

Základy lékařské virologie

MUDr. Jana Bednářová, PhD.
Oddělení klinické mikrobiologie
Fakultní nemocnice Brno

Klinická mikrobiologie

- mikrobiologie = věda o mikrobech
 - ✓ viry a priony - virologie
 - ✓ bakterie - bakteriologie
 - ✓ kvasinky a plísňe - mykologie
 - ✓ paraziti - parazitologie
- klinická mikrobiologie se zabývá etiologií, patogenezí a imunogenezí onemocnění vyvolaných mikroby

Definice viru

- lat. *virus* – „šťáva, jed“, v lékařské terminologii „infekční činitel“
- „Virus je špatná zpráva zabalená do bílkoviny“ (*Sir Peter Brian Medawar, nositel Nobelovy ceny za fyziologii a lékařství v roce 1960*)
- „Viry můžeme s trochou nadsázky definovat jako Tolkienovy Nazguly, bytosti ani živé, ani mrtvé, pohybující se v zemi nikoho, na frontě mezi životem a neživotem.“ (*Marek Orko Vácha, Tančící skály, 2003*)

Povaha virů

- viry jsou nebuněčné částice tvořené nukleovou kyselinou (DNA nebo RNA) a bílkovinou, množí se jen v živých hostitelských buňkách



- viry nejsou organizovány jako buňky, ale jako částice
- obsahují jediný typ nukleové kyseliny: buď RNA nebo DNA
- nemnoží se dělením, ale syntézou svých složek
- syntéza je závislá na ribosomech hostitelské buňky

Viry jako mikroorganismy

- nejsou viditelné běžným mikroskopem
- nerostou na kultivačních půdách
- nejsou citlivé na antibiotika

- šíří se v populaci
- vyvolávají onemocnění
- spouští imunitní reakci
- diagnostikují se metodami přímého a nepřímého průkazu

Historie virologie

- starověké civilizace - první popisy onemocnění virového původu, viry jako původci nebyly známy, studovány pouze projevy onemocnění (pravé neštovice, přenosná dětská obrna, vzteklna...)



Memphis, Egypt, 1400 př.n.l.

1892: objev infekční virové částice

- virus mozaikové choroby tabáku
- Dimitrij Ivanovskij (1864 – 1920)
- dokázal, že šťáva z listů nakažených mozaikovou chorobou tabáku zůstává infekční i po filtraci přes porcelánový bakteriologický filtr
- domníval se, že jde o bakteriální toxin, který označil termínem „virus“

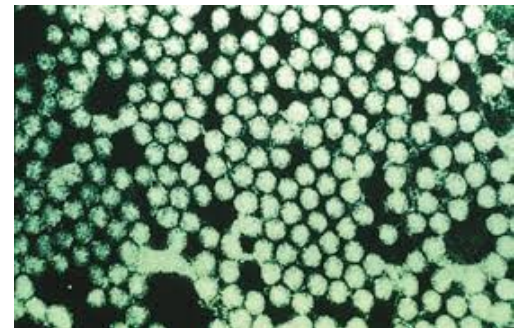
Mozaiková choroba tabáku



První živočišný virus

- virus slintavky a kulhavky
- 1898: Friedrich Löffler a Paul Frosch provedli první pokusný přenos živočišného viru
- filtrovali tekutinu vzniklou rozmělněním sliznice infikovaných zvířat
- filtrát vyvolal infekci u dalších zvířat – potvrzení mikroorganismu menšího než bakterie jako původce onemocnění

Virus slintavky a kulhavky



První lidský virus

- virus žluté zimnice
- velké epidemie v 17. – 19. století v Africe, Jižní a Střední Americe
- 1881: Carlos Finlay popsal přenos žluté zimnice komárem *Aedes aegypti*
- 1902: Walter Reed objevil virus žluté zimnice a potvrdil přenos komárem

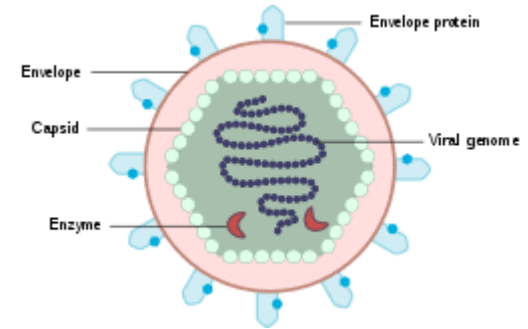


Carlos Finlay



Walter Reed

Stavba virů



virion = virová částice

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

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

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

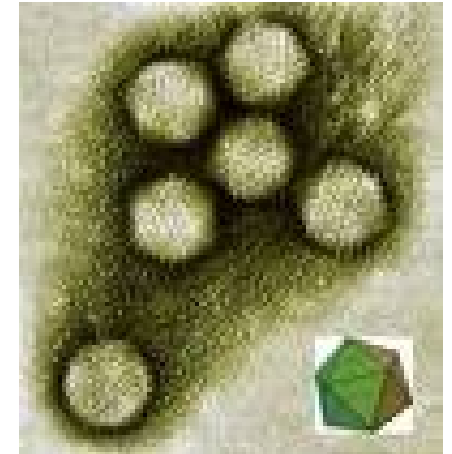
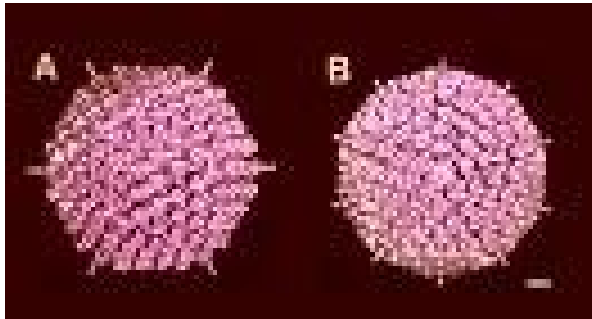
Nukleová kyselina

- typ a organizace virového genomu:
 - RNA nebo DNA
 - jednovláknová nebo dvouvláknová
 - segmentovaná nebo nesegmentovaná
 - lineární nebo kruhová
 - pseudodiploidní genom (retroviry – dvě shodná pozitivní vlákna RNA)

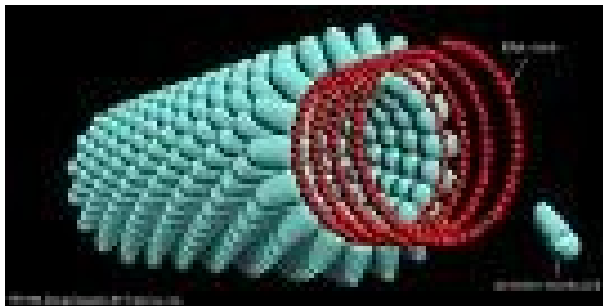
Kapsida

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

Kubická (ikosaedrální) symetrie



Spirální (helikální) symetrie



Komplexní symetrie



Třídění virů

- a) dle povahy hostitele: viry bakterií (bakteriofágy), kvasinek, prvoků, rostlin, hmyzu, obratlovců
- b) dle přítomnosti obalu: neobalené viry, obalené viry
- c) dle charakteru genomu: RNA viry, DNA viry
- d) dle symetrie kapsidy: viry s ikosaedrální symetrií, helikální symetrií, komplexní symetrií

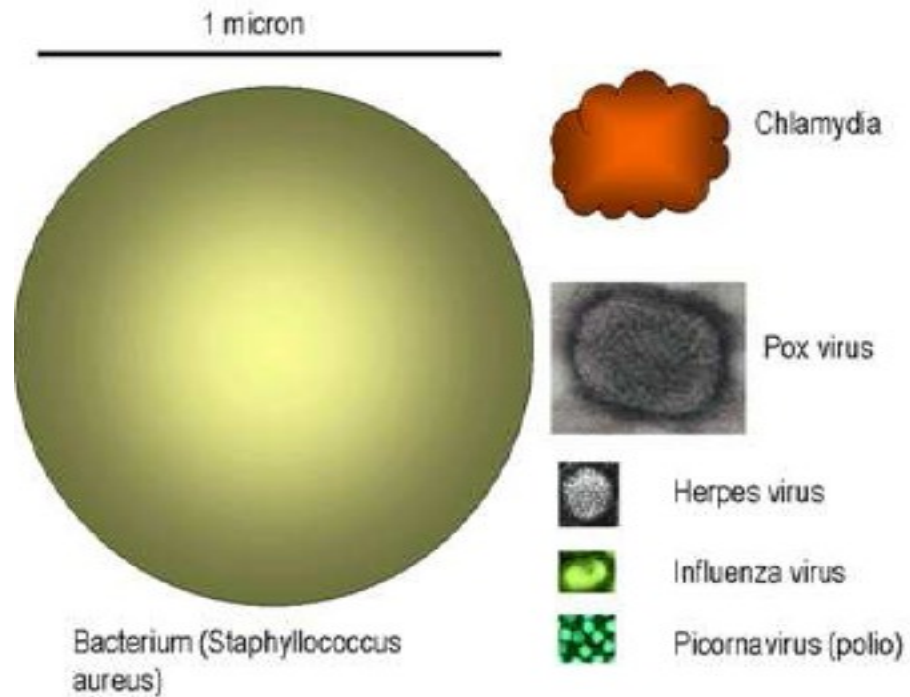
Názvosloví virů

- viry nemají oficiální latinské dvoujmenné názvy
- virové čeledi – název končí koncovkou *-viridae*
- virové podčeledi – koncovka *-virinae*
- virové rody – koncovka *-virus*
- virový druh není jednoznačně definován, používají se vžitá názvy
- příklad: čeleď *Herpesviridae*, podčeleď *Alphaherpesvirinae*, rod *Simplexvirus*, druh lidský herpesvirus 1

Virové infekce

- hepatitidy: HAV, HBV, HCV, HDV, HEV
- herpetické viry: HSV, VZV, CMV, EBV, HHV6...
- neuroviry: virus klíšťové encefalitidy, enteroviry, virus vztekliny...
- respirační viry: viry chřipky, adenoviry, rinoviry, koronaviry...
- virové gastroenteritidy: rotaviry, kaliciviry, astroviry...
- virus příušnic, zarděňek, spalniček, HIV, aj.

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



Virologické vyšetřovací metody

a) přímý průkaz

b) nepřímý průkaz (průkaz serologický)



Přímý průkaz virů

- ve vyšetřovaném vzorku lze prokazovat:
 - ✓ morfologicky typické částice (elektronová mikroskopie)
 - ✓ antigeny (serologické metody)
 - ✓ virové nukleové kyseliny (molekulárně biologické metody)
 - ✓ infekční agens (izolace viru na vhodných objektech)

Mikroskopický průkaz virů

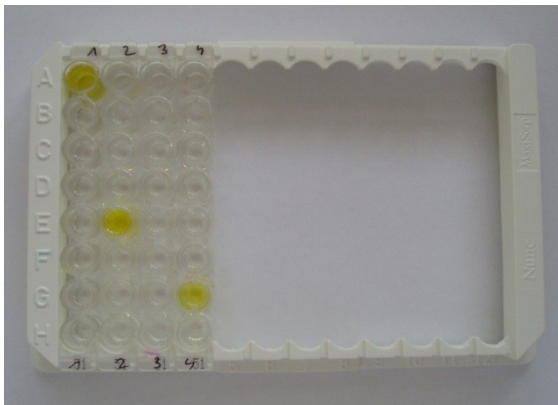
- elektronová mikroskopie
- 1933: sestaven elektronový mikroskop na Vysoké škole technické v Berlíně
- 1939: první elektronoptické snímky viru mozaikové choroby tabáku
- technika negativního kontrastu

Elektronoptický snímek viru mozaikové choroby tabáku



Průkaz virových antigenů

- imunoenzymatické metody – ELISA, např. průkaz HBsAg, HBeAg
- přímá imunofluorescence – fluorescenční mikroskopie, např. průkaz antigenů respiračních virů
- latexová aglutinace – např. průkaz rotavirových a adenovirových antigenů ve stolici

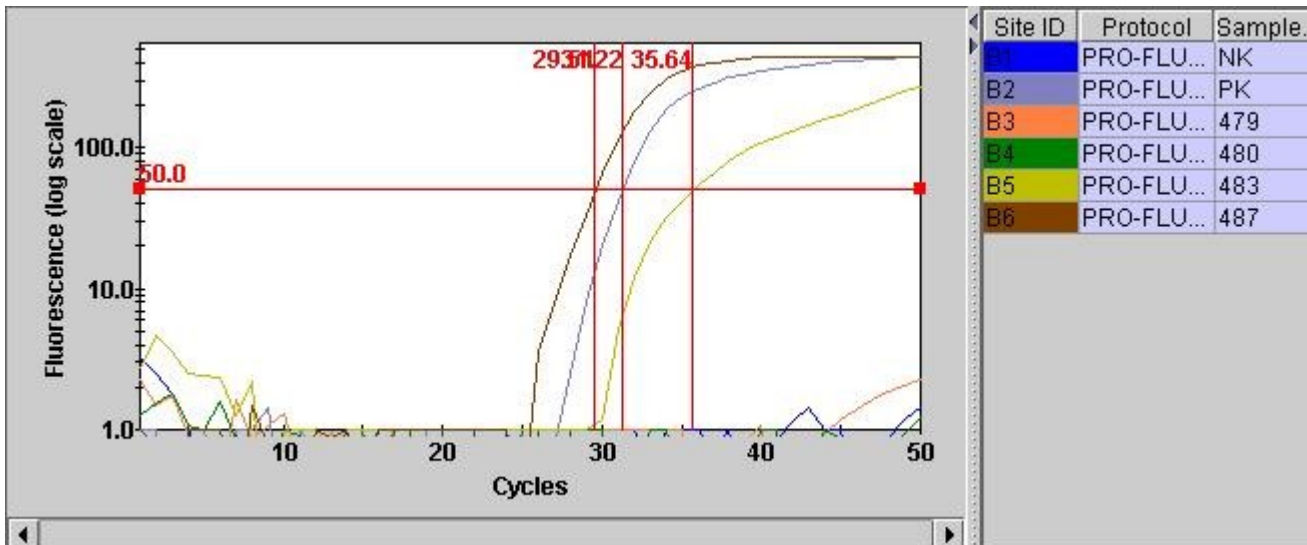
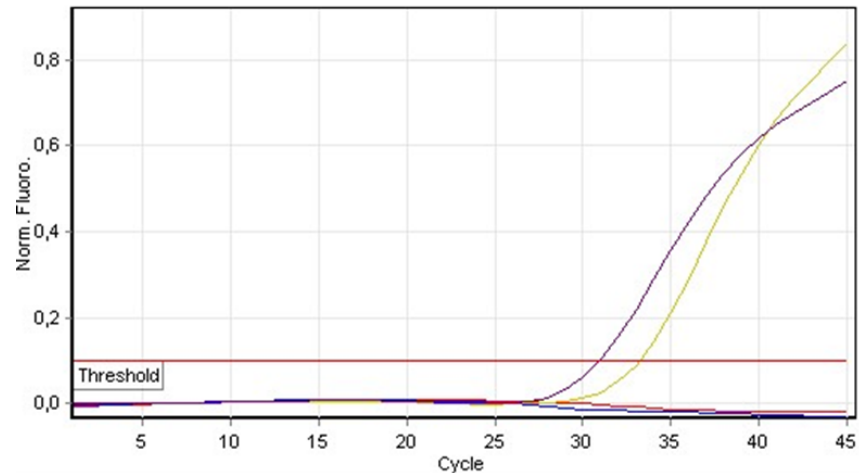


Průkaz virových nukleových kyselin

- polymerázová řetězová reakce
- přímý průkaz NK virů (RNA nebo DNA)
- různé modifikace
- výhody: vysoká specificita, rychlost, možnost detekce více agens současně (multiplexní PCR)
- nevýhody: vysoká cena, přístrojové vybavení, riziko kontaminace

Výstupy vyšetření real-time PCR

- Jednotlivá vyšetření
- Multiplex



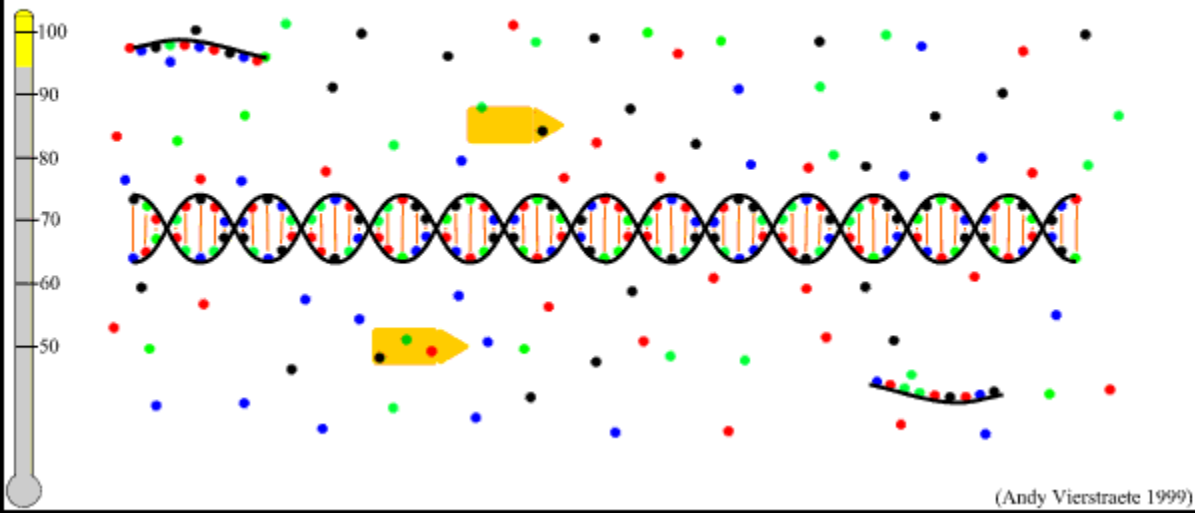
PCR – příklady termocyclerů



Princip PCR

- opakované cykly tří jednoduchých reakcí:
 - denaturace dvojšroubovice hledané DNA na dvě izolovaná vlákna (94 °C)
 - annealing - připojení dvou krátkých syntetických nukleotidů (primery) na tato vlákna (54 – 65 °C)
 - prodlužování primerů v přítomnosti vhodných reakčních složek a enzymu *Taq*-polymerasy za vzniku dvou kopií hledané DNA (72 °C)

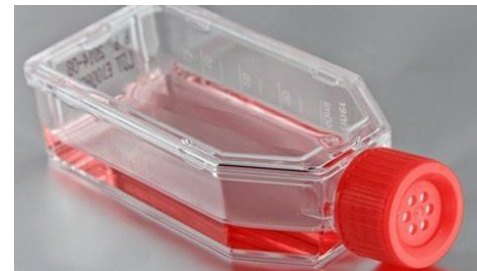
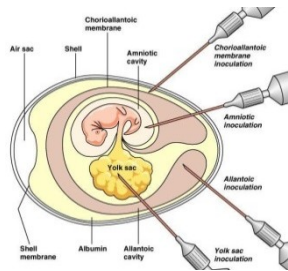
PCR : Denaturation 94°C



(Andy Vierstraete 1999)

Izolace viru

- průkaz infekčního agens na vhodných objektech:
 - ✓ pokusná zvířata – bílá myš
 - ✓ kuřecí zárodky – očkování viru do amnia, alantois, na chorioalantoidní membránu, do žloutkového vaku
 - ✓ tkáňové (buněčné) kultury – primární kultury opičích ledvin, buněčné linie buněk HeLa, Hep-2, Vero, diploidní kmeny z buněk emryonálních plic



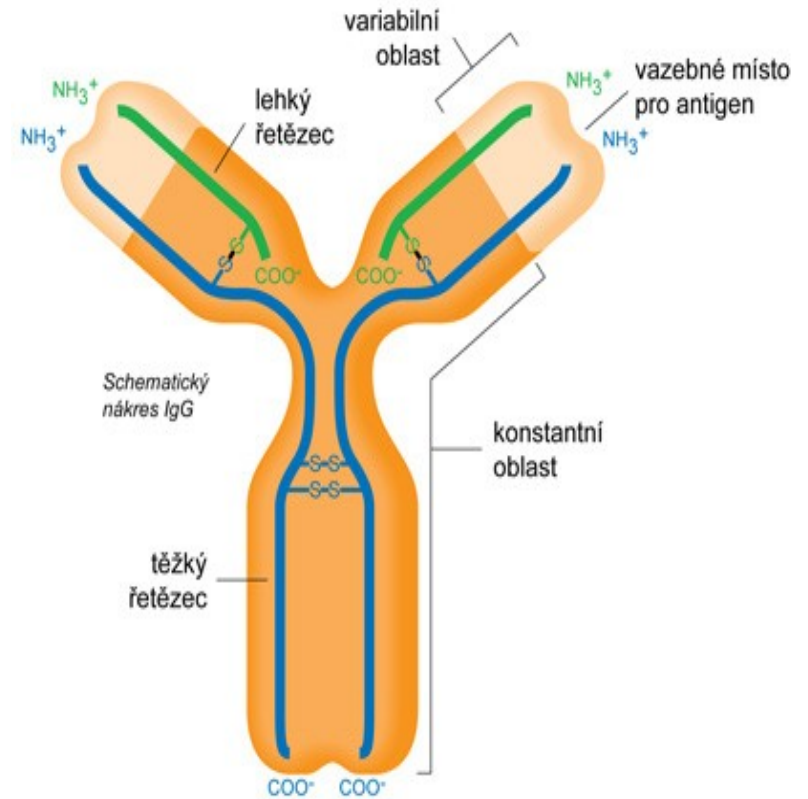
Nepřímý průkaz virů

= průkaz specifických protilátek neboli průkaz serologický

- serologické reakce – reakce mezi antigeny a protilátkami *in vitro*
- použití v diagnostice virových infekcí a některých bakteriálních infekcí (obtížně kultivovatelné bakterie)
- materiál: 5 - 7 ml srážlivé krve, likvor, synoviální tekutina

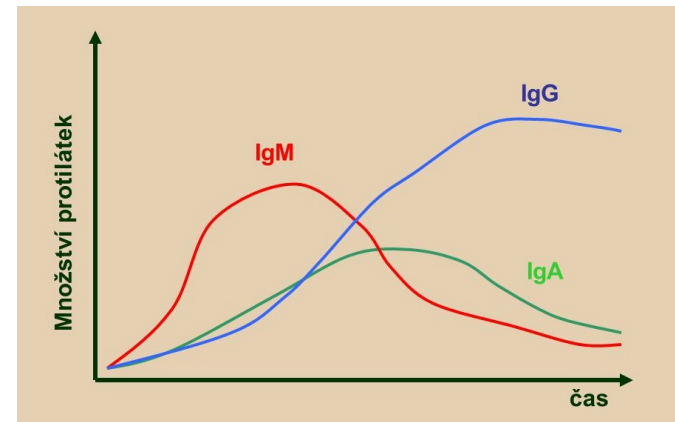
Protilátky

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



Dynamika tvorby protilátek

- **IgM** – první protilátky, přetrvávají týden až několik měsíců, svědčí pro čerstvou infekci
- **IgA** – přetrvávají o něco déle, svědčí pro čerstvou nebo nedávnou infekci
- **IgG** – nejvyšší hladina měsíc po začátku onemocnění, mohou přetrvávat roky



Přehled serologických metod

1. Precipitace
2. Aglutinace
3. Komplement fixační reakce (KFR)
4. Reakce se značenými složkami:
 - imunofluorescence
 - enzymová imunoanalýza
 - Western blot (imunoblot)

Precipitace

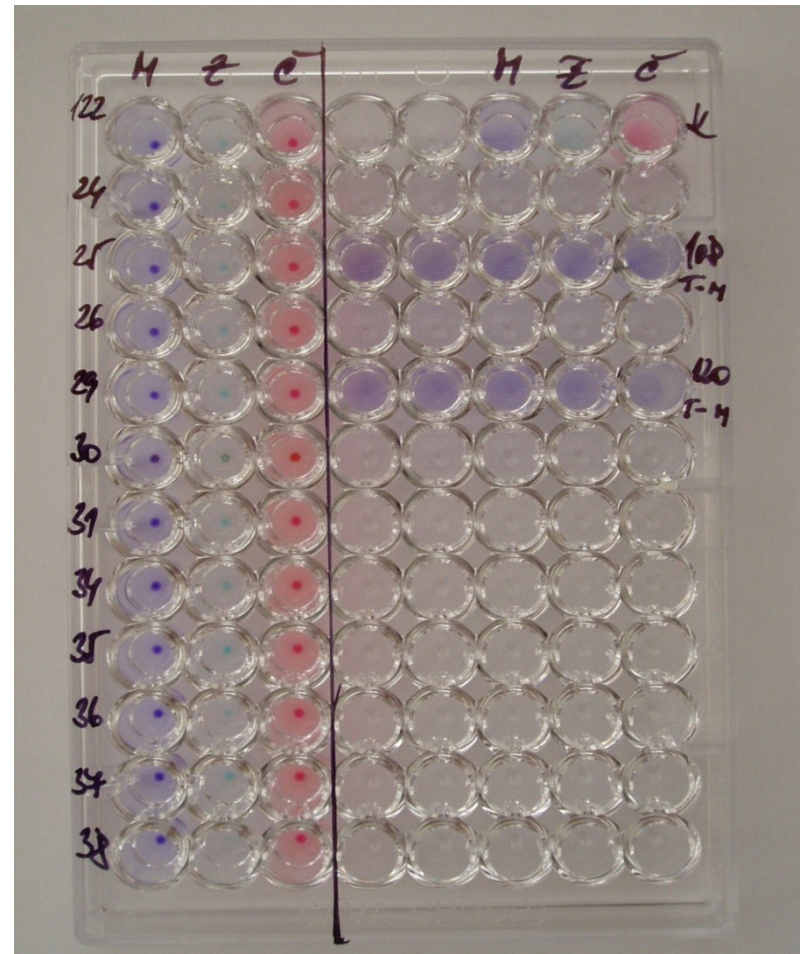
- antigen koloidní povahy
- precipitační neboli vložkovací testy na lues
- VDRL, RRR, RPR

kardiolipin + protilátky v séru → precipitace



Aglutinace

- antigen korpuskulární povahy
- antigen + hledaná protilátka → viditelný shluk (aglutinát)
- průkaz protilátek např. u salmonelózy, yersiniózy, listeriózy, tularémie

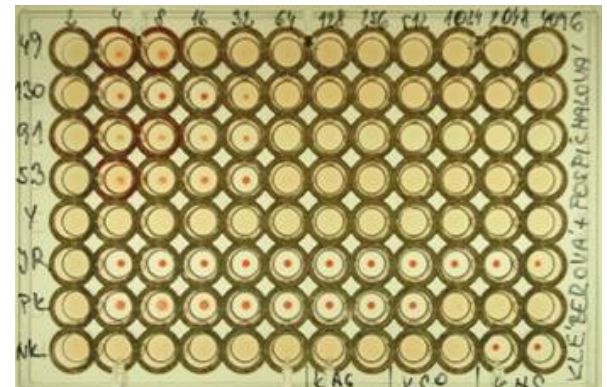


Komplement fixační reakce

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

zábrana hemolýzy
pozitivní reakce

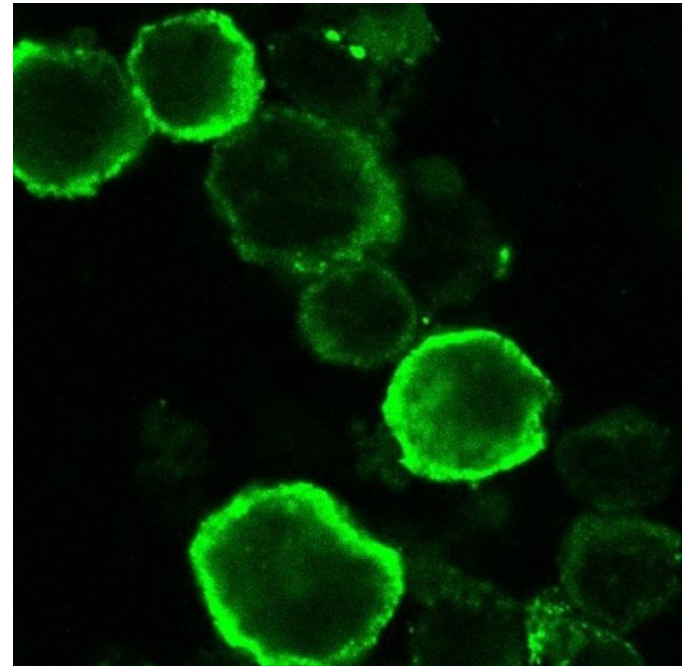
hemolýza
negativní reakce



Imunofluorescence

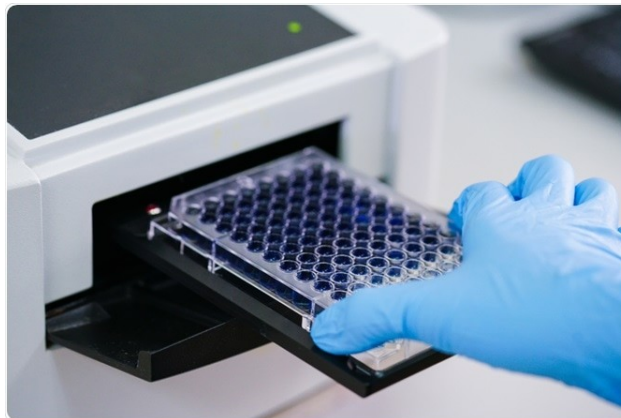
- jedna složka značena fluorescenčním barvivem, průkaz pomocí fluorescenčního mikroskopu
- přímá – průkaz antigenu
- nepřímá – průkaz protilátek

Nepřímá imunofluorescence
- protilátky proti HHV6



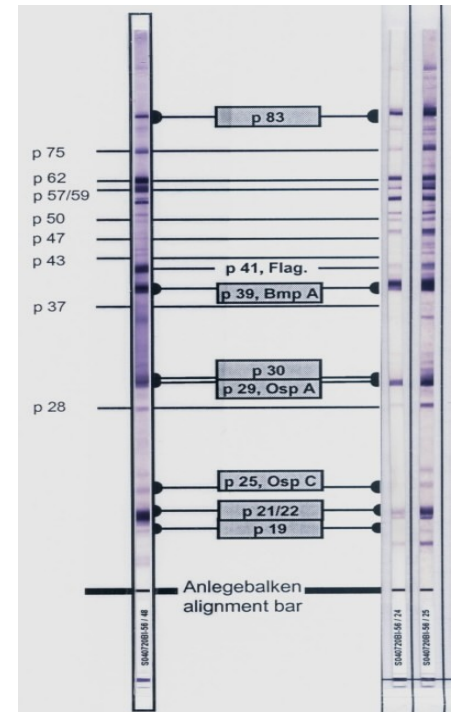
Enzymová imunoanalýza

- jedna složka značena enzymem, který rozloží přidaný substrát za vzniku barevného produktu
- výsledek: barevná reakce
- hodnocení: měření absorbance
- ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)



Western blot

- antigen rozdělený na jednotlivé polypeptidy dle molekulové hmotnosti na nitrocelulózovém pásku
- vazba hledaných protilátek ze séra na příslušné antigenní frakce
- výsledná reakce – barevný proužek



Automatizace serologických vyšetření

- analyzátoři na principu chemiluminiscenční nebo elektrochemiluminiscenční imunoanalýzy
- výhody:
 - rychlost vyšetření
 - klinická senzitivita, specificita
 - možnost předřazení vzorků (statimová vyšetření)
 - široké menu (více metod současně)
 - minimalizace hand-on-time
 - použití čárových kódů
 - import/export do LIS



Cobas e411, Roche

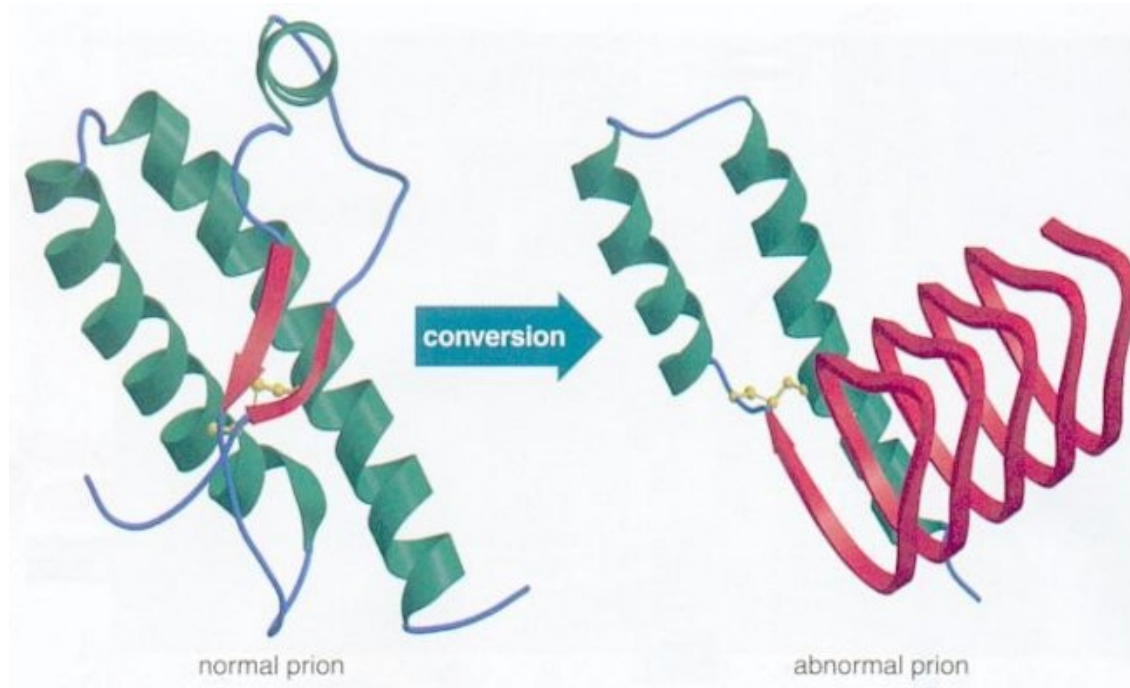
Priony

- z angl. *proteinaceous infectious particles*
- neobsahují nukleovou kyselinu
- vysoká odolnost k zevním vlivům
- účinná kombinace autoklávování 134 °C/1 hod. a působení 1 M NaOH
- Stanley Prusiner (1997 Nobelova cena)



Vlastnosti prionů

- konformační změna alfa-helikální struktury prionového proteinu na patologickou beta strukturu



Prionové choroby

- velmi dlouhá inkubační doba (několik let)
- chronický, postupně se zhoršující průběh s fatálním koncem
- minimální nebo neobvyklé patologické změny
- vliv genetických faktorů
- neúčast imunitního systému

Prionové choroby

= přenosné spongiformní encefalopatie

- *scrapie* u ovcí a koz
- *bovinní spongiformní encefalopatie (BSE, „nemoc šílených krav“)* u krav
- *kuru*
- *Creutzfeldt-Jakobova choroba*



Scrapie, Anglie, 1759



BSE, UK a Portugalsko, 1985



Kuru, Nová Guinea, 1957