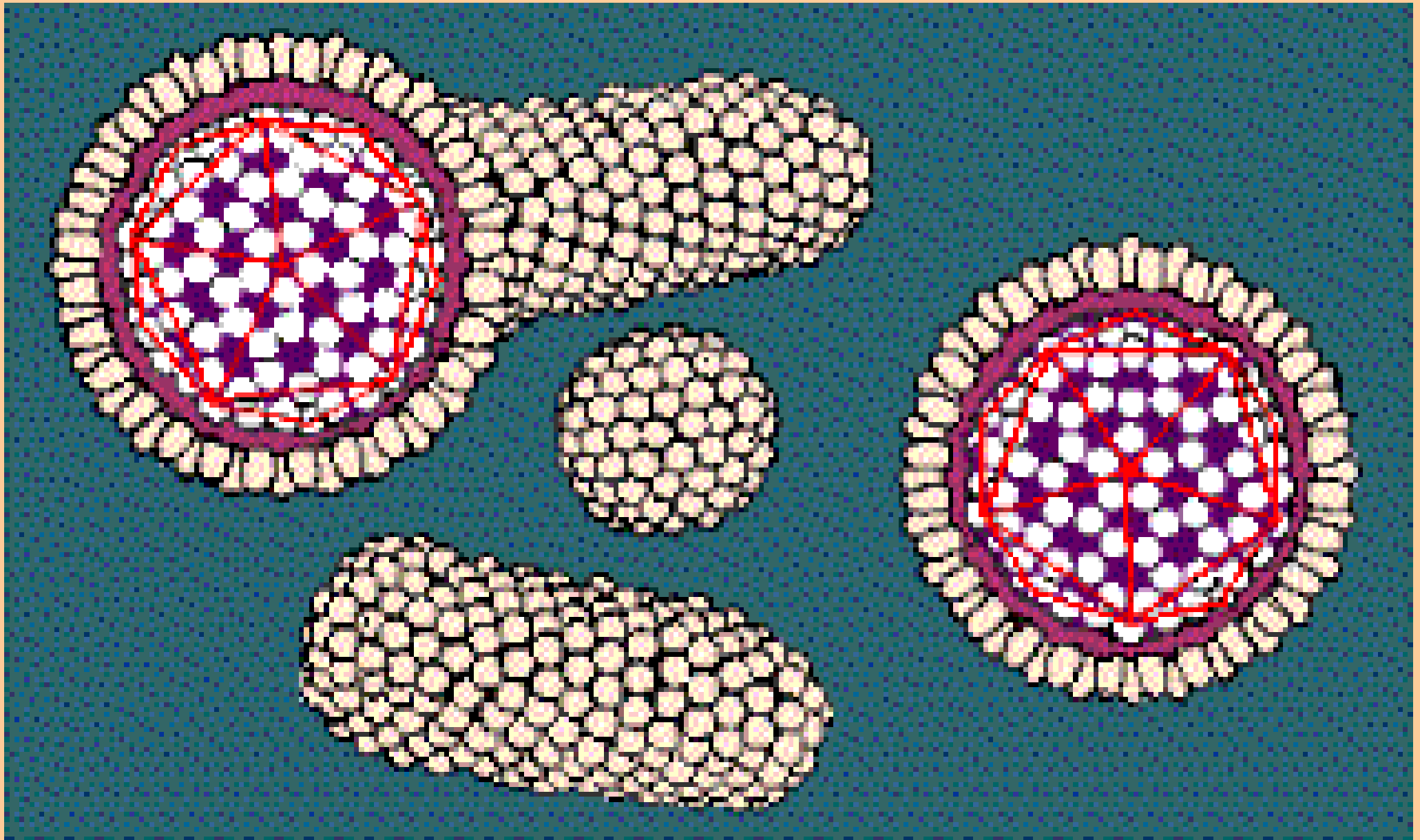
# Virus hepatitidy A

[www.faqs.org/health/Sick-V2/Hepatitis.html](http://www.faqs.org/health/Sick-V2/Hepatitis.html)



# Virus hepatitis B

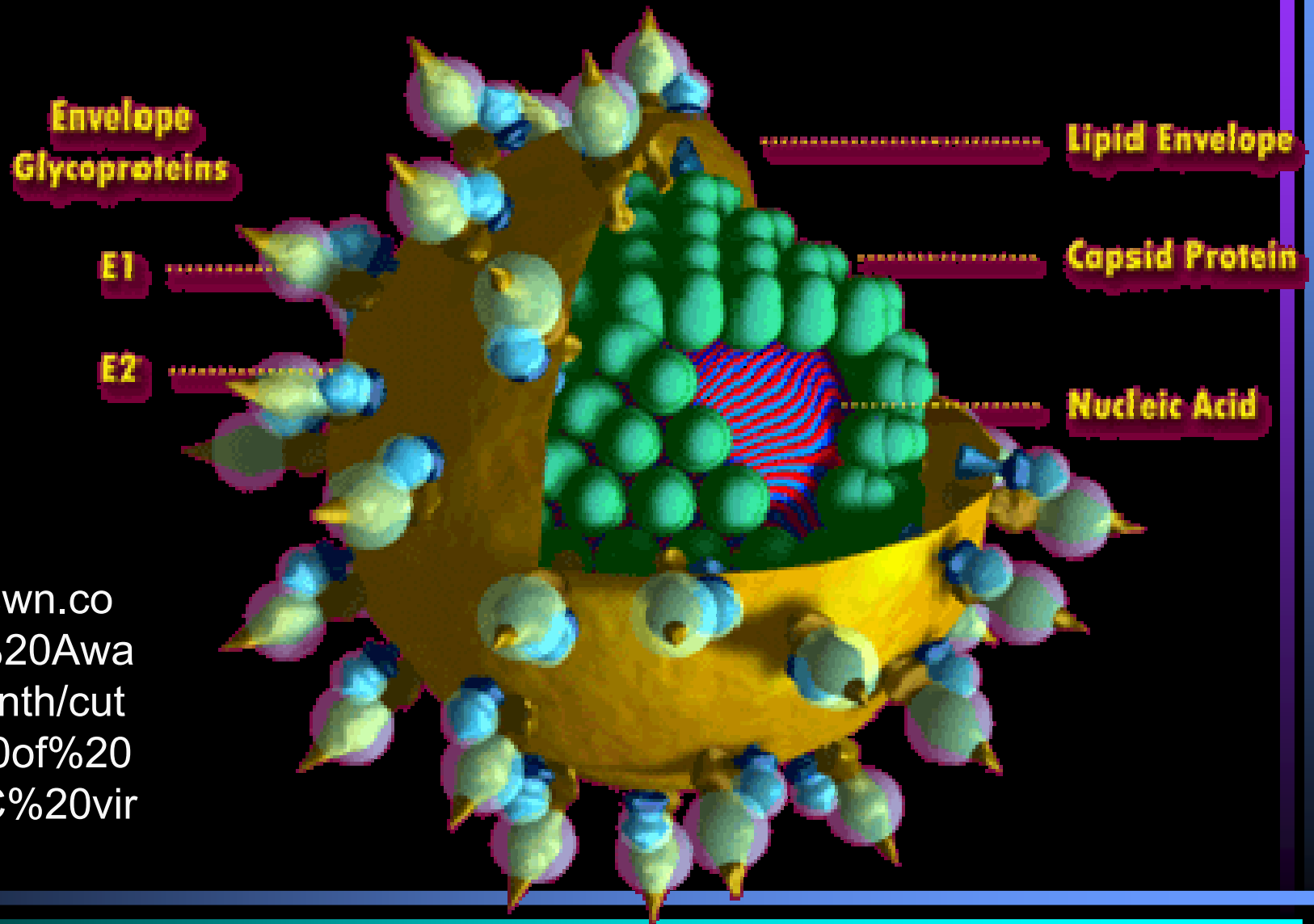
[www.uct.ac.za/depts/mmi/stannard/hepb.html](http://www.uct.ac.za/depts/mmi/stannard/hepb.html)





# Virus hepatitidy C

## Cut-a-Way Model of Human Hepatitis C Virus



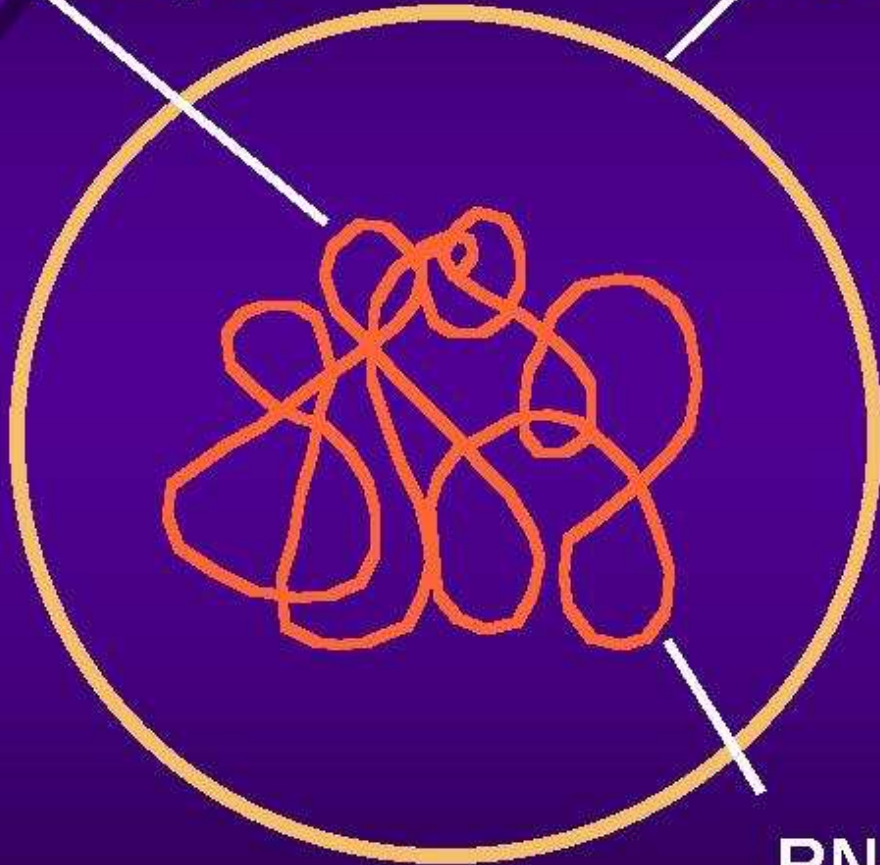
<http://www.pcswn.com/Hep%20C%20Awareness%20Month/cut%20model%20of%20Hepatitis%20C%20virus.gif>

# Virus hepatitidy D

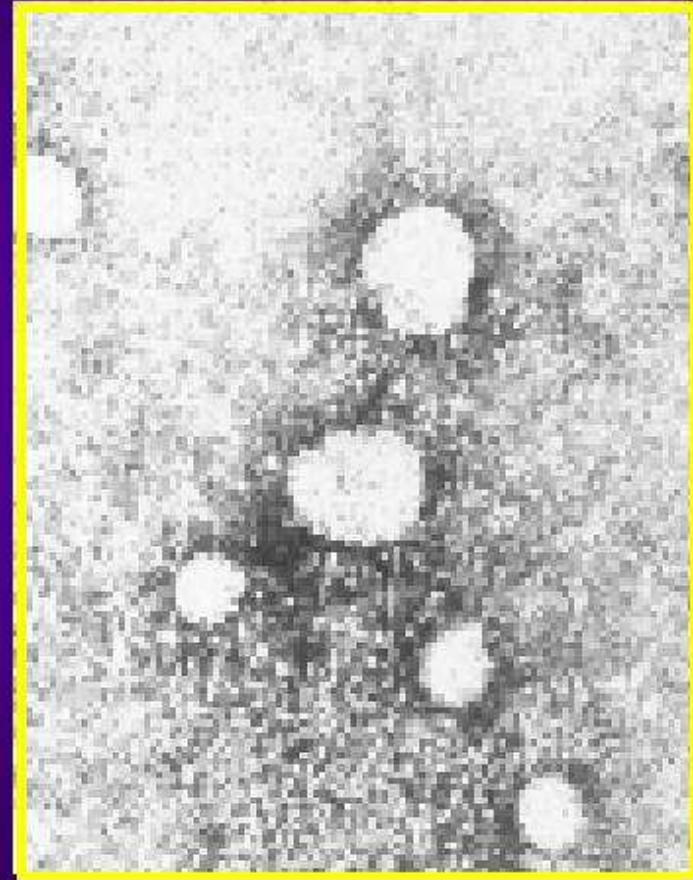
## Hepatitis D (Delta) Virus

$\delta$  antigen

HBsAg

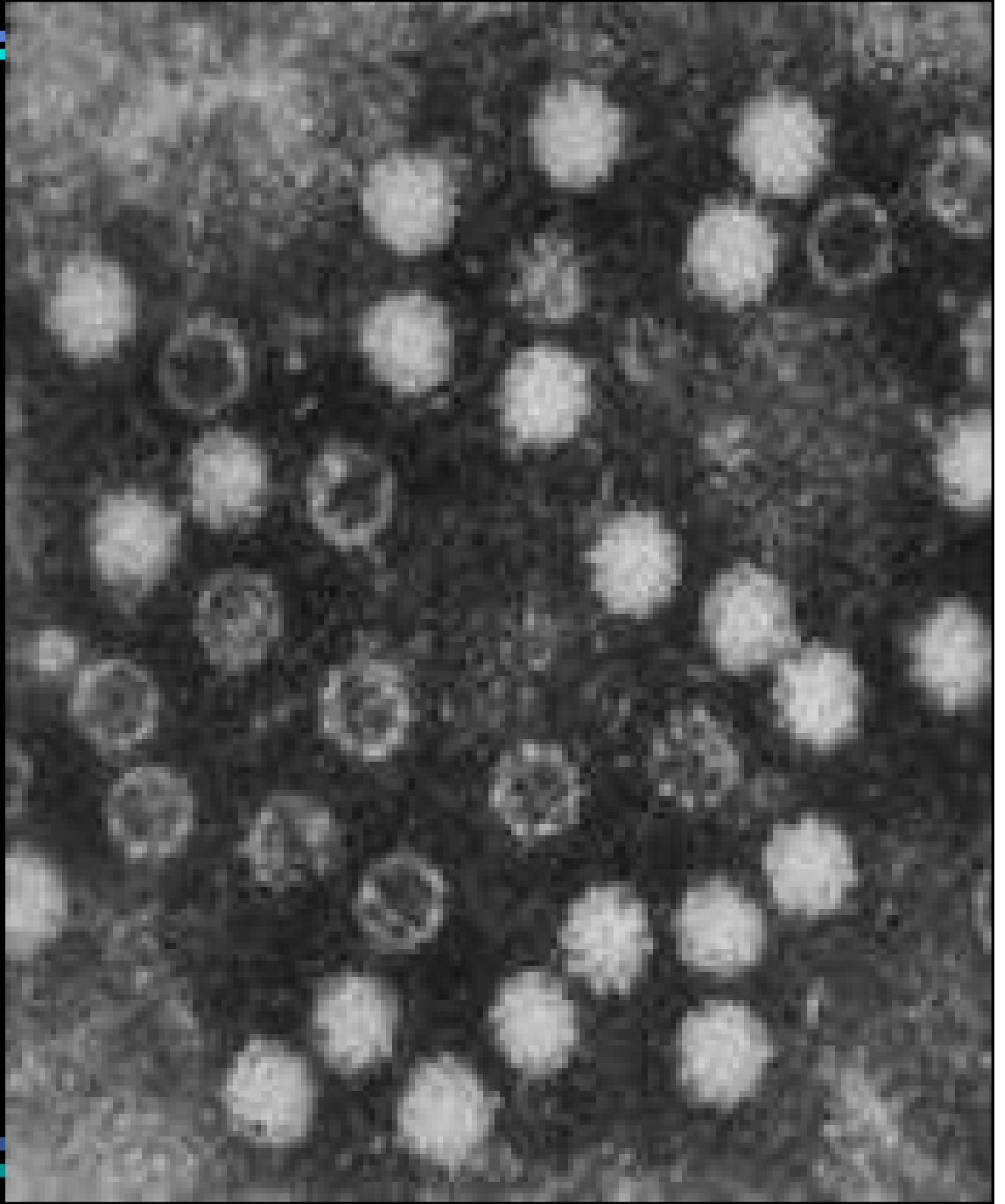


RNA



# Virus hepatitidy E

[http://vietsciences.free.fr/kh  
aocuu/nguyenlandung/virus  
01.htm](http://vietsciences.free.fr/kh<br/>aocuu/nguyenlandung/virus<br/>01.htm)

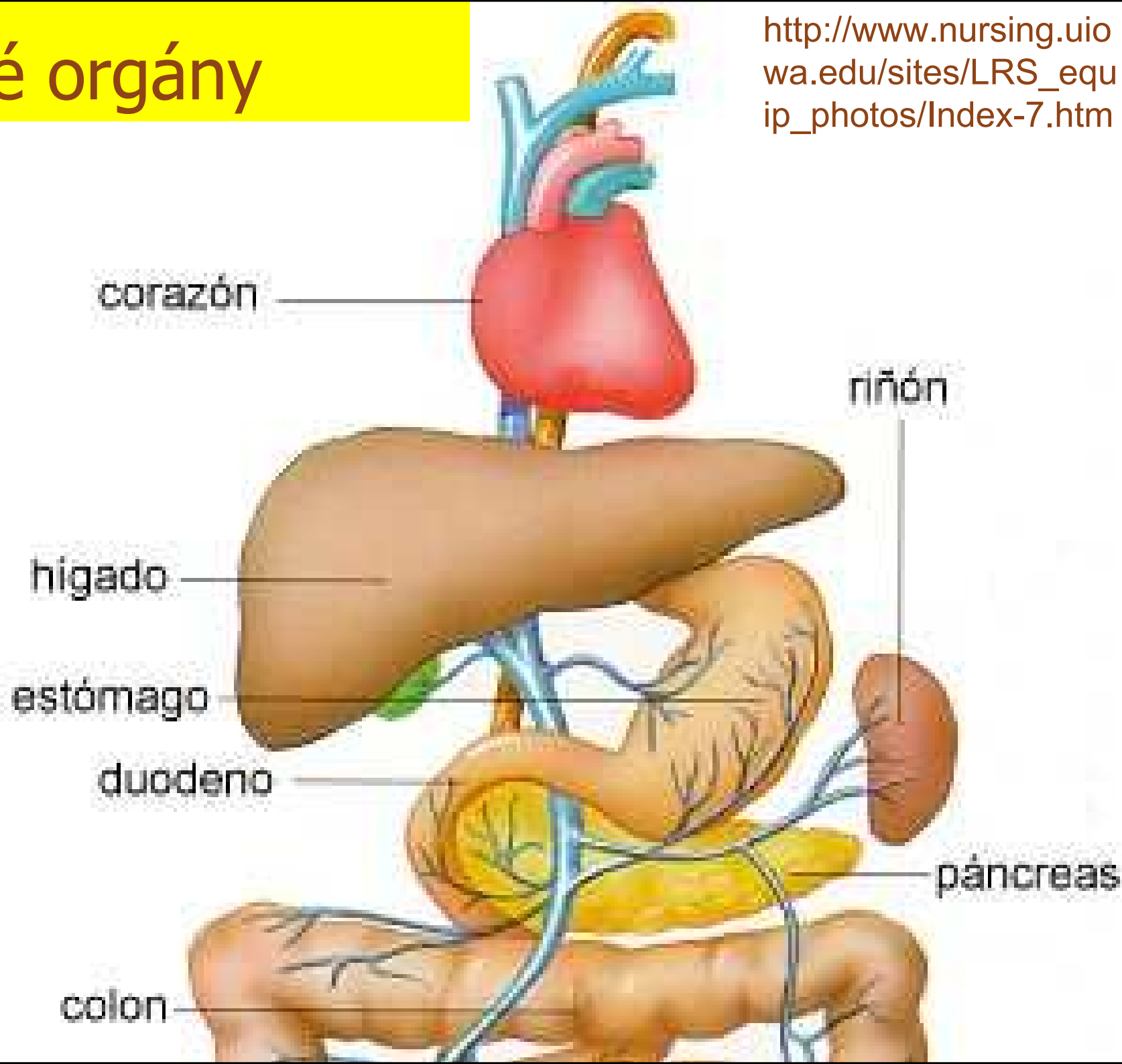


# Hepatitidy

- Jde o infekční **záněty jater**, lidově zvané žloutenky. Je ovšem nutno odlišit žloutenku jako přenosné virové onemocnění a žloutenku jako příznak, který je přítomen nejen při hepatitidě, ale i např. při obstrukci žlučových cest kameny
- **Pacient** má horečky, trávicí potíže, může být přítomno zežloutnutí skléry či kůže, změna barvy moče a stolice atd. Hepatitidy B, C a D mohou přecházet do chronicity, a někdy i být prekancerózou

# Postižené orgány

[http://www.nursing.uio wa.edu/sites/LRS\\_equ ip\\_photos/Index-7.htm](http://www.nursing.uio wa.edu/sites/LRS_equ ip_photos/Index-7.htm)



# Pacienti se žloutenkou



[http://www.gihealth.com/images/  
imgJaundiceBig.jpg](http://www.gihealth.com/images/imgJaundiceBig.jpg)

[medicine.ucsd.edu/Clinicalimg/ski  
n-jaundice.html.](http://medicine.ucsd.edu/Clinicalimg/skin-jaundice.html)

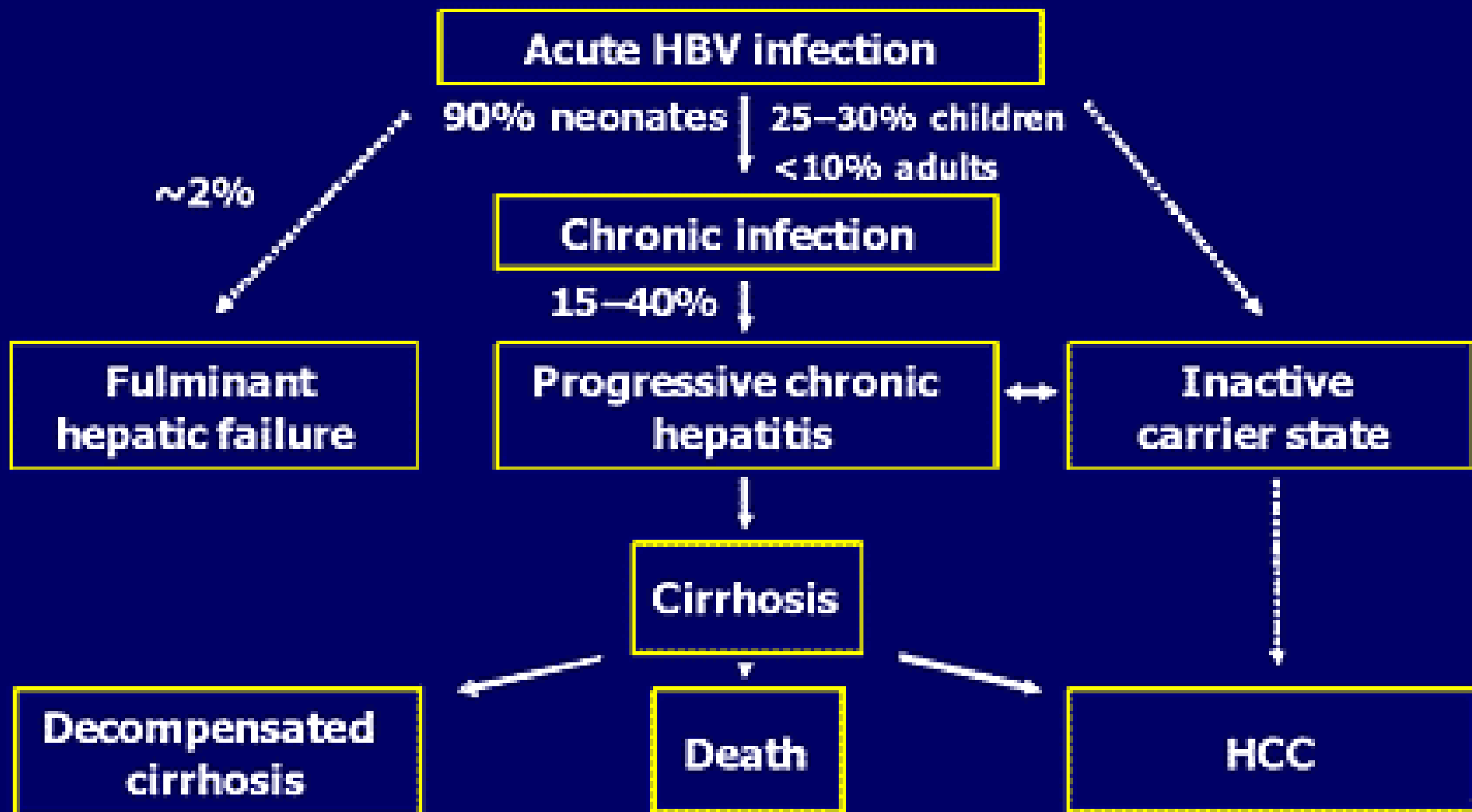




# Klasickým zdravotnickým problémem je zejména hepatitida typu B

- přechází do chronicity, možnost cirhózy či hepatomu
- dříve možný přenos ve zdravotnictví, při dnešní úrovni zdravotnictví připadá v úvahu jen sexuální přenos a (stejně jako u hepatitidy C) i. v. narkomanie
- screening hepatitidy B běžný v řadě situací (před operacemi apod.)

# Natural History of Hepatitis B



3. Lok ASF, McMahon BJ. *Hepatology*. 2004;39:857-861.

4. Lok ASF, McMahon BJ. AASLD Practice Guidelines. Available at: [https://www.aasld.org/eweb/docs/chronichep\\_B.pdf](https://www.aasld.org/eweb/docs/chronichep_B.pdf).

[www.pegasys.com/hcp/efficacy-hepatitis-b.aspx](http://www.pegasys.com/hcp/efficacy-hepatitis-b.aspx)



# HBV

## A Global Health Problem



### HBsAg Prevalence (%)<sup>1</sup>

- 8: High
- 2-8: Intermediate
- <2: Low

Country	HBsAg+ (%)
China	5.3-12 <sup>2</sup>
S. Korea	2.6-5.1 <sup>2</sup>
India	2.4-4.7 <sup>2</sup>
Taiwan	10-13.8 <sup>2</sup>
Viet Nam	5.7-10 <sup>2</sup>
Japan	4.4-13 <sup>3</sup>
Africa	5-19 <sup>2</sup>
Russia	1.4-8 <sup>2</sup>
Europe	0.3-12 <sup>2</sup>

WHO. Hepatitis B. 2002. Available at:  
<http://www.who.int/csr/disease/hepatitis/whocdscsrlyo20022/en/>.

Custer B et al. *J Clin Gastroenterol*. 2004;38(10 suppl):S158-S168.

WHO. Seroprevalence of hepatitis B in WPRO. Available at:  
[http://www.wpro.who.int/pdf/EPI/seroprevalence\\_hepatitisB\\_WPRO.pdf](http://www.wpro.who.int/pdf/EPI/seroprevalence_hepatitisB_WPRO.pdf).

[www.pegasys.com/hcp/efficacy-hepatitis-b.aspx](http://www.pegasys.com/hcp/efficacy-hepatitis-b.aspx)



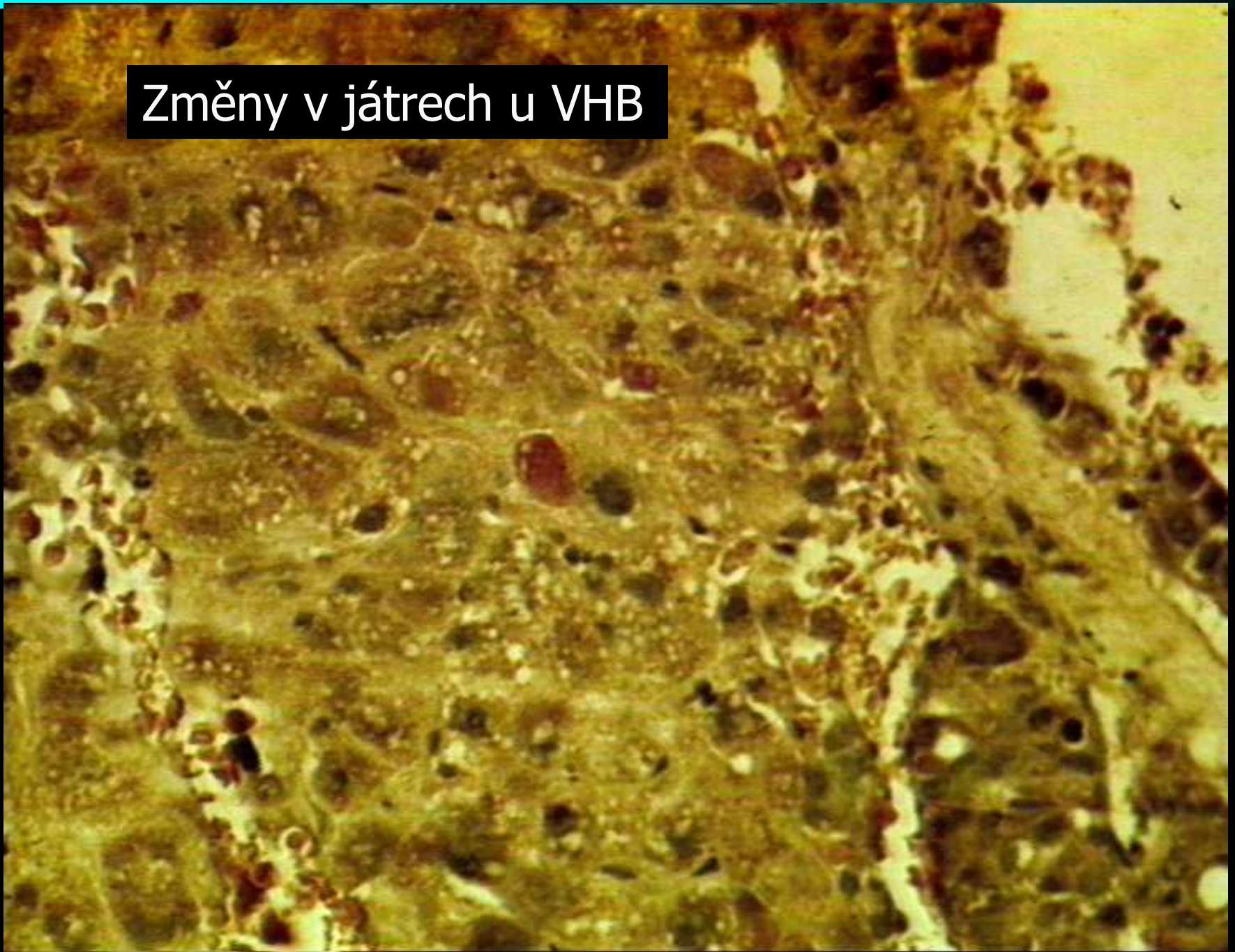
[pathmicro.med.sc.edu/virol/hepatitis-disease2.htm](http://pathmicro.med.sc.edu/virol/hepatitis-disease2.htm)

**Nahoře:** pacient se žloutenkou při hepatitidě B.  
**Vpravo:** žena z thajského uprchlického tábora, která má hepatom po hepatitidě, později na nemoc zemřela





## Změny v játrech u VHB

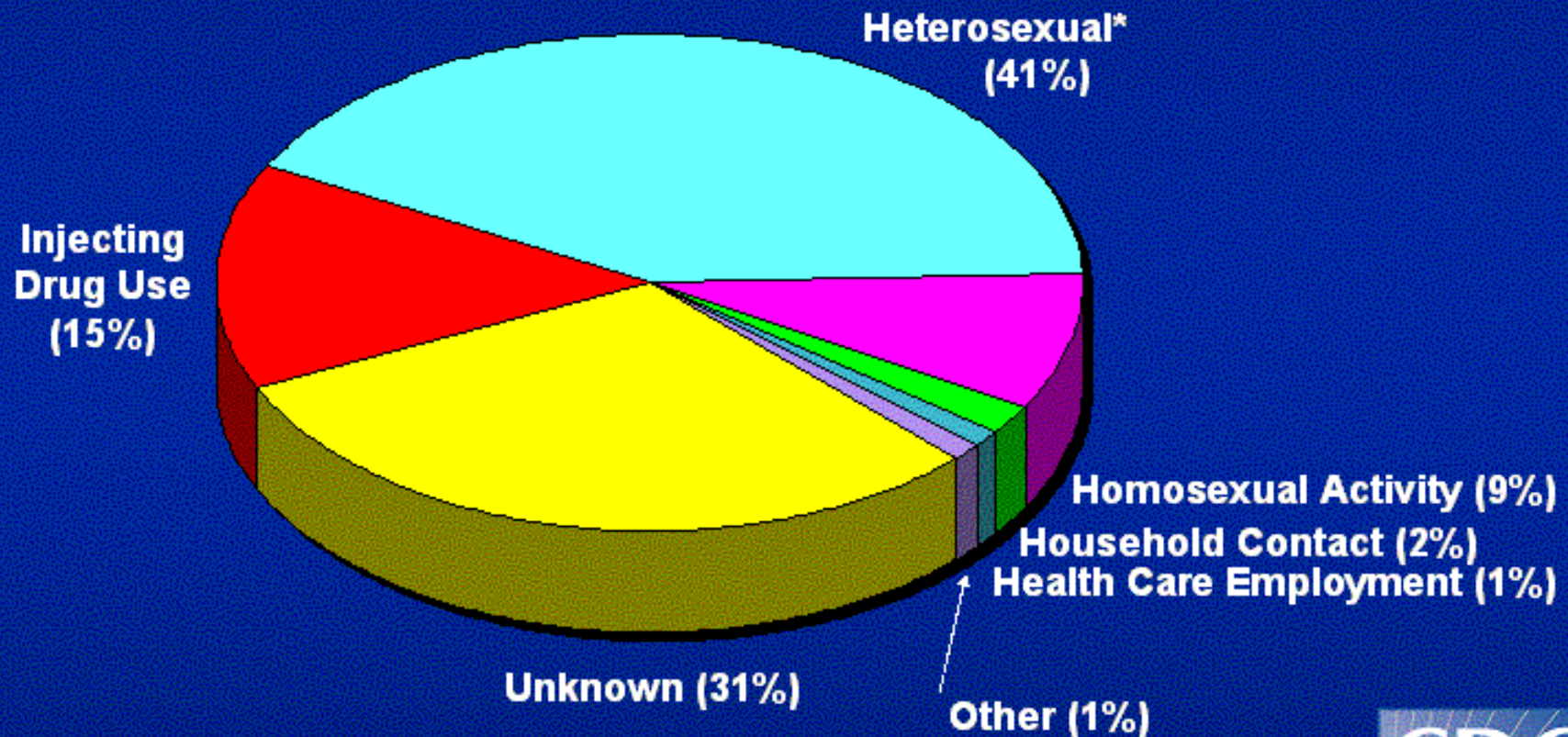




# Rizikové faktory hepatitidy B

## Risk Factors for Acute Hepatitis B United States, 1992-1993

[pathmicro.med.sc.edu/virol/hepatitis-disease2.htm](http://pathmicro.med.sc.edu/virol/hepatitis-disease2.htm)

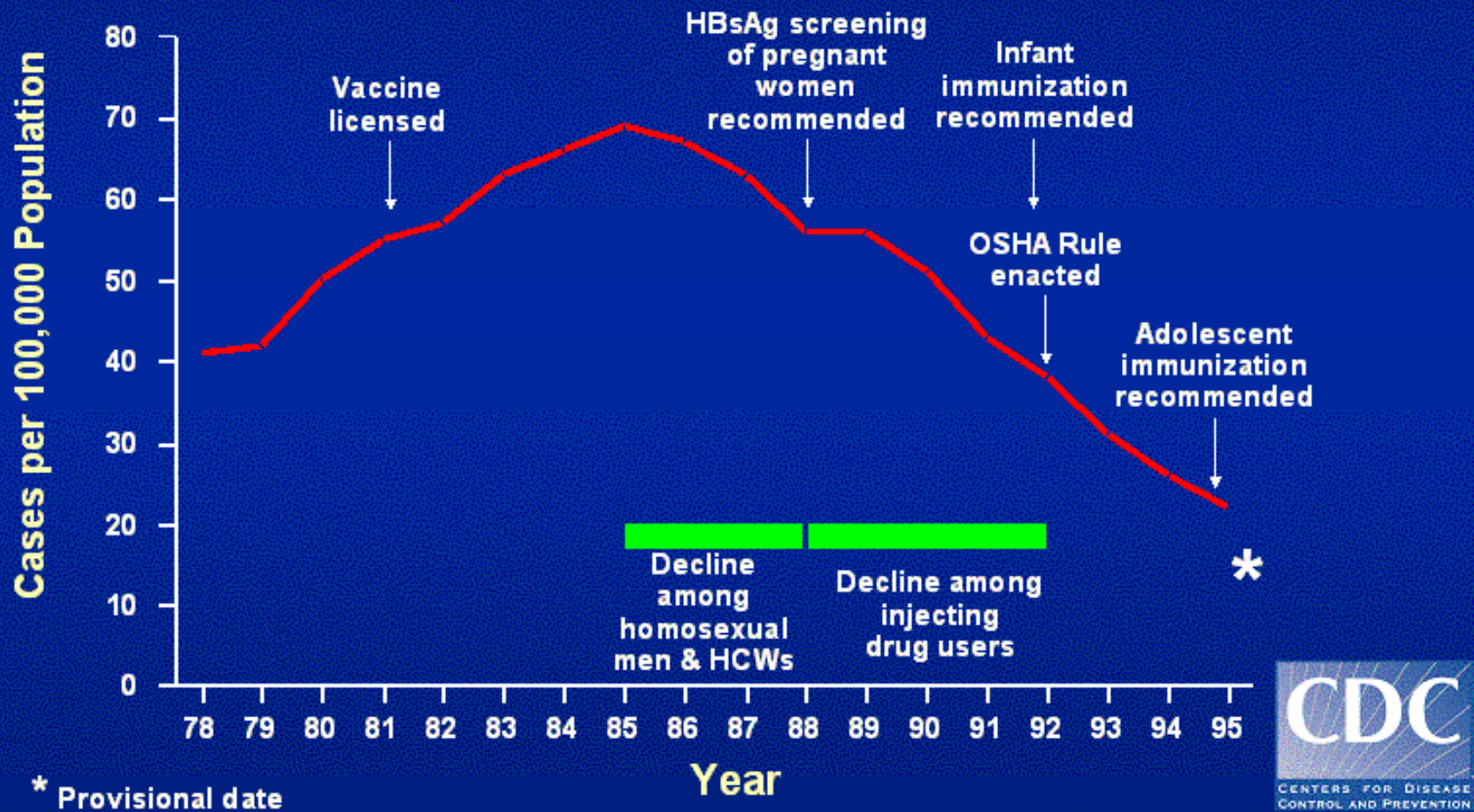


\* Includes sexual contact with acute cases, carriers, and multiple partners.  
Source: CDC Sentinel Counties Study of Viral Hepatitis



# Vývoj počtu případů v USA

## Estimated Incidence of Acute Hepatitis B United States, 1978-1995



# Prevence a léčba hepatitid

- **Očkování proti hepatitidě B** je nyní součástí normálního očkovacího kalendáře
- **Očkování proti hepatitidě A** je dostupné a doporučené např. i při cestách do jižní Evropy či severní Afriky
- U některých hepatitid se používá léčba pomocí **interferonů**
- Jinak se používají **hepatoprotektiva** (látky chránící játra) a jiná podpůrná terapie

# Virus HIV

- **Patří mezi tzv. retroviry**, které disponují reverzní transkriptázou (enzym pro přepis RNA do DNA)
- Virus HIV existuje ve **dvou typech** s tím, že většinu infekcí způsobuje první typ viru
- Přenáší se **krví, pohlavní cestou a také z matky na dítě**
- Existuje řada **léků proti viru HIV**, avšak jejich účinnost je omezená.

# Virus HIV – onemocnění

- Virus postihuje především **buněčnou imunitu**
- Po nespecifické **primární infekci** nastává dlouhé období, kdy se „nic neděje“.
- Poté se postupně vyvíjí generalizovaná lymfadenopatie, objevují se postupně oportunní infekce a při určitém stupni infekce se již hovoří o rozvinutém onemocnění **AIDS**
- AIDS nemá vlastní příznaky. Příznakem nemoci jsou **oportunních infekcí** (toxoplasmóza, pneumocystóza, různé mykózy aj.) a **nádorů**



env  
Surface Glycoprotein SU  
gp120

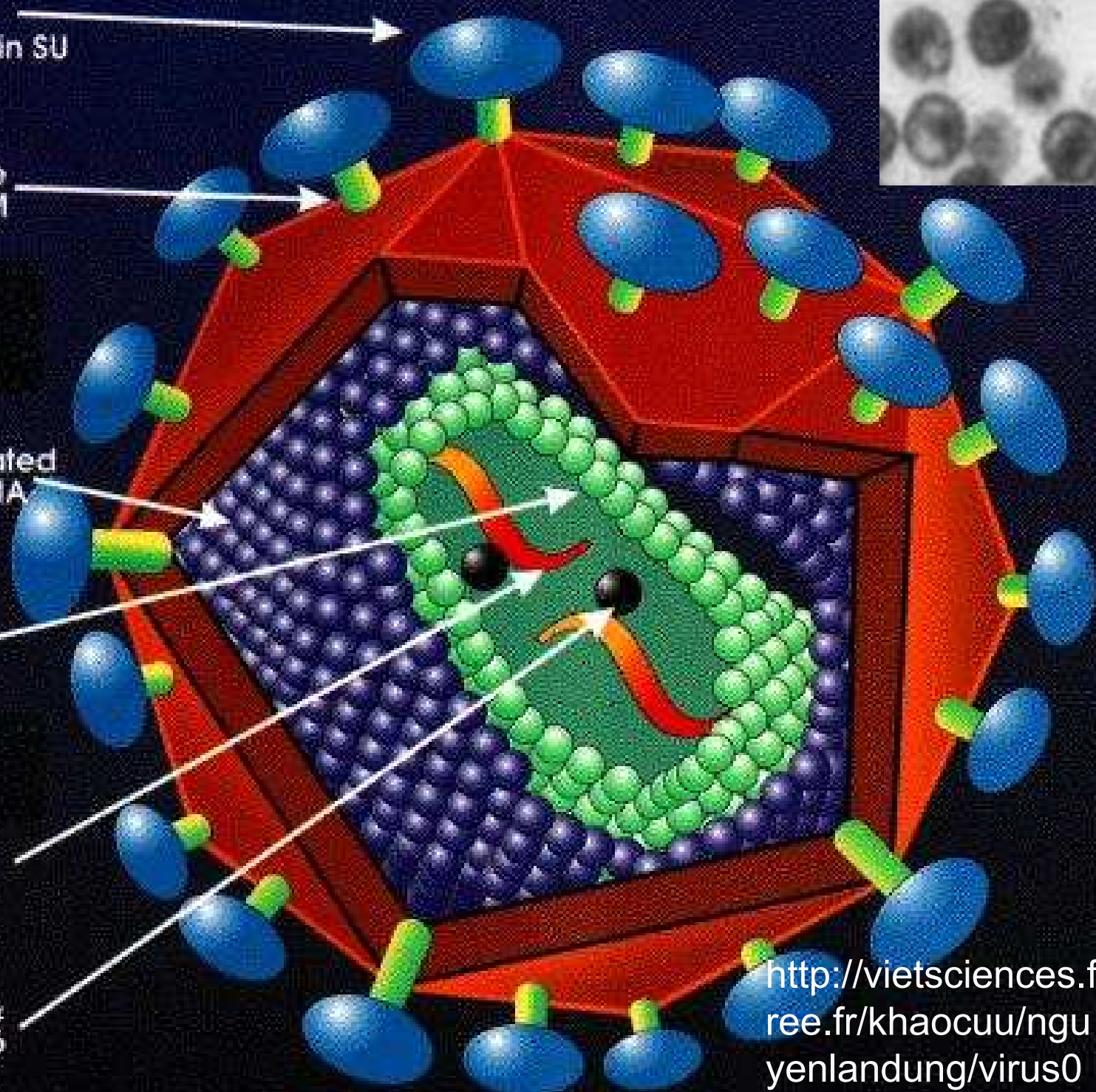
env  
Transmembrane  
Glycoprotein TM  
gp41

gag  
Membrane Associated  
(Matrix) Protein MA  
p17

gag  
Capsid CA  
(Core Shell)  
p24

RNA  
(2 molecules)

pol  
Protease PR p9  
Polymersase RT &  
RNAse H RNH p66  
Integrase IN p32



<http://vietsciences.free.fr/khaocuu/nguyenlandung/virus01.htm>

# A nyní již diagnostika. Nejprve opakování

- Cílem mikrobiologických metod je zpravidla detekce patogena, popř. určení jeho citlivosti na antimikrobiální látky (ale u virů zatím většinou ne)
- Patogena určujeme
  - Přímými metodami
    - detekce celého mikroba (jako morfologické či fyziologické jednotky)
    - detekce jeho části (antigenu, DNA)
    - detekce jeho produktu (například toxinu)
  - Nepřímými metodami: detekce protilátek

# Přehled metod – a které dnes využijeme:

- **Přímé metody** (*práce se vzorkem či kmenem*)
  - Mikroskopie (nativní preparát, barvení...)
  - Kultivace (na tekutých i pevných půdách)
  - Biochemické a podobné identifikační metody
  - **Průkaz antigenu (pomocí protilátky)**
  - Pokus na zvířeti (izolace, průkaz toxicity)
  - **Průkaz nukleové kyseliny**
- **Nepřímé metody**
  - **Průkaz protilátek (pomocí antigenu)**

# Přímý průkaz virů

- **Kultivace** → **izolace** (virus se často nepomnoží, jen uchová živý). Vyžaduje živé buňky. Blíže viz J 12
- **Mikroskopie**: elektronoptická, optická jen k průkazu něčeho, co viry dělají in vivo či in vitro (inkluze, cytopatický efekt)
- **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 virů

- Používá se hlavně **KFR**, různé typy neutralizací (**HIT, VNT**) a v poslední době především **reakce se značenými složkami (hlavně ELISA)**
- Pozor! Ne vše, kde se jako vzorek použije sérum, je nepřímý průkaz! U systémových viróz je často agens (nebo jen jeho antigen) v séru přítomno, a pak se dá sérum použít i pro přímý průkaz

## Diagnostika hepatitid A, C, D, E

- **HAV.** Stanovujeme metodou ELISA anti-HAV IgM s IgG, nebo IgM a celkové protilátky
- **HCV.** Rovněž stanovujeme IgM a IgG protilátky metodou ELISA, dále se používá PCR
- **HDV.** Prokazuje se delta antigen (HDAg), protilátky (anti-HD) či virová RNA PCR
- **HEV.** Opět průkaz IgM a IgG protilátek metodou ELISA, ve výzkumu je PCR



# Úkol 1 – diagnostika HAV

- V úkolu 1a) stanovujeme anti-HAV IgM. Výpočet cut off: průměr C1 a D1
- V úkolu 1b) stanovujeme celkové protilátky anti-HAV
- Výpočet cut off (1a + b): průměr C1 a D1. Pozitivní je to, co je vyšší, než cut off + 10 %, negativní je to, co je nižší než cut off – 10 %, to mezi tím je hraniční

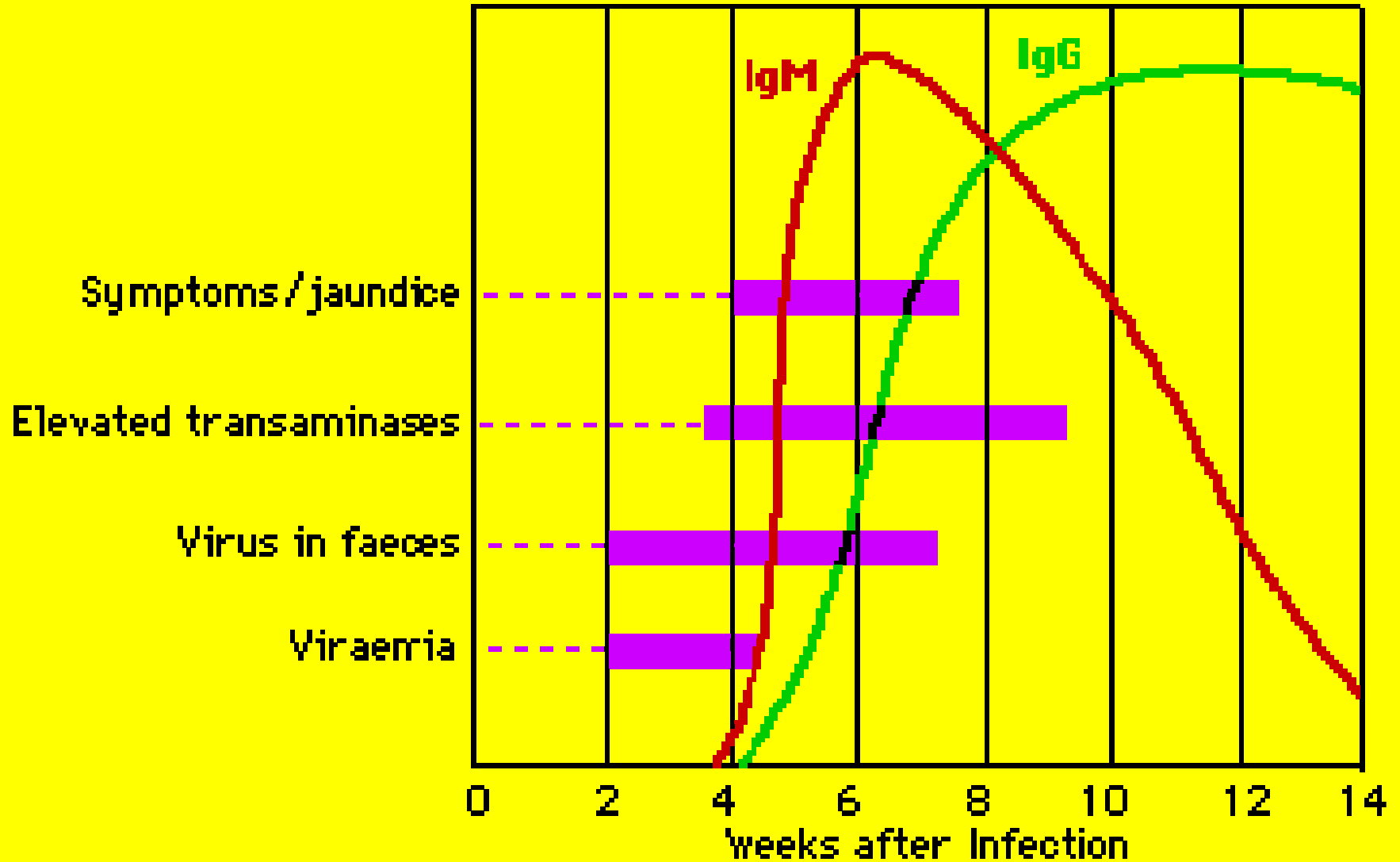
*Stanovení IgM + celkových protilátek je alternativou ke stanovení IgM a IgG*

HAV 😊



HAV!  
HAV!

# Vývoj žloutenky typu A



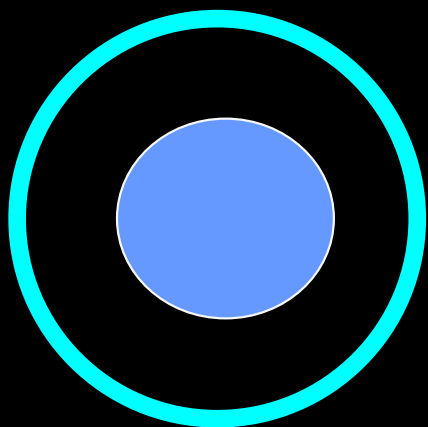
## Před úkolem 2: Zvláštnosti HBV

- Ve středu virionu hepatitidy B je **nukleokapsida**, kde je umístěna DNA a bílkoviny. Významné jsou dvě dřevňové bílkoviny, které mají povahu antigenů: HBcAg a HBeAg
- Kromě toho má virus **obal**, který je zčásti tvořen dalším antigenem: HBsAg
- HBsAg je nadprodukován, takže v krvi kolují i **prázdné obaly**
- Do prázdného HBsAg může proniknout také delta agens – původce hepatitidy D

# Delta agens

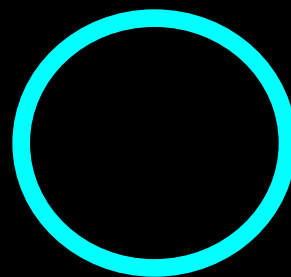
- Delta agens je **viroid**, částice s neurčitou virologickou klasifikací
- Delta agens může infikovat člověka buďto zároveň s virem hepatitidy B (**koinfekce**), nebo následně po takové infekci (**superinfekce**)
- Přítomnost delta agens podstatně zhoršuje prognózu virové hepatitidy

# Virus hepatitidy B



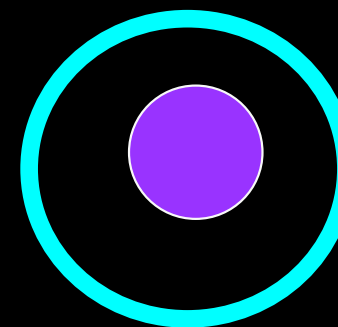
Kompletní  
virion  
(Daneho  
tělísko)

42 nm



Pouhý  
prázdný  
HBsAg

22 nm



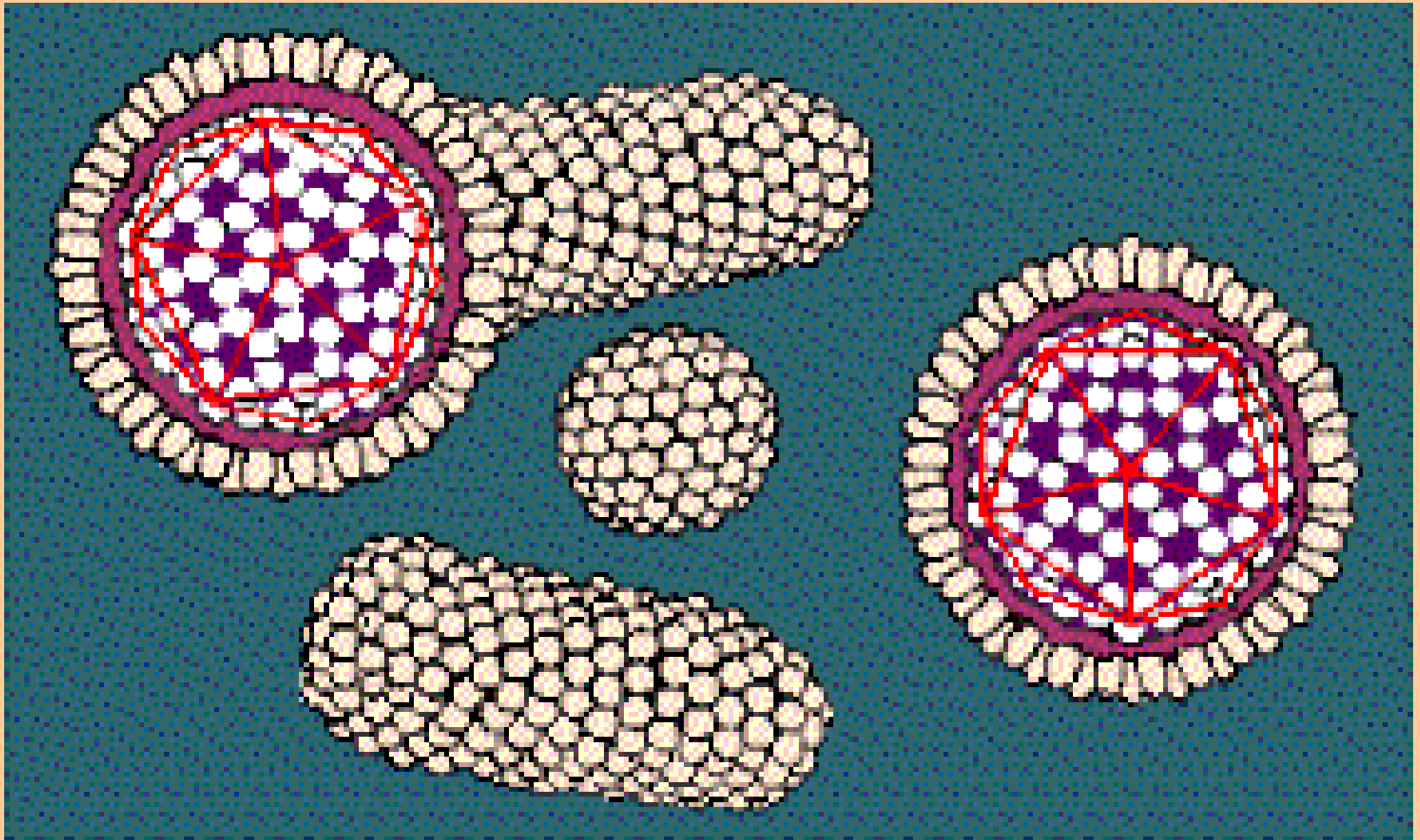
HBsAg,  
uvnitř delta  
agens  
(VHD)

35 nm

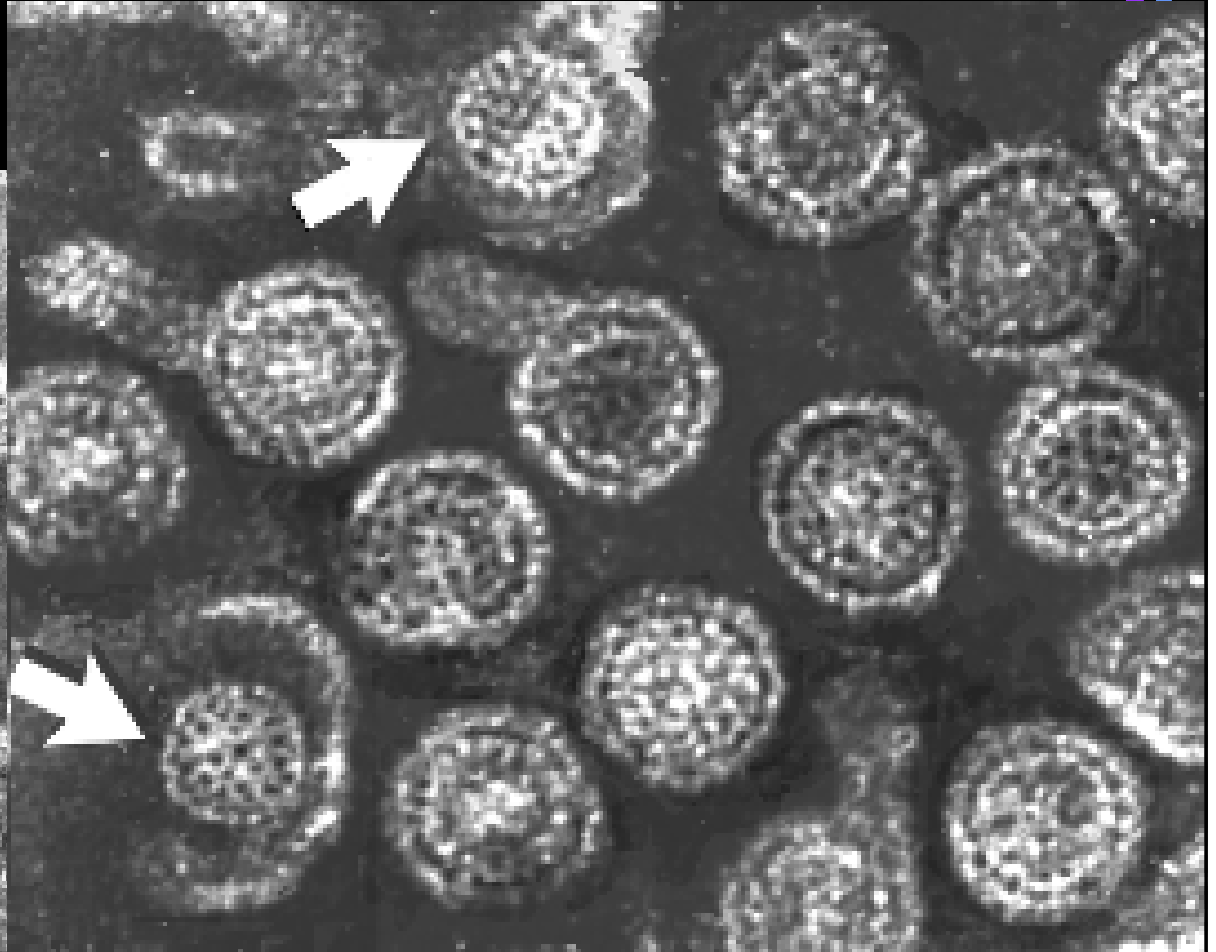
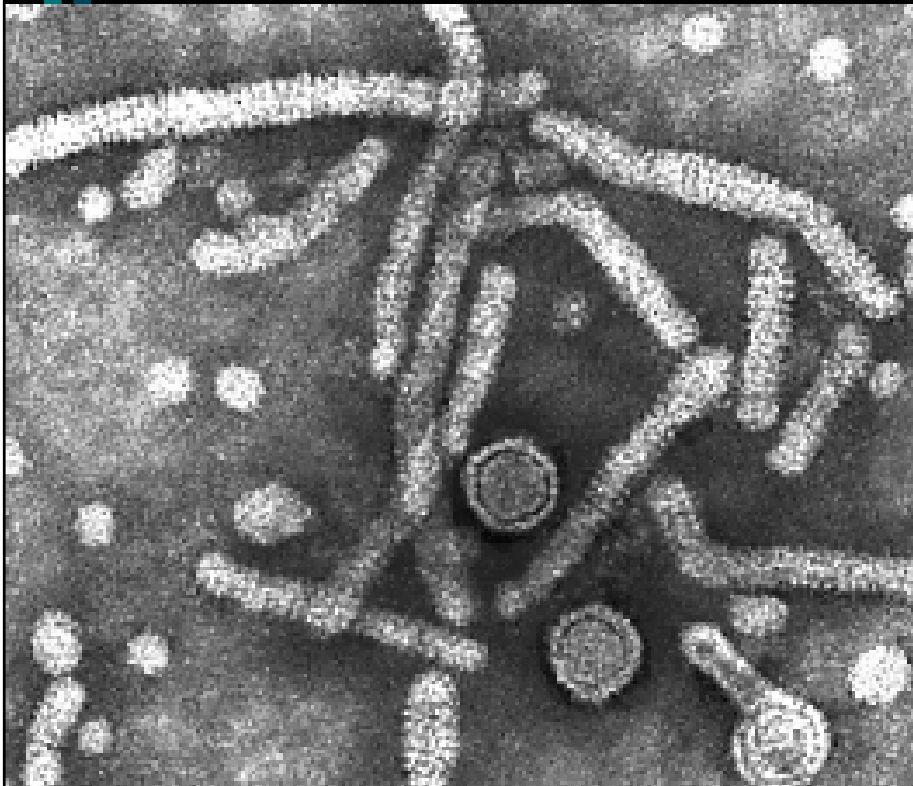


# Virus hepatitis B

[www.uct.ac.za/depts/mmi/stannard/hepb.html](http://www.uct.ac.za/depts/mmi/stannard/hepb.html)



# Kompletní viriony a prázdné HBsAg

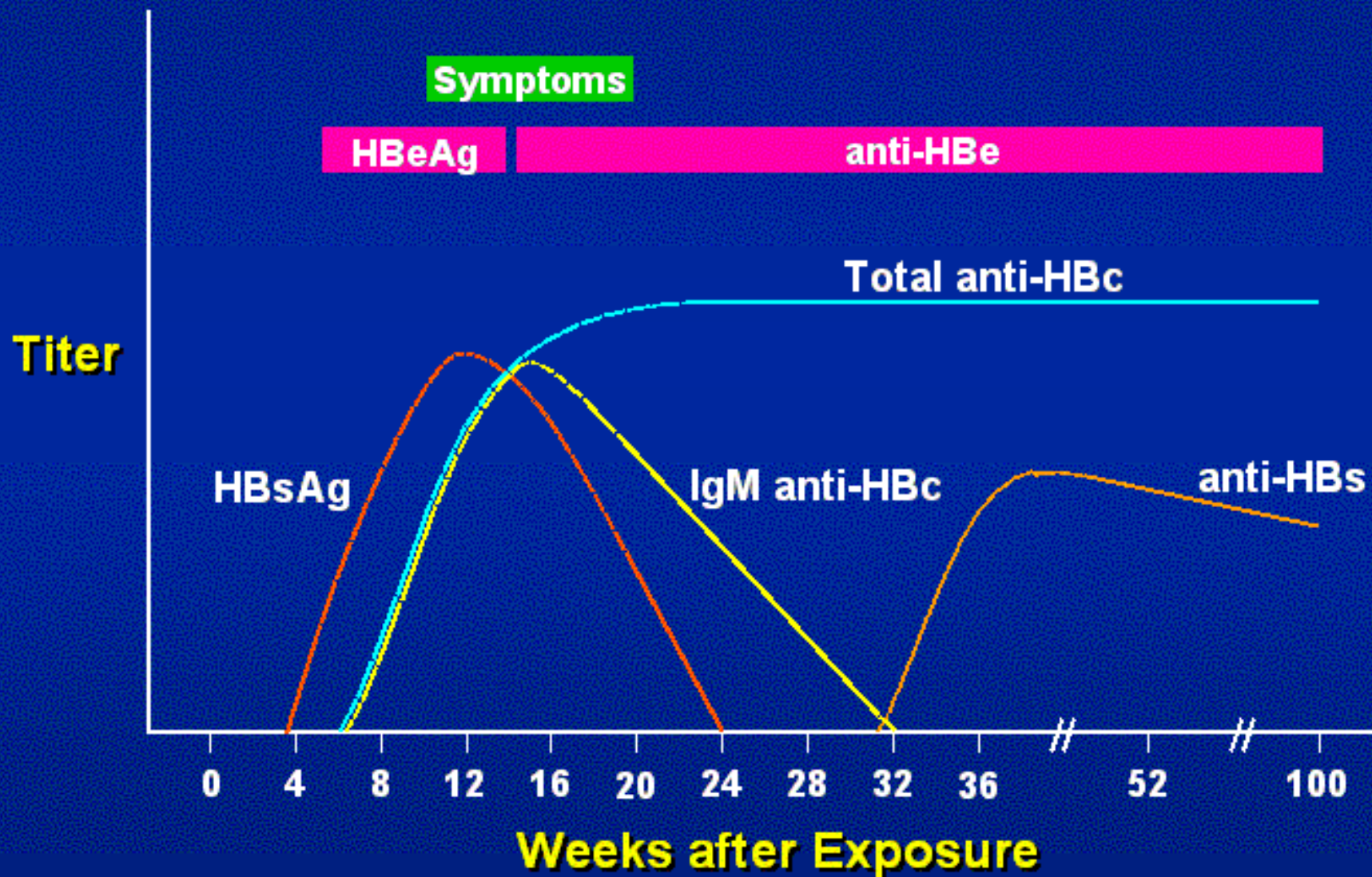


[www.uct.ac.za/depts/mmi/stannard/hepb.html](http://www.uct.ac.za/depts/mmi/stannard/hepb.html).

## Diagnostika HBV

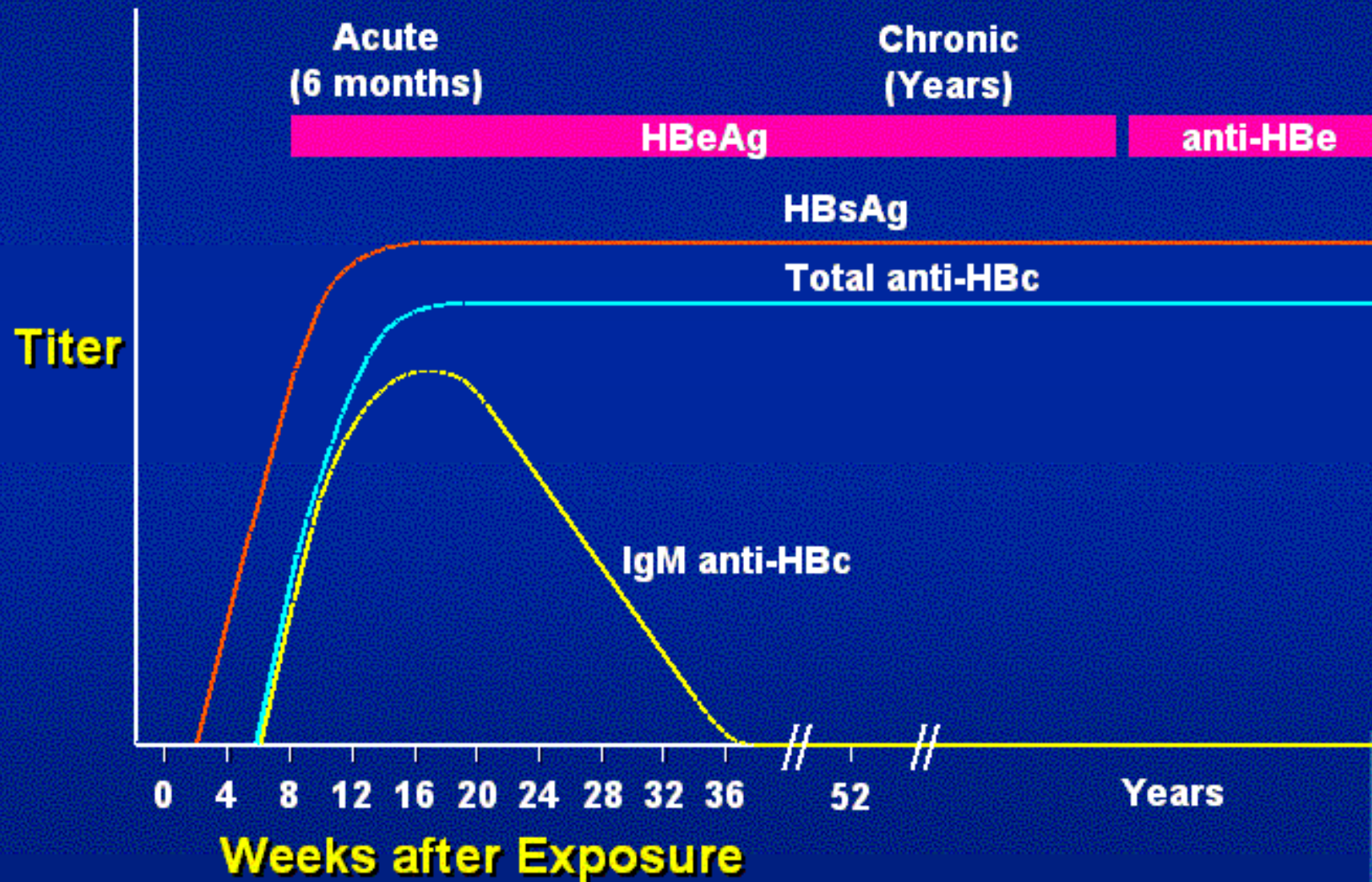
- HBV má **tři pro diagnostiku významné antigeny**. Jen dva z nich však nalézáme v séru: **HBsAg** a **HBeAg**.
- **HBsAg se tvoří v nadbytku**, takže je ho vždy v séru hodně, proto se hodí pro screening
- Protilátky naopak můžeme stanovovat proti všem třem z nich: **anti-HBs**, **anti-HBe** i **anti-HBc**.
- Diagnostiku případně doplní **PCR**, průkaz **jaterních enzymů** aj.
- Z kombinace vyšetření plyne interpretace

# Acute Hepatitis B Virus Infection with Recovery Typical Serologic Course





# Progression to Chronic Hepatitis B Virus Infection Typical Serologic Course



## Úkol 2: Stanovení markerů hepatitid

- 2a) Stanovení HBsAg a HBeAg
- 2b) Stanovení anti-HBs a anti-HBe
- Výpočet cut off (úkol 2a i úkol 2b): průměr C1 a D1.

**Pozitivní** je to, co je vyšší, než cut off + 10 %

**Negativní** je to, co je nižší než cut off – 10 %

**Hraniční** je jsou hodnoty cut off  $\pm$  10 %

# Úkol 3: Diagnostika HCV

- 3a): PCR, elektroforéza. Odečítá se způsobem popsaným v praktiku J11
- 3b): průkaz anti-HCV metodou ELISA
- Výpočet cut off: průměr negativních kontrol (důlku B1, C1 a D1) + 0,050

**Pozitivní** je to, co je vyšší, než cut off + 10 %

**Negativní** je to, co je nižší než cut off – 10 %

**Hraniční** je jsou hodnoty cut off  $\pm$  10 % (nutno znovu otestovat z nového odběru)



# Diagnostika viru HIV

- **Prokazují se protilátky** proti obalovým glykoproteinům pomocí ELISA testů. Pokud výsledek vyjde jako pozitivní, pošle se vzorek séra do referenční laboratoře, která výsledek ověří **(konfirmuje)** western blottem
- **Přímý průkaz** lze provádět pomocí PCR. Izolace viru je dnes již možná, ale velmi náročná a běžné se neprovádí

## Úkol 4: Vyšetření protilátek anti-HIV metodou ELISA

Výpočet cut off (4a + b): průměr C1 a D1.

**Pozitivní** je to, co je vyšší, než cut off + 10 %

**Negativní** je to, co je nižší než cut off – 10 %

**Hraniční** je jsou hodnoty cut off  $\pm$  10 %

# Hezký den!

>>> Lambda fág >>>

<http://www.ucm.es/info/genetica/grupod/Cromovibac/cromovibac.htm>

