

Obecná virologie a vyšetřovací metody

Petr Hubáček

Ústav lékařské mikrobiologie a Klinika dětské hematologie a onkologie
2. Lékařské fakulty Univerzity Karlovy a FN Motol



Co je virus?

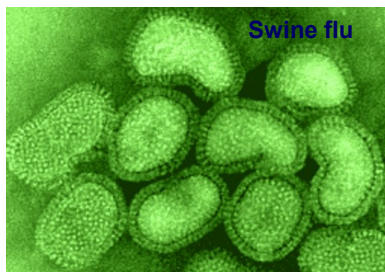
Jsou submikroskopické částice, složené z nukleové kyseliny a bílkovin, infikující a reprodukcující se v buňce.

Pomnožení viru probíhá pouze v infikované buňce.

Viry neobsahují translační systém, tvořený z ribozómů a z transferových RNA, který je pro syntézu proteinů nezbytný. Proto syntéza virových proteinů může proběhnout jen s použitím translačního systému hostitelských buněk organismů, jako jsou bakterie, živočichové a rostliny.

Některé viry, např. poxviry, herpesviry nebo rabdoviry obsahují enzymy uplatňující se při virové reprodukci uvnitř svých virionů.

Virion je kompletní zralá virová částice schopná infikovat permissivní buňku.

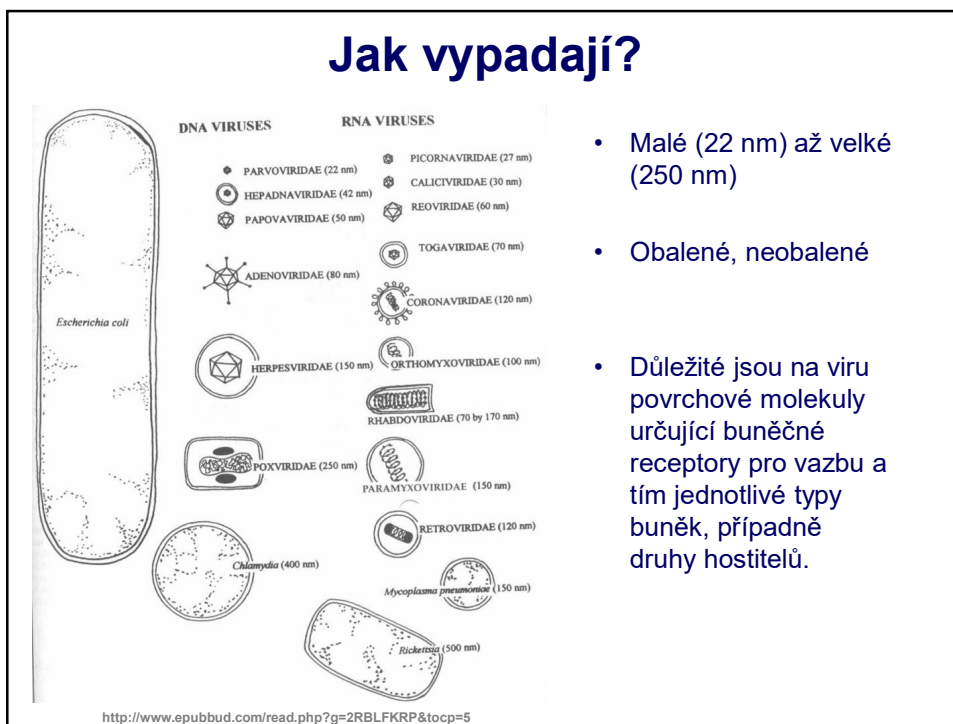


Swine flu



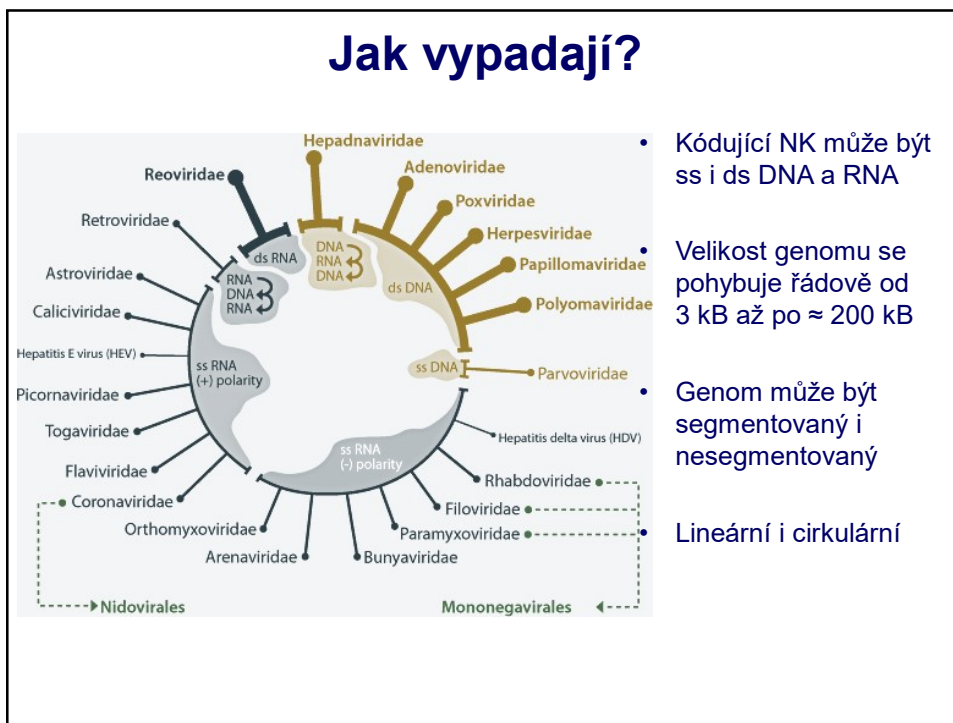
Život je boj.

Jak vypadají?

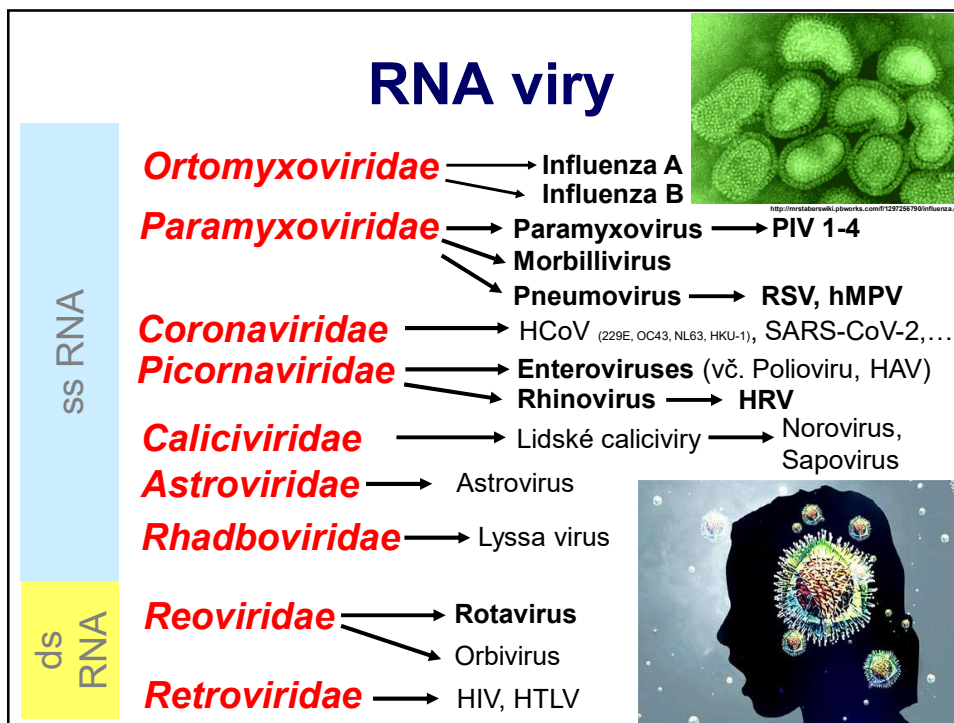
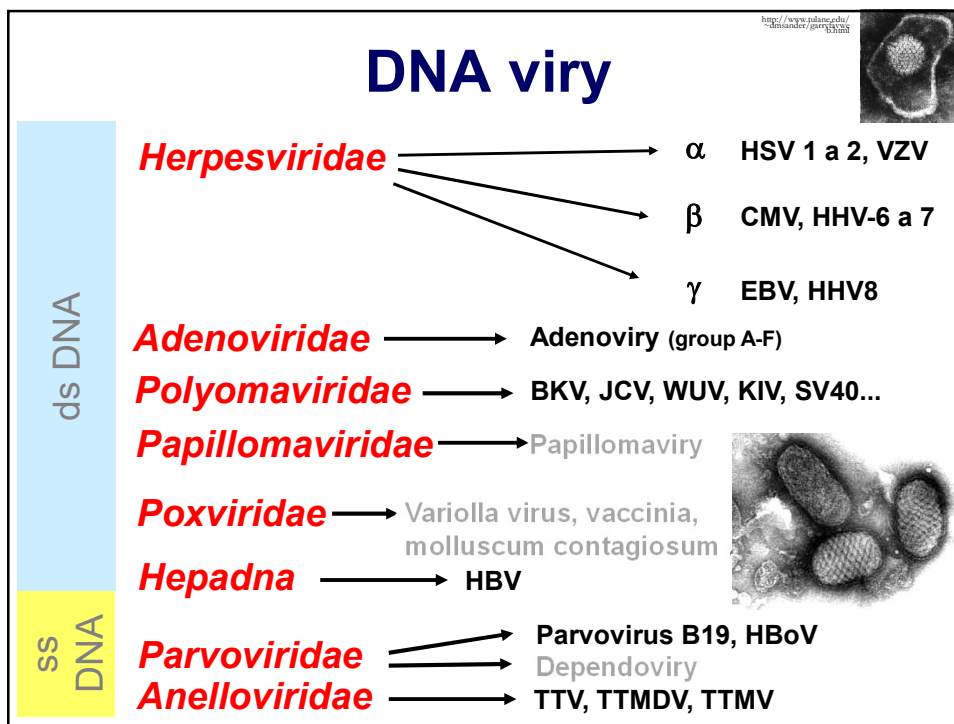


- Malé (22 nm) až velké (250 nm)
- Obalené, neobalené
- Důležité jsou na viru povrchové molekuly určující buněčné receptory pro vazbu a tím jednotlivé typy buněk, případně druhy hostitelů.

Jak vypadají?



- Kódující NK může být ss i ds DNA a RNA
- Velikost genomu se pohybuje řádově od 3 kB až po \approx 200 KB
- Genom může být segmentovaný i nesegmentovaný
- Lineární i cirkulární

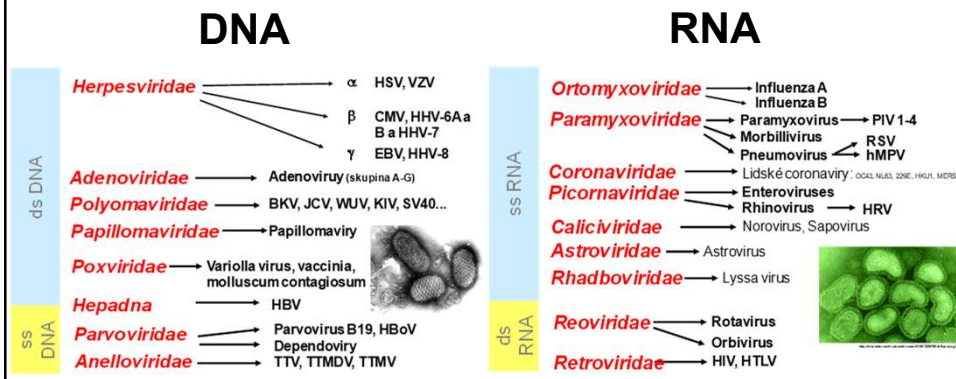


Má to smysl?



Mnoho virů kolem nás

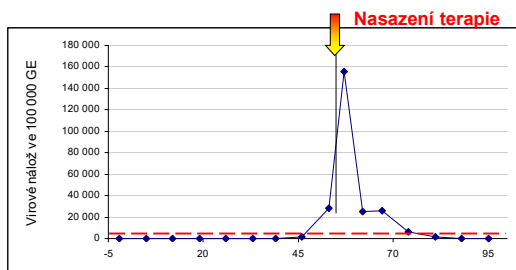
Obalené / neobalené – různá fyzikální a chemická stabilita
RNA / DNA - rozdíl ve stabilitě a často i infekciozitě



Větší, zpravidla větší množství genů.
Často – chronické a latentní infekce.
Manipulace s imunitním systémem.
Změny v genech regulace buněčného cyklu – anti-apoptické působení.

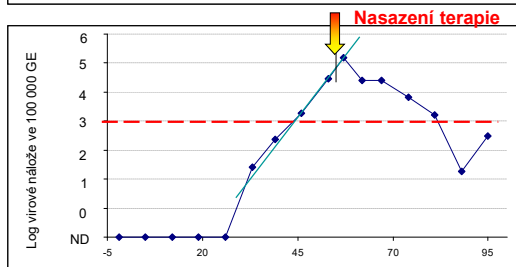
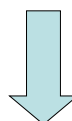
Menší, menší množství genů.
Rychlejší a akutnější průběh onemocnění.
Přes TRL, IFN- větší systémové dopady infekce.
Vyšší rychlost změn genomu.

Exponenciální proliferace virů



In vivo je popsán doubling time CMV mezi

48-72 hodinami



Day	Diff. in days	CMV NVCs	Vypočítaná nálož do dalšího vyšetření při čase 48 hodin
19	7	0	
26	7	0	
33	7	260	
39	6	2 300	2 060
46	7	18 700	27 500
53	7	281 700	224 400

Pacientka s AML po alogenní HSCT

Jde o exponenciální proliferaci.

Rychlé změny genomu CMV

Whole genome sequencing – NGS.

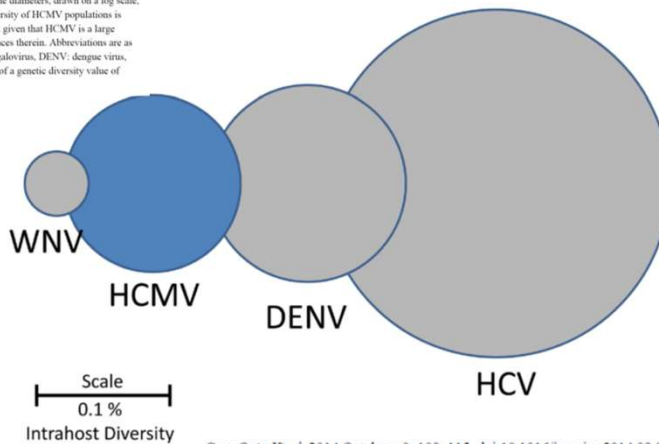
Human Cytomegalovirus Intrahost Evolution – A New Avenue for Understanding and Controlling Herpesvirus Infections

Nicholas Renzette¹, Laura Gibson², Jeffrey D. Jensen^{3,4,5}, and Timothy F. Kowalik^{1,6,*}

Figure 1. HCMV Intrahost genetic diversity as compared to RNA viruses. Viral intrahost diversities are represented as circles with the diameters, drawn on a log scale, representing reported values of diversity. The genetic diversity of HCMV populations is comparable to those of RNA viruses, an unexpected result given that HCMV is a large dsDNA virus. Values were obtained from [16] and references therein. Abbreviations are as follows: WNV: West Nile Virus, HCMV: human cytomegalovirus, DENV: dengue virus, HCV: hepatitis C virus. Scale bar represents the diameter of a genetic diversity value of 0.1%.

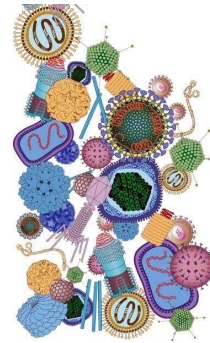
Reinfekce u 10%

Predominantní sekvence u asi 90% virové populace.



Curr Opin Virol. 2014 October ; 0: 109–115. doi:10.1016/j.coviro.2014.08.001.

Rovnováha u (imunosuprimovaného) pacienta



Imunitní systém

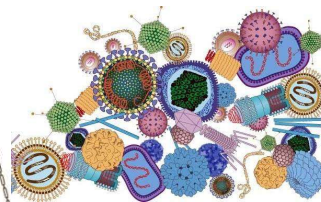
(imunosupresivní léčba, chemoterapie, ...)



Patogeny

Regulované lymfocyty – viry , mykózy

Rovnováha u imunosuprimovaného pacienta



Imunitní systém

(imunosupresivní léky, chemoterapie, monoklonální protilátky, metabolický stav...)



Patogeny

Regulované lymfocyty – viry , mykózy



*U pacientů s kortikoidy a imunosupresivní terapií se příznaky nemusí plně rozvinout, nebo mohou být různě modifikovány, včetně výrazně urychleného a závažného průběhu infekce. **Nemusí fungovat původní očkování.***

Vždy vyšší riziko rozvoje symptomatické nemoci s postižením orgánů.

Vyšetřovací metody ve virologii

- Mikroskopické **Přímá detekce**
- Kultivační
- Průkaz antigenu
- Průkaz nukleové kyseliny

- Průkaz protilátek
- (Příznaky onemocnění)

Nepřímá detekce

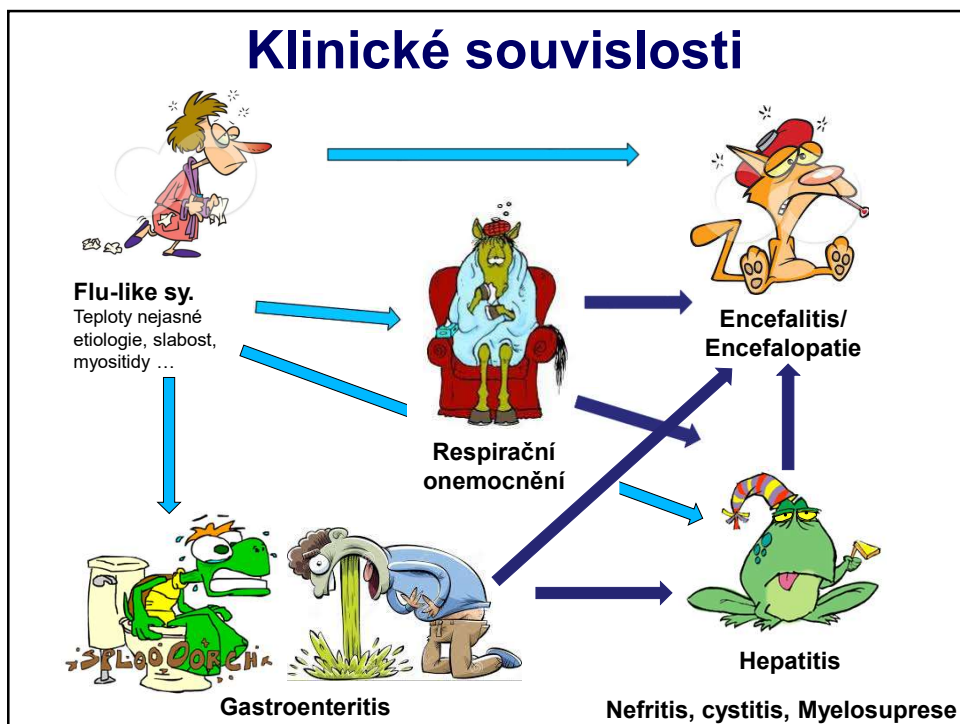
Příznaky nemoci

Klinické příznaky vedoucí k podezření na virovou infekci (poliomyelitida) byly poprvé popsány 3 700 let př. n. l. v Egyptě.

Typické příznaky jsou například u:

- varicelly
- zosteru
- plně rozvinuté IM
- papillomavirové infekce (bradavice)
- u HHV-8 a dalších virových infekcí





MAJOR ARTICLE

Astrovirus VA1/HMO-C: An Increasingly Recognized Neurotropic Pathogen in Immunocompromised Patients

Julianne R. Brown,^{1,2} Sofia Morfopoulou,³ Jonathan Hubb,⁴ Warren A. Emmett,³ Winnie Ip,⁵ Divya Shah,² Tony Brooks,⁶ Simon M. L. Paine,^{7,9} Glenn Anderson,⁷ Alex Virasami,² C. Y. William Tong,⁴ Duncan A. Clark,⁴ Vincent Plagnol,³ Thomas S. Jacques,^{7,9} Waseem Qasim,⁵ Mike Hubank,⁶ and Judith Breuer^{1,8}

¹Virology Department, Great Ormond Street Hospital for Children NHS Foundation Trust, ²NIHR Biomedical Research Centre, Great Ormond Street Hospital for Children NHS Foundation Trust and University College London, ³UCL Genetics Institute, University College London, ⁴Virology Department, Barts Health NHS Trust, ⁵Molecular and Cellular Immunology, ⁶Molecular Haematology and Cancer Biology Unit, Institute of Child Health, University College London, ⁷Department of Histopathology, Great Ormond Street Hospital for Children NHS Foundation Trust, ⁸Department of Infection and Immunity, and ⁹Birth Defects Research Centre, Institute of Child Health, University College London, United Kingdom

Neurotropic Pathogen HAsV VA1/HMO-C • CID 2015:60 (15 March) • 881

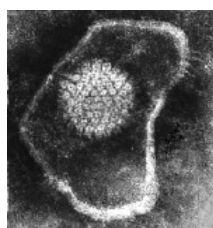
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4201444/

Mikroskopické metody

- Elektronmikroskopický průkaz viru
 - v tekutých materiálech po koncentraci viru
 - v tkáních
 - imunoelektronová mikroskopie po označení viru specifickou protilátkou
- Průkaz viru imunohistochemicky v buňkách
 - metoda histologická z biopsie
 - metoda cytologická

Elektronová mikroskopie

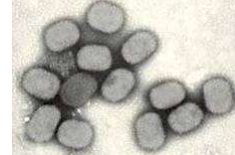
První fotografie viru byla publikována v roce 1939. Další vývoj EM tuto techniku zavedl do rutinní virologické diagnostiky, protože různá morfologie virových částic přispívá ke klinické detekci.



Herpesvirus – well documented envelop from cell membrane and capsid.

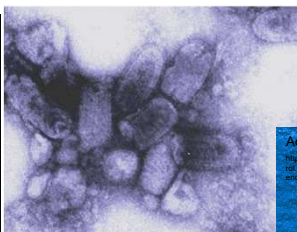
Zdroj:

6



Poxviry – molluca contagiosa

www.enrivers.com



Rhabdovirus – rabies virus

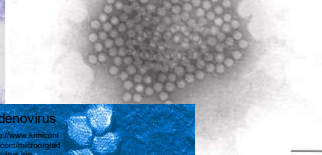
<http://www.stanford.edu/group/virus/rhabdo/2005/Rabies%20virus.htm>



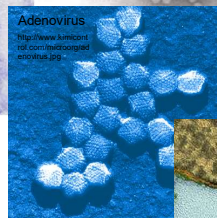
Marburg

http://content.answers.com/main/content/wp/en-commons/thumb/9/91/250px:Marburg_virus.jpg

<http://apicidalanimal.info/capso/capso11/galena/galena3/cometas.htm>
Poliovirus

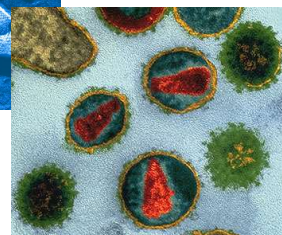


Bar = 100nm



Adenovirus

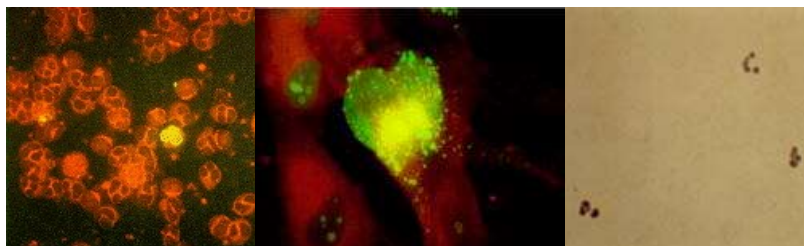
<http://www.arszooftg.com/medicovernet/microtus.jpg>



<http://i.rstnye.files.wordpress.com/2007/09/hiv.jpg>

Imunohistochemická metoda detekce

V současnosti pomocí značených monoklonálních protilátek.

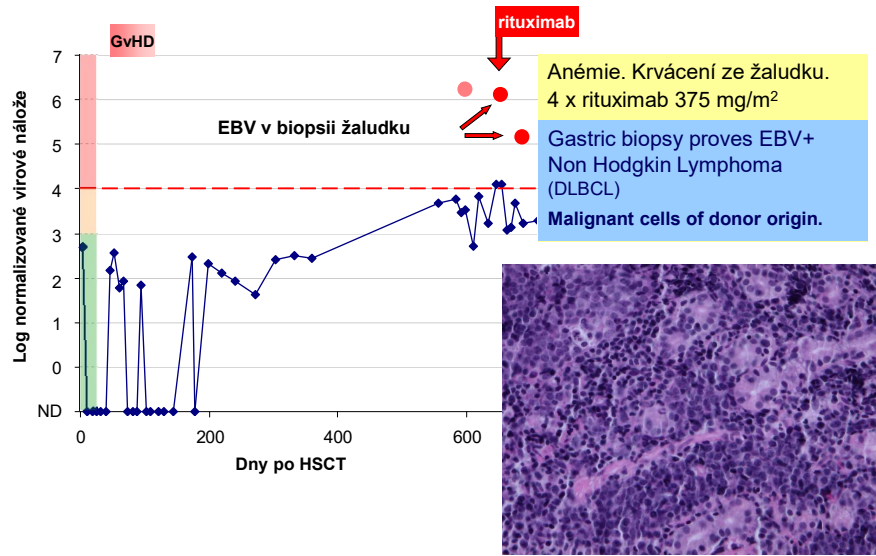


Detekce pp65 CMV antigenu pomocí fluorescenčního mikroskopu. Zdroj: <http://home.teleport.com/~bobh/inflectious/mononucleosis.htm> http://www.argene.com/pictures_gallery/zoom_images_arng/CMV_Antigenemia_periox.php

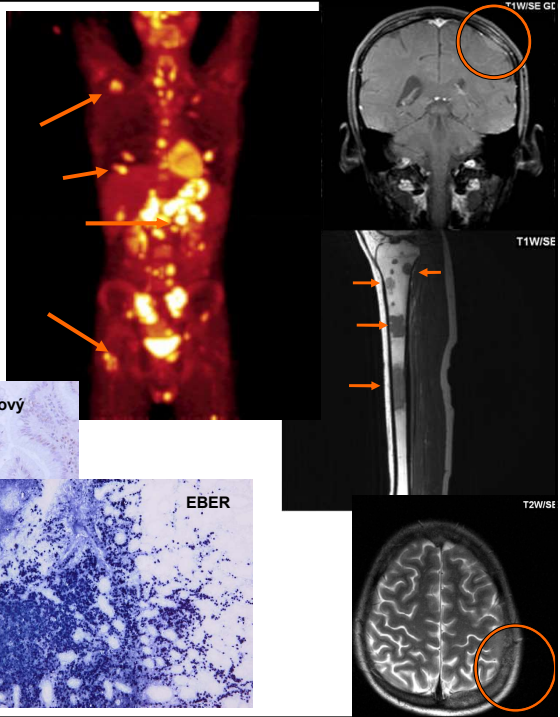
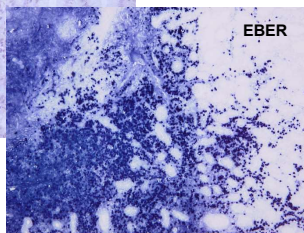
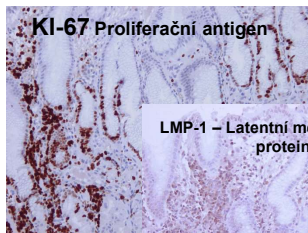
Použití mikroskopických metod

- Histochemické
 - v rámci patologicko anatomické diagnózy
- Elektronová mikroskopie
 - Pro některé typy vzorků a virů se používá
 - Citlivost nižší než u kultivace a PCR
- Optická mikroskopie
 - Může být užitečná orientační metoda
 - známky zánětu bez bakterií svědčí pro virovou etiologii

Lokalizovaná EBV-LPD (NHL)



Léčba dle protokolu
BFM NHL 2004
V průběhu posledního bloku
chemoterapie sepse
Pseudomonas aeruginosa.



Kultivační metody

- Kultivace na buněčných (tkáňových) kulturách
 - klasická s cytopatickým efektem
 - zrychlená s vizualizací viru imunochemicky
- Kultivace na kuřecím embryu
- Pokus na zvířeti

Kultivace na tkáňových kulturách

Výhody

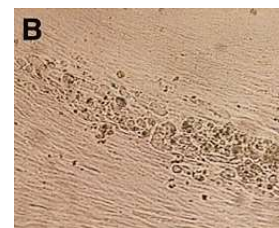
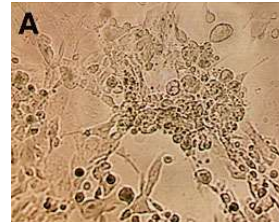
- prokazuje živý virus
- lze provádět další vyšetření viru
- zachycuje širší spektrum virů

Nevýhody

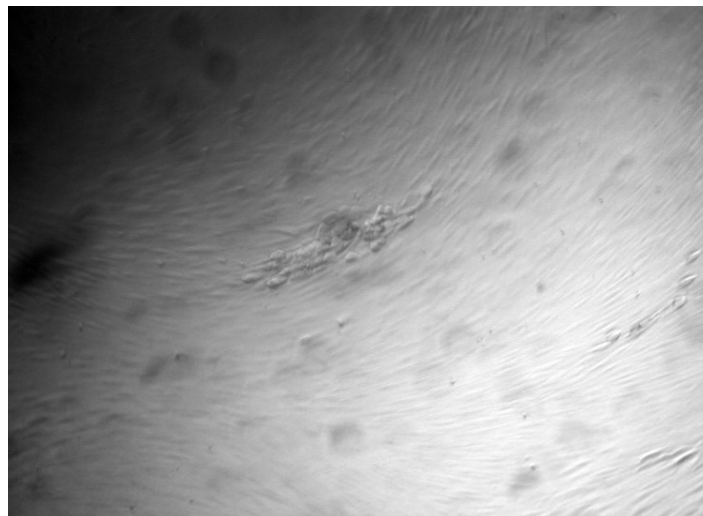
- citlivá na transport
- některé viry špatně rostou in vitro (delší doba k detekci)
- práce s TK je obtížná
- riziko kontaminace bakteriemi (často např. *Mycoplasma sp.*) a plísněmi

Kultivace na TK

Prvně použitá detekce na monovrstvě J. Endersem v roce 1949. Následně byla R. Dulbecem použita Plaque forming assay, která vedla k první kvantifikaci nálože viru a definování plaque forming units (PFU).

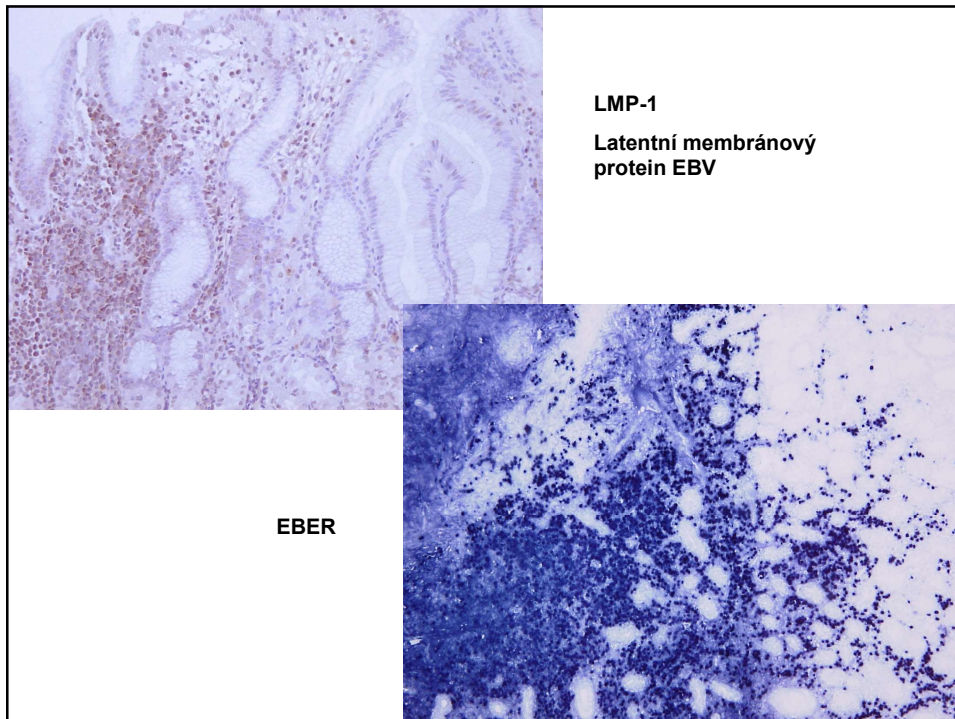
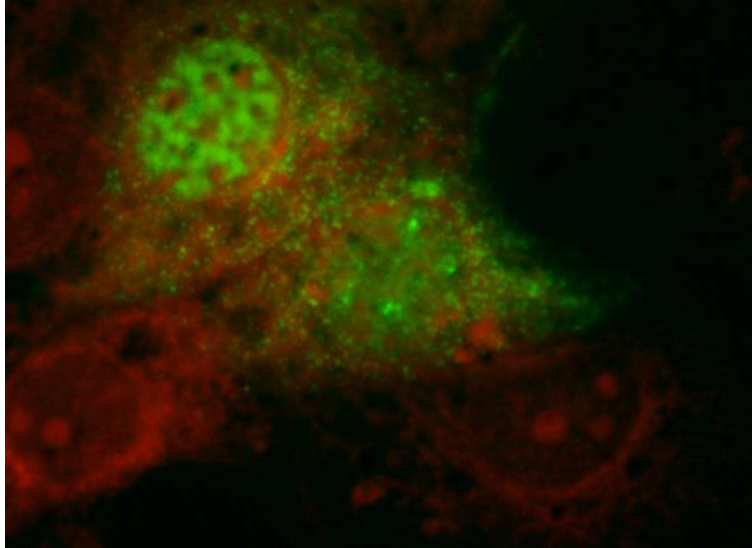


Cytopatický efekt - CMV



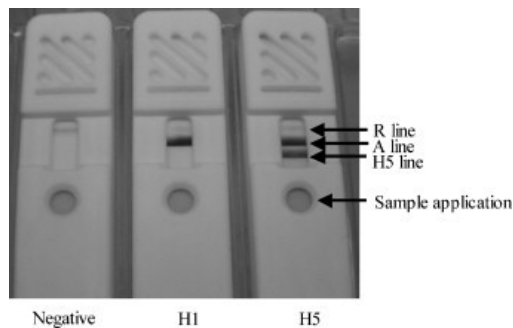
Virus Chřipky A na TK

- barveno monoklonální protilátkou s FITC



Průkaz virového antigenu

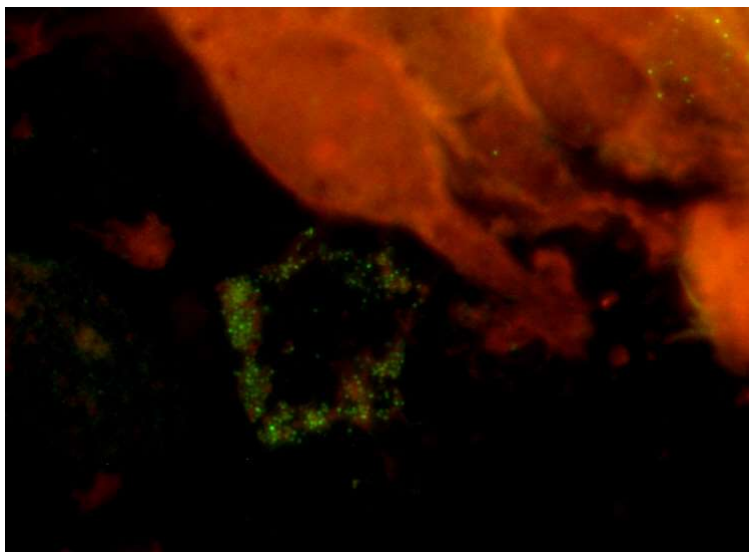
- Prokazujeme přítomnost jednoho nebo úzké palety agens
- Zjišťujeme zda je nebo není přítomno, někdy lze kvantifikovat
- Metodicky jde o reakci antigen-protilátka se známou protilátkou



**Senzitivita udávána přibližně 30-40%
v porovnání s PCR (reálně ≈20%).**

Cena testu přibližně 100-150,- Kč

Antigen Adenoviru v plicní tkáni



Použití průkazu antigenu

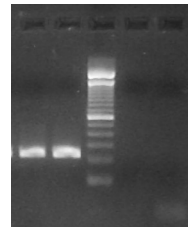
- U infekcí s definovaným klinickým obrazem a několika původci (respirační inf.)
- Infekce, které je nutné monitorovat u definované skupiny pacientů (bývalo např. CMV u imunosuprimovaných)
- Infekce, kde je antigen přítomen pravidelně a ve velkém množství (hepatitida B)

Průkaz nukleových kyselin

- Prokazujeme jedno nebo několik málo agens v reakci (singleplex vs. multiplex)
- Rozlišujeme metody
 - amplifikační NK (PCR, NASBA), amplifikace signálu - citlivé
 - bez amplifikace (genové sondy) - méně citlivé
- Rychlý s dalším potenciálem

Možnosti PCR reakcí

- Kvalitativní
 - základní diagnostika, různá citlivost
 - prokazujeme jen přítomnost nebo nepřítomnost jednoho agens
- Multiplex
 - diagnostikujeme více agens v jedné amplifikaci
 - důležitá je detekce produktu
- Kvantitativní
 - real-time PCR
 - může být i kompetitivní



Využití PCR

Výhody

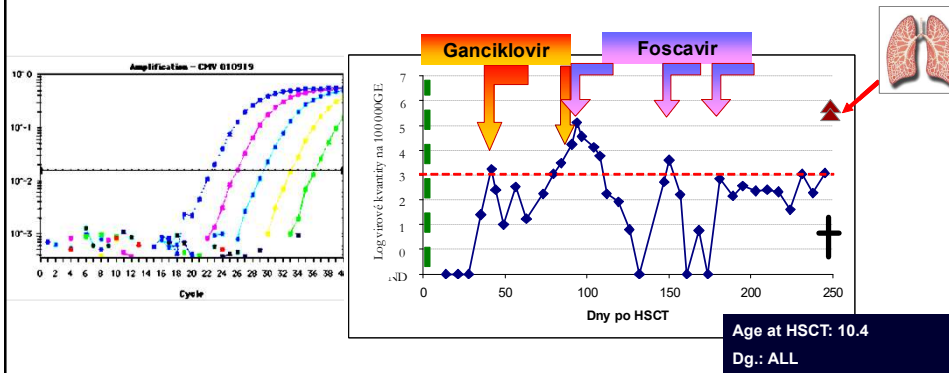
- vysoká citlivost
- rychlost
- vysoce specifická
- lze kvantifikovat

Nevýhody

- citlivá na provedení
- průkaz i neživých agens, zbytků NA
- riziko inhibice, falešných pozitivit

Využití real-time PCR

- Kvantifikace agens a stanovení prognózy
- Monitorování pacientů v imunosupresi (včasné nasazení léčby)
- Monitorování léčby virostatiky (detekce rezistence, pacientů - nonresponderů)

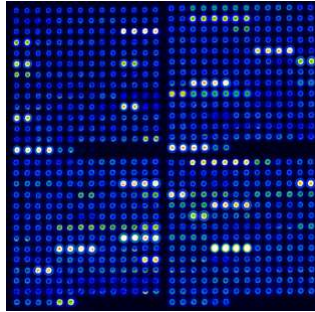


Sekvenace a určení agens podle databáze

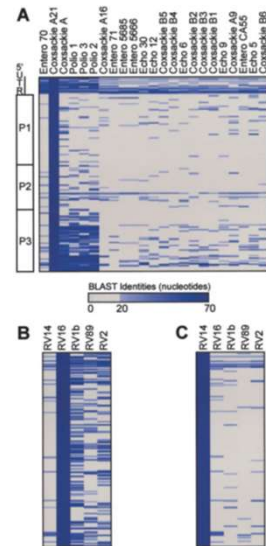
- Určí se sekvence bazí vybraného úseku nukleové kyseliny a podle ní se v databázi najde odpovídající agens
- Ve virologii se k rutinní diagnostice používá méně
- Záleží na kvalitě databáze
- Zatím spíše doplňková

Detekce NK pomocí CHIPových technik

Od roku 2000 se objevují detekce mikrobiologických agens i pomocí CHIPů.



Tento postup je využíván i při objevech nových viurů jako například virů WU a KI v roce 2007 ve vzorcích z respiračního traktu.



Srovnání jednotlivých metod – podle citlivosti

- PCR a kultivace pomnožují vstupní dávku agens – citlivé
 - PCR závisí na volbě metody (typ primerů, multiplex...)
 - Kultivace závisí na zkušenostech laboratoře a typu agens (růstových nárocích)
- Průkaz antigenu pracuje jen s tím, co bylo v odebraném vzorku – menší citlivost
- Mikroskopie je spíše orientační

Srovnání jednotlivých metod podle specifity

- Kultivace má minimum falešně pozitivních reakcí
- PCR – záleží na kvalitě provedení i na kvalitě primerů – navíc neprokazuje jen živé aktivní agens
- Průkaz antigenu má nižší specifitu

Srovnání metod podle rychlosti

- Průkaz antigenu – výsledek obvykle do minut až desítek minut
- PCR – výsledek lze získat za několik hodin (podle organizace práce)
- Kultivace – trvá obvykle dny až týdny

Srovnání metod podle šíře záběru

- PCR a průkaz antigenu prokazují pouze konkrétní hledané agens (s výjimkou sekvenace)
- Kultivace má podle sady použitých tkání širší záběr
- Elektronová mikroskopie zachytí nejširší spektrum (ale vyžaduje značné zkušenosti)

Průkaz protilátek je pouze průkaz reakce části imunitního systému na antigen - infekci.

Průkaz protilátek

- Prokazuje reakci imunitního systému na infekci
- Lze prokazovat imunoglobuliny v jednotlivých třídách (IgG, IgM, IgA)
- V počáteční fázi infekce se protilátky ještě netvoří
- Není vhodný k monitorování léčby

Hlavní využití průkazu protilátek

- Virové infekce s velkou celkovou odezvou (chřipka, zarděnky, hepatitidy)
- Bakteriální infekce s těžším průběhem (pertusse, syfilis)
- Celkové infekce jednobuněčnými parazity (toxoplasmóza)

Kde má průkaz protilátek malý nebo omezený význam

- Infekce intracelulárními bakteriemi (Tuberkulóza)
- Infekce lokální (nekomplikovaná salmonelóza, angína, močové infekce)
- Reaktivace perzistentních infekcí (opar)
- Detekce infekcí a reaktivací u imunosuprimovaného pacienta (iatrogeně i přirozeně)

Klasické metody průkazu protilátek

- Vazba komplementu
 - dobrá specifická, uspokojivá citlivost, levná.
 - Využití: hlavně dg. respiračních virových infekcí
- Virus neutralizační test (VNT)
 - modifikace kultivačního testu, kdy je přidáno testované sérum a jsou-li přítomny neutralizační protilátky, je virová vazba na citlivé buňky blokována a k infekci buněk nedojde.
- Inhibice hemaglutinace
 - specifická, uspokojivá citlivost, levná.
- Aglutinační a precipitační reakce
 - specifická, méně citlivá, levná

Hlavní nevýhodou je nutnost vyšetřování párových vzorků séra

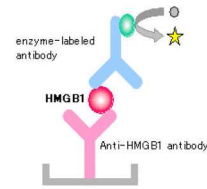
Imunochemické metody

EIA (enzymová imunoanalýza),

IF (imunofluorescence),

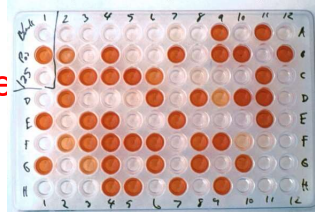
RIA (radio imunoanalýza),

ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)...



Výhody: velmi dobrá reprodukovatelnost
výsledku, rozlišení tříd imunoglobulinů,
vysoká citlivost

Nevýhody: vyšší cena, někdy nespe
nálezy



Proč může selhat průkaz protilátek?

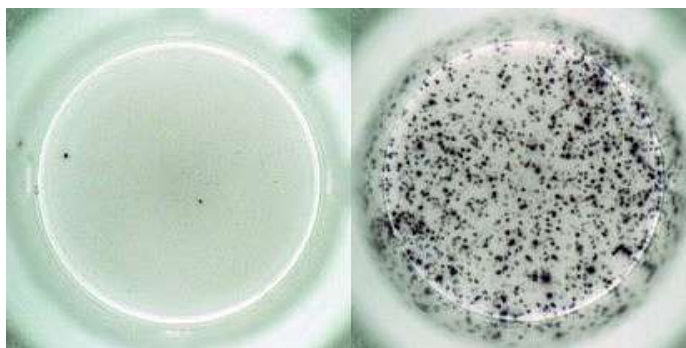
- Významná část infekcí je zlikvidována nespecifickou imunitou (nedojde k aktivaci specifické imunity)
- Je zvolena málo citlivá metoda, nevhodná metoda nebo příliš časný odběr
- Infekci způsobilo jiné agens, než hledáme.

Je průkaz protilátek skutečně jednoduchý?

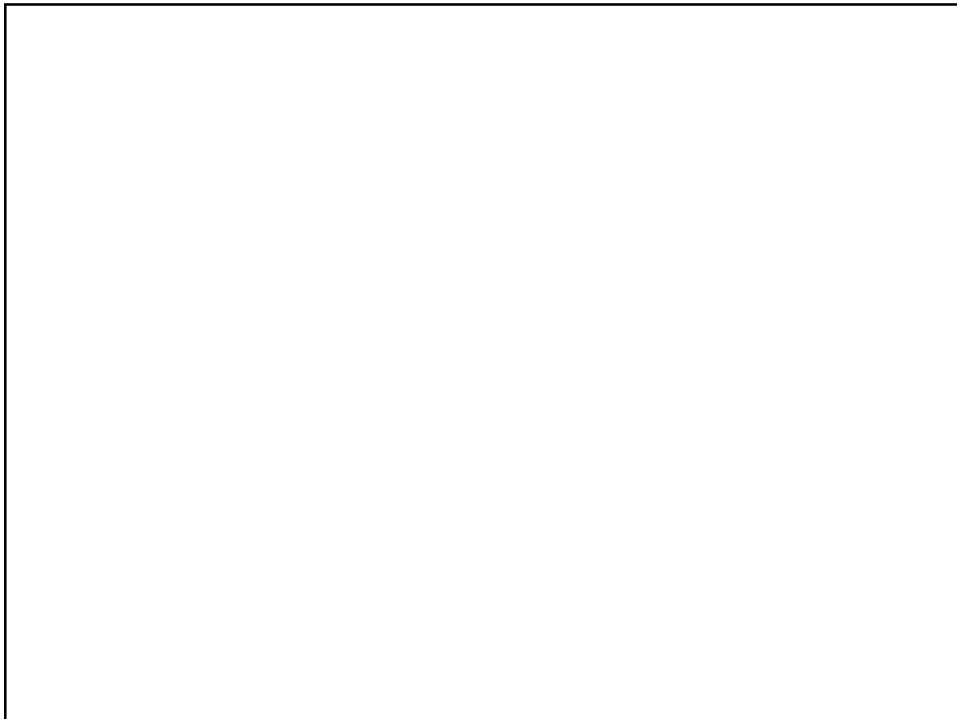
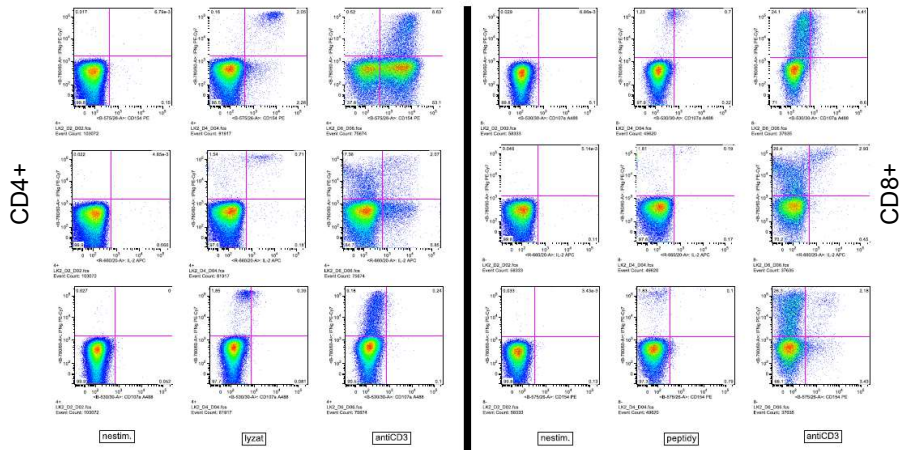
- Technicky se dá zvládnout jednoduše
- Obtížná je interpretace nálezu
 - Často nelze stanovit „normální hodnoty“
 - Citlivost jednotlivých metod závisí na typu použitého antigenu – často obtížná standardizace
 - Imunitní systém každého jedince reaguje unikátně.

Detekce virus specifických lymfocytů

Další krok v detekci virových souvislostí s použitím molekulární biologie. Detekce lymfocytů produkujících IFN- γ po in vitro stimulaci antigenem. Možné provést pomocí ELISPOT eseje či průtokové cytometrie.



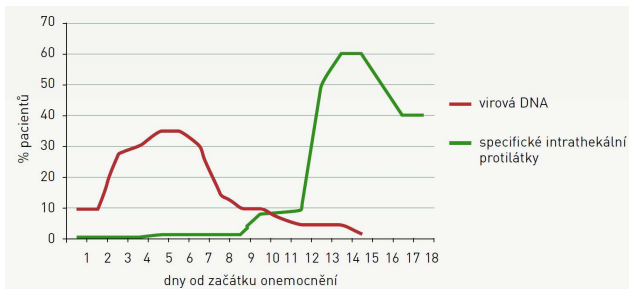
Detekce virus specifických lymfocytů



Odběr materiálu ke kultivaci

- Odběr v akutní fázi infekce
 - v pozdějších fázích má agens nižší životaschopnost
- Odběr z místa nejvyššího výskytu agens
 - důležitá je znalost patogeneze infekce
- Dostatečně razantní odběr
(získání dostatečného množství materiálu)

Protilátková odpověď
na virovou infekci a
detekce viru v CSF



Odběr na přímý průkaz agens

- Průkaz antigenu (a NK bez amplifikace)
 - Velmi důležitý je odběr dostatečného množství materiálu v akutní fázi
- Průkaz NK s amplifikací
 - lze využít i tehdy, když množství a životaschopnost agens klesají (ale ani zde neomezeně!)
 - nutno volit speciálně čisté odběrové a transportní soupravy (riziko dezintegrace DNA a hlavně RNA)

Transport

- **Pro kultivační vyšetření**
 - transportní medium podle doporučení laboratoře
 - uchovávání a transport při chladničkové teplotě
 - důležitá je rychlost transportu (do 24 hod)
- **Pro průkazy antigenu**
 - nutno zabránit znehodnocení vzorku
- **Pro průkaz NK**
 - nutno zabránit znehodnocení vzorku (rozložení NK, vzniku nebo přimísení inhibitorů do vzorku)

Co je důležité pro komunikaci s laboratoří

- **Vědět, co požadují**
(správně položit otázku - diferenciálně diagnostická rozvaha)
- **Vědět, co a jak rychle je možné vyšetřit**
- **Znát patogenezí infekce a zadávat vyšetření v souladu s ní**
- **Umět komunikovat s pracovníky laboratoře**

Co by měla poskytnout dobrá laboratoř

- Standardní výsledek v rozumném čase
- Nadstandardní vyšetření u těžkých stavů
- Konzultovat vhodná vyšetření
- Interpretovat výsledek vyšetření případně poradit další postup a terapii
- Informovat klinika o diagnostickém významu výsledku (senzitivita, specificita, negativní a pozitivní prediktivní hodnota)

Než indikujete nějaký test, musíte vědět co dělat, dopadne-li
1. pozitivně, 2. negativně.
Pokud máte na obě eventuality stejnou odpověď, je test zbytečný.

Děkuji za pozornost



Petr.hubacek@Lfmotol.cuni.cz