

**P09**

**Přehled virologické  
diagnostiky**

# Osnova

- klasifikace a struktura virů
- replikace virů; adenoviry, picornaviry, respirační viry; mykoplasmata
- virus klíšťové encefalitidy
- viry spalniček, zarděnek, příušnic
- viry hepatitid
- HIV virus
- herpesviry
- izolace a kultivace virů, cytopatický efekt

# Viry

- elementární **biosystém**, který **vykazuje některé vlastnosti živých systémů** (přítomnost genomu, schopnost adaptace)
- **nejsou schopny zabezpečit své energetické nároky** bez živé buňky a mimo ni nejsou funkčně aktivní
- **intracelulární parazité**, postrádají proteosyntetický aparát
- 2 fáze:
  - neživé agregáty makromolekul mimo hostitelskou buňku (metabolicky inertní)
  - uvnitř buňky replikace a exprese genomu (metabolicky aktivní)

# Viry (2)

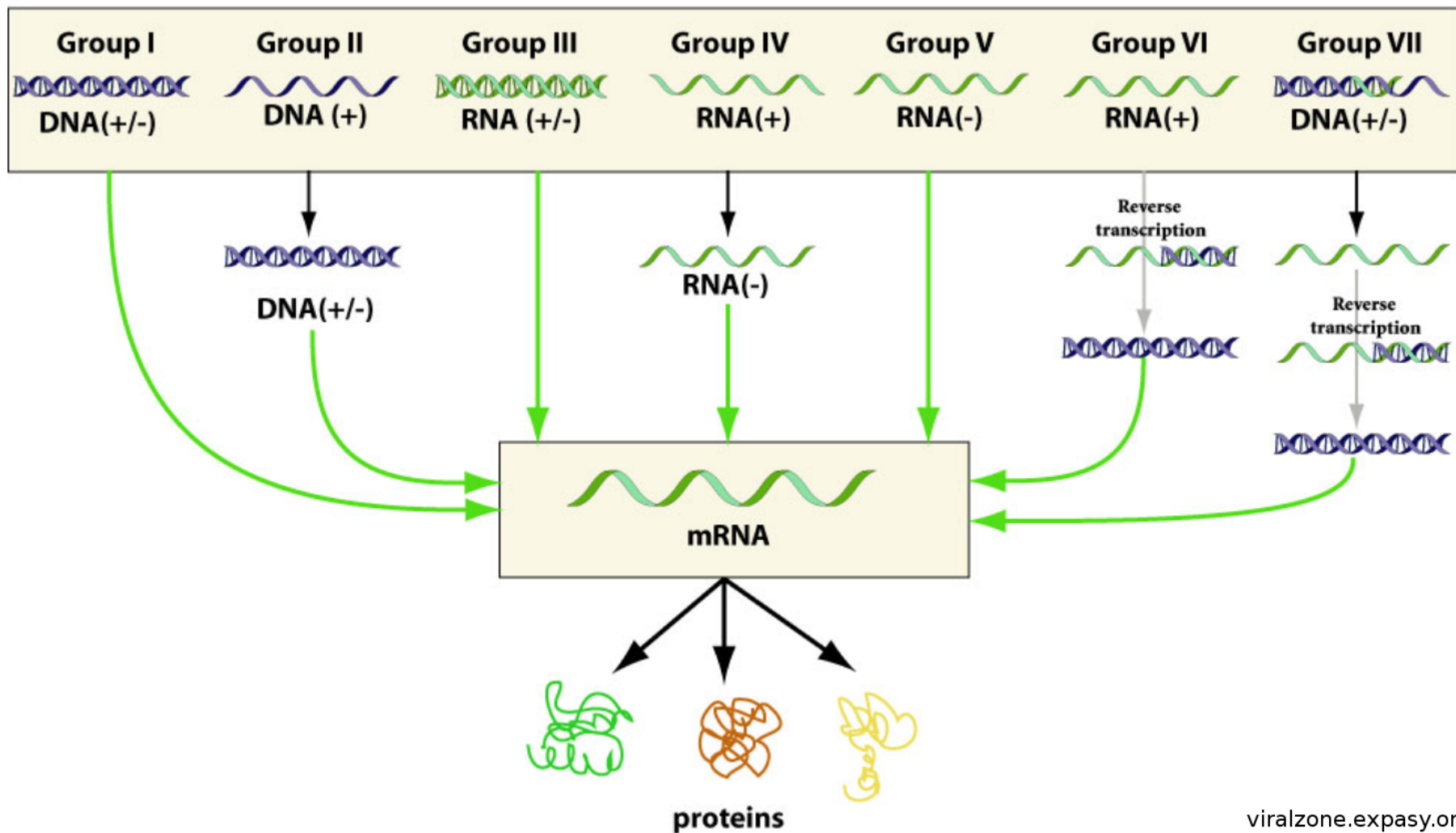
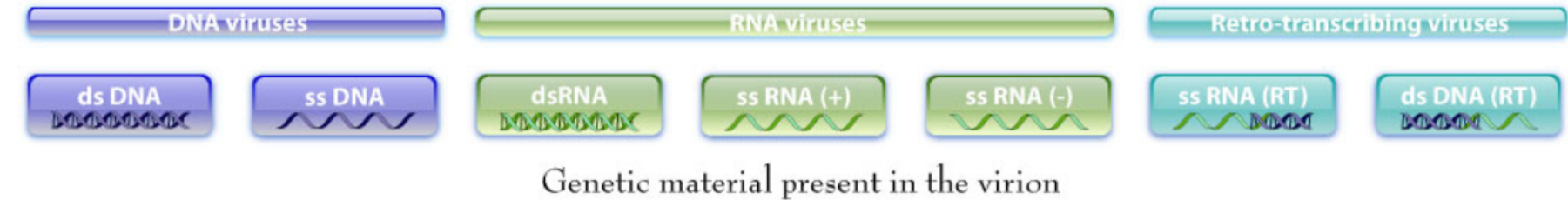
- **společné znaky** s živými organizmy:
    - schopnost **rozmnožování** (de novo)
    - přítomnost **genomu**
    - **variabilita** (proměnlivost, mutace)
    - **adaptace** (změna spektra hostitelů)
    - **vývoj** (evoluce)
  - **odlišné znaky** od živých organizmů:
    - charakter genetického materiálu (**RNA genomy**)
    - specifický druh **parazitizmu** (na genetické úrovni)
    - **nepřítomnost proteosyntetického aparátu**
- => nebuněčná forma života**



# Viry

- původ není jasný, zdá se, že nemají společného předka
- **rozdělení:**
  - **DNA** viry, **RNA** viry
  - jednovláknové (**ss = single stranded**),  
dvouvláknové (**ds = double stranded**)
    - **+ssRNA** – slouží jako mRNA
    - **-ssRNA** – RNA komplementární k mRNA, před translací musí být nejdříve přepsána do +ssRNA
  - **přítomnost reverzní transkriptázy**
  - **obal** (obalené, neobalené)

# Baltimoreva klasifikace virů



# Struktura virů

- **virion** = diskrétní virová částice
  - intaktní virová částice = komplex virové NK a proteinů (popř. i obalu) schopný infikovat buňku
- **kapsid(a)** = plášť viru tvořený bílkovinami (chrání a stabilizují NK); určuje symetrii/tvar
- **kapsomera** = morfologická jednotka sdružující strukturální podjednotky a tvořící kapsidu
- **nukleokapsid(a)** = strukturní útvar tvořený virovou NK a bílkovinným obalem
  - přítomná u většiny virů (bez ohledu na obal)
- proteinové podjednotky se k sobě spojují **autoagregací** (energeticky výhodný proces; bez dodání energie)

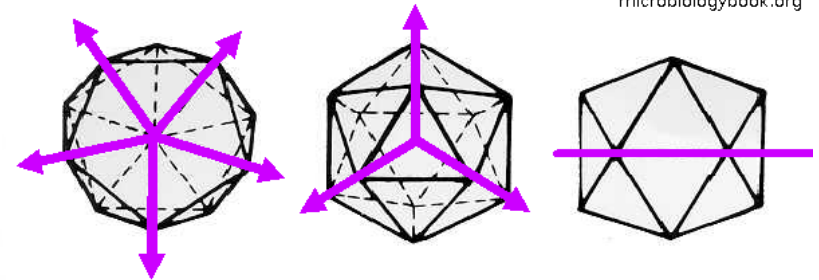
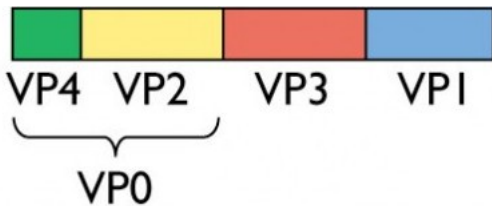
# Struktura virů (2)

- **vnější obal** (envelope) = **lipidová dvojvrstva** s transmembránovými **glykoproteiny**
  - glykoproteiny tvoří výběžky (peplomery, spikes) na povrchu viru
  - pro přichycení viru k hostitelské buňce
  - tvořena **komponenty z hostitelské buňky** (původně část cytoplazmatické nebo jaderné membrány, endoplazmatického retikula nebo Golgiho aparátu)
  - obalené viry **méně mechanicky odolné** (citlivější k vyschnutí, teplu nebo detergentům)
  - výhodou je **adaptabilita obalu** → únik před imunitním systémem hostitele

# Symetrie kapsid

- ikosahedrání** (kubická) = dvacetistěn se třemi osami symetrie (2-, 3-, 5-četnou)

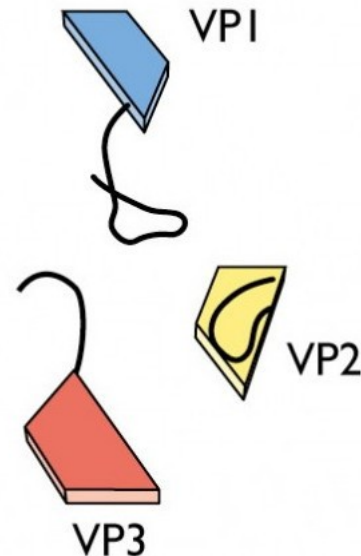
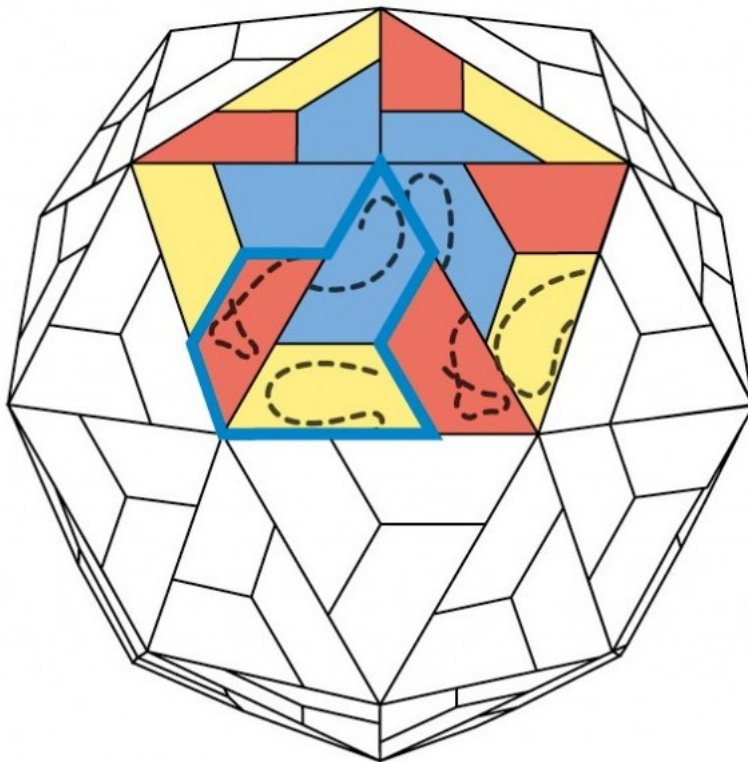
microbiologybook.org



**5-FOLD**

**3-FOLD**

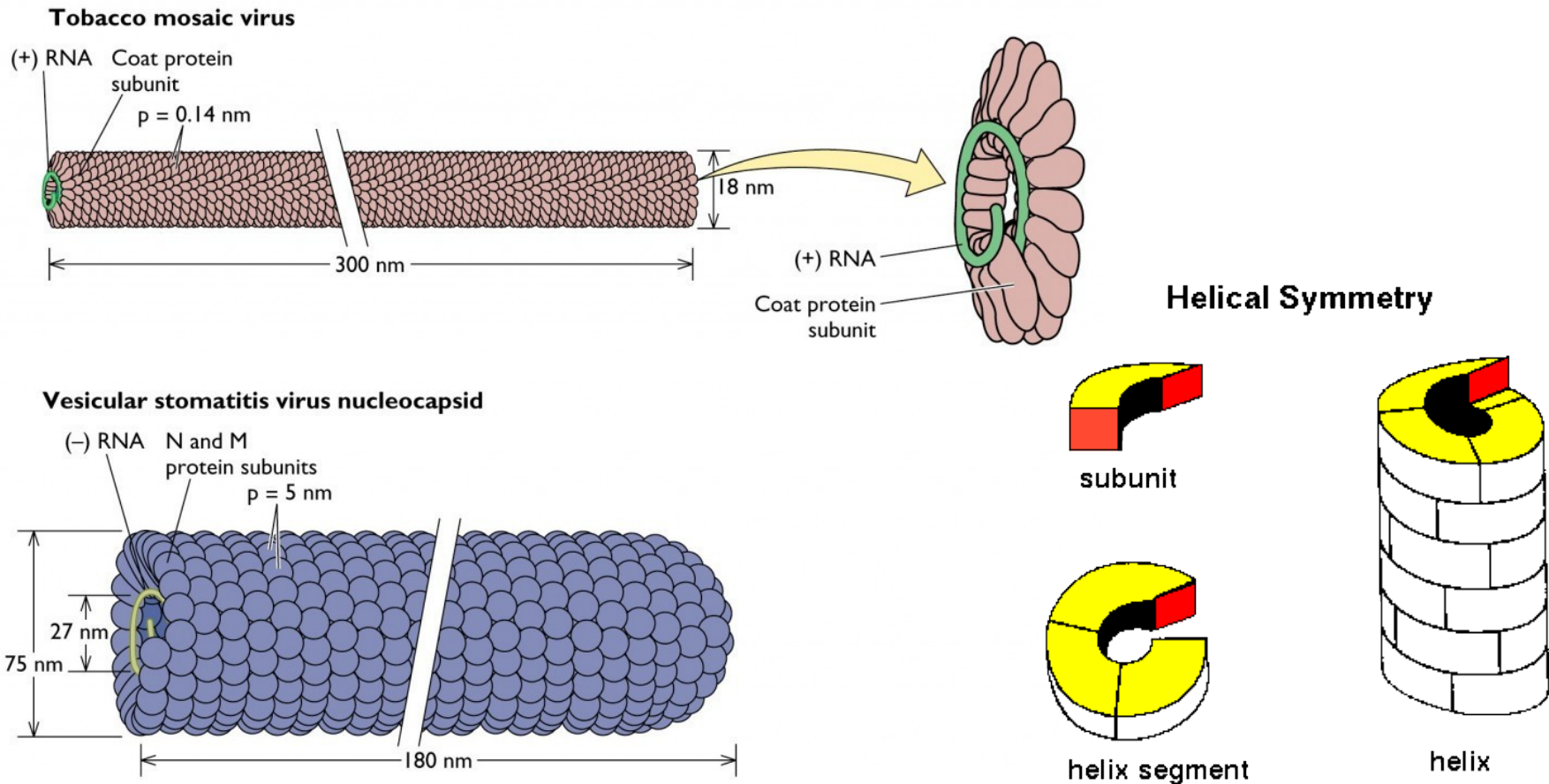
**2-FOLD**



en.wikipedia.org

# Symetrie kapsid (2)

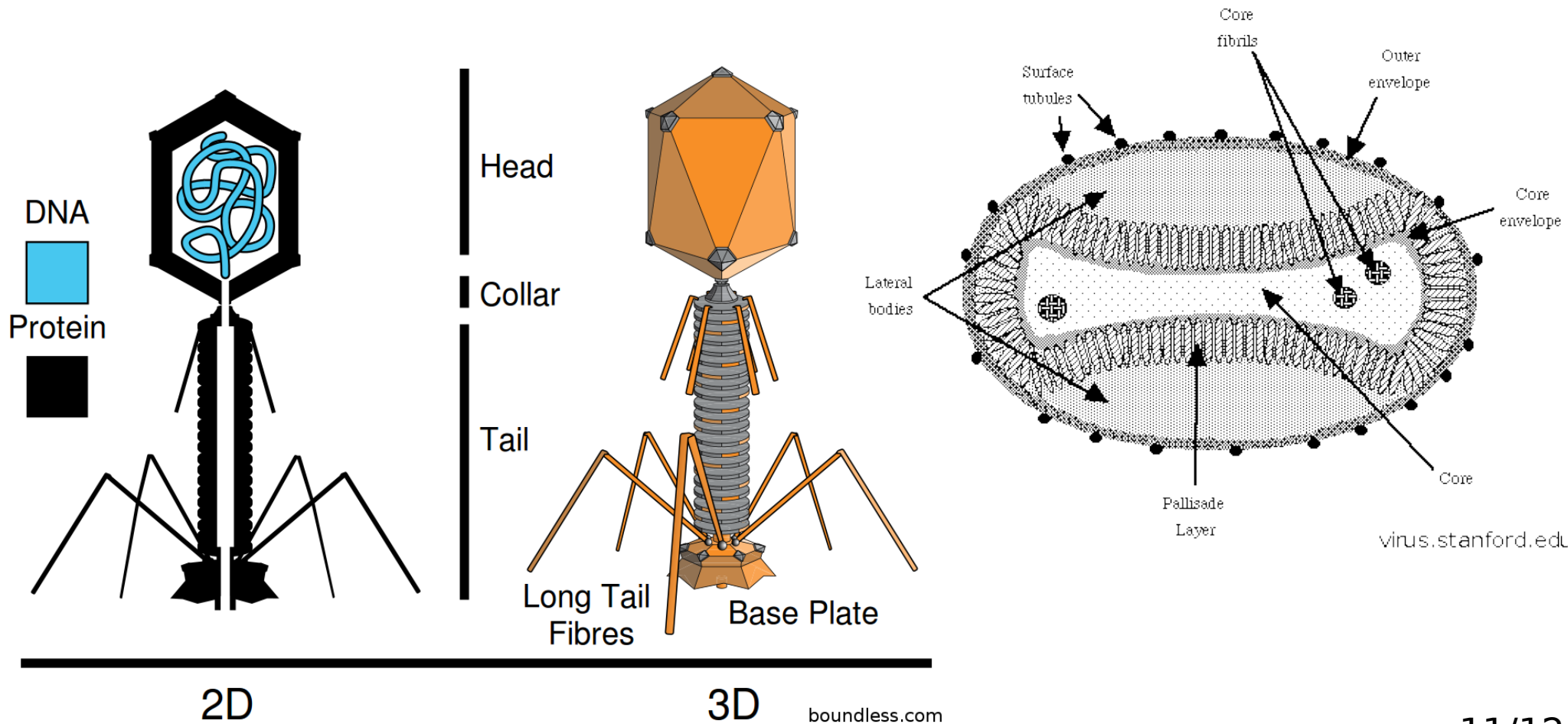
- **helikální** (šroubovicová) = jednotlivé polypeptidy (protomery) se řadí za sebou a jako šroubovice sledují vlákno genomu





# Symetrie kapsid (3)

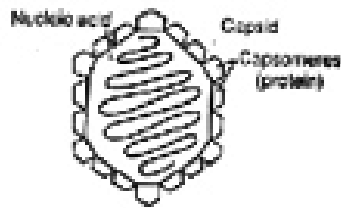
- **komplexní** = uspořádání kapsomer neumožňuje jednoznačné zařazení do předchozích skupin



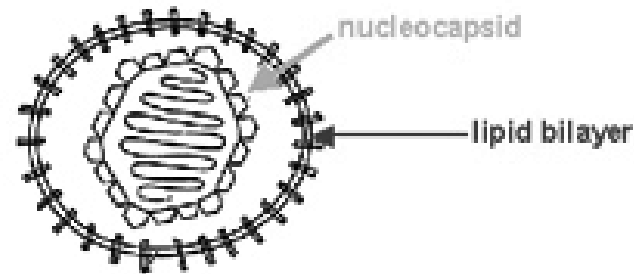
# Symetrie kapsid (4)

- symetrie nukleokapsidů pod vnějším obalem

Icosahedral nucleocapsid

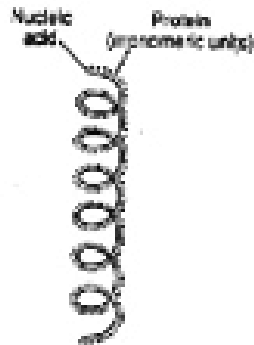


ICOSAHEDRAL

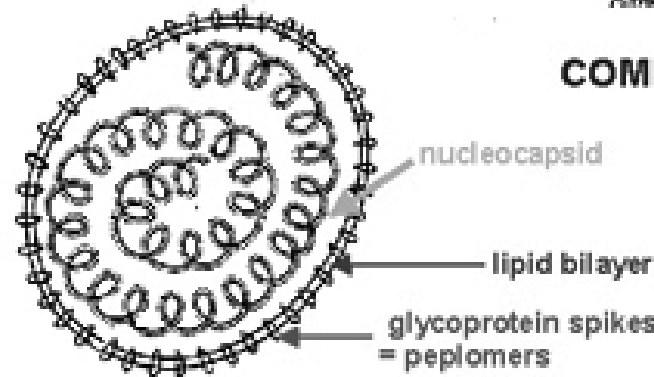


ENVELOPED ICOSAHEDRAL

helical nucleocapsid



HELICAL



ENVELOPED HELICAL



COMPLEX

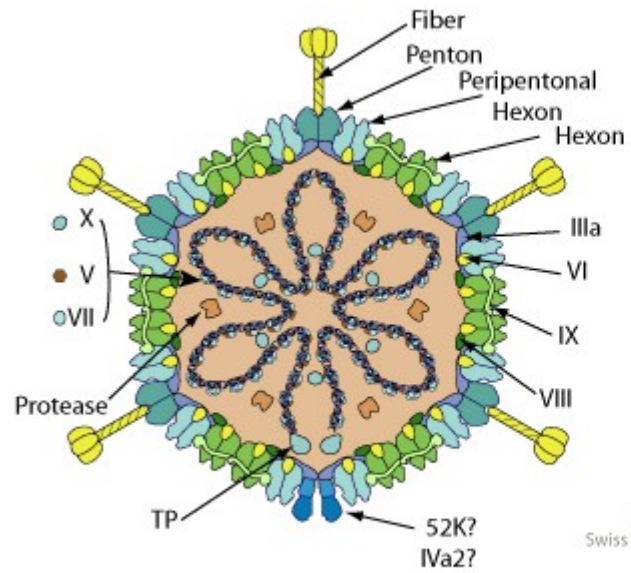
nptel.ac.in



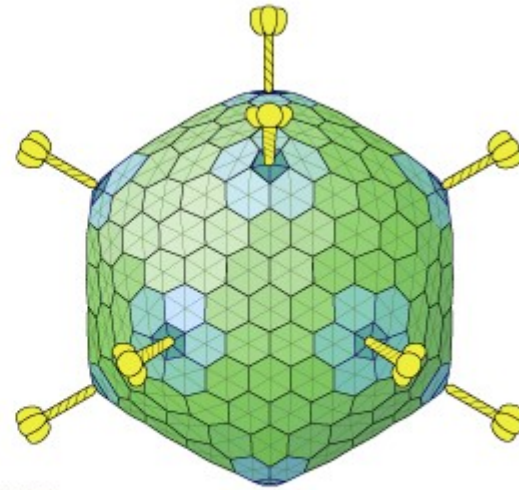
# Adenoviry

- **neobalené dsDNA viry**, ikosahedrální symetrie, středně velké (90 nm)
- původně izolované z adenoidní vegetace (nosní mandle)
- přes 50 serotypů patogenních pro člověka
  - **respirační onemocnění** (rýmy, tonsilitidy, faryngitidy; ojediněle až fatální pneumonie – Ad 14)
  - **konjunktivitidy** (faryngokonjunktivální horečka – Ad 3, 4, 7; keratokonjunktivitidy – Ad 8, 19)
  - **gastroenteritidy** (Ad 40, 41)
  - akutní **hemoragická cystitida** (nefritida) (Ad 11, 21)
- pouze **symptomatická léčba**

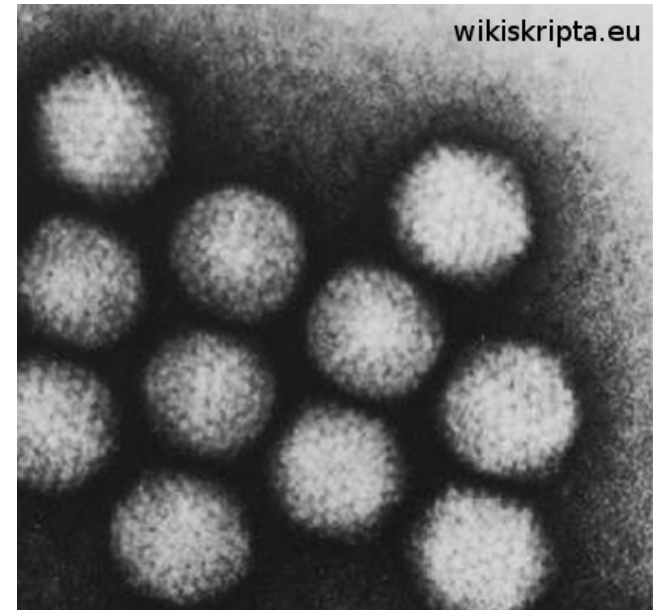
# Adenoviry (2)



© ViralZone 2015  
Swiss Institute of Bioinformatics

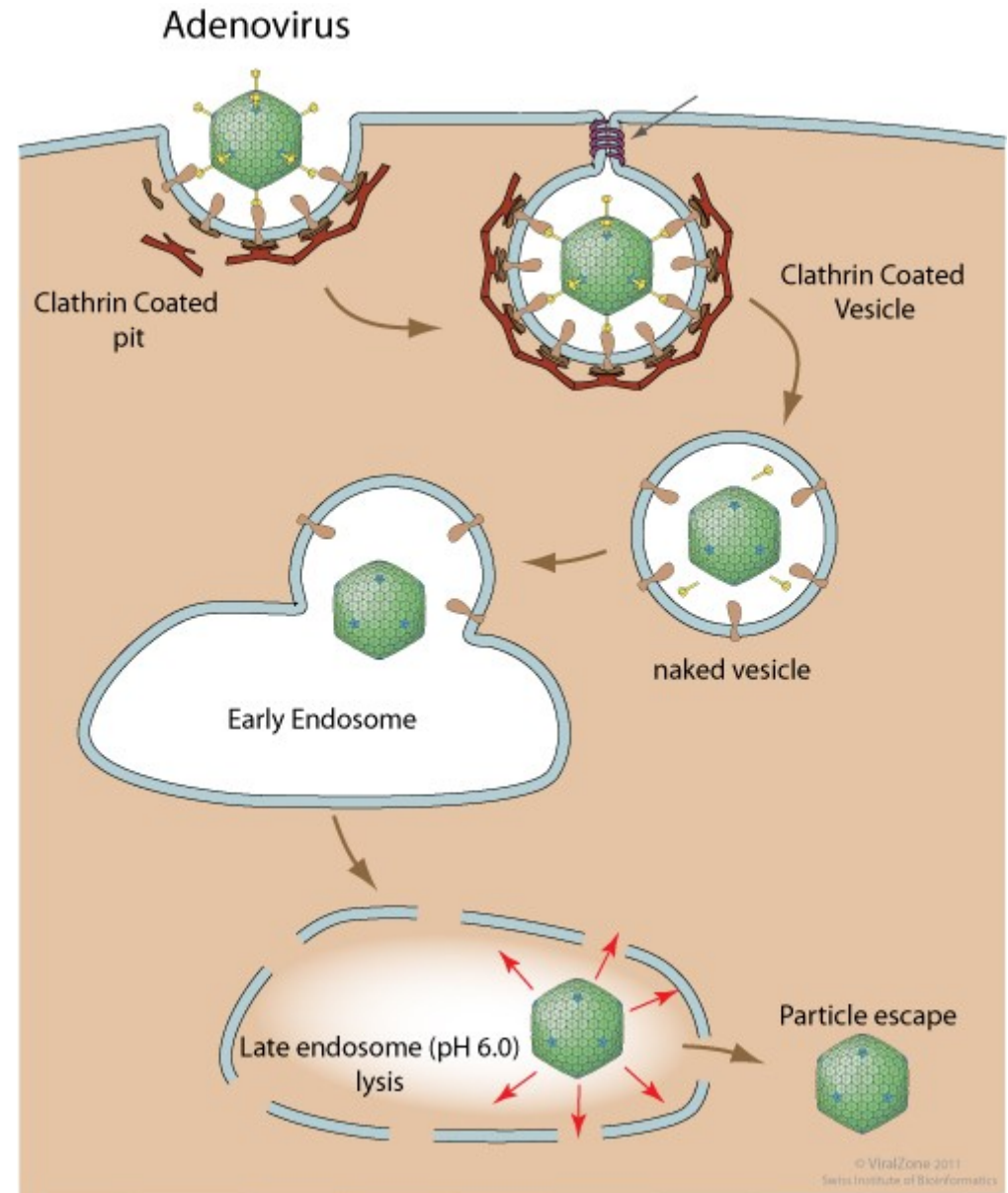


T=25



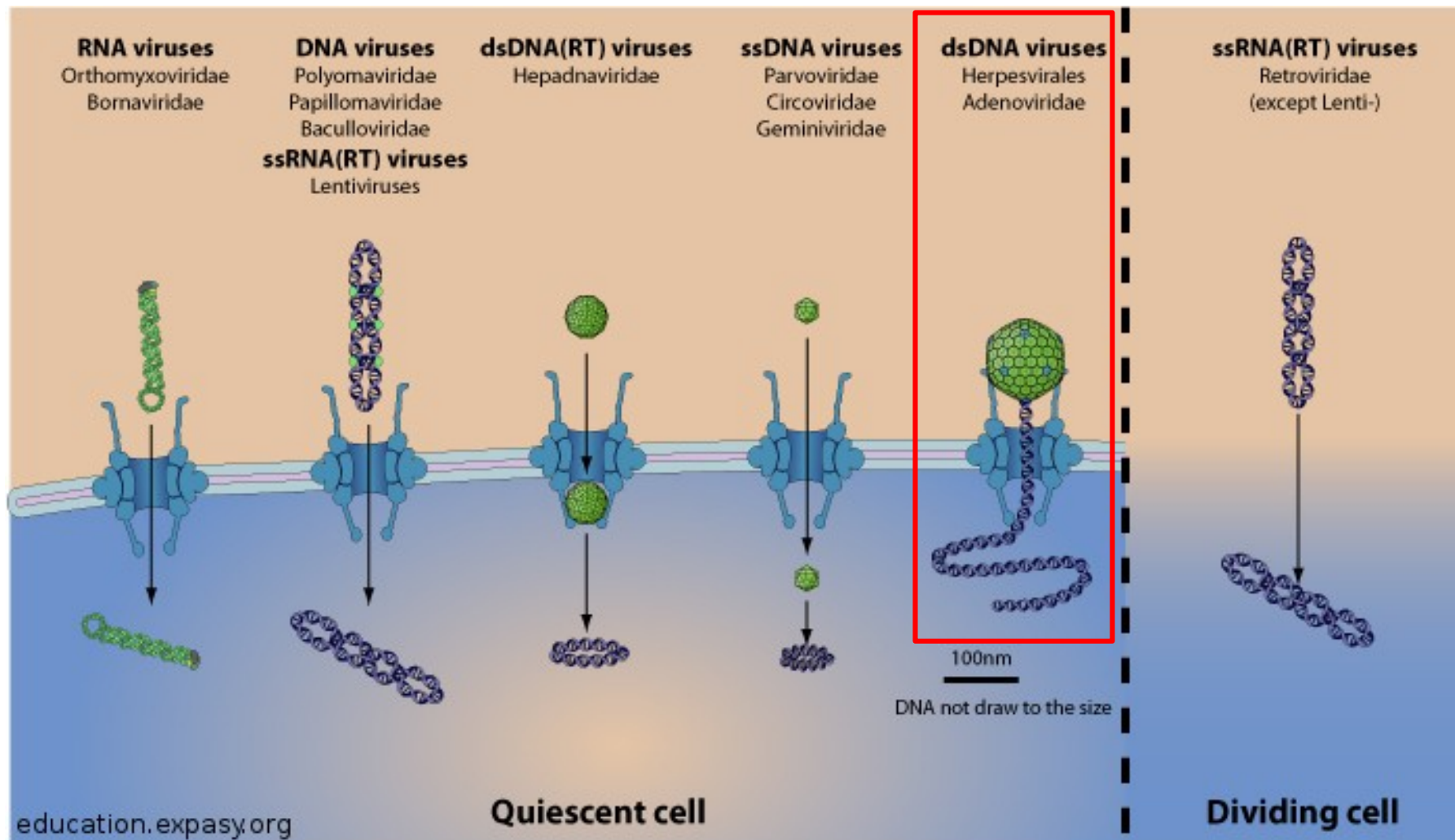
# Adenoviry (3)

- **přichycení** viru glykoproteiny
- **endocytóza**
- **rozrušení endosomu** lytickými enzymy po snížení pH
- **uvolnění virionu** do cytoplasmy
- **transport k jádru** (mikrotubuly)



# Adenoviry (4)

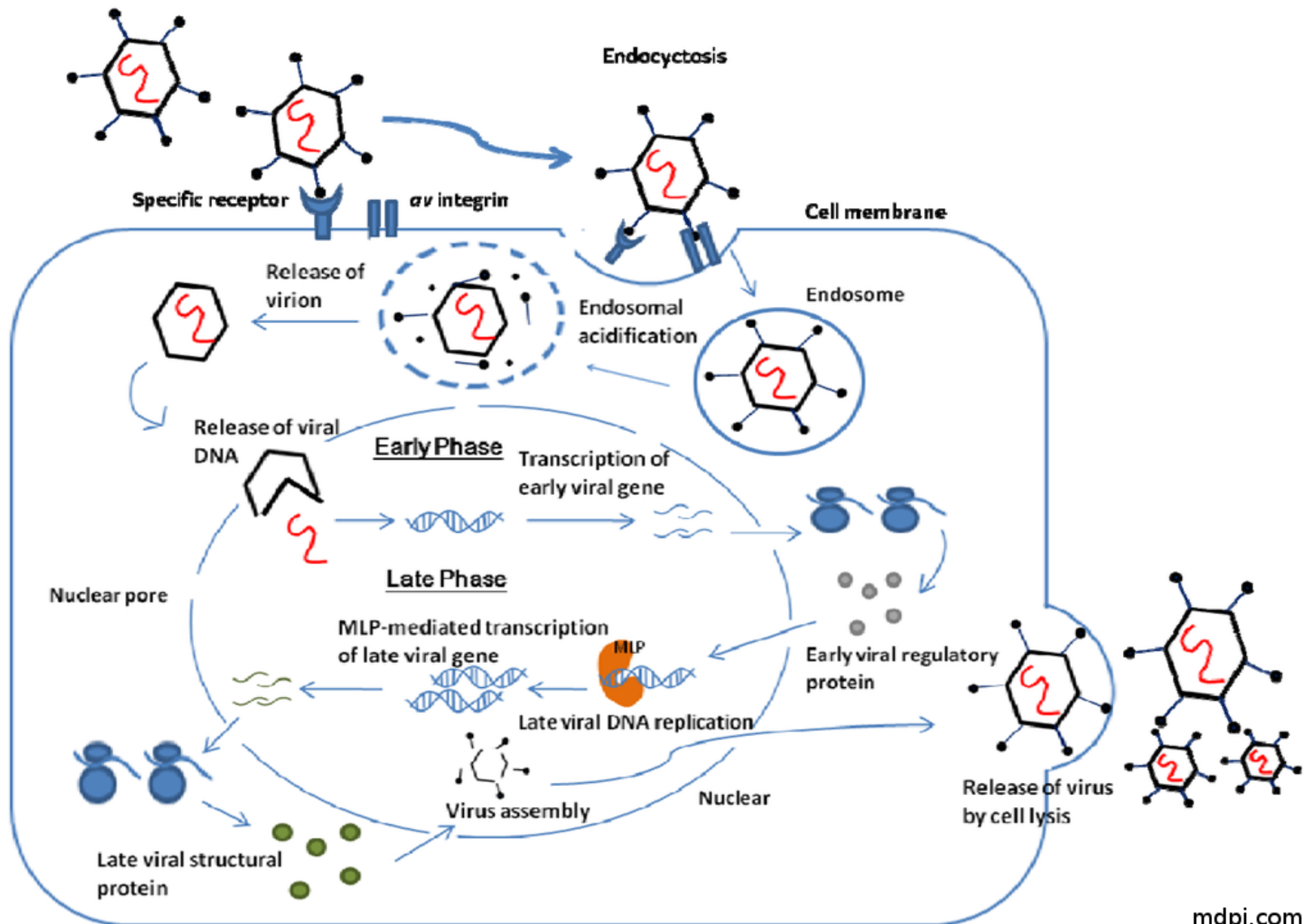
- přenos NK do jádra



# Adenoviry (5)

- **DNA v jádře:**
  - **exprese časných genů (regulační proteiny):**
    - exprese proteinů nutných k replikaci DNA
    - aktivace dalších virových genů
    - zamezit IS zničit virus/napadenou buňku (blokování apoptózy, interferonu a exprese a transportu MHC I)
  - **replikace DNA** (DNA viry často využívají DNA polymerázu hostitele, ale adenoviry mají vlastní)
  - **exprese pozdních genů (strukturní proteiny)**
- **sestavení nových virionů, maturace**
- **opuštění buňky** (lyze buňky)

# Adenovirus (6)

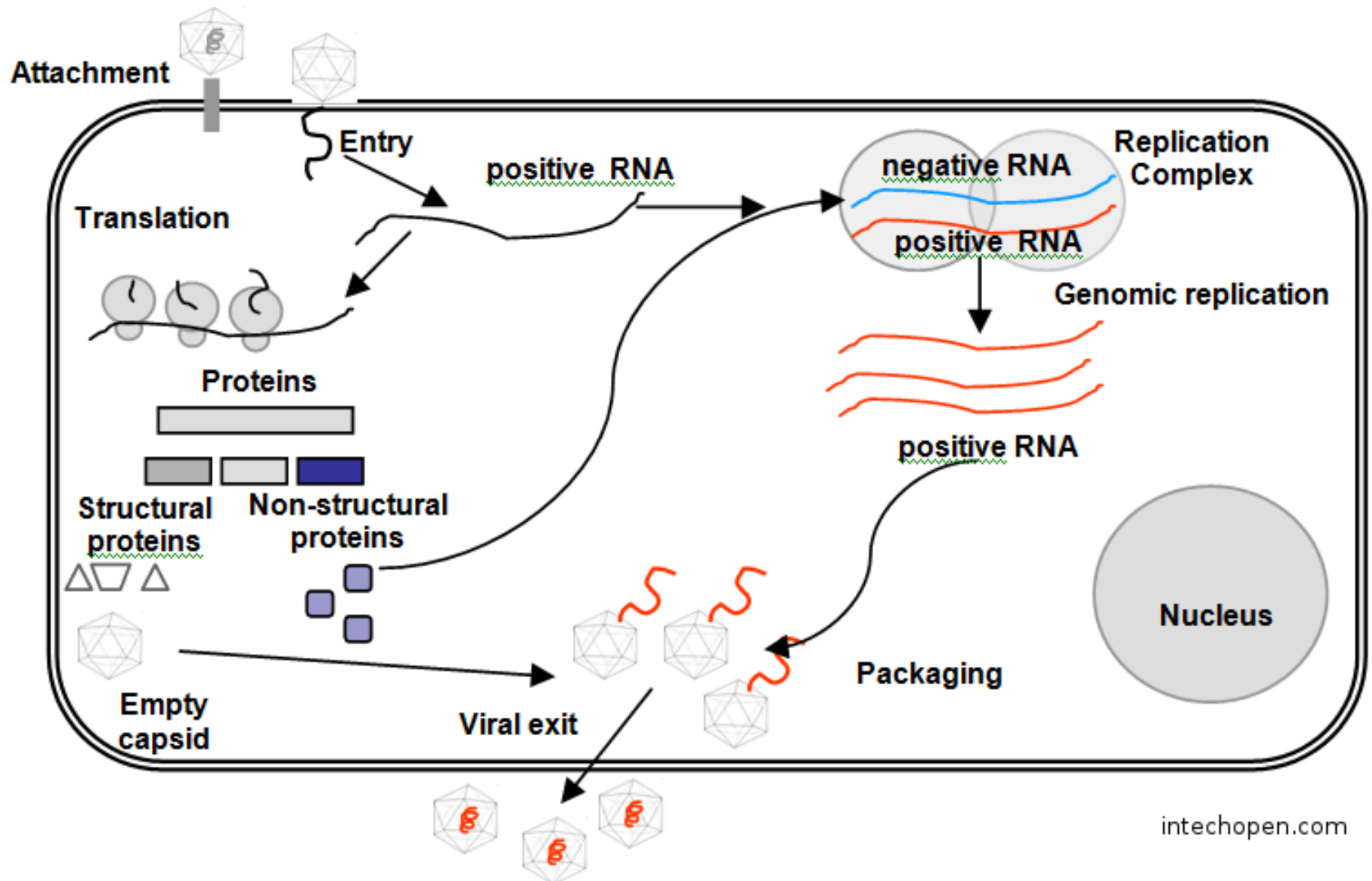




# Čeľed' *Picornaviridae*

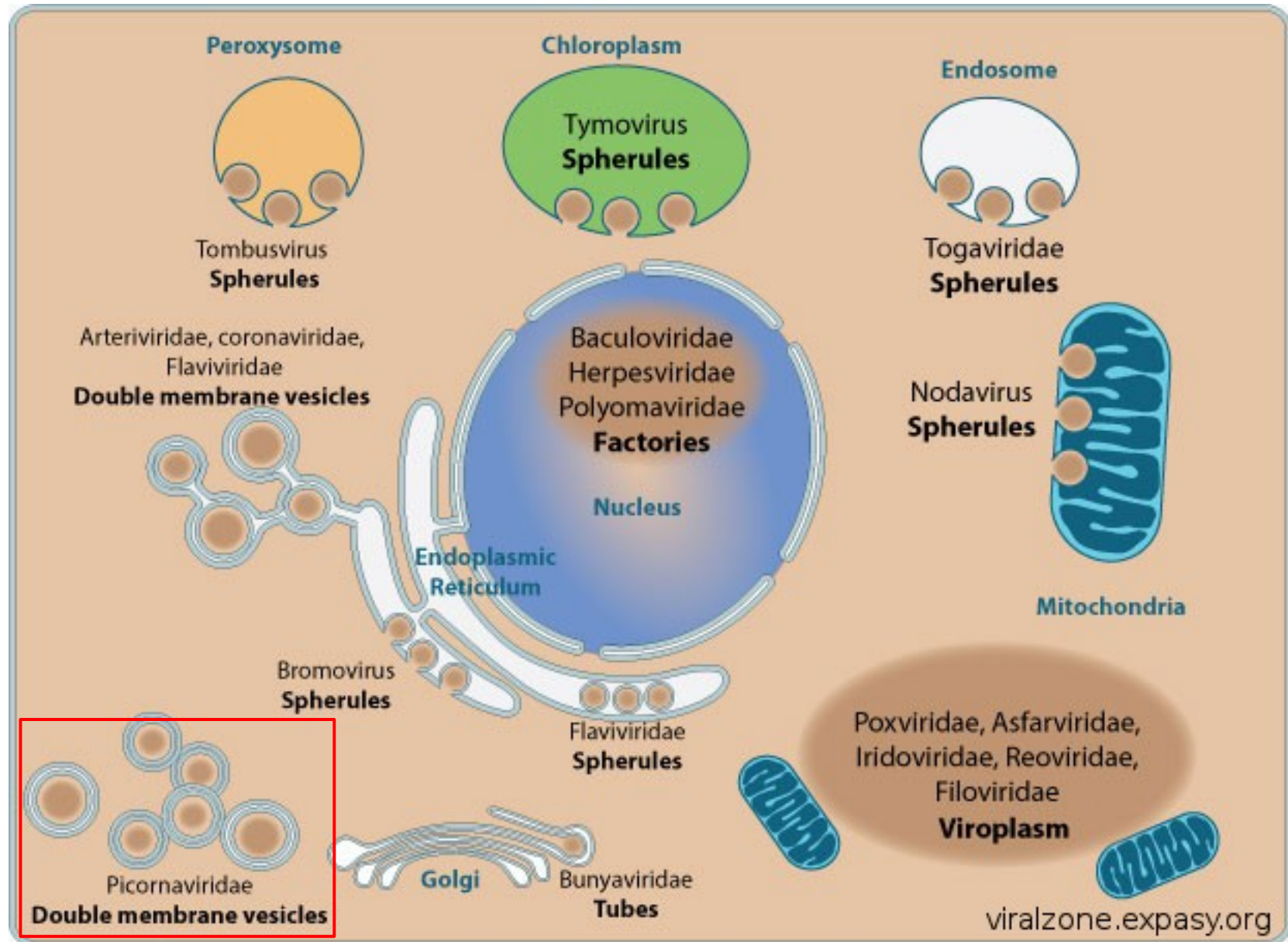
- **neobalené +ssRNA viry**, malé (30 nm), ikosahedrálne, odolné
- **rod *Enterovirus*** (poliovirus, rinoviry, coxsackie viry, echoviry)
- **rod *Hepatovirus*** (virus hepatitidy A)
- **replikace**: adsorpce → endocytóza → translace do polyproteinu → replikace ve viral factories → sestavení prokapsidu → maturace (neznámá proteáza) → lyze buňky
- **viral factories** (intracelulárne kompartmenty rôzneho pôvodu; zvyšujú efektivitu virové replikace a sestavení virionů; ochrana před obrannými mechanizmami hostitele)

# Čeled' *Picornaviridae* (2)





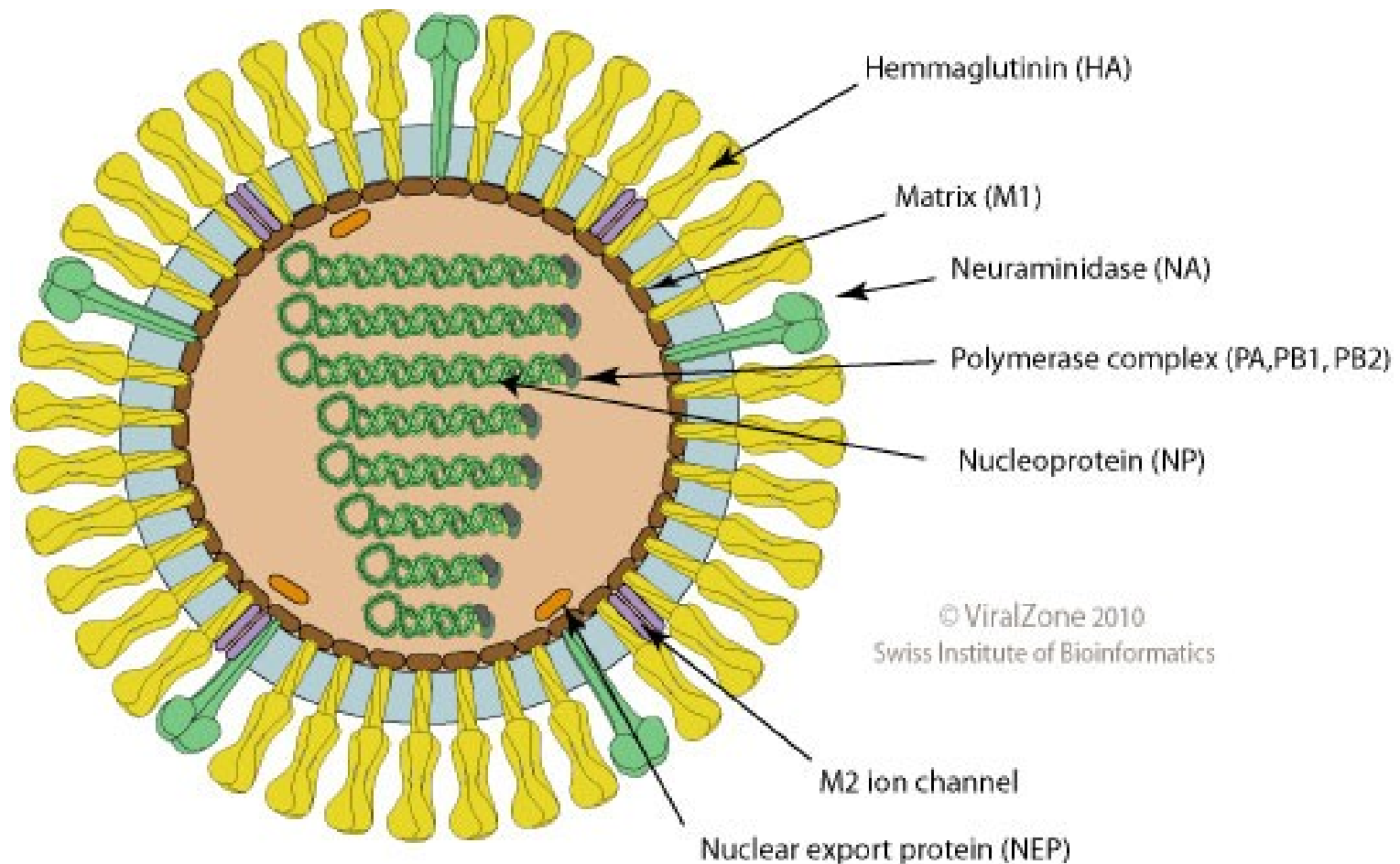
# Viral factories



# Viry chřipky

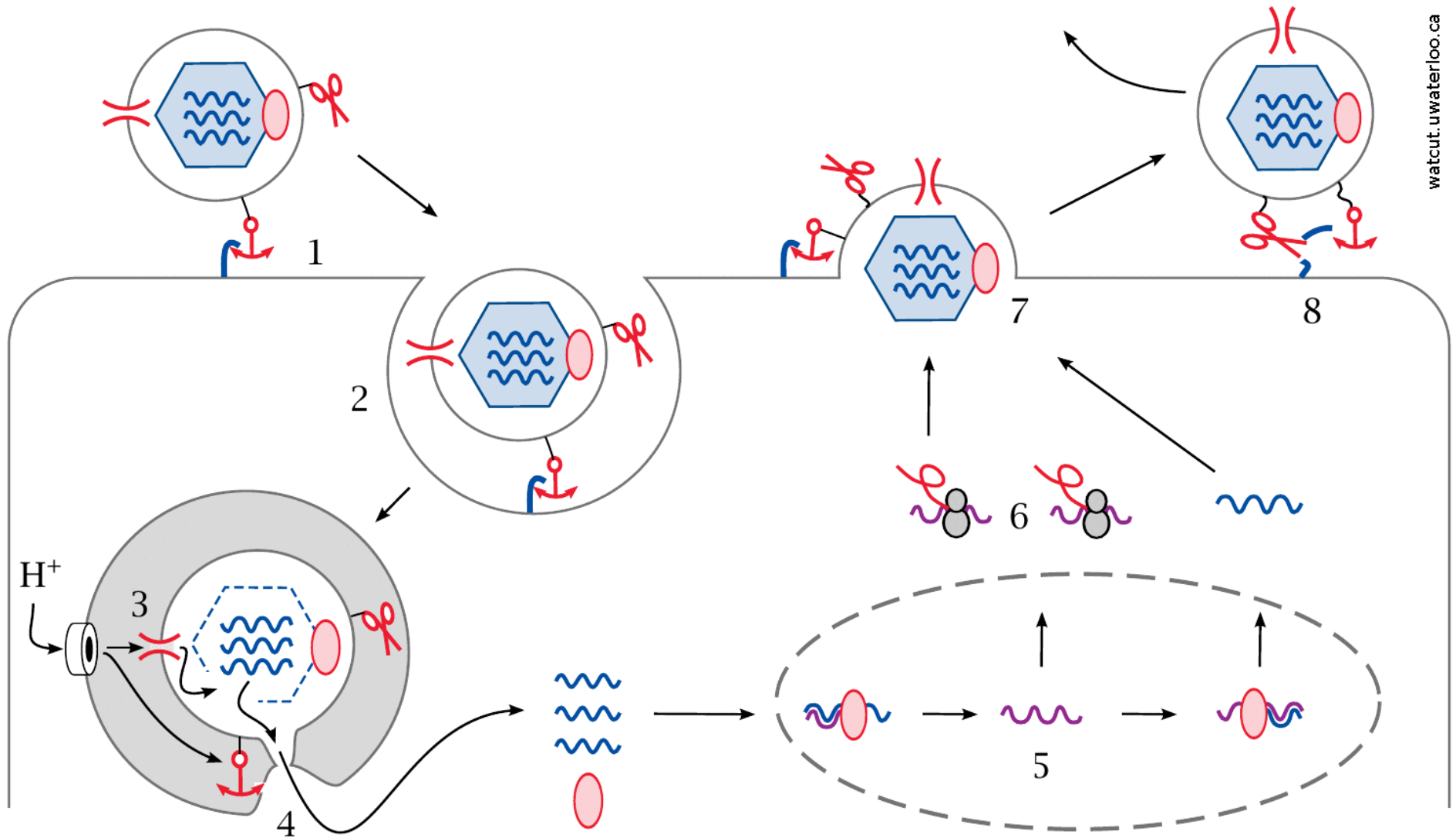
- **obalené -ssRNA viry**, 80 – 120 nm, kulaté, oválné, někdy i protáhlé, **segmentovaný genom** (8 segmentů)
- replikace v jádře (u RNA virů výjimka)
- **hemagglutiny**
  - membránové proteiny, hlavní povrchový **antigen H**
  - **přichycení k povrchu buňky** – receptor kys. sialová
  - **fúze virového obalu a endosomu**)
- **neuraminidáza (N)** – štěpení kys. sialové
  - umožní **pronikání viru přes hlen** na sliznicích
  - **uvolnění virionů** z buňky a zabránění jejich agregaci

# Viry chřipky (2)



- <https://www.youtube.com/watch?v=YSgkoldBNkl>

# Viry chřipky (3)



watcut.uwaterloo.ca

 Hemagglutinin     M<sub>2</sub> protein     RNA polymerase     Neuraminidase

# Chřipka

- příznaky: **horečka** (zimnice a třesavka), silné bolesti hlavy, **artralgie**, **myalgie**, nevolnost až zvracení, **suchý dráždivý kašel**
- **nebezpečná u lidí se sníženou imunitou, těhotných a starších osob**
- **některé subtypy** vyvolávají u mladých lidí s dobrou imunitou tzv. **cytokinové bouře (neadekvátní reakce IS) - pandemie španělské chřipky (H1N1, 1918), prasečí (mexické) chřipky (H1N1, 2009)**
- **virus chřipky A** (nejčastější a nejzávažnější)
- **virus chřipky B** (sezónní, možné i střevní příznaky)
- virus chřipky C (mírný průběh, hlavně děti)

# Chřipka (2)

- **léčba:**
  - **symptomatická** (analgetika, antipyretika, antitusika, expektorancia, nazální dekongescencia)
  - **specifická terapie - antivirotika**
- **antivirotika:**
  - **amantadin, rimantadin** (inhibitory M2-proteinu)
  - modernější **zanamivir** (Relenza; inhal.) a **oseltamivir** (Tamiflu) (inhibitory neuraminidázy)
- **prevence:**
  - **vakcína** 2 subtypů chřipky A a dvou chřipky B
  - v ČR nejvhodnější dobou pro očkování období od října do prosince

# Chřipka (3)

- **evoluční vývoj:**
  - antigenní **drift:**
    - **malé změny** hemagglutininu a neuraminidázy způsobené náhodnými mutacemi
    - infekce (epidemie) přichází v době, kdy je virus dostatečně odlišný a IS ho nerozezná od předchozí prodělané infekce
  - antigenní **shift:**
    - **reasortace segmentů genomu** mezi různými kmeny viru (nejčastěji **ptačí, prasečí a lidské kmeny**)
    - **rychlé získání odlišných antigenů**, vyvolává **pandemie**

# Chřipka (4)

- **pandemie:**
  - jen **chřipka A** (u ostatních je prakticky nemožné, aby nastal antigenní shift)
  - **H1N1, španělská chřipka (1918), prasečí (mexická) chřipka (2009)**
  - H2N2, asijská chřipka (1957)
  - H3N2, hongkongská chřipka (1968)
  - H5N1, ptačí chřipka (2003, nejvíce od 2005)
- samotné subtypy H a N neříkají nic o nakažlivosti a virulenci, záleží na konkrétní struktuře viru
- **viry nebezpečné až po vhodné rekombinaci** různých částí různých virů



# Viry parachřipky

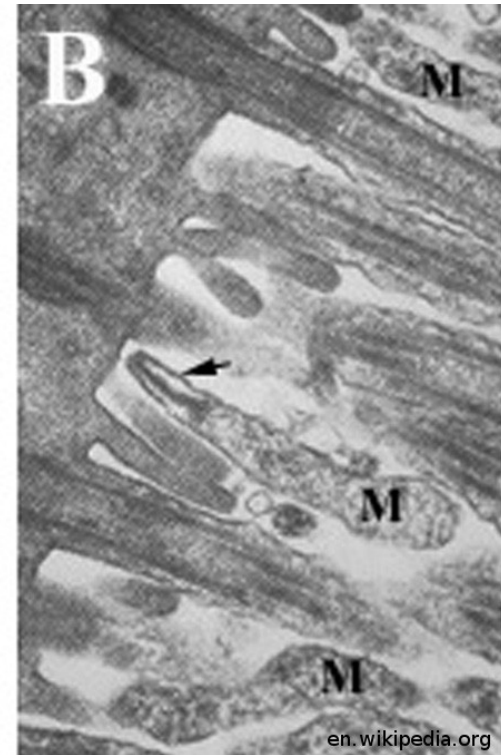
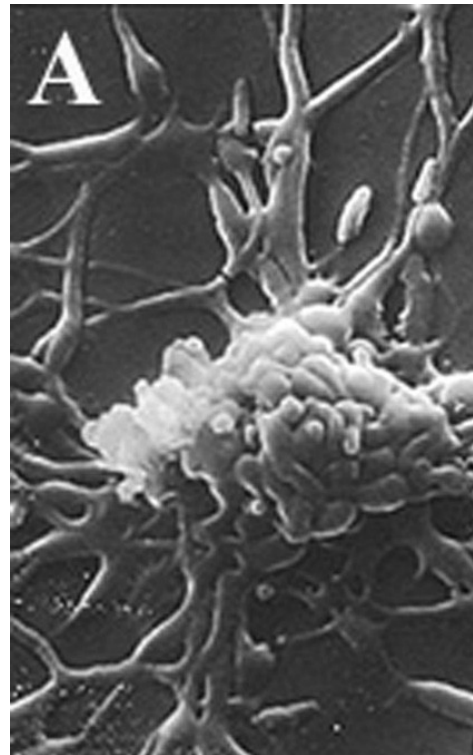
- **obalené -ssRNA viry**, větší (150 nm), 4 typy
- příbuzné virům příušnic a spalniček
- postihuje **zejména malé děti**
- **horečnaté infekce HCD** (kašel, často katar), může přejít i na DCD vč. zánětu plic
- **diagnostika**: KFR, HIT, ELISA (časté **zkřížené reakce**)

# RS virus

- **respirační syncyziální virus** (rod *Pneumovirus*)
- **obalené -ssRNA viry**
- příbuzné virům parachřipek
- postihuje **zejména kojence a malé děti**
- **jedna z nejčastějších příčin hospitalizace dětí**
- bronchitidy, **bronchiolitidy**, zánět plic
- **diagnostika**: ELISA, buněčné kultury
- při replikaci viru vznikají mnohojaderná syncytia
- **metapneumovirus** (napadá starší děti; mírnější příznaky onemocnění)

# Mykoplasmata

- **bakterie**, nejmenší a nejjednodušší prokaryota, která nepotřebují cizí buňku
- **nemají buněčnou stěnu** (→ nepůsobí  $\beta$ -laktamová ATB), mají trojvrstevnou plazmatickou membránu (tvar pleomorfní)
- rody ***Mycoplasma*** a ***Ureaplasma***



# *Mycoplasma pneumoniae*

- původcem tzv. **atypických pneumonií**
- často jen jako rýma nebo bez příznaků
- mohou nastat i mimoplicní komplikace (srdeční, nervové a jiné)
- ATB při těžších formách infekce
- citlivé na **tetracykliny, makrolidy** (u dětí),
- ATB bakterii neusmrcují, pouze zastavují její množení (působení na proteosyntézu)
- **diagnostika: KFR, ELISA** (v rámci serologie respiračních virů)

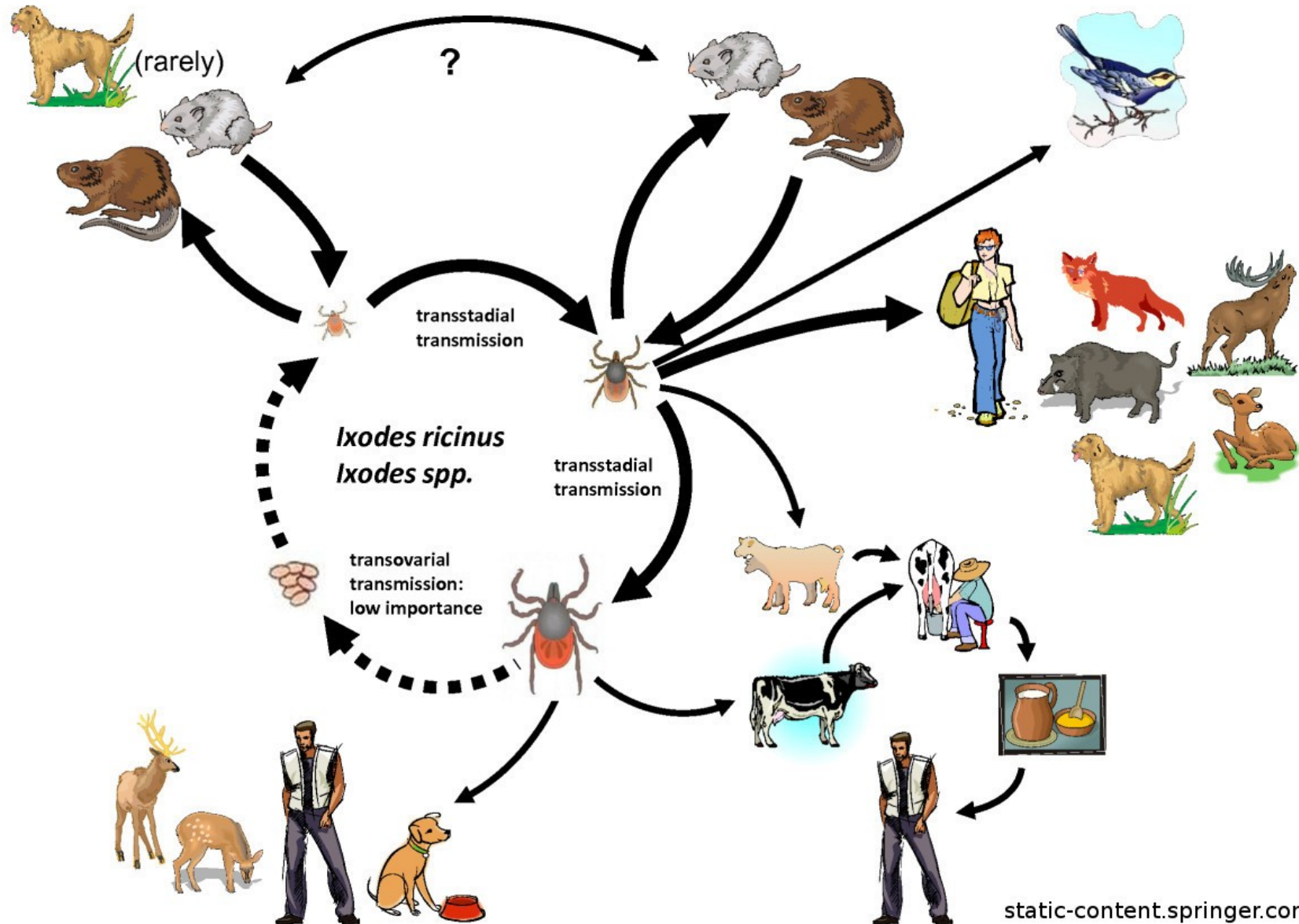
# Další mykoplasmata

- ***Mycoplasma hominis***
  - běžně nacházený patogen převážně v **urogenitálním systému** u žen a sexuálně aktivních mužů
  - **záněty** pochvy, močové trubice, apod., které mohou vyústit v hluboký pánevní zánět
- ***Mycoplasma genitalium***
  - negonokoková **uretritida** (muži), **cervicitida** (ženy), hluboký pánevní zánět
- ***Ureaplasma urealyticum***
  - **záněty** pochvy, močové trubice

# Virus klíšťové encefalitidy

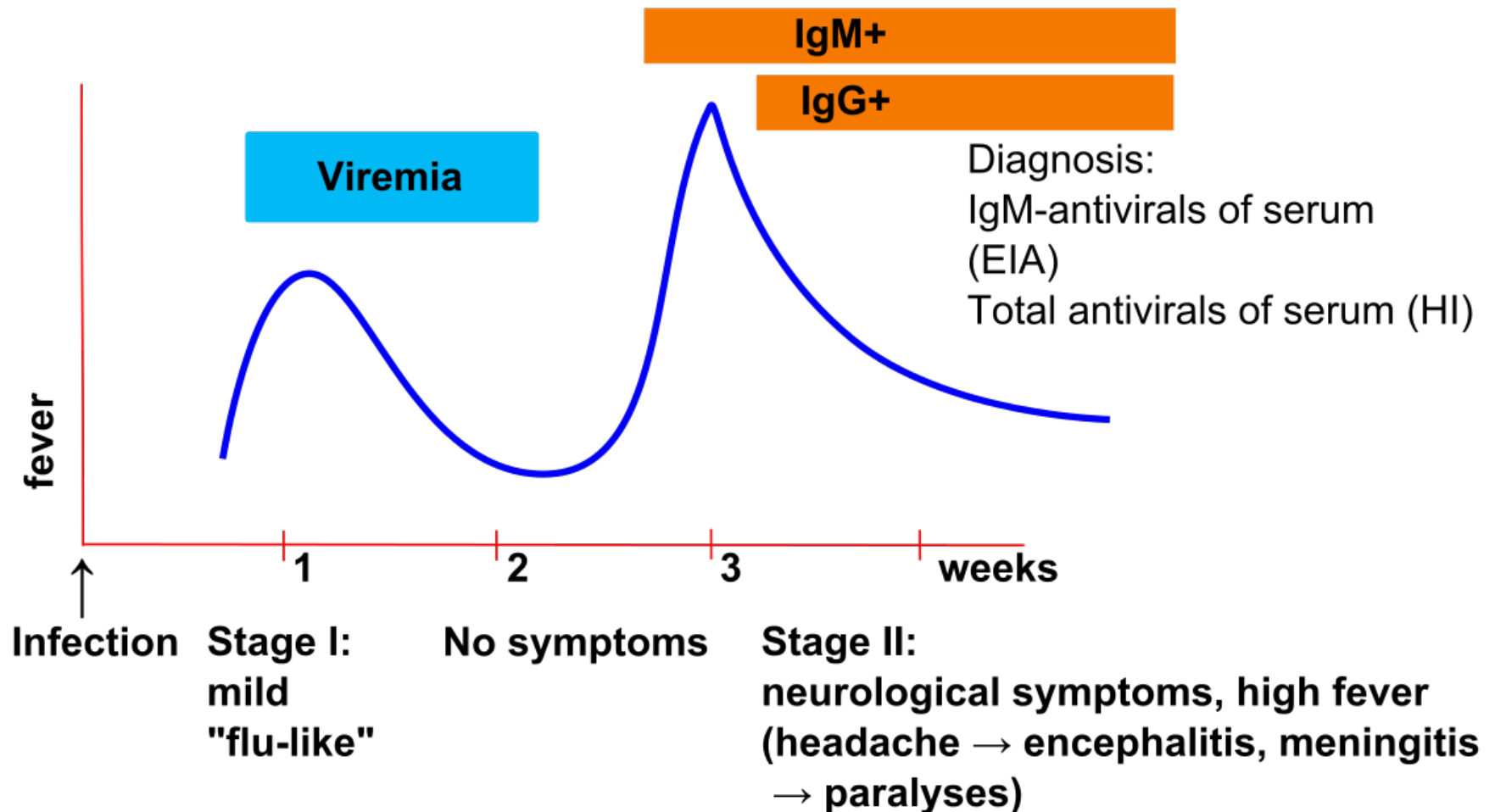
- **obalený +ssRNA** virus, 50 nm, čeleď ***Flaviviridae***
- **klíšťová encefalitida:**
  - **nejdříve mírné „chřipkovité“ příznaky**
  - **encefalitida**, meningitida, meningoencefalitida
  - letalita 1 – 5 %
  - **arbovirus (arthropod-borne virus) – viry přenášené členovci**
  - **zdrojem lesní savci (hlodavci)**
  - **diagnostika: KFR, HIT, ELISA, PCR**, izolace na sajících myšatech

# Virus klíšťové encefalitidy (2)



# Virus klíšťové encefalitidy (3)

- symptomy a diagnostika





# Čeľad: *Togaviridae*

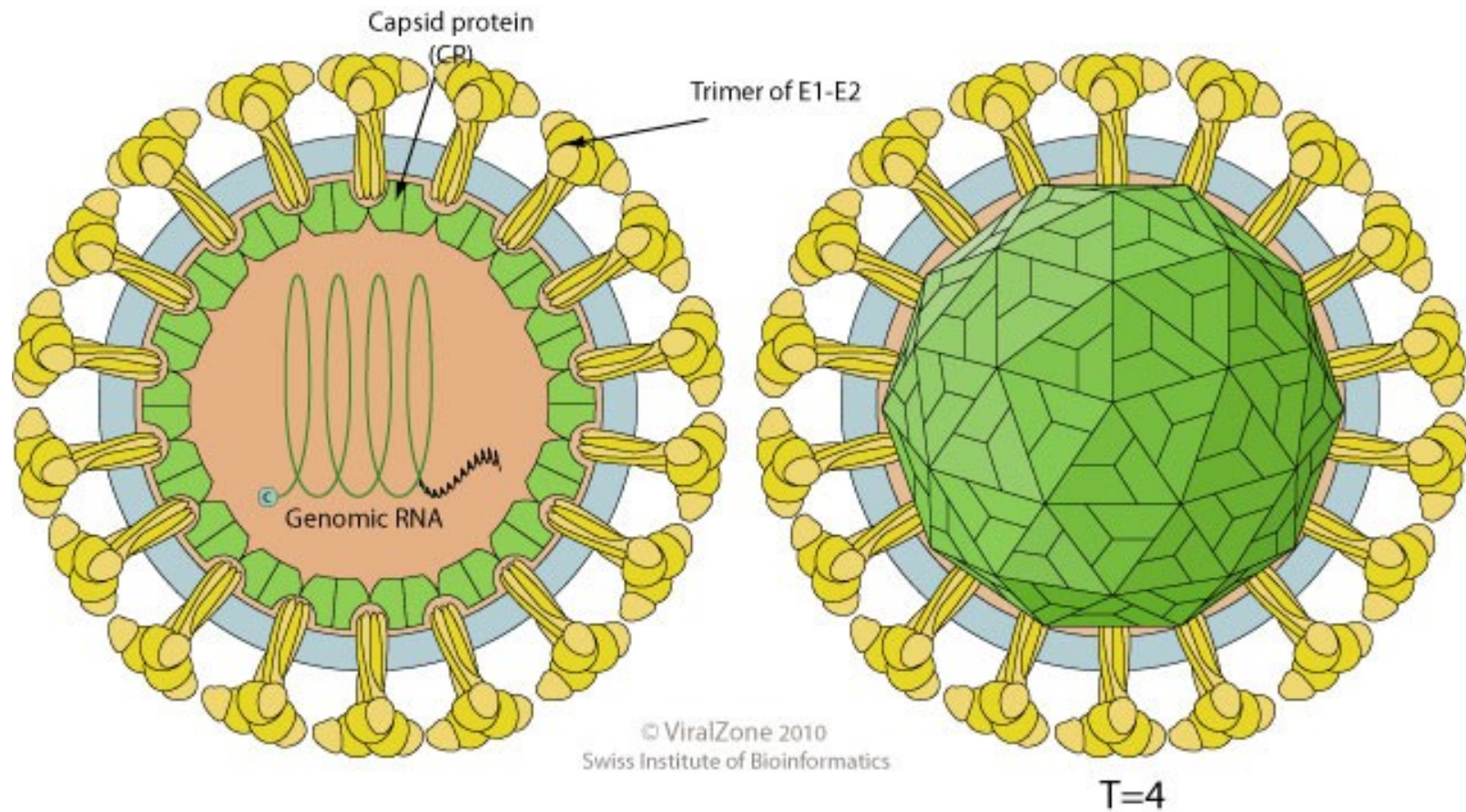
- **obalené +ssRNA viry**, ikosahedrání symetrie, 65-70 nm
- **rod *Rubivirus* – virus rubeoly** (zarděnyky)
- **rod *Alphavirus* – arboviry (arthropode born)**
  - **viry koňské encefalitidy** (EEE, WEE, VEE)
  - **viry horeček Chikungunya a O'nyong nyong**

# Virus rubeoly (zarděnky)

- lat. rubeo = zardívám se, angl. rubella
- **čistě lidský virus**
- **benigní dětské onemocnění**
- **přenos vzduchem**, inkubace 16–18 dní, začíná se vylučovat nosohltanem už před výsevem vyrážky
- **nebezpečné u těhotných** (první trimestr → vrozené vady – malformace srdce, sluchu či jiných orgánů)
- **diagnostika: klinické příznaky**, ELISA, přímý průkaz množení na tkáňových kulturách bez CPE (pomnožení viru prokazováno interferencí, tj. přidáme virus, který by normálně dělal CPE, např. echovirus 11)
- **léčba**: symptomaticky

# Virus rubeoly

- obalený, +ssRNA, 65-70 nm



# Zarděnky - příznaky

- **makulopapulózní vyrážka**, začíná na obličeji, šíří se na celé tělo



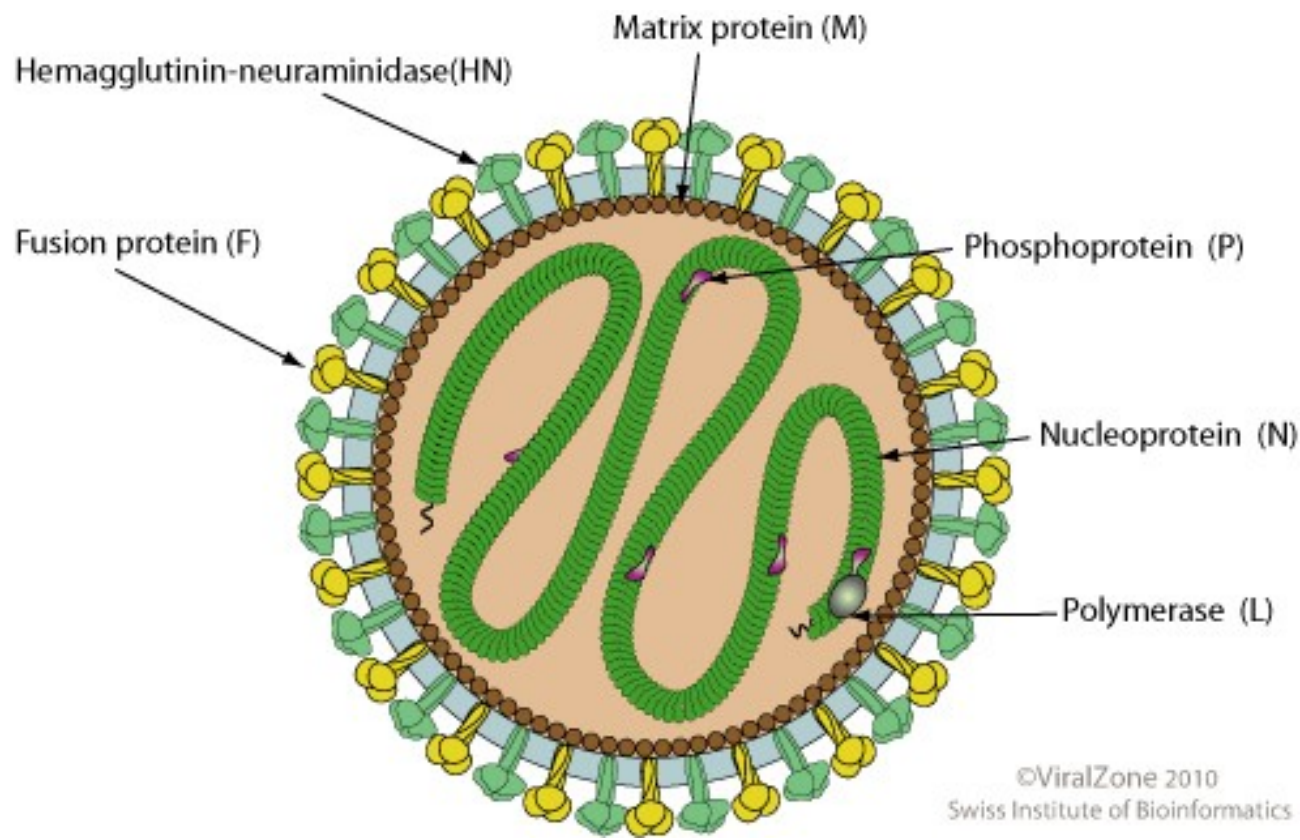
# Čeled': *Paramyxoviridae*

- **obalené -ssRNA viry**, sférické, 150 nm
- podčeled' *Paramyxovirinae*
  - **Respirovirus** – virus **parachřipky 1 a 3**
  - **Morbillivirus** – virus **spalniček**
  - **Rubulavirus** – virus **přiušnic, parachřipky 2, 4a, 4b**
- podčeled' *Pneumovirinae*
  - **Pneumovirus** – lidský **RS virus**
  - **Metapneumovirus** – lidský **metapneumovirus**



# Čeď: *Paramyxoviridae*

- **obalené -ssRNA viry**, sférické, 150 nm



# Virus spalniček (*Morbillivirus*)

- **angl. measles nebo rubeolla**
- **neexistují bezpříznakové infekce:**
  - po 10–11 dnech **horečka, rýma, kašel, záněty spojivek** → charakteristická **vyrážka**, začínající na tvářích a za ušima (po 3–4 dnech vybledá)
  - v ústech tzv. **Koplikovy skvrny** (šedé makuly)
- možné komplikace postihující dýchací a nervovou soustavu
- vzácně reaktivace v dospělosti: subakutní sklerózující panencefalitida (SSPE)
- **diagnostika: serologie** (ELISA, KFR, HIT)
- **léčba:** symptomaticky

# Spalničky - příznaky

- vyrážka
- **Koplikovy skvrny**  
(dole)



ichef-1.bbc.co.uk



classconnection.s3.amazonaws.com

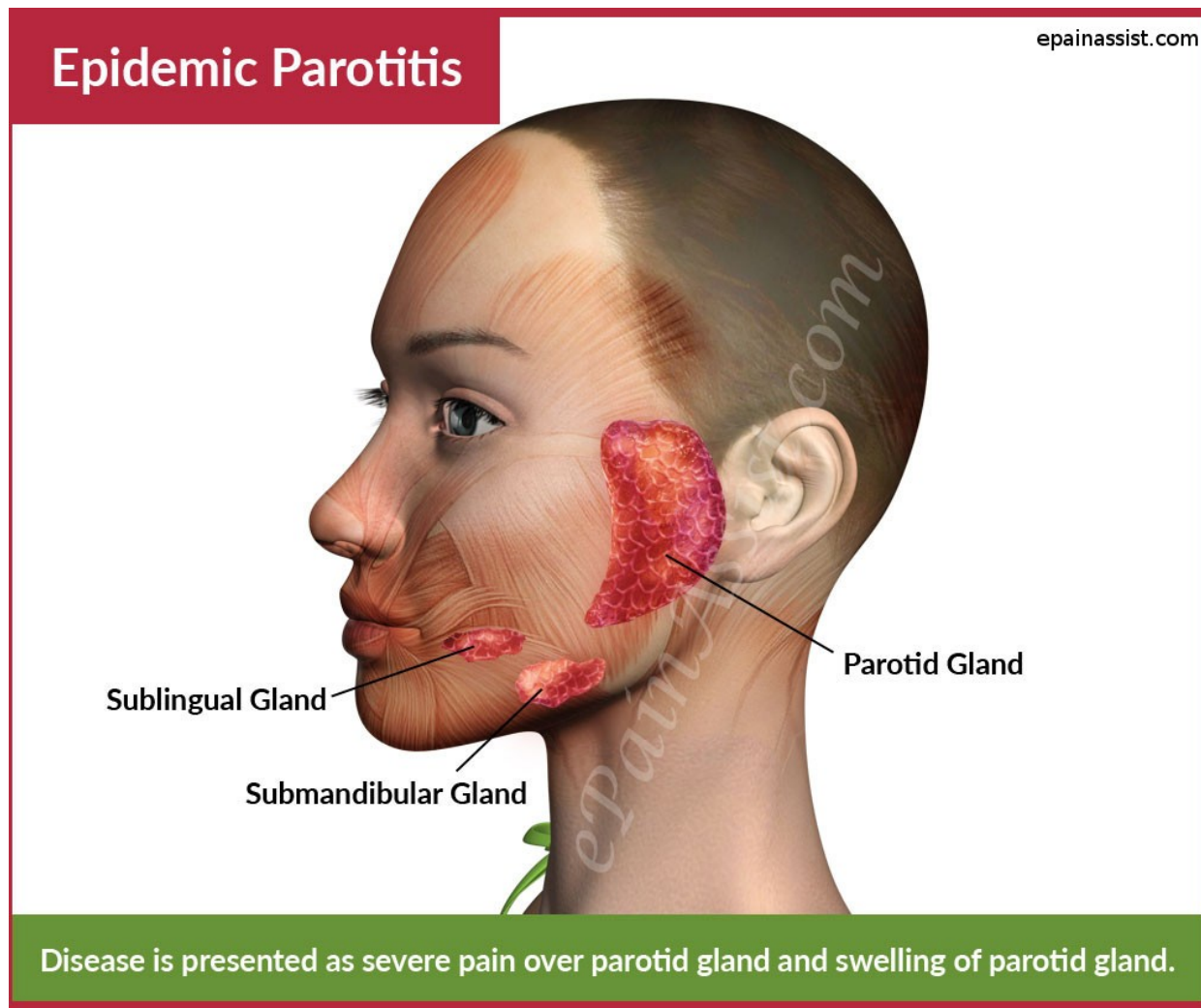
SCIENCEPHOTOLIBRARY



# Virus příušnic

- angl. mumps
- vstup **přes respirační trakt** (kapénkově) → **inkubační doba 2-3 týdny**, generalizovaná infekce
- **otok slinných žláz**, možné postižení CNS, slinivky břišní a varlat (nebezpečné u mužů v pubertě → vzácně vede ke sterilitě)
- **diagnostika: serologie** (HIT, KFR, ELISA), izolace
- **léčba**: symptomaticky

# Příušnice - příznaky



# MMR vakcína

- **očkování proti spalničkám, příušnicím a zarděnkám**
- **živé oslabené viry**
- indikováno dětem starším 15 měsíců, osobám vnímavým na alespoň jednu z nález, při riziku komplikací v těhotenství
- postexpoziční profylaxe po kontaktu se spalničkami

# Viry hepatitid

- **pět hlavních typů** virových hepatitid **VHA až VHE**
- každý patří do jiné skupiny, většina jsou RNA viry, kromě VHB je DNA virus s RT
- **VHA a VHE** – přenášejí se **fekálně-orální cestou** (ruce), **nepřecházejí do chronicity**
- **VHB, VHC a VHD** – přenos **krví**, popř. **sexuálně** (u VHC spíše nevýznamné), mohou **přecházet do chronicity, prekanceróza**
- existují i další viry hepatitid
- pacient má horečky, trávicí potíže, může být přítomno zežloutnutí skléry či kůže, změna barvy moče a stolice atd.

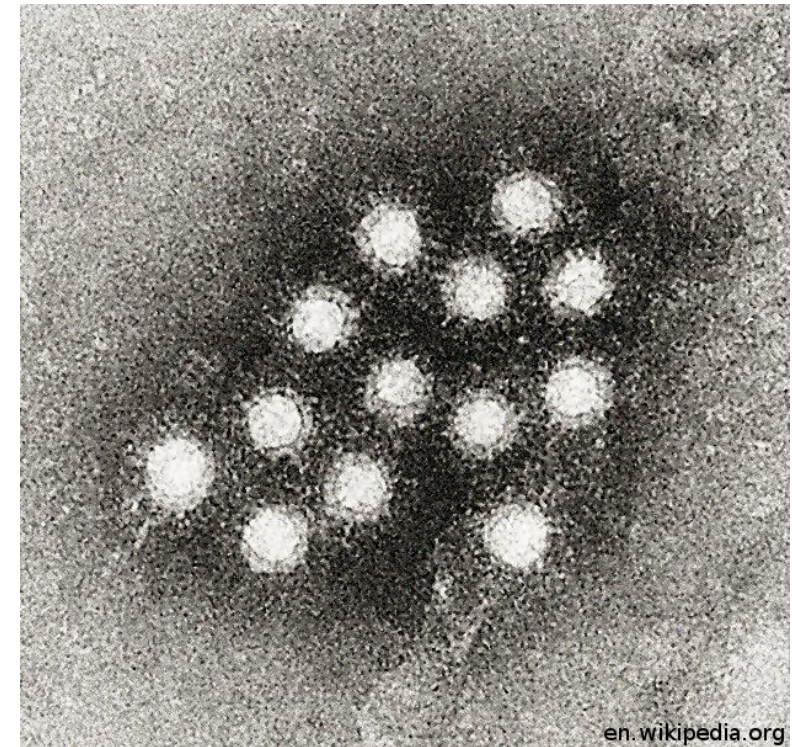
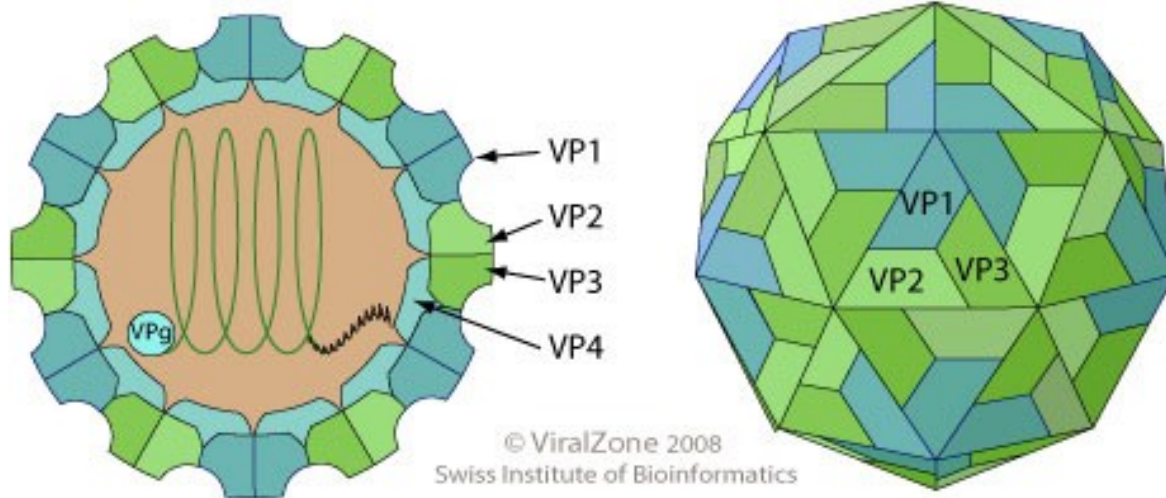
# Viry hepatitid - přehled

Virus	Zařazení	Přenos
<b>HAV</b>	<i>Picornaviridae</i> +ssRNA	fekálně-orální
<b>HBV</b>	<i>Hepadnaviridae</i> dsDNA (RT)	sexuální, kreví
<b>HCV</b>	<i>Flaviviridae</i> +ssRNA	krví
<b>HDV</b>	<i>Deltavirus</i> (Delta agens – viroid) -ssRNA	sexuální, kreví
<b>HEV</b>	<i>Hepeviridae</i> +ssRNA	fekálně-orální



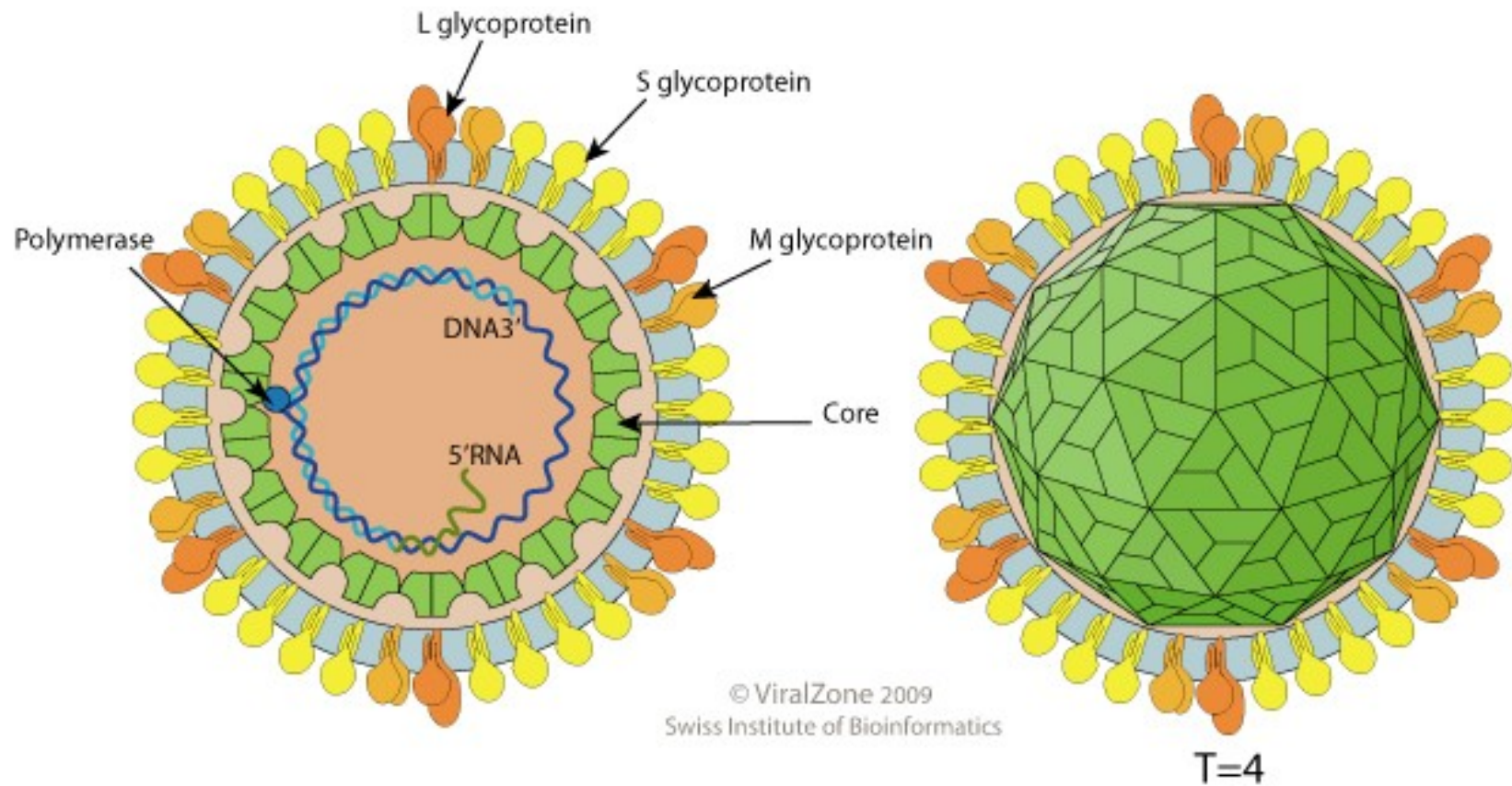
# Hepatitis A virus

- neobalený, +ssRNA, 30 nm



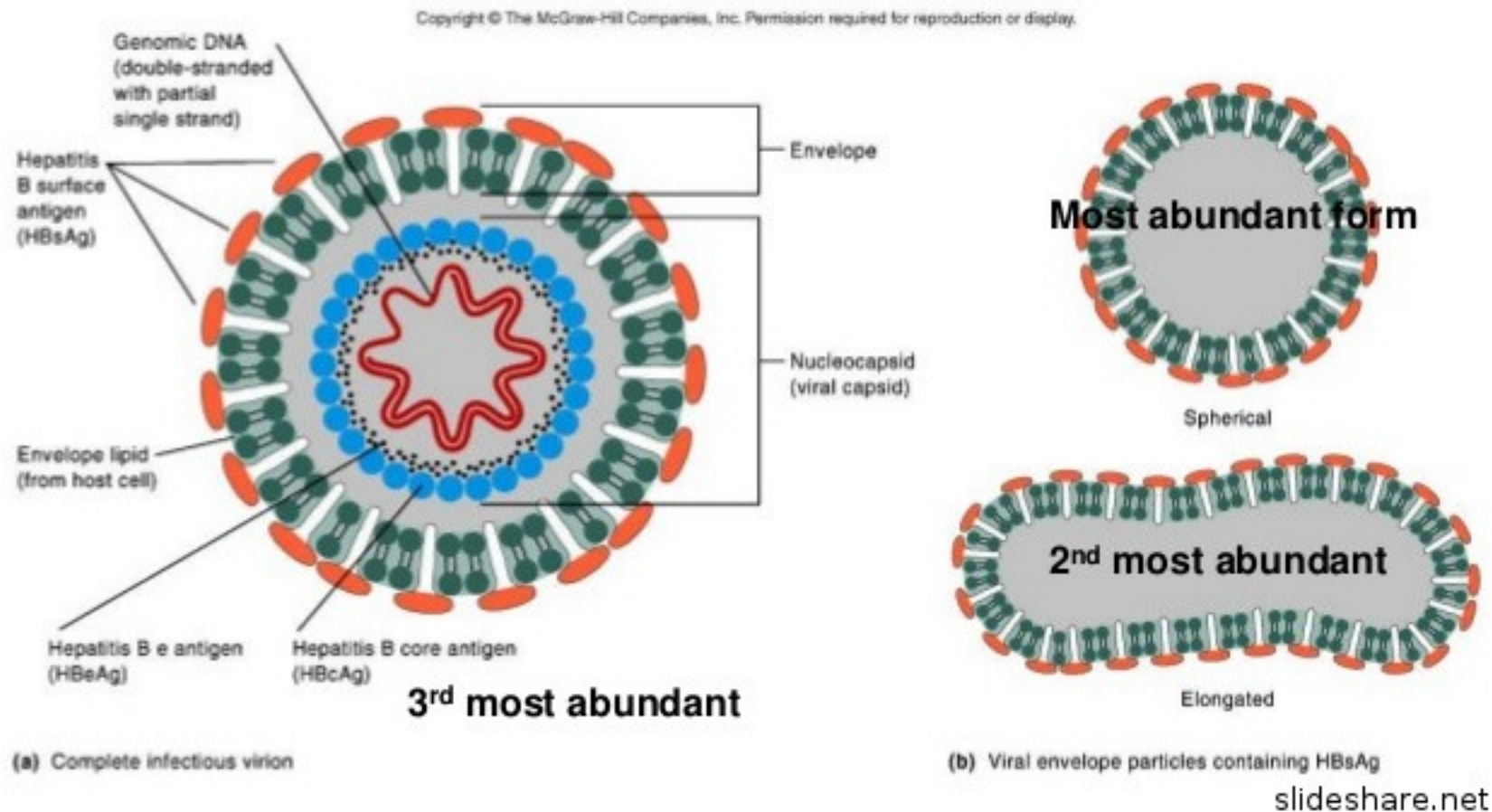
# Hepatitis B virus

- obalený, částečně dsDNA (RT), 42 nm



# Hepatitis B virus (2)

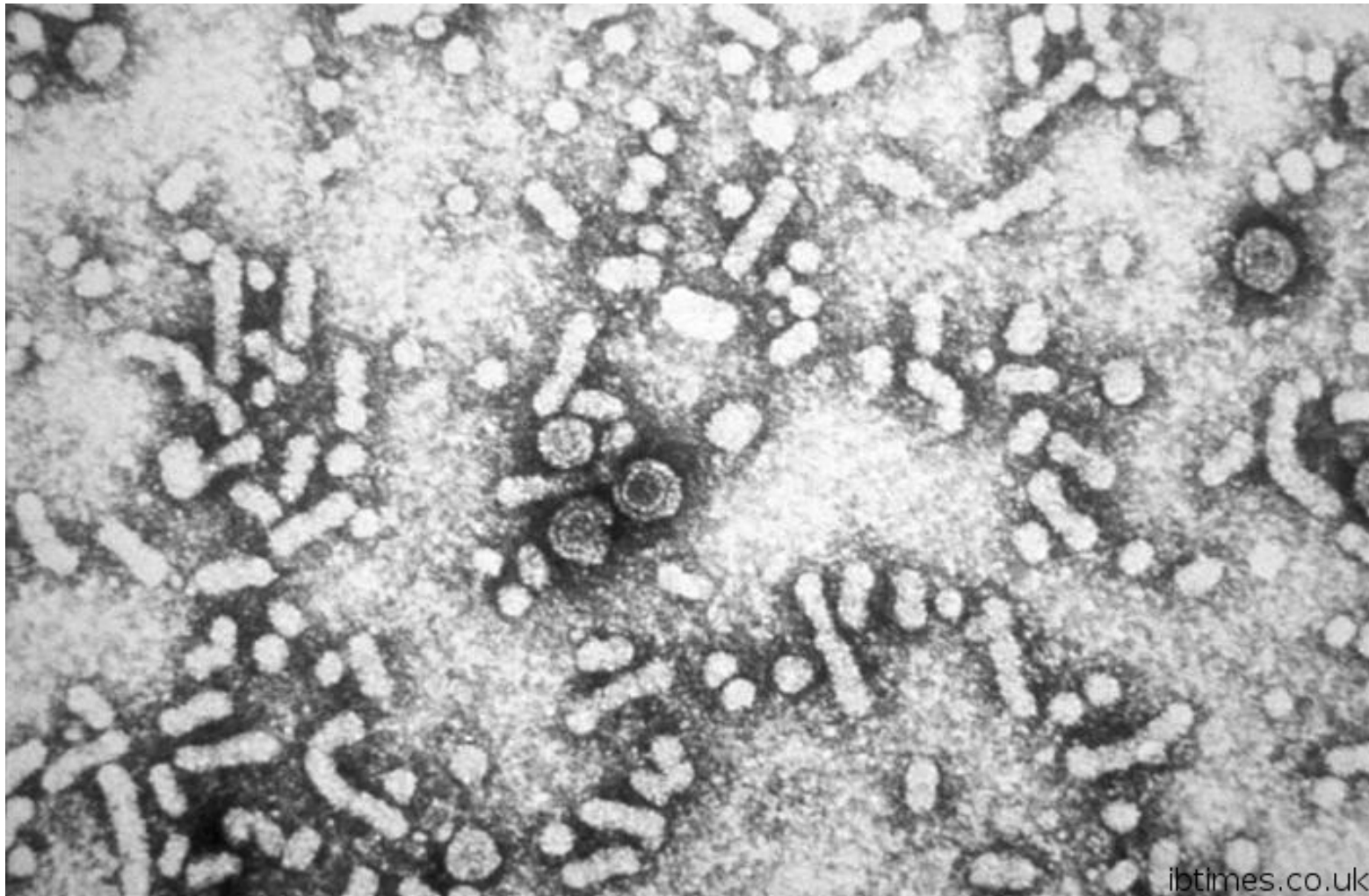
- neinfekční částice produkované v nadbytku





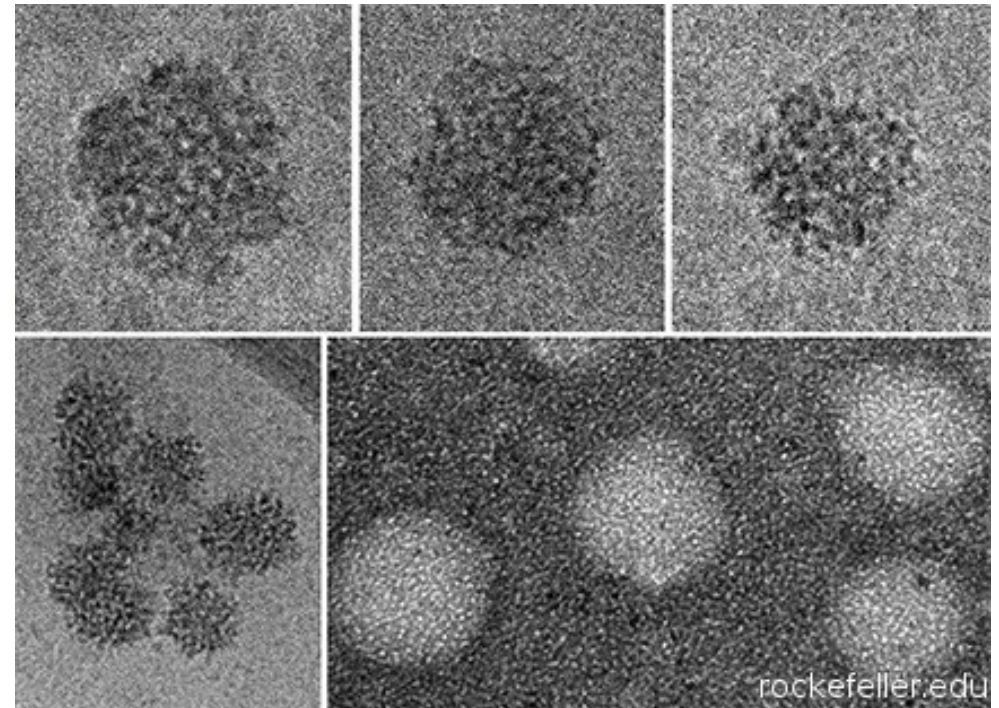
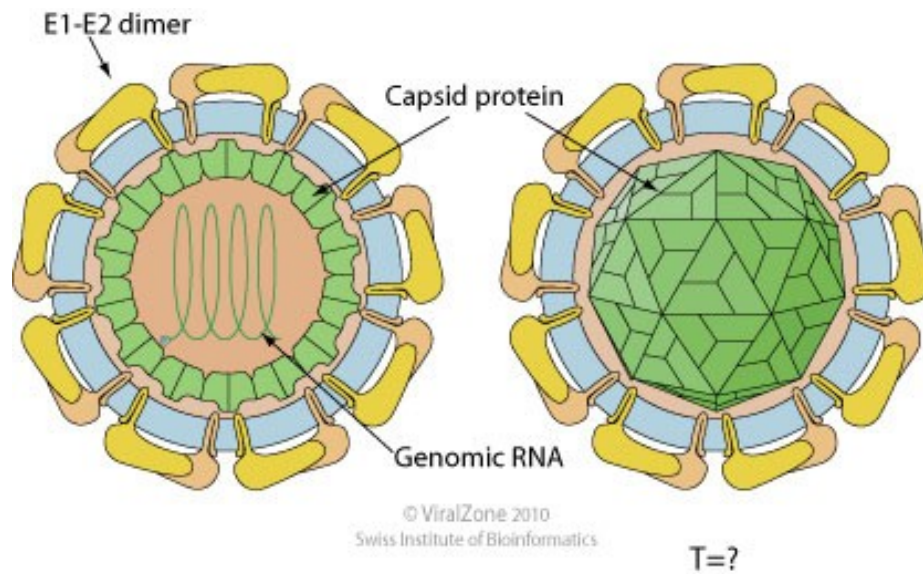
# Hepatitis B virus (3)

- neinfekční částice produkované v nadbytku



# Hepatitis C virus

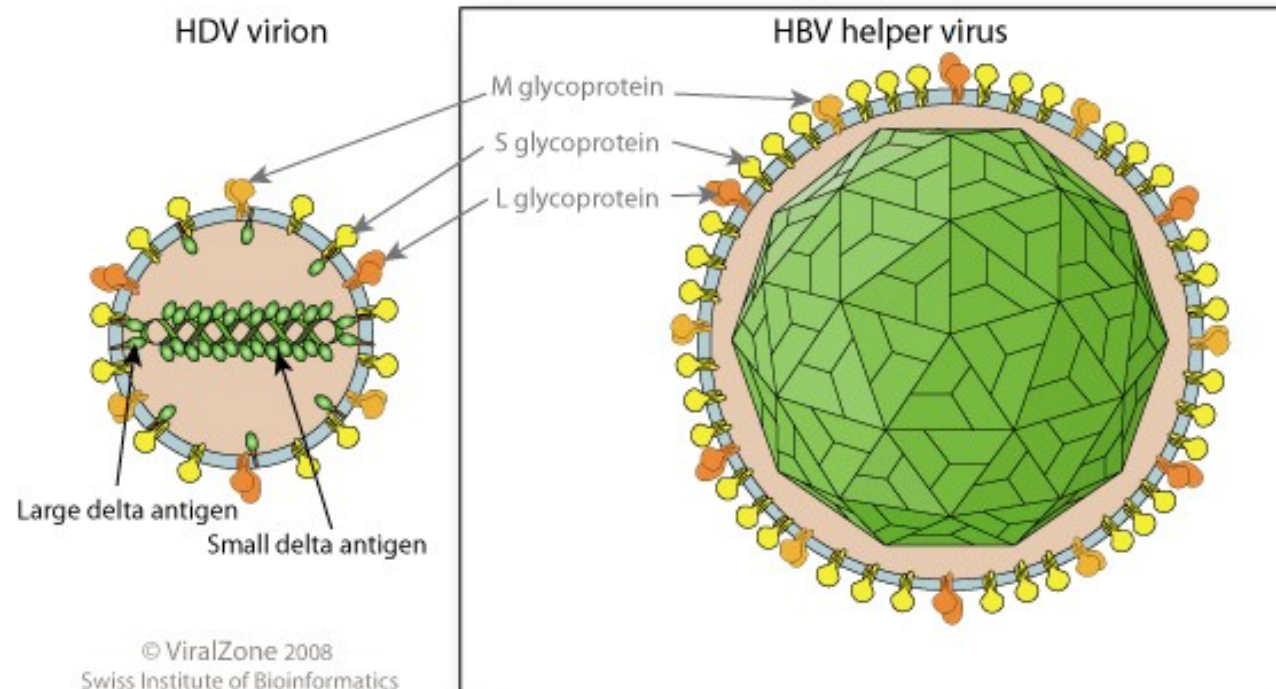
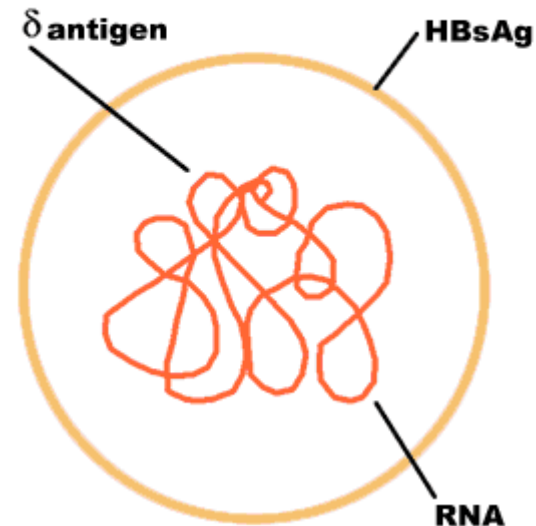
- obalený, +ssRNA, 50 nm



# Hepatitis D virus

medicalassessmentonline.com

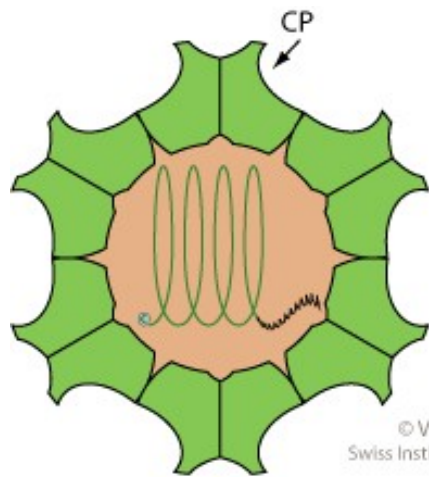
- obalený, -ssRNA  
22 nm
- **satelitní virus**  
(vyžaduje koinfekci  
s HBV)





# Hepatitis E virus

- neobalený, +ssRNA, 32-34 nm

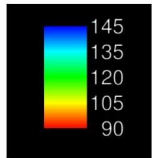
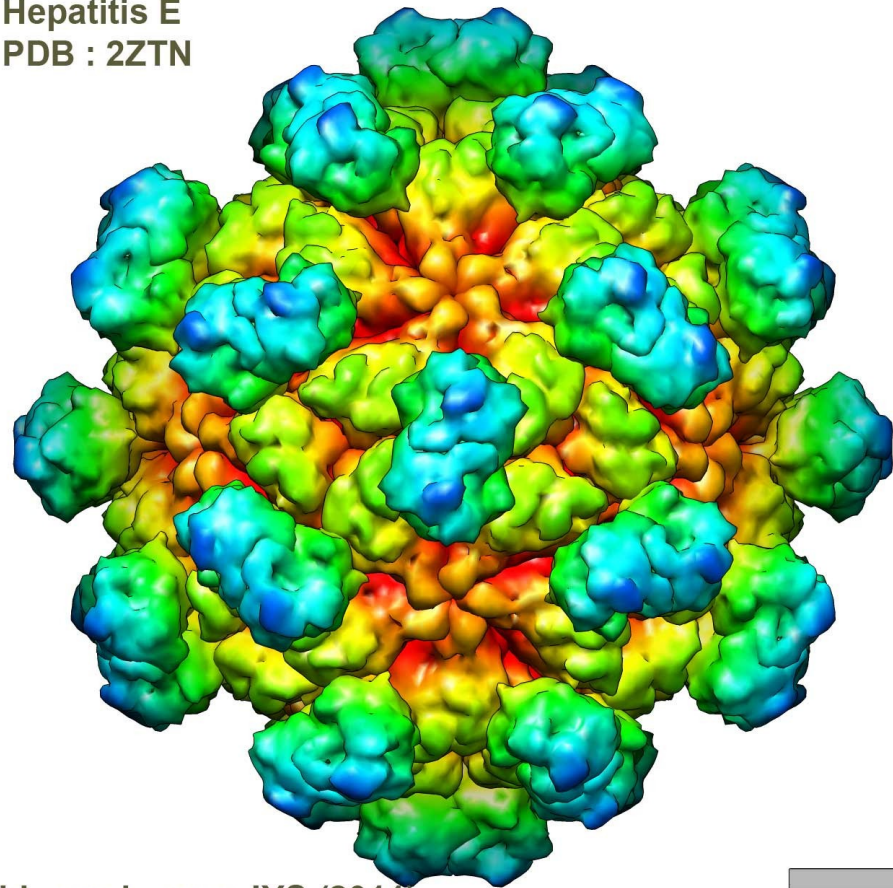


© ViralZone 2008  
Swiss Institute of Bioinformatics



T=1

Hepatitis E  
PDB : 2ZTN



Chimera image: JYS (2011)

100 Å



virology.wisc.edu

# Hepatitidy

- infekční záněty jater, lidově žloutenky
- **hepatitida** jako přenosné **virové onemocnění**
- **hepatitida** jako **příznak**, který je přítomen nejen při virové hepatitidě, ale i např. při obstrukci žlučových cest kameny
- **nevirové hepatitidy**:
  - **metabolická (Wilsonova choroba** – abnormální střádáním mědi v játrech → způsobuje poškození jaterních buněk, poruchy funkce CNS a hemolytickou anémii; **porfyrie** = hromadění prekursorů hemu v játrech)
  - **toxická** (alkohol, léky)

# Hepatitida příznaky

- typická **ikterická forma** (u všech hepatitid je však častější forma anikterická)



# Prevence hepatitid

- **očkování proti hepatitidě A** je dostupné a doporučené např. i při cestách do jižní Evropy či severní Afriky
- **očkování proti hepatitidě B** nyní součástí normálního **očkovacího kalendáře** (hexavakcína)
- možné současné očkování proti hepatitidě A i B
- **očkování proti hepatitidě C není** (několik genotypů, velké množství subtypů, snadno mutuje)
- očkování proti hepatitidě D = proti HBV
- experimentální vakcíny proti HEV (různé fáze klinických studií, uvedení na trh zřejmě nebude v dohledné době)

# Diagnostika hepatitid A, C, D, E

- **HAV**: stanovujeme metodou ELISA **anti-HAV IgM s IgG**, nebo **IgM a celkové protilátky**
- **HCV**: stanovujeme **IgM a IgG protilátky** metodou ELISA, dále se používá **PCR**
- **HDV**: prokazuje se **delta antigen (HDAg)**, protilátky (anti-HD) či **virová RNA pomocí PCR**
- **HEV**: průkaz **IgM a IgG protilátek** metodou ELISA, ve výzkumu i PCR

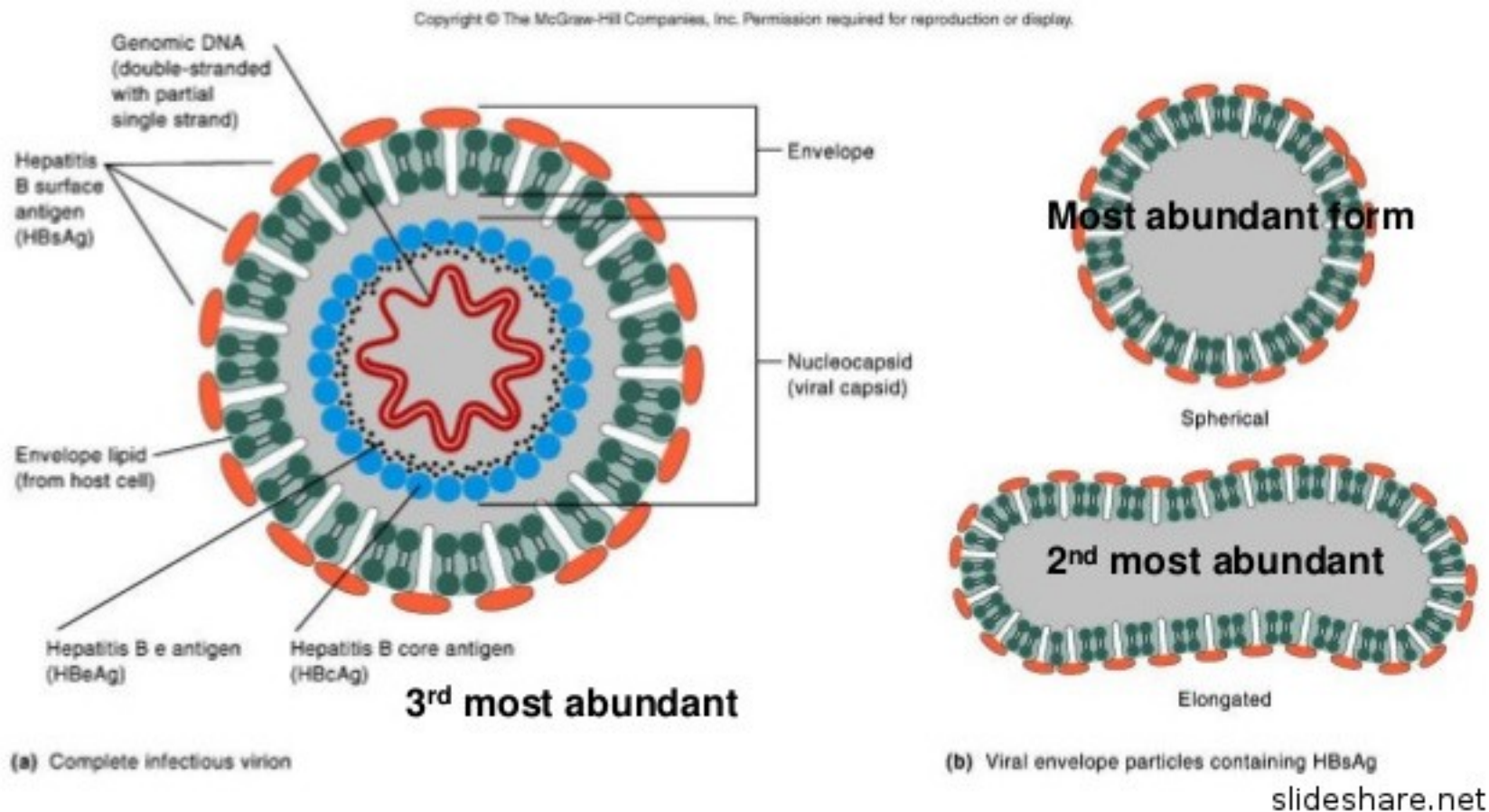


# Zvláštnosti diagnostiky HBV

- **nuleokapsida** – dvě dřeňové bílkoviny, které mají povahu antigenů (**HBcAg** a **HBeAg**)
- **obal** – antigen **HBsAg**
- HBsAg je nadprodukován (v krvi kolují i prázdné obaly)
- **do prázdného HBsAg může proniknout delta agens** – původce hepatitidy D
- **delta agens podstatně zhoršuje prognózu** virové hepatitidy

# Hepatitis B virus (2)

- neinfekční částice produkované v nadbytku



# 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

# Screening a léčba hepatitid

- **screening hepatitidy B běžný** (před operacemi, v těhotenství apod.)
- **léčba akutních hepatitid je symptomatická a podpůrná**
- **základem terapie klidový dietní režim, použití hepatoprotektiv**
- VHC -časná **léčba interferonem** může zabránit přechodu do chronicity
- antivirotika: lamivudin (HBV)

# Virus HIV

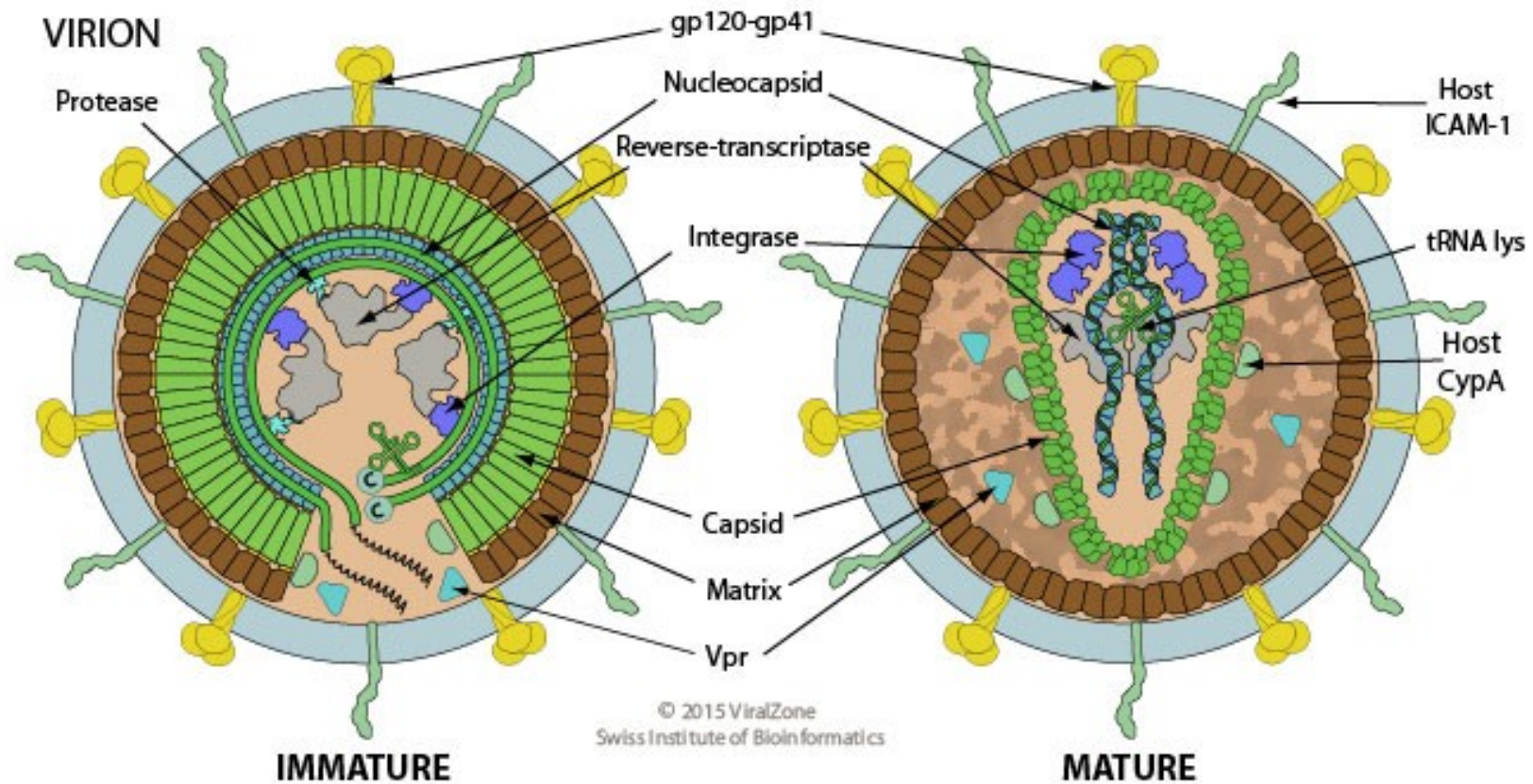
- **retrovirus (reverzní transkriptáza)**
- **HIV 1** – ve střední Africe a v ostatních kontinentech, kam se rozšířil
- **HIV 2** – pouze v západní Africe, rozvoj onemocnění je pomalejší než u infekce HIV 1
- **přenos se krví, pohlavní cestou, z matky na dítě** (transplacentárně i mateřským mlékem)

# Průběh infekce virem HIV

- **primoinfekce virem HIV** (těžký pokles CD4+ lymfocytů, přechodná virémie, příznaky podobné jako tonsilofaryngitida, infekční mononukleóze či chřipce)
- **bezpříznakové stádium** (18 měsíců až 15 let, perzistující generalizovaná **lymfadenopatie**)
- **časné symptomatické stádium** (celkové příznaky – horečka nad 38,5° C, noční pocení, únava, úbytek na váze; časté malé oportunní infekce)
- **pozdní symptomatické stádium, AIDS** (konečné stadium HIV infekce, velké oportunní infekce, nádory, encefalopatie)

# Virion HIV

- obalený, dvě kopie +ssRNA, 80-100 nm



# Diagnostika HIV

- **protilátky proti obalovým glykoproteinům** pomocí **ELISA** testů (**gp41, gp120**)
- výsledek vyjde jako **pozitivní**, pošle se vzorek séra do **referenční laboratoře**, která výsledek ověří (konfirmuje) další reakcí **ELISA** a **Western blottem**
- do výsledků konfirmace je výsledek hodnocen jako „reaktivní“, nikoli jako „pozitivní“
- **přímý průkaz** lze provádět pomocí PCR
- izolace viru je dnes již možná, ale velmi náročná a běžně se neprovádí

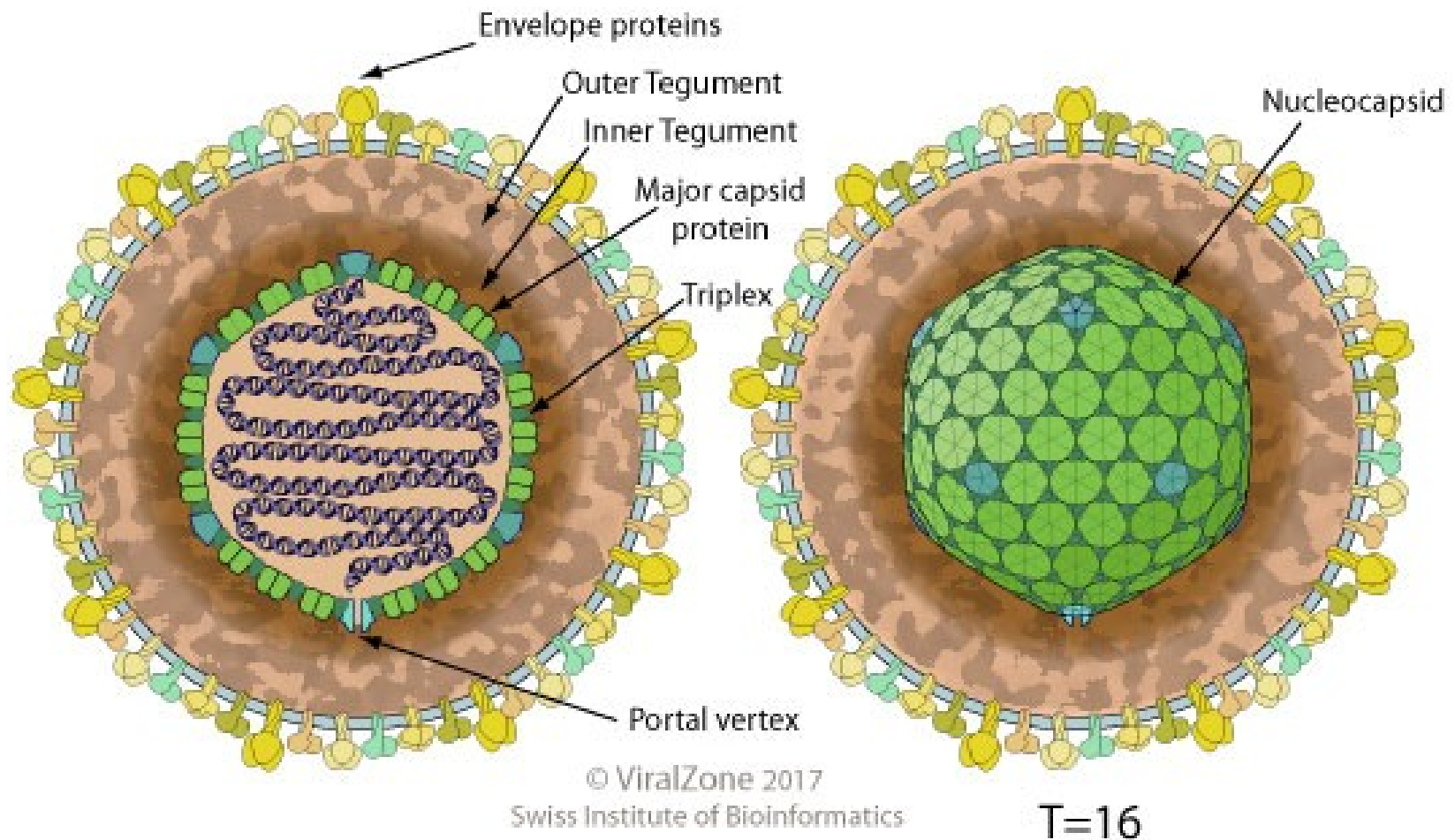


# Herpetické viry

- **obalené, dsDNA**, ikosahedrální symetrie, poměrně velké (HSV-1 150-200 nm)
- typické **dlouhodobé přetrvávání v organismu** (fáze latence) v nervových a lymfatických tkáních
- **reaktivace** při stresové situaci popř. oslabení imunitního systému

# Herpetické viry (2)

- obalený, lineární dsDNA, 150-200 nm



# Herpetické viry (2)

Zkratka, podčleď	Celé jméno	Choroba
<b>HSV-1 + 2</b> (alfa)	Herpes simplex virus	herpes simplex (prostý opar)
<b>VZV</b> (alfa)	Varicella zoster virus	plané neštovice, pásový opar
<b>EBV</b> (gamma)	Virus Epstein-Barrové	infekční mononukleóza
<b>CMV</b> (beta)	Cytomegalovirus	cytomegaloviróza
<b>HHV-6 + 7</b> (beta)	Lidský herpesvirus 6 + 7	exanthema subitum
<b>HHV-8</b> (gamma)	Lidský herpesvirus 8	Kaposiho sarkom

# Herpes simplex virus

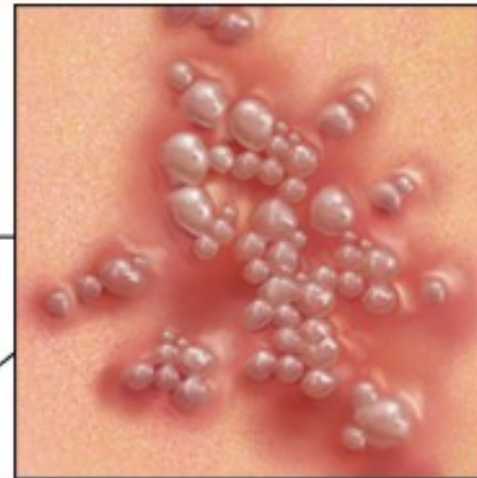
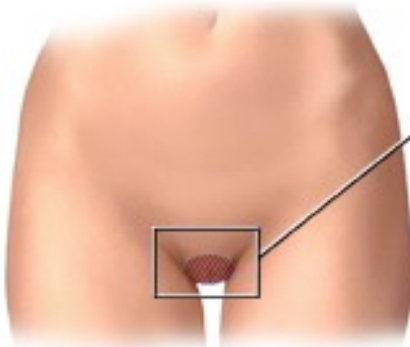
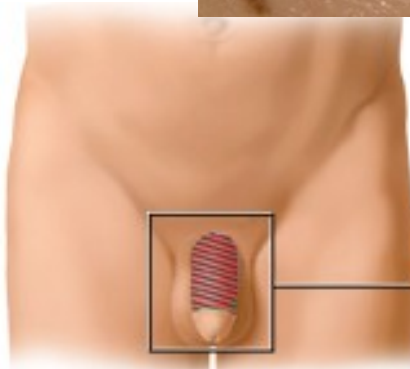
- po infekci viry **přežívají v nervových gangliích**
- **HSV-1: herpes labialis** (bolestivé puchýřky **v oblasti úst**, může se ale objevit i jinde)
  - **závažné komplikace** (encefalitida, infekce oka)
- **HSV-2: herpes genitalis** (bolestivé puchýřky v oblasti genitálu a anu)
- **diagnostika:** klinické příznaky, PCR, popř. izolace viru
- **léčba:** aciklovir, valaciclovir a famciclovir (nepůsobí na latentní infekci, infekce nejsou vyléčitelné → latence)

# Herpes labialis, herpes genitalis

- **HSV-1**



- **HSV-2**



Herpes lesion:  
Found on shaft of penis (male),  
vagina, vulva, cervix (female),  
and around anus

# Varicella zoster virus (VZV)

- bránou **vstupu respirační trakt** → pomnožení v lymfatických uzlinách → hematogenní rozsev do kůže a sliznic → tvorba puchýřků (**plané neštovice**)
- **perzistuje ve spinálních gangliích** interkostálních nervů
- **při oslabení imunity nebo stresu** se šíří anterográdně do senzitivní oblasti příslušného nervu → **pásový opar**
- **diagnostika:** PCR, ELISA, popř. kultivace
- **léčba:** aciklovir, valaciclovir a famciclovir

# Plané neštovice

## Chickenpox



The characteristic feature of Varicella or Chickenpox is that the rash, blisters, and bumps all form at the same time.



# Pásový opar



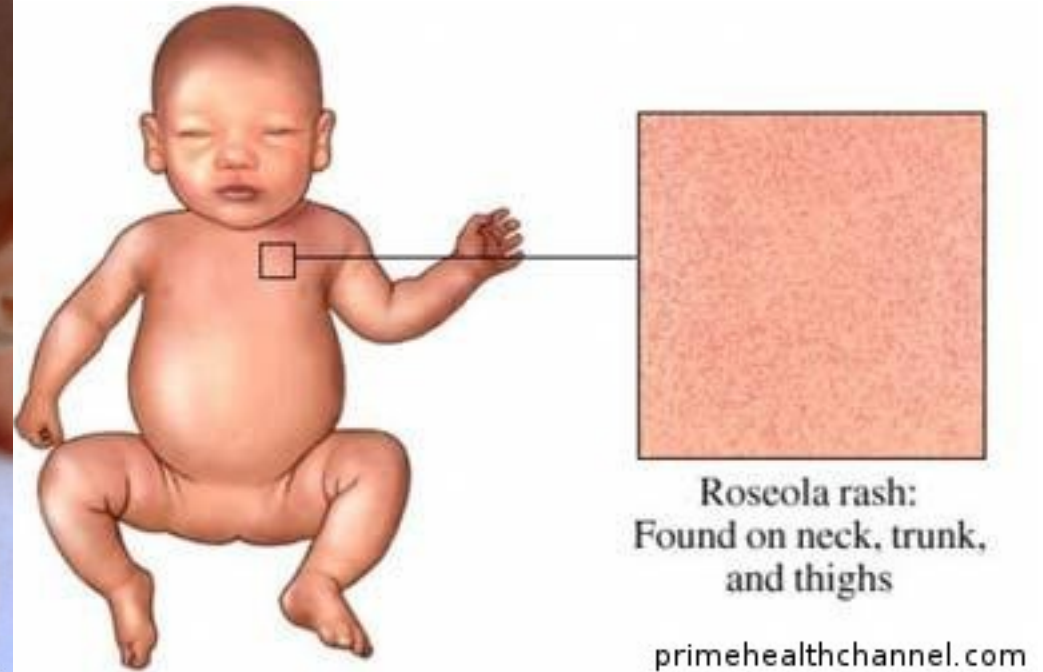
# Cytomegalovirus (CMV)

- název odvozen od zvětšených buněk napadených virem (virus zabraní apoptóze zprostředkovanou mitochondriemi)
- vstup **respiračním** nebo trávicím **traktem** → pomnožení a hematogenní rozsev → perzistence ve slinných žlázách, renálních tubulech, leukocytech
- **u většiny probíhá infekce bezpříznakově**, méně často syndrom infekční mononukleózy (teplota, lymfadenopatie)
- infekce je závažná u těhotných (infekce plodu) a imunokompromitovaných (transplantace, AIDS, apod.)
- **diagnostika**: serologie, PCR, kultivace
- **léčba**: ganciklovir, foskarnet

# Lidský herpesvirus 6 + 7

- HHV-6A, HHV-6B; HHV-7
- **infekce probíhá u dětí** nejčastěji do 1. roku života, přenos kontaktem → zvýšená **teplota**, někdy doprovázená **exantémem** (**exanthema subitum** neboli roseola infantum)
- **reaktivace bezpříznakové**, s výjimkou imunokompromitovaných jedinců
- **diagnostika**: klinické příznaky, serologie, izolace viru
- **léčba**: symptomaticky, výjimečně ganciklovir apod.

# Exanthema subitum neboli roseola infantum



# Virus Epsteinův - Barrové

- brána vstupu **respirační trakt** → pomnožení v B-lymfocytech → **příznaky žádné, přes angínu s lymfadenitidu (infekční mononukleóza), až po postižení jater**
- **souvislost** s určitými typy **tumorů**
- **diagnostika**: Paul-Bunnellova reakce - důkaz tzv. heterofilní protilátek shlukujících beraní krvinky, nebo průkaz specifických protilátek proti různým virovým antigenům (hlavně **EBNA** a **VCA**)
- **léčba**: obvykle symptomatická

# Protilátky anti-VCA a anti-EBNA

- **virový kapsidový antigen (VCA)**
  - anti-VCA IgM se objevují časně při EBV infekci a zpravidla mizí během 4 až 6 týdnů
  - anti-VCA IgG se objevují v časně fázi EBV infekce, vrcholí během 2 až 4 týdnů po začátku nemoci, pomalu klesají, a pak přetrvávají během zbytku pacientova života
- **EBV nukleární antigen (EBNA)**
  - protilátky proti EBNA se pomalu objevují 2 až 4 měsíce po začátku příznaků a perzistují po zbytek pacientova života

# Infekční mononukleóza





# Lidský herpesvirus 8 (HHV 8)

- obsahuje neobvykle velké množství genů, pocházejících z hostitelské buňky
- **souvisí s onkogenitou**
- primární infekce může připomínat infekční mononukleózu, ale bez heterofilních protilátek
- **souvisí s Kaposiho sarkomem** (tvorba lézí na těle), zvláštním typem nádoru u pacientů s AIDS
- diagnostika je zatím spíše experimentální

# Přímé vs. nepřímé metody

## přímé

- **hledáme mikroba, jeho část či jeho produkt** (produktem může být například nějaký bakteriální **antigen** či jed – toxin)
- **agens je přítomno nyní**

## nepřímé

- **hledáme protilátky**
- protilátka není součástí ani produktem mikroba (**produkt makroorganismu**, odezvou na činnost mikroba)
- **agens bylo přítomno** někdy v minulosti

# Přehled metod

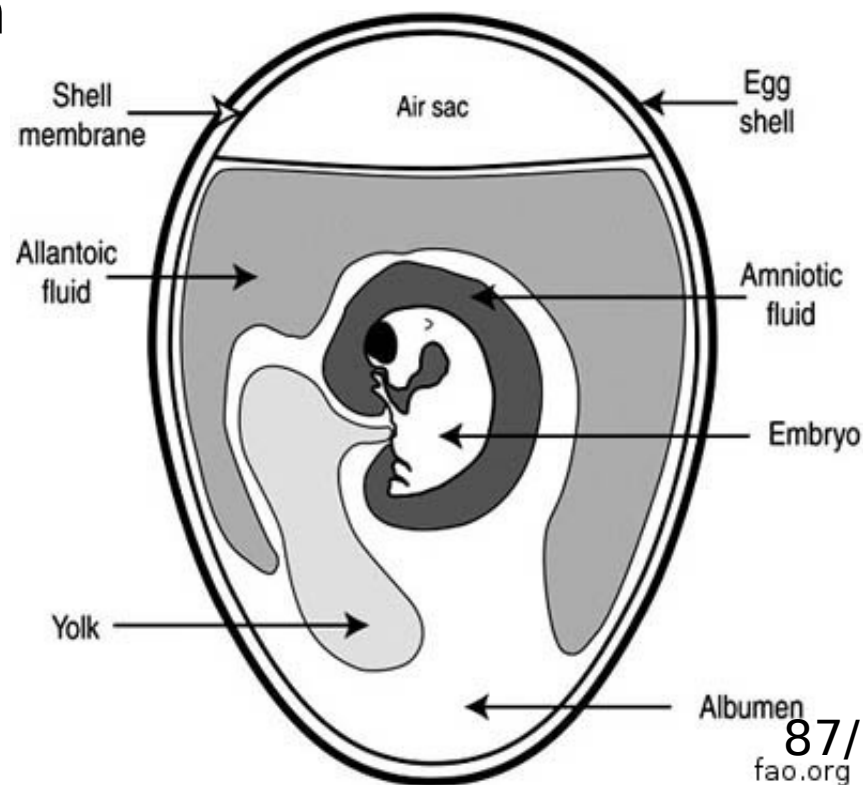
- přímé metody
  - **mikroskopie** – elektronová (morfologie virionů), optická (buněčné kultury, CPE, inkluze)
  - **kultivace, izolace** – buněčné a tkáňové kultury
  - biochemické metody – u virů se nepoužívají
  - **průkaz antigenu (pomocí protilátky)**
  - pokus na zvířeti (izolace, průkaz toxicity)
  - **průkaz nukleové kyseliny**
- nepřímé metody
  - **základ diagnostiky virů – KFR, HIT, VNT, ELISA**

# Mikroskopie

- **elektronová mikroskopie:**
  - **pozorování** většiny virů
  - nákladná a není vždy dostupná → nepoužívá se k rutinní diagnostice, ale **k výzkumným účelům**
- **optická mikroskopie:**
  - pozorování **cytopatických efektů** in vitro
  - pozorování **buněčných inkluzí** in vivo (Negriho tělíška u vztekliny) – spíše v rámci histologie
  - možné pozorování velkých virů ( $> 0,2 \mu\text{m}$ , např. poxviry) – výjimečně, pro praxi se nehodí

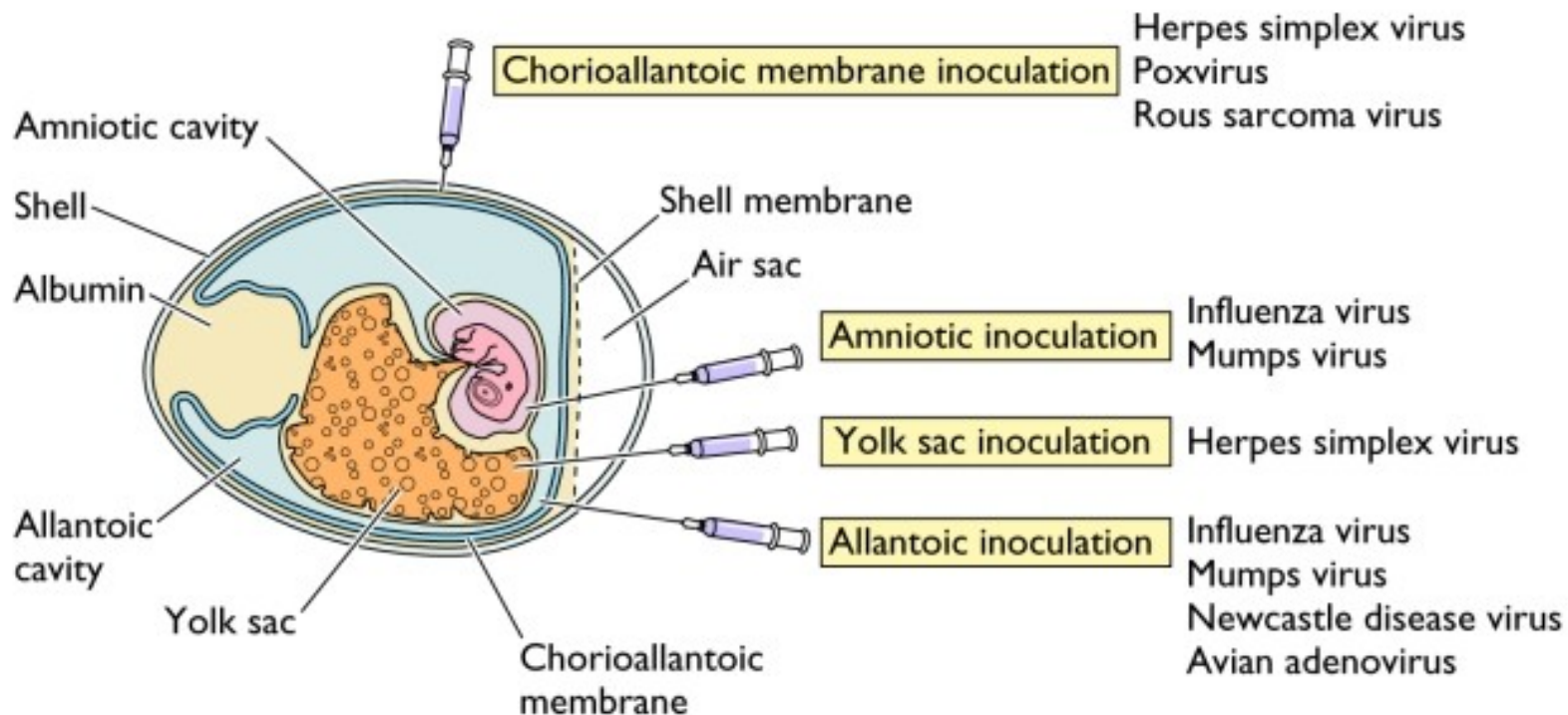
# Izolace a kultivace virů

- zvíře se používá dnes již méně často (sající myšata)
- **kuřecí zárodek** (asi 10 dnů staré embryo):
  - pod skořápkou **papírová blanka** (uzavírá vzduchovou bublinu)
  - na papírovou blanku nasedá **chorioalantoidní membrána**, která ohraničuje **allantoidní dutinu**
  - v allantois se vznáší **amniotická dutina s vlastním embryem**
  - **žloutkový vak**



# Izolace a kultivace virů (2)

- směry očkování do jednotlivých struktur

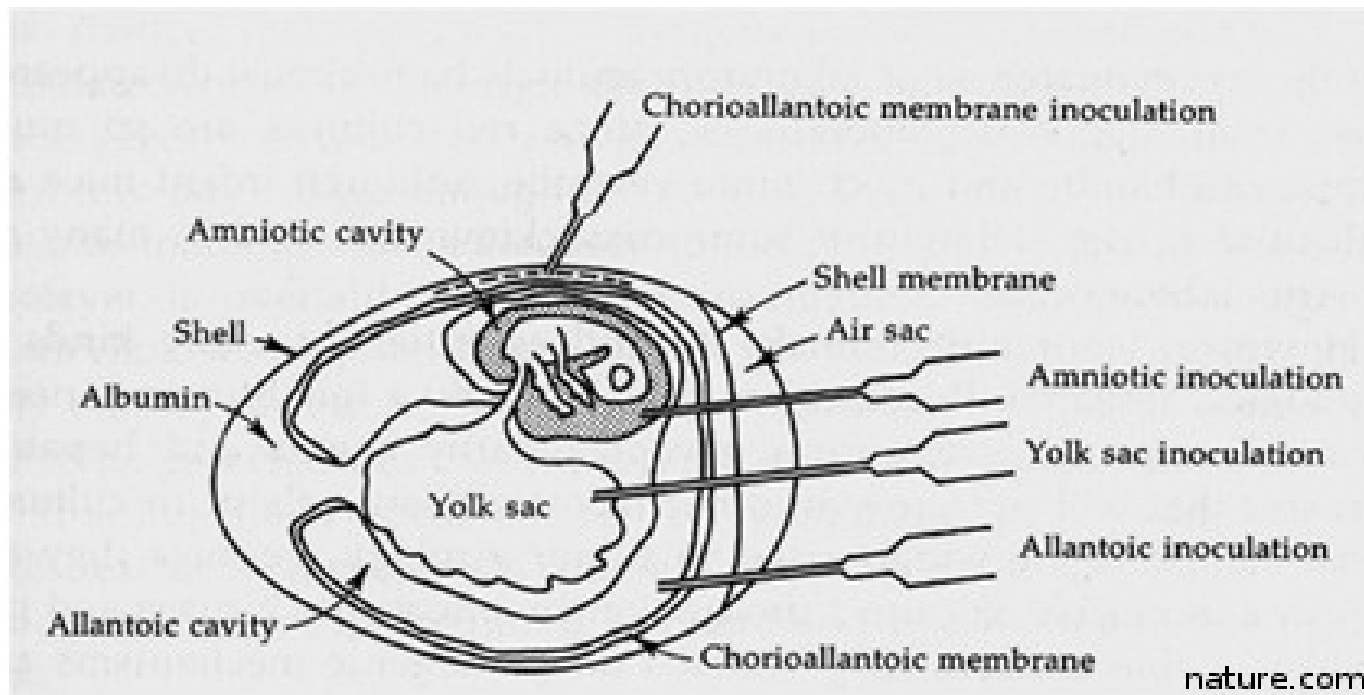


Adapted from F. Fenner et al., *The Biology of Animal Viruses* (Academic Press, New York, N.Y., 1974), with permission.

plus.google.com

# Izolace a kultivace virů (3)

- směry očkování do jednotlivých struktur





# Izolace a kultivace virů (4)

- **amniová dutina** – obklopující zárodek, používá se často, např. u virů **chřipky**
- **allantois** (odpadní váček) poskytuje **větší objem tekutiny, ale je méně výživný** (hodí se pro viry, které byly předtím pěstovány v amniu a adaptovaly se; **využívá se při výrobě chřipkové vakcíny**)
- **žloutkový vak** – kultivace **chlamydií a rickettsií** (používají se sedmidenní embrya → vak je větší)
- **chorioalantoidní membrána** – pěstování zejména poxvirů a herpesvirů

# Izolace a kultivace virů (5)

- výsledek není na kuřecích zárodcích vidět
  - výjimka **chorioalantoidní membrána - poky** (bělavá ložiska)
  - využíváme **schopnosti většiny virů aglutinovat erythrocyty → Hirstův test**
- **buněčné kultury:**
  - „nesmrtelné“ zvířecí či lidské buňky – embryonální, nádorové
  - HeLa (nádor cervixu), Vero (opičí ledviny), HEL (Human Embryonic Lung)
  - **některé viry způsobují cytopatický efekt (CPE)**

# Cytopatický efekt

- **morfologicky patrné důsledky infekce buňky virem (ne všechny viry způsobí CPE!)**
- **následek narušení metabolismu a s ním spojených životních funkcí buněk**
- **projevy:**
  - změny **cytoskeletu**:
    - **zakulacení buněk**
    - **odlupování** od podkladu
  - v důsledku změny **obsahu vody** a přesunu **iontů**:
    - **vakuolizace** cytoplazmy
    - **svraštění** buněk

# Cytopatický efekt (2)

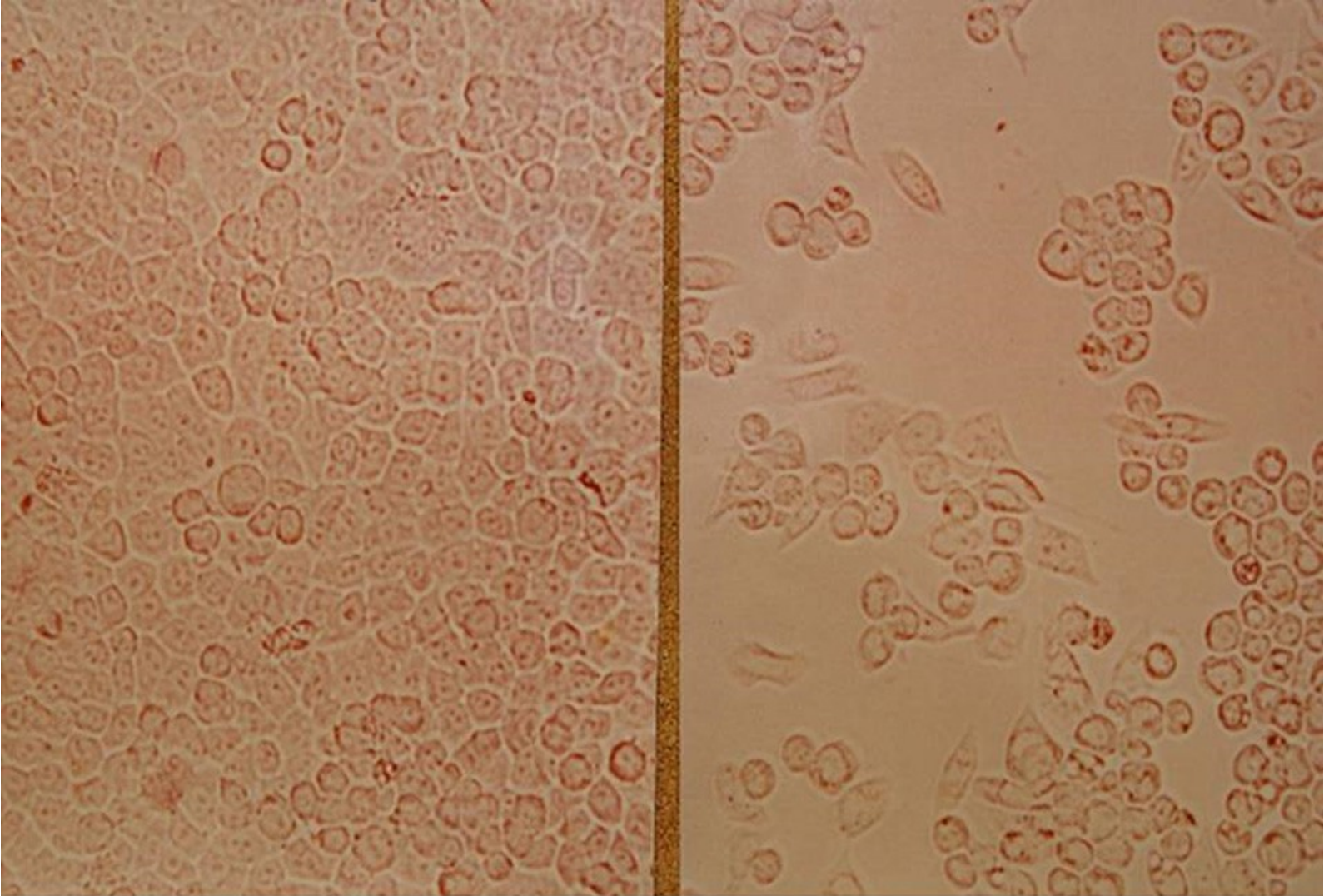
- **total destruction:**

- **úplná destrukce buněk** monolayeru, zhuštění buněk (kondenzace chromatinu)
- enteroviry (poliovirus, rhinoviry, coxsackie viry, echoviry)

- **subtotal destruction:**

- **částečná destrukce buněk** monolayeru (nejsou zasaženy všechny buňky)
- togaviry, pikornaviry, paramyxoviry

# Cytopatický efekt (3)



Photographs of normal tissue culture-Left side

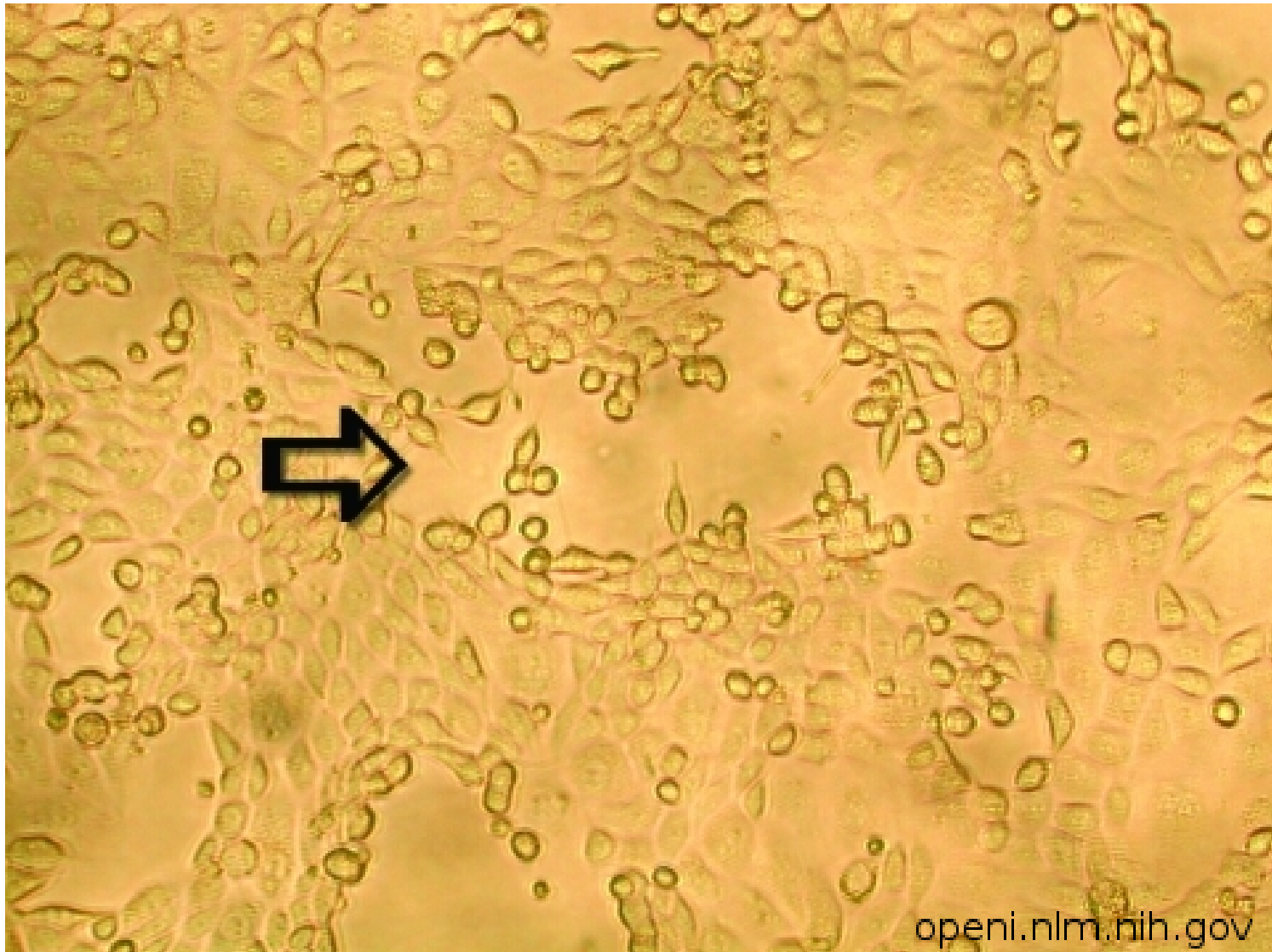
Photographs of infected tissue-Right side

# Cytopatický efekt (4)

- **focal degeneration:**
  - **místo generalizované infekce** monolayeru → virus produkuje lokalizovaná ohniska
  - infekce probíhá **šířením viru z buňky do buňky** (ne difúzí z média)
  - buňky zvětšené, zakulacené, refraktilní
  - herpesviry, poxviry



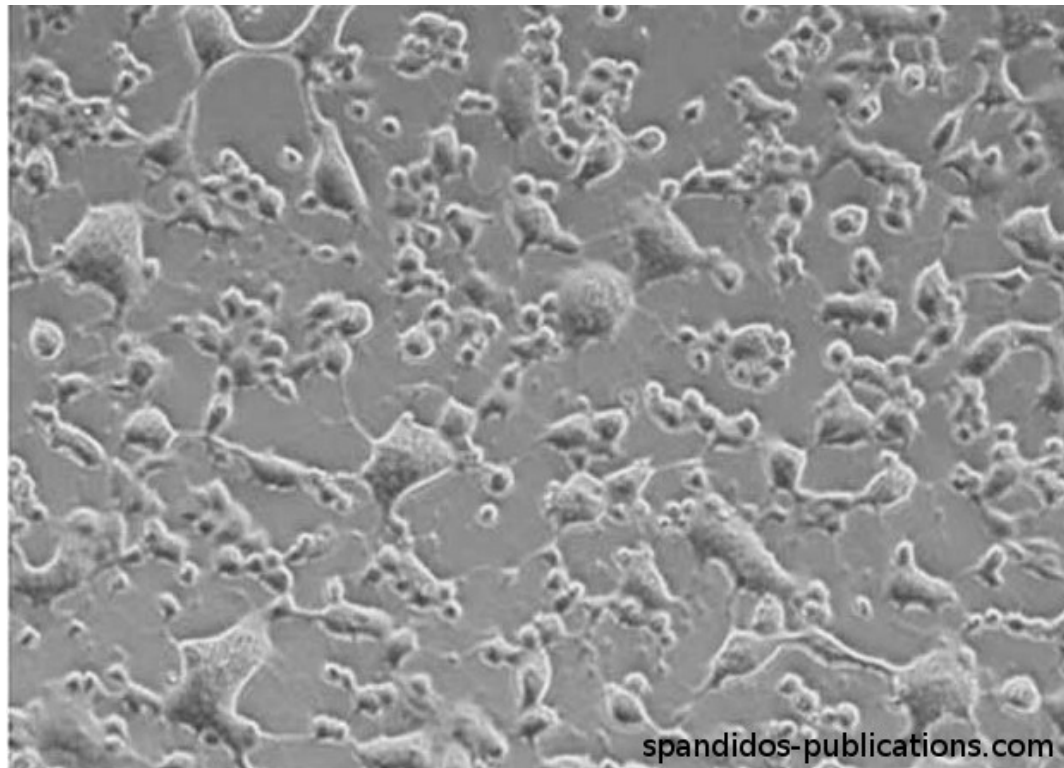
# Cytopatický efekt (5)



# Cytopatický efekt (6)

- **swelling and clumping:**

- infikované buňky se **zvětšují** a postupně **shlukují** do střípcovitých (hroznovitých) útvarů, nakonec se odloučí od podkladu
- adenoviry



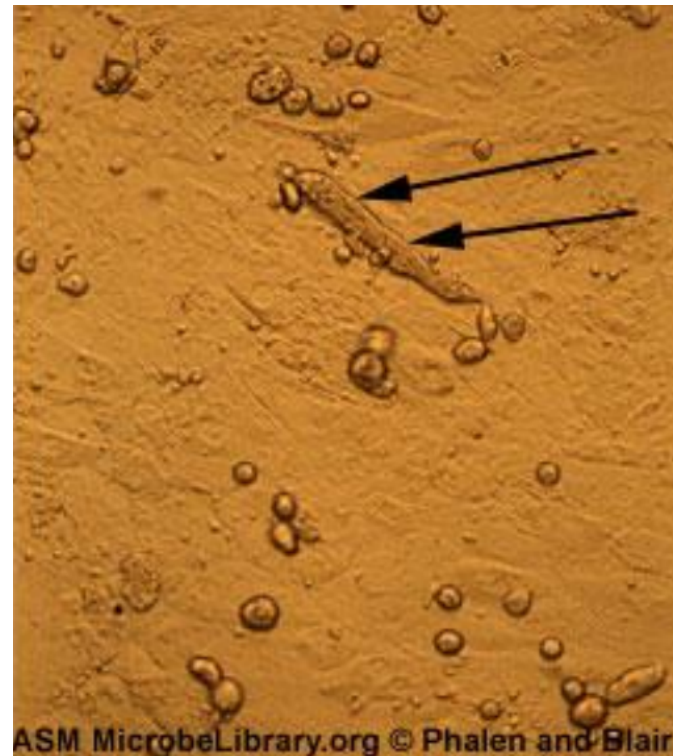
# Cytopatický efekt (7)

- **foamy degeneration (vacuolization)**
  - **produkce velkých a početných vakuol v cytoplasmě** infikovaných buněk
  - těžko pozorovatelné bez barvení
  - retroviry, paramyxoviry, flaviviry



# Cytopatický efekt (8)

- **cell fusion** (syncytium formation/polykaryon formation)
  - **fúze plazmatických membrán čtyř a více buněk**
  - produkce jedné velké buňky se čtyřmi a více jádry (lépe pozorovatelné po obarvení)
  - paramyxoviry, herpesviry



# Cytopatický efekt (9)

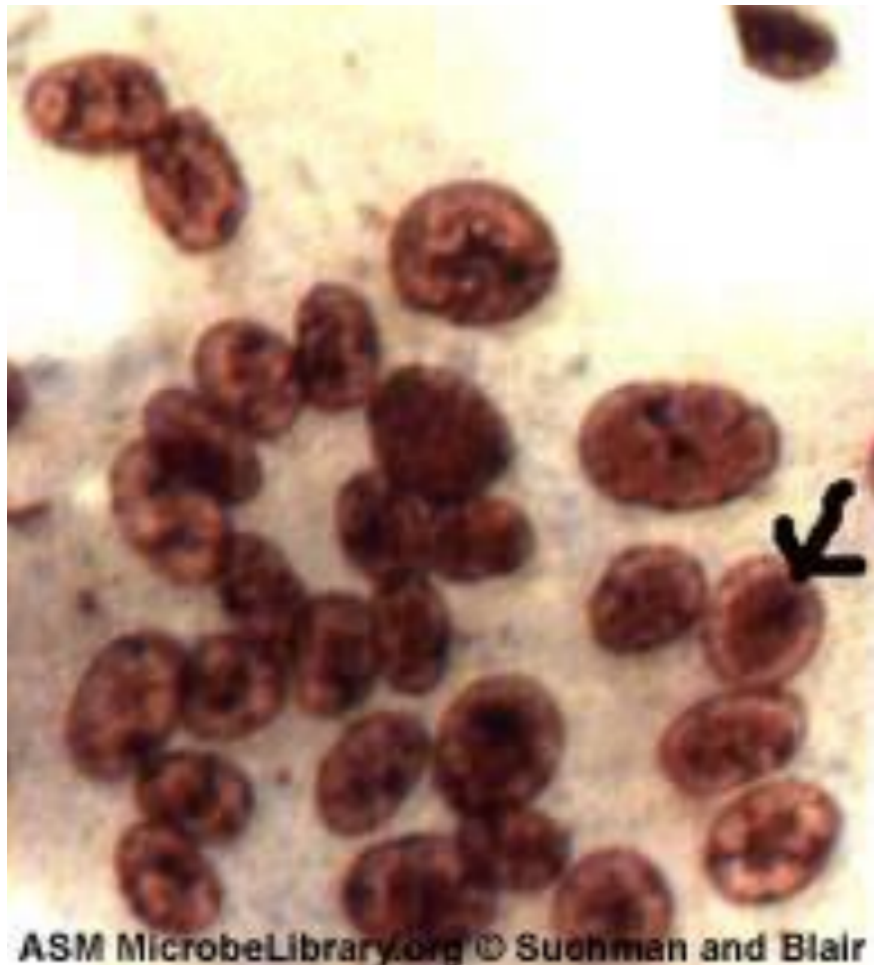
- **inclusion bodies:**

- obvykle **místa syntézy virových proteinů** nebo **replikace virového genomu** nebo místa vzniklá po působení viru
- **liší se dle infikujícího viru** (různý počet, velikost a tvar, v jádře/cytoplazmě, eosinofilní/bazofilní)
- **pozorovatelné po obarvení** (Giemsa: lze vidět fúzi buněk, vakuolizaci cytoplazmy, inkluze)



# Cytopatický efekt (10)

- inclusion bodies



# Průkaz viru

- **výsledek** izolace viru většinou **není vidět** (výjimky CPE, poky)
- **Hirstův test** (test hemaglutinace)
  - využíváme schopnosti viru shlukovat erythrocyty
  - **amniová tekutina s pomnoženým virem aglutinuje krvinky** → průkaz přítomnosti viru
  - přítomnost **specifického viru** provedeme **přidáním protilátek** proti hledanému viru → **v pozitivním případě inhibujeme aglutinaci = HIT**
- **hemadsorpce na buněčných kulturách (chřipka)**
  - i zdánlivě nezměněné buňky, v nichž se pomnožil virus, adsorbují na svůj povrch erythrocyty



# Průkaz viru chřipky

- diagnostika má epidemiologický význam (důkaz, že epidemii působí opravdu chřipka)
- **přímý průkaz** (výplach z nosohltanu nebo výtěr do speciálního transportního média)
  - 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:**
  - klasické serologické metody – párová séra, KFR, HIT
  - ELISA – IgM, IgA

# Úkol 1: Stanovení hemaglutinační jednotky viru chřipky v amniové tekutině (Hirstův test)

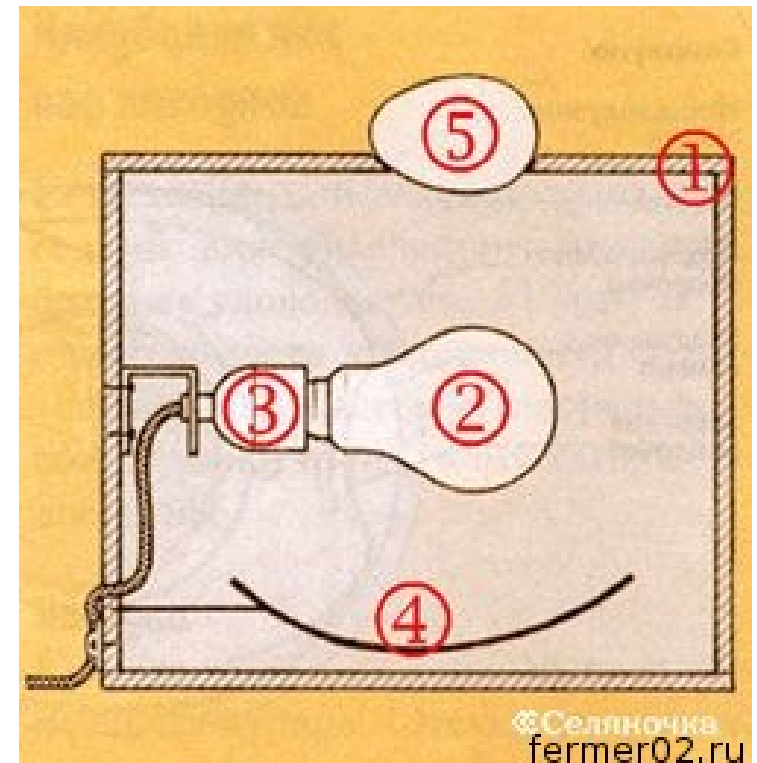
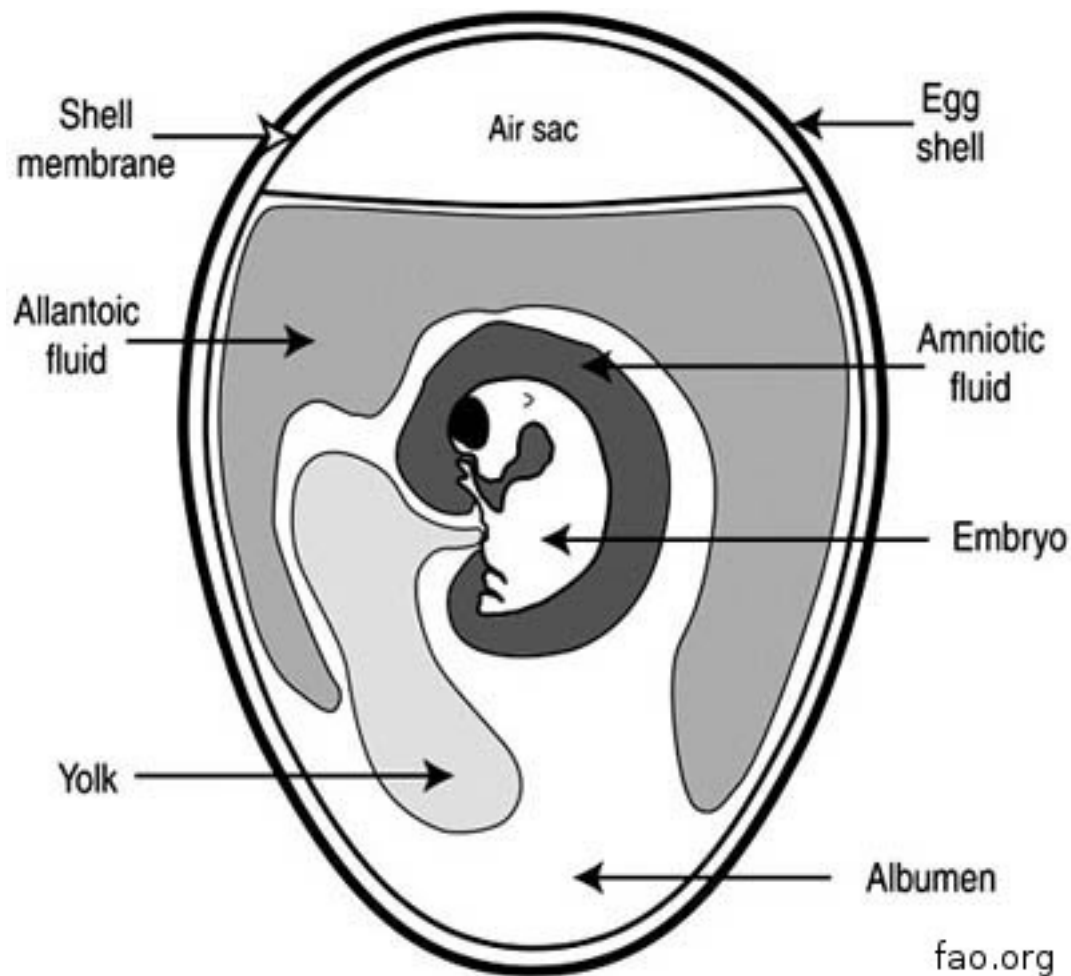
- **do 8 důlků** v destičce napipetujte po **25  $\mu$ l** **fyziologického roztoku**
- **1. důlek** slouží jako **kontrola** erytrocytů
- **do 2. důlku přidejte 25  $\mu$ l amniové tekutiny, promíchejte a 25  $\mu$ l přeneste** do třetího důlku
- **pokračujte v geometrickém ředění do 1:128**, přebývajících 25  $\mu$ l z posledního důlku odpipetujte do dezinfekčního roztoku
- **do všech důlků** přidejte **25  $\mu$ l** suspenze kuřecích erytrocytů
- **reakci odečtěte po 90 minutách** při lab. teplotě

# Úkol 1: Vyhodnocení

- **vyhodnoťte virové shlukování erytrocytů**
- **zakreslete výsledky a запиšte** jaké **ředění** odpovídá jedné hemaglutinační jednotce (1 HU)

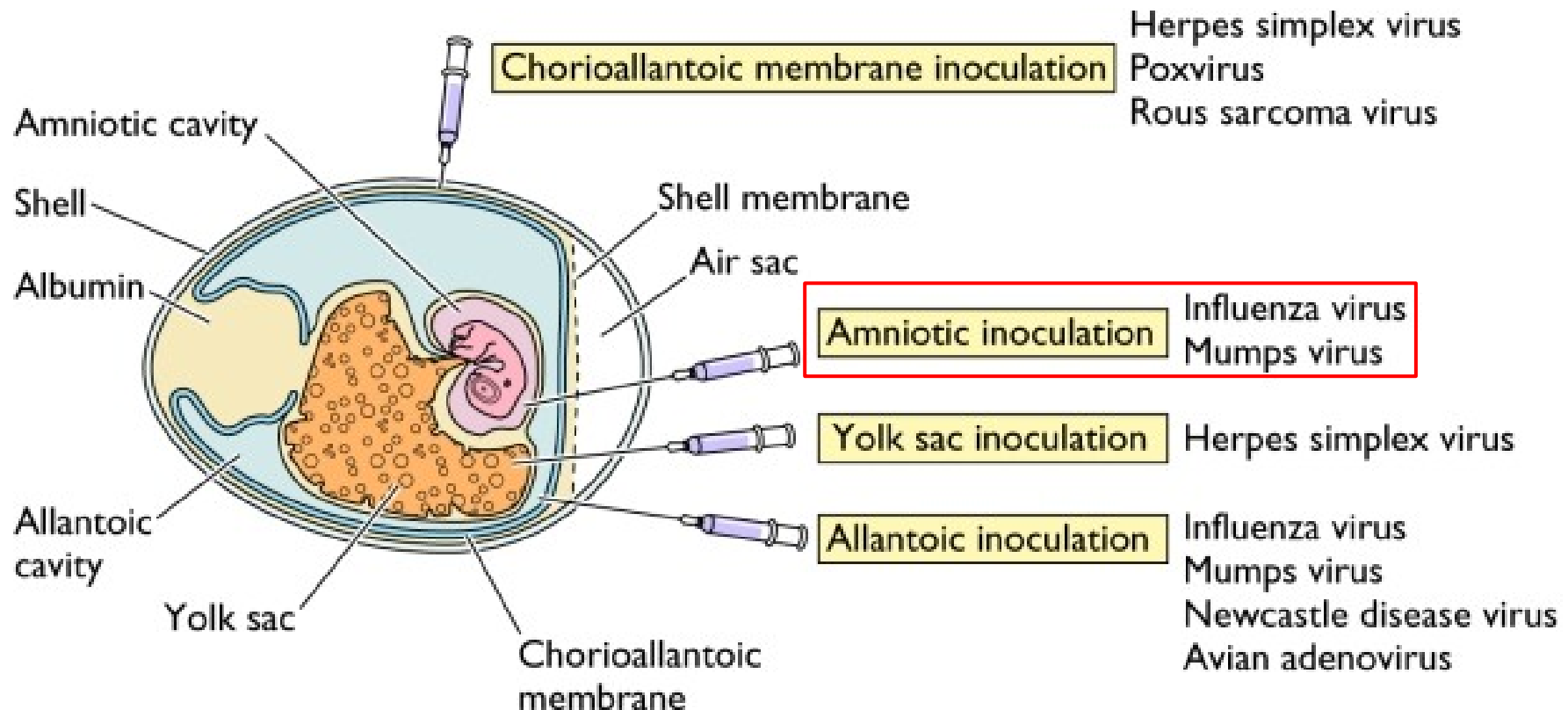
# Úkol 2: Izolace virů na kuřecím zárodku

- **ovoskop** = prosvětlovač vajec



# Úkol 2: Izolace virů na kuřecím zárodku (2)

- očkování do amnia



Adapted from E. Fenner et al., *The Biology of Animal Viruses* (Academic Press, New York, N.Y., 1974), with permission.

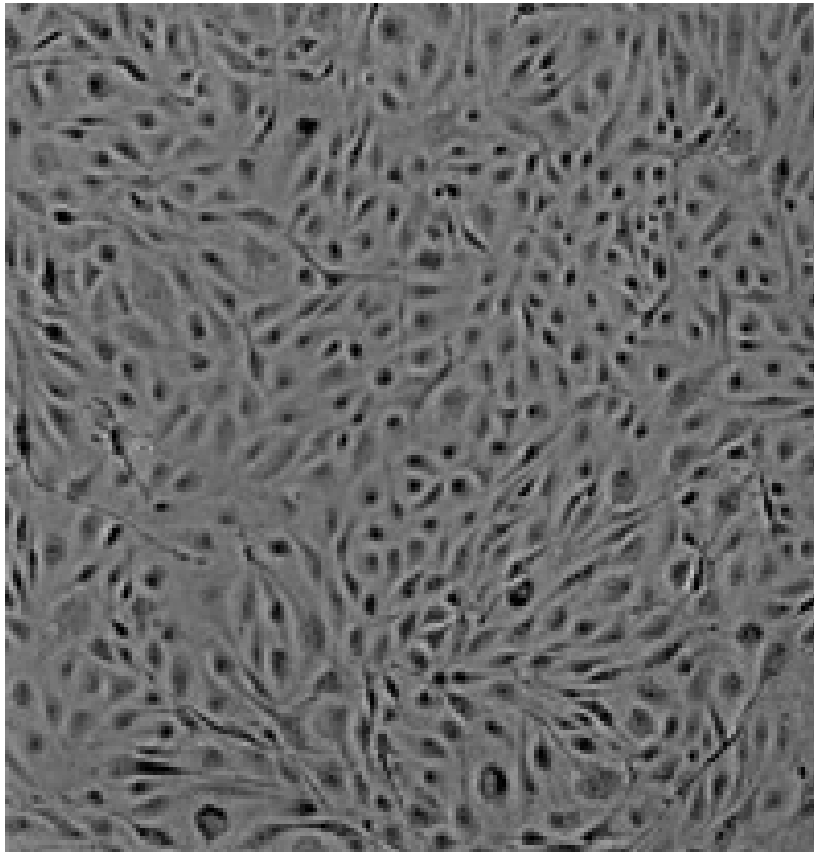
plus.google.com

## Úkol 2: Izolace virů na kuřecím zárodku (3)

- vejce položte naležato, prosviťte v ovoskopu a naznačte tužkou **okraj vzduchové bubliny** (širší konec)
- **odřízněte skořápku** nad vzduchovou bublinou
- na papírovou blanku **kápněte alkohol**
- vejce opět prosviťte v ovoskopu a **vyznačte pozici zárodku**, resp. jeho oka
- **jehlou se snažte trefit do oka kuřecího zárodku** – buď přímo v ovoskopu, nebo případně mimo něj
- **aplikujte inkoust** (atrament)
- **zvětšete si otvor** ve vejci pomocí pinzety, poté vejce vyklopte do Petriho misky a **sledujte výsledek**

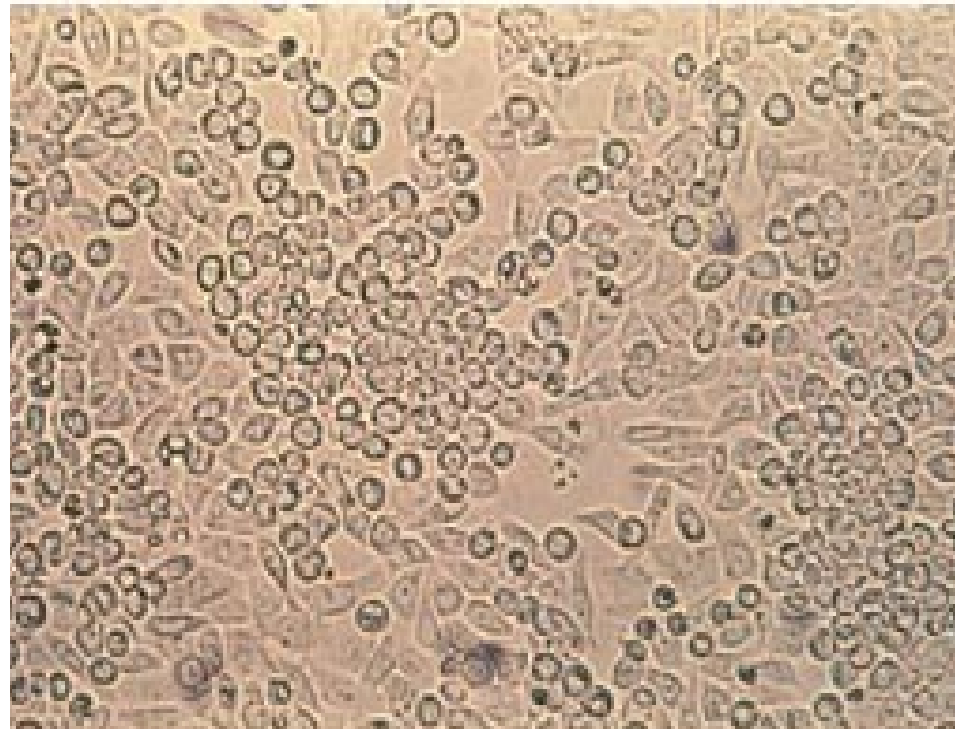
# Úkol 3: Hodnocení buněčných kultur

- buněčná kultura bez a s CPE



[http://cmir.mgh.harvard.edu/cellbio/cellculture.php?menuID\\_=122](http://cmir.mgh.harvard.edu/cellbio/cellculture.php?menuID_=122)

**HSV Growing in Tissue Culture**



[www.herpesdiagnosis.com/diagnose.html](http://www.herpesdiagnosis.com/diagnose.html)



# Úkol 4: Diagnostika parotitidy reakcí ELISA

- vyhodnoťte reakci ELISA ve třídách protilátek IgG a IgM, interpretujte

# Úkol 5: Stanovení KFR protilátek proti nejčastějším původcům respiračních nákaz

- vyhodnoťte KFR
- na destičce je **vyšetřena dvojice sér jediného pacienta** s atypickou pneumonií
- **POZ = sedimentace erytrocytů**
- **NEG = hemolýza**
- za **signifikantní** považujte **čtyřnásobný vzestup titru**

# Úkol 5: Stanovení KFR protilátek proti nejčastějším původcům respiračních nákaz (2)

- **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**

# Úkol 5: Stanovení KFR protilátek proti nejčastějším původcům respiračních nákaz (3)

- **závěry:**
  - ***Mycoplasma pneumoniae*** je pravděpodobným **původcem onemocnění**
  - **doporučena ATB léčba** (např. doxycyklinem)
  - pacient se již za života **setkal s chřipkou A a RS virem** (respirační synciciální virus, pneumovirus)
  - pacient se nikdy neseťkal s ostatními testovanými viry

# Úkol 6: Zjištění titru protilátek proti viru klíšťové encefalitidy pomocí HIT

- vyhodnoťte HIT
- na destičce jsou vyšetřena **párová séra čtyř pacientů**
- **POZ = sedimentace erytrocytů**
- **NEG = hemaglutinace**
- za signifikantní považujte čtyřnásobný vzestup titru
- **ředění v prvním sloupci je 1:5**
- zkontrolujte kontrolu antigenu a erytrocytů v dolních rozích destičky

# Úkol 6: Zjištění titru protilátek proti viru klíšťové encefalitidy pomocí HIT

- **závěry:**
  - **jeden pacient se s klíšťovou encefalitidou vůbec neseťkal**
  - **dva ji prodělali (třeba i bez příznaků/možné očkování)**
  - **jeden je pravděpodobně ve fázi akutního onemocnění (16× vzestup titru)**

# Úkol 11: Diagnostika HAV

- **úkol 11a** stanovujeme anti-HAV **IgM**
- **úkol 11b** stanovujeme **celkové protilátky** anti-HAV (IgM + IgG + ostatní)
- výpočet cut off:
  - průměr „c. o.“ důlků C1 a D1 = cut off
  - hodnoty 110 % cut off a více = pozitivní
  - hodnoty 90 % cut off a méně = negativní
  - hodnoty 90–110 % cut off = hraniční
- stanovení IgM + celkových protilátek je alternativou ke stanovení IgM a IgG



# Úkol 12: Diagnostika HBV

- úkol 12a + b: stanovení **HBsAg** a **HBeAg**
- úkol 12c + d: stanovení **anti-HBs** a **anti-HBe**
- výpočet cut off: průměr C1 a D1
  - hodnoty 110 % cut off a více = pozitivní
  - hodnoty 90 % cut off a méně = negativní
  - hodnoty 90–110 % cut off = hraniční
- HBsAg (přítomnost viru v organismu v jakémkoli období infekce)
- HBeAg (vylučována pouze během replikace viru)
- anti-HBs (po prodělané infekci nebo očkování)
- anti-HBe (po prodělané infekci)

# Úkol 13: Diagnostika HCV

- úkol 13a: **PCR**, elektroforéza
- úkol 13b: průkaz anti-HCV metodou **ELISA**
- výpočet cut off: průměr negativních kontrol (důlku B1, C1 a D1) + 0,050
  - hodnoty 110 % cut off a více = pozitivní
  - hodnoty 90 % cut off a méně = negativní
  - hodnoty 90–110 % cut off = hraniční)

# Dodatečné indicie k úkolu č. 14

- Pacient C – ikterický stav trvá několik týdnů, přetím potíže neměl
- Pacient D – ikterický stav již přetrvává několik let, ale neřešil to
- Pacient E – ultrazvuk ukazuje přítomnost útvarů v oblasti žlučníku. Urobilinogen negativní, stolice acholická
- Pacient G – z anamnézy: před deseti dny byl v kontaktu s kamarádem, u kterého se později potvrdila virová hepatitida A
- Pacient H – u pacienta snížená sérová hladina ceruloplasminu a zvýšené vylučování mědi močí. Přítomna též anémie a neurologické projevy

# Úkol č. 14 - souhrn výsledků

	a-HAV IgM	a-HAV TOTAL	HBsAg	HBeAg	a-HBs	a-HBe	HCV PCR	a-HCV
<b>A</b>	+	+	-	-	-	-	-	-
<b>B</b>	-	-	-	-	-	-	+	+
<b>C</b>	-	-	+	+	-	-	-	-
<b>D</b>	-	+	+	-	-	+/-	-	-
<b>E</b>	-	+	-	-	-	-	-	-
<b>F</b>	-	-	-	-	+	+	-	-
<b>G</b>	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>H</b>	-	-	-	-	-	-	-	-

# Úkol č. 14 - závěr k pacientům

- A: akutní hepatitida A
- B: akutní hepatitida C
- C: akutní hepatitida B
- D: chronická (neaktivní) hepatitida B; v dětství prodělal VHA (nebo je očkován)
- E: současný ikterus zřejmě způsobily kameny; také on kdysi asi prodělal VHA (nebo je očkován)
- F: původ současné žloutenky nejasný, nutno vyšetřovat dále; prodělal VHB, vyléčen
- G: příliš čerstvá hepatitida A, ještě nemá vytvořeny protilátky
- H: Wilsonova choroba (nejde o infekci)

# Úkol 15: Vyšetření protilátek anti-HIV metodou ELISA

- výpočet cut off:
  - průměr „c. o.“ důlků C1 a D1 = cut off
  - hodnoty 110 % cut off a více = pozitivní
  - hodnoty 90 % cut off a méně = negativní
  - hodnoty 90–110 % cut off = hraniční
- pozitivní či hraniční séra je třeba konfirmovat (zaslat do NRL v Praze k ověření)
- v ČR registrujeme více než 2500 HIV pacientů

# Úkol 16: Diagnostika virů čeledi *Herpesviridae*

- vyplněno za vás
- **tvorba tzv. poků** – viditelných struktur na chorioalantoidní membráně



# Úkol 17: Praktická diagnostika infekční mononukleózy

- zhodnoťte výsledky daných pacientů proti EB-virovým antigenům a vyplňte následující tabulky s výsledky
- **VCA** – virový kapsidový antigen – u čerstvých infekcí jsou typické **protilátky IgM a nízkavidní IgG**
- **EBNA** – Epstein-Barr (virový) nukleární antigen – **nejsou přítomny u čerstvých infekcí**, většinou jsou přítomny u latence a reaktivace
- interpretujte podle tabulky v protokolu

# Po tomto cvičení byste měli umět

- klasifikovat viry na základě jejich NK a obalů, stručně popsat replikaci virů
- popsat agens způsobující atypické pneumonie, včetně diagnostických možností
- popsat viry spalniček, příušnic a zarděnek
- popsat viry hepatitid, virus HIV a herpetické viry včetně možných zdrojů nákazy
- popsat metody očkování do jednotlivých částí kuřecího zárodku
- rozeznat buněčné kultury s přítomností CPE
- správně posoudit výsledky různých laboratorních vyšetření