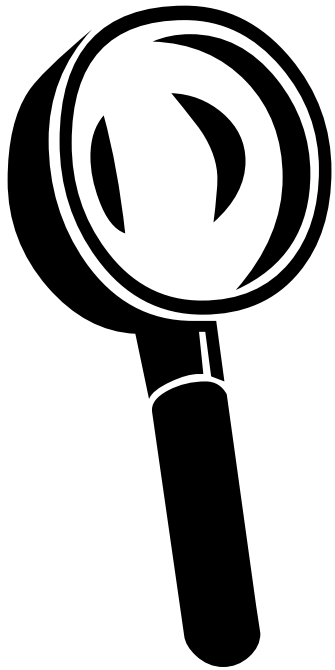


Mikrobiologický ústav uvádí

NA STOPĚ PACHATELE

Díl devátý: Klinická virologie



Autor prezentace: Ondřej Zahradníček (kontakt: zahradnicek@fnusa.cz). K praktickému cvičení pro Bi7170c

Hlavní obsah

Diagnostika virů I (diagnostika virů hepatitid a HIV)

Diagnostika virů II (diagnostika vybraných respiračních a některých dalších virů)

VIRYI

Obsah této části prezentace

Viry

Viry hepatitid

HIV

Diagnostika hepatitid a HIV infekce

Praktické aspekty diagnostiky

Kontrolní otázky

virvy

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.**

Co jsou to vlastně viry?

- Viry jsou **nebuněčné částičky**, vedou se diskuse, zda jsou to vůbec živé 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

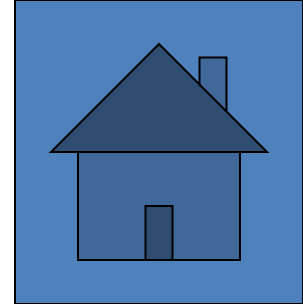
- **Virion není buňka.** Viriony mají menší rozměry než většina buněk včetně bakteriálních: nejčastěji 20–300 nm
- **Skladba virionu**
 - nukleokapsida nebo jádro a kapsida
 - obal (u obalených virů)
 - u některých odlišná, atypická skladba (VHB)

Je-li virus právě přítomen v hostitelské buňce, jeho struktura a uspořádání je odlišná od viru vyskytujícího se ve vnějším prostředí

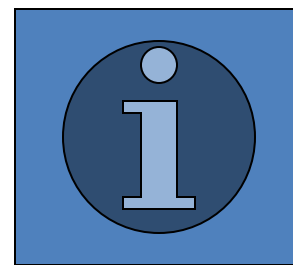
Nukleokapsida

- 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)
- Více o virech v bonusové části



Viry hepatitid

Viry hepatitid

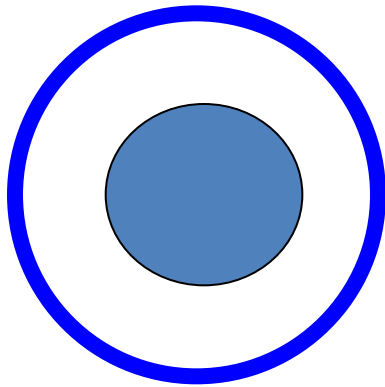
- Existuje pět hlavních typů virových hepatitid VHA až VHE, které způsobují viry HAV až HEV. Každý patří do jiné skupiny, **většina jsou RNA viry, ale virus hepatitidy B je DNA virus**
- **VHA a VHE** (pomůcka: samohlásky) se přenášejí **fekálně orální cestou** (ruce), **nepřecházejí do chronicity**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

Přehled hepatitid

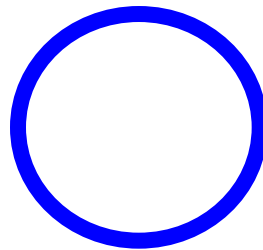
Hepatitida	Zařazení	Přenos
HAV	<i>Picornaviridae</i>	fekálně-orální
HBV	Zvláštní skupina DNA virů	sexuální, kreví
HCV (a HGV)	<i>Flaviviridae</i>	kreví
HDV	Delta agens – viroid	sexuální, kreví
HEV	Příbuzný kalicivirům	fekálně-orální

Virus hepatitidy B



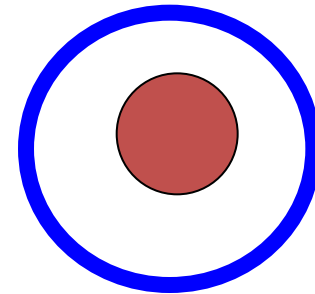
Kompletní
virion
(Daneho
tělísko)

42 nm



Pouhý
prázdný
HBsAg

22 nm



HBsAg,
uvnitř delta
agens
(VHD)

35 nm

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

Klasickým zdravotnickým problémem je zejména hepatitida typu B

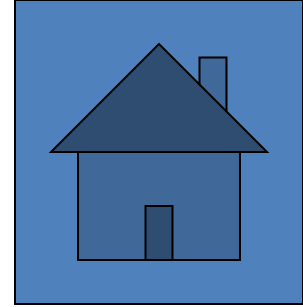
- **přechází do chronicity**, možnost cirhózy či karcinomu jater
- **dříve možný přenos ve zdravotnictví**, při dnešní úrovni zdravotnictví připadá v úvahu jen sexuální přenos a (stejně jako u hepatitidy C) i. v. narkomanie
- **screening hepatitidy B** běžný v řadě situací (před operacemi, v těhotenství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

Dva případy z hlášení KHS JMK (2008)

- **Žena nar. 1985**, BK, nezaměstnaná, PP 28. 4. svědění kůže, teplota, ikterus sklér, 2. 5. hospitalizace na KICH FN Brno, **v anamnéze před půl rokem abortus s kyretáží a extrakce zubu.**
- **Žena nar. 1986**, BM, nezaměstnaná. PP 31. 3. bolesti pod pravým žeberním obloukem, svědění kůže, nevolnost. 15. 4. ikterus kůže a sklér, 14. 4. hospitalizace na KICH FN Brno. **V anamnéze i. v. pervitin**

PP = první příznaky

Prevence a léčba hepatitid



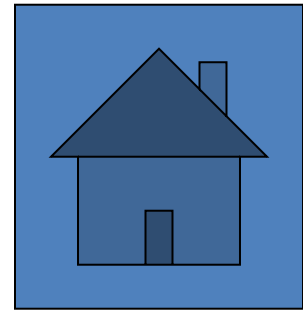
- **Očkování proti hepatitidě B** je nyní součástí normálního očkovacího kalendáře
- **Očkování proti hepatitidě A** je dostupné a doporučené např. i při cestách do jižní Evropy či severní Afriky. Možné i současné očkování proti hepatitidě A + B
- U některých hepatitid se používá léčba pomocí **interferonů**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

ННН V

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**
- V případě AIDS nedominují vlastní příznaky. Hlavním projevem nemoci je nápadný výskyt **oportunních infekcí** (toxoplasmóza, pneumocystóza, různé mykózy aj.) a **nádorů**

Diagnostika hepatitid a HIV infekce

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)
- **Přímé metody**
 - detekce **celého mikroba** (jako morfologické či fyziologické jednotky)
 - detekce **jeho části** (antigenu, DNA)
 - detekce **jeho produktu** (například toxinu)
- **Nepřímé metody:** detekce protilátek (pozitivita = kontakt s mikroblem v minulosti – týdny / měsíce / roky)

Přehled metod

- **Přímé metody** (práce se **vzorkem** či **kmenem**)
 - Mikroskopie – *u virů obtížná*
 - Kultivace – *u virů obtížná*
 - Biochemické metody – u virů se nepoužívají
 - Průkaz antigenu (pomocí protilátky)
 - Pokus na zvířeti (izolace, průkaz toxicity)
 - Průkaz nukleové kyseliny
- **Nepřímé metody** (práce se **vzorkem séra**)
 - Průkaz protilátek (pomocí antigenu)

Přímý průkaz virů

- **Kultivace** → **izolace** (virus se často nepomnoží, jen uchová živý). Vyžaduje živé buňky. Blíže v příští části.
- **Mikroskopie: elektronoptická** spíše pro výzkum než pro běžnou diagnostiku, ale i **optická** 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** – u virů 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

Zvláštnosti diagnostiky 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

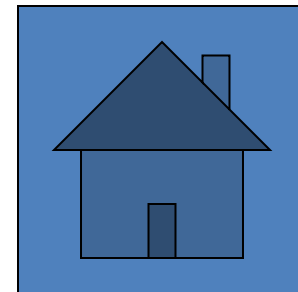
Delta agens

- 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

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

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)** 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

Praktické diagnostické přístupy

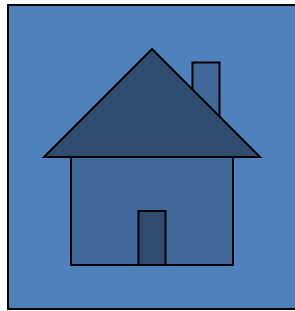
Praktická diagnostika hepatitid a HIV infekce: ELISA

- Ačkoli některé reakce ELISA slouží k průkazu antigenu a jiné k průkazu protilátek, **praktický přístup je obdobný.**
- **Počítání cut off:** průměr důlků cut off, nebo průměr negativních kontrol + konstanta
- Často **cut off $10 \pm \%$ = hraniční hodnoty**
- V některých případech, zvláště u diagnostiky VHA nevyšetřujeme protilátky IgM a IgG, nýbrž **IgM a celkové protilátky**. Je jasné, že negativní IgM a pozitivní celkové protilátky prakticky značí přítomnost protilátek IgG.

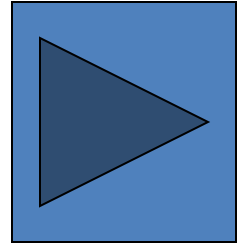
Praktická diagnostika hepatitid a HIV infekce: PCR

- PCR se používá hlavně u **diagnostiky HCV, případně HIV**
- Postup je **stejný, jako u jiných PCR**

Konec této části



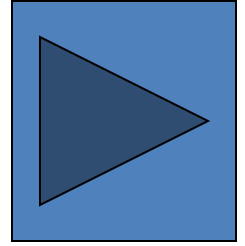
Více k virům



Množení (replikace) virů

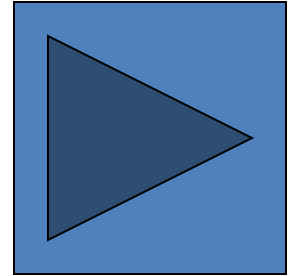
- probíhá buď **v jádře** (většinou u DNA virů), nebo **cytoplasmě** (většinou u RNA virů) hostitelské buňky.
- před replikací se virus musí **zbavit svých bílkovinných obalů**
- vlastní průběh replikace závisí na **konkrétním typu daného viru** (RNA/DNA, jednovláknové – ss/ dvouvláknové – ds).

Jednotlivé možnosti replikace



- **U většiny DNA virů** je DNA-polymerázami dotvořeno vždy komplementární vlákno
- **U hepadnavirů** (VHB) je DNA přepisována do RNA, podle té pak reverzní transkriptázou vzniká zase DNA
- **U RNA virů** se využívají RNA polymerázy
- **U retrovirů** (HIV) se podle RNA tvoří reverzní transkriptázou DNA, která je přepisována buněčnou RNA-polymerázou

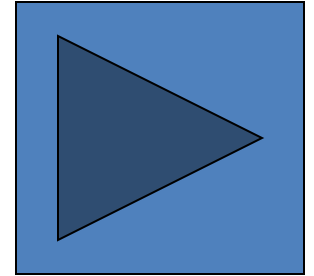
Tvorba virových bílkovin



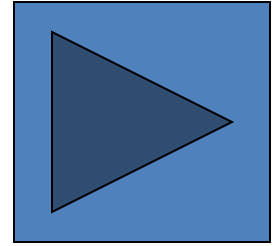
- je **nutná** k tomu, aby se virus po replikaci mohl z buňky uvolnit a šířit se dál.
- vlastní tvorba bílkovin opět **probíhá různě** podle toho, o který typ viru se jedná
- v každém případě virus částečně **využívá proteosyntetický aparát hostitelské buňky.**

Jednotlivé možnosti tvorby bílkovin

- **+ss RNA:** je možná přímá translace
- **-ss RNA:** musí se dotvořit + vlákno
- **ds RNA:** z – vlákna se dotváří + vlákno
- **retroviry:** reverzní transkriptázou se vytvoří DNA a pak už pracují buněčné polymerázy
- **ds DNA:** zpravidla se podle – vlákna tvoří + vlákno RNA
- **ss DNA:** dotvoří se druhé vlákno a pak je to už stejné jako u ds DNA



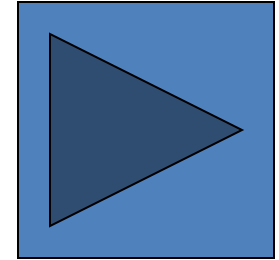
Viry závislé na jiných virech



Zvláštností jsou některé viry, které nemohou existovat bez spoluúčasti jiných virů

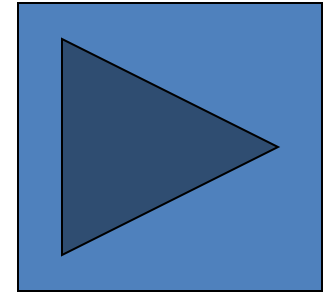
- **Adenoasociované viry (AAV)** patří mezi parvoviry. Replikace je možná pouze za přítomnosti pomocného viru (adenoviru)
- **Virus hepatitidy D** – delta agens – je viroid. Je to nekompletní částice, která je schopna přežít pouze v obalu viru hepatitidy B (tvořeném hlavně HBsAg).

Viry a vnější prostředí, desinfekce



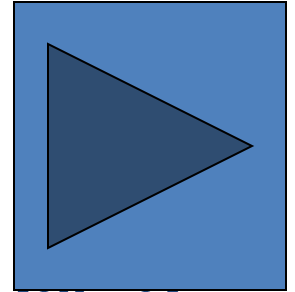
- **některé viry jsou hodně citlivé** (např. HIV)
- **jiné jsou zato mnohem odolnější** než bakterie (třeba rhinoviry).
- mnohé desinfekční prostředky, které působí na bakterie, **nepůsobí na viry nebo jsou nutné vyšší koncentrace**; týká se to zejména **neobalených virů**. Účinné bývají jodové preparáty a peroxidy.
- **velmi odolné** vůči desinfekci i vysokým teplotám jsou **priony**

Možnosti přenosu virů



- Cesty přenosu jsou u virů rozmanité, jsou ovšem prakticky stejné, **jako u bakterií**
- máme viry přenosné **kapénkovou infekcí, fekálně-orální cestou, sexuálním přenosem, přenašečem** (klíště, komár) či **krví** (injekce).
- u většiny virů je také možný **„vertikální“ přenos**, to jest z matky na plod.

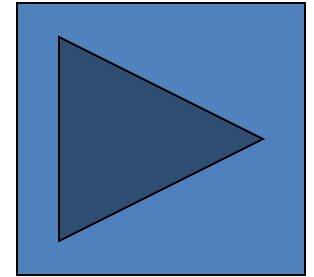
Faktory patogenity



- Na rozdíl od bakterií se u virů **často nerozlišují jednotlivé patogenní struktury**, spíše se virus jako celek považuje za patogenní částici.
- Tomu odpovídá i boj s infekcí, kdy **protilátky často celou virovou aktivitu neutralizují**.

S tím také souvisí větší význam neutralizačních metod v diagnostice.

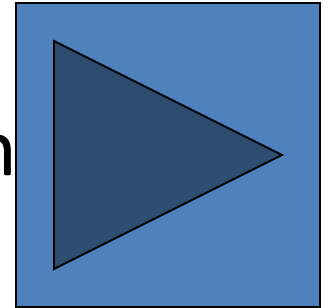
Průběh virové infekce



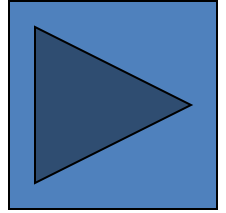
- u virů záněty probíhají jinak než u bakterií
- souvisí to zejména s **nitrobuněčným parazitismem virů**
- zejména je **menší účast granulocytů, větší účast lymfocytů, a význam buněčné imunity**
- také složky nespecifické humorální imunity jsou odlišné (zejména interferony).

Latentní infekce

- hostitelská buňka sice **umožní vniknutí viru do buňky**
- **neumožní však jeho množení** a uvolnění buňky
- zato **umožní jeho přežívání** v buňce nebo dokonce včlenění do chromozomu.
- v některých případech může dojit později k **aktivaci této latentní** (skryté) infekce, takže infekce vlastně znovu vypukne
- typické je to u některých **herpesvirů**.

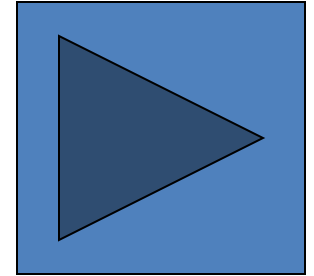


Viry a nádory



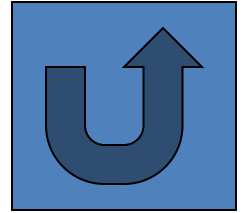
- Některé viry mají zřejmě vliv na **vznik některých nádorů**, zejména EB virus (původce infekční mononukleózy – podílí se na vzniku Burkittova lymfomu) a HHV8 spolu s HIV (vznik Kaposiho sarkomu), či lidský papilomavirus (HPV) – vliv na rakovinu děložního čípku
- Příčinou je to, že **virový promotor** v těchto případech může **aktivovat expresi onkogenů lidských buněk**, která by jinak byla potlačena (neprojevila by se).

Boj s viry I – antivirotika



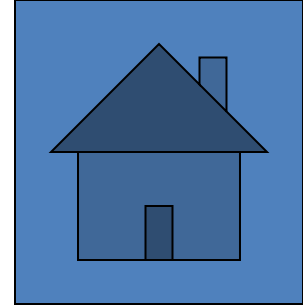
- Používají se **jen u některých virů**
- Zpravidla **jen dílčí význam v terapii**
- Mohou být celková či lokální (někdy i tatáž látka, např. acyklovir – HERPESIN)
- **Testování citlivosti *in vitro* zatím spíše experimentální**
- **Z nejznámějších:** acyklovir, famciklovir, ganciklovir (herpesviry), amantadin, rimantadin, oseltamivir, zanamivir (chřipka), azidotymidin, PMPA (virus HIV)

Boj s viry II – imunoterapie



- Používá se možnosti **pasivní imunizace (protilátky)** i **aktivní imunizace (očkování)**
- Z **očkování pravidelného kalendáře**:
 - **Živé oslabené viry**: spalničky, zarděnky, příušnice
 - **Neživé vakcíny**: virová hepatitida B, dětská obrna (Salk)
- Z **ostatních vakcín**: vzteklina (profylaxe, ne prevence), klíšťová encefalitida, VHA atd.
- Z **pasivní** např. protilátky proti VZV, HBV

Kontrolní otázky



- 1. Jaký je význam "celkových protilátek proti HAV"? Kdy uvažujeme o infekci VHA?
- 2. Co znamená v sérologii slovo „konfirmasi“?
- 3. Jakým způsobem probíhá konfirmace při diagnostice HIV?
- 4. Které jsou typické markery infekce hepatitidou B?
- 5. Která skupina osob je vysoce riziková z hlediska nákazy HCV?
- 6. Po jaké době po rizikové situaci (například kontakt s krví nebo sexuální styk bez kondomu) má smysl vyšetřit protilátky proti HIV?
- 7. Kde se skrývá viroid?
- 8. Které jsou typické metody pro diagnostiku infekce HCV?
- 9. Jaké jsou možnosti určování cut off u reakce ELISA?
- 10. Které typy hepatitid se přenášejí fekálně-orální cestou?

VIRY II

Obsah této části prezentace

Viry chřipky

Další respirační viry

Mykoplasmata

Virus klíšťové encefalitidy

Některé vlastnosti virů důležité pro diagnostiku

Přehled virologické diagnostiky

Mikroskopie ve virologii. Izolace virů

Nepřímé metody ve virologii

Kontrolní otázky

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

- Pojem se nyní považuje za **zastaralý**, nicméně se ho přidržíme pro popsání pneumonií, které
 - se vyznačují **pomalejším nástupem**, spíše neproduktivním kašlem a častou absencí klasických fyzikálních příznaků (ale RTG nález je přítomen)
 - nebývají způsobovány klasickými kultivovatelnými bakteriemi (*Streptococcus pneumoniae*)
 - **původci jsou**
 - **respirační viry (vizte dále)**
 - **atypické bakterie:** *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia (Chlamydophila) pneumoniae*, *Legionella* sp.
- **V případě bakteriálních původců je možná antibiotická léčba** (doxycyklin, makrolidy)

V rámci této prezentace jsou zmíněny viry

- **respirační**

- viry chřipky A a B

- viry parachřipky

- RS viry

- adenoviry

- *Mycoplasma pneumoniae* – není virus, ale diagnostikuje se virologickými metodami

- **virus klíšťové encefalitidy**

Viry chřipky

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** bývá chřipka u imunosuprimovaných (především delší trvání), těhotných, starších osob. Na druhou stranu, některé subtypy postihují více mladé, zdravé lidi paradoxně právě kvůli příliš dobré imunitě. Uplatňují se zde tzv. **cytokinové bouře** jako vlastní příčina zdravotních komplikací
- Existuje chřipka A, B a C. Za většinu epidemií ovšem může **virus chřipky A**

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 **antigenní posun – drift**, tedy přírodní mutace genů pro kódování antigenních determinant, nepřináší zcela nový typ viru
- Je také možná **antigenní výměna – shift**: dojde k přeskládání (reassortment) například mezi ptačím a lidským kmenem viru, takže vznikne zcela nový typ viru. Je možný jen u chřipky A, protože ostatní typy jsou čistě lidské
- Shift je umožněn **segmentovaným genomem**

Chřipkové pandemie

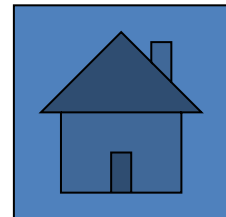
- Jak se viry mění, občas se objeví **nová varianta** a nikdo proti ní není chráněn. Takový virus je pak schopen vyvolávat epidemické výskyty, epidemie či dokonce **pandemie** na velkých územích. Samozřejmě, konkrétní průběh nelze nikdy předpovědět dopředu.
- Viry schopné epidemického výskytu v lidské populaci musí mít nejen **zvýšenou virulenci**, ale také schopnost přenosu **z člověka na člověka**. U ptačích virů taková schopnost zpravidla chybí. Jako „mixážní nádoba“ obvykle (ne ale nutně) slouží prasata. Ptačí faktory virulence se tedy stávají nebezpečnými až po **promíchání či rekombinaci s částmi savčích virů**.

Chřipkové pandemie 2

- Během 1. světové války zahynulo mnoho lidí na tzv. **španělskou chřipku**
- Během dalších desetiletí proběhlo několik relativně menších epidemií (Hongkongská chřipka, Singapurská chřipka)
- **Jedna ze zatím posledních epidemií** („prasečí chřipka“) byla způsobena virem patřícím do skupiny A:H1N1. Samotný pojem „A:H1N1“ neznačí nic nového, ale konkrétní struktura viru byla zvláštní, protože virus nesl části lidského, prasečího i ptačího původu

Chřipka – prevence, profylaxe, léčba

- **Prevence** je možná očkováním, které je doporučeno hlavně oslabeným osobám. Očkování chrání jen před viry aktuálně přítomnými v populaci, nikoli před novými subtypy viru.
- 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, známé pod firemními názvy TAMIFLU a RELENZA).
- Antivirotika je třeba užívat jen ve zdůvodněných případech. Zbytečné „preventivní“ užívání kvůli panice může vést **vývoji rezistence**.



Další
respirační
viry

Viry parachřipky

- Jsou to paramyxoviry, blízce 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 těž, 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 buněčné kultuře.

RS virus (respirační syncyziální virus, pneumovirus)

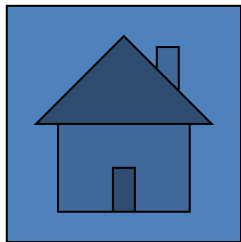
- Je vzdáleně příbuzný virům parachřipek
- RS-virus je **významným patogenem dolních cest dýchacích v prvním půlroce života**
- Jak napovídá název, způsobují **splývání nakažených buněk** (syncyia – soubuní)
- **Diagnostika** – ELISA, přímo buněčné kultury
- *Metapneumovirus je novější virus, který je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

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 **tvár 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

Lidské adenoviry

- Mohou vyvolávat **rýmy (nádchy), 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 buněčných kulturách) a serologická (komplementfixace)
- **Cílená léčba** není možná



Mycoplasmas

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

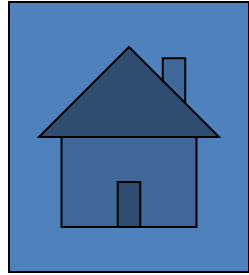
- důležití původci pohlavně přenosných nákaz
- záněty pochvy, močové trubice aj.
- na druhou stranu jsou často přítomny v uretře zdravých osob

Další urogenitální mykoplasmata:

- *Mycoplasma genitalium*: také na pohlavních orgánech, význam nejasný
- *Mycoplasma penetrans*: u nemocných AIDS jako oportunní infekce

Mykoplasmata: diagnostika a léčba

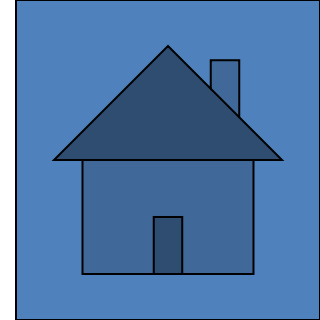
- Kultivace na nebuněčných, avšak nicméně speciálních médiích
- **KFR, ELISA** aj. Obvykle zároveň se serologií respiračních virů
- Nelze použít antibiotika, působící na buněčnou stěnu
- Účinné jsou **tetracykliny**, u dětí je nutno použít makrolidy (tj. erytromycin a spol.)
- U *M. pneumoniae* se zkouší očkování – ve stádiu výzkumů.



Virus
klíšťové
encefalitidy

Virus klíšťové encefalitidy

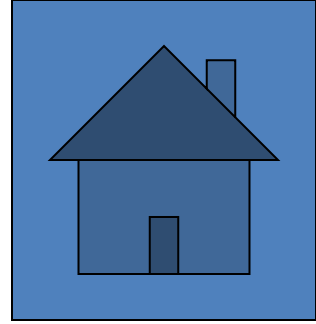
Virus klíšťové encefalitidy



- **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 myšatech, případně PCR

Některé
vlastnosti
virů důležité pro diagnostiku

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 serologickém tématu v **hemaglutinačně** inhibičním testu. Podobná je také schopnost **hemadsorpce**
- Z dalších vlastností: **Virus potřebuje cizí buňky.** Takové nalezne např. ve buněčné kultuře nebo ve strukturách oplodněného vejce s kuřecím zárodkem

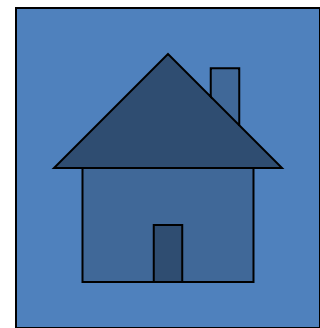
Přehled virologické diagnostiky

Virologická diagnostika

- **Přímý průkaz**
 - **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**

Chřipka – diagnostika

- Diagnostika má **epidemiologický význam** (důkaz, že epidemii působí opravdu chřipka)
- **Přímý průkaz chřipky** (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 chřipky**
 - klasické vyšetření – párová séra, KFR, HIT
 - ELISA – IgM, IgA



Mikroskopie

ve virologii.

Izolace virů

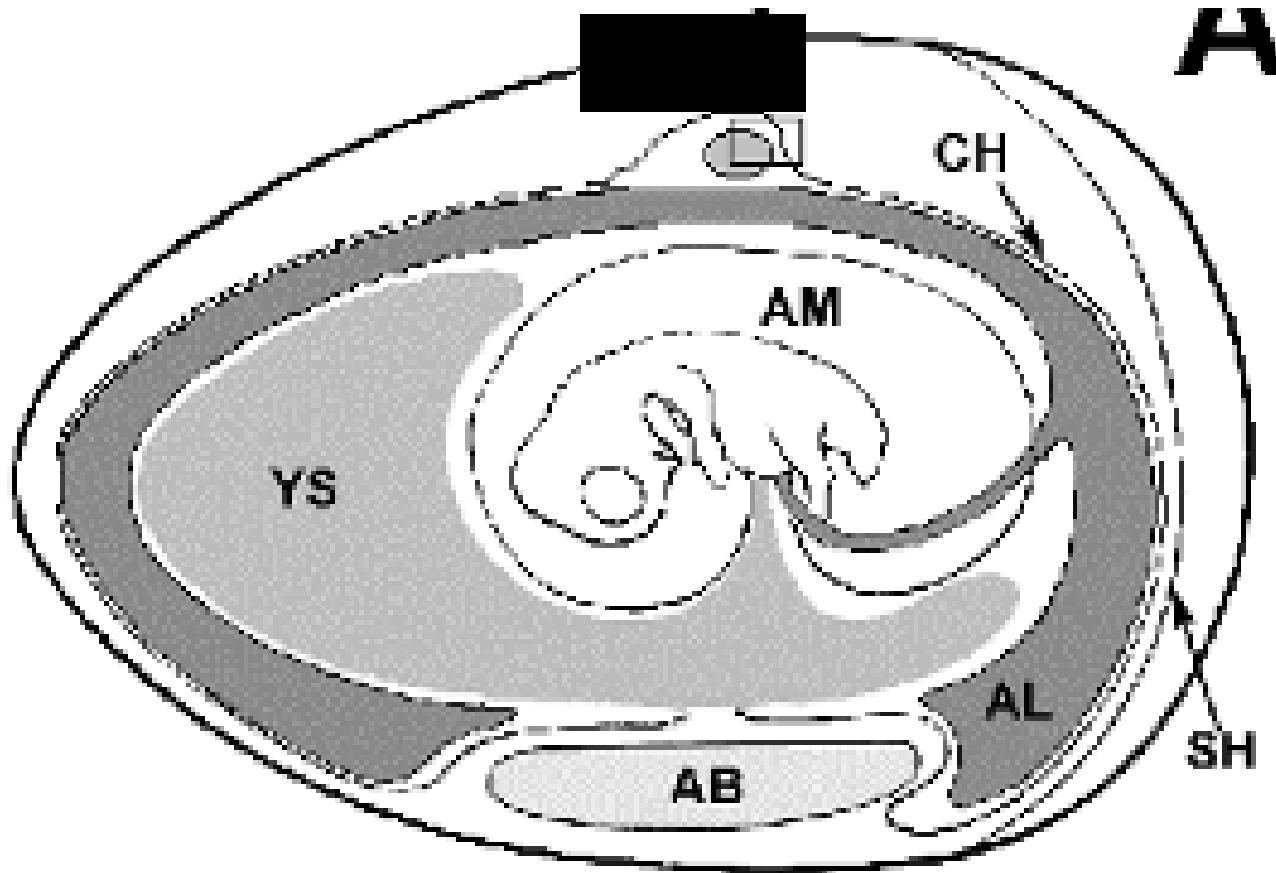
Mikroskopie ve virologii

- **Elektronová mikroskopie** je vhodná k pozorování většiny virů. Je však velmi nákladná a není vždy dostupná (= ne k rutinní diagnostice)
- **Optická mikroskopie** se dá použít
 - K pozorování **cytopatických efektů** in vitro (řada různých virů)
 - K pozorování **buněčných inkluzí** in vivo (Negriho tělíka u vztekliny) – spíše v rámci histologie než mikrobiologie
 - K pozorování **velikých virů** (poxviry) – výjimečně, pro praxi se nehodí

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; v ostatních případech není výsledek izolace na zárodku viditelný)
- **Buněčné kultury (kultury „nesmrtelných“ zvířecích či lidských buněk – embryonálních či nádorových):** například LEP, HeLa, opičí ledviny a různé jiné. Některé (jen některé!) viry dělají na buněčné kultuře cytopatický efekt (CPE)

Oploďněné vejce – schema



SH –
skořápková
(papírová)
membrána

AB – bílek

<http://www.scielo.cl/fbpe/img/bres/v38n4/fig02.gif>

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

CH – chorioallantoidní membrána (CAM)

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)*

Izolace viru na oplodněném vejci prakticky

Ovoskop

- 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 nastrojato**
- **Druhý je oválný k umístění vejce naležato**

Aplikace viru do amniové dutiny: jak to provést

- 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 virus**
- **Vejce opět zavíčkujte a inkubujte několik týdnů**

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**
- U virů **z amniové tekutiny** se používá **Hirstův test** – průkaz **schopnosti viru shlukovat krvinky**. V případě positivity se zjišťuje, které specifické protilátky jsou schopny shlukování zabránit (jde tedy o HIT použitý zde k přímému průkazu)
- U virů z buněčných kultur (např. viru chřipky z kultury opičích ledvin) se testuje **schopnost virové hemadsorpce**

Hirstův test prakticky

F = fyziolog. roztok

V = virus (amniová tekutina)

E = erythrocyty

0.2 ml F	0.2 ml F	0.2 ml F	0.2 ml F	0.2 ml F	0.2 ml F	0.2 ml F	0.2 ml F
-----	0.2 ml V	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml
	míchej pipetuj	míchej pipetuj	míchej pipetuj	míchej pipetuj	míchej pipetuj	míchej pipetuj	míchej pipetuj
0.2 ml E	0.2 ml E	0.2 ml E	0.2 ml E	0.2 ml E	0.2 ml E	0.2 ml E	0.2 ml E

do desinfekce

Cytopatický efekt (CPE) na buněčné kultuře

- Jen zřídka se cytopatický efekt viru na buňku projeví podstatnou **změnou metabolismu**, která by se pak při přidání indikátoru projevila barevnou změnou viditelnou makroskopicky (jak bychom viděli u **virus neutralizačního testu**)
- Častěji CPE pozorujeme **v mikroskopu**:
 - **zakulacení buněk**
 - **ztráta desmosomů mezi buňkami**
 - **ztráta uspořádání jedním směrem**
 - **celkově nastává „místo řádu chaos“**
- **Mnohé viry ovšem na buněčných kulturách nedělají vůbec žádný cytopatický efekt**

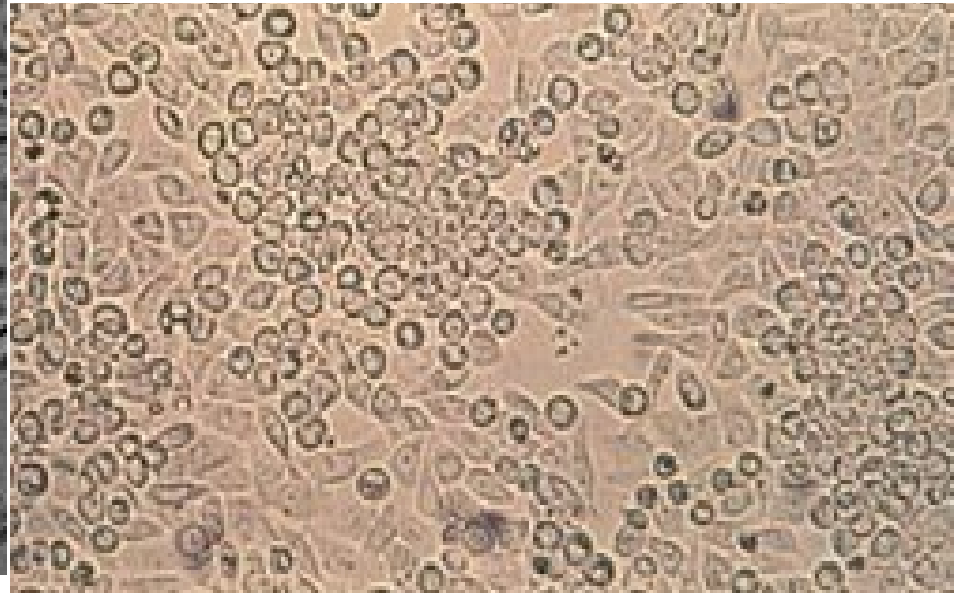
Praktické pozorování buněčných kultur

- Strčte si do mikroskopu **celé zkumavky tak jak jsou**, snažte se zaostřit na vnitřní stěnu.
- Možná uvidíte **buněčné kultury**, v některých možná i s **cytopatickým efektem**
- Zkušené oko rozezná různé buněčné kultury a případně také různé typy cytopatických efektů

HSV Growing in Tissue Culture

Takže tady CPE je...

...kdežto zde není

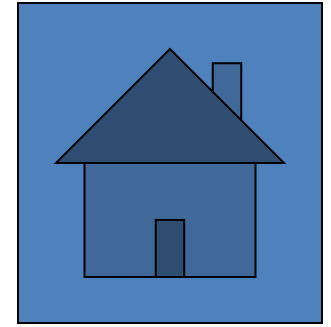


http://cmir.mgh.harvard.edu/cellbio/cellculture.php?menuID_=122

www.herpesdiagnosis.com/diagnose.html

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

Techniky shell-vials



- 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)

Nepřímé metody ve virologii

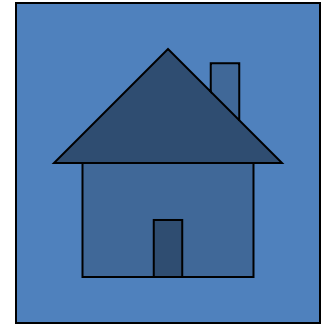
KFR u respiračních virů – příklad

- 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“)
- Titr 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)

HIT – klíšťová encefalitida (příklad)

- 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

Konec



Kontrolní otázky

- 1. Jak se ve virologii používá elektronová a optická mikroskopie?
- 2. Co znamenají termíny „buněčná kultura“ a „cytopatický efekt“?
- 3. Které části oplodněného vejce se využívají k pěstování virů?
- 4. Proč se v diagnostice virů někdy užívají pokusná zvířata?
- 5. Jaké vzorky a metody se používají při virologické diagnostice chřipky?
- 6. Které metody průkazu virů vyžadují odběr dvou vzorků a jaký je ideální odstup mezi prvním a druhým odběrem?
- 7. Na čem jsou založeny techniky shells-vials?
- 8. Které jsou typické metody nepřímého průkazu virů?
- 9. Co je zač *Mycoplasma pneumoniae*?
- 10. Co znamená zkratka „RS virus“?

