

MUNI

Přírodovědecká fakulta

SPECIÁLNÍ VIROLOGICKÉ METODY

Praktická cvičení

doc. RNDr. Luděk Eyer, Ph.D.

Brno, 2024



Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU



**NÁRODNÍ
PLÁN OBNOVY**

MŠMT
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

Předmluva

Skriptum Metody mikrobiální diagnostiky (vybrané virologické metody) si klade za cíl demonstrovat některé postupy a technologie, které nacházejí uplatnění v soudobé diagnostice virových nákaz i v základním virologickém výzkumu. Má sloužit studentům jako názorná pomůcka a sbírka návodů a metodických postupů při praktických laboratorních cvičeních i při řešení a sepisování diplomových prací.

Na tomto místě bych rád poděkoval zejména Mgr. Zuzaně Beránkové a Dr. Janu Havierníkovi za poskytnutí materiálů nezbytných pro kompozici některých kapitol těchto skript. Dále děkuji Prof. Danielu Růžkovi za cenné připomínky týkající se celkového konceptu publikace.

Svým studentům přeji, aby se jim kurz Metod mikrobiální diagnostiky stal dobrým informačním základem k dalšímu studiu, aby jim otevřel nové obzory a ukázal jim, že cesta za poznáním je jedno veliké dech beroucí dobrodružství.

V Brně, září 2024

Autor

Obsah

Úvod.....	4
1. ZÁSADY PRÁCE VE VIROLOGICKÉ LABORATOŘI	5
Bezpečnost a zdraví při práci ve virologické laboratoři.....	5
Vybavení virologické laboratoře	5
Principy práce ve virologické laboratoři	6
Infekční materiál v praktiku	6
2. KULTIVAČNÍ TECHNIKY VE VIROLOGII.....	7
Téma 1. Práce s buněčnou kulturou	7
Úkol 1. Pasážování buněk	8
Úkol 2. Počítání buněk v Bürkerově komůrce	9
Úkol 3. Kultivace buněk v 96-jamkového panelu.....	10
Úkol 4. Kvantifikace CPE.....	11
Téma 2. Stanovení titru viru.....	13
Úkol 1. Stanovení virového titru plakovou titrací.....	13
Úkol 2. Stanovení virového titru jako TCID ₅₀ /mL	16
3. IMUNOLOGICKÉ DIAGNOSTICKÉ METODY VE VIROLOGII.....	19
Téma 1. Imunofluorescenční barvení.....	19
Úkol 1. Vizualizace virového antigenu pomocí fluorescenčního barvení.....	20
Téma 2. ELISA pro stanovení virus-specifických protilátek	23
Úkol 1. Stanovení protilátek proti viru klíšťové encefalitidy z lidského séra.....	25
Téma 3. Rychlý imunologický test na přítomnost protilátek proti SARS-CoV-2	27
Úkol 1. Stanovení protilátek proti SARS-CoV-2 rychlým imunologickým testem.....	28
Téma 4. Virus-neutralizační test	30
Úkol 1. Stanovení neutralizačních protilátek proti klíšťaty přenášenému flaviviru	30
4. MOLEKULÁRNĚ - BIOLOGICKÉ METODY V DIAGNOSTICE VIROVÝCH INFEKČÍ.....	32
Téma 1. PCR pro průkaz viru klíšťové encefalitidy ve vzorcích klíšťat.....	32
Úkol 1. Izolace RNA viru klíšťové encefalitidy z klíšťat	33
Úkol 2. Vlastní PCR pro průkaz virové RNA	35
Úkol 3. Elektroforéza PCR produktů, jejich monitorování a extrakce z gelu.....	37
Téma 2. Vyšetření na SARS-CoV-2 pomocí kvantitativní reverzně-transkripční PCR	39
Úkol 1. Izolace virové RNA.....	39
Úkol 2. RT-qPCR	40
Téma 3. Práce s virovým reportérovým systémem	44
Úkol 1. Využití reportérového virového systému pro virus-neutralizační test	45
5. VIRY A ANTIVIROTIKA	49
Téma 1. Stanovení citlivosti viru na antivirotika	50
Úkol 1. Stanovení citlivosti klíšťaty přenášeného flaviviru na antivirotika.....	50
Úkol 2. Stanovení toxicity testovaných antivirotik	53
Téma 2. Studium rezistence viru na antivirotikum	54
Úkol 1. Experimentální ověření rezistence viru na nukleosidové antivirotikum.....	55
Úkol 2. Bioinformatická analýza mutací v sekvenci virové genomové RNA	56
6. LABORATORNÍ ZVÍŘE VE VIROLOGII	57
Téma 1. Manipulace s experimentálním zvířetem	57
Úkol 1. Celková anestezie laboratorní myši a experimentální infekce	58
Úkol 2. Odběr vzorku krve z ocasní žíly, vykrvení zvířete a odběr orgánů.....	59
7. PŘÍPRAVA RŮSTOVÝCH MÉDIÍ, ROZTOKŮ, BARVIV A DALŠÍCH REAGENTŮ POUŽÍVANÝCH V PRAKTIKU	61
8. DOPORUČENÁ LITERATURA K DALŠÍMU STUDIU.....	63

Úvod

Virové nákazy představují po celou dobu existence lidské civilizace vážný zdroj biologického rizika. Diagnostické virologické metody hrají klíčovou roli v moderní medicíně virových nákaz; správná a rychlá diagnostika vede k lepším prognózám onemocnění a k včasnému zavedení účinné terapie (je-li k dispozici). Diagnostické metody jsou však nezastupitelné rovněž při epidemiologických studiích, hledání původce onemocnění, cest přenosu nákazy a trasování šíření viru v lidské populaci. Uplatňují se také při studiu nových mutací, změn ve virulenci a transmisibilitě a vzniku rezistencí na dostupná léčiva. Jsou nezbytné při hledání nových vakcinačních strategií i při vývoji nových účinných antivirových léků.

Obecně lze diagnostické metody rozdělit podle několika hledisek. Metody označujeme jako přímé, pokud přímo detekují patogenní agens, v tomto případě virus, nebo jeho některou strukturální komponentu (např. genomovou nukleovou kyselinu či virový protein). Naopak nepřímé metody jsou schopny prokázat pouze stopu, kterou virus zanechává svou přítomností v organismu. Takové metody detekují protilátkovou odezvu imunitního systému na přítomnost viru. Použitelnost přímých nebo nepřímých metod závisí striktně na tropismu viru a jeho výskytu v příslušných tkáních nebo tělních tekutinách, které lze odebírat a analyzovat. Např. herpetické viry nebo SARS-CoV-2 lze přímo detekovat ze stěrů sliznice, sputa, nebo hnisu. Naopak, virus klíšťové encefalitidy nebo HIV lze detekovat hlavně nepřímými sérologickými metodami pro průkaz virus-specifických protilátek.

Podle toho, jakými metodologickými přístupy virus (nebo protilátku) detekujeme, rozlišujeme potom diagnostické metody kultivační, elektronově-mikroskopické, imunologické nebo molekulárně-biologické. Kultivační metody jsou nezastupitelné při izolaci viru z klinického materiálu a jeho kultivaci na buněčné kultuře a následnou identifikaci/typizaci. Elektronová mikroskopie se s úspěchem využívá pro detekci virů v různých klinických vzorcích, jako jsou stěry, vzorky stolice a biopsie tkání. Imunologické testy jsou založeny na tvorbě imunokomplexu protilátka-virus; je-li imunokomplex vhodně označen (pomocí radioaktivního izotopu, luminoforu nebo enzymu), poskytuje kvantifikovatelný fyzikální signál a umožňuje stanovit množství viru nebo protilátky v klinickém vzorku. Molekulárně-biologické metody se naopak používají pro prokázání přítomnosti virového genomu (resp. specifické sekvence) ve vzorku, a to nejčastěji pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR). V rutinní diagnostice se nejčastěji uplatňují právě dvě posledně zmíněné rodiny metod.

Praktické cvičení z Metod mikrobiální diagnostiky navazuje na stejnojmenný přednáškový cyklus a klade si za cíl demonstrovat a prakticky si osvojit vybrané metodologické přístupy používané ve virologii a v diagnostice virových nákaz. Základní posláním kurzu, ať už teoretických přednášek nebo praktických cvičení, je porozumět principům diagnostických metod. Proto je občas nezbytné provést při výkladu krátkou exkurzi do jiných přírodních oborů, jako je fyzika, fyzikální chemie, biochemie, imunologie nebo molekulární biologie. Ačkoli je výběr metod primárně zaměřený na metody diagnostické, přednášky i praktika mají výrazný přesah i do metod používaných v základním badatelském výzkumu. Bez tohoto propojení není totiž možné získat komplexní přehled a povědomí o rozsáhlém souboru metod a technologií užívaných jak ve virologické diagnostice a epidemiologii, tak při studiu virové patogeneze a vývoji a aplikaci nových antivirových léčiv a vakcín.

1. ZÁSADY PRÁCE VE VIROLOGICKÉ LABORATOŘI

Bezpečnost a zdraví při práci ve virologické laboratoři

Práce ve virologické laboratoři přináší rizika vyplývající jednak z práce s biologickým (infekčním nebo potenciálně infekčním) materiálem, jednak z používání zdraví škodlivých chemických látek, jejichž využití je někdy nezbytné pro správné, spolehlivé a přesné fungování některých metodik.

Veškerá manipulace s biologickým materiálem a zejména se vzorky a izoláty virů musí být prováděna v laminárních boxech s uzavřeným prouděním vzduchu, které zajistí, že infekční agens neuniknou z prostoru boxů. V praktikách používáme laminární boxy pro II. stupeň biologického rizika. Při práci musejí být používány rovněž ochranné pomůcky, jako je plášť, štít, rukavice, ochranné brýle atd. Veškerý infekční materiál musí být dekontaminován desinfekčními roztoky (Persteril 0,5% nebo Desam GK 4%).

Rovněž práce s tkáňovými kulturami a laboratorními zvířaty přináší rizika plynoucí z možné přítomnosti virových, bakteriálních, parazitických a dalších infekčních agens. Je proto nezbytné, aby pracovníci dodržovali všechna opatření omezující možnost vzniku nákazy a s veškerým biologickým materiálem zacházeli jako s infekčním.

Z dalších zdravotních rizik, vyskytujících se při některých technikách, je třeba uvést práci s radioizotopy, s nimiž mohou pracovat pouze proškolení pracovníci. Práce v digestoři je předepsána při používání izotopů, těkavých rozpouštědel, toxických nebo kancerogenních látek.

Autoklávy mohou obsluhovat pouze vyškolené osoby, protože při nesprávném zacházení hrozí nebezpečí těžkých úrazů. Práce s tlakovými lahvemi obsahujícími stlačené plyny je rovněž zdrojem rizika, a proto je třeba dbát na správnou obsluhu, uskladnění, umístění a používání nepoškozených redukčních ventilů.

Vybavení virologických laboratoří

Laboratoř, kterou využíváme v praxi, je laboratoř bezpečnostního (biohazardního) stupně č. 2 (BSL-2). K základnímu přístrojovému vybavení virologických laboratoří patří laminární boxy s uzavřeným prouděním vzduchu, umožňující bezpečnou práci s patogenními organismy za aseptických podmínek.

K dalšímu vybavení patří světelné nebo fluorescenční mikroskopy, termostaty s přívodem CO₂ nebo bez přívodu, odstředivky a ultracentrifugy, chladničky, mrazničky a hlubokomrazicí boxy, spektrofotometry, třepačky a promývačky mikrotitračních destiček. Pro diagnostické a výzkumné účely se používají speciální měřicí přístroje, např. luminometr, fluorimetr, průtokový cytometr apod.

Dalšími nezbytnými předměty jsou pomůcky ze skla a plastu: zkumavky, pipety (skleněné či plastové), automatické mikropipety jedno i více kanálové, dávkovače, injekční stříkačky a jehly, kultivační lahve, panely o různém počtu jamek a lahve na zásobní roztoky a média.

Principy práce ve virologické laboratoři

Virologická laboratoř má ve své práci uplatňovat zásady správné laboratorní praxe. Každá laboratoř má mít své standardní procedury, které jsou používány v provozu laboratoře. Tyto obsahují instrukce pro údržbu a použití přístrojů, popis provedení testu a interpretaci výsledků. Standardní procedury jsou uloženy v laboratoři v písemné formě a musí být pravidelně revidovány.

Práce ve virologické laboratoři by měla být založena zejména na následujících principech:

1. Pracovníci musí dbát zásad bezpečnosti, v laboratoři nejíst, nepít a nekouřit a při práci musí používat ochranné pomůcky.
2. Přístroje musí být pravidelně udržovány a testovány.
3. Materiály (sklo a pomůcky z umělé hmoty) mají být vysoké kvality, nesmí být toxické, musí být dobře umyté, opláchnuté, zbavené detergentů a vysterilizované. Dnes se běžněji používají jednorázové plastové pomůcky na úkor pomůcek ze skla.
4. Reagencie se musí používat kvalitní, z ověřených zdrojů a v požadované čistotě. Je třeba dbát na správnou přípravu pomocných roztoků, zejména na přesné navážení komponent. U všech roztoků a reagií se mají kontrolovat následující vlastnosti: (i) pH, (ii) elektrická vodivost, která odpovídá koncentraci solí v roztoku a (iii) sterilita kultivačních médií.
5. Každý test musí být proveden s odpovídajícími pozitivními a negativními kontrolami. Primární data, tj. výsledky měření, nelze měnit ani přepisovat.

Infekční materiál v praktiku

Pro minimalizaci zdravotních rizik spojených s manipulací s infekčním materiálem v praktiku budou používány pouze takové kmeny virů, které nejsou patogenní pro člověka. Většina úloh bude provedena s klíšťaty přenášeným virem Langat (kmen IP/LGTV/09/12/2010), typickým zástupcem čeledi *Flaviviridae*, který je růstovými vlastnostmi blízký viru klíšťové encefalitidy. S izolovanou a purifikovanou virovou RNA je možno nakládat jako se zcela neinfekčním materiálem (materiál byl ošetřen lyzačním pufrem, který má virucidní účinky). Neinfekční jsou rovněž subgenomové fragmenty potřebné pro konstrukci reportérového virového systému. Séra určená pro průkaz protilátek proti viru jsou součástí komerčně dodávané testovací sady (na principu ELISA) a jsou prosty jakékoliv bakteriální či virové infekce. Studenti si v případě zájmu mohou přinést vlastní sérum k testování.

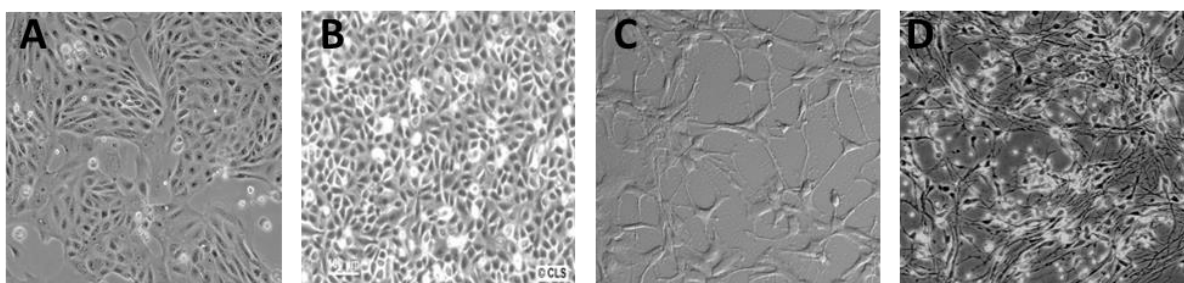
2. KULTIVAČNÍ TECHNIKY VE VIROLOGII

Kultivační techniky vyživající buněčné kultury pro multiplikaci virů jsou jedinými technikami (s výjimkou kultivace v experimentálním zvířeti), které umožňují izolaci viru pro účely jeho následné genotypové nebo fenotypové identifikace a charakterizace. Kultivace virů na buněčných kulturách je ovšem možná pouze u některých virů, a to takových, které jsou schopny efektivně se replikovat v buňkách za podmínek *in vitro*. K takovým virům patří např. flaviviry přenášené klíšťaty nebo komáry, koronaviry, viry chřipky, herpetické viry, virus vztekliny a mnoho dalších. Viry, které není možno kultivovat *in vitro*, lze pomnožovat buď v kuřecích embryích nebo v experimentálních zvířatech. Nedostupnost *in vitro* kultivačních systémů pro některé viry, lze řešit zavedením tzv. subgenomových replikačních systémů, v nichž dochází pouze k replikaci virové nukleové kyseliny bez tvorby infekčních virových částic. Takové replikační systémy jsou úspěšně používány např. pro studium viru žloutenky typu C (HCV).

Téma 1. Práce s buněčnou kulturou

Viry jako intracelulární parazité jsou bez hostitelských buněk nekultivovatelné. Buněčné kultury jsou proto nepostradatelným nástrojem při studiu virů a jsou cennou pomůckou při diagnostice virových onemocnění či při vývoji antivirotik a vakcín. Buněčné kultury sehrály významnou roli při vývoji vakcín proti viru dětské obrny, spalniček nebo zarděnek. Buněčné kultury posloužily k objevu řady nových virů a virových čeledí (např. adenovirů, echovirů, rhinovirů apod.). Práce s buněčnými kulturami vyžaduje přísně aseptické podmínky, přesto se vyskytují časté problémy s kontaminacemi bakteriemi, mykoplazmaty, kvasinkami či plísněmi.

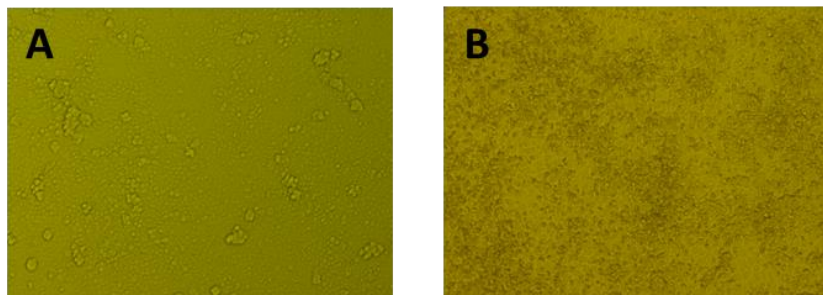
Rozlišujeme několik typů buněčných kultur (obr. 1): (i) Imortalizované buněčné linie se vyznačují nádorovým původem a neomezenou proliferační schopností, která je důsledkem přítomnosti aktivních telomeráz. Nejznámější imortalizovanou buněčnou linií jsou HeLa buňky izolované v roce 1951 z nádoru děložního hrdla Henrietty Lacksové (z prvních dvou písmen jména a příjmení této ženy pochází i název linie). (ii) Buněčné kmeny jsou buněčné kultury odvozené do somatických (diploidních) buněk, které minimálně jedenkrát již prošly procesem pasážování. Tyto kmeny zpravidla zanikají po 40-50ti děleních z důvodu zkracování telomer. (iii) Primární buňky jsou charakteristické omezenou proliferační schopností a často vyššími nároky na kultivaci. Primární buňky lze získat buď od dárce, nebo mohou být diferencované z kmenových/primordiálních buněk.



Obrázek 1. Buněčné kultury pro kultivaci některých virů. (A) Madin-Darby Canine Kidney cells (MDCK, imortalizovaná linie pro kultivaci virů chřipky), (B) Huh-7 (imortalizovaná linie odvozená od hepatokarcinomálních buněk pro kultivaci virů žloutenky typu B a C), (C) lidské mozkové kortikální astrocyty a (D) lidské neurony (obě jsou primokultury pro kultivaci vektorem přenášených flavivirů a jiných neurotropních virů).

Infekce virem probíhá v buňkách, které jsou jednak na virus citlivé (senzitivní; virus je schopný adsorpce na receptor této buňky) a jednak k viru vnímavé (permisivní; umožňují viru se v nich replikovat). Nepermisivní buňky mohou být virem infikovány, ale nemůže se v nich uskutečnit některý ze stupňů replikace nebo morfogeneze viru. Rozlišujeme několik typů infekce buňky virem: (i) cytocidní produktivní infekce (lytická forma infekce), (ii) perzistentní infekce (virové částice se stále tvoří, buňka nebývá poškozena a dále se dělí), (iii) transformace (přeměna buňky v buňku nádorovou) a (iv) abortivní infekce (vznikají jen některé strukturní virové složky, netvoří se kompletní virové částice, chybí např. některý enzym).

Změny v infikovaných buňkách se v některých případech projevují tzv. cytopatickým efektem (CPE). CPE (obr. 2) je soubor změn, které vznikají v buňce v důsledku proniknutí viru do buňky a jeho replikace v buňce a způsobují nevratné narušení jejich metabolických procesů. Dochází k inhibici syntézy buněčných makromolekul (inhibice syntézy buněčné RNA, blokáda asociace ribozomů s buněčnou mRNA, inhibice syntézy buněčné DNA), k přestavbě membrán endoplazmatického retikula a jádra, změně permeability membrán, úniku iontů a makromolekul, změně buněčných mikrofibril a mikrotubulů. Uvnitř infikovaných buněk často pozorujeme inkluze nebo apoptotická tělíska, buňky vytvářejí mnohojaderná syncytia a výrazně se mění integrita monolayeru (jednovrstevné buněčné kultury), přičemž vznikají v buněčné kultuře léze. Pro kvantifikaci CPE se používají různé kolorimetrické reakce, pomocí kterých hodnotíme metabolickou aktivitu testovaných buněk za vzniku chemických produktů s definovanými maximy ve viditelné oblasti spektra.



Obrázek 2. Cytopatický efekt (CPE) na PS buňkách (porcine kidney stable cells). (A) Neinfikovaná kultura. (B) kultura infikovaná virem klíšťové encefalitidy. Tmavé léze a shluky morfologicky odlišných buněk jsou projevem vznikajícího cytopatického efektu v důsledku virové infekce (foto L. Eyer).

Úkol 1. Pasážování buněk

Pasážování je základní technikou při práci s buněčnou kulturou. Umožňuje kontinuální růst buněčné kultury, která pak může být využita pro další výzkumné nebo diagnostické účely. Proces pasážování zahrnuje přenos buněk do čerstvého média, očištění kultury od odumírajících buněk a buněčného debrisu a redukci počtu buněk připadajících na jednu kultivační jednotku (např. rozdělením buněčné populace do většího počtu kultivačních lahví).

Materiál: Kultivační lahev (75 cm²) s narostlou kulturou buněk (např. PS, porcine kidney stable cells nebo A549), živné médium s přísadkou fetálního bovinního séra (v případě PS

používáme Leibowitz (L15) médium s 3% FBS, v případě A549 používáme Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) s 10% FBS, roztok trypsinu, fosfátový pufr (PBS).

Postup práce:

1. Vstupním materiálem je konfluentně narostlá kultura hostitelských buněk v kultivační lahvi (75 cm²). Pro přípravu buněčné suspenze slijeme médium, opatrně propláchneme pomocí PBS, odsajeme PBS a přidáme 2 mL roztoku trypsinu. Trypsin vylejeme z lahve a přidáme znovu 2 mL trypsinu. Inkubace 10 – 15 min při 37 °C. Buněčný monolayer se začne viditelně odlupovat. Odlupování monolayeru lze urychlit poklepáním na stěnu kultivační lahve.
2. Přidáme 4 mL média obsahujícího 3% bovinního fetálního séra (celkem máme nyní v lahvi 6 mL). Sérové proteiny inaktivují trypsin a jeho štěpná aktivita se zastaví. Pokud by enzymatické štěpení probíhalo příliš dlouho, narušil by se buněčný povrch, což by vedlo k úhynu buněk.
3. Pomocí pipety (5 nebo 10 mL) důkladně resuspendujeme buňky, aby tvořily homogenní suspenzi (10 – 30x nasajeme a vypustíme buněčnou suspenzi, zároveň suspenzí omýváme stěny kultivační lahve. Snažíme se médium v lahvi příliš nenapěnit. Je možné kontrolovat mikroskopicky.
4. Odebereme 2 mL suspenze, přidáme 18 mL čerstvého média a kultivujeme při 37 °C po dobu dvou až tří dnů, kdy jsou buňky připraveny k další pasáži nebo mohou dále sloužit k dalším manipulacím a experimentům. PS buňky kultivujeme v přirozené atmosféře bez přídavku CO₂.

Vyhodnocení: Ihned po skončení práce se pomocí světelného mikroskopu přesvědčíme, že buňky jsou rovnoměrně rozestě v kultivačním médiu v kultivační lahvi. Po 16-24 h inkubace buňky opět prohlédneme, zda jsou přisedlé ke dnu kultivační lahve. Následující dny pozorujeme, jak buňky dorůstají a postupně tvoří konfluentní monolayer.

Úkol 2. Počítání buněk v Bürkerově komůrce

Počítáním buněk zajistíme přesný a definovaný počet buněk vstupující do další pasáže nebo do navazujícího experimentu. Znalost přesného počtu buněk zajišťuje vysokou reprodukovatelnost prováděných experimentů nebo možnost přesně určit multiplicitu infekce (MOI). Existuje několik typů komůrek pro počítání buněk. V praxi bude demonstrováno počítání buněk pomocí Bürkerovy komůrky (obr. 3).

Materiál: Bürkerova komůrka, trypanová modř, suspenze buněk získaná v předchozí úloze

Přístrojové vybavení: Optický mikroskop nebo binokulární lupa

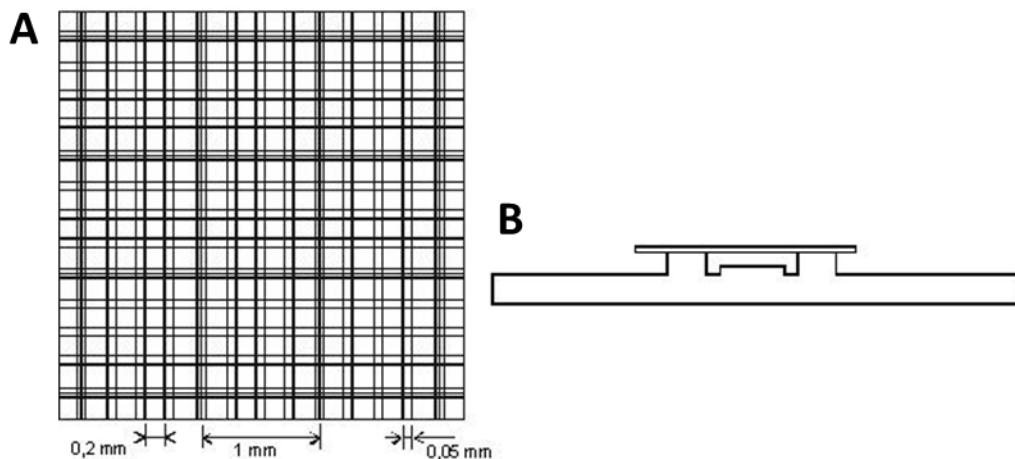
Postup práce:

1. Malé množství buněčné suspenze (viz Úkol 1: Pasážování buněk, bod 3) přeneseme do zkumavky, z ní odebereme 25 µL a smícháme s 25 µL trypanové modři.
2. Pipetujeme do obou částí Bürkerovy komůrky (pomocí kapilárních sil suspenze vteče do prostoru komůrky).

- Počítáme pod mikroskopem nebo binokulární lupou. Počítáme buňky v jednom řádku a v jednom sloupci komůrky + 1 další políčko. To celé provedeme dvakrát, počítáme tedy buňky v obou částech (počítacích prostorech) komůrky.

Příklad: Počet buněk pro první počítací rastr v jednom směru: 42, počet buněk v druhém směru: 38, v samostatném políčku: 5. Pro druhý počítací rastr v jednom směru 35 buněk, v druhém směru 49 buněk.

$$\text{Počet buněk} = (42 + 38) + (35 + 49) \cdot 10^4 = 164 \cdot 10^4 = 1,64 \cdot 10^6 \text{ buněk/mL}$$



Obrazek 3. Bürkerova komůrka. (A) Počítací prostor (rastr) Bürkerovy komůrky s uvedenými rozměry jednotlivých čtverců pro počítání. (B) Tvarový profil komůrky. Výpočet počtu buněk se vždy vztahuje na objem tekutiny vymezený podložním a krycím sklem.

Vyhodnocení: Počítáme-li buňky z dobře narostlé kultivační lahve (75 cm²), měl by být celkový počet buněk cca kolem 2 milionů buněk/mL (viz výpočet). Počítáme-li buňky ještě před ukončením vlastní pasážování, můžeme podle aktuálního počtu buněk přizpůsobit ředění buněk při pasážování a vyvarovat se tak nadměrnému přerůstání (při vysokém počtu) nebo nedorůstání (při nízkém počtu) buněčné kultury.

Úkol 3. Kultivace buněk v 96-jamkového panelu

Většina virologických experimentů se provádí v kultivačních panelech o různém počtu jamek (obvykle 6, 18, 24, 48 nebo 96 jamek). Jamky v panelu slouží jako mikrozskumavky a umožňují tak provést rozsáhlou sadu prostorově vzájemně oddělených experimentů při minimální spotřebě média a jiného materiálu. „Nasazení panelu s buňkami“, jak se tomuto úkonu v laboratorní hantýrce často říká, je proto rutinní aktivita, kterou zpravidla začíná většina virologických experimentů založených na infekci buněčné kultury virem.

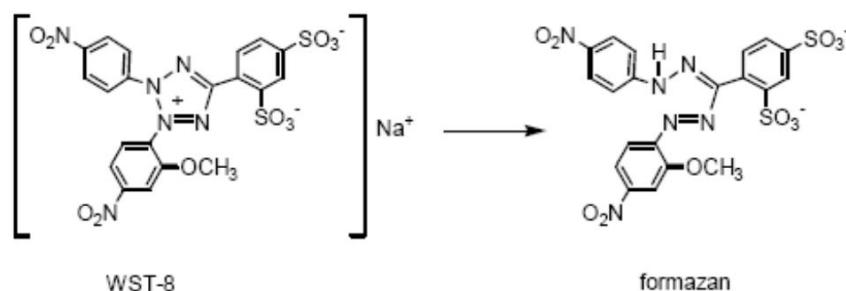
Postup práce:

- Postupujeme až do bodu 3 (viz Úkol 1: Pasážování buněk). Odebereme 2 mL suspenze a přidáme cca 18 – 20 mL čerstvého média.
- Vzniklou suspenzi nanese dávkovací pipetou do 96-jamkového panelu (200 µL do každé jamky).
- Buňky v panelu kultivujeme do příštího dne (16-24 hodin) při 37 °C.

Vyhodnocení: Následující den kontrolujeme konfluenci buněčné kultury. Chceme-li buňky využít k dalším experimentům (kvantifikace CPE, pokusy s antivirotyky atd.), je třeba, aby byla kultura zcela konfluentní nebo semikonfluentní (s menšími mezerami a otvory mezi rozrůstajícími se buňkami).

Úkol 4. Kvantifikace CPE

Míra CPE odráží efektivitu replikace viru v buněčné kultuře. Kvantifikace CPE je proto velmi užitečná metoda, používaná při řadě testů ve virologické diagnostice (např. při provádění virus-neutralizačního testu) i v základním výzkumu (např. při hodnocení schopnosti antivirotika zastavit replikaci viru v kultuře). Pro kvantifikaci CPE se s výhodou využívá řada kolorimetrických biochemických metod, které monitorují metabolickou aktivitu, a tedy životaschopnost, infikovaných buněk. V praxi se seznámíme s kolorimetrickou reakcí využívající redukci tetrazoliové soli WST-8 na žlutý formazan (obr. 4) prostřednictvím buněčných dehydrogenáz. Jednodušší metoda spočívá v prostém obarvení buněčné kultury naftalenovou černí nebo jiným barvivem, které má afinitu k adherovaným buňkám na dně jamek mikrotitrační destičky.



Obrázek 4. Redukce bezbarvé tetrazoliové soli WST-8 na žlutý formazan. Tato kolorimetrická reakce je využívána pro monitorování metabolické aktivity buněk, a je tedy vhodná i pro kvantifikaci CPE.

Materiál: Cell Counting Kit-8 (CCK-8, Dojindo Molecular Technologies), zásobní suspenze viru (titr cca 10^6 PFU/mL), naftalenová čern.

Přístrojové vybavení: Spektrofotometr pro mikrotitrační destičky schopný měřit absorbanci při 450 nm a 590 nm.

Postup práce:

1. Výchozím materiálem je buněčná kultura získaná v předchozím úkolu. Z jamek odsajeme médium a nahradíme jej čerstvým médiem obsahujícím různě naředěný virus (např. desítkovou, pětikovou nebo dvojkovou řadou).
2. Infikované médium přeneseme do jamek s narostlou kulturou.
3. Kultivujeme několik dnů (obvykle dva až tři dny), dokud není na buňkách mikroskopicky pozorovatelný CPE.

4. Kvantifikace pomocí testovací soupravy CCK-8: odebereme médium a nahradíme ho čerstvým obsahujícím reagensii CCK-8 (ředěn 1:10). Buňky dále kultivujeme (1 – 2 h), všímáme si, že buňky produkují žluté barvivo. Měříme absorbanci při 450 nm.
5. Kvantifikace barvením naftalenovou černí: odebereme médium a destičku obarvíme naftalenovou černí (ponořením do vany s roztokem naftalenové černě, barvíme 45 min). Měříme absorbanci při 590 nm.

Vyhodnocení: Buňky s výrazně rozvinutým CPE budou charakteristické nízkými hodnotami absorbance, blízkými hodnotám absorbancí pozadí. Na druhé straně buňky bez CPE nebo s mírně rozvinutým CPE (a kontroly) budou poskytovat hodnoty vysoké (hodnota absorbance u kontrol by se měla pohybovat v rozmezí 1 – 2, kdy je závislost absorbance na ředění viru lineární). Hodnoty absorbancí lze přepočítat na % buněčné viability (životnosti), kterými popisujeme životaschopnost a metabolickou aktivitu testované buněčné kultury.

Téma 2. Stanovení titru viru

Titř viru se stanovuje dvěma metodami založenými na kultivaci viru v buněčné kultuře. První metoda je označována jako plaková titrace, pomocí níž vyjadřujeme titř v jednotkách PFU/mL („plaque forming units“), druhá metoda určuje titř jako hodnotu TCID₅₀/mL („median tissue culture infectious dose“). Oba termíny budou vysvětleny níže v textu.

Testovaným materiálem mohou být různé vzorky obsahující virus, např. živné médium, homogenáty tkání a orgánů, krev (sérum), mozkomíšní mok, sliny, mléko atd. Komplexnější matrice, jako jsou tkáně, musí být před analýzou důkladně homogenizovány (obvykle se připravuje 10 – 20% suspenze v PBS nebo živném médiu) a centrifugací zbaveny buněčného debrisu a jiných větších částic. Enzymy uvolněné z některých buněk, nejčastěji z hepatocytů, mohou inhibovat růst nebo narušovat strukturu hostitelských buněk, a proto musí být před analýzou vhodně naředěny. Také lipidy uvolněné při homogenizaci mozkové tkáně mohou ztěžovat pozorovatelnost plaků nebo CPE. Při analýze viru v krvi používáme krevní sérum získané aglutinací krevních buněk a jejich odstředěním. Odstředují se také vzorky mozkomíšního moku, mléka, atd. aby se zbavily větších částic, zejména aglomerátů tuků a proteinů.

Úkol 1. Stanovení titru viru plakovou titrací

Plaková titrace je klasická virologická kultivační technika, která se používá pro stanovení titru viru v nejrůznějších vzorcích. Je založena na kultivaci viru v buněčné kultuře a na schopnosti viru tvořit v kultuře plaky, tj. drobné léze či čiré lytické zóny, které se dají snadno a přesně kvantifikovat. K takovým virům patří např. vektorem přenášené flaviviry nebo herpetické viry.

Vlastní plaková titrace se provádí v mikrotitračních destičkách o různé velikosti jamek. Pro velmi přesné určení titru viru nebo v případě práce s viry tvořícími extrémně velké plaky se používají 6-jamkové mikrotitrační destičky. Ve většině případů však lze vystačit s 24-jamkovými destičkami. Pro analýzu velmi početných vzorků je možné metodu adaptovat na destičky s větším počtem jamek (48 nebo 96); takové jamky jsou ale rozměrově menší, a proto vhodné jen pro viry tvořící na hostitelských buňkách velmi malé plaky.

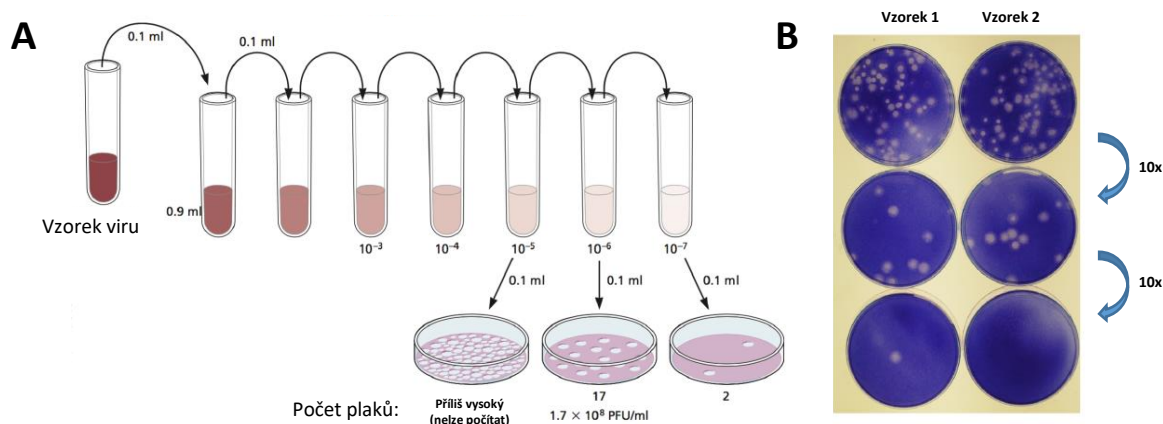
Vzorek se v jamkách destičky ředí nejčastěji desítkovou ředicí řadou. Smyslem je dosáhnout takového ředění viru, aby vzniklé plaky byly dobře viditelné a počitatelné. Při nízkých ředěních viru plaky splývají a nelze je kvantifikovat, naopak při vysokém ředění nezískáme žádné plaky. Některé viry nejsou pro plakovou titraci vhodné, protože netvoří v buněčné kultuře plaky. K takovým virům patří např. virus vztekliny. Pro kvantifikace těchto virů se používají např. molekulárně biologické metody založené na kvantifikaci virové nukleové kyseliny.

Hostitelské buňky se do jamek přidávají v podobě suspenze (cca 10⁴ až 10⁵ buněk/jamku). Buněčnou suspenzi získáme působením trypsinu na vhodně narostlou buněčnou kulturu. Je třeba dbát na to, aby byly buňky pokud možno pravidelně rozmístěné po celé ploše dna jamky a netvořily shluky. Jedině tak mohou vytvořit konfluentní monolayer, který umožňuje plaky kvantifikovat. Aby proběhla infekce, inkubujeme buňky společně se vzorkem viru 2-4 hodiny při 37 °C. Během tohoto časového intervalu dochází k adsorpci většiny virových částic na povrch hostitelských buněk a k jejich internalizaci.

Po inkubaci se přidává do každé jamky silně viskózní látka, nejčastěji karboxymethylcelulóza nebo agaróza s nízkým bodem tání („low melting agarose“). Výhodou karboxymethylcelulózy je, že zůstává tekutá a udržuje si požadovanou viskozitu při širokém rozsahu teplot, včetně laboratorní teploty a teploty potřebné ke kultivaci. Naopak low melting agaróza při snížení teploty pod 40 °C tuhne, proto vyžaduje rychlou manipulaci. Přídavek vysoce viskózního média zajistí, že pomnožené virové částice se nebudou uvolňovat do média, nebudou se v médiu difuzně šířit a infekce bude proto probíhat řízeným způsobem z buňky do buňky. Tím se docílí tvorby charakteristických plaků, tedy ohraničených lytických zón vznikajících pouze v místě infekce. V takovém případě jeden plak obsahuje viriony, které jsou potomstvem jedné infekční virové částice, a to za předpokladu, že buňka byla infikována právě jednou virovou částicí.

Infikované buněčné kultury v mikrotitračních destičkách se kultivují při 37 °C několik dní (obvykle 3 – 5 dní, někdy déle), dokud nejsou plaký dostatečně patrné mikroskopicky. K barvení buněk a k vizualizaci plaků se používají různá barviva, např. naftalenová černě nebo neutrální červeně.

Hodnoty titru viru získané plakovou titrací se vyjadřují jako PFU/mL. PFU (jednotky tvořící plaký, „Plaque Forming Units“) představují infekční virové částice schopné tvořit plaký. Získaná hodnota titru tedy není celkovým počtem virionů ve vzorku, nýbrž pouze počtem životaschopných virionů plně schopných infekce. Virové populace však běžně obsahují také určité procento neživotaschopných virových částic (např. defektní částice, částice bez enkapsulované nukleové kyseliny atd.). Takové virové částice nelze plakovou titrací prokázat. Schéma provedení plakové titrace je znázorněno na obr. 5.



Obrázek 5. Plaková titrace. (A) Schematické znázornění plakové titrace. (B) obarvená 6-jamková destička s viditelnými plaký. Virus byl ředěn desítkovou řadou shora dolů v duplikátu, barveno naftalenovou černí.

Materiál: Konfluentně narostlá buněčná kultura v kultivační lahvi, trypsin, živné médium, PBS, mikrotitrační destička (24 jamek), vzorek viru o neznámém titru, karboxymethylcelulóza, vana na barvení, fyziologický roztok (1.5 L), desinfekční roztok (cca 2 L), naftalenová černě (1.5 L).

Přístrojové vybavení: Biohazardní box s laminárním prouděním vzduchu

Postup práce:

A) Příprava buněčné suspenze

1. Vstupním materiálem je konfluentně narostlá kultura hostitelských buněk v kultivační lahvi. Pro přípravu buněčné suspenze slít médium, opatrně propláchnout PBS, odsát PBS a přidat 2 mL roztoku trypsinu. Trypsin vylejeme z lahve a přidáme znovu 2 mL trypsinu. Inkubace 10 – 15 min při 37 °C. Buněčná kultura se začne viditelně odlupovat. Odlupování buněk lze urychlit poklepáním na stěnu kultivační lahve.
2. Přidáme 4 mL média obsahujícího 3% bovinního fetálního séra. Sérum inaktivuje trypsin a jeho štěpná aktivita se zastaví. Pokud by enzymatické štěpení probíhalo příliš dlouho, narušil by se buněčný povrch, což by vedlo k úhynu buněk.
3. Pomocí pipety (5 nebo 10 mL) důkladně resuspendujeme buňky, aby tvořily homogenní suspenzi (10 – 30x nasajeme a vypustíme buněčnou suspenzi, zároveň suspenzi omýváme stěny kultivační lahve. Je možné kontrolovat mikroskopicky.
4. Odebereme 2 mL suspenze a přidáme 5.5 mL média. Nyní máme připravenou buněčnou suspenzi, kterou použijeme pro vlastní provedení plakové titrace. Buněčnou suspenzi uchovávat při 4 °C až do použití (chladem předcházíme vzájemné adhezi buněk).

B) Nanesení vzorku viru a buněčné suspenze do jamek mikrotitrační destičky a kultivace

1. Pro provedení plakové titrace použijeme 24-jamkovou titrační destičku. Do každé jamky nanese 180 µL růstového média.
2. Nanesení a ředění vzorku viru. Nanese 20 µL vzorku viru (médium nebo sérum obsahující virus o neznámém titru), jednotlivé vzorky nanášíme do jamek A1 až A6.
3. Vzorek ředíme desítkovou řadou tak, že z každé jamky v řadě A přeneseme 20 µL do jamek B, z jamek B přeneseme 20 µL do jamek C, z jamek C přeneseme 20 µL do jamek D. Z jamek řady D odebereme 20 µL a zlikvidujeme v desinfekci. Před každým odběrem měníme špičku pipety.
4. Nanesení buněčné suspenze. Připravenou buněčnou suspenzi uchovanou při 4 °C znovu důsledně promícháme, aby byla suspenze co nejvíce homogenní. Do každé jamky přidáme 300 µL takto připravené buněčné suspenze. Po přidávku buněčné suspenze rozmícháme buňky křížovým pohybem destičky, abychom dosáhli co nejrovnoměrnějšího rozložení buněk v jamce.
5. Takto připravenou destičku inkubujeme 2 – 4 h při 37 °C kvůli správnému proběhnutí infekce.
6. Připravíme směs karboxymethylcelulóza : růstové médium (2x konc.) v poměru 1:1.
7. Po ukončení inkubace nanese do každé jamky 400 µL směsi karboxymethylcelulózy s médiem a kultivujeme po dobu 5 dní při 37 °C. Po 5-denní kultivaci lze plaky pozorovat mikroskopicky.

C) Barvení

1. Připravíme cca 2 L desinfekčního roztoku (např. 0.5 % kyselina peroxiactová, persteril), ve vhodné nádobě, např. velké Erlenmeyerově baňce, kterou umístíme pod laminární box. Uzavřenou/zaškrcenou hadici barvicí vany zastrčíme do nádoby s desinfekcí.
2. Připravíme 1.5 L fyziologického roztoku (12.5 g NaCl rozpustit v 1.5 L destilované vody). Roztok nalijeme do barvicí vany umístěné v laminárním boxu.

3. Mikrotitrační destičku otevřeme a vložíme ji do barvicí vany s fyziologickým roztokem. Víčko je možno vložit také nebo jej ošetřit desinfekcí uvnitř laminárního boxu v samostatné nádobě. Pohybem destičky ve vaně pomocí delší pipety vymyjeme kultivační médium z jamek. Jamky musí být čiré, zbavené veškerého narůžověle zbarveného média. Fyziologický roztok vypustíme z barvicí vany do nádoby z desinfekcí uvolněním uzávěru hadice.
4. Znovu uzavřeme/zaškrtneme hadici barvicí vany, do které nyní nalijeme naftalenovou čerň. Je vhodné nalít roztok barviva až po horní okraj vany. Roztok naftalenové čerň je silně kyselý a je virucidní, proto vnitřní prostor vany je nyní prostý infekce. Barvíme 30 až 45 min.
5. Naftalenovou čerň vypustíme do připravené nádoby uvolněním uzávěru hadice. Barvivo je recyklovatelné. Vyjmeme destičku z barvicí vany a propláchneme ji pod tekoucí vodou, aby byly plaky zřetelně viditelné.

Vyhodnocení: Na obarvené destičce spočítáme plaky. Výpočet titru viru provádíme dle následujícího vztahu:

$$\text{Titř} = (1000/180) \cdot (\text{počet plaků}/\text{příslušné ředění}) \text{ [PFU/mL]}$$

(výraz $(1000/180 = 5,556)$ zahrnuje přepočet titru z původního vkládaného objemu 180 μL na objem 1 mL).

Stanovujeme-li titř viru, který byl získaný pomnožením na buněčné kultuře, titry zpravidla dosahují hodnot mezi 10^5 až 10^8 PFU/mL.

Příklad:

Pozorujeme 12 plaků při ředění viru 10^{-4} .

$$\text{Titř} = (1000/180) \cdot (12/10^{-4}) = 5,556 \cdot 120\,000 = 666\,720 \text{ PFU/mL} = \underline{\underline{6,7 \cdot 10^5 \text{ PFU/mL}}}$$

Úkol 2. Stanovení titru viru jako TCID₅₀/mL

Hodnota TCID₅₀ je definována jako ředění viru, které infikuje 50% testovaných inokulovaných jednotek (tj. např. jamek v 96-jamkovém panelu s narostlou buněčnou kulturou). Infekci buněčných kultur hodnotíme podle přítomnosti CPE. Výpočet přesné hodnoty TCID₅₀ lze provést různými matematickými algoritmy, např. Spearmanovou-Kärberovou metodou nebo Reedovou-Muenchovou metodou. Titř viru je vyjádřený jako TCID₅₀/mL. Metoda je použitelná zejména pro viry, které tvoří jasné a počítatelné plaky (a tedy plaková titrace není použitelná), avšak jejich replikace na buněčných kulturách vede k tvorbě CPE.

Materiál: Konfluentně narostlá buněčná kultura v kultivační lahvi, trypsin, živné médium, PBS, mikrotitrační destička (96 jamek), vzorek viru o neznámém titru.

Přístrojové vybavení: Biohazardní box s laminárním prouděním vzduchu

Postup práce:

1. Výchozím materiálem je buněčná kultura v 96-jamkovém panelu získaná v předchozím úkolu. Z jamek odsajeme médium a nahradíme jej čerstvým médiem obsahujícím naředěný virus. Virus ředíme desítkovou řadou od 10^{-1} do 10^{-8} . V řadě A na 96-jamkovém panelu bude virus ředěn 10^{-1} (v každé jamce v řadě A je výsledně 20 μ L zásobní virové suspenze + 180 μ L média; tento údaj (20 μ L) je důležitý pro výpočet TCID₅₀/mL).
2. Pokračujeme s ředěním dále do řad B až H tak, že přenášíme vždy 20 μ L infikovaného média z předchozí jamky do jamky následující. V řadě B bude tedy ředění viru 10^{-2} , v řadě C bude ředění viru 10^{-3} atd., až v řadě H bude virus ředěn 10^{-8} .
3. Jamky ve sloupcích 1 a 2 naplníme pouze neinfikovaným médiem, budou sloužit jako kontrola. Infikované médium tedy přidáme do jamek ve sloupcích 3 až 12.
4. Kultivujeme několik dnů (obvykle dva až tři dny) při 37 °C, dokud není na buňkách pozorovatelný CPE.
5. CPE hodnotíme a titr viru počítáme Reedovou-Muenchovou metodu dle návodu níže.

Vyhodnocení:

Ředění	Kontrola												% jamek s CPE
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
10^{-1} A	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	100%
10^{-2} B	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	100%
10^{-3} C	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	100%
10^{-4} D	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	100%
10^{-5} E	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	100%
10^{-6} F	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	80%
10^{-7} G	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	0%
10^{-8} H	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	0%

Obrázek 6. Příklad 96-jamkové destičky, u které byly symboly „+“ a „-“ znázorněno, ve kterých jamkách se vyskytuje CPE. Takto kvantifikovaný CPE v jamkách lze využít pro výpočet hodnoty TCID₅₀.

Ředění odpovídající 50% infekční dávce (ID₅₀, 50% „endpoint titer“) leží v případě znázorněném na obr. 6 někde mezi ředěním viru 10^{-6} (80% infekce) a 10^{-7} (0% infekce). Proporční vzdálenost (proportionate distance, PD) mezi těmito dvěma ředěními se vypočítá podle následující rovnice:

$$PD = \frac{\% \text{positive above } 50\% - 50\%}{\% \text{positive above } 50\% - \% \text{positive below } 50\%}$$

$$PD = (80-50)/(80-0) = 30/80 = 0,375$$

50% infekční dávku (ID₅₀) spočítáme podle vzorce:

$$\mathbf{50\% \text{ infekční dávka (ID}_{50}) = 10^{\log Z - (PD \times h)}}$$

h = logaritmus dilučního faktoru (zde h = 1, protože diluční faktor je 10)

Z = ředění viru, při kterém je % inokulovaných jednotek (= jamek mikrotitrační destičky) ovlivněných cytopatickým efektem nad 50% (zde $Z = 10^{-6}$, $\log Z = -6$)

$$\text{Pak ID}_{50} = 10^{-6 \cdot (0,375 \cdot 1)} = 10^{-6,375}.$$

Toto je tedy 50% infekční dávka, tzn. ředění viru, které infikuje 50% testovaných inokulovaných jednotek, tedy jamek na panelu. Reciproká hodnota z tohoto čísla je titr viru vyjádřená jako počet infekčních dávek na jednotku objemu. Jestliže byl původní objem inokula 0,02 mL, titr výchozí zásoby viru bude: $1/10^{-6,375} / 0,02 = \underline{\underline{1,19 \cdot 10^8 \text{ TCID}_{50}/\text{mL}}}$. Vzorek viru tedy obsahuje $1,19 \cdot 10^8$ TCID₅₀ dávek v jednom mililitru.

Dále je možno přepočítat hodnotu TCID₅₀/mL na PFU/mL. To provedeme vynásobením TCID₅₀/mL konstantou 0,7. Hodnota konstanty vychází z Poissonova rozložení počtu infekčních virových částic na počet infikovaných buněk při virové infekci. Předpokládá se, že u plně permissivní buněčné linie je 50% infekce dosaženo při multiplicitě infekce 0,7. Neplatí to samozřejmě vždy, ale je to dostačující aproximace vhodná pro většinu aplikací.

V našem případě by tedy hodnota $2,108 \cdot 10^5$ TCID₅₀/mL odpovídala titru $1,19 \cdot 10^8$ TCID₅₀/mL x 0,7 = **$8,3 \cdot 10^7$ PFU/mL**. Tedy mililitr zásobní suspenze viru by obsahoval $8,3 \cdot 10^7$ PFU.

3. IMUNOLOGICKÉ DIAGNOSTICKÉ METODY VE VIROLOGII

Imunologické metody patří mezi významné diagnostické metody virových onemocnění a hrají důležitou roli i v základním virologickém výzkumu. Jsou založeny na specifické interakci protilátky s virovou částicí nebo některou z jeho strukturních složek (např. s rekombinantně připraveným povrchovým antigenem). Imunologické metody mají v diagnostice dlouholetou tradici a obecně se používají dvojnásobem: (i) buď k přímému průkazu virové částice v klinickém vzorku (např. antigenní test na SARS-CoV-2) nebo (ii) k nepřímému průkazu protilátek vytvořených organismem při setkání s původcem onemocnění (např. některé typy ELISA nebo virus-neutralizační testy). Dříve hojně používané techniky na bázi aglutinačních a precipitačních testů jsou dnes nahrazovány vysoce citlivými imunoanalytickými metodami schopnými přesně kvantifikovat protilátky nebo antigeny ve vzorku. Tyto metody využívají enzymově (ELISA, „Enzyme-Linked Immunosorbent Assay“), fluorescenčně (FIA, „Fluoroimmunoassay“) nebo chemiluminiscenčně (CLIA, „Chemiluminescence Assay“) značené reagenty jako sondy poskytující kvantifikovatelný signál. Snaha o zrychlení a zlevnění těchto metod vedla k vývoji rychlých imunologických testů (dipstick technologie či tzv. „lateral-flow-immunoassays“ známé také jako antigenní testy) a k biosenzorům využívajících vysoce sofistikované fyzikálně-chemické přístupy pro převedení bioafinitní interakce protilátky s antigenem na snadno kvantifikovatelný elektrický signál.

Téma 1. Imunofluorescenční barvení

Imunofluorescenční barvení umožňuje přímou vizualizaci antigenu pomocí protilátky značené fluorescenční sondou. Technika se používá k detekci antigenů v buněčných kulturách, separovaných buňkách, tkáňových organoidech nebo histologických řezech.

Prvním krokem úspěšného imunofluorescenčního barvení je fixace buněčných struktur a permeabilizace membrán. Tyto kroky se provádějí pomocí (i) organických solventů (např. směsi acetonu a metanolu) nebo (ii) chemických síťovacích činidel (např. paraformaldehydu). Organické solventy většinou materiál současně fixují i permeabilizují. Při použití chemických síťovadel je třeba preparát navíc permeabilizovat vhodným detergentem (např. Tritonem X-100). Permeabilizace membrán je nezbytná pro průnik imunoreagentů a fluorescenčních barviv dovnitř buněčných struktur. Po fixaci/permeabilizaci se preparát vystaví účinku blokačních činidel (roztoky proteinů, krevní sérum atd.), aby se snížila pravděpodobnost vazby protilátek do nespecifických vazebných míst.

Studovaný antigen je následně rozpoznán specifickou (primární) protilátkou. V praxi používáme myší monoklonální protilátku, která specificky rozpoznává flavivirový povrchový protein E. Díky strukturní podobnosti proteinů E v rámci celé čeledi *Flaviviridae* je tato protilátka použitelná pro detekci většiny flavivirů. Pro vlastní detekci je použita sekundární protilátka, která rozpoznává Fc fragment protilátky primární a která je značena fluoroforem s definovaným excitačním a emisním maximem. Pro vizualizaci jednotlivých buněk v kultuře se používají barviva vázající se na buněčnou DNA, např. 4',6-diamidino-2-fenylindole (DAPI), nebo řada jiných barviv specificky rozpoznávajících různé buněčné struktury, vhodné také pro zobrazování označované jako „life cell imaging“. Tyto sondy musí mít odlišné emisní maximum od fluoroforu použitého k detekci sledovaného antigenu. Schematické znázornění

principu imunofluorescenčního barvení, včetně příkladu značené buněčné kultury, je zřejmé z obr. 7.

Rozlišujeme několik skupin fluoroforů, od konvenčních chemických (např. fluoresceinisothiokyanát, FITC) až po tzv. kvantové tečky (QDots, částice s definovaným excitačními a emisními maximy, obvykle s velmi úzkým emisním spektrem). Fluorescenčně aktivní látky podléhají excitaci absorpcí záření o určité vlnové délce. Excitované stavy jsou termodynamicky nestabilní. Přechod z excitovaných stavů do stavu základního je spojen s emisí záření o vyšší vlnové délce, než byla vlnová délka záření excitačního. Rozdíl mezi vlnovou délkou absorbovaného a emitovaného záření (obvykle 30-50 nm) se nazývá Stokesův posun. Přehled základních chemických fluoroforů, včetně excitačních a emisních maxim je uveden v Tabulce 1.

Detekce imunofluorescenčně značených antigenů se provádí pomocí fluorescenční nebo konfokální mikroskopie a vyžaduje zpravidla pokročilou analýzu obrazu pomocí specializovaných počítačových programů. Značení mnohočetných antigenů u studovaného preparátu pomocí fluoroforů s odlišnými ex/em maximy dovoluje kolokalizaci rozdílných struktur v buňkách nebo tkáních; takové techniky jsou dnes běžné nejen při diagnostice infekcí, ale také při studiu rakoviny nebo autoimunitních chorob.

Tabulka 1. Základní fluorofory používané pro imunofluorescenční barvení

Fluorofor	Excitace (nm)	Emise (nm)
Hydroxykumarin	325	386
Cascade blue	401	423
Pacific blue	403	455
Pacific Orange	403	551
Lucifer Yellow	425	528
R-Phytoerythrin (PE)	480, 565	578
PE-Cy5 conjugates	480, 565, 650	670
PE-Cy7 conjugates	480, 565, 743	767
Red 613	480, 565	613
Fluorescein	495	519
BODIPY	503	512
X-Rhodamine	570	576
Texas Red	589	615
Allophycocyanin	650	660

Úkol 1. Vizualizace virového antigenu pomocí fluorescenčního barvení

Roztoky:

Fixační roztok (aceton:methanol 1:1, vychlazený na -20°C)

Blokační roztok (9 mL PBS + 1 mL bovinního fetálního séra)

PBS 10x koncentrovaný, celkový objem 1 L (NaCl – 85 g, NaH₂PO₄ – 3.2 g, Na₂HPO₄ – 26.9 g)

PBS-T (2 L PBS + 1 mL Tween 20)

Primární protilátka (myší monoklonální protilátka (klon D1-4G2-4-15, ředění 1:250 v PBS-T) proti flavivirovému E proteinu (povrchový protein, “envelope”).

Sekundární protilátka (kozí polyklonální protilátka proti myšimu IgG, značená fluoresceinisothiokyanátem (FITC), ředění 1:500 v PBS-T)

4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI, ředění 1:2000 v PBS-T)

Médium pro tvorbu trvalých preparátů s indexem lomu blízkým indexu lomu skla (MOWIOL, DAPKO nebo jiný obdobný preparát).

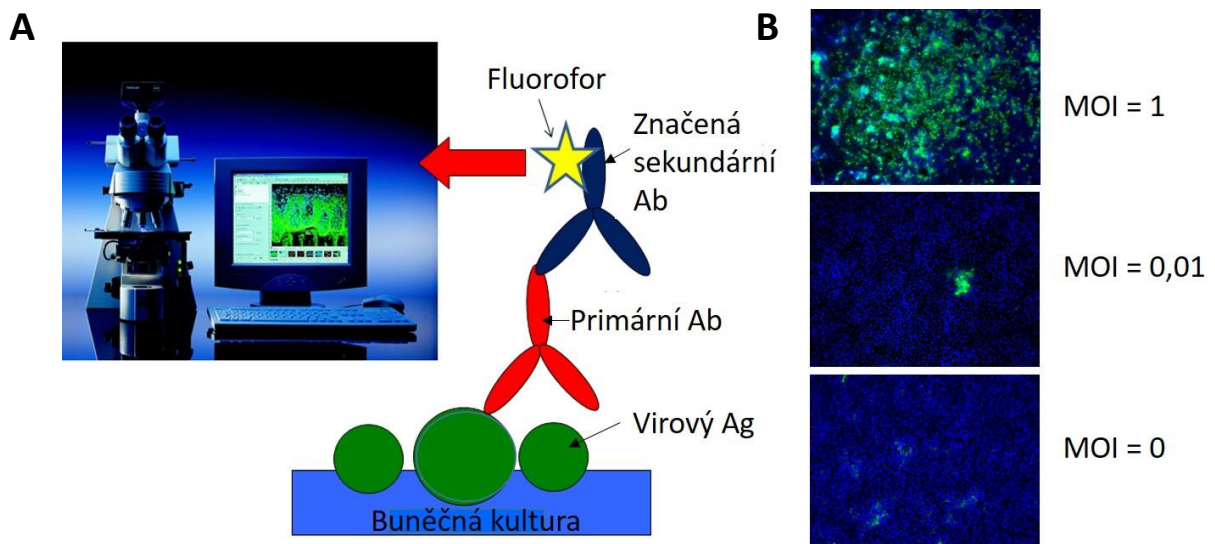
Další materiál: 96-jamková destička (nebo 8-jamková komůrka) s narostlou buněčnou kulturou (např. buněčná linie PS) infikovaná virem Langat.

Přístrojové vybavení: Biohazardní box s laminárním prouděním vzduchu, fluorescenční mikroskop (Olympus IX71)

Pracovní postup:

1. *Fixace.* Odsát živné médium ze všech jamek 96-jamkové destičky pomocí multikanálové pipety do dezinfekčního roztoku. Destičku ponořit do vaničky s vychlazeným fixačním roztokem. Inkubace 30 min při -20°C. Po té vyklepnout fixační roztok z jamek a nechat oschnout. Poznámka: K fixaci lze alternativně použít i 4% paraformaldehyd, po jehož aplikaci je třeba buněčnou kulturu permeabilizovat pomocí 0.5% Tritonu X-100. Permeabilizační krok v případě fixace aceton:methanolem odpadá.
2. *Blokace.* Do každé jamky nanést 100 µL blokačního roztoku, inkubace 30 min/37 °C.
3. *Promytí* destičky 1x v PBS-T.
4. *Navázání primární protilátky.* Po promytí nanést do každé jamky 50 µL primární protilátky (ředěno 1:250), inkubace 60 min/37 °C ve vlhké komůrce.
5. Obsah jamek vyklepnout do dezinfekčního roztoku, promytí destičky 3x v PBS-T.
6. *Navázání sekundární protilátky.* Do každé jamky nanést 50 µL sekundární protilátky (ředěno 1:500), inkubace 60 min/37 °C ve vlhké komůrce.
7. Obsah jamek vyklepnout do dezinfekčního roztoku, promytí destičky 3x v PBS-T.
8. *Značení buněčných jader pomocí DAPI.* Do každé jamky nanést 50 µL DAPI (1:2000), inkubace 30 min/37 °C ve vlhké komůrce.
9. Obsah jamek vyklepnout do dezinfekčního roztoku, promytí destičky 3x v PBS-T.
10. Pokud je barvení prováděno v **96-jamkové destičce**, pak do každé jamky nanést 10 µL PBS, prohlédnout pod fluorescenčním mikroskopem. Destičku je možno uchovávat při 4 °C ve tmě.
11. *Trvalý preparát.* Pokud je barvení prováděno v **8-jamkové komůrce**, pak po oschnutí sloupnout silikonový okraj, sklíčko otřít etanolem, připravit si krycí sklíčko. Do středu každé jamky aplikovat MOWIOL (polyvinylalkohol) nebo DABKO (1,4-diazobicyclo-2,2,2-oktan), obojí jsou s vodou mísitelná média na bázi pryskyřice s definovanými optickými vlastnostmi, cca 1 µL), přiložit krycí sklíčko, lehce přitlačit a zakápnout lakem. Preparát je možno uchovávat při 4 °C ve tmě.

Vyhodnocení: Preparát pozorujeme pomocí fluorescenčního mikroskopu. Všimáme si, že infikované buňky jsou zřetelně viditelné (vysoká intenzita fluorescence v oblasti vlnových délek pro zelenou barvu). Při vysokém MOI pozorujeme, že téměř všechny buňky poskytují výrazný fluorescenční signál. Při nižších MOI vidíme fluorescenci pouze u některých buněk, nebo pozorujeme tvorbu výrazných plaků (následek šíření viru procesem známým jako „cell-to-cell transmission“). Všechny buňky (jak infikované, tak bez infekce) mají výrazně viditelná jádra (dosaženo vazbou DAPI na jadernou DNA).



Obrázek 7. Imunofluorescenční barvení. (A) Princip barvení. (B) Imunofluorescenčně barvená buněčná kultura (buňky PS) infikovaná flavivirem při různých multiplicitách infekce (MOI). Na snímku je patrný virový antigen značený primární protilátkou specifickou proti flavivirovému proteinu E a sekundární protilátkou konjugovanou s FITC (zelená) a buněčná jádra (modrá) značená pomocí DAPI.

Téma 2. ELISA pro stanovení virus-specifických protilátek

ELISA („Enzyme-Linked Immunosorbent Assay“) patří v současnosti k nevíce používaným imunologickým metodám pro detekci mikrobiálních patogenů nebo patogen-specifických protilátek. Jako typická imunologická metoda je založena na detekci imunokomplexu, tedy komplexu protilátka-antigen. Vzniklý imunokomplex je imobilizován na pevném povrchu, což umožňuje imunokomplex účinně separovat od zbytku reakční směsi (promytím), který pak při následných interakcích neinterferuje a neovlivňuje výsledek analýzy. Imunokomplex je zachycen a detekován protilátkou značenou enzymem, který po přidavku vhodného substrátu generuje barevně odlišitelný produkt s definovaným absorpčním maximem, kvantifikovatelný kolorimetricky.

ELISA se běžně provádí v mikrotitračních destičkách, jejichž jamky (jejich dna a stěny) poskytují pevný povrch pro adsorpci imunoreagentů (antigenů nebo protilátek). Klasické 96-jamkové destičky mohou být konstruovány rovněž do podoby stripů (8-jamkových „proužků“), které umožňují provést analýzu pouze v omezeném počtu reakcí (obr. 8). Typická ELISA vyžaduje následující kroky: (i) adsorpce, (ii) promytí, (iii) blokace, (iv) opětovné promytí, (v) tvorba imunokomplexu, (vi) promytí, (vii) barvení a (viii) kolorimetrická kvantifikace analytu.



konvenční formát mikrotitrační destičky



stripový formát mikrotitrační destičky

Obrázek 8. Formáty mikrotitračních destiček pro ELISA techniky.

Adsorpce imunoreagentů se děje prostřednictvím nekovalentních interakcí s molekulami povrchu jamky; tato interakce vyžaduje specifické iontové prostředí (provádí se např. v roztoku uhličitanu sodného) a teplotní podmínky (4 °C, pokojová teplota, nebo 37 °C). Na povrch jamky se může sorbovat jak antigen (např. celý inaktivovaný virus nebo rekombinantní virový protein), tak protilátka (např. virus-specifická záchytná protilátka, „capture“).

Promýváním odstraníme (imuno)reagenty, které se neadsorbovaly na pevný povrch. Promývacími roztoky jsou zpravidla PBS (roztok fosforečnanu sodného), nebo PBS s přidavkem detergentů, např. Tween-20, které současně působí jako chemické blokační činidlo. Promývání může být usnadněno využitím promývacích zařízení, které celý proces urychlují a automatizují.

Blokaci se obsazují nespecifická vazebná místa v ELISA systému, jejichž potenciální interakce s protilátkami by mohly vést k falešně pozitivním/negativním výsledkům. Typickým blokačním činidlem je fetální bovinní sérum, nebo roztoky proteinů, např. albuminu či kaseinu.

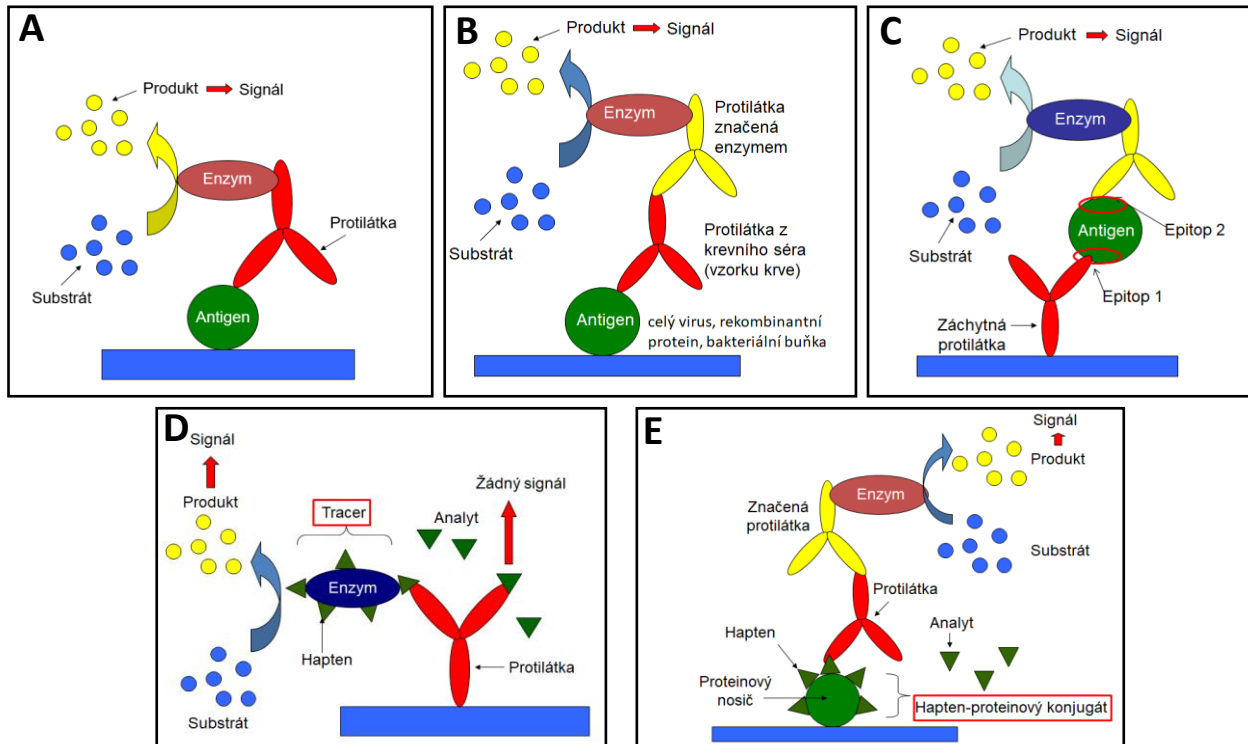
Tvorba imunokomplexu je stěžejní a nejdůležitější fází této metody. V závislosti na typu adsorbovaného proteinu rozlišujeme dva základní typy ELISA systémů, které se běžně používají v mikrobiální diagnostice. (i) Je-li na pevný povrch adsorbována protilátka, hovoříme o tzv. primární nebo záchytné protilátce, „capture“ která specificky rozpoznává a váže stanovovaný antigen. Antigenem jsou v tomto případě nejčastěji celé virové částice, vyskytující se ve vzorku tělní tekutiny (např. slin, sputa, krve, hnisu, hlenu nebo moči) vyšetřovaného jedince. Antigen zachycený protilátkou (imunokomplex) je následně detekován sekundární nebo detekční protilátkou značenou enzymem („detection“). Takové uspořádání systému ELISA se označuje jako „sandwich“ (protilátka-antigen-protilátka) a slouží k přímé diagnostice patogenů ve vzorku. Ve virologii se používá např. pro diagnostiku herpetických virů získaných stěrem z herpetických kožních nebo slizničních lézí nebo SARS-CoV-2 ze sputa získaného výtěrem dýchacích cest. (ii) Je-li na pevný povrch adsorbován antigen, využívá se takový ELISA systém k průkazu patogen-specifických protilátek. Vzorkem je pak nejčastěji krev/sérum jedince obsahující protilátky proti danému patogennímu organismu. Protilátka navázaná na imobilizovaný antigen (imunokomplex) je následně detekována detekční protilátkou značenou enzymem. Tato detekční protilátka je specifická nejčastěji proti Fc fragmentu druhově specifických imunoglobulinů dané třídy. Běžně jsou k dispozici ELISA systémy schopny rozlišit imunoglobuliny třídy IgM od IgG a rozpoznat tak akutní infekci (pro kterou je markerem IgM) od proběhlé infekce nebo vakcinace (markerem je IgG). Takové uspořádání systému ELISA se týká zejména testů pro průkaz protilátek proti viru klíšťové encefalitidy, HIV-1/2 nebo virů žloutenky typu B a C.

Systémy založené na antigenech proteinové povahy nebo celých virových částicích, případně buňkách, se označují jako nekompetitivní ELISA systémy. Naopak systémy pro detekci malých molekul (např. antibiotik, polutantů, nízkomolekulárních klinických markerů atd.) se označují jako kompetitivní. V kompetitivních systémech soutěží (kompetuje) o vazebné místo protilátky analyt (tj. organická molekula) s komplexem analyt-nosičový protein nebo komplexem analyt-enzym. Koncentrační převaha jednoho kompetitora vede vytěsnění druhého z vazebných míst protilátek. Pozn. vzhledem k tomu, že malé molekuly nejsou samy o sobě imunogenní, protilátky proti nim se získávají imunizací experimentálních zvířat imunogeny složenými s nosičového proteinu a kovalentně navázané molekuly analytu. Molekula analytu navázaná na nosič se označuje jako neúplný imunogen, neboli haptén. Přehled nejrůznějších typů ELISA systémů je znázorněn na obr. 9.

Detekční protilátky bývají nejčastěji značeny dvojitým typem enzymů. První (časnější) typ je křenová peroxidáza. Jako substrát využívá tertramethylbenzidin, který se mění za katalytického působení peroxidu vodíku na modrou diiminovou formu, která se po okyselení protonuje a mění na žlutý produkt (absorpční maximum 450 nm). Druhým typem je alkalická fosfatáza, která jako substrát využívá *p*-nitrofenylfosfát, který defosforyluje na žlutý *p*-nitrofenol (absorpční maximum 405 nm).

Historicky ELISA navazuje na starší metodický přístup označovaný jako radioimunoanalýza (RIA), která místo enzymem značených imunoreagentů využívá imunoreagenty značené radioaktivním izotopem. RIA se dodnes používá jako diagnostická metoda pro lékařské účely,

její výhodou je zejména vysoká citlivost, často vyšší než obvyklé ELISA systémy. Záměnou enzymu za fluorescentní nebo chemiluminiscentní značku získáme typ imunoanalýzy označovaný jako FIA nebo CLIA. Podstatou i uspořádáním jsou si všechny typy imunoanalýzy velmi podobné.



Obrázek 9. Různé typy uspořádání ELISA systémů. Nahoře: nekompetitivní formáty. (A) přímá nekompetitivní ELISA, (B) nepřímá nekompetitivní ELISA pro sérologické stanovení protilátek, (C) „sandwich“ nekompetitivní ELISA pro přímé stanovení patogenního agens. Dole: kompetitivní formáty pro stanovení nízkomolekulárních antigenů. (D) přímá kompetitivní ELISA, (E) nepřímá kompetitivní ELISA.

Úkol 1. Stanovení protilátek proti viru klíšťové encefalitidy z lidského séra

Vzhledem k tomu, že tento ELISA systém detekuje pouze protilátky třídy IgG, je tato metoda vhodná pro zjištění titru protilátek proti viru klíšťové encefalitidy u jedinců po očkování nebo po prodělané infekci. Namísto detekční protilátky je v tomto případě použit konjugát proteinu G s křenovou peroxidázou. Protein G byl izolován z bakterií rodu *Streptococcus* a váže se na Fc region imunoglobulinů třídy IgG většiny druhů. Proto je test možno použít i na detekci protilátek u jiných savců než pouze u člověka (např. u myši, přežvýkavců atd.).

Materiál a přístrojové vybavení: souprava ELISA (Immunozyt FSME IgG All Species, Progen), vyšetřovaná séra, multikanálová pipeta (na promývání destiček), spektrofotometr

Souprava obsahuje následující komponenty:

- 12 ELISA stripů (8-jamkových proužků) s adherovaným inaktivovaným virem klíšťové encefalitidy

- promývací roztok (10x), 0.1 M Tris/HCl pH 7.4 obsahující detergent a konzervant. Před použitím naředit 10x (270 mL destilované vody + 30 mL promývacího roztoku, naředěný promývací roztok označujeme jako pracovní roztok)
- kalibrační séra CAL 1 – 5 obsahující naředěné lidské sérum pozitivní na protilátky proti viru klíšťové encefalitidy, před použitím naředit 10 µL kalibračních sér + 500 µL pracovního roztoku. Kalibrační séra mají determinovanou hodnotu virus-specifických protilátek určenou v tzv. vídeňských jednotkách (VIEU/mL; Vienna Units, podle Prof. Ch. Kunze, Vídeň)
- pozitivní kontrolní séra POS LL a POS HL (LL, low level; HL, high level), před použitím naředit 10 µL kalibračních sér + 500 µL pracovního roztoku
- testovaná séra, před použitím naředit 10 µL testovaných sér + 500 µL pracovního roztoku
- konjugát protein G-peroxidáza, před použitím naředit 1 + 100, např. pro 8 jamek smíchat 20 µL konjugátu a 2000 µL 10x naředěného promývacího roztoku
- substrát: tetramethylbenzidin, TMB
- zastavovací roztok („stop solution“): 0.5 M kyselina sírová

Postup práce:

1. Do jamek nanést 200 µL naředěných kalibračních sér CAL 1- 5, dále 200 µL naředěných kontrolních sér POS LL a POS HL a 200 µL naředěných testovaných sér.
2. Inkubace 60 min při pokojové teplotě
3. Promytí 3 x 200 µL pracovním roztokem
4. Do jamek nanést 200 µL naředěného konjugátu (protein G-peroxidáza)
5. Inkubace 60 min při pokojové teplotě
6. Promytí 3 x 200 µL pracovním roztokem
7. Do jamek nanést 200 µL roztoku substrátu
8. Inkubace 30 min při pokojové teplotě
9. Do jamek nanést 50 µL zastavovacího roztoku
10. Měření absorbance při 450 nm, absorbanci je vhodné měřit do 10 min po zastavení reakce.
11. Z hodnot absorbancí kalibračních sér CAL 1 – 5 sestrojít kalibrační křivku.
12. Evaluace výsledků testovaných sér podle kalibrační křivky.

- Poznámky:**
1. Hodnota absorbance CAL 1 by neměla přesáhnout 0.5.
 2. Absorbance nejvyššího kalibrátoru (CAL 5) by měla být vyšší než 1.
 3. Rozdíl hodnot absorbancí CAL 5 a CAL 1 by měla být alespoň 1.0.
 4. Vzorky, které vykazují absorbanci větší než 5 by měly být naředěny 1:1 pracovním roztokem.

Vyhodnocení: Výsledky lze interpretovat podle následující tabulky:

<63 VIEU/mL	negativní
63-126 VIEU/mL	hraniční
>126 VIEU/mL	pozitivní

Téma 3. Rychlý imunologický test na přítomnost protilátek proti SARS-CoV-2

Vývoj diagnostických testů je směřován k neustálému zjednodušování a zrychlování. Klasické ELISA techniky jsou zdlouhavé (většinou trvají 2 až 4 hodiny, pokud je třeba sorbovat mikrotitrační destičku antigenem/protilátkou (tzv. „coating“), pak se inkubace provádí zpravidla přes noc) a vyžadují komplikovanější laboratorní vybavení, včetně spektrofotometru nebo promývačky mikrotitračních destiček. Takové vybavení není k dispozici v terénních podmínkách nebo v ordinacích praktických lékařů. Tato omezení řeší rychlé imunologické testy, označované také jako „lateral flow immunochromatographic assays“ nebo „dipstick assays“, které jsou založeny na principu ELISA (tvorba imunokomplexu antigen-protilátka a jeho vizualizace), využívají však jiné materiály a většinou pouze okometrický způsob detekce signálu. Jsou proto dobře využitelné v terénních podmínkách jako např. rychlé antigenní testy pro průkaz protilátek proti SARS-CoV-2, testy HIV v zemích třetího světa, diagnostické testy pro určení hemoglobinu, proteinů, glukózy a dalších markerů v moči, determinace různých chemických faktorů, např. kontaminant v potravinách a polutantů v životním prostředí. Tyto testy jsou rychle proveditelné (provedení v řádu minut, nikoli hodin), k jejich vyhotovení není třeba školený personál ani přístrojové či jiné laboratorní vybavení a bývají levnější s porovnání s klasickými ELISA systémy. K nevýhodám rychlých imunologických testů patří nižší citlivost a větší spotřeba imunoreagentů při konstrukci testu. Většina dostupných testů je kvalitativní, pouze některé umožňují semikvantitativní detekci signálu. Pro semikvantitativní detekci je však třeba speciálních zařízení (adaptovaných spektrofotometrů), která techniku prodražují a omezují její využití v terénních podmínkách.

Rychlé imunologické testy jsou tvořeny porézním nosičem, např. filtračním papírem nebo nitrocelulózovou membránou, který má vhodné kapilární vlastnosti (umožňuje vztlínání kapaliny pomocí kapilárních sil) a dovoluje adsorpci klíčových imunoreagentů. Porézní nosič je charakterizován specifickou velikostí pórů (μm), porozitou (%), objem vzduchu v membráně; porozita je označována také jako „bed volume“ a odpovídá množství kapaliny v membráně, při vytěsnění vzduchu kapalinou), tloušťkou (μm) a chemickým složením (ovlivňuje množství navázaných proteinů a hydrofobicitu nosiče). Nanesení imunoreagentů na porézní nosič se provádí pomocí dispenzního zařízení.

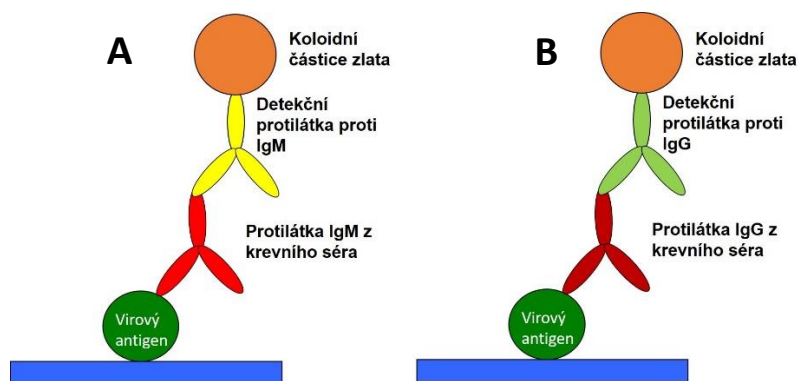
Při uspořádání, které je analogické nepřímé ELISA, je na porézní nosič navázán antigen (např. virový protein). Při nanesení kapky krve/séra/plasmy dojde k navázání protilátek na imobilizovaný antigen (tvorba imunokomplexu). Na vzniklý imunokomplex se následně váže sekundární protilátka značená nejčastěji nanočásticemi kovu (např. zlata). Akumulace nanočástic v místě tvořícího se imunokomplexu vede ke vzniku proužku viditelného pouhým okem (testovací proužek „T“). Kontrolní proužek „C“, který slouží jako průkaz, že test proběhl technicky správně, vzniká v místě, kde je na porézní nosič navázána např. nespecifická protilátka proti lidským imunoglobulinům, nebo protilátka proti některé bílkovině přítomné v lidské krvi (např. albuminu), která je pak detekována příslušnou značenou sekundární protilátkou. Příslušné imunoreagenty se dostanou do vzájemného kontaktu tak, že jsou unášeny kapalinou vztlínající porézním nosičem. Toto uspořádání se využívá ve virologii pro sérologická stanovení protilátek akutní (IgM) nebo již proběhlé (IgG) infekce nebo vakcinace.

Dalším typem uspořádání je „sandwich“, které využívá imobilizovanou protilátku proti detekovanému antigenu (primární protilátka), antigen se nachází v testovaném vzorku a je detekován protilátkou značenou částicemi kovu. Toto uspořádání se používá pro přímou

diagnostiku některých virů a bývá také využíváno pro rychlou diagnostiku klinicky významných proteinových markerů (proteiny v moči, CRP v krvi atd.).

Úkol 1. Stanovení protilátek proti SARS-CoV-2 rychlým imunologickým testem

Tento test se liší od klasického antigenního testu na stanovení přítomnosti viru SARS-CoV-2 tím, že namísto přímé detekce viru provádíme nepřímou (sérologickou) diagnostiku protilátek specifických proti tomuto viru (obr. 10). Testovací soupravu, kterou pro stanovení používáme, obsahuje dva druhy testovacích proužků, jeden slouží pro detekci imunoglobulinů třídy IgM a druhý pro IgG. Někteří výrobci používají i proužky pro simultánní stanovení protilátek obou tříd; takové testy se obvykle liší v uspořádání imobilizovaných a detekčních imunoreagentů od systému, který používáme v praxi.



Obrázek 10. Uspořádání imunoreagentů na rychlém imunologickém testu pro detekci protilátek proti SARS-CoV-2 (Kit COVID-19 IgG + IgM Duo (RapiGEN), který používáme v praxi). (A) Formát pro detekci protilátek třídy IgM. (B) Formát pro detekci protilátek třídy IgG. Obě reakce probíhají na oddělených proužcích a pro každou z nich je zapotřebí nový vzorek krve.

Materiál: Rychlý imunologický test COVID-19 IgG + IgM Duo (RapiGEN)

Souprava obsahuje následující komponenty:

- Obalová fólie s desikantem
- Lahvička s nanášecím roztokem (assay diluent)
- Kapilární pipeta
- Sterilní lanceta pro odběr kapky krve z prstu
- Instrukční leták
- Testovací proužek s imobilizovaným rekombinantním virovým antigenem (test je neinfekční) a nanesenou sekundární protilátkou (anti-IgG a anti-IgM) konjugovanou s koloidním zlatem

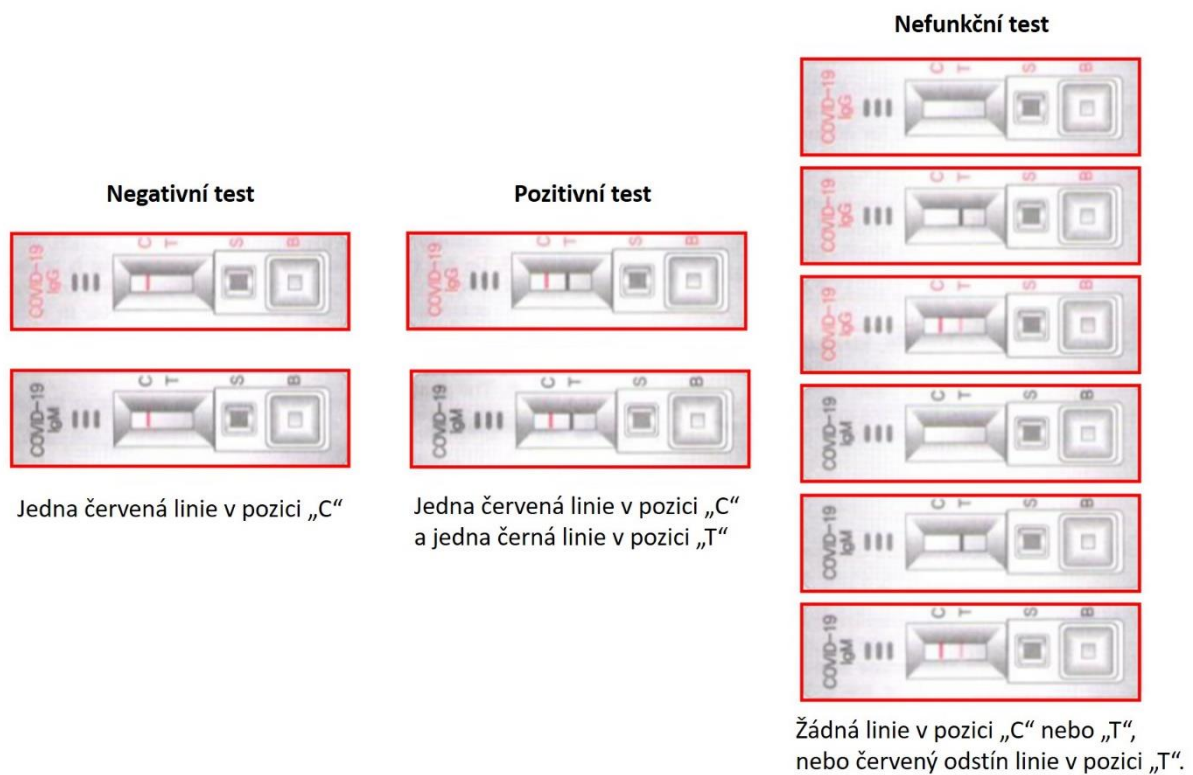
Pracovní postup:

1. Před použitím vytemperovat komponenty testovací soupravy na pokojovou teplotu.
2. Vyjmout testovací proužek z ochranné fólie a umístit jej na rovný a suchý povrch.
3. Pomocí kapilární pipety nebo klasické pipety přidat 10 μ L séra/plazmy nebo 20 μ L krve do jamky označené „S“ (sample). Pro odběr kapky krve z prstu použít sterilní lancetu a místo odběru před vpichem vydesinfikovat alkoholovým roztokem.

4. Přidat 3 kapky nanášecího roztoku do jamky označené „B“ (buffer). Je třeba nanést přesný objem, větší či menší objem může vést ke zkresleným výsledkům.
5. Výsledek testu vyhodnotíme za 5 – 10 min (interpretace výsledků po více jak 10 min může vést ke zkresleným výsledkům).

Vyhodnocení:

- Negativní výsledek je charakterizován pouze jedním červeným pruhem v kontrolní linii „C“.
- Pozitivní výsledek (pro IgG nebo IgM) je charakterizován červeným pruhem v kontrolní linii „C“ a tmavým pruhem v testovací linii „T“.
- Technicky nesprávně provedený test je charakterizován buď absencí pruhu v kontrolní linii „C“ nebo přítomností červeného pruhu v testovací linii „T“.
- Možné situace jsou patrné z obr. 11.



Obrázek 11. Pozitivní, negativní a nefunkční rychlý imunologický test pro detekci sérových protilátek IgM a IgG proti SARS-CoV-2.

Téma 4. Virus-neutralizační test

Virus neutralizační test je metoda, která se v diagnostice používá pro stanovení přítomnosti virus-neutralizačních protilátek v krvi nebo jiných tělních tekutinách vyšetřované osoby. Na rozdíl od ostatních metod diagnostikujících přítomnost protilátek (např. ELISA) stanovuje tento test výhradně protilátky, které jsou schopny neutralizovat, tedy inaktivovat virus. Je třeba si uvědomit, že ne všechny protilátky interagující s virovou částicí musí mít nutně neutralizační účinky. Řada z nich může rozpoznávat virus, ale vázat se do míst, která nejsou klíčová pro interakci viru s hostitelskou buňkou. Takové protilátky, i když jsou na virovou částici navázány, neovlivní schopnost viru infikovat hostitelskou buňku. Jsou známy i protilátky, které virulenci dokonce posilují; jedná se většinou o protilátky vytvořené proti viru jednoho sérotypu a interagující s virem jiného sérotypu (pozorováno u viru Dengue a jev je označován jako tzv. „antibody-dependent enhancement effect“, ADE efekt). Zatímco většina rutinně používaných imunologických diagnostických metod nedokáže takové protilátky rozlišit, virus-neutralizační test je pro kvantifikaci neutralizačních protilátek vynikající pomůckou. Jeho nevýhoda je však (i) časová náročnost (je to kultivační metoda vyžadující často několikadenní inkubaci) a (ii) nutnost disponovat laboratořemi s BLS2 režimem a vyšším (v závislosti na použitém viru), což je v současné době možné pouze pro specializovaná zdravotnická nebo výzkumná pracoviště. (iii) Test je možno použít zejména v případě virů, které na hostitelské kultuře vytváří zřetelný CPE. U virů, které CPE netvoří, je použití testu problematické.

Klíčové kroky virus-neutralizačního testu spočívají v inkubaci viru s testovaným sérem, kultivaci takto ošetřeného viru v buněčné kultuře a odečtení virem indukovaného CPE. Jsou-li v séru přítomny neutralizační protilátky, vážou se na virus a inhibují jeho schopnost infikovat buňky, a CPE se netvoří (nebo se tvoří v menším rozsahu proti pozitivní kontrole – záleží na titru neutralizačních protilátek ve vzorku). V opačném případě není virus protilátkou ovlivněn (není neutralizován) a CPE je dobře viditelný. Vznik CPE lze odčítat mikroskopicky, nebo je možno buněčnou kulturu obarvit kontrastním barvivem (naftalenová čerň, krystalová violet). Každé testované sérum se analyzuje v několika ředěních, aby se co nejpřesněji určil titr protilátek. Titr protilátek ve vzorku se pak udává v jednotkách ředění, např. 1:80, 1:160, 1:320 atd.

Úkol 1. Stanovení neutralizačních protilátek proti klíšťaty přenášenému flaviviru

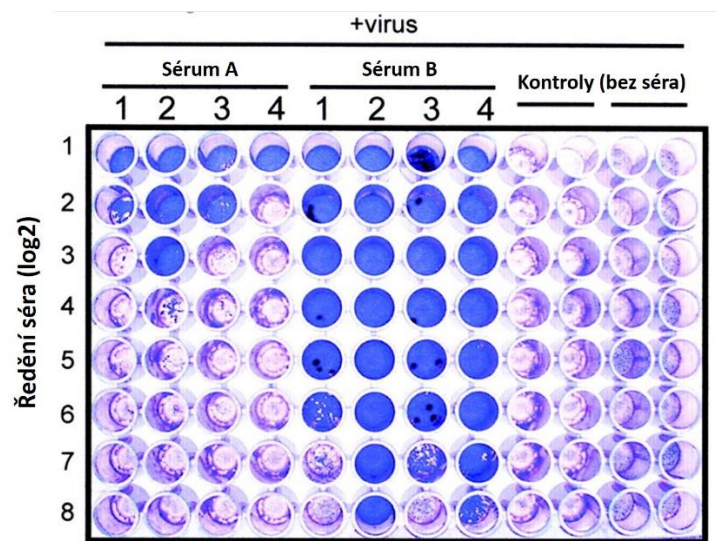
Materiál: Lidská séra od různých dárců, zásobní suspenze flaviviru (titr 10^6 PFU /mL), hostitelské buňky (např. PS nebo A549), médium L15, mikrotitrační destička (96-jamek).

Postup práce:

1. Vzorek séra je nutno nejprve naředit 5x (40 μ L séra + 160 μ L média L15)
2. Inaktivace vzorku při 56 °C 30 min. Tím inaktivujeme potenciální patogeny v séru, včetně inaktivace komplementu.
3. Do 96-jamkové mikrotitrační destičky nanese 50 μ L média a do první vodorovné řady jamek (řada A) přidáme 50 μ L naředěného inaktivovaného vzorku. Výsledné ředění vzorku je tedy 10x. Každé analyzované sérum nanášíme minimálně v duplikátu.
4. Provedeme naředění každého séra na hodnoty ředění 20x, 40x, 80x, 160x, 320x a 640x přenášením vždy 50 μ L vzorku do níže ležících jamek.
5. Do každé jamky je přidán virus na výsledný titr 1000 PFU/mL (tedy 50 PFU/jamku).

6. Jako kontroly použijeme médium obsahující pouze virus (bez séra) a prázdné médium (bez séra i bez viru).
7. Inkubace 90 min při 37 °C.
8. Přidat buněčnou suspenzi PS buněk ($3 \cdot 10^4$ buněk na jamku), přidávaný objem je 100 μL .
9. Inkubace 4 dny (i více), průběžně kontrolujeme, zda se objevuje CPE.
10. Míru tvorby CPE hodnotíme okometricky, obarvením (kolorimetricky) či imunofluorescenčním barvením.

Vyhodnocení: V jamkách s buňkami pozorujeme tvorbu CPE. Buněčné monolayery, které vykazují tvorbu CPE, hodnotíme jako pozitivní. Titr protilátek ve vzorku se pak udává v jednotkách ředění, např. 1:80, 1:160, 1:320 atd. Příklad provedení virus-neutralizačního testu je patrný z obr. 12.



Obrázek 12. Provedení virus-neutralizačního testu v 96-jamkové mikrotitrační destičce. Test byl proveden v přítomnosti slabě neutralizačního séra (Sérum A), silně neutralizačního séra (Sérum B) a bez přítomnosti sér (kontroly). Barveno krystalovou violetí.

4. MOLEKULÁRNĚ-BIOLOGICKÉ METODY V DIAGNOSTICE VIROVÝCH INFEKČÍ

Molekulárně-biologické metody hrají v soudobé mikrobiální diagnostice klíčovou roli, a to zejména díky své univerzálnosti a možnosti využití pro širokou škálu diagnostických aplikací. Tyto metody patří mezi tzv. přímé diagnostické metody, protože detekují genomovou nukleovou kyselinu (resp. specifickou sekvenci) patogenu (viru) v klinickém vzorku. Nejrozsáhlejší skupinu molekulárně-biologických metod tvoří metody založené na amplifikaci templátové nukleové kyseliny, tedy na polymerázové řetězové reakci (PCR). Molekulárně-biologické metody zahrnují i techniky spojené se separací PCR produktů (tj. elektroforetické techniky) a s jejich purifikací. Pro detailní identifikaci a typizaci izolátů a dále pro mutační analýzu se využívají sekvenační techniky. Molekulárně-biologické metody jsou nezbytné nejen v diagnostice, nýbrž i v základním výzkumu, kde umožňují provádět rozmanité zásahy do studovaných genů/genomů s cílem studovat strukturu a funkci genů a jimi kódovaných proteinů.

Téma 1. PCR pro průkaz viru klíšťové encefalitidy ve vzorcích klíšťat

PCR je založena na cyklicky se opakující enzymové syntéze nových řetězců vybraných úseků dsDNA ve směru 5' → 3' prostřednictvím DNA polymerázy. Studovaný úsek je vymezen připojením dvou primerů, které se vážou na protilehlé řetězce tak, že jejich 3'-konce směřují proti sobě. Syntéza řetězců probíhá pomocí polymeračního účinku termostabilní polymerázy z termofilních organismů, např. Taq DNA polymeráza z *Thermus aquaticus*, odolávající teplotám, při nichž DNA denaturuje.

Během PCR se cyklicky střídají následující kroky:

1. denaturace dsDNA (94 °C)
2. připojení primerů k odděleným řetězcům (30 – 65 °C)
3. syntéza nových řetězců DNA pomocí DNA-polymerázy (65 – 75 °C)

Reakce probíhá v zařízení označovaném jako termocykler, které umožňuje automatickou změnu teplot v naprogramovaných časových intervalech. Postupným opakováním procesu se exponenciálně (2^n , n = počet cyklů) vytvoří až miliarda kopií DNA.

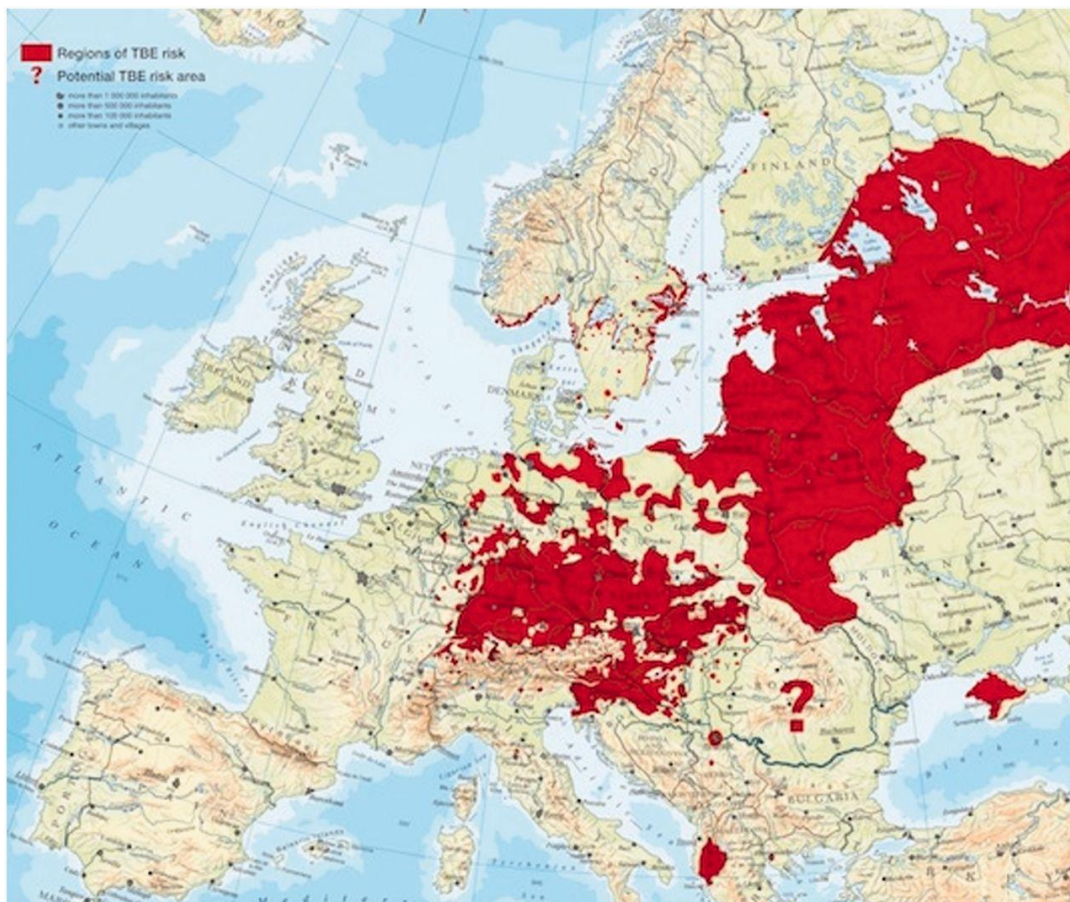
Navrhované primery musí splňovat následující kritéria: (i) musí se jednat o jedinečné sekvence, schopné vázat se specificky jen k jednomu místu templátu, na matricové DNA nesmí být nespecifická vazebná místa, (ii) délka zpravidla 18 – 25 nukleotidů, (iii) obsah G+C 40 až 60%, (iv) rovnoměrná distribuce oblastí bohatých na G/C a A/T páry, (v) teplota T_m primeru alespoň 50 °C, podobná u obou primerů, (vi) absence komplementárních sekvencí v primerech, které by vedly k duplexům, (vii) absence vnitřních sekundárních struktur (vlásenek), (viii) zařazení 1 až 2 zbytků G nebo C v sekvenci na 3'-koncích primerů pro zajištění přesné vazby na templát (G-C vazba je tvořena třemi vodíkovými můstky oproti A-T vazbě, kterou tvoří pouze dvě vodíkové vazby).

Pro viry, jejichž genomem je RNA, se nejprve provádí reverzní transkripce, což je přepis genetické informace z RNA do cDNA („complementary DNA“) pomocí rozličných reverzních transkriptáz (např. retrovirových). Vzniklá cDNA se pak následně amplifikuje běžnou PCR za vzniku dsDNA ampliconů.

Vzniklé amplikony se separují pomocí gelové elektroforézy (pohyb záporně nabitě DNA směrem ke kladně nabitě elektrodě, anodě). PCR amplikony jsou v gelu vizualizovány fluorescenčními barvivy interkalujícími mezi řetězce nebo jinak interagující s dsDNA (např. ethidium bromid nebo modernější barviva typu „Simply Safe“ atd.).

Pro diagnostiku klíšťové encefalitidy u člověka není PCR vhodnou metodou. Virus klíšťové encefalitidy se nachází ve fázi virémie, tedy ve fázi, kdy je virus přítomný v krvi pacienta, pouze po omezenou dobu na počátku infekce. V této fázi však má pacient pouze nespecifické nebo žádné symptomy infekce a často ani nevyhledá lékařskou péči. Krátce po viremické fázi je virus translokován do buněk centrálního nervového systému, kde přirozeně není běžnými metodami detekovatelný (možné jsou pouze odběry nervové tkáně *post mortem*).

PCR se však s výhodou využívá pro epidemiologické studie viru klíšťové encefalitidy v klíšťatech. Incidence virem infikovaných klíšťat v různých biotopech i regionech pak pomáhá predikovat riziko přenosu viru na člověka. Metoda je tedy extrémně důležitá při sledování epidemiologie nákazy a při studiu interakcí virus-vektor-hostitel (obr. 13).



Obrázek 13. Výskyt klíšťové encefalitidy v Evropě (zdroj Pfizer, 2016).

Úkol 1. Izolace RNA viru klíšťové encefalitidy z klíšťat

RNA bude z klíšťat izolována pomocí chromatografických kolonek využívajících elektrostatických interakcí virové RNA s náplní kolonky.

Materiál: QIA Viral RNA kit (QIAGEN), platová nebo skleněná tyčinka pro rozdrcení klíšťat, vhodné zkumavky, vzorky klíšťat nasbíraných v různých lokalitách.

Přístrojové vybavení: centrifuga, spektrofotometr (NanoDrop)

Postup práce:

A) Příprava roztoků z koncentrátů v testovací soupravě:

AW1 (promývací roztok 1): 19 mL koncentrátu + 25 mL etanolu, celkem 44 mL

AW2 (promývací roztok 2): 13 mL koncentrátu + 30 mL etanolu, celkem 43 mL

Nosičová („carrier“) RNA: 310 μ L AVE pufru k 310 μ g lyofilizátu carrier RNA (rozdělit po alikvotech, skladovat při -20 °C, alikvoty rozmrazovat max. třikrát).

B) Vlastní izolace virové RNA z klíšťat

1. Klíšťata rozdrtíme skleněnou nebo plastovou tyčinkou ve vhodné zkumavce. Používáme cca 5 jedinců na vzorek.
2. K rozdrceným klíšťatům přidáme 140 μ L PBS a důsledně resuspendujeme.
3. Pro izolaci RNA použijeme QIA Viral RNA kit (QIAGEN).
4. Vzorky klíšťat centrifugujeme při 4 000 rpm / 5 min.
5. Do zkumavky přidáme:
 - 600 μ L roztoku AVL (lyzační roztok),
 - 6 μ L carrier RNA (připravené alikvoty -20°C),
 - 140 μ L vzorku klíšťat,
 - Promícháme, ponecháme 10 min při RT.
 - Přidáme 600 μ L etanolu.
 - Vortexujeme 15 s.
6. Na izolační kolonku nanese 700 μ L takto připravené směsi.
7. Centrifugace 7 000 rpm / 60 s.
8. Kolonku přeneseme do nové sběrné zkumavky.
9. Zbytek vzorku nanese na kolonku, centrifugace 7 000 rpm / 60 s.
10. Kolonku přeneseme do nové sběrné zkumavky.
11. Na kolonku nanese 500 μ L AW1 (promývací roztok 1).
12. Centrifugace 7 000 rpm / 60 s.
13. Kolonku přeneseme do nové sběrné zkumavky.
14. Na kolonku nanese 500 μ L AW2 (promývací roztok 2).
15. Centrifugace 11 000 rpm / 3 min.
16. Kolonku přeneseme do čisté zkumavky.
17. Na kolonku nanese 60 μ L AVE (eluční roztok), ponecháme 1 min při RT.
18. Centrifugace 7 000 rpm / 60 s, RNA je jímána do zkumavky.
19. RNA uchováváme při -80 °C.

Vyhodnocení: Koncentraci izolované RNA lze měřit spektrofotometricky (např. na zařízení NanoDrop) při vlnových délkách 260/280 nm.

Úkol 2. Vlastní PCR pro průkaz virové RNA

PCR kit umožňuje v jedné reakci postupně převést RNA vzorek do cDNA reverzní transkripcí a následně provést amplifikaci pomocí PCR.

Materiál: (OneStep Ahead RT-PCR kit, QIAGEN)

Přístrojové vybavení: Zařízení pro PCR, termocykler (BioRad)

Kit obsahuje:

- voda prostá RNáz
- 5x QIAGEN One Step RT-PCR buffer (Tris·HCl, KCl, NH₄SO₄, MgCl₂)
- 5x Q-solution
- dNTP mix: s dATP, dCTP, dGTP and dTTP o vysoké čistotě
- Enzyme mix: směs reverzních transkriptáz a DNA-polymeráz (Tabulka 2 a 3)

Tabulka 2. Použité reverzní transkriptázy a jejich inhibitory, které jsou součástí soupravy OneStep Ahead RT-PCR kit (QIAGEN)

Reagencie	Popis
Reverzní transkriptáza (RT) Omniscript	Rekombinantní, heterodimerní enzym exprimovaný v <i>E. coli</i> . Do reakce se přidává v inaktivním stavu (s minimální enzymatickou aktivitou při RT). Je aktivována během reverzně-transkripčního kroku při teplotě 50 °C.
Reverzní transkriptáza (RT) Sensicript	Stejně jako v předchozím případě jedná se o rekombinantní, heterodimerní enzym exprimovaný v <i>E. coli</i> . Do reakce se přidává v inaktivním stavu (s minimální enzymatickou aktivitou při RT). Je aktivována během reverzně-transkripčního kroku při teplotě 50 °C.
Inhibitor RNáz	Rekombinantní savčí protein, který inhibuje eukaryotní RNázy (zejména RNázu A a B).
RT blocker	Umožňuje teplem zprostředkovanou aktivaci reverzních transkriptáz.

Tabulka 3. Použité DNA-polymerázy, které jsou součástí soupravy OneStep Ahead RT-PCR kit (QIAGEN)

Reagencie	Popis
DNA polymeráza QuantiNova	Modifikovaná forma rekombinantní 94-kDa DNA polymerázy, původně izolované z <i>Thermus aquaticus</i> . QuantiNova je přidáván do reakce v neaktivním stavu (nemá enzymatickou aktivitu při RT). Je aktivován během 5-min inkubace při 95 °C.

DNA polymeráza HotStarTaq	Chemicky modifikovaná forma Taq polymerázy. Je přidávána do reakce v neaktivním stavu (nemá enzymatickou aktivitu při RT). Aktivace probíhá postupně s narůstající teplotou.
HotStar proofreading enzym	Vysoce účinná DNA polymeráza s proofreadingovou aktivitou a s 3'-5' exonukleázovou aktivitou. Je aktivována během 5-min inkubace při 95 °C. Její přídavek zajišťuje vyšší amplifikační přesnost a procesivitu.

A) Příprava reakční směsi pro PCR (pro jednu reakci):

- voda prostá RNáz: 6 µL
 - 5x QIAGEN One Step RT-PCR buffer: 5 µL
 - dNTP mix: 1 µL
 - 5x Q-solution: 5 µL
 - primer A: 1.5 µL (pracovní koncentrace 10 µM)
 - primer B: 1.5 µL (pracovní koncentrace 10 µM)
 - enzyme mix: 1 µL
 - RNA sample: 4 µL
- celkový objem: 25 µL**

B) Sekvence použitých primerů (primery pro amplifikaci části genu pro NS5 flavivirovou polymerázu

Označení		Sekvence	Annealing (°C)	Pozice v genomu
2G	Sense	GAA ATT GGG AGA ATT CGG AGT GGC G	55	9048-9072
2H	Antisense	CGC CCT CCC AAC GAG TTC ATC TTG	55	9882-9859

C) Vlastní PCR:

1. **Reverzní transkripce:** 50 °C / 30 min (OmniScript a SensiScript RT jsou aktivovány a probíhá přepis virové RNA do cDNA)
2. **Počáteční PCR aktivace:** 95 °C / 15 min (během tohoto kroku se aktivuje směs DNA polymeráz, inaktivují se reverzní transkriptázy)
3. **Tříkrokové cyklování** (počet cyklů: 40)
 - a) Denaturace: 94 °C / 30 s
 - b) Annealing: 55 °C / 30 s
 - c) Extenze: 72 °C / 1 min
4. **Finální extenze:** 72 °C / 10 min
5. **Uchování vzniklého PCR produktu:** 8 °C

Úkol 3. Elektroforéza PCR produktů, jejich monitorování a extrakce z gelu

A) Elektroforéza získaných PCR produktů

Materiál: agaróza, TAE pufr, barvivo Simply Safe, DNA marker

Přístrojové vybavení: aparatura pro elektroforézu (BioRad), monitorovací zařízení (BioRad)

1. Příprava agarózového gelu: 1.2% gel (0.34 g agarózy + 28 mL TAE pufru,) po zchlazení přidat vizualizační barvivo Simply Safe 5 $\mu\text{L}/100\text{ mL}$ gelu (= cca 0.5 μL). Pak gel nalijeme do tvořítka a vložíme hřebínek.
2. Příprava vzorků: vzorky DNA smíchat 1 : 6 s nanášecím pufrům (loading buffer)
3. Po utužení gelu (cca 20 min) vyjmeme hřebínek, gel vložíme do elektroforetické vany a nanese vzorky do jamek. Nanést rovněž pozitivní kontrolu a DNA marker.
4. Elektroforéza probíhá při 100 V po dobu 40 min. Průběh monitorujeme prostřednictvím nízkomolekulárního barviva, které putuje rychleji než vysokomolekulární PCR amplikony (tj. dsDNA).
5. Po skončení separačního procesu vypneme zdroj napětí, gel vyjmeme z elektroforetické vany a prohlédneme na transluminátoru nebo pomocí monitorovacího zařízení.
6. Pruhy obsahující DNA amplikony je možné vyříznout z gelu, purifikovat a dále analyzovat (např. sekvenovat).

Vyhodnocení: Vyjde-li vzorek jako pozitivní, bude na gelu výrazně viditelný jeden pruh o velikosti cca 800 pb. V případě negativního výsledku bude dráha pro daný vzorek prázdná. Pozorujeme-li v jednotlivých dráhách mnohočetné pruhy různé délky, došlo patrně k nespecifickému nasedání primerů a vzniku nespecifických amplikonů. To lze řešit úpravou podmínek, např. zvýšením annealingové teploty.

B) Purifikace PCR produktu z gelu

Materiál: Kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega)

Přístrojové vybavení: centrifuga, spektrofotometr (NanoDrop)

(Rozpuštění gelu)

1. Po proběhnutí elektroforézy vložíme vyříznuté bločky gelu obsahující PCR amplikony do předem zvážených zkumavek.

(Navázání DNA na sorbent kolonky)

2. Přidáme 10 μL Membrane Binding Solution na 10 mg gelu. Vortexujeme a inkubujeme při 50 – 65 °C až je gel zcela rozpuštěn. *Pokud provádíme přímou purifikaci PCR amplikonů (bez předchozího rozdělení pomocí elektroforézy), přidáme stejný objem Membrane Binding Solution ke směsi obsahující PCR amplikony.*
3. Vložíme purifikační kolonku do sběrné zkumavky (zkumavky).
4. Na kolonku nanese směs z bodu 2, inkubace při RT 1 min.
5. Centrifugace při 16 000 x g / 1 min (může být např. 12 000 rpm). Protečenou tekutinu slijeme.

(Promývání)

7. Přidáme 700 μL Membrane Wash Solution (promývací roztok) s přidaným etanolem. Centrifugace 16 000 x g / 1 min. Protečenou tekutinu slejeme.
8. Opakujeme krok 6. s 500 μL Membrane Wash Solution, centrifugace 16 000 x g / 5 min.
9. Vyprázdníme sběrnou zkumavku a opět centrifugujeme 1 min s otevřeným víčkem, aby se odpařil zbytkový etanol.

(Eluce)

10. Přenést kolonku do čisté 1.5 mL zkumavky.
11. Přidat 50 μL vody prosté nukleáz. Inkubace 1 min při RT. Centrifugace 16 000 x g / 1 min.
12. Kolonku zlikvidujeme, DNA skladujeme při 4 °C nebo -20 °C.

Vyhodnocení: Koncentraci eluované DNA měříme spektrofotometricky při 260/280 nm např. na zařízení NanoDrop. Purifikované vzorky se pak dále používají zejména k sekvenaci, která je nezbytná pro typizaci izolátů virů pomocí genomických metod. Sekvenování se také používá k identifikaci různých virových mutant, např. s rozšířeným portfoliem hostitelů, změnami ve virulenci, rezistencemi k léčivům atd.

Téma 2. Vyšetření na SARS-CoV-2 pomocí kvantitativní reverzně-transkripční PCR (RT-qPCR)

Specifickým případem PCR je kvantitativní PCR, při které amplifikace a detekce probíhají simultánně. Kvantifikace amplikonu v reálném čase se provádí prostřednictvím detekce a kvantifikace fluorescenčního signálu ve speciálním zařízení, které kromě cyklického střídání teplot umožňuje detekci fluorescence a monitorování postupu PCR v reálném čase bez nutnosti detekovat produkty PCR elektroforeticky. Pro kvantitativní detekci produktu v průběhu PCR existují tři obecné metody založené na použití (i) interkalačního barviva vázajícího se na DNA, (ii) fluorescenčně značených sond vázající se na střední část amplifikovaného produktu, (iii) fluorescenčně značených primerů.

Ve virologické diagnostice se PCR využívá zejména pro průkaz takových virových patogenů, které jsou přítomné v odebíraných vzorcích, získaných nejčastěji stěrem (kožní nebo slizniční léze, sputum), odběrem stolice atd. Mezi tyto viry patří zejména herpetické viry, papillomaviry, respirační viry, (SARS-CoV-2), rotaviry atd. PCR test na přítomnost RNA viru SARS-CoV-2 v dýchacích je v dnešní době jedinou validní metodou, která dokáže spolehlivě rozlišit jedince pozitivní na koronavirus (antigenní testy jsou podstatně méně citlivé a lze je využít jen orientačně).

Úkol 1. Izolace virové RNA

Izolaci lze provést buď manuálně za pomoci klasických kolonkových centrifugačních souprav nebo pomocí automatického izolátoru, jehož princip je založen na separaci nukleových kyselin pomocí magnetických kuliček. Úspěšnost izolace je u obou způsobů srovnatelná, s tím, že magnetická izolace je nepatrně úspěšnější než kolonková. Ještě před izolací se do každého analyzovaného vzorku přidává interní kontrola (IC), která je součástí PCR soupravy používaného pro následnou detekci přítomnosti virové RNA. Tato interní kontrola je v našem případě tvořena RNA z fága MS2, která je následně během PCR analýzy rovněž detekována. Účelem této kontroly je ověření toho, že jednotlivé kroky celého analytického procesu (tj. extrakce RNA, reverzní transkripce a PCR samotná) proběhly u každého vzorku technicky správně. Některé PCR soupravy využívají jako interní kontrolu primery a sondy cílící na některé lidské geny (např. GAPDH), které by měli být v každém odebraném vzorku přítomny, a není tedy potřeba před izolací ke vzorku nic přidávat.

V naší laboratoři používáme pro diagnostické účely automatický izolátor EXM3000 Zybío v kombinaci s izolační soupravou rovněž od společnosti Zybío. Při menším počtu vzorků používáme kolonkovou soupravu RiboSpin od firmy GeneAll (principem obdobný jako kit zmíněný v protokolu na izolaci RNA viru klíšťové encefalitidy).

Vzhledem k tomu, že izolace RNA z klinických vzorků testovaných na přítomnost RNA SARS-CoV-2 vyžaduje manipulaci s vysoce rizikovým biologickým materiálem (nutno provádět v laboratořích BLS3), nebude tento krok v praktikách prováděn. Studenti budou pracovat se vzorky již izolované virové RNA, které jsou neinfekční.

Úkol 2. RT-qPCR

Pro detekci SARS-CoV-2 se v současné době používají téměř výhradně multiplexové testovací soupravy, které využívají toho, že je možné v jedné reakci detekovat současně více genů (obvykle to bývají 3 – 4 geny; sekvence, na které nasedají primery a sondy, musejí být striktně specifické pro daný virus). Takovým příkladem je i **Seegene Allplex™ 2019-nCoV Assay (Cat. No. RP10250X)**. Pomocí této soupravy lze detekovat 4 geny, z toho jeden gen je pro interní kontrolu (IC, zmíněno výše), zbylé 3 geny jsou určeny k detekci SARS-CoV-2. Kit detekuje konkrétně *E gen* (gen kódující obalový („envelope“) protein), *RdRp* (gen pro RNA-dependenční RNA-polymerázu) a *N gen* (gen kódující nukleokapsidový protein). Pro každý gen je výrobcem navržena specifická kombinace primerů a fluorescenčně značené sondy, které na definovaný úsek genu nasedají. Každá ze sond je vázaná s odlišným fluoroforem (lišící se emisním spektrem) a jednotlivé geny tak lze detekci fluorescence v daných spektrech odlišit.

Materiál: Seegene Allplex™ 2019-nCoV Assay, vzorky izolované RNA vyšetřovaných jedinců (materiál je neinfekční)

Přístrojové vybavení a software: Zařízení pro RT-qPCR (Bio-Rad CFX96™ C1000 Touch). Výsledky budou zpracovány pomocí programu Bio-Rad CFX Maestro (Bio-Rad).

Množství reagensií na jednu PCR reakci dle výrobce:

- | | |
|---|--------------|
| • Voda prostá RNáz | 5 µL |
| • 2019-nCoV MOM mix (směs primerů a sond) | 5 µL |
| • 5x Real-time One-step Buffer | 5 µL |
| • Real-time One-step Enzyme | 2 µL |
| • Vzorek RNA | 8 µL |
| celkový objem reakce | 25 µL |

Postup práce:

1. Před použitím jednotlivé mikrozkušavky s reagensiemi vortexujeme a následně krátce centrifugujeme.
2. Reakční směs pro PCR (PCR Mastermix) připravíme dle protokolu od výrobce a přeneseme příslušné množství do jamek 96-jamkové destičky nebo do 8-jamkových stripů (dle počtu analyzovaných vzorků).
3. Do příslušných jamek obsahujících PCR Mastermix přidáme 8 µL izolované RNA, 2019-nCoV PC (pozitivní kontrola PCR reakce, součást soupravy) a NC (negativní kontrola – voda prostá RNáz, součást kitu). Celkový objem jedné PCR reakce tedy činí 25 µL.
4. 96-jamkový panel (příp. 8-jamkový strip) se následně uzavře pomocí víček a krátce centrifuguje, aby veškerá tekutina stekla na dno jamek a došlo k odstranění případných bublin.
5. Takto připravený panel se přenesení do zařízení pro RT-qPCR (Bio-Rad CFX96™ C1000 Touch) a nastaví se příslušný program (Tabulka 4).

Tabulka 4. Podmínky pro RT-qPCR pro diagnostiku SARS-CoV-2

Krok	Počet cyklů	Teplota	Trvání
1	1	50 °C	20 min
2	1	95 °C	15 min
3	45	94 °C	15 s
4*		58 °C	30 s
5	zpět na krok 3, celkem 44 cyklů		

* Při kroku 4 je odečítána fluorescence

Amplifikace markerových genů je rozlišena pomocí rozdílných fluoroforů. Jednotlivé křivky odpovídající amplifikaci cílových sekvencí v reálném čase jsou v programu odlišeny barevně, jak je zřejmé z Tabulky 5.

Tabulka 5. Rozlišení markerových genů pomocí různých fluoroforů

Fluorofor	Gen	Barevné označení křivky
FAM	E gen	Modrá
HEX	interní kontrola (IC)	Zelená
Cal Red 610	RdRP gen	Magenta
Quasar 670	N gen	Hnědá

Vyhodnocení:

Pro všechny cílové sekvence platí:

Počet cyklů (cycle threshold, C_t)

≤ 40

> 40 nebo žádný signál

Výsledek

virová RNA detekována (pozitivní vzorek)

virová RNA není detekována (negativní vzorek)

Pozn. Pokud je C_t hodnota pro IC (interní kontrolu) > 40 , je doporučeno test zopakovat.

Výsledky testu hodnotíme podle Tabulky 6.

Tabulka 6. Možné výsledky RT-qPCR testu pro diagnostiku SARS-CoV-2 a jejich interpretace

Cíl. sekvence	IC	E	RdRp	N	Výsledek testu	Pozn.
Fluorofor	HEX	FAM	CalRed 610	Quasar 670		
Situace 1	+/-	+	+	+	Pozitivní	1
Situace 2	+/-	+	-	+	Pozitivní	2
Situace 3	+/-	+	+	-		
Situace 4	+/-	-	+	+		
Situace 5	+/-	-	-	+		
Situace 6	+/-	-	+	-		
Situace 7	+/-	+	-	-	Pravděpodobně pozitivní	3
Situace 8	+	-	-	-	Negativní	4
Situace 9	-	-	-	-	Nesprávně provedený test	5

Poznámky:

¹ Výsledky jsou platné. RNA z SARS-CoV-2 byla detekována.

² Výsledky jsou platné. RNA z SARS-CoV-2 byla detekována. Negativní výsledek (pro E, RdRp nebo N) může být zapříčiněn:

1. koncentrace vzorku je blízko nebo pod limitem detekce metody
2. sekvence obsahuje mutace
3. jiné faktory

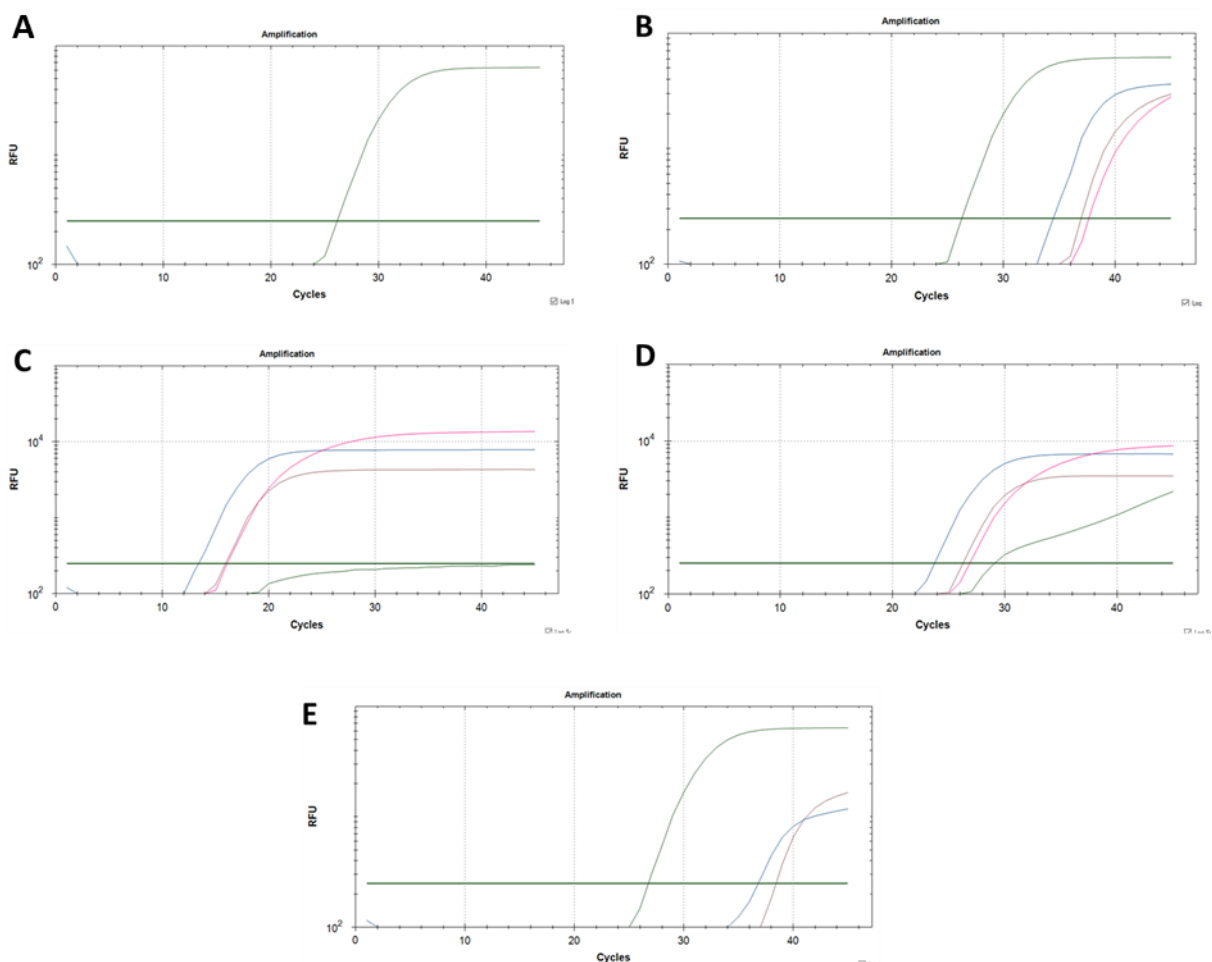
³ Výsledky jsou platné. Pozitivní výsledek pro sekvenci genu E. Negativní výsledek pro sekvence genů RdRp a N může být zapříčiněn:

1. koncentrace vzorku je blízko nebo pod limitem detekce
2. sekvence je mutována
3. jiné faktory

Doporučení: zopakovat test s větším množstvím RNA (do 13 µL) na úkor vody prosté RNáz.

⁴ Výsledky jsou platné. RNA z SARS-CoV-2 nebyla detekována.

⁵ Výsledky jsou neplatné. Test je nutno zopakovat.



Obrázek 14: Možné výsledky testu na SARS-CoV-2 založeného na kvantifikace virové RNA pomocí RT-qPCR. (A) Typický negativní výsledek, detekována pouze IC. (B) Pozitivní výsledek s vyššími hodnotami Ct indikující nízkou virovou nálož. (C) Pozitivní vzorek s extrémně nízkými hodnotami Ct indikující vysokou virovou nálož. Vzorky tohoto typu jsou ojedinělé. (D) Pozitivní vzorek s nízkými hodnotami Ct indikující probíhající infekci. Jedná se o typický příklad pozitivního vzorku. (E) Pozitivní vzorek s vyššími hodnotami Ct pouze pro geny E a N. Vysoká pozitivita pouze ve dvou genech může značit buď začínající nebo končící infekci. Takovýto vzorek bývá většinou vyhodnocen jako hraniční a je doporučeno jej zopakovat v následujících dnech, aby se odhalilo, zda se jednalo o začínající nebo končící infekci. Při interpretaci výsledku také hraje roli anamnéza pacienta, tj. zda má příznaky respiračního onemocnění, zda byl v kontaktu s pozitivní osobou nebo zda v nedávné době COVID-19 prodělal. Kvantitativní RT-PCR proběhlo na zařízení CFX96 (Bio-Rad). Výsledky získány pomocí programu Bio-Rad CFX Maestro (Bio-Rad). Křivky jsou barevně odlišené, viz Tabulka 5.

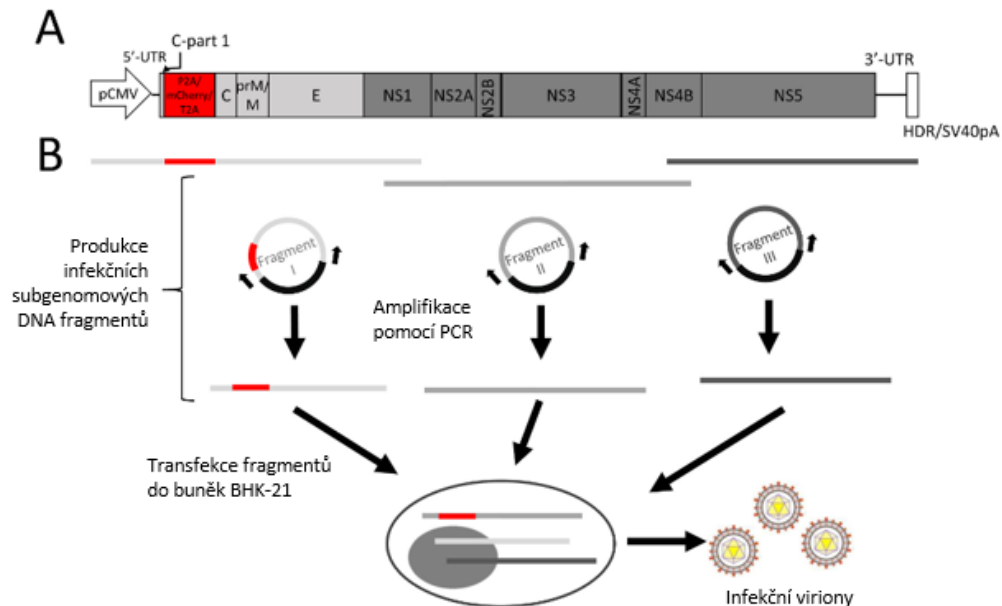
Téma 3. Práce s virovým reportérovým systémem

Reportérové virové systémy jsou založeny na rekombinantních (geneticky modifikovaných) virech, které nesou ve svém genomu tzv. reportérový gen, který při replikaci viru generuje kvantifikovatelný fyzikální signál. To nahrazuje pracné a časově náročné plakové titrace nebo drahé izolace a kvantifikace virových nukleových kyselin. Jako reportérové geny se používají geny kódující různé luminiscenční (fluorescenční nebo chemiluminiscenční) proteiny, jako např. zelený fluorescenční protein („green fluorescent protein“, GFP), mCherry protein, světlušková luciferáza, další formy luciferáz s nízkou molární hmotností izolované z hlubokomořských živočichů (např. nanoluciferáza, nLuc, z korýše *Oplophorus gracilirostris*). Exprimované reportérové proteiny mohou být buď přímou součástí virové částice (exprimované jako fúzní virový protein), nebo se při translaci uvolní (např. díky přítomnosti tzv. „ribosome skipping“ sekvencí, RSS) a hromadit se v infikovaných buňkách jako volné proteiny. Reportérové virové systémy lze využít pro řadu užitečných aplikací, např. pro přímé sledování replikace viru v tkáňové kultuře nebo v experimentálním zvířeti, a tedy pro studium virové patogeneze, dále pro testování antivirotických látek a protilátek pro terapeutické účely a v neposledně řadě pro rychlé provedení neutralizačních testů při diagnostice virus-neutralizačních protilátek z krve a jiných tělních tekutin.

Ve cvičení se seznámíme s reportérovým systémem odvozeným od viru klíšťové encefalitidy (kmenu Hypr) využívající reportérový gen pro červeně fluoreskující protein mCherry (obr. 15). Tento systém je koncipován do podoby tří fragmentů DNA (tzv. infekčních subgenomových amplikonů, ISA) vzájemně se překrývajících na svých 3' a 5' koncích a klonovaných do plazmidových vektorů (nejčastěji pUC57 nebo PC11). Tyto tři DNA fragmenty pokrývají svojí sekvencí celý genom viru klíšťové encefalitidy: fragment I (nukleotidová pozice 1 až 3662), fragment II (nukleotidová pozice 3545 až 8043) a fragment III (nukleotidová pozice 7961 až 11100). První fragment má k svému 5' konci připojen silný promotor odvozený z promotoru lidského cytomegaloviru (pCMV) a třetí fragment je na 3' konci ohraničen ribozymovou sekvencí a polyadenylačním signálem z viru SV40 (sekvence se označuje jako HDR/SV40pA). Gen pro mCherry je lokalizován ve fragmentu I (72 nukleotidů od počátku genu C; tato pozice je nezbytná k zachování replikační schopnosti flaviviru). Sekvence kódující mCherry je na svém 5' a 3' konci ohraničena dvěma RSS, za kterými následuje kompletní sekvence genu pro C protein (včetně prvních 72 nukleotidů). Jak bylo zmíněno výše, RSS zodpovídají za uvolnění vzniklého mCherry proteinu od nascentního virového polypeptidu; vzniklý mCherry protein tedy není součástí virových částic a hromadí se v cytoplazmě transfekovaných nebo infikovaných buněk.

Práce s reportérovým virovým systémem zahrnuje několik kroků: (1) Jednotlivé ISA fragmenty je třeba nejprve vyštěpit z vektorů, ve kterých jsou klonovány, nebo je amplifikovat pomocí PCR. Obě cesty vedou k získání tří DNA fragmentů, které jsou zbaveny vektorových sekvencí a tedy přímo použitelné k transfekci hostitelských buněk. (2) Transfekce hostitelských buněk pomocí vhodného transfekčního činidla (např. lipofektaminu) vede k průniku DNA fragmentů do recipientní buňky. Uvnitř buňky dochází následně k rekombinaci tří transfekovaných DNA fragmentů za vzniku jediné dsDNA, která svou sekvencí pokrývá celý genom viru a která se prostřednictvím silného promotoru pCMV přepisuje buněčnými polymerázami do mRNA s funkcí virového genomu. Translací této mRNA na buněčných ribozomech vznikají životaschopné virové částice schopné infikovat další hostitelské buňky. Současně vzniká reportérový protein, který je markerem úspěšné transfekce a později i infekce buněk vzniklými

viriony. (3) Odběr živného média a použití získaných virionů pro další účely. Vzniklé virové částice lze pak používat klasickým způsobem jako běžný virus. Je nutné zdůraznit, že reportérové systémy mívají omezenější stabilitu a dobu použitelnosti než běžný virus. Během opakovaného pasážování dochází postupem času ke ztrátě reportérového genu a tedy reverzi na virus standardního typu (wild-type virus).



Obrázek 15: Reportérový virový systém. (A) Konstrukce reportérového virového systému na bázi genomu viru klíšťové encefalitidy a reportérového genu pro mCherry protein. (B) Produkce infekčních subgenomových amplikonů pomocí PCR a jejich transfekce do recipientních buněk, která vede k produkci infekčních virových částic nesoucích reportérový transgen.

Úkol 1. Využití reportérového virového systému pro virus-neutralizační test

Popsaný reportérový systém bude využit pro virus-neutralizační test prokazující přítomnost sérových protilátek proti viru klíšťové encefalitidy. Celý proces má několik nezbytných fází: (1) amplifikace ISA fragmentů pomocí PCR a purifikace získaných fragmentů, elektroforéza a přečištění získaných amplikonů, (2) transfekce BHK-21 buněk získanými ISA fragmenty, (3) sklizení vzniklých virových částic, stanovení titru, (4) vlastní virus-neutralizační test. Můžeme říci, že kroky 1-3 jsou přípravné fáze, během kterých si připravíme virový reportér pro vlastní virus-neutralizační test.

A) Amplifikace ISA fragmentů

Materiál a přístrojové vybavení: PrimeStar MAX DNA polymerase (Takara, polymeráza schopná amplifikovat dlouhé fragmenty), specifické primery vázající se na konce jednotlivých ISA fragmentů (viz níže), sterilní voda prostá RNáz, Bio-Rad T100™ Thermal Cycler.

Sekvence primerů:

Fragment I

FW(FragI): GAATAAGGGCGACACGGAAATGT

RV(FragI): TGACAAGCAAAGCGAGAACGACG

Fragment II

FW(FragII): GGGTCCCCGGAATAGTGGCATT

RV(FragII): AAATTTGATCAAGTTCCAACCCAGG

Fragment III

FW(FragIII): ATACACCATTGGTGGGAAGAGGGC

RV(FragIII): TACTGGAACGTTGTGAGGGTAAAC

Postup práce:

1. Příprava PCR směsi (celkový objem 50 μ L na jednu reakci):
 - 25 μ L PrimeSTAR MAX premix (Takara)
 - 1 μ L DNA templátu (fragment I, II nebo III), koncentrace 1 ng/ μ L
 - 1 μ L primer FW (koncentrace 10 μ M)
 - 1 μ L primer RV (koncentrace 10 μ M)

Od každého fragmentu provádíme 3 PCR reakce (při následné purifikaci PCR produktu smícháme získané PCR amplikony, a tím získáme větší koncentraci každého fragmentu). Celkem tedy provádíme 9 PCR reakcí.

2. Vlastní PCR (tříkrokové cyklování, 30 cyklů)
 - denaturace: 98 °C/ 10 s
 - annealing: 55 °C/ 5 s
 - extenze: 72 °C/20 s (*5 s/1Kbp)
 - uchování vzniklého PCR produktu: 8 °C

3. Elektroforéza PCR produktů a jejich monitorování (viz předchozí úloha)

Vyhodnocení: Pomocí PCR bychom měli získat pro každý fragment jeden výrazný pruh, odpovídající velikostem cca 4000 bp (fragment I), 5000 bp (fragment II) a 3000 bp (fragment III).

4. Purifikace PCR produktu

- Přidáme stejný objem Membrane Binding Solution ke směsi obsahující PCR amplikony.
- Vložíme SV Microcolumn (purifikační kolonku) do sběrné zkumavky.
- Na kolonku nanese směs z bodu 2, inkubace při RT 1 min.

- Centrifugace při 16 000 x g / 1 min (může být např. 12 000 rpm). Protečenou tekutinu slijeme.
- Přidáme 700 µL Membrane Wash Solution (promývací roztok) s přidaným etanolem. Centrifugace 16 000 x g / 1 min. Protečenou tekutinu slejeme.
- Opakujeme krok 6 s 500 µL Membrane Wash Solution, centrifugace 16 000 x g / 5 min.
- Vyprázdníme sběrnou zkumavku a opět centrifugujeme 1 min s otevřeným víčkem, aby se odpařil zbytkový etanol.
- Přenést kolonku do čisté 1.5 mL zkumavky.
- Přidat 50 µL vody prosté nukleáz. Inkubace 1 min při RT. Centrifugace 16 000 x g / 1 min.
- Kolonku zlikvidujeme, DNA skladujeme při 4 °C nebo -20 °C.

Vyhodnocení: Koncentraci amplifikované DNA měříme při 260/280 nm.

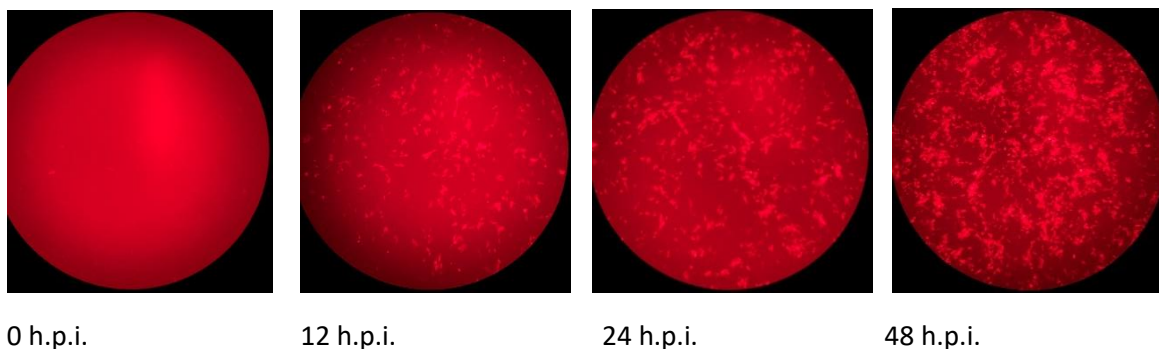
B) Transfekce recipientních buněk BHK-21 získanými PCR amplikony

Materiál a přístrojové vybavení: Ekvimolární směs ISA fragmentů získaných v předešlém experimentu, X-tremeGENE™ HP DNA Transfection Reagent (Roche), µL Opti-MEM medium (Life Technologies), 24-jamková destička s buněčnou kulturou BHK-21, spektrofotometr Nano-drop

- Změříme koncentraci získaných ISA fragmentů. Připravíme ekvimolární směs fragmentů tak, aby od každého fragmentu bylo zastoupeno stejné množství. Pro transfekční činidlo X-tremeGENE™ se doporučuje celkové množství DNA 2.1 µg DNA, což odpovídá 0.7 DNA µg od každého fragmentu.
- Naředíme 2 µl X-tremeGENE™ pomocí 200 µL Opti-MEM a přidáme 2.1 µg ekvimolární směsi DNA fragmentů.

Příklad:

- koncentrace fragmentů:
- FI-mCherry = 117,287 ng/µL
- FII = 135,163 ng/µL
- FIII = 151,160 ng/µL
- na transfekční směs tedy potřebujeme:
- 5,97 µL FI-mCherry + 5,18 µL FII + 4,63 µL FIII + 2 µL transfekčního činidla + 200 µL µL Opti-mem
- Inkubujeme 15 min při pokojové teplotě.
- Směs nakapeme na monolayer buněk BHK-21, inkubujeme 3–5 dní.
- Monitorujeme rozvoj cytopatického efektu mikroskopicky v procházejícím světle a fluorescenční signál vznikající po translaci reportéru mCherry pomocí fluorescenčního mikroskopu.
- Intenzitu fluorescence je možno kvantifikovat spektrofotometricky. Ex/em maxima pro protein mCherry jsou: 587/610 nm.
- Průběh inkubace s rostoucí intenzitou fluorescenčního signálu je patrná z obr. 16.

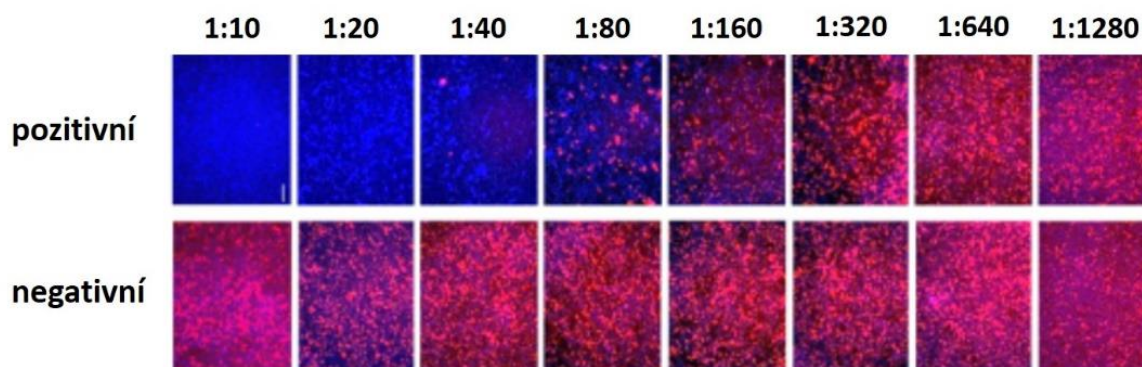


Obrázek 16. Postupná tvorba CPE a fluorescenčního signálu reportérovým virovým systémem exprimujícím protein mCherry na buňkách BHK-21. Pozorováno fluorescenčním mikroskopem v časech 0 až 48 h po infekci (foto J. Havierník).

C) Odběr a kvantifikace získaného reportérového viru

- Odebereme živné médium z transfekovaných buněk, které obsahuje životaschopné virové částice.
- Virový titr kvantifikujeme pomocí plakové titrace.

D) Vlastní virus-neutralizační test. Postupujeme stejně, jako v případě virus-neutralizačního testu využívajícího standardní typ viru (viz předchozí úloha). Replikaci reportérového viru ošetřeného sérem v buňkách pak kvantifikujeme měřením fluorescence při ex/em 587/610 nm (obr. 17).

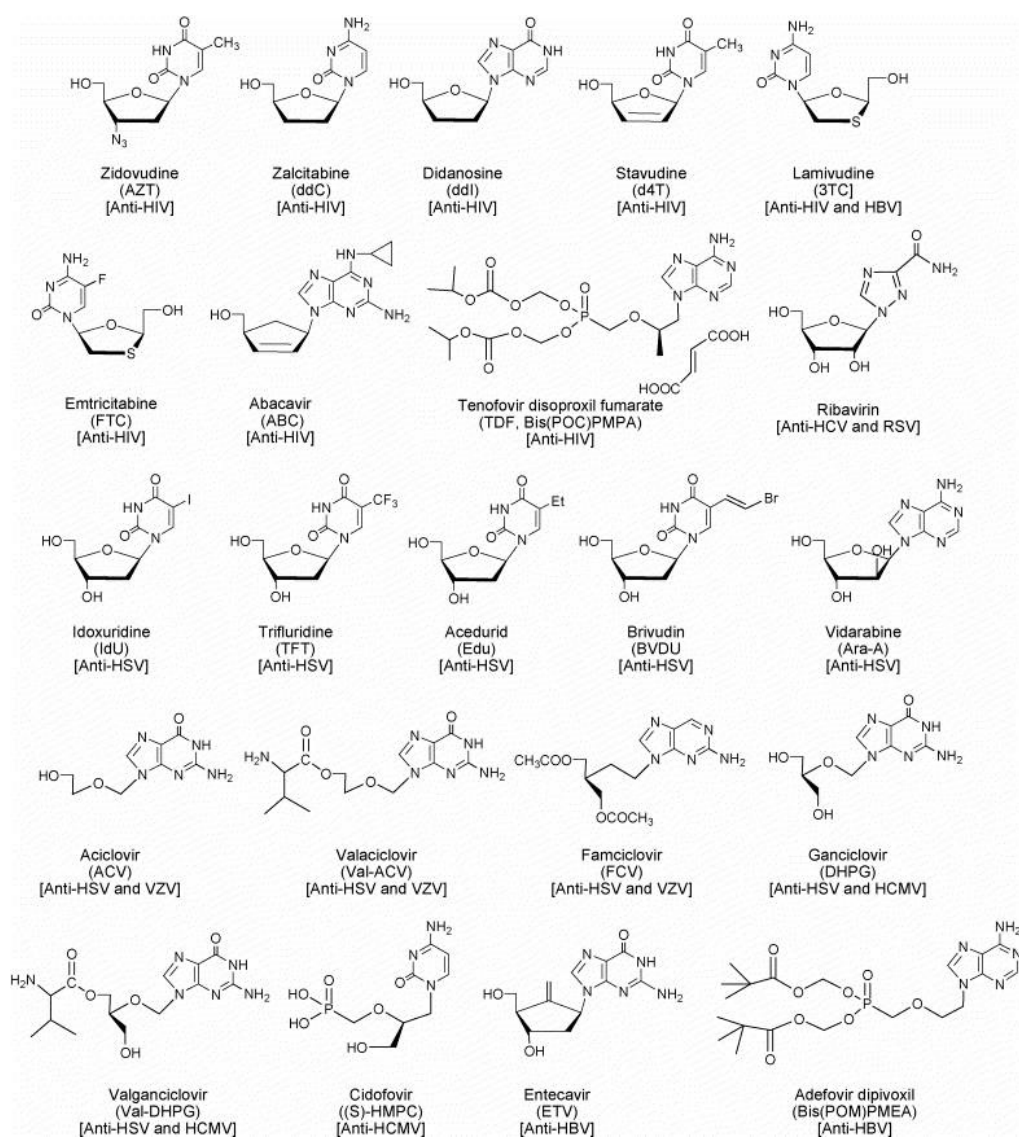


Obrázek 17. Virus-neutralizační test na průkaz protilátek proti viru klišťové encefalidity.

Vyhodnocení: Neutralizační test provedený s reportérovým virovým systémem hodnotíme obdobným způsobem jako test s klasickým virem standardního typu. Buněčné kultury, které poskytují fluorescenční signál, hodnotíme jako pozitivní. Množství protilátek ve vzorku se pak udává v jednotkách ředění, např. 1:80, 1:160, 1:320 atd. Fluorescentní signál měříme buď pomocí fluorimetru nebo hodnotíme pomocí fluorescenčního/konfokálního mikroskopu.

5. VIRY A ANTIVIROTIKA

Vývoj účinných antivirotik je spolu s efektivní profylaxí ve formě vakcín cestou pro řešení nebezpečných virových onemocnění, která působí vysokou úmrtnost v lidské populaci nebo mají za následek závažné poškození zdraví s trvalými následky u mnoha pacientů. Od doby, kdy bylo do klinické praxe zavedeno první antivirotikum (idoxuridin v r. 1963), bylo formálně schváleno celkem 90 antivirových léčiv pro terapii infekcí způsobených HIV, HBV, HCV, HSV (herpes simplex virus), virem chřipky, lidským cytomegalovirem, virem pásového oparu (varicella-zoster), RSV (respiratory syncytial virus) a lidským papillomavirem. Mnohá další antivirotika jsou již ve fázi klinických testů na lidských dobrovolnících (např. galidesivir pro virus žluté zimnice nebo remdesivir pro SARS-CoV-2). Antivirotika se běžně rozdělují podle kritéria, zda cílí na virové nebo hostitelské proteiny. Antivirotika, která specificky interagují s virovými proteiny, jsou zpravidla méně toxická, ale jsou účinná pouze pro velmi úzkou skupinu blízce příbuzných virů (např. pouze na flaviviry). Na druhé straně antivirotika, která interagují s hostitelskými proteiny, mívají širokospektrální antivirový účinek (inaktivují např. většinu obalených virů), avšak vyznačují se obvykle vyšší toxicitou pro lidské (savčí) buňky.



Obrázek 18. Nukleosidová antivirotika používaná pro terapii závažných virových onemocnění.

Látky z rodiny nukleotidů a nukleosidů jsou v dnešní době velmi nadějnými kandidáty pro vývoj vysoce účinných antivirových preparátů (některé příklady, viz obr. 18). Jejich mechanismus účinku spočívá ve specifické blokaci virových polymeráz, např. reverzní transkriptázy u HIV-1 nebo RNA-dependentní RNA-polymerázy u SARS-CoV-2. Některé experimentální nukleosidové analogy, působí též jako inhibitory virových methyltransferáz nebo působí jako tzv. letální mutageny. Další antivirové preparáty (ne-nukleosidové povahy) cílí na virové proteázy nebo povrchové virové proteiny zodpovědné za adsorpci viru na buněčný receptor.

V praxi má stanovení citlivosti viru na antivirovika význam výhradně u infekcí, proti nimž již existuje zavedená antivirová léčba (např. HIV nebo HBV). V takových případech je znalost citlivosti kmene, kterým je pacient infikován, velmi důležité pro volbu účinné terapie. Vývoj nových antivirotik s vysokou genotypovou a fenotypovou bariérou proti vzniku rezistence, včetně použití směsí (tzv. koktejlů) antivirotik současně cílících na různé virové proteiny, jsou dnes základem moderní antivirové terapie, zejména terapie HIV.

Téma 1. Stanovení citlivosti viru na antivirovika

Citlivost k antivirotikům pomocí *in vitro* metod se nejčastěji posuzuje podle naměřené hodnoty EC_{50} (nebo IC_{50}), tedy 50% efektivní (nebo inhibiční) koncentrace antivirovika. Tato hodnota vyjadřuje koncentraci antivirovika, která je zapotřebí k redukci virového titru na 50%. Silnější antivirovika mají nízkou hodnotu EC_{50} (často v nanomolárních nebo sub-mikromolárních hodnotách). Významnou hodnotou je dále CC_{50} , což je 50% cytotoxická koncentrace, tedy koncentrace antivirovika, která sníží viabilitu (životnost) hostitelských buněk na 50% kvůli svojí toxicitě. Podíl CC_{50}/EC_{50} pak vyjadřuje tzv. selektivní index (SI), hlavní ukazatel vztahu antivirové aktivity a toxicity. Silné inhibitory s velmi nízkou toxicitou mají vysoké hodnoty SI, ty nejlepší inhibitory mají SI až několik (set) tisíc. Takové látky jsou vhodnými kandidáty pro terapii virových onemocnění u člověka.

Ve cvičení budou prováděny úlohy demonstrující inhibiční účinek některých nukleosidových analogů na replikaci viru Langat. Protože v současnosti neexistují schválená léčiva pro léčbu infekcí způsobených vektory přenášenými flaviviry, je třeba pohlížet na demonstrované metody jako na modelové systémy, které však využívají stejných principů jako antivirové testy prováděné se schválenými léčivy na jiných typech virů v klinických laboratořích.

Úkol 1. Stanovení citlivosti klíšťaty přenášeného flaviviru na antivirovika

Materiál: Panel (96-jamek) s narostlou kulturou buněk (např. PS), zásobní virová suspenze (klíšťaty přenášený flavivirus, např. Langat, zásobní titr 10^6 PFU/mL), živné médium s přídatkem fetálního bovinního séra, FBS (např. L15, Leibowitz, s 3% FBS), panel antivirotik – 10 mM roztoky látek v DMSO (sada nukleosidových analogů obsahujících 2'-C-modifikované nukleosidy, galidesivir, 4'-C-azidoderiváty cytidinu, acyklovir, remdesivir, nukleosidy fluorované v pozicích 2' a 3'), CCK-8 kit pro určení toxicity antivirotik.

Postup práce:

1. Připravíme roztoky antivirotik o koncentraci 50 μM (pro každé antivirotikum) v médiu L15 (vycházíme ze zásobních roztoků 10 mM). Celkový objem každého antivirotika bude 1 mL.
2. Pro látky 7-deaza-2'-C-methyladenosin a 4'-C-azidocytidin připravíme ředící řadu (dvojkové ředění) počínaje koncentrací 50 μM a konče koncentrací 1.5 μM . Tyto dvě látky budou sloužit pro demonstraci výpočtu efektivní koncentrace (EC_{50}).
3. Do takto připravených naředěných vzorků přidáme virus do celkového MOI 0.1 (obvykle ředíme médiem zásobu viru klíšťové encefalitidy 1000x a z takto získané naředěné virové suspenze přidáme 5 μL na 200 μL média (= 1 jamka), tedy 25 μL na 1000 μL námi ředených látek).
4. Jako negativní kontrola bude sloužit neinfikované médium bez jakéhokoli antivirotika. Jako pozitivní kontrola slouží médium, do kterého byl přidán pouze virus a nikoli antivirotikum.
5. Z panelu s buněčnou kulturou odsajeme médium a nahradíme obohaceným médiem připravených v krocích 2-4. Od každého vzorku (včetně kontrol) látky nanese duplikát nebo triplikát.
6. Kultivujeme několik dnů (obvykle dva až tři dny), dokud není na buňkách pozorovatelný CPE.
7. Po inkubaci odsajeme médium a provedeme plakovou titraci.

Vyhodnocení: Vzorky s antivirotiky s vysokým antivirovým účinkem budou charakterizovány velmi nízkým nebo žádným titrem viru (při koncentraci 50 μM), srovnatelným s negativní kontrolou. Naopak antivirotika bez účinku poskytnou vysoké titry srovnatelné s pozitivní kontrolou.

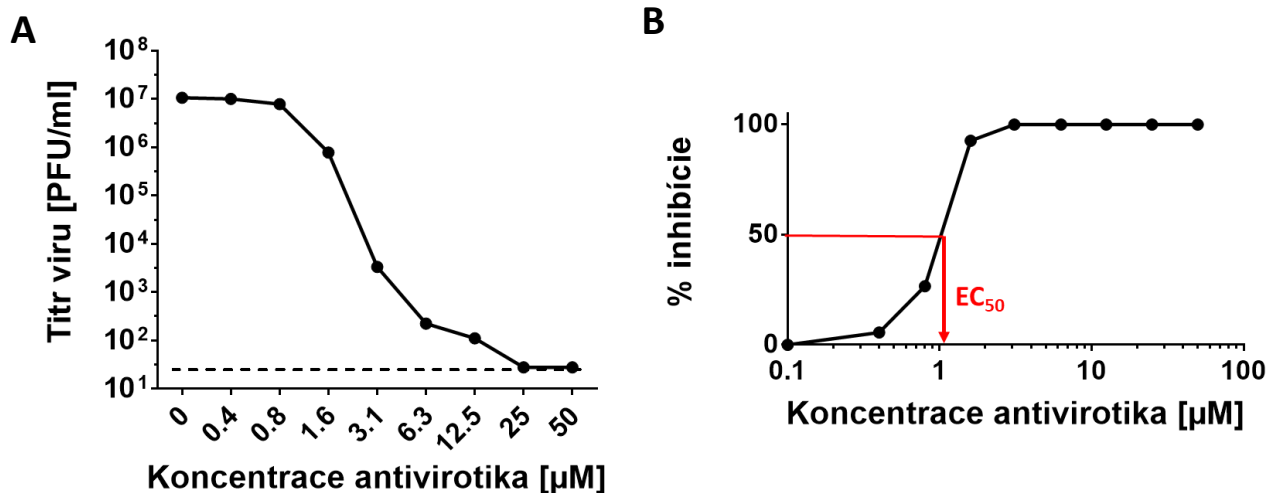
Pro látky 7-deaza-2'-C-methyladenosin a 4'-C-azidocytidin, u nichž byla provedena kompletní ředící řada, vypočítáme hodnotu EC_{50} (postup, viz Tabulka 7 a obr. 19).

Nejdříve je třeba přepočítat naměřené titry na % inhibice dle vztahu:

$100 - (\text{titr pro dané ředění} \cdot 100 / \text{titr pro pozitivní kontrolu})$ (viz Tabulka 7)

Tabulka 7. Příklad přepočtu titru viru na % inhibice

Koncentrace antivirotika [μM]	Titř viru [PFU/mL]	% Inhibice
0	1,06E+07	0
0,4	1,00E+07	5,660377
0,8	7,78E+06	26,60377
1,6	7,78E+05	92,66038
3,1	3,33E+03	99,96858
6,3	2,22E+02	99,99791
12,5	1,11E+02	99,99895
25	2,78E+01	99,99974
50	2,78E+01	99,99974



Obrázek 19. Replikace viru v přítomnosti antivirotika. (A) Příklad konstrukce růstové křivky (závislost titru na koncentraci antivirotika). (B) Příklad konstrukce inhibiční křivky (závislost % inhibice na koncentraci antivirotika) pro výpočet hodnoty EC_{50} .

Vlastní hodnotu EC_{50} pak spočítáme podle Reedovy-Muenchovy metody:

Ředění odpovídající 50% efektivní koncentraci (EC_{50}) leží v případě znázorněném na obr. 19 a Tabulce 7 někde mezi koncentracemi antivirotika 0,8 µM (26,6% inhibice) a 1,6 µM (92,6 % inhibice).

$$PD = \frac{\% \text{positive above } 50\% - 50\%}{\% \text{positive above } 50\% - \% \text{positive below } 50\%}$$

$$PD = (92,6 - 50) / (92,6 - 26,6) = 42,6 / 66 = 0,645$$

EC_{50} spočítáme podle vzorce:

$$EC_{50} = 10^{\log Z - (PD \times h)}$$

h = logaritmus dilučního faktoru (zde $h = 0,301$, protože diluční faktor je 2)

Z = ředění antivirotika, při kterém je % inhibice nad 50% (zde $Z = 1,6$ µM)

$$\text{Pak } EC_{50} = 10^{\log 1,6 - 0,645 \times 0,301} = 10^{0,204 - 0,194} = 10^{0,01} = \underline{\underline{1,023 \text{ } \mu\text{M}}}$$

V našem případě tedy 1,023 µM antivirotika způsobí v důsledku svého inhibičního efektu pokles titru viru na 50 %. Tato hodnota odpovídá hodnotě EC_{50} . Tuto hodnotu můžeme rovněž odečíst z inhibiční křivky na obr. 19. Poznámka: body inhibiční křivky se většinou prokládají nikoli lomenou čarou, jak je tomu na obrázku, nýbrž sigmoidní křivkou, která je výslednicí sigmoidní (logistické) funkce, podle níž jsou jednotlivé hodnoty (body v grafu) rozloženy.

Úkol 2. Stanovení toxicity testovaných antivirotik

1. Připravíme roztoky antivirotik o koncentraci 50 μM (pro každé antivirotikum) v médiu L15 (vycházíme ze zásobních roztoků 10 mM). Celkový objem každého antivirotika bude 1 mL.
2. Jako negativní kontrola bude sloužit médium bez jakéhokoli antivirotika, které přidáme do jamky s metabolicky aktivními buňkami (krok 4).
3. Jako pozitivní kontrola bude sloužit médium bez antivirotika, které přidáme do jamky bez narostlých buněk (krok 5).
4. Z panelu s buněčnou kulturou odsajeme médium a nahradíme obohaceným médiem připravených v krocích 2-3. Od každého vzorku (včetně kontrol) látky nanese duplikát nebo triplicát. Pozitivní kontrolu (krok 4) nanese do jamky bez buněk.
5. Kultivujeme několik dnů (obvykle dva až tři dny), dokud není na buňkách pozorovatelný CPE.
6. Po inkubaci odsajeme médium a kvantifikujeme cytotoxický efekt pomocí kitu CCK-8.
7. Kvantifikace pomocí CCK-8 kitu: odebereme médium a nahradíme ho čerstvým obsahujícím tetrazoliovou sůl WST-8 (ředěno 1:10). Buňky dále kultivujeme, všimáme si, že buňky produkují žluté barvivo (formazan). Měříme absorbanci při 450 nm.

Vyhodnocení: Získané hodnoty absorbance porovnááme s hodnotami pro pozitivní a negativní kontrolu. Hodnoty absorbance u vzorků s netoxickými antivirotiky budou blízké hodnotám u negativních kontrol (hodnoty budou v rozmezích 1 – 1.5). Hodnoty absorbance u vzorků s toxickými antivirotiky budou blízké hodnotám i pozitivních kontrol (hodnoty budou v rozmezích 0.1 – 0.2).

Poznámka: Pro testování citlivosti viru na antivirotikum je třeba také znát hodnotu CC_{50} daného antivirotika, aby mohl být vypočítán SI index. Experimenty a výpočty spojené se získáním hodnot CC_{50} jsou obdobné jako pro hodnoty EC_{50} , pouze namísto % inhibice pracujeme s % životaschopnosti (viability) buněk. V praxi proto není výpočet demonstrován.

Téma 2. Studium rezistence viru na antivirotikum

Rezistence na antivirotika představuje jeden s hlavních problémů soudobé antivirové terapie založené na nízkomolekulárních inhibitorech virové replikace. Na rozdíl od bakteriální rezistence k antibiotikům, která bývá často důsledkem horizontálního genového přenosu mezi bakteriálními kmeny, u virů bývá rezistence k antivirotikům následkem vzniku bodových mutací. Takové mutace označujeme jako mutace zodpovědné za rezistenci („resistance-conferring mutations“), jsou často zcela unikátní a charakteristické pro určitý inhibitor (léčivo). Proto tyto mutace označujeme jako tzv. „signature mutations“. RNA viry, jako např. flaviviry, replikují svůj genom pomocí RNA-dependentních RNA-polymeráz, které se vyznačují vysokou chybovostí replikace a absencí schopnosti rozpoznat a nahradit chybně zařazené nukleotidy („tzv. error-prone replication“). Takový způsob replikace a vysoká mutabilita je pro tyto skupiny virů evolučně výhodná, neboť jim umožňuje adaptovat se na selekční tlaky působící během životního cyklu viru (rozpoznání receptorů, únik před imunitním systémem, překonávání buněčných a tkáňových bariér atd.).

Vznik rezistence k nízkomolekulárním inhibitorům virové replikace je vždy spjat s překonáním tzv. bariér pro vznik rezistence. Tyto bariéry mohou být buď genotypové, tedy přímo související se vznikem příslušných mutací v genomové DNA/RNA, nebo fenotypové, související s životaschopností a růstovými vlastnostmi rezistentních virových mutant. Nukleosidové inhibitory virových polymeráz interagující přímo s aktivním místem virové polymerázy (tzv. „direct acting antivirals“), mívají vyšší genotypovou bariéru než ne-nukleosidové (allosterické) inhibitory, které se vážou do jiného místa (než aktivního) na povrchu enzymu a které tak nepřímou působí konformační deformaci aktivního místa. Znamená to tedy, že vznik rezistence na nukleosidové inhibitory je obecně obtížnější a časově náročnější než vznik rezistence na allosterické inhibitory. Vznik rezistence na některé inhibitory je spjat s nízkou genotypovou a vysokou fenotypovou bariérou, příslušné mutace tedy sice vznikají snadno, rychle a jsou dlouhodobě udržitelné, ale životaschopnost vzniklých mutant je velmi nízká. K nastavení vysokých bariér pro vznik rezistence se využívá tzv. kombinační terapie založená na použití směsi (koktejlů) inhibitorů, které specificky interagují s různými virovými proteiny, např. s polymerázou, proteázou a proteinem rozpoznávajícím receptor. Rezistence k takovým koktejlům jsou vzácné a kombinační terapie představuje v současnosti hlavní trend antivirové terapie zavedené do klinické praxe.

Diagnostika rezistence viru na antivirové léčivo má zásadní význam pro stanovení účinné terapie a má velmi často významný vliv na prognózu onemocnění. To se týká zejména pacientů s HIV, HBV nebo HCV infekcemi. Diagnostika rezistence se provádí molekulárně-biologickými metodami, kdy izolujeme virový genom a pomocí sekvenačních technik stanovujeme mutace charakteristické pro rezistenci na daný typ léčiva. Experimentálně lze rezistenci prokázat kultivací *in vitro* viru izolovaného z pacienta v prostředí obsahující léčivo. Řada rezistentních virových mutant selektovaných *in vitro* má silně pozměněný fenotyp (odlišná růstová kinetika, změny v morfologii plaků, snížená schopnost infikovat hostitele, atenuace atd.).

Ve cvičení budou prováděny úlohy zaměřené na experimentální průkaz rezistence klíšťaty přenášeného flaviviru na vybraná antivirotika (zejména na 2'-C-modifikované nukleosidy) a dále na bioinformatickou analýzu sekvence virového genomu s cílem nalézt mutace zodpovědné za rezistenci. Jako v předchozím případě je třeba pohlížet na demonstrované

metody jako na modelové systémy, které však využívají stejných principů jako testy prováděné se schválenými léčivými látkami na jiných typech virů v klinických laboratořích.

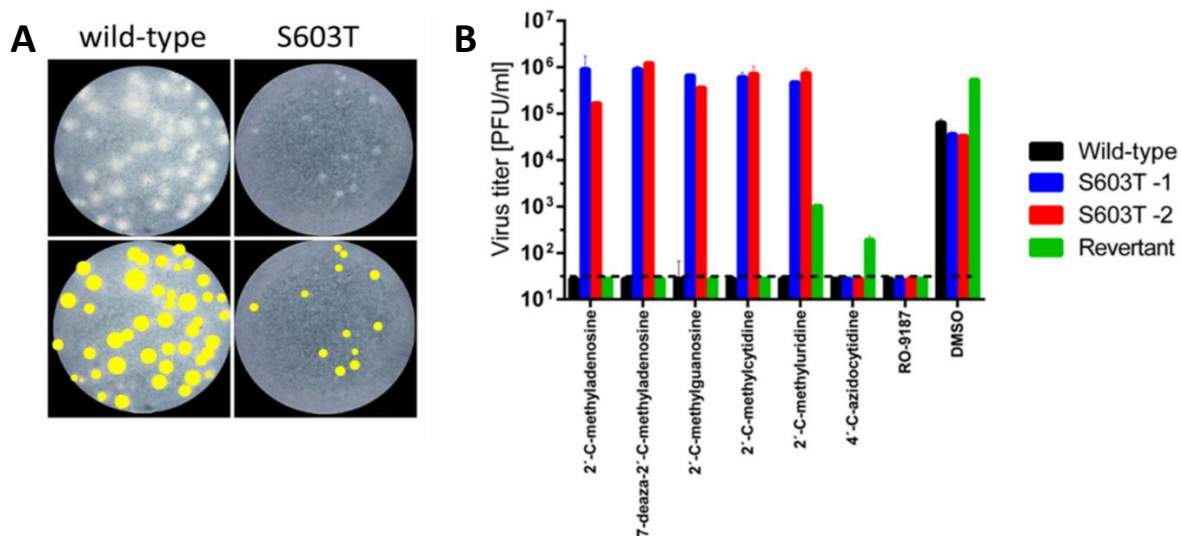
Úkol 1. Experimentální ověření rezistence viru na nukleosidové antivirotika

Materiál: Klíšťaty přenášený flavivirus (standardní typ, wild-type), mutantní kmen viru rezistentní na antivirotika (titr zásobní suspenze obou virů cca 10^6 PFU/mL), 2'-C-methylové řady, antivirotika (zásobní koncentrace 10 mM): 2'-C-methyladenosin, 2'-C-methylguanosen, 2'-C-methylcytidin, 7-deaza-2'-C-methyladenosin.

Postup práce:

1. Připravíme roztoky antivirotik o koncentraci $50 \mu\text{M}$ (pro každé antivirotikum) v médiu L15 (vycházíme ze zásobních roztoků 10 mM). Celkový objem každého antivirotika bude 1 mL.
2. Do takto připravených naředěných vzorků přidáme virus do celkového MOI 0.1. Použijeme jak standardní virus (wild-type), tak mutantní variantu.
3. Kultivujeme několik dnů (obvykle dva až tři dny), dokud není na buňkách pozorovatelný CPE. Mutantní virus je třeba kultivovat déle (až 5 dní), aby byl CPE patrný.
4. Po inkubaci odsajeme médium a provedeme plakovou titraci.

Vyhodnocení: Všimáme si rychlosti růstu viru standardního typu a mutantního kmene. Zatímco standardní virus vytvoří CPE během 2-3 dnů inkubace, mutant se replikuje výrazně pomaleji (CPE je patrný až po 5 dnech). Odlišná je také morfolgie plaků – standardní virus má plaky velké a čiré, zatímco mutant je charakteristický drobnými zakalenými plakami (obr. 20). Hlavní rozdíl mezi oběma viry však bude spočívat v tom, že standardní virus není schopen replikovat se v přítomnosti antivirotika (roste pouze na buňkách neošetřených nukleosidovými analogy). Mutant roste jak na buňkách bez antivirotika, tak na buňkách ošetřených antivirotikem, a to i při poměrně vysokých koncentracích látky ($50 \mu\text{M}$).



Obrázek 20. Příklad rezistence viru na antivirotika. (A) Rozdíly v morfologii plaků klíšťaty přenášeného flaviviru standardního typu (wild-type) a mutantní rezistentní formy S603T. (B) Schopnost mutantní formy S603T replikovat se v přítomnosti nukleosidových inhibitorů 2'-C-methylové řady. Mutant není schopen růst na strukturně odlišných

nukleosidových derivátech 4'-C-azidové řady. Revertant je virus získaný kultivací mutantní formy S603T bez přítomnosti nukleosidového inhibitoru (je identický s virem standardního typu, wild-type).

Úkol 2. Bioinformatická analýza mutací v sekvenci virové genomové RNA

V tomto úkole bude demonstrována mutační analýza virového izolátu. Původním materiálem byla genomová RNA klíšťaty přenášeného flaviviru, a to jak viru standardního typu, tak mutantního kmene rezistentního na 2'-C-methylované nukleosidy. Pro účely bioinformatického porovnání bude k dispozici již známá sekvence obou genomů (resp. jejich částí, v tomto případě genu pro virovou RNA-dependentní RNA-polymerázu) získaná pomocí Sangerova sekvenování. Pomocí programu BioEdit nebo Mega-X budou oba úseky genomů viru srovnány a budou v nich nalezeny příslušné mutace. Příklady jsou uvedeny na obr. 20. Pak s využitím kompletní sekvence získané z databáze NCBI bude určena přesná poloha mutací v kompletním virovém genomu a rovněž bude stanovena pozice mutovaných aminokyselin ve virové polymeráze (RdRp).



Obrázek 20. Bioinformatická mutační analýza. (A) Výstup získaný sekvenací úseku genomové RNA klíšťaty přenášeného flaviviru (formát s příponou .ab1) editovatelný v programu BioEdit. (B) Srovnání části genomové sekvence standardního typu viru (WT) a dvou rezistentních virových mutant s vyznačenými bodovými mutacemi (zelená šipka). (C) Srovnání na úrovni aminokyselinové sekvence s vyznačenými změnami (zelená šipka). Srovnání B a C byly provedeny v programu BioEdit.

6. LABORATORNÍ ZVÍŘE VE VIROLOGII

Před objevem laboratorních technik založených na tkáňových kulturách byla pro virologický výzkum používána pouze laboratorní zvířata jako přirození hostitelé virů. Dodnes jsou laboratorní zvířata, případně jejich embrya, ve vědě a zejména ve virologii nenahraditelná a slouží pro pokročilé studie patogeneze virových nákaz, testování účinnosti antivirotik, ověřování virulentních vlastností virů a virových mutant, studium genetické predispozice citlivosti na virové infekce a v neposlední řadě k přípravě vakcín.

Práce s laboratorními zvířaty je ošetřena zvláštní legislativou (v ČR se jedná o zákon č. 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání) a experimenty na zvířatech mohou provádět pouze pracovníci se zvláštní kvalifikací, kterou dokládají pomocí dokumentu „Osvědčení o odborné způsobilosti k navrhování pokusů a projektů pokusů podle §15d odst. 3 zákona č. 246/1992 Sb.“. Právní předpisy a vyhlášky dále stanovují, v jakých podmínkách mají pokusní jedinci žít, tzn. míra osvětlení, hladina hluku, denní režim, potrava (i zastoupení jednotlivých výživových látek), velikost chovných nádob, způsob nakládání atd.). Každý experiment na zvířatech musí být ošetřen žádostí o schválení projektu pokusu, která je posouzena příslušným státním orgánem (např. Akademie věd ČR, Ministerstvo zemědělství, Ministerstvo zdravotnictví atd.) a který vydá rozhodnutí o schválení a oprávnění vykonávat pokusy na zvířatech.

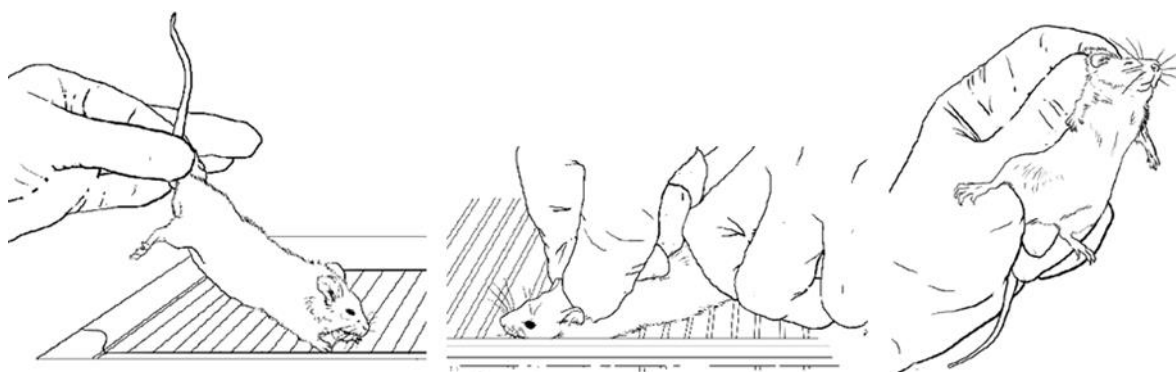
Nejčastěji se pro virologický výzkum používají hlodavci (myši, potkani, morčata), kteří svou velikostí i chovnými nároky vyhovují většině laboratorních zařízení. Některé kmeny hlodavců, zejména laboratorních myší, jsou vysoce citlivé na určité skupiny virů (např. BALB/c je vysoce vnímavá na virus klíšťové encefalidity, virus západonilské horečky nebo některé herpetické viry). Některé viry však nepůsobí na většině myších kmenů viditelné projevy infekce, nebo se v myších vůbec nereplikují (např. virus Zika, Dengue nebo SARS-CoV-2). V takových případech je třeba zvolit sající, mladé nebo imunokomprimované myši (např. AG129 neexprimující INF- α/β and INF- γ receptory, IFNAR $^{-/-}$ postrádající pouze IFN- α/β receptory), nebo kompletně imunosuprimované myši. V některých případech je možno použít virové kmeny adaptované na hlodavce (např. kmen viru žluté zimnice Jimenez adaptovaný na křečky). Pro studium SARS-CoV-2 se užívá myší model založený na humanizovaných myších, schopných exprese lidského ACE2 receptoru v plicních buňkách, což je činí vysoce vnímavými k SARS-CoV-2.

K dalším využívaným zvířecím modelům ve virologii patří fretka (pro studium viru chřipky) a v případě, že je třeba co nejvěrněji napodobit fyziologické podmínky lidského hostitele, jsou využíváni i primáti. Podle zákona č. 246/1992 Sb. se subhumánní primáti nesmějí používat k pokusům s výjimkou, že se pokus provádí s cílem zabránit nebo předcházet klinickým stavům, které oslabují člověka nebo které mohou ohrozit lidský život, nebo takové stavy diagnostikovat či léčit a dále, kdy je vědecky doloženo, že účelu pokusu nelze dosáhnout za použití jiných druhů pokusných zvířat než subhumánních primátů. Pro tvorbu vakcín se v minulosti hojně používala kuřecí embrya. Pro některé viry se jako modelové hostitelské organismy používají také prasata nebo přežvýkavci.

Téma 1. Manipulace s experimentálním zvířetem

Ve cvičení budeme demonstrovat běžnou manipulaci s laboratorní myší, která se používá při provádění virologických experimentů (obr. 21 a 22). Základem manipulace je kvalitní

anestezie, která minimalizuje stres zvířete spojený s manipulací a prováděnými zákroky i riziko pracovního úrazu pro osobu provádějící úkon. Anestezie se provádí buď jako krátkodobá (za použití etheru nebo isofluranu) trvající pouze několik sekund potřebných pro manipulaci (injekce léčiva, experimentální infekce atd.), nebo dlouhodobá (velmi hluboká anestezie za použití injekčně podávaných roztoků anestetik) pro časově náročnější úkony nebo úkony, při kterých dojde k usmrcení zvířete (např. celková perfúze). Běžnými typy úkonů jsou pak experimentální infekce a aplikace léčiv. Rozlišujeme několik druhů aplikací podle místa podání: injekční subkutánní (s.c.), intraperitoneální (i.p.), intramuskulární (i.m.) nebo intracerebrální (i.c.). Látky vstřebatelné přes trávicí trakt se aplikují perorální cestou (p.o.) speciální sondou napojenou na injekční stříkačku. Látky působící v dýchacím systému se aplikují intranasálně (i.n.), a to buď kapáním, nebo tzv. nebulizací, kdy zvíře vdechuje drobné kapénky vytvořené nebulizérem. Stejně se provádějí také infekce respiračními viry. U infikovaných zvířat monitorujeme hmotnost, celkové klinické skóre (postupný vývoj symptomů infekce) a úmrtnost. Velmi často je nutno odebírat experimentálním zvířatům krev pro další analýzy (např. virémie, tvorba protilátek atd.). Malé množství krve (10 – 50 μ L) se odebírá z ocasní žíly. Virus se kvantifikuje z odebraných orgánů, podle toho, o jaký virus se jedná a jaká je jeho cílová tkáň (např. virus klíšťové encefalitidy nebo virus západonilské horečky se detekuje v mozku, SARS-CoV-2 v plicích atd.). Kvantifikaci viru z orgánů se provádí klasickou plakovou titrací, případně pomocí kvantitativní PCR. Patologické změny, které replikace viru v orgánech působí, lze následně hodnotit histologickými nebo histochemickými metodami. Pitvy myši je třeba provádět v laminárních boxech, a to jednak kvůli aseptické práci a jednak kvůli riziku infekce.



Obrázek 21. Manipulace s laboratorní myši. Uchopení a fixace myši za dorzální kožní řasu.

Úkol 1. Celková anestezie laboratorní myši a experimentální infekce

Materiál: Živá laboratorní myš (např. kmen BALB/c), inzulinové injekční jehly/stříkačky, ether a nádoba na krátkodobou anestezii, anestetikum (směs 8 mL 5% Narkamonu (ketamini hydrochloridum) a 2 mL 2% Rometaru (xylazini hydrochloridum))

Přístrojové vybavení: Biohazardní box s laminárním prouděním vzduchu

Pracovní postup:

1. *Krátkodobá anestezie etherem.* Přenést laboratorní myš do nádoby pro krátkodobou anestezii, do nádoby je vložena buničina napuštěná etherem. Myš je ponechána v nádobě několik sekund.

2. *Dlouhodobá anestezie.* Injekce myši, která se nyní nachází v krátkodobé anestezii, cca 50 μL (dle velikosti/hmotnosti zvířete) směsi Narkamon/Rometar do stehenního svalu. Anestetikum necháme působit 5 – 10 min.
3. *Demonstrace s.c. infekce.* Myš v celkové anestezii položíme na stůl nebo podložku a pomocí dvou prstů (palce a ukazováku) levé ruky lehce napneme kožní řasu za hlavou. Pravou rukou injikujeme do podkoží 200 μL fyziologického roztoku, který simuluje virovou suspenzi (Obr. 22).
4. *Demonstrace i.p. infekce.* Myš uchopíme do dlaně levé ruky břišní stranou vzhůru, přičemž ukazovákem a palcem držíme myš za dorzální kožní řasu a ostatními prsty napínáme kožní řasu a ocas. Tím myš fixujeme v poloze, která umožní snadný a bezpečný vpich do peritonea. Injekční stříkačku držíme v pravé ruce, injikujeme 200 μL fyziologického roztoku, který simuluje virovou suspenzi (Obr. 22).

Úkol 2. Odběr vzorku krve z ocasní žíly, vykrvení zvířete a odběr orgánů

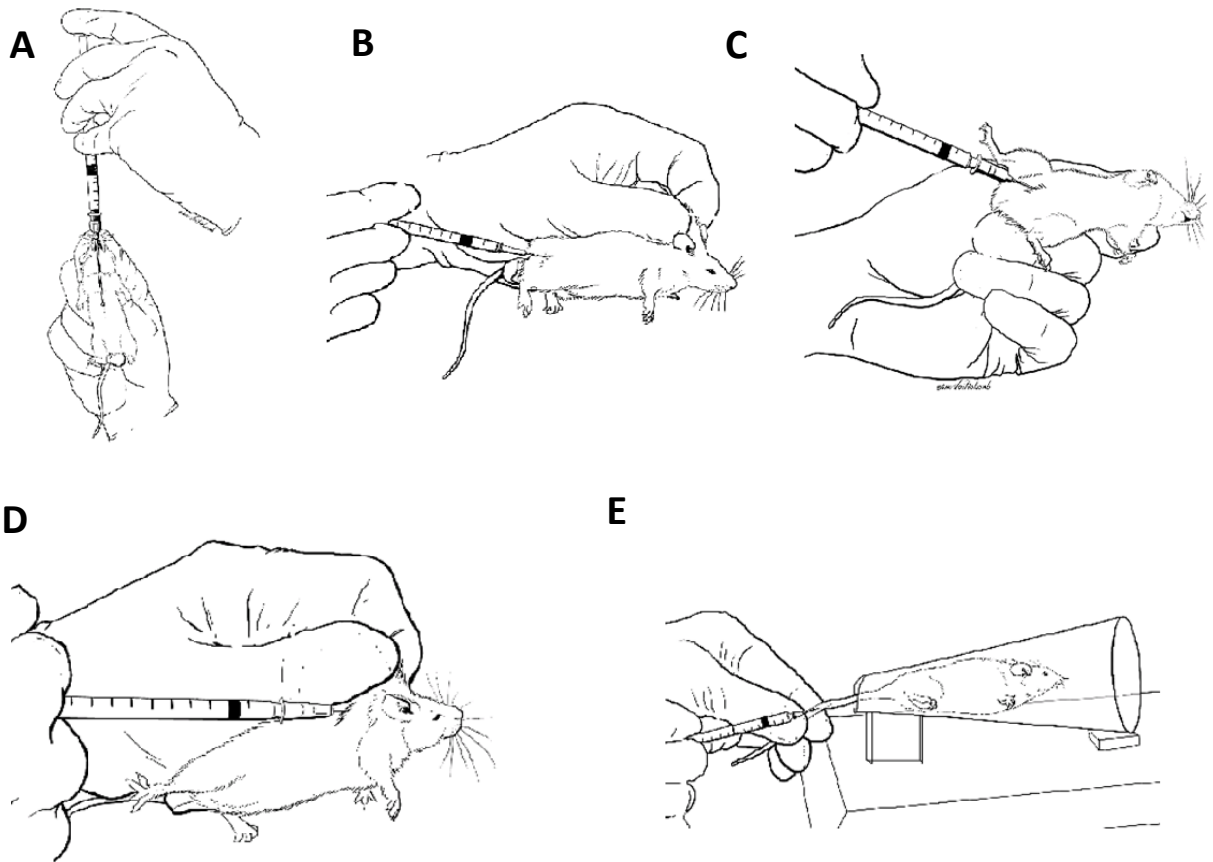
Materiál: Živá laboratorní myš (např. kmen BALB/c) pod anestézií získaná v předchozím úkolu, nahřívací lampička nebo horká lázeň, žiletky, nástroje pro laboratorní pitvu, pitevní podložka. Pracujeme v laminárním boxu.

Přístrojové vybavení: Biohazardní box s laminárním prouděním vzduchu

Pracovní postup:

1. *Odběr vzorku krve z ocasní žíly.* Odběr je možno provést zaživa (myš fixujeme pod Petriho miskou nebo ve speciálním fixačním zařízení, obr. 22) nebo v anestezii. Nahřejeme ocas myši lampičkou nebo v horké lázni, čímž dojde k roztažení cév v oblasti ocasu a k vyššímu průtoku krve cévami. Ocasní žíla je většinou dobře patrná. Žiletkou provedeme krátký a rychlý řez napříč ocasní žílou. V místě řezu se objeví kapka krve, kterou jímáme pomocí pipety do připravené zkumavky. Pro většinu sérologických stanovení postačí 10 μL krve. Doporučuje se krev odebírat do zkumavky s připraveným PBS (90 μL), získáme tak 10x ředěnou krev.
2. *Vykrvení zvířete.* Myš v hluboké anestezii fixujeme na polystyrenovou podložku břišní stranou vzhůru. Odpreparujeme kůži přibližně v místě jedné z klíčních kostí a nůžkami přestříháme krkavici. Vytékající krev jímáme pipetou do zkumavky. Po vykrvení usmrtíme zvíře pomocí cervikální dislokace (zlomení vazy).
3. *Odběr orgánů pro virologická stanovení.* Usmrcenou myš fixujeme na polystyrenovou podložku břišní stranou vzhůru. Nůžkami a pinzetou opatrně odpreparujeme kůži, začínáme preparovat v břišní oblasti a postupujeme nahoru k hrudníku a k hrdlu zvířete. Odpreparovanou kůži fixujeme špendlíky k podložce. Otevřeme pobřišnici a postupujeme vzhůru k hrudníku. Nakonec otevřeme hrudní koš. Pro virologická stanovení odebíráme nejčastěji (i) slinné žlázy, (ii) plíce, (iii) srdce, (iv) játra, (v) slezinu, (vi) ledviny a (vii) lymfatické uzliny.
4. *Odběr mozku pro virologická stanovení.* Myš fixujeme na polystyrenovou podložku hřbetní stranou vzhůru. Odpreparujeme kůži z oblasti hlavy. Provedeme stříh mezi očnicemi, abychom přerušili čichové laloky mozku. Odstříháme temenní kost. Mozek podebereme nůžkami směrem od čichových laloků a přerušíme mozkový kmen. Mozek vyjmeme z lebky do připravené zkumavky.

5. Orgány se analyzují nejčastěji na přítomnost živých virových částic (plaková titrace) nebo virové nukleové kyseliny (q-PCR) po předchozí homogenizaci, centrifugaci a přípravě 20% orgánových suspenzí (2 g tkáně na 8 mL PBS).



Obrázek 22. Experimentální infekce a odběr krve u myši. (A) Perorální aplikace pomocí sondy, (B) intramuskulární injekce, (C) intraperitoneální injekce, (D) subkutánní injekce, (E) odběr krve z ocasní žíly (myš je umístěna ve speciálním manipulačním trychtýři).

7. PŘÍPRAVA RŮSTOVÝCH MÉDIÍ, ROZTOKŮ, BARVIV A DALŠÍCH REAGENTŮ POUŽÍVANÝCH V PRAKTIKU

Desinfekční prostředky pro dekontaminaci infikovaného materiálu

Persteril 0,5% nebo Desam GK 4%

Médium pro PS buňky

Leibowitz-15 (L15) obohacené o 3% fetální bovinní sérum, 1% směs antibiotik a antimykotik a 1% glutamin.

Médium pro A549 buňky

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) obohacené o 10% fetální bovinní sérum, 1% směs antibiotik a antimykotik a 1% glutamin.

Trypsin pro pasážování buněk

0,025% trypsin v EDTA (ze zásoby trypsinu 0,25% v PBS, Bio Sera)

Karboxymethylcelulóza

Carboxymethylcellulose sodium salt Medium viscosity (Sigma)

3% roztok v destilované vodě (sypat do vody, nechat 4-24 hod bobtnat, pak sterilizace v autoklávu)

Naftalenová čern, celkový objem 1L

940 ml vody

60 ml ledové (100%) kys. octové

13,5 g octan sodný

1 g NAPHTOL BLUE BLACK (Sigma)

Fyziologický roztok

0.9% roztok NaCl v destilované vodě

Blokační roztok pro imunofluorescenční barvení

10% bovinní fetální sérum v PBS (9 mL PBS + 1 mL bovinního fetálního séra)

Fosfátový pufr (PBS) 10x koncentrovaný, celkový objem 1 L

NaCl – 85 g, NaH₂PO₄ – 3.2 g, Na₂HPO₄ – 26.9 g

Promývací roztok (PBS-Tween 20), celkový objem 2 L

2 L PBS + 1 mL Tween 20

Promývací roztok (10x) pro ELISA, celkový objem 300 mL

0.1 M Tris/HCl pH 7.4 obsahující detergent a konzervant. Před použitím naředit 10x (270 mL destilované vody + 30 mL promývacího roztoku)

50x TAE (Tris – kyselina octová – EDTA), celkový objem 1 L

EDTA (50 mM)

Tris (2 M)

ledová kyselina octová (1M)

Příprava EDTA (500 mL, pH 8): 93,05 g EDTA, rozpustit v 400 mL deionizované vody, upravit pH pomocí NaOH na 8. Doplnit na 500 mL, autoklávovat.

Příprava 50x TAE: 242 g Tris-base, rozpustit v 700 mL destilované vody, přidat 57,1 mL ledové kyseliny octové a 100 mL 0,5 M EDTA (pH 8). Doplnit na 1 L.

1,2% agarózový gel pro elektroforézu

0.34 g agarózy + 28 mL TAE pufru, po zchladnutí přidat Simply Safe (vizualizační barvivo) 5 μ L/100 mL gelu (= cca 0.5 μ L)

Roztoky antivirotik (50 μ M, celkový objem 1 mL)

Zásobní roztoky jsou 10 mM v DMSO.

5 μ L zásobního roztoku + 1 mL růstového média

Reagent CCK-8 pro kvantifikaci CPE

1 mL reagentu CCK-8 (Dojindo Molecular Technologies) + 10 mL růstového média

Injekční anestezie pro experimentální zvíře (myš)

8 mL 5% Narkamon (Ketamini hydrochloridum) a 2 mL 2% Rometar (Xylazini hydrochloridum)

8. DOPORUČENÁ LITERATURA K DALŠÍMU STUDIU

JURÁNKOVÁ, Jana. Klinická mikrobiologie v laboratorní praxi. Bakalářský obor Zdravotní laborant. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2011. 73 s. ISBN 978-80-210-5657-2.

KNOZ, Jan a Věra OPRAVILOVÁ. Základy mikroskopické techniky. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 1992. 195 s. ISBN 80-210-0473-8.

M. Votava et al. Lékařská mikrobiologie: Vyšetřovací metody. 1st edition. Neptun, 2010.

PRICE, Christopher, P., a NEWMAN, David, J. (Ed.). Principles and Practices of Immunoassay. 2. vyd. London: Macmillan Reference LTD, 1997, 667 s., ISBN 1-56159-145.

VEENSTRA, Timothy, D. a YATES John, R. (Ed.). Proteomics for Biological Discovery. New Jersey: John Wiley and Sons, Inc, 2006, 326 s, ISBN 978-0-471-16005-2.

VOTAVA, Miroslav, Filip RŮŽIČKA, Vladana WOZNICOVÁ, Lenka ČERNOHORSKÁ, Milada DVOŘÁČKOVÁ, Monika DVOŘÁKOVÁ HEROLDOVÁ, Veronika HOLÁ a Ondřej ZAHRADNÍČEK. Lékařská mikrobiologie: Vyšetřovací metody. 1. vyd. Brno: Neptun, 2010. 495 s. ISBN 978-80-86850-04-7.

WILD, David (Ed.). The Immunoassay Handbook. 2. vyd. New York: Nature Publishing Group, 2001, 906 s., ISBN 1-56159-270-6.

ŠMARDA, Jan, Jiří DOŠKAŘ, Roman PANTŮČEK, Vladislava RŮŽIČKOVÁ a Jana KOPTÍKOVÁ. Metody molekulární biologie. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2005. 194 s. 1. vydání. ISBN 80-210-3841-1.

METODY MIKROBIÁLNÍ DIAGNOSTIKY
VYBRANÉ VIROLOGICKÉ METODY
Praktická cvičení

Učební text
RNDr. Luděk Eyer, Ph.D.
Brno, 2022
Druhé vydání

ISBN 978-80-7672-028-2