



Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU



NÁRODNÍ
PLÁN OBNOVY



**MASARYKOVA
UNIVERZITA**

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Základy virologie 1 část

Prof. RNDr. Daniel Růžek, Ph.D.

Obsah

1. Úvod.....	4
2. Víry	10
3. Základy patogeneze virových nákaz	22
4. Genetika a evoluce virů.....	28
5. Epidemiologie virových infekcí.....	29
6. Rezistence organismu proti virové nákaze.....	36
7. Chemoterapie virových infekcí.....	39
8. Vakcinace proti virovým nákazám	45
9. Laboratorní diagnostika virových infekcí	52

1. Úvod

Ač jsou viry vůbec nejpočetnějšími obyvateli planety Země, víme o nich stále zoufale málo. Odhaduje se, že existuje zhruba desetkrát tolik druhů virů, než je buněčných organismů. Kdybychom poskládali za sebe všechny hypotetické virové částice vyskytující se na naší planetě, vytvořily by řadu dlouhou snad 10 miliónů světelných let. V celé biosféře je naprostá většina genetického materiálu tvořena viry. Přesto pro nás viry zůstávají stále obrovským mystériem.

Virologie je věda o virech a jejich interakcích s hostitelskými buňkami, organismy a společenstvy organismů. Jsou viry živé? Otázka řazení virů mezi živé organismy, mezi nejjednodušší biologické jednotky či mezi neživé formy, prakticky nemůže být zodpovězena, protože zatím ještě nejsme schopni chápat, co to vlastně život vůbec je. Někteří pod pojmem živá bytost chápou objekt tvořený ze základních částic – buněk, které pro ně představují komplikovaný strojek sestavený z fosfolipidů, cukrů, bílkovin a nukleových kyselin, který funguje na základě chemického rozkladu látek, které jsou přijímány a spalovány. Jiní ve snaze poodhalit tajemství života hledají cosi, co se těžko popisuje, ať už je to entelechie, *vis vitalis* nebo duše. Aristoteles rozlišoval duši rostlinnou, živočišnou a lidskou. Můžeme se domnívat, že kdyby měl znalosti v rozsahu dnešní biologie, možná by přiznal duši i prvokům a houbám, ale určitě ne virům. Jak napsal Marek Orko Vácha ve své knížce *Tančící skály*, viry můžeme trochu s nadsázkou tedy definovat jako Tolkienovy Nazgûly, bytosti ani živé ani mrtvé, pohybující se v zemi nikoho, na frontě mezi životem a neživotem.

Ve světle posledních objevů na poli virologie byla v časopise *Nature* publikovaná nová definice virů. Ta říká, že „Virus je kapsid kódující organismus, který se skládá z proteinů a nukleových kyselin, je schopen samovolného složení svého nukleokapsidu a využívá organismy kódující ribozomy pro dovršení svého replikačního cyklu.“ Viry jsou submikroskopičtí obligátní nitrobuněční parazité obsahující ve své nukleové kyselině komplex genetických informací nezbytných pro nezávislou reprodukci v hostitelských buňkách.

1.1 Počátky virologie

Mnohé choroby, o kterých je dnes známo, že jsou virového původu, byly známy již v počátcích lidské civilizace – první popisy pocházejí z období starověkého Egypta, Řecka a Říma. Přesto se virologie jako vědecká disciplína začala rozvíjet teprve počátkem 20. století. Viry však nebyly objeveny v souvislosti se zákeřnými lidskými chorobami, které sužovaly lidstvo odnepaměti; namísto toho při objevu virů a vzniku virologie sehrála klíčovou roli mozaiková choroba rostliny tabáku.

Z pohledu historie můžeme výzkum virů a chorob jimi vyvolaných rozdělit do tří etap, a to:

1. V první etapě nebyly viry jako původci chorob známy, byly studovány pouze projevy chorob.
2. Druhá etapa začala objevem infekční virové částice (D. J. Ivanovský, 1892).
3. Třetí etapa je spojena s využitím metod rekombinantní DNA, genových manipulací ve virologii a využití virů jako nástrojů v genovém inženýrství, biotechnologiích a medicíně.

Virové choroby byly studovány celá století před tím, než byly viry objeveny. Již na sklonku prvního tisíciletí byly zaznamenány případy epidemie pravých neštovic. Tehdy Číňané nevědomě použili tzv. variolace k ochraně lidí. Obsah vysušených puchýřků vyvolaných virovou infekcí míchali s roztokem zeminou a vtírali do kůže zdravých jedinců, vyvolávali tak umělou infekci, často se slabším průběhem spojeným s navozením imunity. Později anglický lékař **Edward Jenner** (po roce 1790) pozoroval, že dojičky často trpí mírnou formou neštovic přenesených z krav a prodělání takové choroby je pak chránilo před nebezpečnými pravými neštovicemi. Jenner tak objevil princip vakcinace, kdy protilátky vytvořené proti málo škodlivým kravským neštovicím jsou schopné zabránit infekci příbuzným virem pravých neštovic. Vakcinaci pak rozpracoval a prakticky aplikoval až **Louis Pasteur** (1884), který vyvinul například i vakcínu proti vzteklině. K vakcinaci v tomto případě byl použit extrakt z míchy králíků infikovaných virem vztekliny.

Až do 19. století se však všechna pozorování zabývala chorobou a na existenci infekčního agens se usuzovalo jen nepřímou, a to podle přenosu a šíření infekce. Na počátku 19. století se několik skupin vědců snažilo objevit původce infekční choroby tabáku vyvolávající chlorotické mozaiky na listech. Zjistilo se, že se nemůže jednat o bakterie, které bylo možné z homogenátu spolehlivě zachytit (odfiltrovat) pomocí porcelánových bakteriologických filtrů. Někteří se domnívali, že může jít o zvláštní enzymy. V roce 1892 **Dmitrij Ivanovský** zjistil, že chorobu rostlin může vyvolat organismus menší než bakterie. Tabáková mozaika je nenápadné onemocnění tabákových listů, které v té době významně ekonomicky ohrožovalo pěstitele tabáku. Na postižených listech se tvoří mozaikové obrazce a listy pak chřadnou a hynou. Ivanovský, ve snaze původně prokázat bakteriální původ tohoto onemocnění, prováděl sérii nepřímých pokusů, kdy filtroval homogenáty z nakažených rostlin přes bakteriální filtr, tj. filtr z nepolévaného porcelánu s póry tak malými, že dokáže zachytit i bakteriální buňky (Chamberlandův filtr). Získaným filtrátem se pak pokoušel infikovat další rostliny. Oproti předpokladu se rostliny, které byly inokulovány filtrátem, nakazily. Ivanovský se domníval, že bakterie zachycené na filtru vyloučily neznámý jed, jímž pak intoxikoval další generaci rostlin. Vůbec ho nenapadlo, že by za takových okolností původcem choroby mohly být mikroorganismy. Onu neznámou látku nazval termínem „**virus**“, což v latině znamená výraz pro jed či zapáchající odpornou tekutinu. Ve své době výsledky Ivanovského experimentů zapadly bez povšimnutí.

100 let virologie jako vědecké disciplíny



Dmitrij Ivanovský, 1882



Fig. 2. Symptoms of tobacco mosaic virus. (Photograph courtesy of the IPO, Wageningen, The Netherlands.)

Další experimenty dokazující existenci menších infekčních částic než bakterie provedl **Martinus W. Beijerinck**. Nezávisle na Ivanovském provedl obdobné experimenty, ovšem s tím rozdílem, že již začal uvažovat o mikroorganismech menších než bakterie; nazval je tehdy *Contagium vivum fluidum*.



Martinus W. Beijerinck

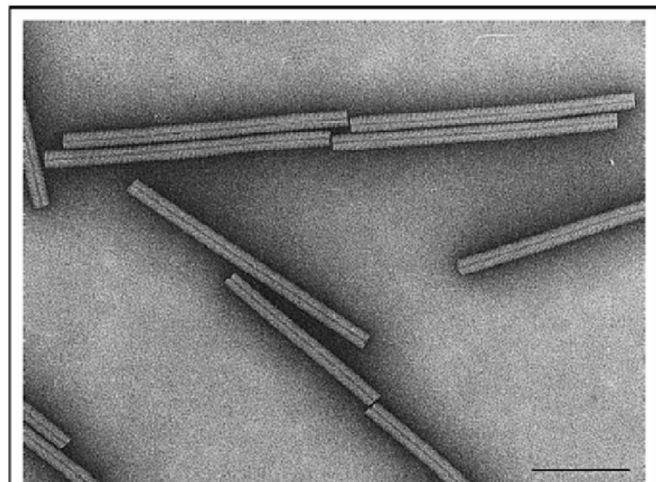


Fig. 5. Electron micrograph of particles of tobacco mosaic virus negatively stained with uranyl acetate. Scale bar represents 100 nm. Photograph courtesy of Dr J.T. Finch.

Contagium vivum fluidum

Následovalo období nalézání nových a nových původců chorob menších než bakterie. V roce 1898 **Friedrich Löffler** a **Paul Frosch** prokázali, že slintavka a kulhavka skotu jsou rovněž vyvolávané organismy menšími než bakterie. Filtovali tekutinu vzniklou rozmělněním sliznice zvířat napadených slintavkou a kulhavkou. Původně byli podobně jako dříve Ivanovský u mozaiky tabáku přesvědčeni, že původcem choroby jsou bakterie, a obdobně prováděli nepřímý důkaz. V okamžiku, kdy filtrát vyvolal infekci u dalších pokusných zvířat, bylo jasné, že onemocnění způsobuje buď nesmírně silný jed, nebo mikroorganismus menší než bakterie. Opakované přenosy infekce na další a další zvířata vedly k zamítnutí toxinové teorie a poukázaly na mikroorganismální původ onemocnění.



Fridrich Loeffler a Paul Frosch



Slintavka a kulhavka, 1898



O čtyři roky později komise pod vedením plukovníka **Waltera Reeda** filtrací infekční krve potvrdila, že původce onemocnění žlutá zimnice je menší než bakterie a že infekce je přenášena komárem *Aedes aegypti*. Jednalo se o objev prvního lidského viru v historii. Reed se spolupracovníky provedli několik velmi elegantních experimentů, které přinesly nezvratné důkazy virového původu žluté zimnice a způsobu jejího přenosu. Žlutá zimnice, onemocnění, jež se pravidelně objevovalo podél pobřeží rozvodněných řek Střední Ameriky, stála život každoročně tisíce lidí. Zejména Kuba byla považována za endemický region. Vědci se zprvu domnívali, že původcem žluté zimnice je bakterie *Bacillus icteroides*. Prováděli značné množství testů na bakterie, ovšem stále s negativním výsledkem. Následně se začali domnívat, že infekce je přenášena lůžkovinami a oblečením nakažených lidí či vzduchem. Ovšem i tento materiál byl v bakteriologických testech negativní. To vedlo ke změně centrální otázky: oproti předchozímu marnému hledání původce žluté zimnice se zaměřili na otázku, co tuto infekci vlastně přenáší. Začali se zabývat myšlenkou, kterou však již před nimi formuloval kubánský lékař Carlos Finlay, totiž zda do přenosu infekce je zapojen nějaký sekundární přenašeč, v tomto případě komár. Nikdo tomu moc nevěřil, ale nakonec bylo schváleno testování s využitím lidských dobrovolníků. Celkem 1900 komárů se nechalo sát na dobrovolnících. Při

experimentech bylo využito pokusné stanice, kterou tvořily dvě centrální budovy, jedna s lůžkovinami kontaminovanými krví infikovaných lidí a druhá s komáry. Podle plánu experimentu chodili dobrovolníci spát buď do domu s lůžkovinami nebo s komáry. Výsledky polního experimentu již přinesly konečný a nezvratný důkaz potvrzující přenos žluté zimnice komáry. Tímto okamžikem se začíná rozvíjet lékařská virologie a vzniká její specializované odvětví – arbovirologie, čili věda zabývající se virem, jež jsou přenášeny členovci.

Compliments of the writers

[Reprinted from THE PHILADELPHIA MEDICAL JOURNAL, October 27, 1900.]

THE ETIOLOGY OF YELLOW FEVER.

A Preliminary Note.¹

By WALTER REED, M.D., Surgeon, U. S. A.,

AND

JAMES CARROLL, M.D., A. AGRAMONTE, M.D., JESSE
W. LAZEAR, M.D.,² Acting Assistant Surgeons, U. S. A.



Reed

Carroll

Agramonte

Lazear

CONCLUSIONS.

1. The mosquito (*C. fasciatus*) serves as the intermediate host for the parasite of yellow fever.

2. Yellow fever is transmitted to the nonimmune individual by means of the bite of the mosquito that has previously fed on the blood of those sick with this disease.

3. An interval of about 12 days or more after contamination appears to be necessary before the mosquito is capable of conveying the infection.

4. The bite of the mosquito at an earlier period after contamination does not appear to confer any immunity against a subsequent attack.

5. Yellow fever can also be experimentally produced by the subcutaneous injection of blood taken from the general circulation during the first and second days of this disease.

6. An attack of yellow fever, produced by the bite of the mosquito, confers immunity against the subsequent injection of the blood of an individual suffering from the nonexperimental form of this disease.

7. The period of incubation in 13 cases of experimental yellow fever has varied from 41 hours to 5 days and 17 hours.

8. Yellow fever is not conveyed by fomites, and hence disinfection of articles of clothing, bedding, or merchandise, supposedly contaminated by contact with those sick with this disease, is unnecessary.

9. A house may be said to be infected with yellow fever only when there are present within its walls contaminated mosquitoes capable of conveying the parasite of this disease.

10. The spread of yellow fever can be most effectually controlled by measures directed to the destruction of mosquitoes and the protection of the sick against the bites of these insects.

11. While the mode of propagation of yellow fever has now been definitely determined, the specific cause of this disease remains to be discovered.

2. Viry

Termín "virus", vycházející z jeho latinského původu, byl dlouhou dobu synonymem pro jed, zápach či odpornou tekutinu. Prvním, kdo tento termín použil, byl Aulus Cornelius Celsus v prvním století našeho letopočtu. Během 19. století se jeho význam rychle měnil. Nejdříve se stal označením pro "mikroba", později jej začal Luis Pasteur používat pro obecné označení infekčního agens (infekční částice). V osmdesátých letech minulého století, s rozvojem kultivace bakterií a hub v aseptických podmínkách na živých médiích, konstrukcí nových výkonnějších optických mikroskopů a vývojem bakteriálních filtrů, se zúžil obsah pojmu virus na označení infekčních agens menších než bakterie, a to tzv. "filtrovatelných agens" - filtrovatelných (ultramikroskopických) virů.

2.1 Původ virů

Názory na původ virů nejsou zdaleka jednotné. Odmyslíme-li různé teorie mimozemského či metafyzického původu virů, obecně můžeme rozlišit tři základní teorie snažící se vysvětlit, jak viry na planetě Zemi vznikly.

1. viry vznikly z paraziticky žijících mikroorganismů, především bakterií, regresivním vývojem směřujícím k úplné závislosti na hostitelské buňce. Během vývoje ztratily původní strukturu i řadu funkcí nezbytných pro samostatný metabolismus. Přechodným stadiem by pak mohly být mykoplasmata, rickettsie a chlamydie. Ovšem vážnou námitkou proti teorii regresního vývoje virů je jejich nebuněčná organizace, zejména nepřítomnost buněčné membrány.

2. viry se vyvinuly z buněčných složek vyšších organismů, jako jsou ribozómy, mitochondrie nebo plastidy, které se časem osamostatnily a změnily v buněčné parazity. Ovšem problémem je, že v eukaryotických buňkách se nevyskytují žádné struktury podobné kapsidům virů.

3. Obecně nejvíce přijímanou teorií původu virů je hypotéza, která staví na předpokladu, že viry pocházejí z primitivních nebuněčných forem živé hmoty, které se postupně vyvinuly v obligátní buněčné parazity. Vývoj k parazitickému způsobu života probíhal u virů v těsném vztahu s ostatními organismy, přičemž se tento vztah projevoval u obou partnerů zároveň jako selekční a mutagenní faktor. Tato teorie, kdy nejprve vznikly prvotní předbuněčné formy života, z nichž jednak probíhal vývoj buněčných organismů a ve druhé virů, je ve shodě s představou, že nejprve vznikly RNA-viry a až později DNA-viry. Současně téměř všechny rostlinné viry obsahují genomovou RNA, přičemž je známo, že vývoj rostlin na Zemi předcházela vývoji živočichů.

Viry jsou považovány za nejjednodušší biologické jednotky s vlastnostmi živé hmoty. Vzhledem k tomu, že postrádají některé životně důležité systémy, např. proteosyntetický aparát, nemohou žít na rozdíl od buněčných organismů samostatně, ale pouze jako vnitrobuněční paraziti. S buněčnými organismy mají ale viry několik společných vlastností:

1. Schopnost rozmnožování. Množení virů neprobíhá binárně jako je tomu u jiných organismů, tj. rozdělením virové částice na dvě nové, nýbrž tím způsobem, že jednotlivé složky nových virů jsou syntetizovány odděleně a posléze se z nich poskládá větší množství virových částic.
2. Dědičné vlohý. Nositelem dědičnosti je virový genom tvořený DNA nebo RNA a určující morfologické, strukturní a biologické vlastnosti virů.
3. Proměnlivost. Příkladem proměnlivosti vyvolané změnou virové genetické informace je např. vznik virových mutantů odolných vůči působení virostatik, adaptovaných na určité prostředí apod.
4. Přizpůsobivost k vnějším podmínkám.
5. Schopnost vývoje. Vývoj virů je podobně jako je tomu u všech organismů dán přirozeným výběrem. Vzhledem ke způsobu života viru a jeho obvykle vysoké rychlosti množení bývají vývojové etapy virů poměrně krátké.

Mezi záležitosti, které viry odlišují od organismů, řadíme

1. Odlišný charakter genetického materiálu. Zatímco genom všech organismů je tvořen výlučně molekulou DNA, u virů to může být RNA nebo DNA. Kromě toho může být virový nukleová kyselina jedno- i dvouřetězcová, kruhová, lineární nebo fragmentovaná.
2. Specifický typ parazitismu. Zatímco jiní parazité napadají organismy na buněčné nebo organismální úrovni, viry jsou parazité na úrovni genetické a biochemické, neboť v infikované buňce přejímají informační a řídicí funkce.
3. Nepřítomnost proteosyntetického aparátu. Všechny organismy, včetně těch nejjednodušších, obsahují vlastní výbavu k syntéze bílkovin. U virů však tento aparát chybí a virové bílkoviny jsou syntetizovány pomocí aparátu hostitelské buňky.
4. Nebuněčná forma života. Viry postrádají buňku jako základní stavební a funkční útvar.

	Růst na umělém médiu	Binární dělení	Mají současně DNA a RNA	Mají ribozómy	Mají kyselinu muramovou	Jsou citlivé k antibiotikům
Bakterie	Ano	Ano	Ano	Ano	Ano	Ano
Mykoplasmata	Ano	Ano	Ano	Ano	Ne	Ano
Rickettsie	Ne	Ano	Ano	Ano	Ano	Ano
Chlamydie	Ne	Ano	Ano	Ano	Ne	Ano
Viry	Ne	Ne	Ne	Ne *	Ne	Ne

* Arenaviry mají ribozómy zabalené náhodně a nesehrávají žádnou roli při replikaci virové částice.

Klasifikace virů

Viry představují velice heterogenní skupinu mikroorganismů. Projevuje se to nejen obrovskou šíří hostitelů od bakterií, sinic, řas, prvoků, rostlin až po obratlovce, ale i jejich velkou strukturální variabilitou a reprodukční strategií. Od nejjednodušších kubických virů o průměru 20 nm (např. pikonaviry) přes složené velké poxviry (virus pravých neštovic má velikost cca 180 x 250 x 350 nm), až po obří mimiviry (průměr cca 400 nm). Stejně variabilní je i struktura jejich genomu nesoucího od jednoho až po několik desítek genů, genomu jednoduchého nebo složeného, genomu tvořeného DNA nebo RNA (nebo oběma) cirkulárního či lineárního, nejrůznější topologie a polarity.

Existence velkého počtu virových druhů schopných infikovat všechny známé buněčné organismy si vyžádala jejich systematické rozčlenění. V roce 1966 byla na Mezinárodním mikrobiologickém kongresu v Moskvě založena Mezinárodní komise pro nomenklaturu virů (později přejmenována na Mezinárodní komisi pro taxonomii virů, **International Committee for Taxonomy of Viruses, ICTV**). Vedly se diskuse, zda stovky druhů virů infikujících všechny živé organismy mají tvořit jednotný systém. Na Mezinárodním virologickém kongresu v Madridu v roce 1975 byla pro taxonomii virů zavedena číselná kryptogramová nomenklatura, ta se ovšem nevžila. Kryptogramy byly složeny ze čtyř párů symbolů, jež byly odvozeny od typu nukleové kyseliny (lomeno počet řetězců), molekulové hmotnosti příslušné nukleové kyseliny, obrys virionu a přítomnost obalu a konečně druh infikovaného hostitele.

Například pro poxviry pak existoval následující kryptogram:

[D/2: 130-240/5-7,5:X*:I,V/O, R, Ve/Ac, Di, Si],

kde D/2 je dvouřetězcová DNA, 130-240 reprezentuje molekulovou hmotnost virové DNA, DNA tvoří 5-7,5% molekulové hmotnosti virionu, virus má složitý obalený virion (X/*), I,V znamená, že viry infikují bezobratlé i obratlovce, O znamená přenos přímým kontaktem, R respiračním traktem, pomocí vektora (Ve), kterým jsou roztoči (Ac), diptera (Di), a blechy (Siphonaptera, Si).

Jako první obecná kritéria pro tvorbu systému byly přijaty následující vlastnosti virů: typ nukleové kyseliny, symetrie kapsidu, přítomnost nebo absence obalu a replikační strategie viru

Podle zprávy ICTV (2008) byly definovány a jsou i prakticky využívány tyto taxonomické jednotky:

řád, čeleď, podčeleď, rod, podrod, druh (u některých taxonů nebyly rody a podrody (výjimečně čeledi) stanoveny a používá se označení skupina nebo podskupina).

V praxi se nejčastěji využívá taxonomických kategorií čeleď, rod, druh, kmen (strain), izolát, případně typ.

Čeleď je reprezentována skupinami virových rodů stejné obecné charakteristiky, ve které se liší od jiných čeledí.

Rod je reprezentován skupinou virových druhů stejné obecné charakteristiky, ve které se liší od jiných rodů. Kritéria pro stanovení rodů se liší mezi jednotlivými čeleděmi. Obvykle se jedná o strukturální, genetické a biologické odlišnosti (např. přenos/šíření, identita virových produktů).

Druh je základní jednotkou systému virů. Definice druhu viru je: „Virový druh představuje skupinu virů jednotného původu definovanou vývojovou řadou vyskytující se v určité ekologické nise“.

Kritéria pro nižší jednotky, než je druh, nejsou moc jednotná.

Kmen je definován na základě rozdílů v biologických vlastnostech (virulence, patogenita, přenos/šíření, okruh hostitelů ap.), ale i na sekvenční identitě nukleové kyseliny.

Izolát představuje populaci jednoho druhu viru, která se liší v blíže nespecifikovaných vlastnostech od jiných populací téhož druhu.

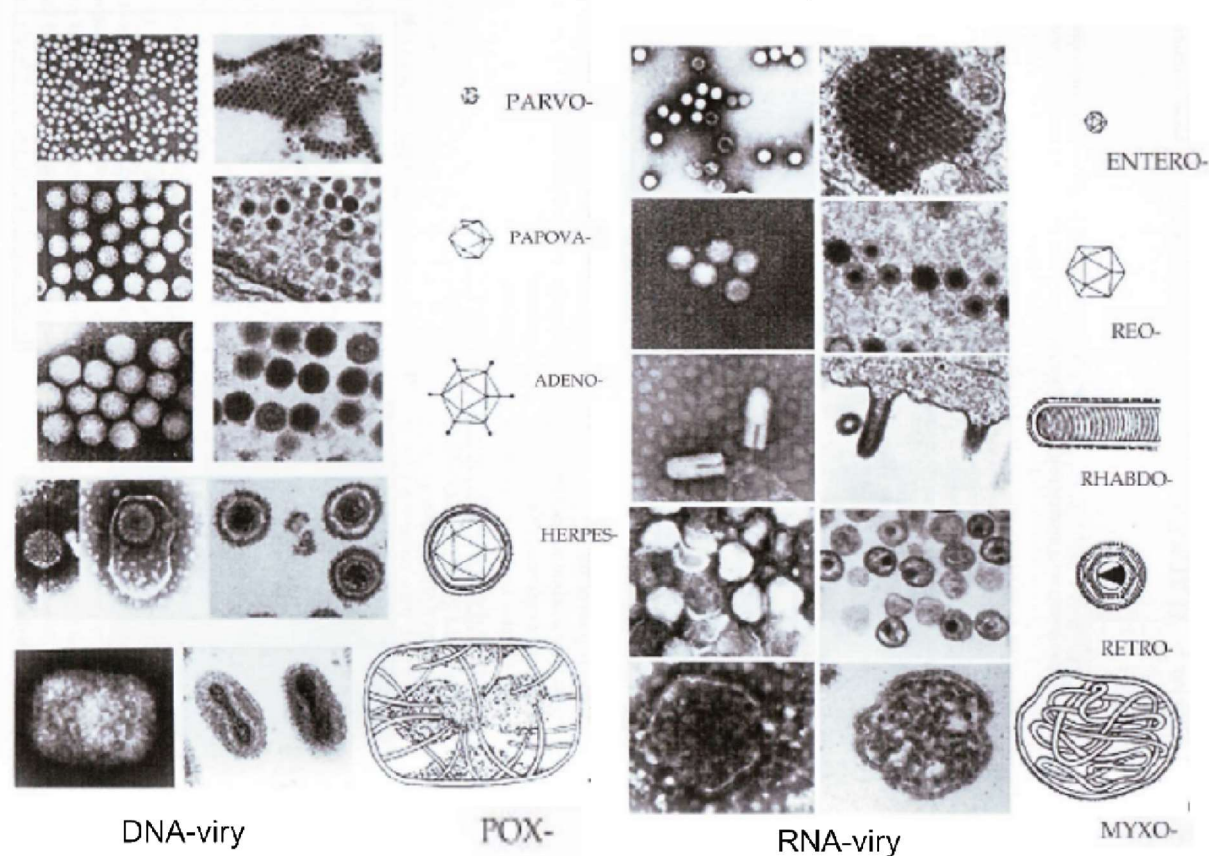
Typ představuje populace jednoho druhu viru, která se liší od jiných populací v jedné konkrétní vlastnosti: genotyp (fylogenetické odlišnosti) sérotyp (odlišnosti na základě sérologických vlastností viru), patotyp (odlišná patogeneze), topotyp (z určité typické lokality) apod.

Subtyp je nižší kategorií oproti typu, ale někdy jej nahrazuje (například: virus klíšťové encefalidity (druh) se dělí na 3 subtypy – evropský, dálnovýchodní a sibiřský).

Velikost virionů

Rozměry a tvar virů mohou být značně rozdílné. Například pikornaviry patří mezi nejmenší viry s velice jednoduchou strukturou představovanou neobalenými nukleoproteiny, průměr jejich částic se pohybuje kolem 20 nm. U středně velkých virů, mezi které patří např. adenoviry nebo retroviry, činí průměr 70-100 nm. K největším virům naopak patří viry z čeledi Poxviridae o délce virové částice 200-300 nm. Mimiviry jsou největšími známými viry. Jejich částice dosahují velikosti až 400 nm v průměru, což je velikost odpovídající již malým prokaryotům. Tyčinkové viriony se vyskytují zejména mezi rostlinnými viry; délka částice se pohybuje mezi 160 nm (Hordeivirus) až po 2000 nm (Carlavirus).

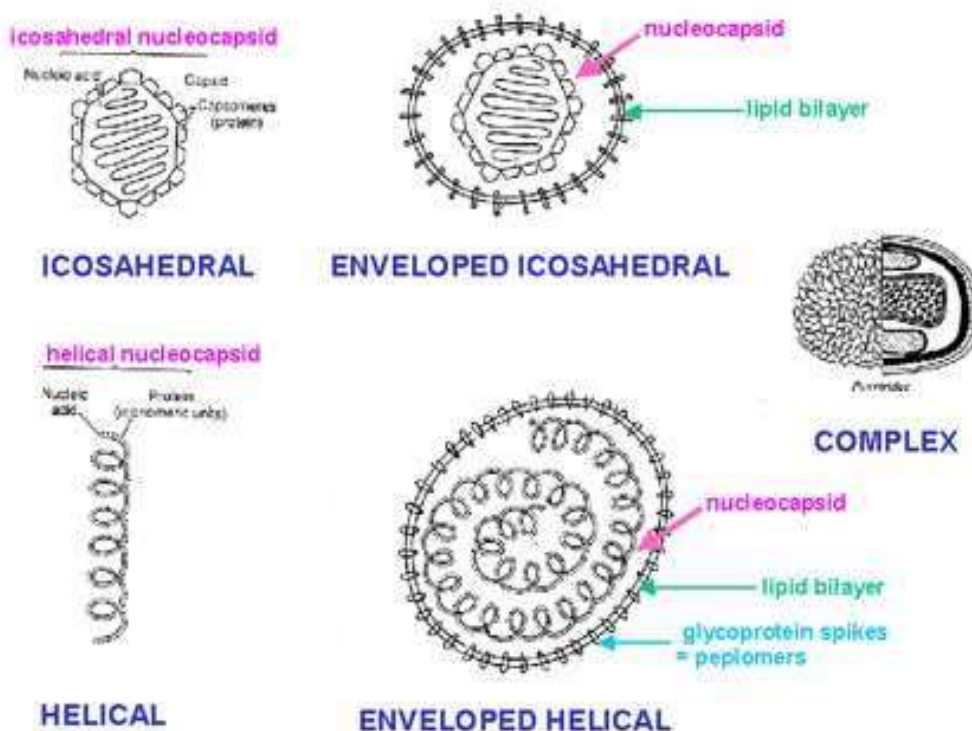
Porovnání relativních velikostí zástupců hlavních skupin virů



Stavba virionu

Virová částice (**virion**) je tvořena nukleovou kyselinou (RNA nebo DNA) představující genom viru obklopenou bílkovinným obalem – **kapsidou**. Celkový útvar tvořený oběma složkami se pak označuje jako **nukleokapsida**. Základními strukturními jednotkami kapsidu jsou identické polypeptidové řetězce – **protomery**. Protomery jsou nekovalentními vazbami navzájem pospojovány v morfologické jednotky – **kapsomery**. Sestavování virové částice probíhá spontánně, bez přítomnosti externích zdrojů energie (proces **autoagregace**). Způsob uspořádání kapsomer udává tvar kapsidu.

5 BASIC TYPES OF VIRAL SYMMETRY

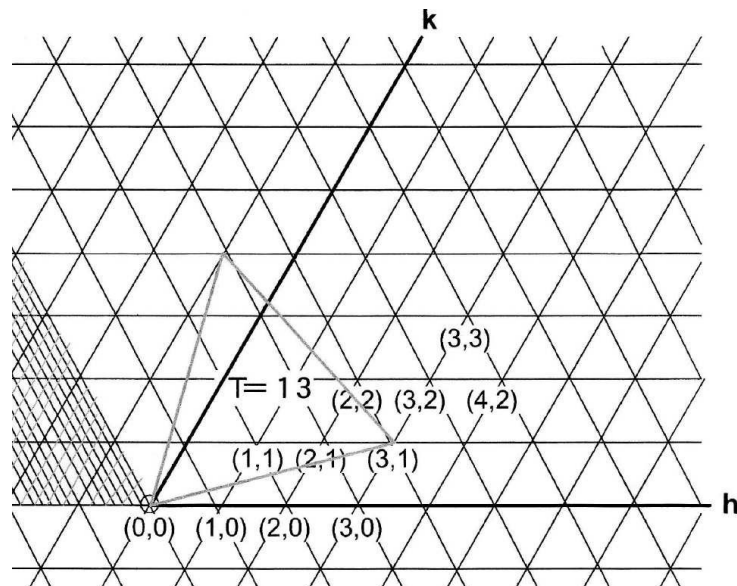


Adapted from Schaefler et al., Mechanisms of Microbial Disease

Kapsidy s kubickou symetrií

Tento typ kapsidy je odvozen od dvacetistěnu – **ikozaedru**. Jednoduchý ikozaedr má stěny tvaru rovnostranného trojúhelníku. Ikozaedr obsahuje dvanáct vrcholů, které sestávají z kapsomer složených z pěti protomer – **pentamerů**. Celkově je ikozaedr tvořen 60 kopiemi protomer. Jeho stavba je vymezena podmínkami osové symetrie typu 5:3:2. To ale omezuje velikost virové částice, a jak se ukázalo, vskutku většina virů má více než 60 protomer. Proto u větších virů bývají částice poskládány z většího počtu protomer. V takovém případě je trojúhelníková stěna dělena na určitý počet menších ekvilaterálních ploch označovaných jako **facety** a vzniká mnohostěn nazvaný **deltaedr**. Počet nových trojúhelníkových stěn je možno odvodit pomocí tzv. **triangulačního čísla T** z výrazu: $T=h^2+hk+k^2$, kde h a k jsou celá čísla větší nebo rovna nule. Pentamery vždy obsazují vrcholy částice, proto je jich vždy 12, ale počet hexamerů může

být různý podle velikosti částice. Hodnoty h a k vycházejí z geometrického modelu viru a z postavení jednotlivých pentamerů. Na mřížce sestávající z pravidelných trojúhelníků se vynese arbitrární bod jako místo prvního pentameru. V tomto místě se protínají osy h a k , které navzájem svírají úhel 60° . Pozice nejbližšího dalšího pentameru pak udává velikost virionu a jeho umístění vzhledem k osám h a k i triangulační číslo podle výše uvedeného vzorce.



Podle triangulačního čísla je pak možno vypočítat počet kapsomer K (morfologických jednotek) i protomer P (strukturních jednotek) podle vzorců: $K=10T+2$; $P=60T$.

Kapsidy se závitnicovou (helikální) symetrií

Nejjednodušší formou uspořádání početných identických bílkovinných subjednotek je rotační symetrie. Takové viriony mají tvar tyčinky nebo vlákna a skládají se z protomer spirálovitě uspořádaných kolem ortogonální osy kapsidu. U viru tabákové mozaiky, který je prototypovým zástupcem této skupiny virů, tvoří protomery ploché kotouče spojené v závitnicově uspořádanou tyčku. Molekula RNA je spirálovitě uložena v kanálku tvořeném žlábkou v protomerách. Délku částice udává délka RNA.

Kapsidy s binární symetrií

Tento typ virové částice se vyskytuje hlavně u bakteriofágů. Sestává z hlavy a bičíku, jež jsou vzájemně spojeny. Hlavová část má kubickou, zatímco bičíková helikální symetrii. Virová nukleová kyselina je uložena v hlavě bakteriofágu.

Viriony s vnějšími obaly

U některých virů je nukleokapsida uzavřena ještě do vnějšího lipidického obalu, resp. pláště. Takové viry pak označujeme jako obalené. Vnější plášť je zpravidla tvořen dvojnou vrstvou fosfolipidů, do níž jsou vnořeny molekuly specifických povrchových bílkovin, např. glykoproteinů, ukotvené v membráně hydrofóbními interakcemi. Ty mohou tvořit výčnělky (**peplomery**), jež se uplatňují především při adsorpci virionu na povrch hostitelské buňky, resp. při interakci virové částice se specifickým receptorem na buněčném povrchu. Mohou ale plnit i různé jiné funkce. Membrána bývá odvozena od membrán hostitelské buňky a virus jí získává při průchodu přes jadernou nebo plasmatickou membránu. Obalové proteiny jsou ale kódovány virovým genomem. Svůj obal získávají při průchodu jadernou membránou například

herpesviry; membránu z endoplasmatického retikula mají odvozenou např. arenaviry, flaviviry, bunyaviry nebo koronaviry. Pučením přes cytoplasmatickou membránu získávají svůj obal např. orthomyxoviry nebo paramyxoviry.

Komplexní virové částice

Typickým představitelem virů s komplexní stavbou virových částic jsou poxviry. To jsou oválné nebo cihličkovité viry dlouhé 200-300 nm, které sestávají z více jak 100 proteinů. Nukleoprotein je tvořen bikonkávní dření obsahující DNA. V konkavitách jsou uloženy jedno nebo dvě laterální tělíška.

Morfogeneze virů

V průběhu morfogeneze viru v hostitelské buňce lze rozlišit několik fází:

1. Adsorpce virionu na hostitelskou buňku pomocí virových přichycovacích proteinů (virus attachment protein, VAT), působících jako antireceptory
2. Vstup (penetrace) virionu do buňky, obnažení virové nukleové kyseliny
3. Reprodukce virionu v hostitelské buňce
 - a. syntéza virových bílkovin
 - b. replikace virového genomu
 - c. tvorba nových virových částic, jejich dozrávání (maturace) a uvolňování z buňky

Časový úsek od adsorpce až po zahájení tvorby nových virionů se označuje jako **fáze eklipse**. Délka replikačního cyklu je u jednotlivých virů různá a svojí délkou se liší i jednotlivé fáze replikačního cyklu. Replikační cyklus např. u viru chřipky trvá 6 hodin, u herpesvirů 18 hodin a u adenovirů až 24 hodin.

Asorpce

Pod pojmem adsorpce se rozumí přichycení virionu prostřednictvím virových vazebných míst (často lokalizovaných na peplomerách) ke specifickým receptorům na povrchu hostitelské buňky. Proces začíná náhodným stykem virionů s buňkou, přičemž k vytvoření vazby mezi vzájemně komplementárními místy na povrchu buňky a virové částice vede jen jedno z přibližně 10^3 - 10^4 setkání. Tento velice přesný a specifický mechanismus vzájemného rozpoznávání vysvětluje, proč některé viry mají úzký okruh hostitelů nebo mají afinitu jen k některým tkáním a jiné viry mohou napadat široký okruh hostitelů a infikovat je systémově. Na povrchu virové částice se nacházejí vazebná místa, která jsou většinou tvořena jednoduchými nebo složenými bílkovinami. Často jsou lokalizována na výrůstcích v podobě hrotů (na peplomerách). Hroty obsahují většinou jeden nebo dva polypeptidické řetězce o průměru 2-4 nm adélce 10-30 nm a proměnlivou sacharidickou složku. Jestliže se takové viry (orthomyxoviry, paramyxoviry, togaviry aj.) adsorbují na červené krvinky, vyvolávají jejich shlukování či aglutinaci. Podstata této reakce označované jako hemaglutinace spočívá v adsorpci virionů na erythrocyty, přičemž může každý virion svými početnými hemaglutinačními hroty vázat několik buněk. Při vzájemné interakce většího počtu virionů a erythrocytů se mezi buňkami vytvářejí zároveň spojovací můstky, což vede k aglutinaci. Hemaglutinační reakci může vyvolávat řada virů. Poprvé byla pozorována u viru chřipky, jehož hroty jsou složeny z glykoproteinu hemaglutininu a enzymu neuraminidázy. V praxi se hemaglutinace využívá v diagnostice virů a při stanovení hladiny antivirových protilátek v krvi rekonvalescentů. Vzájemné působení mezi povrchovými

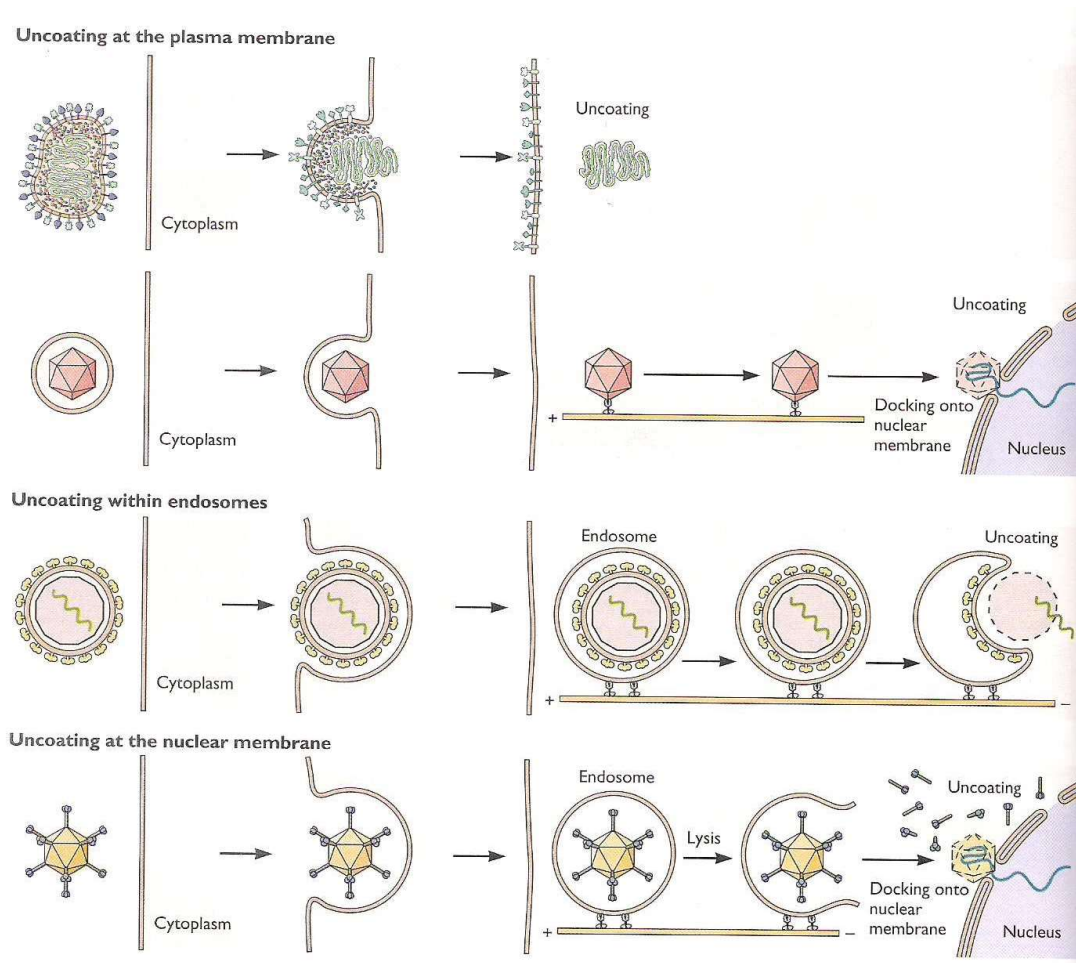
bílkovinnými strukturami virů a erythrocyty se může projevit též hemadsorpcí, při níž se červené krvinky adsorbují na buňky, které nesou na svém povrchu pouze hroty obsahující hemaglutinin. U neobalených virů s kubickou symetrií, které nejsou vybaveny hroty, např. u pikornavirů, mohou plnit funkci vazebných míst povrchové struktury uspořádané z kapsidových bílkovin ve tvaru mozaiky. Ke spojení mezi virionem a hostitelskou buňkou dochází přitom zpravidla prostřednictvím většího počtu vazeb.

Jako receptory virů se uplatňují především lipoproteiny nebo glykoproteiny. Buňky nesou na svém povrchu receptory specifické pro různé druhy virů. Přitom se může na povrchových útvech jedné buňky vyskytovat pro daný virus 10^4 až 10^5 kopií každého receptoru. Je nutno podotknout, že buňky receptory neexprimují primárně pro viry, ale že tyto receptory plní primárně jiné funkce. Některé buňky mohou exprimovat určité receptory jen v určité části ontogenetického vývoje organismu.

Samotné spojení virionu s hostitelskou buňkou nemusí ještě nutně vést k infekci. Vzájemné vazby mohou být zpočátku slabé a reverzibilní, takže virion se může odpoutat z buněčného povrchu. K ireverzibilnímu spojení dochází až poté, když se kromě receptoru zapojí do procesu adsorpce další vazebné struktury na povrchu buněčné membrány. Počáteční stadium vzájemného působení viru s buňkou má elektrostatický charakter a závisí na teplotě, iontové síle a pH prostředí.

Vstup (penetrace) virionu do buňky

Penetrace virionu do buňky probíhá různým způsobem v závislosti na fyzikálně-chemických podmínkách tohoto procesu. Penetrace obalených virů je zpravidla provázána „splýváním“ vnějšího virového obalu s buněčnou membránou, neobalené viry pronikají do buňky většinou procesem tzv. **viropexe**. Viropexe je proces, který připomíná receptorem zprostředkovanou endocytózu či fagocytózu. V průběhu penetrace virus přichází o svůj obal a posléze dochází k rozpadu i kapsidu. Mechanismus pronikání virionů do buňky se liší také podle toho, zda jde o viry, u nichž odpovídá za syntézu nových virových částic pouze virový genom nebo o viry, u kterých se do těchto procesů zapojují rovněž jejich DNA- či RNA-polymerázy obsažené v nukleokapsidu.



Viriony vstupující do buňky významně ovlivňují buněčné funkce. Projevem jejich působení je především inhibice syntézy buněčných nukleových kyselin a bílkovin. Intenzita inhibičního účinku závisí přitom na vlastnostech viru a hostitelské buňky a na multiplicitě infekce (viz dále).

Reprodukce viru

1. potlačení buněčných funkcí, především procesů syntézy nukleových kyselin a bílkovin
2. syntéza virových mRNA a bílkovin
3. replikace virového genomu
4. morfogeneze virionů
5. uvolnění virionů z buňky

Pro celkovou charakterizaci množení viru je důležité, zda virový genom je tvořen RNA nebo DNA a na polaritě vláken. Syntéza virových nukleových kyselin je katalyzována jak virovými enzymy, tak enzymy původem z hostitelské buňky.

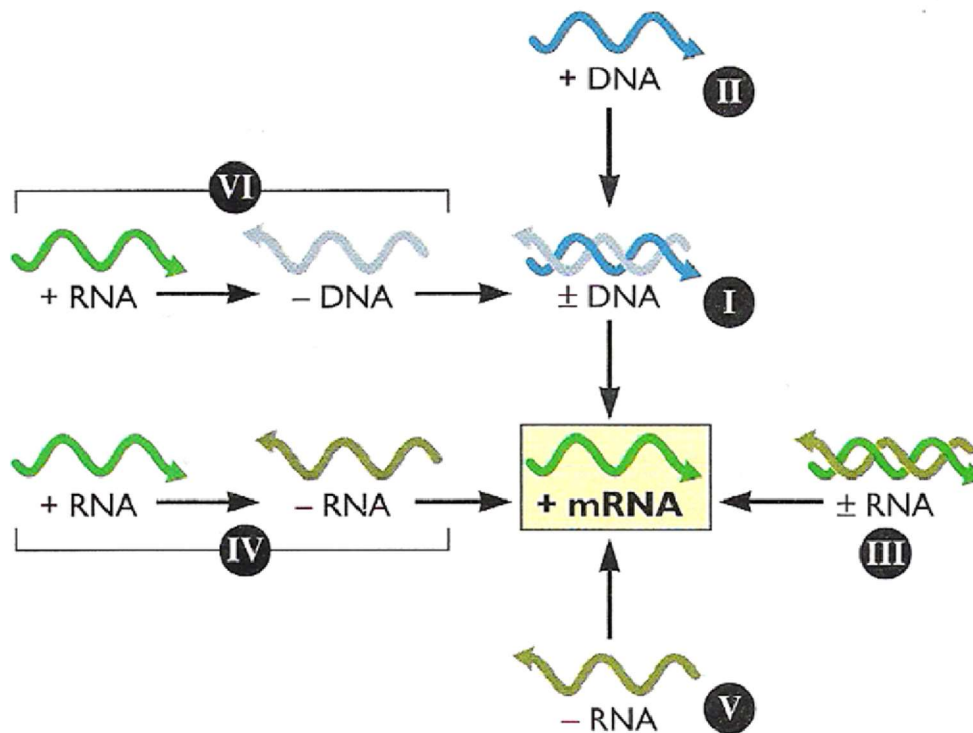
1. Viry s genomem dsDNA (adenoviry, herpesviry, poxviry, papilomaviry, polyomaviry) – transkripce probíhá na řetězci (-)DNA, vzniká (+)ssRNA, která je následně na ribozómech translatována na proteiny. DNA viry musí zahájit transkripci svého genomu co nejdříve po infekci buňky. Tento proces je obvykle nastartován pomocí buněčných enzymů, kde hlavní roli hraje RNA polymeráza II. Syntetizované mRNA jsou pak

přepisovány do řetězců časných (raných) a pozdních proteinů. Časné proteiny vznikají překladem původní virové DNA, pozdní pak často z nově syntetizovaných řetězců virové DNA. Až na výjimky se musí virová DNA dostat do jádra buňky, kde dojde k její transkripci na mRNA.

2. Viry s jednořetězcovou DNA tvořenou pozitivním nebo negativním řetězcem. Při virové infekci se tvoří přechodně dvouřetězcová DNA označovaná jako replikační forma, jejíž negativní řetězec se přepisuje na RNA.
3. Viry s jednořetězcovou genomovou RNA o pozitivní polaritě. (+)RNA může sloužit rovnou jako mRNA a překládána do řetězce aminokyselin na buněčných ribozómech bezprostředně po průniku do buňky. Primárním translačním produktem je polyprotein, který se štěpí na jednotlivé funkční a strukturní proteiny. Štěpení polyproteinu je zahájeno již během translace a je zprostředkováno autokatalytickou aktivitou virem kódované proteázy. Virus si sám kóduje RNA-dependentní RNA polymerázu, která katalyzuje syntézu druhého vlákna RNA podle RNA templátu. Transkripcí genomu vzniká (-)RNA přes dvouřetězcový RNA intermediát. RNA o negativní polaritě se přepisuje opět do (+)RNA. Část jejich molekul plní funkci mRNA, zatímco zbývající molekuly vstupují do nově vytvořených kapsid.
4. Viry obsahující celistvé nebo segmentované řetězce (-)RNA. Tato RNA nemůže být rovnou translatována na ribozómech na proteiny. Nejprve se musí vytvořit (+)RNA, jež vystupuje zčásti jako mRNA a zčásti je přepisována do (-)RNA začleňované do kapsidů nových virionů. RNA-dependentní RNA polymeráza musí být součástí virionu vstupujícího do buňky, aby mohla negativní RNA přepsat na RNA o pozitivní polaritě.
5. Viry s genomovou (+)RNA přepisovanou do DNA. Transkripce se uskutečňuje za účasti enzymu reverzní transkriptáza, který si virus přinese do buňky spolu s virovou částicí. Přepisem RNA vzniká DNA, z ní pak mRNA a genomová (+)RNA nových virionů. cDNA se nejprve v buňce vyskytuje jako DNA-RNA hybridní dvojitě vlákno. Následně je RNA odbourána a je nahrazena komplementárním vláknem DNA za vzniku dvouvlákna DNA. Tato DNA se integruje do genomu hostitele za vzniku tzv. **proviru**. Virové proteiny jsou syntetizovány na matrici virové mRNA, která vzniká přepisem z provirové DNA. Kompletní kopie virové RNA, vzniklé přepisem provirové DNA, jsou rovněž použity jako kopie genomické RNA pro skládání nových virionů.

Replikace virového genomu

Baltimorovo schéma



V průběhu infekce hostitelské buňky je zvýhodňována virová genetická informace na úkor buněčné genetické informace. Obecně můžeme tvrdit, že virová informace se vyznačuje vyšší afinitou vůči translačnímu aparátu než buněčné mRNA. Mimo zvýhodnění translace virové genetické informace je po infekci zpomalena nebo zastavena transkripce a replikace buněčné DNA. Zatímco zastavení transkripce je spojeno s inaktivací specifických transkripčních faktorů, inhibice syntézy buněčné DNA je výsledkem časné selektivní inhibice syntézy buněčných proteinů odpovědných za replikaci.

Skládání viru, maturace, zrání

Utváření nukleoproteinů a skládání virionů je v infikované buňce zahájeno ve chvíli, kdy bylo vytvořeno dostatečné (nadlimitní) množství virových nukleových kyselin a proteinů, a pokračuje tak dlouho, dokud je infikovaná buňka metabolicky aktivní. Proteinový plášť se vytváří vazbou virových proteinů (kapsomer) nebo jejich aglomerátů na nativní virovou nukleovou kyselinu, kterou obaluje. Během skládání virové částice jsou do virionu integrovány důležité funkční proteiny. Ke vzniku virového nukleoproteinů dochází v cytoplazmě, obvykle v blízkosti cytoplazmatické membrány, nebo v jádře (většina živočišných DNA virů). V případě, že se jedná o konečnou formu virové částice, může dojít k integraci virových glykoproteinů do povrchových struktur a k uvolnění virové částice z buňky. Nukleoproteiny obalených virů jsou obvykle transportovány do míst zdrojů lipoproteinové membrány (jaderná membrána, membrána Golgiho komplexu, cytoplazmatická membrána). V místě obalování jsou v nadlimitní koncentraci připraveny virové glykoproteiny. Dochází k interakci virového nukleoproteinů s příslušnou membránou, a to prostřednictvím virových glykoproteinů, a k jejich obalení procesem analogickým exocytóze (pučení). Přitom dojde k uvolnění buněčných

proteinů z lipoproteinové membrány a jejich nahrazení viru specifickými proteiny. Jiný mechanismus uvolňování virových částic představuje způsob, kdy se viry nahromadí ve velkých buněčných váčcích podobných vakuolám, ze kterých se uvolní po fúzi váčku s cytoplazmatickou membránou. Jindy dochází k lýzi celé buňky a uvolnění virových částic do extracelulárního prostoru.

3. Základy patogeneze virových nákaz

Viry se svou schopností množit se v citlivých (permissivních) buňkách se jeví ve vztahu k organismu jako **patogeny**. Souhrn jevů a procesů, které vedou k onemocnění a určují zákonitosti jeho rozvoje, se označuje jako **patogeneze**. Patogeneze je složitý proces zahrnující způsob šíření nákazy, cesty vstupu viru do organismu a délku inkubační doby. Do procesu patogeneze patří také rozmnožování viru, primární patogenická reakce organismu na změny a poškození buňky virem, které představují základní procesy determinující další patogenické obrazy.

Po průniku viru do organismu se virus střetává s celou řadou reakcí, které mají obranný charakter. Tyto reakce vznikají jako výsledek fylogenetického a ontogenetického vývoje. Mají specifický nebo nespecifický charakter.

Pro patogenezi virových infekcí je důležitá i jeho **virulence**. Virulence je dána schopností viru se množit v daném jedinci za projevů jeho poškození nebo onemocnění, které se může projevit pouze v infikované buňce, tkáni nebo na organismální úrovni. Virulence jako vlastnost viru je zakódována v jeho genetické informaci. Jedná se tedy o vlastnost, která se musí definovat vždy ve vztahu k infikovanému jedinci, čili virulence jednoho viru může být různá pro různé živočišné druhy.

Nejcharakterističtějším projevem virulence na buněčné úrovni je **cytopatický efekt**, jehož výsledkem je destrukce, případně odumření buňky, za současného uvolnění nových virových částic.

Z klinického a epidemiologického hlediska se za **virovou nákazu (infekci)** považují všechny procesy, které probíhají v makroorganismu po jeho infekci virem, bez ohledu na to, zda mají povahu klinických projevů onemocnění.

Virové onemocnění je naproti tomu stav infikovaného organismu, který je charakterizován dočasným nebo trvalým narušením fyziologické funkce buněk, tkání nebo orgánů. Tyto změny vedou k vývoji klinických příznaků onemocnění, tedy k chorobnému stavu. Virové onemocnění je tedy důsledkem virové nákazy.

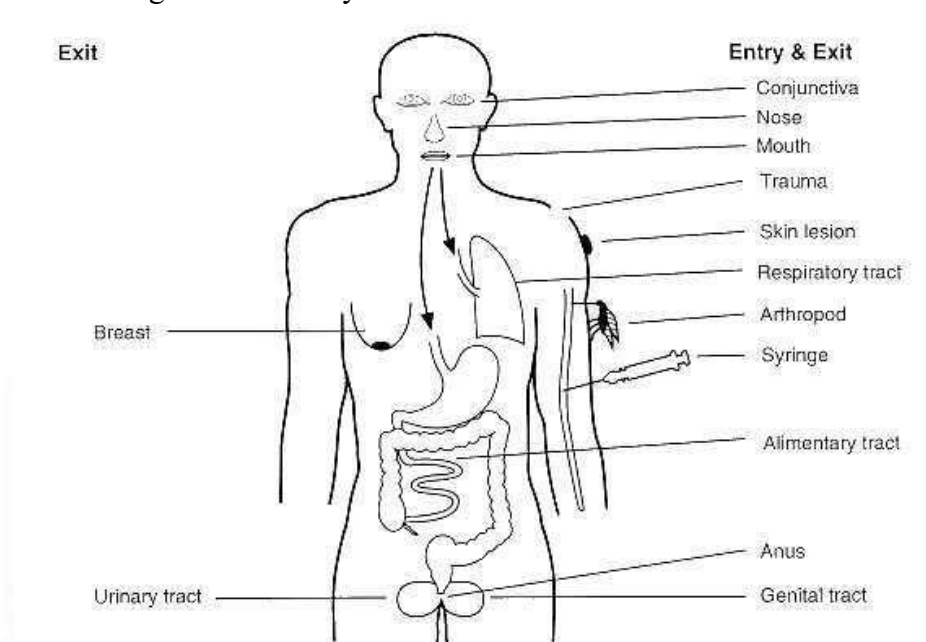
Na základě klinických projevů je možné členění virových nákaz na:

1. **bezpříznakové (inaparentní)**, při nichž je možné infekční virus v organismu nebo sekretech prokázat, ale klinicky se takový průběh manifestuje jako abortivní. Může proběhnout u organismů se specifickými protivirovými protilátkami. Při infekci organismu málo virulentními kmeny virů může přejít i do chronické formy, jejíž klinické příznakymohou mít proměnlivý, třebaže ve svých konečných důsledcích škodlivý charakter.
2. **klinicky manifestní (zjevné, aparentní)**, které po uplynutí inkubační doby přecházejí ve virové onemocnění s typickými klinickými projevy. Ty mohou být
 - a. **akutní** – jejich výskyt je nejčastější. Tyto nákazy jsou charakteristické krátkou inkubační dobou a klinickými projevy různého stupně. Po odeznění choroby se zpravidla neopakují (pokud virus nepodléhá rychlým antigenním změnám). Zřídka tyto nákazy přecházejí do chronického stavu. Příkladem může být chřipka, respirační virové nákazy, poliomyelitida, encefalitida, enterální virová onemocnění apod.

- b. **chronické** – tento typ nákazy může být výsledkem klinicky skryté infekce vzniklé v důsledku inaparentní nákazy (méně často také jako následek akutního onemocnění). Chronické infekce můžeme rozdělit na **persistentní, latentní a pomalé infekce**. Latentní chronické nákazy jsou charakterizovány perzistencí viru nebo nekompletních virových částic v některých buňkách. Klinický projev je tlumen různými mechanismy organismu. Teprve po selhání nebo narušení těchto mechanismů (stres, změna imunologické rovnováhy, hormonální změny apod.) se nastartuje replikace viru s lokalizovanými klinickými projevy. Chronická nákaza se pak projeví akutním onemocněním. Typickým případem je rekurentní herpes labialis nebo herpes zoster, jež se občas projeví v akutní formě, ačkoliv jde většinou o inaparentní nákazu v raném dětství, jež se udržuje v organismu v chronické formě prakticky po celý život. Klasickým příkladem persistentní infekce je nákaza virem lymfocytární choriomeningitidy. V takovém případě je organismus virem napaden dlouhodobě, vylučuje virus, ale nemá žádné klinické příznaky. Mezi pomalé infekce řadíme například infekci virem HIV nebo spalničky.

Cesty průniku viru do hostitelského organismu

Brány vstupu virů do organismu nejsou nahodilé, ale jsou výsledkem dlouhého vývoje. Lidské tělo dělí od vnějšího prostředí tři typy hlavní epiteliální bariéry: pokožka, respirační mukóza a epitel trávicího traktu, a dva menší: epitel genitálií a oční spojivka. Aby viry zdolaly tyto bariéry, musí buď (1) infikovat buňky těchto povrchů, (2) zdolat tyto povrchy jiným způsobem (poškození, kousnutí hmyzem či živočichem, injekce, transfúze či transplantace), nebo (3) být přeneseny z matky na potomka. Viry tělo opouští přes tytéž povrchy, ne vždy však toutéž cestou, kterou se do organismu dostaly.



Infekce přes pokožku

Nepoškozená pokožka má těsnou vnější vrstvu rohovějících buněk. Tato bariéra brání tělo před infekcí, bývá však často poškozena při zranění či inokulaci (např. sání hmyzu či klíštěte, injekce

apod.). K přenosu viru pomocí injekční stříkačky může dojít nejen při lékařském zákroku, ale velmi často při sdílení jehel mezi narkomany, tetování, či piercingu. Tímto způsobem jsou nejčastěji přenášeny viry hepatitidy B a C, méně často cytomegalovirus, virus Epsteinova a Barrova či virus lidské imunodeficiency (HIV).

Zdolání epiteliální bariéry pomocí vektora (př. komár, klíště) je typické pro řadu medicínsky významných virů (mluvíme souhrnně pak o tzv. **arbovirech**), mezi které řadíme většinu togavirů, flavivirů, rod Orbivirus, a všechny bunyaviry s výjimkou hantavirů. V takovém případě bývá virus přímo injikován do malé krevní cévy.

Pouze některé z virů, které do těla vstupují přes pokožku, opouští tělo touto cestou. Některé z virů, které vstupují do těla respirační cestou, jsou pak vylučovány v mukóze ústní dutiny (například spalničky a dříve virus pravých neštovic) či v slinných žlázách (příušnice).

Infekce přes respirační trakt

Ve vyspělém západním světě představuje šíření virů přes respirační trakt vůbec nejčastější způsob šíření virů. Průměrný dospělý člověk vydýchá zhruba 600 litrů vzduchu každou hodinu. Jak hluboko viry do respiračního traktu proniknou, je dáno velikostí kapének, případně prachových částic. Malé částičky (< 2µm v průměru) prostupují do hlitanu a některé dosahují až k plicním sklípkům. Viry v kapénkách mohou iniciovat infekci v okamžiku, kdy jsou zaneseny až k buňkám respiračního traktu. Mnohé respirační viry mohou být také přeneseny pomocí kontaminovaných prstů nebo předmětů. Infekce respiračními viry může být lokalizovaná na respirační trakt (pak způsobují nachlazení, rýmu, chřipku, faryngitidu, bronchitidu či pneumonii), či může prostoupit respiračním traktem a přejít v generalizovanou infekci.

TABLE 48-2 Viruses That Initiate Infection via the Respiratory Tract

Site of Infection	Family	Specific Viruses
Local respiratory infection	Orthomyxoviridae	Influenza A and B viruses
	Paramyxoviridae	Parainfluenza viruses, respiratory syncytial virus
	Picornaviridae	Rhinoviruses, a few enteroviruses
	Coronaviridae	Many serotypes
	Adenoviridae	Many serotypes
Generalized disease, usually without initial respiratory symptoms	Herpesviridae	Varicella virus, EBV, cytomegalovirus
	Papovaviridae	BK virus, JC virus
	Parvoviridae	Erythema infectiosum virus
	Paramyxoviridae	Mumps virus, measles virus
	Togaviridae	Rubella virus
	Picornaviridae	Some enteroviruses
	Bunyaviridae	Hantaviruses
	Arenaviridae	Lymphocytic choriomeningitis virus, Lassa fever virus
	Poxviridae	Smallpox virus (in the past)

Infekce přes trávicí trakt

Ačkoliv je povrch trávicího traktu potenciálně vystaven obrovskému množství virů, nevlídné podmínky v žaludku a duodenu většinu z nich zlikvidují. Například viry, které obsahují lipidickou obálku, jsou obvykle inaktivovány v kyselém prostředí, žluči nebo enzymy, které se vyskytují v žaludku a duodenu. K infekci přes střevo tudíž může dojít jen v případě virů, které jsou odolné působení těchto extrémních podmínek. Tyto viry se množí v epitelu tenkého střeva

a jsou vylučovány ve výkalech. Takové viry bývají často rezistentní vůči vnějším environmentálním podmínkám a mohou způsobovat vodou či potravinami šířené epidemie. V poslední době se do této skupiny začaly řadit i některé klasické sexuálně přenosné infekce (př. HIV), které se v tomto případě dostávají do těla díky poškození mukózy rekta při análním sexuálním styku, především mezi homosexuálními muži.

TABLE 48-3 Viruses That Initiate Infection via the Alimentary Tract

Site of Infection	Family	Specific Viruses
Mouth or oropharynx	Poxviridae	Monkeypox virus
	Herpesviridae	HSV, EBV, cytomegalovirus
Intestinal tract Producing enteritis	Reoviridae	Rotaviruses
	Caliciviridae	Norwalk agent and related viruses
	Adenoviridae	Several types
Producing generalized disease, usually without local symptoms	Picornaviridae	Many enteroviruses including polioviruses and hepatitis A virus
	Caliciviridae	Hepatitis E virus
Usually symptomless	Picornaviridae	Some enteroviruses
	Adenoviridae	Some adenoviruses
	Reoviridae	Reoviruses
	Coronaviridae	Coronaviruses (rarely)

Infekce přes genitální trakt

Do této skupiny můžeme zařadit běžné sexuálně přenosné infekce, jako je HIV, virus lidské T-buněčné leukémie (HTLV-1) a zřejmě virus hepatitidy C. Do centra pozornosti se dostává zřejmý genitální přenos papilomavirů, coby původců nádoru děložního čípku. Genitální léze způsobené sexuálně přenosným virem herpes simplex, typ 2 (HSV-2) mohou zvýšit pravděpodobnost úspěšného heterosexuálního přenosu viru HIV.

Mnohé lidské viry jsou vylučovány v moči lidí, či v případě arenavirů a hantavirů moči hlodavců. Viry z moči hlodavců pak mohou vyvolat lidskou infekci po vdechnutí prachu obsahujícího virové částičky (hemoragická horečka v případě arenavirů a hemoragická horečka s renálním syndromem nebo hantavirový pulmonární syndrom v případě hantavirů.)

Infekce přes rohovku

Některé viry mohou příležitostně infikovat rohovku přímo, ale konjunktivitida (infekce rohovky) bývá častěji způsobena coby výsledek generalizované infekce, kdy virus dosáhne rohovky z krevního řečiště (např. spalničky).

TABLE 48-4 Viruses That Initiate Infection of the Eyes or Genitourinary Tract or Are Excreted in Urine

Site	Family	Specific Viruses	Disease
Ocular	Adenoviridae	Human type 8 virus, and others	Conjunctivitis
	Herpesviridae	HSV-1	
	Poxviridae	Vaccinia virus (accidental)	
	Picornaviridae	Enterovirus 70, coxsackievirus A24	
Genital	Paramyxoviridae	Newcastle disease virus	Molluscum contagiosum Genital herpes Genital warts Hepatitis AIDS Adult T cell-leukemia Hepatitis
	Poxviridae	Molluscum contagiosum virus	
	Herpesviridae	HSV-2	
	Cytomegalovirus	Congenital disease	
	Papovaviridae	Human papillomaviruses 16, 18, others	
	Hepadnaviridae	Hepatitis B virus	
	Retroviridae	HIV-1, HIV-2	
		HTLV-1	
	Flaviviridae	Hepatitis C virus	
	Excretion in urine	Herpesviridae	
Togaviridae		Rubella virus	
Paramyxoviridae		Measles virus, mumps virus	
Hepadnaviridae		Hepatitis B virus	
Arenaviridae		Several arenaviruses	
Bunyaviridae		Hantaviruses	

Vertikální přenos

Vertikální přenos znamená přenos viru z rodičů na potomky a může k němu dojít přes vajíčko, placentu, během porodu nebo z mateřského mléka. Mezi viry, které jsou schopné prostoupit placentou, řadíme virus zarděnek a cytomegalovirus, které mohou způsobit defekty plodu a těžké novorozenecké infekce, a virus HIV.

Klasickými případy vertikálního přenosu viru u živočichů je virus lymfocytární choriomeningitidy u myši, který je přenosný v cytoplasmě vajíčka a přes placentu, nebo virus hlodavčí leukémie (murine leukemia). Retroviry jsou přenosné jednak díky začlenění jejich cDNA (z RNA genomu) do genomu hostitele nebo vzácněji (u ptáků) díky infekčním virovým částicím přítomným ve vajíčku.

K vertikálnímu přenosu cytomegaloviru může docházet pomocí mateřského mléka. Dále může být cytomegalovirus, ale i herpes simplex virus, typ 1, přenesen z rodičů na potomky kontaminovanými slinami.

Šíření viru v hostitelském organismu

Viry mohou vyvolávat lokální nebo systémové onemocnění. V druhém případě to znamená, že od místa primární infekce se musí virus dostat k cílovému orgánu, v němž probíhá vlastní infekční proces. Šíření z místa vniknutí závisí na povaze viru, tak i na vnímavosti nebo rezistenci makroorganismu. U vnímavých organismů závisí intenzita průniku viru do tkání pouze na virulenci viru. Do tkání se virus nedostane pouze tehdy, je-li organismus imunní (po předchozí infekci stejným virem) nebo přirozeně rezistentní.

U obratlovců je nejčastější šíření virů:

1. **sliznicemi** – při lokální infekci (zasažení malé části sliznice) se předpokládá předávání viru z buňky na buňku. Naproti tomu rychlé zachycení větších úseků sliznice je spíše umožněno účastí povrchové tekutiny, která je uváděna do pohybu činnostmi řasinek. Nelze vyloučit ani účast mezibuněčné tekutiny.

2. **lymfatickými cestami** – Lymfatický systém se na šíření viru z místa infekce může podílet dvěma způsoby: (1) Slouží k přenosu viru z místa primárního kontaktu (kůže nebo sliznice), které může být u některých virů i místem primárního pomnožení. Odtud se virus šíří k cílovému orgánu lymfatickými cestami. (2) Z lymfoidní tkáně přechází virus do krve či krevního řečiště, kterým je dále transportován.

3. **neurální cestou** – po nervových vláknech nebo uvnitř jejich obalů, jako je tomu u vztekliny a poliomyelitidy. Postup viru může být lymfatickými drahami obklopujícími neurony, v tkáňových prostorech perineuria, epineuria nebo mezi nervovými vlákny, podél nervu, progresivní infekcí buněk pojivové tkáně nebo Schwannovými pochvami. Je možná i kombinace několika mechanismů.

4. **krevní cestou** – Krevní oběh představuje hlavní cestu šíření viru. Virus v krvi cirkuluje zpočátku v malých kvantech, mluvíme o tzv. **primární virémii**. Jejím prostřednictvím je zanesen k místu sekundárního pomnožení. Zde dochází v infikovaných buňkách k jeho pomnožení do takového množství, kdy už je pak v krvi detekovatelný běžnými virologickými technikami. Mluvíme pak o tzv. **sekundární virémii**. Hlavními zdroji viru pak bývají krví bohaté orgány, jako játra, slezina a kostní dřeň. Do krve se virus však může dostat i z cévního endotelu nebo lymfoidní tkáně.

Zjednodušeně si lze proces patogeneze typické virové infekce představit asi takto: Virus infikuje sliznici nebo podkoží v bráně vstupu. Dále virus proniká do lymfatických cís, které prostupují infikovanou oblastí. Odtud se v malých dávkách (primární virémie) dostává do krevního řečiště, přičemž je poměrně rychle vychytáván buňkami retikuloendoteliální soustavy. K dalšímu množení viru dochází v těchto sekundárních místech virové replikace, odkud je virus již uvolňován ve velkém množství do krve a to vede k rozvinutí sekundární virémie. Současně se tak dostává do cílového orgánu.

Uvolňování viru z hostitelského organismu

Viry mohou být vylučovány již v místě primárního pomnožení nebo v případě generalizované infekce sputem, krví, slinami, močí, stolicí, či spermatem.

Snadné a rychlé vylučování je možné především z místních kožních lézí, zvláště jsou-li doprovázeny kožní nekrózou, jako je tomu u neštovic. Podobně je tomu i při nekróze povrchových buněk sliznic především dýchacích cest (např. u chřipky). Toto snadné uvolňování virů však dává všechny předpoklady pro velice rychlý způsob jejich šíření. Naproti tomu při generalizovaných infekcích je vylučování viru závislé na orgánech, v nichž dochází k sekundárnímu pomnožení a probíhá podstatně pomaleji.

Ve slinách je možné detekovat virus především při parotitidě.

Vylučování stolicí je charakteristické pro některé prionaviry, ECHO viry, reoviry, adenoviry apod. Do střeva se viry mohou dostat z tkání střevní stěny, z horních částí trávicího traktu, ale i z dýchacích cest.

Vylučování močí bylo prokázáno u virů příušnic, spalniček, zarděnek, některých adenovirů ad. Viry jsou vylučovány močí po dobu virémie. Jestliže exkrece virů močí trvá delší dobu, je možné předpokládat, že dochází k pomnožení viru v buňkách ledvin, případně v jiných místech močových cest.

4. Genetika a evoluce virů

Studium genetiky virů vychází ze dvou základních předpokladů: je nutno izolovat geneticky homogenní materiál a popsat jeho různé genetické markery, jimiž lze spolehlivě odlišit jedlitlivé klony. Klon je možné definovat jako geneticky homogenní materiál. Avšak i zde hraje podstatnou roli stabilita. Klon nemusí zůstat trvale absolutně homogenní. Během reprodukce virů, zvláště při replikaci virového genomu mohou vznikat více či méně odlišní jedinci, čili mutanti. Většina důležitých změn v sekvenci nukleotidů virové nukleové kyseliny vzniká právě mutacemi. V menší míře lze získat mutovaný genom rekombinací.

Mutace

Mutaci je možné charakterizovat jako proces, při kterém dochází ke změně primární struktury nukleové kyseliny. Důsledkem této změny je vznik nového znaku. Uvážíme-li, že při virové infekci se genom každé částice zreplikuje více než milionkrát, pak v populaci viru lze očekávat celou řadu genotypů. V této souvislosti mluvíme o tzv. qasispecies (kvazi-druh), což je soubor geneticky příbuzných variant vyskytujících se v jedné virové populaci (např. v jednom hostiteli). Praktický význam nově vytvořených genotypů bude potom záviset na dvou faktorech: 1. zda výsledná změna v polypeptidu mutantního viru je selekčně příznivá nebo zda je neutrální či nepříznivá; 2. zda se mutace uskutečňuje v časně nebo pozdní fázi infekce.

Mutace uskutečňované substitucí báze (bodové mutace) jsou pravděpodobně stejné u DNA virů jako u prokaryotních buněk, protože množení se obvykle uskutečňuje v jádru těchto buněk za přítomnosti stejných korekturních mechanismů. Tyto chyby se vyskytují při rychlosti 10^{-8} až 10^{-9} na jeden inkorporovaný nukleotid.

Pro eukaryotické buňky nepředstavuje RNA zdroj genetické informace, a proto neexistuje důvod, proč by obsahovaly korekturní mechanismy pro RNA molekuly. Studium RNA virů naznačuje, že mutační rychlost virové RNA je velice vysoká, podstatně vyšší než u virové DNA. Pravděpodobně je vyšší než 10^{-6} na nukleotidové zdvojení, nebo 10^{-2} na molekulární zdvojení v 10 kb RNA viru. Většina substitucí v RNA však může být letální a genomy, které je obsahují, se v evoluci vytrácejí.

Mutace mohou být klasifikovány podle změny v nukleové kyselině, vyvolané buďto substitucí nebo delecí (velkou či malou). Fyziologický efekt mutace však nezávisí pouze na typu a lokalizaci mutace, ale také na aktivitě dalších genů.

Klasifikovat lze mutace též podle fenotypové exprese, a to jako teplotně senzitivní, adaptované k chladu, mutace v rozmezí hostitele, ve schopnosti tvořit plaky apod. Teplotně senzitivních a k chladu adaptovaných mutant lze využít při přípravě oslabených živých virových vakcín. Mutace ovlivňující antigenní místa (epitomy) mohou být selektovány během reprodukce viru v přítomnosti protilátky. Mají tedy podstatný význam nejen u organismů persistentně infikovaných, ale také v epidemiologii.

Mutagenese

Mutace v přírodě vznikají jako náhodné chyby při replikaci. Jejich frekvenci lze zvýšit vystavením virionů nebo jejich nukleové kyseliny fyzikálním faktorům nebo působením chemických látek.

Abortivní infekce a defektní viry

Virová infekce není vždy produktivní, tj. nevede k vytvoření infekčního potomstva. Tento jev je označován jako abortivní infekce a dochází k nastolení tohoto stavu v buňkách, které nejsou pro daný virus permissivní. Takové buňky například postrádají některé enzymy nebo jejich kofaktory, či jiné nezbytné záležitosti nutné k dokončení replikačního cyklu.

Extrémní forma defekce se projevuje u buněk transformovaných některými DNA viry. V tomto případě je část nebo celý virový genom integrován do genomu hostitelské buňky a současně se s ním také replikuje. Přitom může zde dojít k expresi části virového genomu kódujícího syntézu specifických bílkovin, ale v konečné fázi není produkována infekční částice.

Genetická interakce mezi viry

Jestliže dva různé viriony infikují tutéž buňku, může dojít k řadě genetických interakcí mezi nově syntetizovanými molekulami virové nukleové kyseliny. Mezi nejdůležitější patří rekombinace a reaktivace.

Rekombinace je výměna sekvencí nukleových kyselin mezi dvěma různými, ale obvykle příbuznými viry. Reassortace (reassortment) – v tomto případě dochází k prohození celých genomických segmentů dvou virů současně infikujících danou buňku.

Reaktivace je termín používaný pro případy množení virů, kdy dochází k infekci buňky dvěma nebo více viry téhož kmene, z nichž každý má letální mutaci různého genu.

Interakce mezi genovými produkty virů

Komplementace je souhrn interakcí mezi produkty virových genů v mnohonásobně nebo smíšeně infikované buňce, jež vede ke zvýšení produkce jednoho nebo více typů virů. Na rozdíl od rekombinace nezahrnuje komplementace výměnu nukleových kyselin, ale odráží skutečnost, že jedna virová částice poskytuje genový produkt, který druhá částice není schopna vytvářet. Komplementace může být uskutečňována i mezi nepříbuznými viry.

Fenotypové míšení

Po smíšené infekci buněk dvěma viry s některými společnými znaky může většina potomstva nabýt fenotypovou charakteristiku obou rodičovských částic, avšak genotyp zůstává nezměněn. Často mohou vznikat částice s antigenní mozaikou, která je determinována různými nukleovými kyselinami.

U neobalených virů je pozorováno fenotypové míšení také tzv. transkapsidací, při které dochází k rozsáhlým nebo úplným změnám kapsidu.

Polyploidie

S výjimkou retrovirů, které jsou diploidní, jsou všechny ostatní viry haploidní, tzn. obsahují pouze jednu kopii každého genu. U virů, jejichž maturace je uskutečňována pučením přes cytoplasmatickou membránu, se zjistilo, že několik neuklokapsidů může být uzavřeno do jediného obalu. Jestliže jsou buňky současně infikovány průkazně odlišným kmenem viru, potom převážná část potomstva bude heterohaploidní. Na základě toho může mít i fenotypově smíšené povrchové antigeny.

5. Epidemiologie virových infekcí

V předchozích kapitolách jsme se zabývali viry z pohledu molekulární biologie, jejich interakcemi s hostitelskými buňkami, efektem virové infekce na jednotlivé orgány, orgánové soustavy či infikovaného jedince. Nyní přikročíme k otázce vztahu virů a celé společnosti. Termín „epidemiologie“ je odvozen z řečtiny a znamená něco na způsob „studium toho, co je mezi lidmi“. „Epizootologie“ je odpovídající termín týkající se infekcí postihujících zvířata.

Definice

Prevalence – počet případů dané infekce (klinických nebo subklinických) zaznamenaný v daném čase; vyjádřený jako část sledované populace.

Incidence je obvykle vyjadřována jako počet případů na tisíc nebo sto tisíc jedinců v dané populaci za daný časový úsek.

Termín „**endemický**“ označuje onemocnění, které se konstantně vyskytuje na určité hladině v dané populaci. Míra endemnicity/endemičnosti může být vysoká nebo nízká. Odpovídající termín v případě infekčních onemocnění zvířat je „enzootický“.

Epidemie – označuje stav, kdy dojde k neobvyklému nárůstu počtu případů dané infekce v dané populaci. Označení „neobvyklý“ závisí na dané infekci – 100 nových případů spalniček v Londýně nelze pokládat za epidemii, zatímco 100 nových případů dětské obrny na témže místě by jistě za epidemii považováno bylo. Ve veterinární medicíně používáme termín „**epizoonóza**“.

V prvé řadě je možnost vzniku hromadné nákazy v podmínkách výstavby velkoměst, sídlišť, závodů, ale i rekreačních a kulturních zařízení, kde na jednotku plochy připadá velký počet osob. Mezi podmínky umožňující rychlé šíření virové infekce patří zavedení masové dopravy, obzvláště letecké, a velkochovy hospodářských zvířat. Dalším faktorem podporujícím vznik epidemií vyvolaných viry zejména v rozvojových a hospodářsky zaostalých zemích je nízká úroveň zdravotnické a hygienické služby, dále pak podvýživa a hlad obyvatel těchto zemí. Ohniska infekcí, které se zde často vyskytují, představují také potenciální možnost jejich přenosu i do hospodářsky a kulturně vyspělých zemí s hustým osídlením. Výskyt virových onemocnění u člověka je podmíněn i ekologickými vztahy a podmínkami, například vstupem do přírodního ohniska nákazy.

Pandemie je epidemie, která zasáhne více kontinentů v současném čase. Ve veterinární medicíně se používá korespondující termín „**panzoonóza**“.

Virové infekce živočichů přenosné na člověka ať již prostřednictvím přenašečů (vektorů) nebo jiným způsobem (poranění, vdechnutí, potrava) patří mezi tzv. **antropozoonózy**.

Co způsobuje epidemie?

Epidemiologie, to není jen statistika a zaplňování suchých tabulek; epidemiologie má za cíl se zabývat i následujícími otázkami:

1. Predikovat trendy šíření onemocnění. Například znalosti ohledně toho, jak se nemoci šířily dříve, nám pomáhá určit, jaký bude zřejmě trend rozvoje epidemie.

2. Zavádět, zlepšovat a upravovat preventivní a kontrolní opatření (vakcinační programy, kontrola šíření vektorů infekcí, hygiena).
3. Hodnocení účinnosti různých preventivních kampaní na národní i celosvětové úrovni.
4. Pomáhat zlepšovat diagnostiku. Znalost toho, jaké konkrétní infekční choroby se vyskytují v daném čase v dané populaci, napomáhá lékařům zvolit vhodné diagnostické laboratorní testy a určit správnou diagnózu.

Metodika epidemiologie

Epidemiologie využívá dvou klasických metodik – monitoring klinických infekcí a laboratorní testování. Obě metodiky jsou velmi provázané a napojené na odpovídající systémy sběru a vyhodnocení dat.

Monitoring klinických infekcí

Pečlivý monitoring infekcí dal základ epidemiologii jako vědecké disciplíně ještě dávno před tím, než byly bakterie a viry objeveny. Klasickým příkladem je studium šíření cholery v Londýně provedené Dr. Johnem Snowem v roce 1854, čili dávno předtím, než bylo *Vibrio cholerae* objeveno. Dr. John Snow sledoval, které vodovodní společnosti zásobují vodou určité části Londýna, a tyto údaje porovnával výskytem onemocnění cholerou. Určil tímto nejenom to, že tato infekce je přenášena vodou, ale odhalil i jednu konkrétní pumpu, která byla zdrojem infekce a příčinou rozsáhlé epidemie.

Laboratorní testování

Řadu infekcí je obtížné diagnostikovat čistě na základě klinických příznaků a navíc velmi mírné či subklinické infekce zůstávají nezaznamenány. Z těchto důvodů je nutné provádět i klinické testování, které se zaměřuje jednak na detekci viru, jeho nukleové kyseliny nebo antivirových protilátek u akutně infikovaných pacientů a detekci specifických antivirových protilátek v běžné populaci.

Serologická epidemiologie

Tento termín poprvé použil John Paul, který prvně uvedl, že sérové protilátky představují „otisk“ infekce prodělané v bližší či vzdálenější minulosti. Ve třicátých letech minulého století bylo zjištěno, že protilátky proti danému patogenu lze detekovat u mnohem více lidí, než kolik jich prodělalo klinickou infekci. Tento fenomén byl pojmenován jako „špička ledovce“, kde část ledovce nad vodou představuje klinické infekce, zatímco část ponořená pod vodou tu část populace, která má protilátky, ale nebyla klinicky nemocná.

Zajímavých výsledků dosáhl výzkum, který proběhl v letech 1949-51 na třech místech světa lišících se socioekonomickými faktory – v Káhiře, Miami a na Aljašce a který se zabýval detekcí protilátek proti viru dětské obrny. V Káhiře bylo zjištěno, že děti mladší 6 měsíců mají stále vysoký titr mateřských protilátek proti danému viru, přičemž jejich titr posléze klesá, ale poté množství protilátek opět vzroste následkem aktivace imunitního systému při rané infekci. Toto zjištění bylo překvapivé, protože klinické případy dětské obrny byly v Káhiře prakticky neznámé. Tudíž všechny tyto děti reprezentovaly onu část ledovce, která je ponořena pod vodní hladinou. Rané vytvoření dostatečné protektivní hladiny protilátek je charakteristické pro

společnosti s nízkou úrovní hygienických podmínek, kde se tento fekálně-orální cestou šířený patogen rychle šíří.

V Maiami, čili místě s vysokým hygienickým a ekonomickým standardem, byla situace zcela odlišná. Zde přicházeli pacienti do kontaktu s virem v pozdějším věku, což vedlo k epidemiím dětské obrny pravidelně v intervalu 7-10 let.

Ve velmi izolovaném prostředí na Aljašce se poslední epidemie objevila asi 20 let před prováděným výzkumem, ale od té doby téměř žádné nové případy nebyly registrovány. U osob mladších 20ti let nebyly skoro žádné protilátky detekovány, ale naopak osoby starší 20ti let měly vysokou hladinu protektivních protilátek.

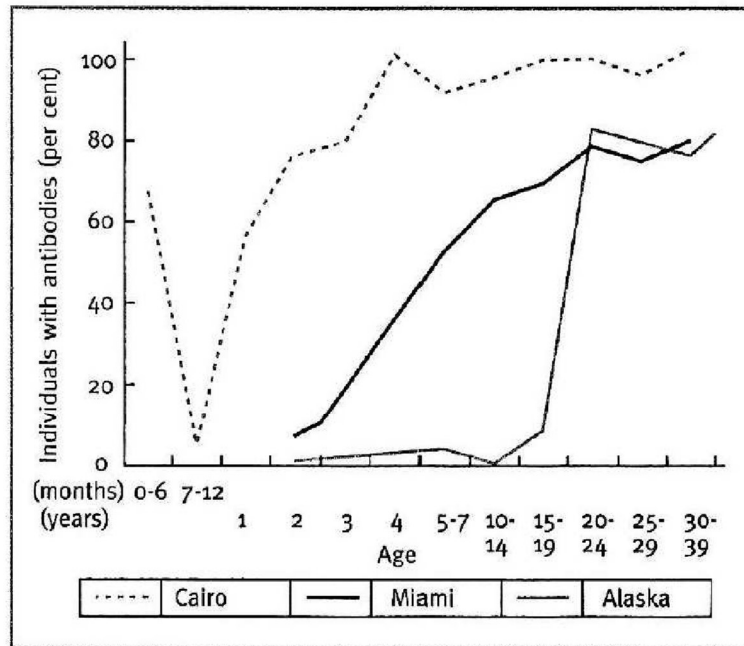


Fig. 7.3 Prevalence of poliomyelitis antibody in different populations. Percentages of individuals with antibodies to poliovirus type 2, surveyed during 1949–51. (Reproduced with permission from Paul, J.R. and White, C. (ed.) (1973). In *Serological Epidemiology*, p. 10. Academic Press, New York.)

Faktory ovlivňující šíření infekcí

Prvním z faktorů ovlivňující šíření infekce je stabilita ve vnějším prostředí. Enteroviry jako například virus hepatitidy A nebo virus dětské obrny si ponechávají životaschopnosti i po několika týdnech ve vodě nebo splašcích, což z nich činí úspěšné vodou-přenosné patogeny, kromě toho jsou velmi rezistentní ke kyselému pH, tudíž přežívají drsné prostředí žaludku, jsou-li požití společně s kontaminovanou vodou nebo potravinami.

Hostitelský rámec je také důležitým faktorem. Je-li primárním nebo alternativním hostitelem savec nebo pták, má to jistě důležité epidemiologické konsekvence. Některé infekce jsou navíc přenášeny vektory – komáry nebo klíšťaty.

Jistě i cesty, kterými virus vstupuje do těla hostitele a jakými se v rámci hostitelova těla šíří, jsou velmi důležité. Velmi závisí na schopnosti viru zdolávat útok imunitního systému hostitele, na jeho virulenci a mutační frekvenci, která může determinovat schopnost viru stát se rezistentním vůči neutralizačním protilátkám nebo antivirové terapii, apod. Rychlost šíření epidemie ovlivňuje i délka inkubační doby – v případě enteroviru 70 je inkubační doba asi 2

dny, díky čemuž dochází k rozvoji rychlých a rozsáhlých epidemií, zatímco infekce virem HIV má inkubační dobu trvající roky a tudíž tato infekce se šíří relativně pomalu, ale o to více zákeřně.

Na šíření virových infekcí mají bezpochyby podstatný vliv i environmentální faktory a faktory charakterizující hostitele (věk, etnická skupina, genetické faktory, výživový status apod.).

Rozlišujeme dva hlavní způsoby přenosu patogenů v lidské společnosti:

1. šíření z člověka na člověka (sem patří především viry, jež mají bránu vstupu přes respirační trakt – virus chřipky, spalniček, příušnic atd.)
2. viry nepřenášené přímo z člověka na člověka – mnoho virů je přenášeno fekálně-orální cestou (virus dětské obrny, hepatitida A), jiné pomocí bezobratlých vektorů (virus klíšťové encefalitidy, dengue, žluté zimnice, japonské encefalitidy, horečky západního Nilu), či při sexuálním kontaktu (virus HIV, herpes simplex 2).

Šíření virů mezi hostiteli

248

9. Epidemiology and Control of Viral Infections

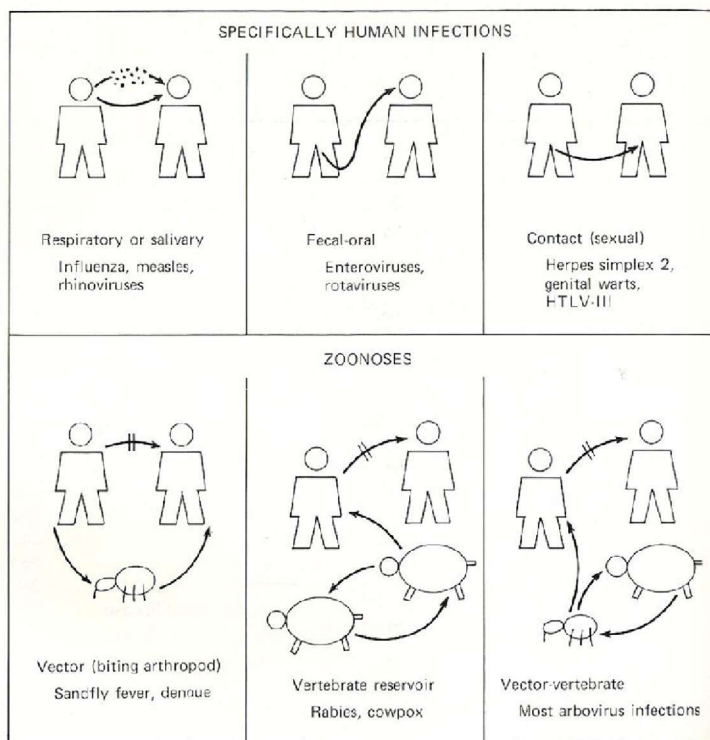


FIG. 9-1. Types of transmission of human viral diseases. Respiratory and contact

Přímý horizontální přenos virových infekcí

Nejčastěji se setkáváme s přenosem nákazy formou kapénkové infekce (respirační virózy), infekce šířené zažívacím traktem (enterovirózy) a s přenosem přímým kontaktem.

Některé cesty přenosu virových onemocnění jsou uskutečňovány porušením bariéry – kůže, například injekcí provedenou člověkem (př. transfúze) nebo bodnutím členovce. Porušení kůže členovcem má z epidemiologické stránky mnohem větší význam než všechny ostatní způsoby přenosu kůží. Přenos v takovém případě může být čistě mechanický nebo spojený s pomnožením viru v organismu přenašeče. Schopnost viru rozmnožovat se v tkáních členovce

nestačí však k tomu, aby se dotyčný členovec stal rovnou přenašečem. Některé viry se sice rozmnožují v těle komárů, ale nejsou schopny pronikat přes stěnu střeva. Jindy se virus v komáru množí, ale není schopen proniknout do jeho slinných žláz.

Přenos virů členovci je vysoce efektivní způsob šíření. Viry tak poměrně snadno překonávají mezidruhové bariéry, neboť jeden přenašeč se může živit na vrub tak rozdílných živočichů jako jsou ptáci, plazi, savci aj.

Přímý vertikální přenos virových infekcí

Přenos virové infekce od jednoho hostitele ke druhému, ať už v rámci jednoho druhu nebo mezi druhy, se označuje jako horizontální. Naproti tomu vertikálním způsobem přenosu se rozumí předávání infekce z pokolení na pokolení. Nejčastěji je vertikální přenos uskutečňován infekcí plodu, přes cytoplasmu vajíčka a placentu nebo mlékem.

Nepřímý přenos virových infekcí

Nepřímý přenos se může uskutečnit třeba formou prachových částic, na které je virus volně navázán. S těmito částicemi se pak vdechnutím nebo potravou dostává virus do organismu. Z přírodního ohniska se viry mohou dostat do půdy, vody, prachu, mléka, masa apod. Infekčnost virů v rezervoárech nákazy je ovlivněna celou řadou faktorů. Mezi nejdůležitější náleží faktor času – doba, která uplynula od vyloučení viru do půdy, vody, prachu, a dále faktory chemické (pH prostředí, přítomnost různých látek) a fyzikální (teplota, vysušení, UV záření apod.).

Dýchací cesty jsou nejčastěji branou vstupu respiračních virů. Ústy pronikají do organismu především viry enterické, ale i řada jiných. Na nepřímém způsobu přenosu se též může podílet i hmyz, kdy např. mouchy přenesou virovou infekci z přírodního ohniska na potravu živočichů. V živočišném organismu se virus pak začne množit a vyvolá onemocnění.

Epidemie v uzavřené komunitě

Tento způsob epidemie lze výborně demonstrovat na příkladu epidemie spalniček, která proběhla v roce 1846 na Faerských ostrovech. Obrázek ilustruje izolovanou komunitu osob, z nichž většina se nikdy nedostala do kontaktu s danou infekcí a je tudíž k infekci vnímavá. Šipka na obrázku označuje osobu/osoby, které zavlekly tuto infekci na ostrov. Inkubační doba tohoto onemocnění je asi 2 dny, tudíž se infekce začala rychle šířit v naivní populaci. Za 12 týdnů infekci prodělalo téměř veškeré obyvatelstvo ostrova, což mělo za následek téměř 90% seropozitivitu. Pověšměte si, že některé případy představovaly slepý konec (dead-end), čili nepřenesly infekci na další lidi.

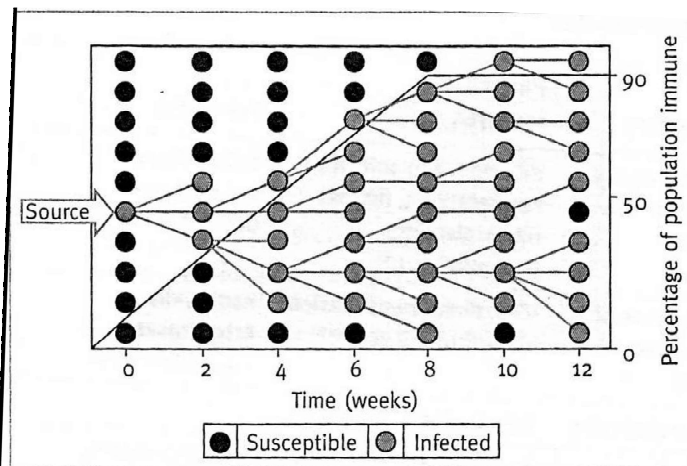


Fig. 7.4 Spread of measles in a highly susceptible population in the Faroe Islands, 1846.

Endemické infekce

Vraťme se zpátky k obrázku, jež ilustruje porovnání seropozitivity proti viru dětské obrny v různých částech světa. V Káhiře se většina dětí nakazila v době, kdy nákaza vede obvykle pouze k bezpříznakovou infekci. Zatímco v Miami zhruba jen polovina populace přišla do styku s virem před dosažením dospělosti, čili velká část populace byla vystavena viru dětské obrny až v dospělosti, tedy ve věku, kdy se infekce manifestuje jako velmi závažné onemocnění.

Nosokomiální nákazy

Nosokomiální nákazy vychází z toho paradoxu, že mnozí lidé přicházející do nemocnice za účelem svého vyléčení se tam nakazí jinou, leckdy vážnější infekcí. K takové infekci může dojít nejen následkem těsného osobního kontaktu různých pacientů, ale též přes předměty společného užívání (splachovací toalety), či lékařskými nástroji a přístroji. Složitost moderních přístrojů často znemožňuje jejich účinnou desinfekci. Kromě toho nemocniční prostředí bývá promořeno patogeny, které jsou rezistentní k antimikrobiálním lékům a desinfekčním prostředkům.

Riziko nosokomiální nákazy může být sníženo důsledným dodržováním hygienických pravidel pacienty a nemocničním personálem, úzkostlivým dodržováním čistoty ve všech nemocničních prostorách, udržování čistých klimatizačních šachet, izolací infekčních pacientů či naopak pacientů s imunodefektem, omezením doby hospitalizace na nezbytné minimum atd.

6. Rezistence organismu proti virové nákaze

V průběhu fylogenetického vývoje se u makroorganismů vytvořila soustava obranných reakcí, které umožňují eliminovat organismu cizí látky (antigeny) pronikající do jeho buněk a tkání. Mobilizace obranného systému představuje proces, v němž se společně uplatňují faktory specifické a nespecifické, buněčné i humorální. Obecně lze říci, že protivirová imunita se u živočichů v řadě aspektů liší od imunity, jež se projevuje při protozoálních, bakteriálních a houbových onemocněních. Tyto odlišnosti zapříčiňují zejména dva fakty: 1. viry jsou striktně intracelulární patogeni, 2. obranná reakce musí být aktivována proti dvěma formám existence viru v hostiteli – mimobuněčné (klidové) a intracelulární (vegetativní) formě.

Obranné mechanismy spočívají zejména v bránění reprodukce viru, nikoliv v ničení samotných virových částic. Jde zejména o potlačení raných fází reprodukčního cyklu – adsorpce a průniku viru do buňky. Blokování těchto fází se uskutečňuje především protilátkami. Jestliže již virus pronikl do buňky, lze jeho další produkci zabránit interferonem, který buňka začne produkovat. Rovněž zvýšená teplota těla vede k narušení syntézy některých komponentů nových virových částic, případně k zabránění vylučování virů z již infikované buňky.

Přirozená odolnost

Přirozená odolnost je schopnost organismu zachovat si i po virové infekci fyziologické funkce, které zabraňují vzniku příznaků nemoci. Genetické základy přirozené rezistence jsou zatím málo prozkoumány. Předpokládá se, že spočívá v buněčné rezistenci, kterou lze vysvětlit nepřítomností receptorů pro viry na povrchu buňky. Dalším možným mechanismem je neschopnost buňky uvolnit virový genom z bílkovinného obalu a umožnit tak zahájení reprodukčního cyklu.

Přirozená rezistence není neměnná, ale může být ovlivněna řadou faktorů, mezi které patří věk, hormonální hladina, výživový stav, stres a trauma a další faktory nespecifické rezistence zahrnující reaktivní, bariérové a exkretční mechanismy.

Stáří organismu ovlivňuje nejen jeho vnímavost k virové infekci, ale i celkový průběh a klinické projevy onemocnění. Všeobecně platí, že mladý organismus je podstatně vnímavější k virové infekci, avšak některé infekce u dospělých či starých jedinců probíhají ve výrazně těžších formách.

Co se hormonálních faktorů týče, je známo, že kortizon a kortikosteroidy podstatně zvyšují vnímavost na virovou infekci. Zvýšená hladina kortizonu má za následek snížení zánětlivé reakce, což se projeví snížením kapilární a venózní dilatace. Tím se omezí nebo i zastaví vazba protilátek na antigen a tvorba membránového komplexu. Mimoto se do značné míry omezuje průnik leukocytů do místa virové infekce a nedochází tak k vytvoření granulační tkáně.

Stres a trauma se projevují oslabením imunitních reakcí a snížením tvorby interferonu. Zároveň podporují rozmnožování virů a zvyšují vnímavost organismu k virové nákaze.

Reaktivní (nespecifické) mechanismy se uplatňují zejména v raných fázích infekce, kdy ještě nejsou přítomny specifické protilátky. Řadíme mezi ně: celkový adaptační syndrom (obecná reakce na jakékoliv podráždění), místní adaptační syndrom (v místě množení viru se objevuje C-reaktivní protein, alfa-globuliny, hexozamin aj.), horečka (omezuje replikaci virů), bariérové

mechanismy (tvořené neporušenými povrchovými strukturami některých tkání a orgánů a představujících mechanickou překážku), fagocytóza a interferony.

Interferon

Interferony představují důležitý obranný mechanismus organismu proti virové nákaze. První interferon byl izolován v roce 1957 Isaacem a Liedenmannem jako protein z buněk chorionlantoidní blány kuřecího zárodku infikovaného chřipkovým virem. Tato bílkovina byla produkována buňkami infikovanými virem a sloužila k ochraně zdravých buněk proti infekci stejnými nebo příbuznými viry.

Lidské interferony klasifikujeme do třech skupin: alfa, beta a gama.

Interferony alfa a beta nejsou produkovány konstitutivně ve významném množství, ale jejich tvorba je indukována virem. Interferon (IFN) gama je atypický tím, že je produkován pouze lymfocyty a je možno tudíž na něj pohlížet jako na lymfokin.

Interferony neinaktivují přímo virové částice ani jejich nukleové kyseliny, nýbrž zasahují až v určitých etapách reprodukce viru v buňce. Přítomnost interferonů nepůsobí na adsorpci ani na průnik viru do buňky. Nejdříve se IFN váže na specifický receptor, který je společný IFN alfa a beta, ale jiný pro gama. Navázáním IFN na buněčný povrch je odstartována celá řada biochemických reakcí. V jejich průběhu je indukována exprese nejméně 3 enzymů: (2'-5' oligoadenylátsyntetáza, ribonukleáza L a 73K proteáza. Aktivovaná 2-5 oligoadenylát syntetáza katalyzuje syntézu neobvyklého oligonukleotidu z ATP. Oligonukleotid pak aktivuje endoribonukleázu čili RNázu L, která působí destruktivně na mRNA, což vede k inhibici syntézy virových bílkovin u buněk infikovaných virem. Po aktivaci 73K proteinkinázy dvouřetězcovou RNA dochází rovněž k inhibici syntézy bílkovin, avšak odlišnou cestou.

Tvorba IFN není závislá na virulenci virů. Produkci je možno zaznamenat i v přítomnosti inaktivovaných virových částic. Je možné tedy předpokládat pouze nepřímou závislost mezi schopností viru indukovat syntézu IFN a jeho virulencí. Působení IFN na imunitní systém je rozmanité a někdy zřejmě protichůdné.

Interferon je považován za univerzální prostředek protivirové obrany makroorganismu se širokým spektrem účinnosti, nabízí se proto možnost jeho terapeutického využití. Léčba virových onemocnění člověka aplikací exogenního interferonu má určitá omezení. Mezi nejdůležitější patří zjištění, že účinný je pouze IFN připravený na buněčných kulturách lidského původu. Jako efektivní k přípravě lidského interferonu se ukazuje použití leukocytů. Takto připravený preparát je prakticky bez vedlejších účinků a člověk jej velmi dobře snáší.

Specifická protivirová rezistence (imunita)

Jestliže se virus dostane do organismu, působí jako antigen a vyvolává imunitní odpověď organismu. Tato odpověď může být buď protilátková (humorální) nebo buněčná. Protilátková imunita je spojena s tvorbou protilátek za účasti B-lymfocytů, kdežto buněčná je podmíněná produkcí T-lymfocytů.

Protilátková humorální aktivita

Specifické protilátky produkované organismem proti virům náležejí do skupiny globulárních bílkovin nazývaných imunoglobuliny. Imunoglobuliny jsou vylučovány imunokompetentními buňkami, B-lymfocyty, při těsném spolupůsobení T-lymfocytů a makrofágů. Tvorba

Blymfocytů probíhá u savců v kostní dřeni. B-lymfocyty nesou na svém povrchu receptory imunoglobulinové povahy, tak i receptory pro komplexy antigen-protilátka. Význam imunoglobulinových receptorů spočívá v tom, že jsou schopny rozpoznávat příslušné antigeny. Z velkého počtu B-lymfocytů produkuje pouze část protilátky proti antigenu jednoho určitého druhu. Tyto buňky pak přesně rozpoznají příslušný antigen, pokud se znovu dostane do organismu a na jeho přítomnost odpoví zvýšenou tvorbou protilátek. Takové buňky označujeme jako paměťové.

Imunoglobuliny u člověka rozlišujeme do pěti tříd: IgA, IgD, IgE, IgG a IgM. IgG představují hlavní protilátky séra. Jsou také jediné, které mají schopnost prostupovat placentou a zabezpečovat tak novorozenci protilátkovou ochranu během prvních měsíců života. IgA jsou hlavními imunoglobuliny mateřského mléka a také sekretu dýchacího a trávicího traktu.

IgM se tvoří jako první protilátky po styku organismu s antigenem. Jsou syntetizovány podobně jako IgG plasmatickými buňkami sleziny a lymfatických uzlin. Jejich poločas v organismu je ale v porovnání s IgG krátký.

Další detaily naleznete ve výukovém textu ke kurzu Imunologie.

Buněčná imunita

Buněčná imunita souvisí s produkcí buněk, které se vytvářejí v kostní dřeni a jejich další vývoj je uskutečňován v thymu (brzlíku). Lymfocyty produkované v tomto místě se nazývají T-lymfocyty. Biologická funkce T-lymfocytů může být buď aktivní nebo pomocná. Tlymfocyty rozpoznávají nosnou část antigenové molekuly. Na podnět antigenu se začnou rychle rozmnožovat a zachytí jeho převážnou část. S vneseným antigenem se potom střetnou B-lymfocyty, u nichž antigen stimuluje procesy dělení a diferenciaci na lymfoblasty a především na plasmatické buňky. Tyto mají schopnost vytvářet a vylučovat do prostředí protilátky, jimiž je antigen neutralizován.

Buněčná imunita má význam především u těch virových nákaz, kdy se virové antigeny získávají v průběhu rozmnožování viru z buněčných membrán, tedy u obalených virů. Detaily ve specializované přednášce z Imunologie.

7. Chemoterapie virových infekcí

Pro selektivní antivirotikum (= virostatikum) je nezbytné, aby inhibovalo virovou replikaci při podání takové dávky, která není škodlivá pro hostitele. Současná schválená antivirotika jsou cílena především proti herpesvirům, retrovirům a v menší míře proti rhinovirům.

Základní mechanismy

Vzhledem k těsnému provázání virové replikace s normálním metabolismem buňky není jednoduché nalézt takové látky, které by přerušily virovou replikaci, aniž by zasáhly do buněčného metabolismu. Snahou je tedy antivirové látky cílit vůči virově specifickým procesům (např. reverzní transkripce), které v normální buňce neprobíhají, či vůči virovým enzymům strukturně a funkčně výrazně odlišným od odpovídajících enzymů buňky.

Obecně lze, jak už jsme si řekli dříve, rozdělit virový replikační cyklus do deseti kroků: 1. adsorpce, 2. penetrace, 3. rozbalení částice, 4. raná transkripce, 5. raná translace, 6. replikace virového genomu, 7. pozdní transkripce, 8. pozdní translace, 9. sestavení částice, a 10. uvolnění nových částic z buňky. Adsorpce, penetrace a rozbalení virové částice jsou typickými příklady kroků, které jsou dobrým cílem antivirotik, neboť analogy těchto procesů se u normálních buněk neodehrávají. Mezi replikační kroky, které jsou řízeny virusspecifickými enzymy, řadíme transkripci +ssRNA do DNA (katalyzovanou enzymem reverzní transkriptáza u retrovirů), replikace DNA (katalyzovaná DNA polymerázou herpesvirů), nebo proteolytické štěpení virových prekurzorových proteinů (katalyzováno proteázou viru HIV).

Schválené antivirové preparáty

Mezi antivirové látky, které byly formálně schváleny pro klinické použití, patří **amantadin**, rimantadin, **ribavirin**, idoxuridin, trifluridin, vidarabin, **acyclovir**, **ganciclovir**, **foscarnet**, **zidovudin**, didanosin, zalcitabin, stavudin, **famciklovir** a **valaciklovir**.

Žádný z momentálně dostupných antivirových preparátů nebyl vyvinut cíleně jako výsledek molekulárního designu, pouze s výjimkou současných HIV proteázových inhibitorů. Spíše se nejprve ukázalo, že daná látka má inhibiční účinek vůči danému viru, a to leckdy spíše jako výsledek náhody.

Antivirové látky lze rozdělit do dvou kategorií: 1) látky, které přímo interagují se svým cílem a 2) látky, které musí být nejdříve uvnitř buňky aktivovány například fosforylací do své aktivní formy. Látky, které nevyžadují aktivaci, jsou například amantadin, rimantadin, foscarnet a virové proteázové inhibitory. Tyto interagují přímo se svým cílem (brání virové adsorpci, penetraci, rozbalení, HIV-1 reverzní transkriptáze nebo HIV proteáze). Na druhou stranu, všechny nukleosidové analogy, které jsou aktivní jako antiherpetické látky (acyklovir, ganciclovir, penciklovir...) nebo některé anti-retrovirové látky (zidovudin a jiné dideoxynukleotidové analogy) musí být nejdříve aktivované během třech po sobě jdoucích fosforylačních kroků než mohou interagovat se svým cílovým enzymem (herpesvirovou DNA polymerázou nebo retrovirovou reverzní transkriptázou). Trifosfáty nukleosidových analogů poté kompetují s normálními substráty pro DNA polymerázu nebo reverzní transkriptázu. Mohou tedy inhibovat inkorporaci přirozených substrátů (tj. např. dTTP a dGTP) do nově vznikajícího DNA vlákna nebo jsou samy do nového vlákna začleněny. Inkorporace acykloviru,

zidovudinu a některých jiných dideoxynukleosidů do DNA vede k terminaci elongace, tudíž tyto látky slouží jako terminátory replikace/transkripce.

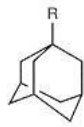
V případě, kdy je zahrnuta fosforylace, antivirová selektivita může být zesílena přítomností virem-kódovaných thymidin kináz. Virus herpes simplex a VZV takovou virově specifickou thymidin kinázu kóduje. Acyklovir je pak výborným substrátem pro fosforylaci tímto enzymem, ale slabým substrátem pro normální buněčné thymidin kinázy. Tudíž k jeho fosforylaci a následné aktivaci dochází preferenčně v infikovaných buňkách.

Problémy antivirových látek

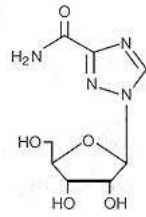
Jak již bylo uvedeno výše, použití v současné době dostupných antivirových látek je limitováno kvůli jejich toxickým vedlejším efektům. Čím je antivirovum více selektivní (a tudíž má potenciálně menší vedlejší účinky), tím je jeho použití více omezeno, například jen na konkrétní virus. Dále vzhledem k tomu, že antivirovum je cílena na některou z fází virového replikačního cyklu, nejsou schopna postihnout latentní fázi některých virových infekcí (např. herpesvirové či retrovirové).

Léčba virových infekcí by měla být započata velmi záhy, předtím, než dojde k ireverzibilnímu poškození tkáně. Takto raná terapie však nebývá vždy možná bez rychlé a včasné diagnostiky, která je pro řadu virů obtížná (například infekce respiračního traktu).

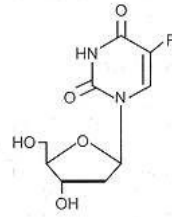
Velkým problémem je vznik rezistentních mutantů, které se často objevují velmi záhy po zahájení antivirové terapie.



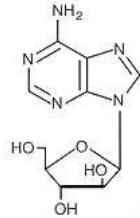
Amantadine: R = NH₂ • HCl
 Rimantadine: R = CH(NH₂) • HCl
 |
 CH₃



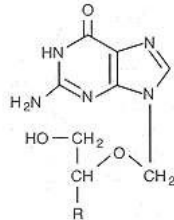
Ribavirin



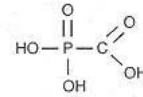
Idoxuridine: R = I
 Trifluridine: R = CF₃



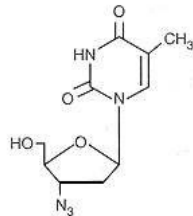
Vidarabine



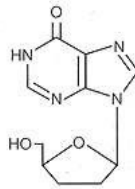
Acyclovir: R = H
 Ganciclovir: R = CH₂OH



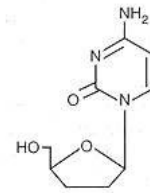
Foscarnet



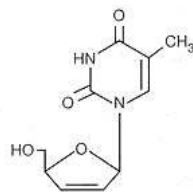
Zidovudine



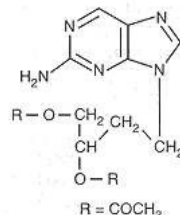
Didanosine



Zalcitabine



Stavudine



Famciclovir



Valaciclovir

TABLE 52-1 Treatment, Dosage, and Indications for Use of Antiviral Drugs

Drug	Dosage Examples (From Literature)	Indication
Anti-myxovirus drugs		
Amantadine	200 mg/d, PO	Influenza A
Rimantadine	200 mg/d, PO	Influenza A
Ribavirin	20 mg/ml, aerosol (3-6 days), topical	RSV infection in infants
Anti-herpesvirus drugs		
Idoxuridine	0.1% eyedrops, topical	Herpetic keratitis
Trifluridine	1% eyedrops, topical	Herpetic keratitis
Vidarabine	3% eye ointment, topical	Herpetic keratitis
	15 mg/kg/d (10 days), IV	Herpetic encephalitis
	15 mg/kg/d (10 days), IV	Neonatal herpes
	10 mg/kg/d (7 days), IV	VZV infection in immunocompromised patients
Acyclovir	3% eye ointment, topical	Herpetic keratitis
	5% cream (ointment), topical	Primary genital herpes
	5 x 200 mg/d (5-10 days), PO	Primary and episodic genital herpes
	15 mg/kg/d (7 days), IV	HSV infection in immunocompromised patients
	30 mg/kg/d (10 days), IV	Herpetic encephalitis
	15-30 mg/kg/d (10 days), IV	Neonatal herpes
	4 x 200 mg/d, PO	Prophylaxis (recurring HSV infection in immunocompromised patients)
	30 mg/kg/d (7 days), IV	VZV infection in immunocompromised patients
Ganciclovir	5 x 800 mg/d (7 days), PO	Herpes zoster
	2 x 5 mg/kg/d (14-21 days), IV (induction)	CMV infection in immunocompromised patients
Foscarnet	3 x 60 mg/kg/d (14-21 days), IV (induction)	CMV infection in immunocompromised patients
Famciclovir	3 x 250, 500 or 750 mg/d (7 days), PO	Herpes zoster
Valaciclovir	3 x 1000 mg/d (7 days), PO	Herpes zoster
Anti-retrovirus drugs		
Zidovudine	3 x 200 mg/d, PO	AIDS and AIDS-related complex
Didanosine	2 x 125, 200 or 300 mg/d, PO	AIDS and AIDS-related complex
Zalcitabine	3 x 0.375 or 0.75 mg/d, PO	AIDS and AIDS-related complex
Stavudine	2 x 30 or 40 mg/d, PO	AIDS and AIDS-related complex
Interferon α	1 x 10 ⁶ units intralesionally 3x/w x 3w	Condyloma acuminatum
	5x10 ⁶ units S.C./I.M. 3x/w x 4m	Hepatitis B
	3x10 ⁶ units S.C./I.M. 3x/w x 6m	Hepatitis C

TABLE 52-2 Activity Spectrum of Major Antiviral Compounds

Compound	Virus family	Viruses ^a
Viral penetration inhibitors Amantadine, ^b Rimantadine ^b	Orthomyxoviridae	Influenza A virus
Viral nucleic acid synthesis inhibitors Ribavirin ^b	Orthomyxoviridae Paramyxoviridae	Influenza A, B, and C viruses RSV, measles virus
Idoxuridine ^b , Trifluridine ^b	Arenaviridae	Lassa virus, Junin virus
Vidarabine ^b	Herpesviridae	HSV, VZV
Acyclovir ^b , Valaciclovir ^b , Famciclovir ^b	Herpesviridae	HSV, VZV
Ganciclovir ^b	Herpesviridae	HSV, VZV, CMV, EBV, HHV-6
Zidovudine ^b , Didanosine ^b , Zalcitabine ^b , Stavudine ^b	Retroviridae	HIV
Lamivudine (3'-thiacytidine, 3TC) ^b	Retroviridae	HIV
Foscarnet ^b	Hepadnaviridae Herpesviridae Hepadnaviridae Retroviridae	HBV HSV ^c , VZV, CMV, EBV, HHV-6 HBV HIV
Bromovinyldeoxyuridine (BVDU)	Herpesviridae	HSV-1, VZV, EBV
Acyclic nucleoside phosphonates HPMPC ^d	Adenoviridae Herpesviridae Poxviridae	Adenovirus HSV ^c , VZV, CMV, EBV, HHV-6 Vaccinia virus
PMEA ^e	Papovaviridae Herpesviridae Hepadnaviridae Retroviridae	HPV HSV ^c , VZV, CMV, EBV, HHV-6 HBV HIV
Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs)	Retroviridae	HIV
Viral adsorption inhibitors Polyanions (Polysulfates-, sulfonates-, carboxylates, -oxometalates, etc.)	Herpesviridae Retroviridae Other enveloped viruses	HSV ^c , CMV HIV
Viral protease inhibitors Saquinavir, Ritonavir, Indinavir	Retroviridae	HIV
Virus uncoating inhibitors Oxazoliny isoxazole and piperaziny pyridazine derivatives	Picornaviridae	Rhinovirus

^aEBV, Epstein-Barr virus; HHV-6, human herpes virus type 6; HPV, human papilloma virus; for other viruses, see text.

^bFormally approved for human use. (3TC for treatment of HIV infection)

^cIncluding TK⁻ (thymidine kinase-deficient) mutants that have become resistant to acyclovir.

^dHPMPC, Hydroxyphosphonylmethoxypropylcytosine (Cidofovir, Vistide).

^ePMEA, Phosphonylmethoxyethyladenine (Adefovir).

TABLE 52-3 Mechanism of Action of and Main Targets for Major Antiviral Compounds

Compound	Intracellular Activation Steps	Main Target for Antiviral Action
Amantadine, rimantadine	None	Penetration, uncoating and assembly
Ribavirin	Phosphorylation to 5'-mono and tri-phosphate by cellular enzymes	Inhibition of 5'-capping of viral mRNA; inhibition of IMP dehydrogenase
Idoxuridine	Phosphorylation to 5'-triphosphate by cellular enzymes	Incorporation into DNA
Trifluridine	Phosphorylation to 5'-monophosphate by cellular thymidine kinase	Inhibition of thymidylate synthase
Vidarabine	Phosphorylation to 5'-triphosphate by cellular enzymes	Incorporation into DNA and inhibition of HSV DNA polymerase
Acyclovir ^a , Penciclovir ^b	Phosphorylation to monophosphate by HSV-specified thymidine kinase, and then to di- and triphosphate by cellular enzymes	DNA chain termination
Ganciclovir	Phosphorylation to monophosphate by CMV-specified protein kinase and to triphosphate by cellular enzymes	Inhibition of viral DNA polymerase
Zidovudine, Didanosine, Zalcitabine, Stavudine, Lamivudine and other dideoxy-nucleosides	Phosphorylation to 5'-triphosphate by cellular enzymes	Inhibition of reverse transcriptase; DNA chain termination
Foscarnet	None	Inhibition of viral DNA polymerase and of reverse transcriptase
Bromovinyldeoxyuridine	Phosphorylation to 5'-diphosphate by HSV-1-specified thymidine kinase and then to 5'-triphosphate by cellular enzyme(s)	Inhibition of viral DNA polymerase and incorporation into viral DNA
Acyclic nucleoside phosphonates (HPMPC, PMEA)	Phosphorylation to diphosphoryl derivatives by cellular enzymes	Inhibition of viral DNA polymerase; DNA chain termination
NNRTIs	None	HIV-1 reverse transcriptase
Polyanions	None	Viral adsorption
Viral protease inhibitors	None	HIV protease
Oxazoliny isoxazole and piperaziny pyridazine derivatives	None	Viral uncoating

^aValaciclovir acts as prodrug of acyclovir.

^bFamciclovir acts as prodrug of penciclovir.

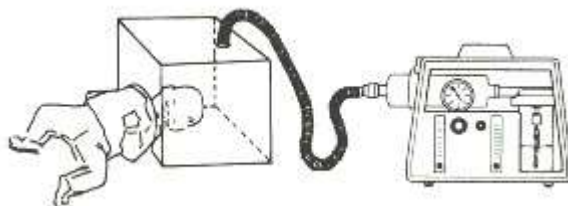
Amantadin a rimantadin

Klinické použití amantadinu a rimantadinu je omezené pro profylaxi a ranou terapii infekce virem chřipky A. Protichřipková profylaxe je indikována u imunodeficitních pacientů, osob alergických na komponenty chřipkové vakcíny, nevakcinované členy domácnosti, kteří jsou v kontaktu s vysoce rizikovými pacienty, a dlouhodobě nemocné pacienty v zařízeních, kde propukly epidemie chřipky A. Amantadin je znám pro své vedlejší účinky postihující centrální nervovou soustavu, jako jsou halucinace a desorientace, které vedou například ke zvýšenému riziku nebezpečných pádů. Rimantadin způsobuje méně vedlejších účinků než amantadin, je-li podán ve stejné dávce (200 mg/den, perorálně). V populaci viru chřipky A byly zjištěny kmeny rezistentní jak k amantadinu, tak rimantadinu.

Ribavirin

Ačkoliv je ribavirin účinný proti orto- i paramyxovirům, je ve formě preparátu Virazole schválen pouze pro léčbu infekcí kojenců způsobených respiratorním syncytiálním virem

(RSV). Lék se podává ve formě aerosolu (průměr kapének 1-3 μm); je tedy aplikován s cílem zasáhnout dolní respirační trakt. Aerosolové podání vede k rychlému zastavení šíření viru a odeznění symptomů bez známek toxicity.



Acyklovir, valaciclovir a famciklovir

Acyklovir (Zovirax) představuje hlavní průlom v léčbě herpetických infekcí. Hlavní indikace pro jeho užití jsou primární genitální herpes, herpetická encefalitida a HSV a VZV infekce u imunoruprimovaných pacientů. Může být užit topicky, intravenózně nebo perorálně (po orálním užití je však jen 20% absorbováno). Místně může pomoci i při léčbě labiálního herpesu. HSV a VZV může proti acykloviru vyvinout rezistenci, zejména u imunokompromitovaných pacientů. Valaciclovir (Valtrex) a famciklovir (Famvir) představují dva další preparáty pro perorální léčbu HSV VZV infekcí. Hlavní indikace v tomto případě je herpes zoster.

Ganciklovir, foscarnet

Ganciklovir (Cytovene) je lékem pro cytomegalovirové (CMV) infekce u pacientů s AIDS nebo jinými imunodefekty. Vykazuje velmi slabou biodostupnost po orálním podání (jen 3%) a je tudíž většinou podáván intravenózně. Ze všech různých klinických manifestací cytomegalovirové infekce u imunosuprimovaných nejlépe na terapii reaguje cytomegalovirová retinitida. Mezi nejčastější vedlejší komplikace patří granulocytopenie (neutropenie) a trombocytopenie. Foscarnet (Foscaviru) je dalším lékem užívaným pro léčbu CMV infekcí, zejména CMV retinitidy, u imunokompromitovaných pacientů. Podává se intravenózně.

Zidovudin

Zidovudin (Retrovir, AZT) je licencován pro pacienty s HIV 1 a 2. Brání další progresi onemocnění, snižuje mortalitu a snižuje frekvenci oportunistických infekcí. Nicméně, při dlouhodobější léčbě se objevují rezistentní HIV mutanty. AZT je dobře absorbováno po orálním podání (60%). Mezi těžké vedlejší efekty patří megaloblastická anémie a leukopénie; v takových případech je nutno terapii AZT zastavit.

Truvada, lék, který se v současné době používá k terapii AIDS a vyvinutý Prof. Erikem De Clercqem, je kombinací dvou antiretrovirových chemoterapeutik: 300 mg tenofoviru a 200 mg emtricitabinu. Tenofovir i emtricitabin je nukleosidové analogy inhibující činnost reverzní transkriptázy viru HIV. Mezi vedlejší efekty patří bolesti hlavy, zvýšení krevního tlaku, nevolnost, zvracení, vyrážka, ztráta apetitu, zvýšená hladina jaterních enzymů. Tento lék také může způsobit laktázovou acidózu, která se může projevit bolestmi ve svalech a slabostí.

8. Vakcinace proti virovým nákazám

První vakcíny, které byly proti virovým nákazám vytvořeny, byly vakcínami proti pravým neštovicím a vzteklině. Mezi další milníky v historii antivirových vakcín řadíme vyvinutí živé

atenuované vakcíny proti žluté zimnici produkované na infikovaných kuřecích embryích, proti dětské obrně a dalším virovým nemocem, které byly produkovány na buněčných kulturách, a v poslední době vakcíny proti řadě dalších infekcí, které sestávají z virových proteinů, ať už purifikovaných nebo vytvořeny rekombinantní technologií, nebo založené čistě na inokulaci DNA plasmidů.

Vakcína	Zdroj viru	Forma	Podání	Poznámky
Vakcínie	Lymfa ze skarifikované zvířecí kůže	Atenuovaná	Skarifikací	Dnes již jen ve zvláštních ř p ípadech Imunizováni příslušníci armády
Žlutá zimnice	Kuřecí embrya	Atenuovaná	i.m.	Dlouhodobá imunita
Chřipka	Kuřecí embrya	Inaktivovaná, podjednotková	i.m.	Vzhledem k antigenní variabilitě každoročně nové typy; 70% ochrana
Polio	Buňky opičí ledviny nebo lidské diploidní buňky	Inaktivovaná	i.m.	
Spalničky	Buňky kuřecího embrya	Atenuovaná	p.o.	Vysoce účinná
Zarděnky	Lidské diploidní buňky	Atenuovaná	i.m.	Trojvakcína
Příušnice	Buňky kuřecího embrya	Atenuovaná		
Vzteklina	Zvířecí mozek	Inaktivovaná	i.m.	Postexpoziční profylaxe
	Lidské diploidní buňky	Inaktivovaná	i.m.	Pre- a postexpoziční profylaxe
Hepatitida A	Lidské diploidní buňky	Inaktivovaná	i.m.	
Hepatitida B	Lidské sérum	Inaktivovaná, podjednotková	i.m.	
	Kvasinky, rekombinant	Podjednotková	i.m.	Rekombinantní vakcína

Produkce protivirových vakcín

Většina vakcín byla odvozena od živých virů, které byly atenuovány (oslabeny) nejrůznějšími způsoby. Tyto vakcinační kmeny jsou vybírány na základě nutnosti dobré imunogenity, ale ztráty patogenity. Takové vakcinační kmeny musí být také geneticky stabilní, čili riziko reverze na virulentní fenotyp musí být minimální.

Navzdory recentnímu pokroku metod molekulární biologie a genetického inženýrství je dosud většina vakcín produkována tradičním způsobem, tj. na buněčných kulturách, čili technologií, která byla vyvinuta před více než půlstoletím. Ve 40. letech minulého století John Enders se spolupracovníky poprvé pozoroval, že virus dětské obrny je možno kultivovat v podmínkách in vitro v kultuře buněk opičích ledvin, které se snadno pěstují v laboratorních podmínkách. Toto zjištění bylo odměněno Nobelovou cenou. Jejich objev, společně s objevem antibiotik inhibujících růst kontaminujících bakterií v buněčných kulturách, dal zelenou vývoji efektivních antivirových vakcín.

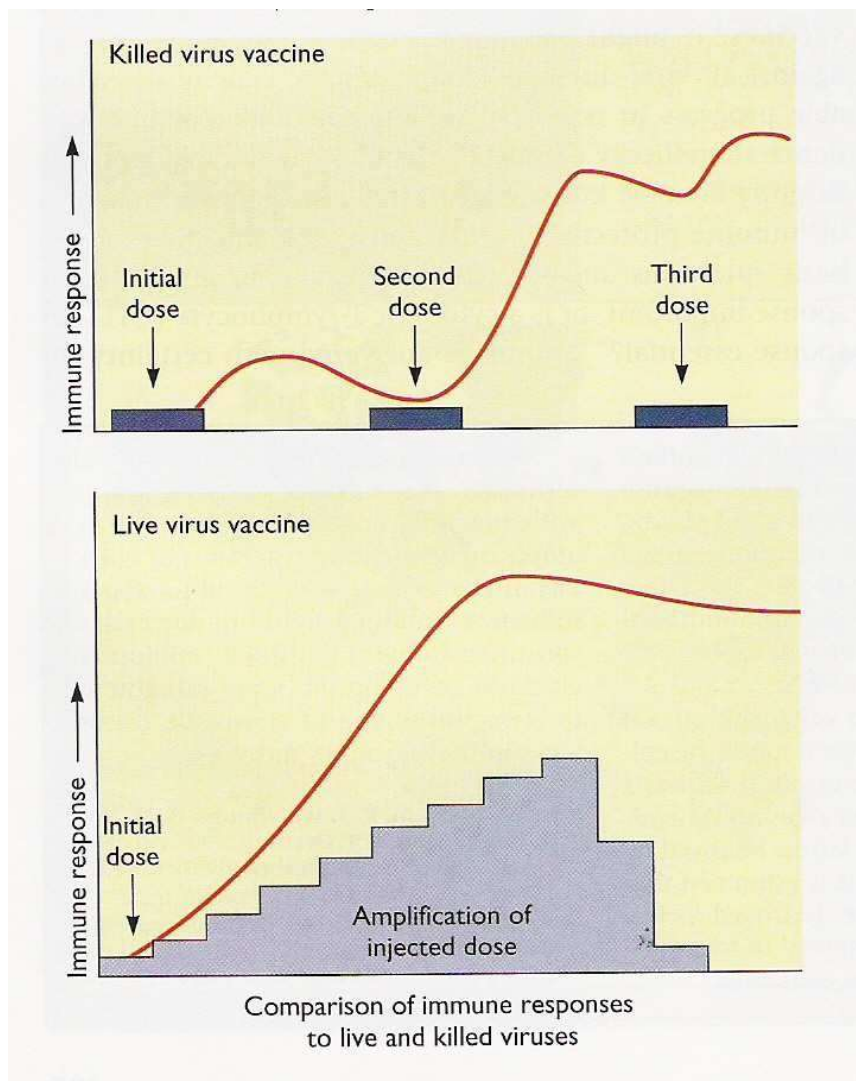
Základní požadavky pro vhodnou buněčnou linii pro množení vakcinačního kmene jsou mj. dobrá dostupnost a snadná kultivovatelnost, minimální riziko potenciální onkogenicity, genetická stabilita a nepřítomnost dalších skrytých virových infekcí. Zprvu se používaly zejména buněčné linie různých savců, ale posléze vzhledem k identifikaci velkého množství endogenních retrovirů případně dalších virů, které by mohly být potenciálně nebezpečné, se začaly používat spíše buňky přímo lidské. Tyto lidské buňky jsou obvykle diploidní s omezeným počtem buněčných dělení, tak, jak je to přirozené. Nejčastěji užívané linie WI-38 a MRC-5 jsou odvozeny z abortovaných lidských plodů, což se ovšem naráží na etickými principy.

Většina atenuovaných vakcín byla vytvořena pro RNA-viry (virus dětské obrny, spalničky, příušnice, zarděnky). To není náhodné, protože RNA-viry zkrátka postrádají editační mechanismus při transkripci. To znamená, že během každého cyklu replice, trvajících řekněme 8 hodin, takový RNA-virus může vyprodukovat až 500 různých mutantů na 10.000 kopií parentálního kmene. A jak již pozoroval Pasteur, některé z těchto mutantů mohou být méně virulentní než parentální virus. Takové oslabené mutanty mohou být následně selektované, například pasáží v buněčných kulturách nebo v laboratorních zvířatech. Jiným způsobem je pasážování viru při nižší teplotě (28-30°C), které umožní selekci termosenzitivních nebo na nižší teplotu adaptovaných mutantů, které se množí preferenčně při těchto teplotách.

Porovnáme-li atenuované mutanty s parentálním virem, většinou nacházíme jen nízký počet mutací. Například porovnáním vakcinačního kmene a parentálního viru dětské obrny typu 1 bylo nalezeno jen 55 substitucí z celkového počtu 7441 bází; pouze 21 substitucí vedlo ke změně v aminokyselinové sekvenci. V případě viru dětské obrny typu 3, pouze 10 nukleotidů bylo změněno a pouze ve třech případech došlo ke změně aminokyseliny. Atenuovaný poliovirus typu 3 může tedy snadněji revertovat na původní virulentní virus. Moderní atenuované vakcíny proti chřipce mají obvykle minimálně deset mutací, z nichž se vždy alespoň jedna nachází v každém z osmi virových genů. Díky pokroku na poli molekulární biologie a genového inženýrství je možno dnes vytvářet definované atenuované vakcíny. RNA genom viru může být reverzně transkribován na DNA, ta mutována a vpravena do buňky, kde dojde k transkripci virové mutantované RNA.

Mrtvé vakcíny

Chemická agens jako formalin nebo beta-propiolaktón jsou užívány k inaktivaci virů díky jejich schopnosti chemicky kroslinkovat páry bází v RNA nebo DNA viru. Mezi klasické mrtvé vakcíny patří Salkova vakcína proti viru dětské obrny, vakcína proti vzteklině či chřipce.



Problémy virových vakcín

Ačkoliv je vývoj efektivních protivirových vakcín jedním z největších úspěchů biomedicínsko výzkumu, přesto se vynořily na světlo světa některé velmi vážné, ale naštěstí vzácné problémy. Příkladem takového neočekávaného problému může být vakcína proti RSV, kdy některé z imunizovaných dětí následně onemocněly dokonce vážnější formou nemoci, než tomu bylo u jejich nevakinovaných spolužáků, kteří se evidentně nakazili stejným virem vyskytujícím se v daném kolektivu. V tomto případě zřejmě vakcína iniciovala nadměrnou produkci IgE proti jedné z virových peplomer.

Jiným problémem atenuovaných vakcín je riziko zpětné reverze mutanty na původní virulentní virus, jako je tomu pozorováno v případě vakcín proti chřipce a dětské obrně. Incidence postvakcinační obrny je asi 1 případ na 300.000 dávek.

Někdy je určitým problémem i způsob podání a načasování vakcíny, jako je tomu u atenuované trivakcíny MMR (spalničky, příušnice, zarděnky). Ačkoliv i jedna dávka vakcíny vytváří imunitu v 90% případech, bylo doporučeno podávat dávky dvě dětem ve věku 12-15 měsíců, či kdykoliv později. MMR vakcína dramaticky snížila incidenci těchto třech onemocnění, nicméně bylo zaznamenáno, že tato vakcína způsobuje také různé komplikace, od horečnaté reakce po podání, až po závažná onemocnění (autismus, Crohnova choroba), což vedlo k zahájení hlasité anti-MMR kampaně. Komplikace pravděpodobně vznikají díky „zahlcení“

imunitního systému u malých dětí. Řešením by mohla být vakcinace ve třech oddělených dávkách (každý virus zvlášť), což ale naráží na další problém – mezi podáním dávek by musel být určitý časový odstup, který by ale vystavoval děti nechráněné proti těm zbývajícím virům po příliš dlouhou dobu (což se dokonce už v některých případech stalo, kdy byla zaznamenána zvýšená incidence infekcí zbývajících viry v průběhu vakcinace. Tento způsob vakcinace ale není povolen, byť se někdy provádí). Je nutno zdůraznit, že kolem této problematiky se často objevují velmi zkreslené a dokonce přímo lživé rádobý odborné informace, zejména na internetu.

Vakcíny by měly být skladovány při 4°C a neměly by být nikdy mraženy. Zejména živé vakcíny jsou náchylné k teplotní inaktivaci. Některé jsou distribuovány ve formě lyofilizovaného prášku, který je před aplikací rozpuštěn ve sterilní vodě. Vakcíny, které nemohou být lyofilizovány (jako třeba orální poliovakcína) musí být transportovány ve speciálních chladících boxech, které obsahují teplotní senzory, indikující výchylku teploty oproti doporučeným teplotám. Orální poliovakcína je aplikována v podobě kapek, většinou na kostce cukru. Všechny ostatní současně užívané vakcíny, ať už živé nebo inaktivované, se podávají injekčně intramuskulárně.

Nové přístupy ve vývoji antivirových vakcín Geneticky konstruované vakcíny

Virové geny kódující imunogenní proteiny nebo jejich části mohou být klonovány do plasmidů a ty přeneseny např. do buněk kvasinek nebo bakterií a v tomto arteficiálním prostředí produkovány ve velkém množství. Tímto způsobem je například produkována vakcína proti hepatitidě B. Virové geny je možno také klonovat do jiných systémů, včetně hmyzích nebo rostlinných.

Velmi slibný způsob je klonování virového genu do genomu jiného velkého DNA-viru (virus vakcínie, adenovirus), který je označován jako způsob „Trojského koně“. Tímto způsobem byly klonovány geny kódující imunogenní proteiny např. viru vztekliny, chřipky, HIV nebo hepatitidy do TK lokusu genomu viru vakcínie. Inerce nové genetické informace navíc většinou atenuuje původní virus. Po inokulaci do kůže se virus vakcínie množí a současně produkuje proteiny kódované zaklonovaným genem.

Krátké peptidy

Některé virové epitopy sestávají prakticky jen z několika aminokyselin, tudíž je možno úspěšně užít jen tyto krátké úseky k vakcinaci. Takového krátkého peptidu se využívá například u vakcinace dobytka proti viru slintavky a kulhavky. Teoreticky by bylo možno vytvořit konstrukt, kde by byly pospojovány epitopy různých virů v jeden imunogenní protein, který by indukoval imunitní odpověď proti několika virům současně.

DNA vakcíny

Virová DNA, pokud je injikována do organismu, penetruje do epiteliálních buněk a je transkribována a translatována s využitím buněčných mechanismů. Tyto nově syntetizované virové proteiny jsou následně vystavovány na povrchu buňky pomocí MHC-1 molekul stejně, jako se tomu děje u buněk virem normálně infikovaných. Taková virová DNA tedy může sloužit jako atenuovaná vakcína. Virová RNA může být transkribována na DNA pomocí enzymu

reverzní transkriptáza a taková DNA injikována do kůže. DNA vakcíny jsou v současnosti předmětem intenzivního výzkumu, zejména v případě HIV.

Adjuvans

Adjuvans mohou prolongovat a zesílit imunitní odezvu organismu vůči inaktivovaným nebo podjednotkovým vakcínám. Pro použití v humánní medicíně je v současné době povolen coby adjuvans pouze hydroxid hlinitý. Předmětem výzkumu jsou potenciální adjuvans, která by stimulovala imunitní systém přes Toll-like receptory, které jsou přítomné na povrchu makrofágů a dendritických buněk.

Podobně agregace virových proteinů pomocí molekul saponinů nebo začlenění virových proteinů do lipozómů spolu s peptidy kyseliny muramové (součást bakteriální stěny) může stimulovat imunitní odpověď.

Vakcíny a veřejné zdraví

Výsledkem masivních očkovacích kampaní během posledních dvou desetiletí se incidence zejména dětských nemocí dramaticky snížila. Nemoci jako dětská obrna, spalničky a zarděnky jsou dnes již téměř neznámé v rozvinutých zemích. Někteří neuvážliví rodiče proto své děti odmítají dávat očkovat (u nás naštěstí je stále povinnost základního očkování dána zákonem; pokud někdo očkování odmítne, pediatr je povinen tento případ hlásit spádové hygienické stanici, která může daného rodiče pokutovat; neočkované dítě například nemůže nastoupit do školky), protože se domnívají, že je velmi malé riziko, že by jejich dítě přišlo do kontaktu s patogenem a snaží se tím tak snížit riziko nežádoucích reakcí na vakcínu. Nicméně je třeba mít na paměti, že žijeme v globálním světě, kde patogeni cestují společně s lidmi a mohou být snadno kamkoli zavlčeny a tam nadělat u nevakcinovaných jedinců velké problémy. Paralytická dětská obrna či spalničky se stále vyskytují například v Jižní Americe, Asii a Africe. Tyto viry mohou a jsou importovány do dalších zemí včetně těch evropských a severoamerických. Dokud existují rezervoáry infekce kdekoliv na světě, jejich import do „virus-free“ zemí zůstává konstantním problémem.

Povinná očkování v ČR

Věk	Nemoc
4. den až 6. týden	Tuberkulóza Záškrt, tetanus, dávivý kašel a invazivní onemocnění vyvolané Haemophilem influenzae typu B (1. dávka) a virová hepatitida typu B (1.
9. až 12. týden týden až 18	dávka) 10.
měsíc	Dětská přenosná obrna (2x po 8 týdnech v březnu a květnu) Záškrt, tetanus, dávivý kašel a invazivní onemocnění vyvolané Haemophilem influenzae typu B (2. dávka) a virová hepatitida typu B (2. 13. až 16. týden dávka)
17. až 20. týden	Záškrt, tetanus, dávivý kašel a invazivní onemocnění vyvolané Haemophilem influenzae typu B (3. dávka)
33. až 36. týden	Virová hepatitida typu B (3. dávka)

14,5. měsíc až	
30. měsíc	Dětská přenosná obrna (2x po 8 týdnech v březnu a květnu)
15. měsíc	Spalničky, příušnice, zarděnky (1. očkování)
18. až 20. měsíc	Záškrt, tetanus, dávivý kašel (4. dávka)
21. až 25. měsíc	Spalničky, příušnice, zarděnky (2. očkování po 6 – 10 měsících)
5. rok	Záškrt, tetanus, dávivý kašel (přeočkování)
12. rok	Virová hepatitida typu B (u dětí, které nebyly očkovány v prvních měsících života)
13. rok	Dětská přenosná obrna (přeočkování)
14. rok	Tetanus (přeočkování, další vždy po 10 – 15 letech)

Očkování a cestování

Před cestou do zahraničí, zejména do rozvojových zemí světa, dotyčný by měl podstoupit preventivní očkování. Volba konkrétních vakcín by měla být konzultována s očkovacím centrem nebo klinikou cestovní medicíny. Očkování proti žluté zimnici je vhodné při cestování do endemických zemí, někdy je dokonce povinné. Profylaktické očkování proti vzteklině nebývá doporučováno, výjimku tvoří pouze případ, kdy člověk cestuje do endemické oblasti, kde se bude vyskytovat po delší dobu. Cestující do zemí třetího světa by měli být očkováni proti hepatitidě A, případně kombinovanou vakcínou proti hepatitidě A a B.

Pasivní imunizace

Injekce lidských imunoglobulinových preparátů obsahujících specifické protilátky poskytuje střední nebo i kompletní ochranu proti infekci některými viry. Ochrana nastává ihned po injekci, ale netrvá déle než 4 měsíce, protože ony protilátky jsou v těle degradovány a jedinec si začne vytvářet protilátky vlastní proti samotnému preparátu. Pasivní imunizace je indikována postexpozičně v případě některých infekcí nebo profylakticky například u pacientů s imunodefektem, kteří jsou vystaveni vysokému riziku infekce daným virem. Není ale univerzálním způsobem ochrany, neboť v některých případech mohou protilátky dokonce zhoršit průběh samotné infekce (např. v případě infekce viry dengue začnou protilátky vytvářet komplexy, což vede k závažné reakci).

Příklady lidských imunoglobulinů používaných pro pasivní profylaxi.

Preparát	Poznámky
Normální lidský imunoglobulin	Pro prevenci spalnicek u osob se zvláštním rizikem jako jsou imunokompromitované děti a dospělí
Hepatitis B imunoglobulin	Podán současně s vakcínou v případě nutnosti rychlé protekce. Podán např. po poranění jehlou ve zdravotnictví.
Vzteklina - imunoglobulin	Poskytuje rychlou ochranu po expozici dokud se nevytvoří vlastní protilátky vakcinací

Herpes-zoster imunoglobulin	U immunosuprimovaných osob nebo pacientů s leukémií; novorozenci nebo těhotné ženy po kontaktu s patogenem
Lassa - antisérum	Používáno terapeuticky
SARS - antisérum	Použito zatím jen u několika pacientů
Klíšťová encefalitida - antisérum	Používáno jen v některých případech

9. Laboratorní diagnostika virových infekcí

Odběr vzorku

Správný odběr vzorku je naprosto zásadní pro smysluplnou laboratorní diagnostiku. Nedostane-li laboratoř kvalitní vzorky, není schopna poskytnout relevantní výsledek, ať už je pro diagnostiku použita byť i nejmodernější technologie.

Pro správnou diagnostiku je nutno, aby byl odebrán správný vzorek, ten odebrán ve správnou dobu a správným způsobem transportován do laboratoře (např. některé viry mohou být kompletně destruovány, je-li vzorek zmražen).



Příklady vzorků odebíraných pro laboratorní diagnostiku (+ vždy 5-10 ml srážlivé krve na serologické vyšetření):

Onemocnění	Odebrané vzorky
Respirační infekce	Výtěry z krku nebo nosu Postnasální výplachy
Gastrointestinální infekce	Stolice Vesikulární tekutina,
Měchýřkovitá vyrážka	výtěr z krku, stolice
Hepatitida	Sérum, stolice Mozkomíšní mok,
CNS infekce	výtěr z krku, stolice
AIDS	Nesrážlivá krev

Transport

Odebrané vzorky by měly být umístěny v plastických sáčkích a vhodně označeny. Vzorky by měly být dopraveny do laboratoře co nejdříve. Pokud je nutno vzorek uchovat přes noc, je vhodnější jej ponechat při teplotě +4°C, nežli jej mrazit, protože zmražením by se mohly viry inaktivovat (zejména ty, co mají lipidický obal). Vzorek by měla doprovázet vhodně vyplněná

žadanka. Obecně lze říci, že pro laboratoř je cennější informace o začátku onemocnění, klinických příznacích a předpokládané diagnóze, než zatřetí konkrétních požadovaných metod.

Zdravotní ústav se sídlem v Ostravě	
Odbor mikrobiologie a parazitologie Ostrava Partyzánské náměstí 7, 702 00 Ostrava, www.zuova.cz Přístupné je akreditované CIA dle normy ČSN EN ISO 15189 jako zdravotnická laborator číslo 8014	Číslo vyšetření: (nepovinné)
ŽÁDANKA O VIROLOGICKÉ VYŠETŘENÍ	
 Vyšetření provede VIROLOGICKÉ ODDĚLENÍ tel.: 596 200 111, fax: 596 118 661 IČZ: 91 866 000 	
PACIENT: Přijetí, jméno: _____ Rodné číslo: ____/____/____ Kód pojistovny: ____ Kód diagnózy: ____ Bydliště: _____ Vzorek (specifikovat): _____ Diagnóza nebo příznaky onemocnění: _____ Datum odběru, čas (hh:mm): _____ Začátek onemocnění: _____	
Přímý průkaz agens - kultivace, elektronová mikroskopie, průkaz antigenů, genomu	
Kultivace - izolační pokus: <input type="checkbox"/> Kultivační průkaz virů (vškerý materiál) na: tkáňových kulturách, k. embryu, saj. myši Elektronomikroskopický průkaz agens: <input type="checkbox"/> Negativní barvení virů (vškerý materiál) Průkaz antigenů: <input type="checkbox"/> Rotaviry (stolice) <input type="checkbox"/> Adenoviry (stolice) <input type="checkbox"/> Noroviry (stolice) <input type="checkbox"/> Astroviry (stolice) <input type="checkbox"/> Respirační viry (výtěr z nosohltanu) <input type="checkbox"/> p24 HIV-1 - antigenemie + a-HIV-1, 2 (žev - sérum) <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	Průkaz genomu: <input type="checkbox"/> <i>Chlamydia trachomatis</i> (hybridizace DNA) a <i>Neisseria gonorrhoeae</i> (hybridizace DNA) (spec. výtěr z cervixu nebo uretry, ex. spojivky) <input type="checkbox"/> Papillomaviry (HPV) (hybridizace DNA) (spec. výtěr z cervixu) <input type="checkbox"/> Cytomegalovirus (DNA-PCR) <input type="checkbox"/> Herpes simplex v. typ 1, 2 (DNA-PCR) <input type="checkbox"/> Epstein - Barrové v. (DNA-PCR) <input type="checkbox"/> Varicella - zoster v. (DNA-PCR) <input type="checkbox"/> Enteroviry (RNA-PCR) <input type="checkbox"/> <i>Mycoplasma pneumoniae</i> (DNA-PCR) <input type="checkbox"/> <i>Chlamydia pneumoniae</i> (DNA-PCR) <input type="checkbox"/> <i>Chlamydia trachomatis</i> (DNA-PCR) <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Průkaz protilátek - sérologická vyšetření (krev - sérum, likvor)	
<input type="checkbox"/> Respirační agens (Influenza v. A, B, Parainfl. vv., Adenoviry, RS-virus, <i>Mycoplasma pneumoniae</i>) <input type="checkbox"/> Herpetické viry: (CMV, EBV, VZV, VZV) <input type="checkbox"/> Cytomegalovirus (CMV) <input type="checkbox"/> Epstein - Barrové v. (EBV) <input type="checkbox"/> Herpes simplex v. (HSV) <input type="checkbox"/> Varicella - zoster v. (VZV) <input type="checkbox"/> Herpes hominis v. typ 6 (HHV-6) (6. nemoc) <input type="checkbox"/> Parvovirus B-19 (5. nemoc) <input type="checkbox"/> Morbilli v. (1. nemoc) <input type="checkbox"/> Rubella v. (3. nemoc) <input type="checkbox"/> Parotitis v. <input type="checkbox"/> Enteroviry, Coxsackie vv. B1-6 <input type="checkbox"/> Enteroviry <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Klisťová encefalitis v. (TBE) <input type="checkbox"/> Dengue v. (DEN) <input type="checkbox"/> West Nile v. (WNV) <input type="checkbox"/> Žlutá zimnice v. (YF) <input type="checkbox"/> Japonská B encefalitis v. (JBE) <input type="checkbox"/> Chikungunya v. (CHIK) <input type="checkbox"/> Lymfocytární choriomeningitis v. (LCM) <input type="checkbox"/> Hantaviry <input type="checkbox"/> HIV-1, HIV-2 (AIDS) (vyšetření i na antigen p24 HIV-1) <input type="checkbox"/> Chlamydie - rod. specif. (bez diferenciace druhů) <input type="checkbox"/> Chlamydie - druh. specif. (vs. <i>Western Blot</i>) <input type="checkbox"/> <i>Coxiella burnetii</i> (Q-horečka) <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Vyšetření požaduje: _____ IČP: _____ Odbornost: _____ Telefon: _____	Razítko s adresou a podpis lékaře: _____

Zdravotní ústav se sídlem v Ostravě				
Odbor mikrobiologie a parazitologie Ostrava, VIROLOGICKÉ ODDĚLENÍ, Partyzánské nám. č. 7, 702 00 OSTRAVA Tel.: 596 200 111, e-mail: Jiri.Januska@zuova.cz, IČZ - IČL: 91866312, http://www.zuova.cz				
Odběr a zaslání biologického materiálu				
Typ vzorku (biologický materiál)	Doporučená sterilní odběrová souprava	Teplota úschovy do transportu	Maximální doba a teplota transportu	Vyšetření
srážlivá krev na sérologické vyšetření	skleněná zkumavka nebo komerční souprava pro odběr srážlivé krve	po odběru 18 - 25°C 2 hod., pak 2 - 8°C	2 - 8°C do 2 dnů, 18 - 25°C lze až do 12 hod.	vyšetření protilátek (sérologická vyšetření)
výtěr suchým daktron. tamponem z nosu, nosohltanu, spojivky a j.	virologické odběrové/transportní médium ve zkumavce s gumovou zátkou	2 - 8°C	2 - 8°C do 24 hod.	izolační pokus, průkaz antigenů
stolice cca 1 cm ²	zkumavka nebo nádobka s těsným uzavřením	2 - 8°C	2 - 8°C do 24hod. 8 - 25°C do 12hod.	izolační pokus, průkaz antigenů
likvor	zkumavka nebo nádobka s těsným uzavřením	2 - 8°C	2 - 8°C do 24 hod.	izolační pokus, vyšetření protilátek
moč doplnit po rysku (cca 4 ml moči)	odběrové/transportní médium na moč ve zkumavce	2 - 8°C	2 - 8°C do 12 hod.	izolační pokus (na CMV)
výtěr z uretry nebo ze spojivky na chlamydie a gonokoky	souprava Gen-Probe: tamponěk pro výtěr z uretry nebo z konjunktivy a transportní médium	2 - 25°C	2 - 25°C do 7 dnů	průkaz genomu genovou sondou (specif. DNA)
výtěr z cervixu na a) chlamydie a gonokoky b) papillomaviry	souprava Digene: Cervical Sampler (pro těhotné daktronový tampon) a transportní médium	2 - 25°C	2 - 25°C do 7 dnů	průkaz genomu genovou sondou (specif. DNA)
nesrážlivá krev (pro PCR s EDTA, bez heparinu!)	komerční souprava pro odběr nesrážlivé krve (pro PCR s EDTA!)	2 - 8°C	2 - 8°C do 24 hod. 2 - 8°C do 48 hod. bez chlazení do 12 hod.	izolační pokus průkaz antigenů průkaz genomu - PCR (specif. DNA, RNA)
výtěr suchým daktron. tamponem a další jiny materiál na PCR	v prázdné zkumavce (nebo s virologickým odběrovým/transport. médiem) s gumovou zátkou	2 - 8°C	2 - 8°C do 48 hod. bez chlazení do 12 hod.	průkaz genomu - PCR (specif. DNA, RNA)
Odběrové soupravy a žadanky (kromě souprav pro odběr krve) vydá na požádání virologické oddělení zdarma				
TELEFON: 596 200 111 (ústředna Zdravotního ústavu se sídlem v Ostravě)				automatické linky:
MUDr. JIRI JANUŠKA, vedoucí virologického oddělení, vedoucí NRL ČR pro arboviry				310, 311
RNDr. IAN RASZKA, zást. ved. odd., virologická sérologie, diagnostika HIV				342, 341, 355, 349
RNDr. PETR ČERVENKA, virologická diagnostika na tkáňových kulturách				316, 341, 355
MUDr. HANA ZELENÁ, genové sondy NRL pro arboviry, elektronová mikroskopie				311, 340, 334
Mgr. MARKÉTA POMIKLOVÁ, virol. diagnostika na tkáňových kulturách, elektron. mikroskopie				316
Alena HLADÍKOVÁ, vedoucí laborantka virologického oddělení				334, 316

Diagnostické metody

Techniky, které se používají k diagnostice virových infekcí, jsou založeny buďto na:

- přímém průkazu virového agens (kultivační techniky, průkaz virového antigenu nebo virové nukleové kyseliny)
- nepřímém průkazu infekce (detekce specifických protilátek proti danému agens). V současné době je naprostá většina vyšetření ve virologické diagnostice založena na nepřímém průkazu infekce (až 95% vyšetření).

Přímý průkaz virového agens 1. Kultivační techniky

Byť se kultivační techniky mohou dnes zdát již poměrně zastaralé, opak je pravdou. Stále zůstávají „zlatým standardem“, co se detekce virů týče. Příkladem může být nedávná epidemie viru SARS, kdy tento nový koronavirus byl objeven právě pomocí kultivace v buněčné kultuře. Průkaz virového agens metodou kultivace je nejspěšnější v akutní fázi infekce, kdy většinou dochází k masivnímu množení viru. Nevýhodou kultivačního průkazu je časová náročnost této metody (několik dní) a nízká záchytnost. Metoda je závislá na rychlém transportu vzorku do laboratoře a jeho rychlém zpracování.

Z materiálů vhodných pro průkaz virů se nejčastěji odebírá stolice (enteroviry, rotaviry, adenoviry), výtěr z nosu a nosohltanu (respirační viry), likvor (neurotropní viry), moč (cytomegalovirus), bronchoalveolární laváž (cytomegalovirus), stěr ze spojivky (adenoviry),

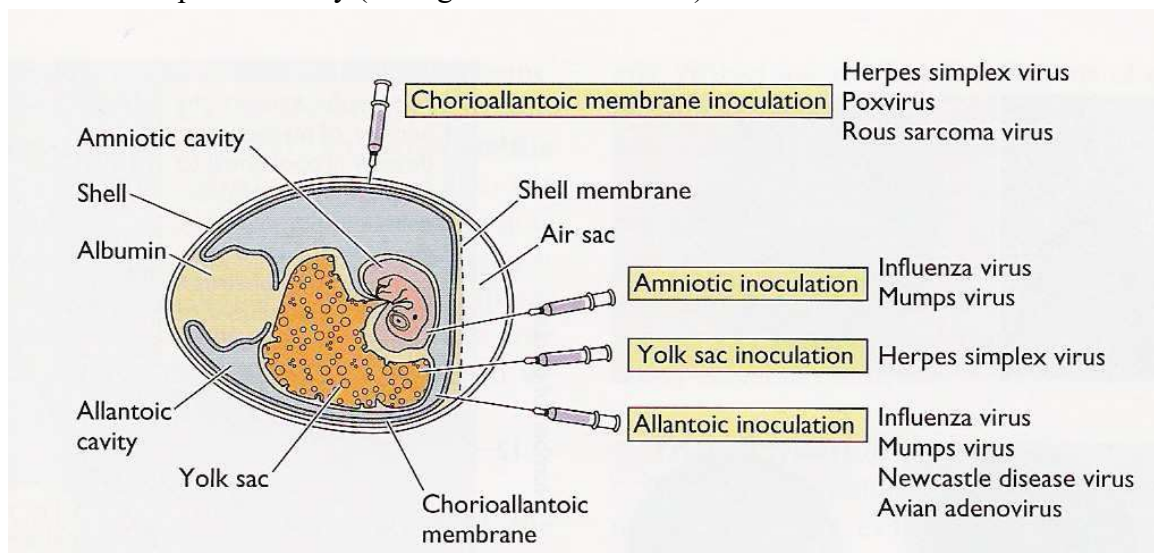
obsah puchýřků (herpetické viry), leukocytární frakce krve (cytomegalovirus) nebo různé tkáně odebrané biopsií nebo *post mortem* (různé viry).

Dnes již ve velmi omezené míře a spíše jen v referenčních laboratořích se užívá ke kultivačnímu vyšetření laboratorních zvířat. Vnímavost laboratorních zvířat k virové infekci závisí nejen na druhu, ale i na jejich věku. Je dobře známo, že sající myši mohou být vysoce vnímavé k infekci činitelem, k němuž dospělá myš bývá zcela odolná. Z toho důvodu se doporučuje užívat k izolaci virů zejména novorozené myši. Tento postup počítá také s tím, že nově izolované viry se vždycky nechovají podle popisů jejich patogenních vlastností uváděných v učebnicích, které všeobecně vycházejí z experimentálních zkušeností s vysoce adaptovanými laboratorními kmeny virů.

Kultivace s využitím kuřecího embrya

Specifickou metodou představuje izolace viru s využitím kuřecího embrya. Tato metoda se aplikuje např. pro izolaci viru chřipky. Vatové tampony, kterými byl proveden výtěr z nosohltanu a nosu, se umístí do odběrového média (PBS + albumin + antibiotika). 0,2 ml odběrového média jsou posléze očkována kuřecí embrya o stáří cca 10 dnů do amnionového vaku. Po 3 dnech kultivace se obsah amnionového vaku odebere, provede se tzv. Hirstův test (viz níže) a další pasáž, tentokrát však do allantoické dutiny, kde dochází k množení viru do vyššího titru. V případě potřeby je možno provést ještě třetí pasáž.

Hirstův test – virus chřipky aglutinuje červené krvinky, čehož se využívá v diagnostice. Ke krvinkám (př. kuřecím) je přidána amnionová či allantoická tekutina a po 30 minutách je test vyhodnocován. V případě přítomnosti viru dojde k aglutinaci krviček, což se projeví vytvořením pavučinové sítě na dně jamky aglutinačního panelu; v opačném případě se krvinky usadí u dna v podobě tečky (hemaglutinačního terčíku).



Kultivace v buněčných kulturách

V laboratorní praxi se většinou užívá stabilizovaných buněčných linií, které je možno množit po neomezeně dlouhou dobu. Po přidání testovaného materiálu k buňkám se množení viru obvykle projeví tzv. cytopatickým efektem (CPE). Kultivace buněk se provádí ve speciálních médiích povětšinou v plastových kultivačních lahvích, růst probíhá při teplotě 37 °C, práce s nimi se provádí ve sterilním boxu a do odběrových a kultivačních médií se přidávají některá

antibiotika a antimykotika pro potlačení bakteriální a mykotické kontaminace. Kultivační médium představuje roztok solí o fyziologické koncentraci, pufovaný na pH 7,2-7,4, glukózu, aminokyseliny, esenciální vitamíny. Dále je přidáváno sérum (fetální bovinní sérum nebo prekolostální telecí sérum) jako zdroj dalších látek esenciálních pro buněčný růst a množení. Obvykle je užíváno 10-20% séra v růstovém médiu. Poté, co buňky dorostou do stavu plné konfluence (souvislá monovrstva na dně kultivační lahvičky), bývá kultivační médium nahrazeno médiem udržovacím, které obsahuje nižší koncentraci séra (2-5%), čímž se omezí další případné množení buněk. Samotná inokulace se provádí tak, že k buněčné kultuře se přidá malé množství klinického vzorku z transportního média. Po inokulaci testovaného vzorku jsou kultury prohlíženy denně za účelem sledování rozvoje cytopatického efektu, který je někdy natolik charakteristický, že další konfirmační průkaz již není nutný. Cytopatický efekt se může objevit již během 48 hodin (enteroviry, virus herpes simplex), či až třeba za 14 dní (CMV). Cytopatický efekt může být buď klasicky lytický (zakulacování buněk až lýze; např. enteroviry), či dochází k formování mnohojaderných obřích buněk (syncytia) (herpesviry, paramyxoviry). Některé viry, ač se v dané buněčné kultuře množí, nezpůsobují žádný viditelný cytopatický efekt, ale třeba brání superinfekci dané kultury jiným virem, čehož se může využít také diagnosticky. Jinak je virus prokazován třeba pomocí protilátek. Buňky infikované některými viry mají schopnost vázat červené krvinky (hemadsorpce – viz níže).

Mezi nejužívanější linie v praxi patří:

LEP- diploidní lidské fibroblasty užívané při detekci viru herpes simplex, viru varicella-zoster a řady enterovirů.

CV-1 – linie odvozená od opičí ledviny. Používá se k izolaci některých enterovirů.

MDCK – buňky psí ledviny. Používá se pro izolaci viru chřipky.

L-132 – epiteloidní buňky užívané k izolaci viru herpes simplex, RS viru, či adenovirů.

Typy buněčných kultur:

a) semikontinuální buněčné linie – takové linie jsou odvozeny z lidských nebo zvířecích fetálních tkání. Mají normální karyotyp, proto mohou být použity pro produkci vakcín. Některé z těchto linií bývají používány i pro diagnostiku (WI-38, MRC-9). Tyto linie jsou pojmenovány „semikontinuální“, protože mají omezenou životnost – mohou být pasážovány maximálně po asi 50 generací.

b) kontinuální buněčné linie – nejčastěji používané v diagnostické praxi. Jsou odvozeny buďto z nádorové tkáně, či byly immortalizovány uměle, nebo i spontánně. Mají tedy většinou abnormální karyotyp. Některé z těchto linií (např. Vero buňky, či MDCK) jsou nyní využívány také pro produkci vakcín (polio, chřipka).

c) lymfocytární kultury – kultury B lymfocytů se immortalizují infekcí virem Epstein a Barrové, která vede k jejich transformaci. Tato schopnost EBV je také využívána jako diagnostický marker. T-lymfocyty je možno množit v kultuře působením lymfokinu IL-2, čehož se využívá pro kultivaci lidských retrovirů (HIV, HTLV), které pak vyvolávají vznik syncytií obřích buněk v kultuře.

2. Neutralizační test

Virus se v tomto případě určuje pomocí protilátky. Virus (například izolovaný pomocí kuřecího embrya či na buněčné kultuře) a protilátka se smíchají ve vhodných koncentracích. Specifická

protilátka se naváže na virové částice, neutralizuje je, a virus není posléze schopen se vázat/infikovat vnímavou buňku, narozdíl od kontrolního vzorku (vzorek viru bez protilátky).

3. Průkaz virového antigenu

U virů, které není možné kultivovat v kuřecích embryích či v buněčných kulturách, či u kterých by byla kultivace příliš zdlouhavá, se provádějí jiné metody, jako např.

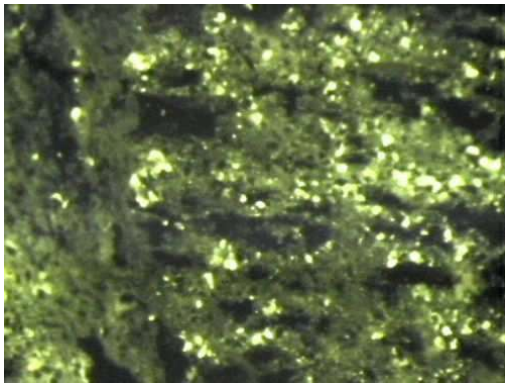
imunofluorescence (IF), ELISA, aglutinační reakce, eventuelně hemadsorpce.

3.1 Hemadsorpce

Hemadsorpce je metoda, která nepřináší diagnostickou informaci, spíše se jí využívá pro zjištění, zda se daný, hemaglutinem vybavený virus pomnožil v buněčné kultuře či kuřecím embryu. Využívá se například u viru chřipky. Virus se objeví ve velkém množství na jejich povrchu asi za 2 dny od počátku infekce. Po převrstvení této kultury 0,5% suspenzí morčecích krvinek dochází po určité době k jejich adsorpci, což je pozorovatelné pod mikroskopem při malém zvětšení jako husté nalepení krvinek na infikovaných buňkách.

3.2 Imunofluorescence

Přítomnost viru v klinickém vzorku nebo v buněčné kultuře, která byla inokulována patientským vzorkem a inkubována přes noc (např. virus chřipky nebo RSV v bronchoalveolárním výplachu nebo v buněčné kultuře, která byla inkubována 12-18 hodin po inokulaci), se dokazuje pomocí specifické protilátky, která je konjugovaná s fluorescenční molekulou (metoda přímé fluorescence) nebo častěji se užívá sekundární značená protilátka, která rozpoznává primární protilátku specifickou k danému antigenu (metoda nepřímé fluorescence). Vzorky se vyšetřují s využitím fluorescenčního mikroskopu.



Positive IFA test
(dengue)

3.3 ELISA

Využívá se pro průkaz virů v tekutině (séru, mozkomíšním moku, výplachu apod.). Je však nutné mít vyšší koncentraci virových částic ve vzorku. Komerční kity jsou dostupné pro respirační viry, rotaviry, či virus hepatitidy B. Místo enzymaticky značené protilátky je také možno užít protilátky, která je značena radioaktivně. Pak mluvíme o metodě radioimunoassay (RIA), ta je dnes však z praktických důvodů užívána vzácně.

3.4 Latexová aglutinace

Využívá se protilátek, které jsou navázány na latexové částice. Po smíchání s virem dojde k pouhým okem viditelné agutinaci latexových částic. Těto metody se využívá například u průjemových onemocnění (adenoviry, rotaviry).



4. Světelná mikroskopie

Mikroskopické vyšetření infikovaných tkání na přítomnost patologických změn bývá všeobecně jednoduché, ale má omezenou použitelnost. Je poměrně málo klinických stavů, u nichž se může použít tohoto postupu – např. vzteklna, herpes simplex, varicella. Je všeobecně žádoucí, aby se získané nálezy potvrdily nějakým jiným způsobem, jako serologií nebo izolací viru, neboť kromě několika výjimek jsou mikroskopické techniky metodami pouze nápomocnými. Z případů, kdy histopatologické metody slouží k identifikaci etiologického činitele, jsou nejběžnějšími příklady nepochybně vyšetření mozkové tkáně na přítomnost Negriho tělísek v případě infekce virem vztekliny, případně v menší míře vyšetření jaterní tkáně získané postmortálně nebo viscerotomií na přítomnost změn vyvolaných virem žluté zimnice.

5. Elektronová mikroskopie

Ve virologické diagnostice sehrává v současné době jen malou roli a využívají jí pouze vysoce specializovaná pracoviště. Využívá se značení metodou negativního kontrastu, kdy jsou částice světlé oproti negativnímu pozadí. Elektronová mikroskopie je velmi cennou pomůckou v případě izolace nového, neznámého viru. Dále může být tato metoda vhodná v případě špatně kultivovatelných virů či virů, které jsou ve vzorku přítomny ve velkých kvantech (např. některé gastroenterické viry, virus hepatitidy B). Ve vzorku je potřeba, aby bylo alespoň 10^6 částic/ml, aby bylo možno je vůbec identifikovat. Citlivost průkazu virového agens může být zvýšena použitím protilátek nesoucích elektrodenzní značky nebo protilátek, které aglutinují virus ve vzorku. Pak mluvíme o tzv. imunoelektronové mikroskopii.

6. Průkaz virové nukleové kyseliny

Metody průkazu virové nukleové kyseliny se díky své jednoduchosti, citlivosti a specifitě staly velmi exstenzivně užívanými v diagnostické praxi. Metody zahrnují PCR, RT-PCR (pro detekci virové RNA, kdy v prvním kroku dochází k přepisu virové RNA pomocí enzymu reverzní transkriptáza (RT) na cDNA, která je následně amplifikována shodně s klasickou PCR) a kvantitativní real-time PCR či real-time RT-PCR (zde je průběh reakce monitorován v „reálném čase“ díky použití specifických nebo nespecifických fluorescenčních sond a díky tomu je možno kvantifikovat množství kopií virové nukleové kyseliny ve vzorku). Metody real-time PCR a real-time RT-PCR jsou vhodné například pro monitoring průběhu onemocnění, účinnosti antivirové terapie, případně někdy může zjištění množství viru ve vzorku napomoci určení prognózy onemocnění.

Průkaz protilátek

V tomto případě jsou detekovány protilátky tvořené hostitelským organismem coby odpověď na akutní virovou infekci. Určité úskalí však představují chronické či latentní infekce, které se mohou za určitých podmínek aktivovat. Obvykle se zjišťuje přítomnost protilátek ve třídách IgM (první protilátková odpověď; indikují akutní infekci), případně i IgG (dlouhodobé, paměťové protilátky). Využívají se metody ELISA, komplement fixační test nebo immunoblotting.

Pro sérologické vyšetření se odebírá žilní krev bez použití protisrážlivých prostředků s dodržováním všech bezpečnostních pravidel (dezinfekce místa vpichu, stříkačky a jehly pro jedno použití, rukavice pro jedno použití pro odebírající personál). Odběr by se měl provádět nejlépe ráno nalačno za aseptických podmínek. Krev se odebírá do sterilních zkumavek na jedno použití (event. s aktivátorem hemokoagulace) v množství 5-7 ml.

Pro sérologický průkaz virové infekce se obvykle doporučuje vyšetření párových sér:

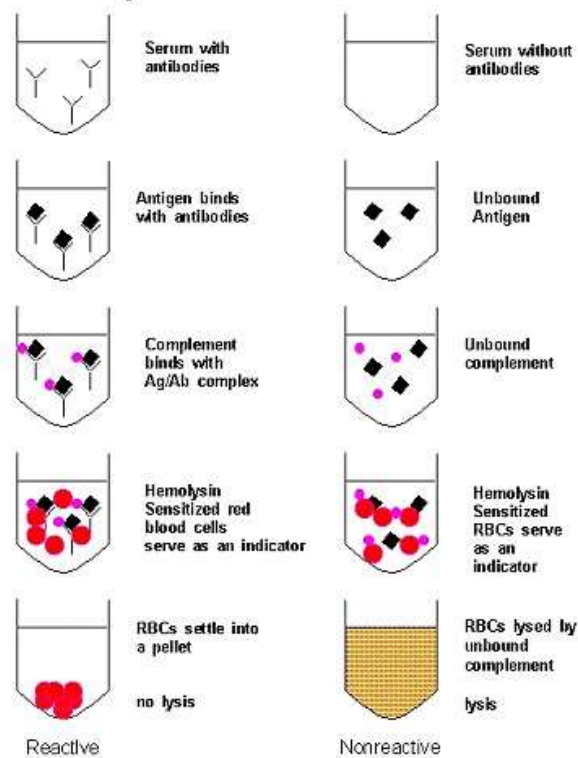
- akutní sérum - odebrané co nejdříve po začátku onemocnění
- rekonvalescentní sérum - odebrané za 14 a více dnů (dle jednotlivých agens) po začátku onemocnění.

1. Komplement fixační test

KFT může být použit jak k detekci specifických protilátek, tak i virového antigenu v séru pacienta. Dnes je tento test na ústupu, nicméně se ještě stále používá na některých pracovištích. Pro průkaz antigenu se využívá červených krvinek s navázanými protilátkami (ovčího původu) a sérum (obvykle králičí) jako zdroj komplementu. Komplement je systém sérových proteinů, které reagují s komplexy antigen-protilátka. Pokud tato reakce proběhne na povrchu buněk, vede k vytvoření transmembránových pórů a následné destrukci buněk (v tomto případě hemolýze krvinek).

Komplement může také reagovat s komplexy antigen-protilátka v roztoku a ani v takovém případě k lýze krvinek nedochází. Tedy sérum pacienta obsahující specifickou protilátku bude smícháno s antigenem za vytvoření komplexu a následné inhibice komplementu.

Complement Fixation Test



2. ELISA

– viz výše s tím rozdílem, že tentokrát je v jamkách mikrotitračního panelu povětšinou imobilizován antigen a sleduje se přítomnost protilátky ve vzorku. V případě, kdy je protilátka přítomna, dojde k navázání na antigen a posléze se nechá na protilátku navázat sekundární protilátka s konjugovaným enzymem, který katalyzuje přeměnu bezbarvého substrátu přidaného do jamky na zabarvený produkt, který se pak stanovuje spektrofotometricky. Existuje řada variant klasické ELISY. Příkladem jiného designu budiž třeba komerční test pro diagnostiku zarděnek:

- Protilátky ve třídě IgM proti lidským IgM jsou imobilizovány v jamkách mikrotitračního panelu
- Do jamek je napipetováno testované sérum, IgM protilátky jsou zachyceny anti-IgM protilátkami.
- Poté je přidán antigen připravený z viru zarděnek. Jsou-li mezi patientskými IgM přítomny anti-rubella IgM, zachytí antigen.
- Přidá se enzymaticky značená protilátka proti antigenu viru zarděnek. Ta se přichytí jen v případě, kdy jsou přítomny patientské anti-rubella IgM, které chytly antigen. Je provedena enzymatická reakce na základě jejíhož výsledku se hodnotí, zda byl vzorek pozitivní či negativní.

3. Immunoblotting

Western blotting (či imunoblotting) je například zásadní metodou pro confirmaci pacientovy infekce virem HIV, kdy je vždy nutno pozitivní nález z vyšetření metodou ELISA dále potvrdit, neboť chybný laboratorní výsledek by mohl znamenat pro pacienta nedozírné osobní i sociální následky. V tomto případě jsou virové proteiny separovány podle molekulové hmotnosti

elektroforézou v polyakrylamidovém gelu. Proteiny jsou následně přeneseny (přeblovány) na speciální papír, ke kterému se těsně naváží. Papír se nastříhá na proužky a k nim jsou přidány vzorky patientských sér. Jsou-li ve vzorku přítomny protilátky proti viru, naváží se na dané proteiny. Posléze se po promytí přidá protilátka proti lidským protilátkám značená enzymem. Po proběhnutí enzymatické reakce proužky indikují komplexy antigenu o dané molekulární hmotnosti se specifickou protilátkou.

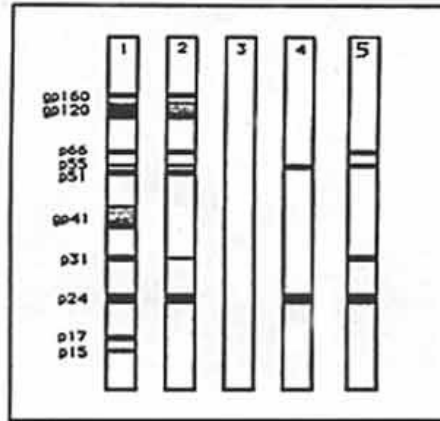


Figure:

Examples of reactions by an HIV-1 Western blot:

1. Positive control (strong)
2. Positive control (weak)
3. Negative control
4. Indeterminate profile
5. Indeterminate profile (highly suggestive)

4. Inhibice hemaglutinace

Některé viry mají tu schopnost, že váží červené krvinky, což v experimentu se projeví jejich aglutinací. Jsou-li proti danému viru přítomny v klinickém vzorku protilátky, aglutinaci zabrání. Tento test je však jen velmi orientační a dnes je vytěšňován specifitějšími metodami.

