

# 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?

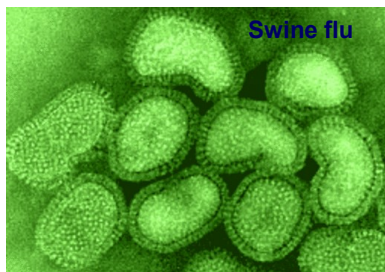
**Jsou submikroskopické částice, složené z nukleové kyseliny a bílkovin, infikující a reprodukcující se v buňce.**

**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.**

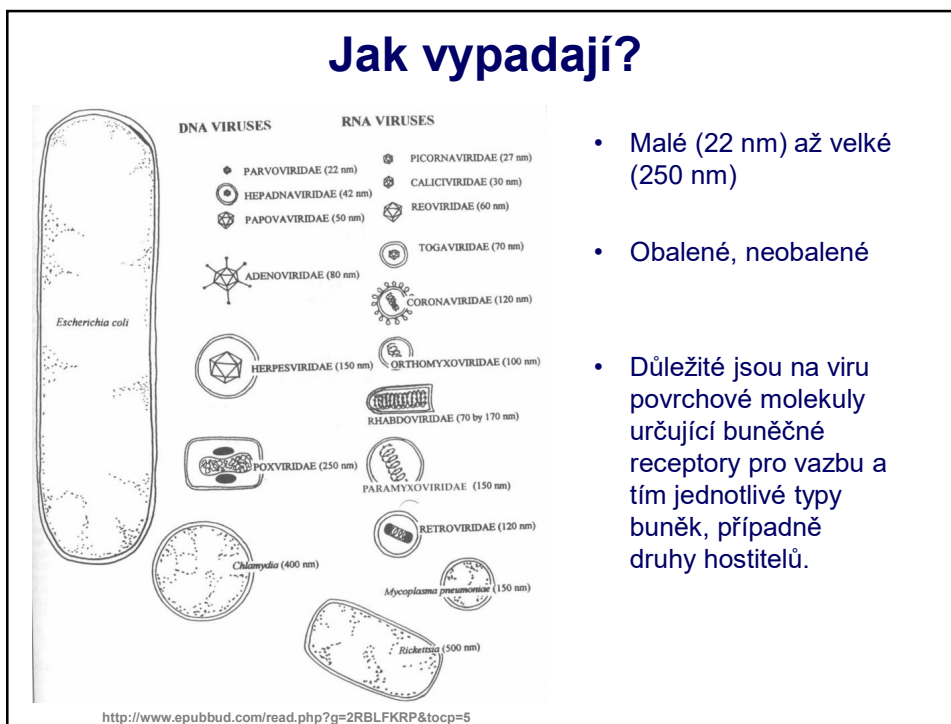


Swine flu



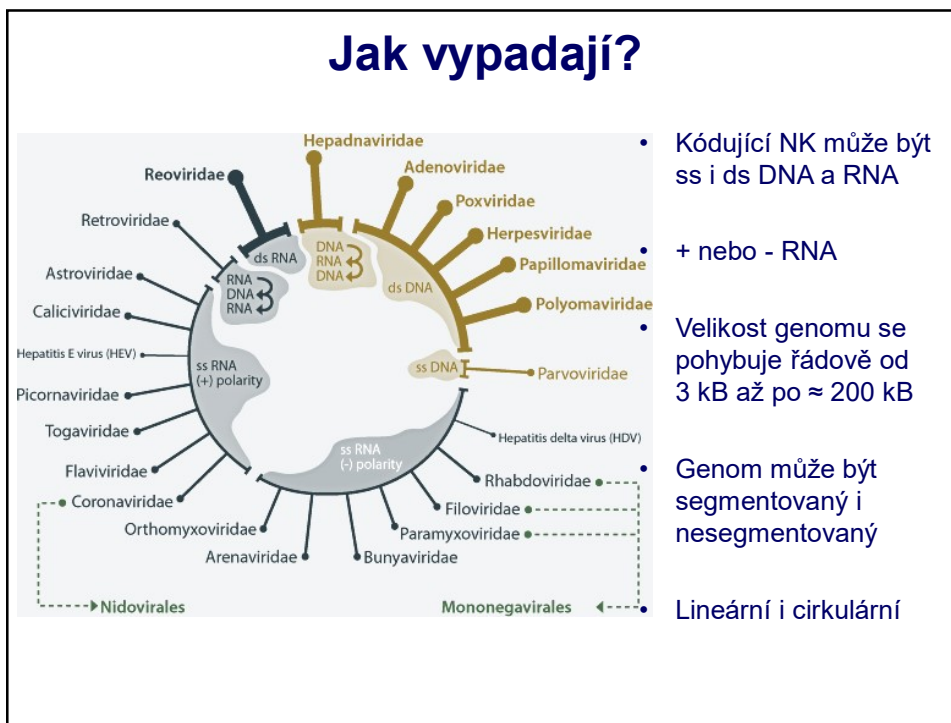
**Život je boj.**

## Jak vypadají?

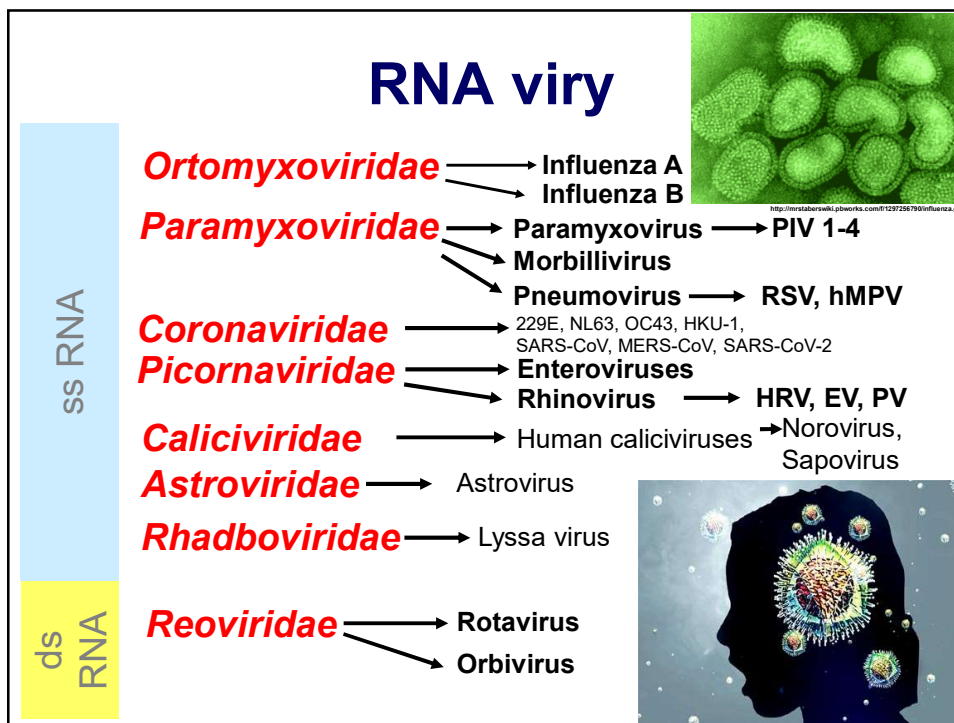
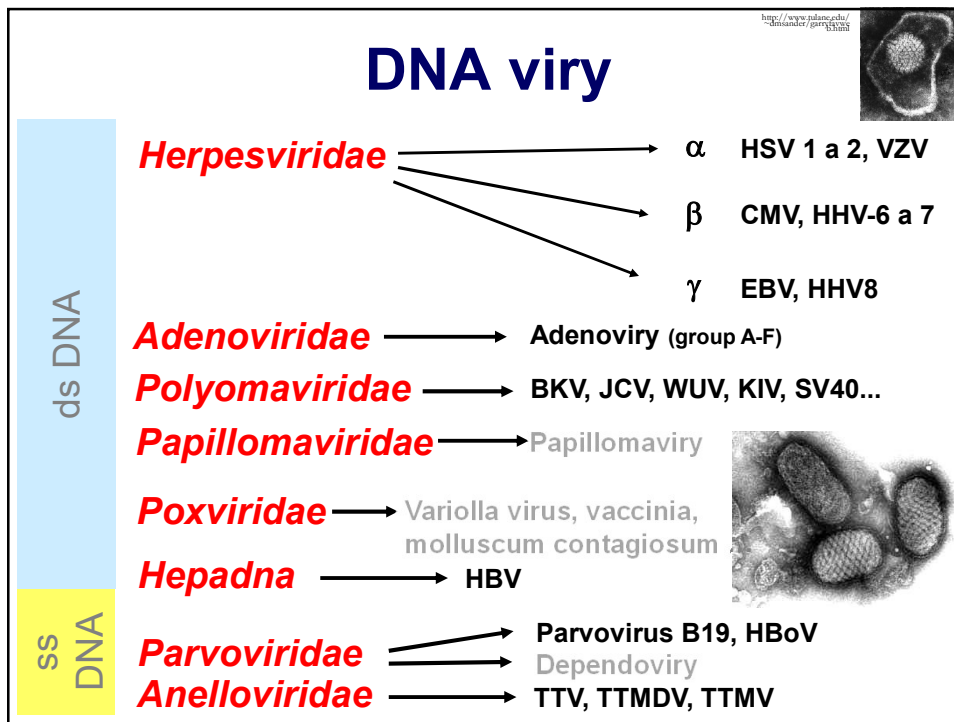


- Malé (22 nm) až velké (250 nm)
- Obalené, neobalené
- Důležité jsou na viru povrchové molekuly určující buněčné receptory pro vazbu a tím jednotlivé typy buněk, případně druhy hostitelů.

## Jak vypadají?



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

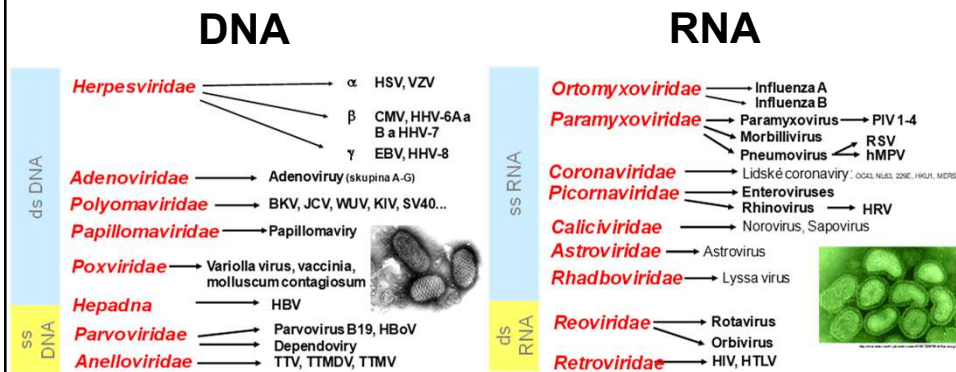


# Má to smysl?



## Mnoho virů kolem nás

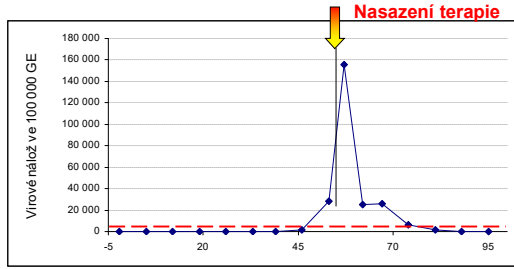
**Obalené / neobalené** – různá fyzikální a chemická stabilita  
**RNA / DNA** - rozdíl ve stabilitě a často i infekciozitě



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

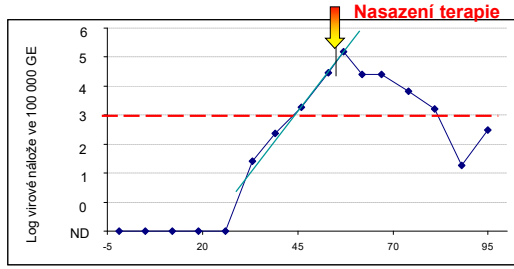
**Menší, menší množství genů.**  
**Rychlejší a akutnější průběh onemocnění.**  
**Přes TRL, IFN- větší systémové dopady infekce.**  
**Vyšší rychlost změn genomu.**

# Exponenciální proliferace virů



In vivo je popsán doubling time CMV mezi

**48-72 hodinami**

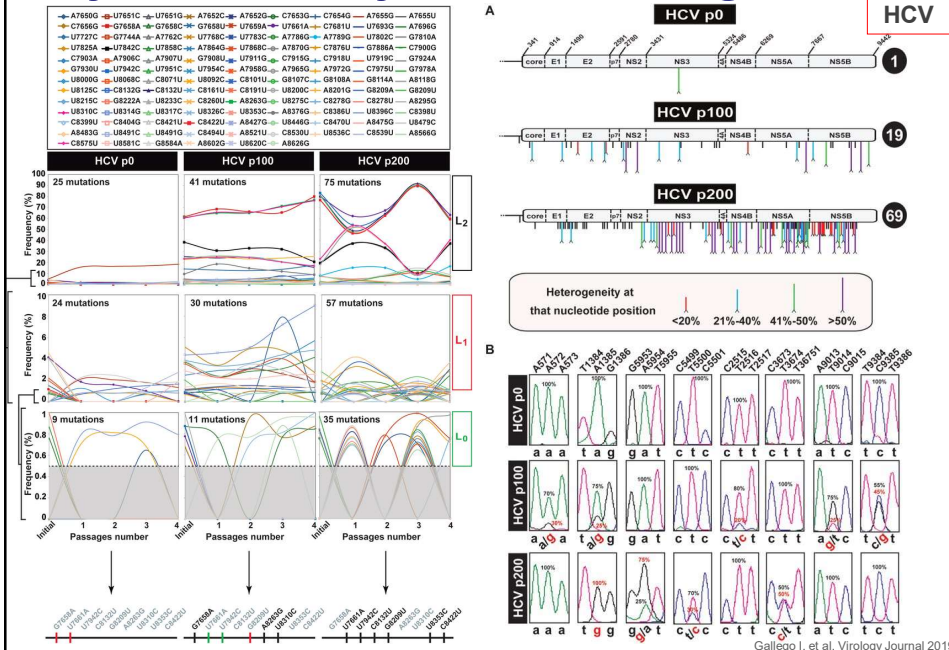


Day	Diff. in days	CMV NVCs	Vypočítaná nálož do dalšího vyšetření při čase 48 hodin
19	7	0	
26	7	0	
33	7	260	
39	6	2 300	2 060
46	7	18 700	27 500
53	7	281 700	224 400

Pacientka s AML po alogenní HSCT

Jde o exponenciální proliferaci.

# Rychlé změny ve virovém genomu



# Rychlé změny genomu CMV

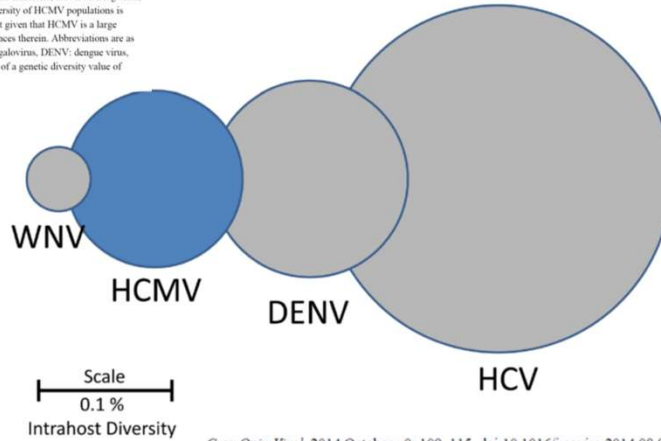
Whole genome sequencing – NGS.

## Human Cytomegalovirus Intra-host Evolution – A New Avenue for Understanding and Controlling Herpesvirus Infections

Nicholas Renzette<sup>1</sup>, Laura Gibson<sup>2</sup>, Jeffrey D. Jensen<sup>3,4,5</sup>, and Timothy F. Kowalik<sup>1,6,\*</sup>

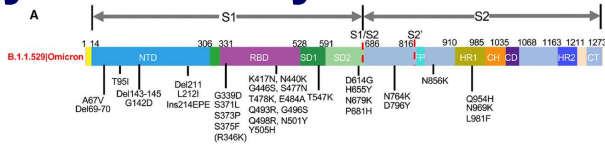
**Figure 1. HCMV Intra-host genetic diversity as compared to RNA viruses**  
Viral intra-host diversities are represented as circles with the diameters, drawn on a log scale, representing reported values of diversity. The genetic diversity of HCMV populations is comparable to those of RNA viruses, an 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.

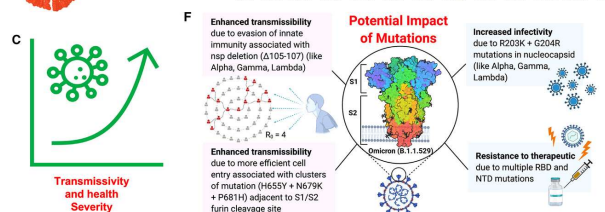
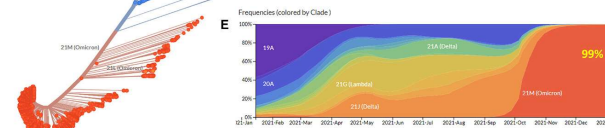
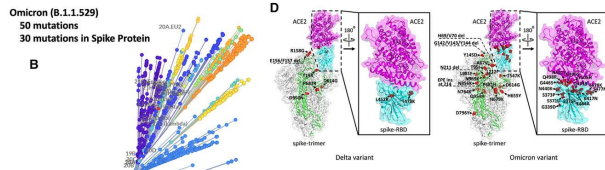


*Curr Opin Virol.* 2014 October ; 0: 109–115. doi:10.1016/j.coviro.2014.08.001

# Rychlé změny ve virovém genomu

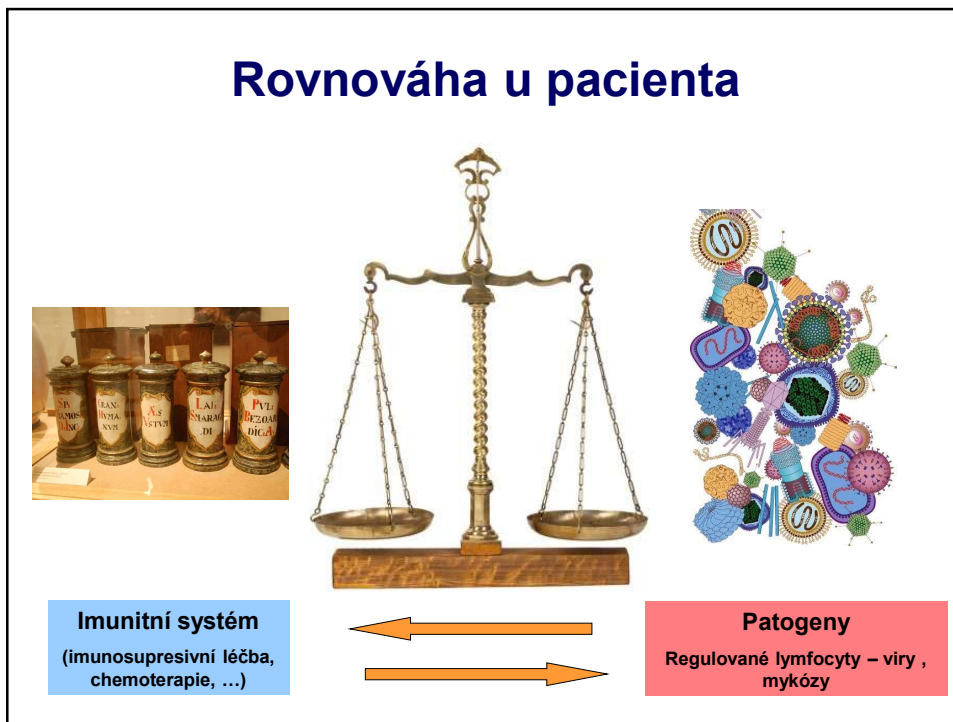


SARS-CoV-2



Mostafavi E. et al. *MedComm.* 2022;3:1–8.

## Rovnováha u pacienta



## Rovnováha u imunosuprimovaného pacienta



## Vyšetřovací metody ve virologii

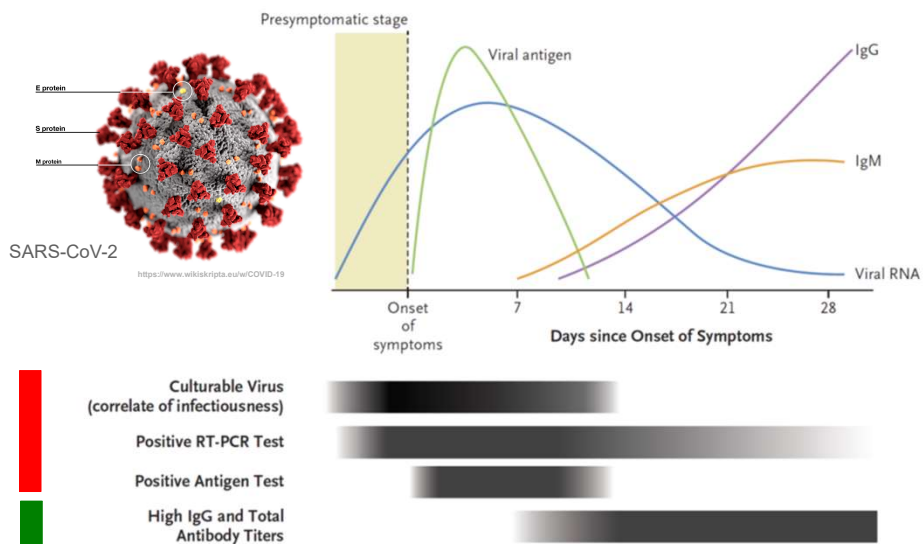
- Mikroskopické **Přímá detekce**
- Kultivační
- Průkaz antigenu
- Průkaz nukleové kyseliny

---

- Průkaz protilátek
- (Příznaky onemocnění)

**Nepřímá detekce**

## Diagnostické „okno“





## Příznaky nemoci

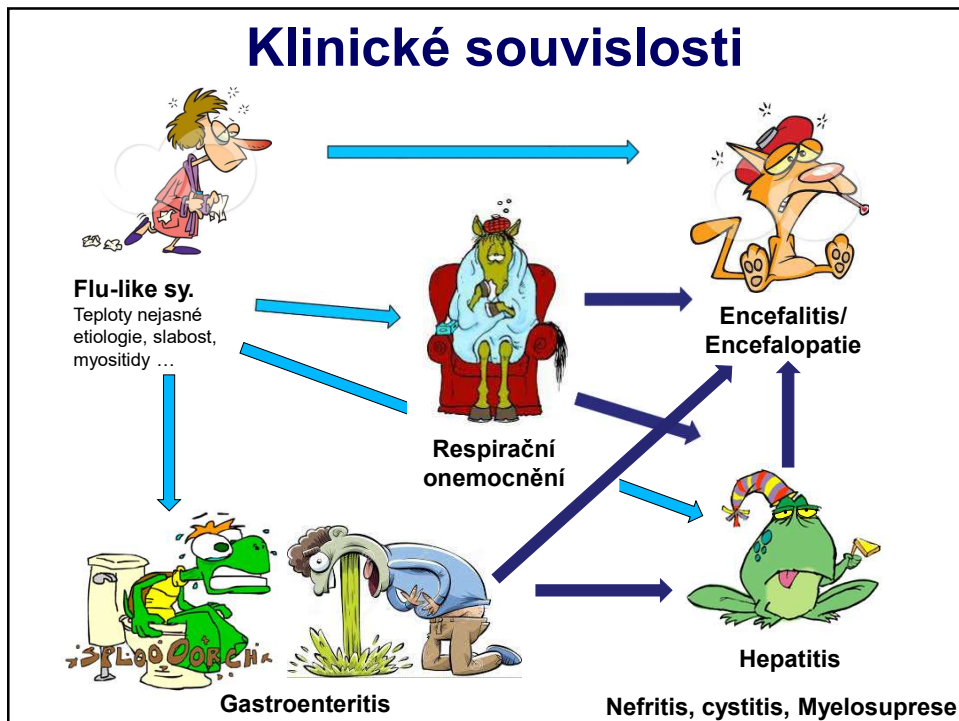
Klinické příznaky vedoucí k podezření na virovou infekci (poliomyelitida) byly poprvé popsány 3 700 let př. n. l. v Egyptě.

Typické příznaky jsou například u:

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



## Klinické souvislosti

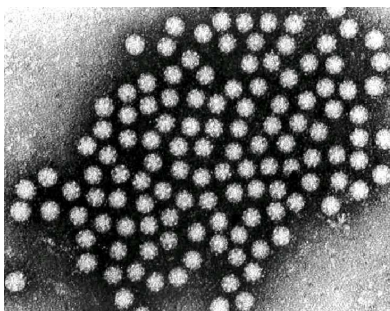


# Astrovirus VA1/HMO-C: An Increasingly Recognized Neurotropic Pathogen in Immunocompromised Patients

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

<sup>1</sup>Virology Department, Great Ormond Street Hospital for Children NHS Foundation Trust, <sup>2</sup>NIHR Biomedical Research Centre, Great Ormond Street Hospital for Children NHS Foundation Trust and University College London, <sup>3</sup>UCL Genetics Institute, University College London, <sup>4</sup>Virology Department, Barts Health NHS Trust, <sup>5</sup>Molecular and Cellular Immunology, <sup>6</sup>Molecular Haematology and Cancer Biology Unit, Institute of Child Health, University College London, <sup>7</sup>Department of Histopathology, Great Ormond Street Hospital for Children NHS Foundation Trust, <sup>8</sup>Department of Infection and Immunity, and <sup>9</sup>Birth 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.ocrdc.ohio-state.edu/iaf/ab/pictures/astro%20virus%20144.jpg>

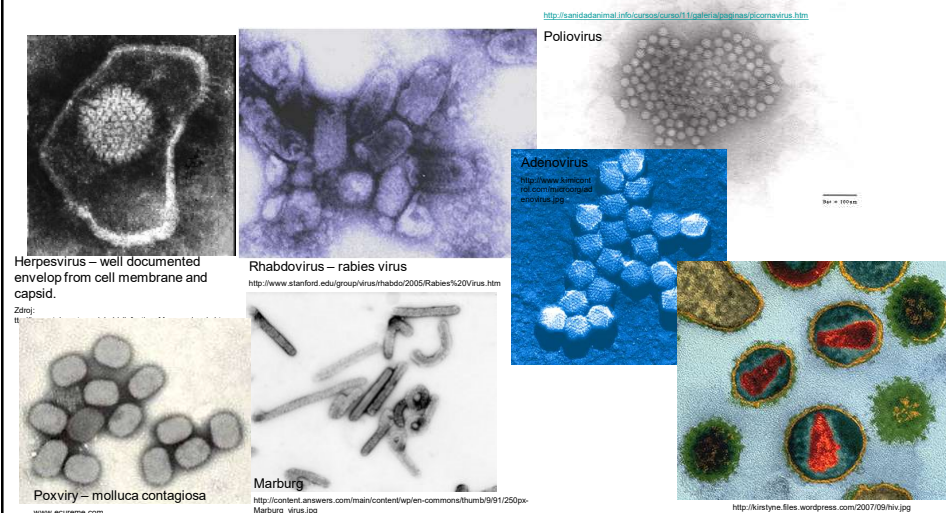
## Metody virové detekce - přímá

### 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

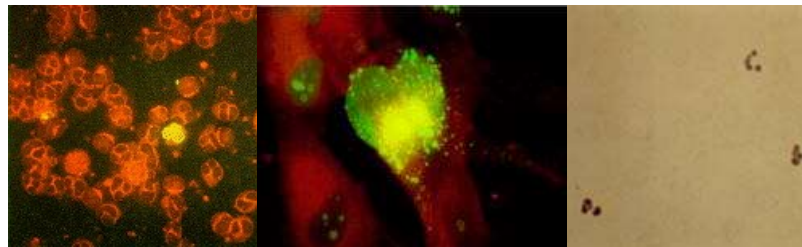
## Elektronová mikroskopie

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.



## Imunohistochemická metoda detekce

V současnosti pomocí značených monoklonálních protilátek.

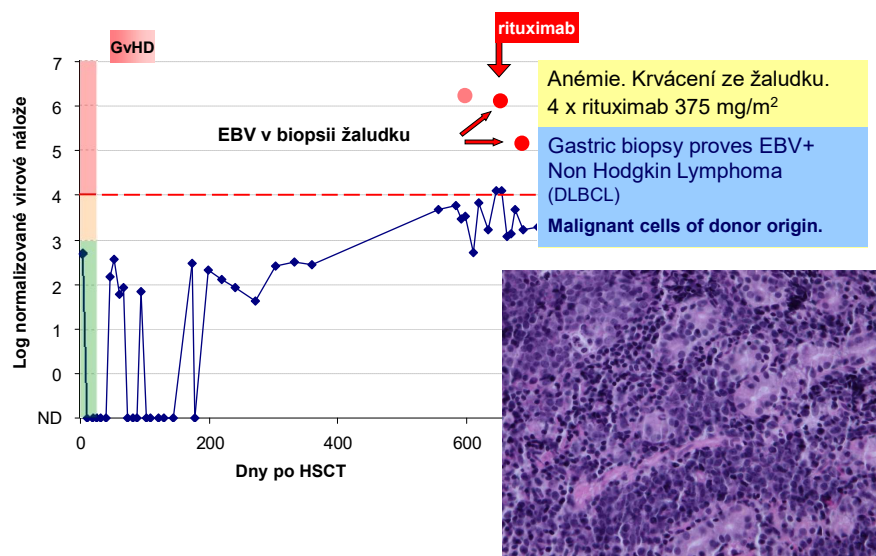


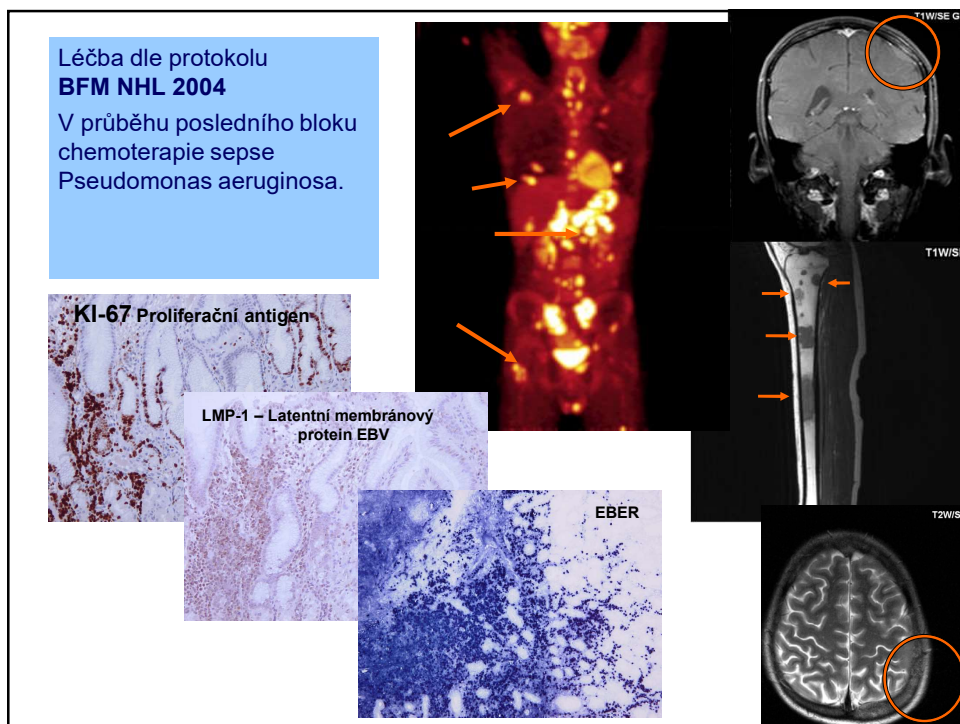
Detekce pp65 CMV antigenu pomocí fluorescenčního mikroskopu. Zdroj: <http://home.teleport.com/~bobh/infectious/Mononucleosis.htm>  
[http://www.argene.com/pictures\\_gallery/zoom\\_images\\_ang/CMV\\_Antigenemia\\_periox.php](http://www.argene.com/pictures_gallery/zoom_images_ang/CMV_Antigenemia_periox.php)

## 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)





Metody virové detekce - přímá

## 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

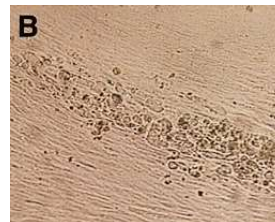
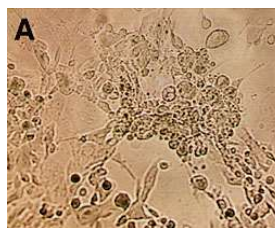
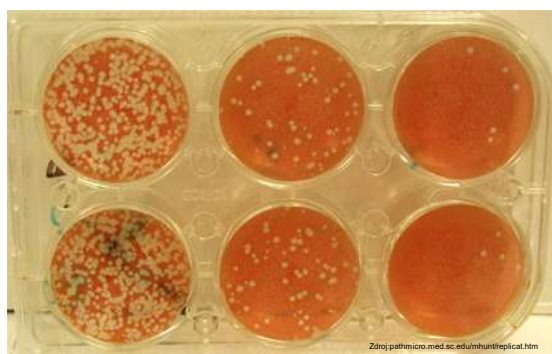
- prokazuje živý virus
- lze provádět další vyšetření viru
- zachycuje širší spektrum virů

### 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. Dulbeccem použita Plaque forming assay, která vedla k první kvantifikaci nálože viru a definování plaque forming units (PFU).

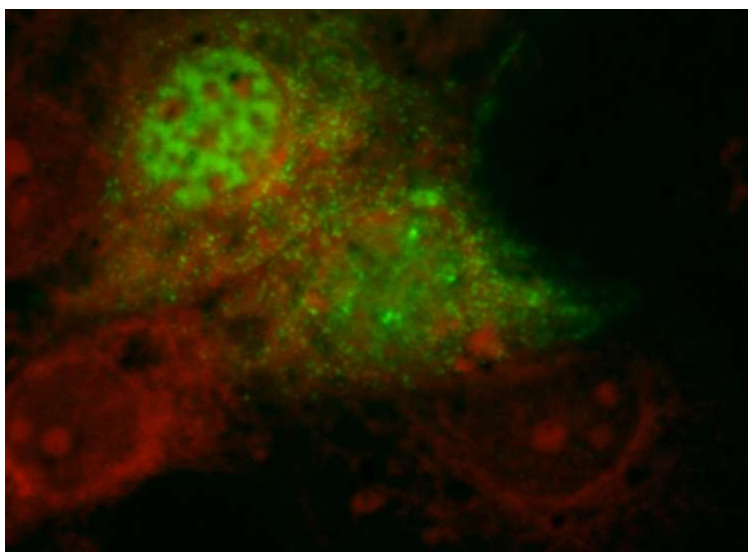


## Cytopatický efekt - CMV



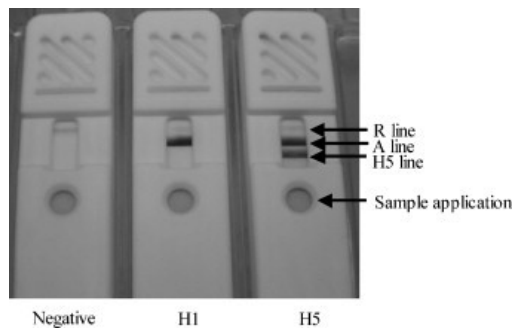
## Virus Chřipky A na TK

- barveno monoklonální protilátkou s FITC



## Průkaz virového antigenu

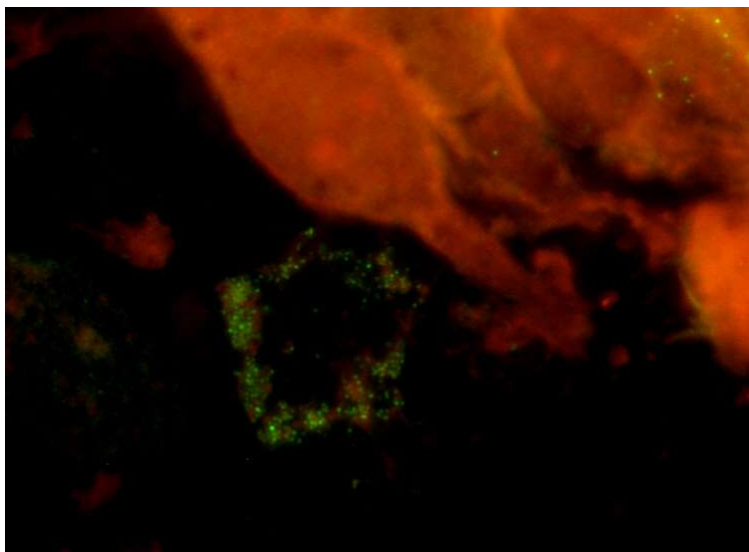
- Prokazujeme přítomnost jednoho nebo úzké palety agens
- Zjišťujeme zda je nebo není přítomno, někdy lze kvantifikovat
- Metodicky jde o reakci antigen-protilátka se známou protilátkou



**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)

## Je detekce antigenem opravdu jednoduchá?

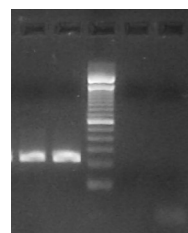
- Technicky – ano
- Interpretačně – ne zcela
  - Není „normální rozmezí“
  - Sensitivita metod závidí na použitém antigenu a chemii – **není standardizace**

## 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

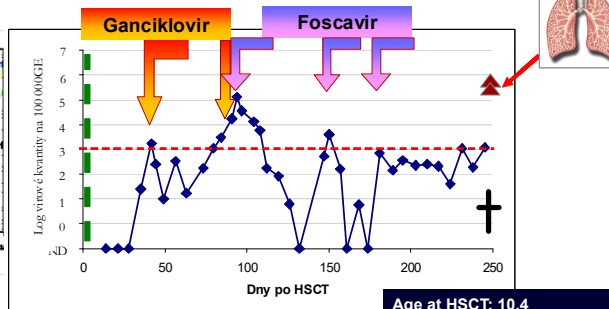
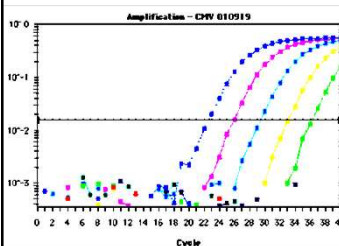
- vysoká citlivost
- rychlost
- vysoce specifická
- lze kvantifikovat

### 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)



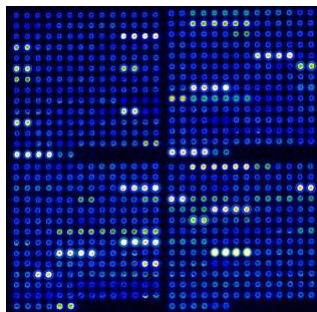
Age at HSCT: 10.4  
Dg.: ALL

## Sekvenace a určení agens podle databáze

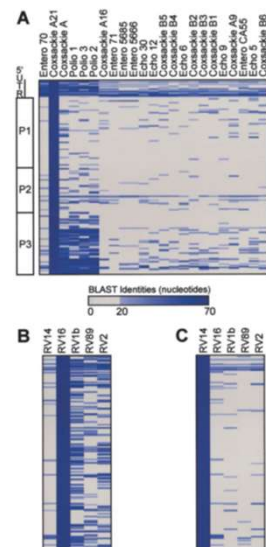
- Určí se sekvence bazí vybraného úseku nukleové kyseliny a podle ní se v databázi najde odpovídající agens
- Ve virologii se k rutinní diagnostice používá méně
- Záleží na kvalitě databáze
- Zatím spíše doplňková

## 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

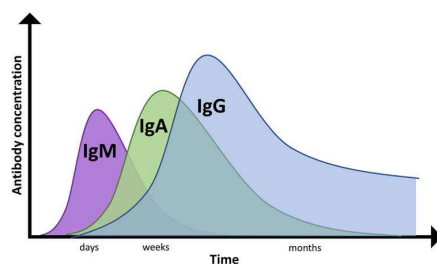
## **Srovnání metod podle šíře záběru**

- 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

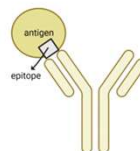
- Prokazuje reakci imunitního systému na infekci
- Lze prokazovat imunoglobuliny v jednotlivých třídách (IgG, IgM, IgA)
- V počáteční fázi infekce se protilátky ještě netvoří
- Není vhodný k monitorování léčby



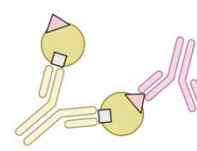
<https://www.raybiotech.com/learning-center/covid-19-biology-101/>

### Affinity vs. Avidity

**Affinity** - strength of a single interaction



**Avidity** - total strength of a multivalent interaction



<https://www.rapidriver.com/wp-content/uploads/2020/01/2-Affinity-vs.-Avidity-e1673020820106-768x438.png>

## Hlavní využití průkazu protilátek

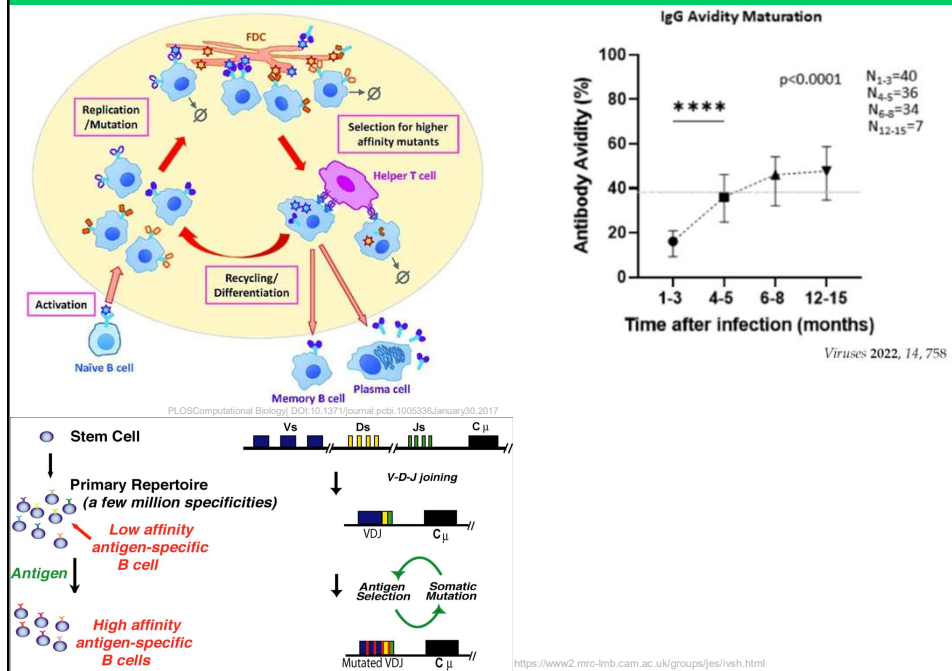
- Virové infekce s velkou celkovou odezvou (chřipka, zarděnky, hepatitidy)
- Bakteriální infekce s těžším průběhem (pertusse, syfilis)
- Celkové infekce jednobuněčnými parazity (toxoplasmóza)
- Additional information for interpretation of positivity is **antibody avidity**

## 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 (iatrogně i přirozeně)



## Metody virové detekce - nepřímá



## Metody virové detekce - nepřímá

### Klasické metody průkazu protilátek

- Vazba komplementu
  - dobrá specifita, uspokojivá citlivost, levná.
  - Využití: hlavně dg. respiračních virových infekcí
- Virus neutralizační test (VNT)
  - modifikace kulturačního 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**

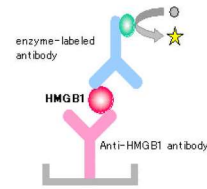
## Imunochemické metody

EIA (enzymová imunoanalýza),

IF (imunofluorescence),

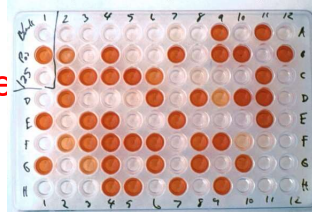
RIA (radio imunoanalýza),

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?

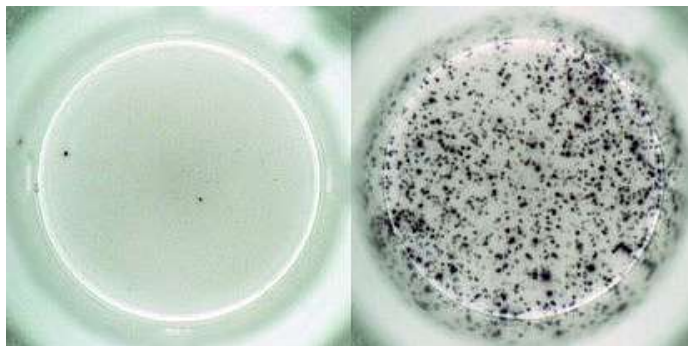
- Významná část infekcí je zlikvidována nespecifickou imunitou (nedojde k aktivaci specifické imunity)
- Je zvolena málo citlivá metoda, nevhodná metoda nebo příliš časný odběr
- Infekci způsobilo jiné agens, než hledáme.

## Je průkaz protilátek skutečně jednoduchý?

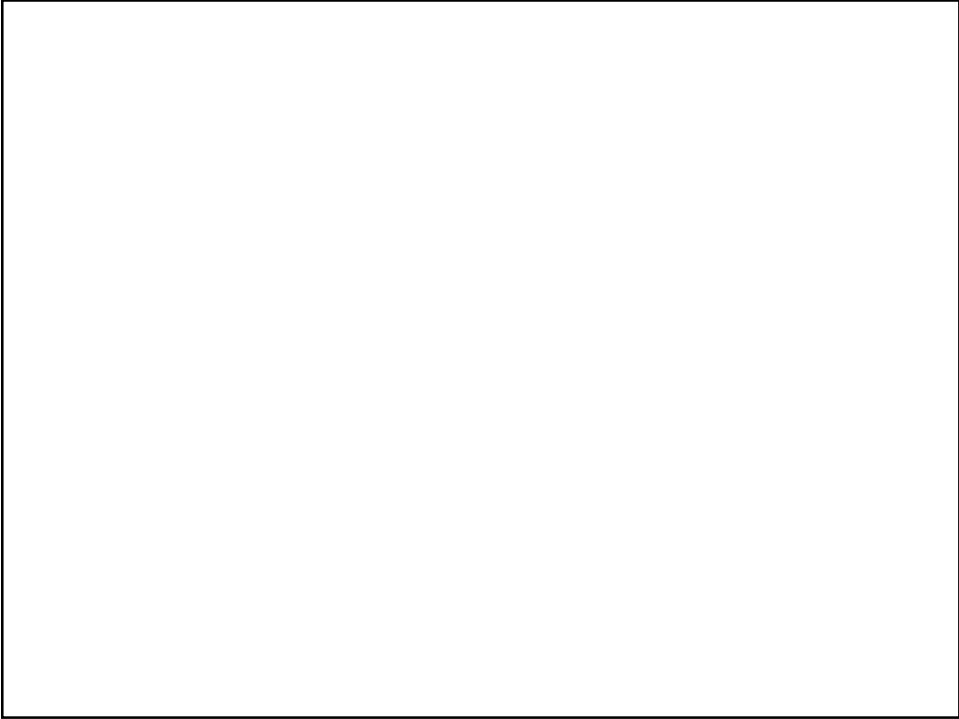
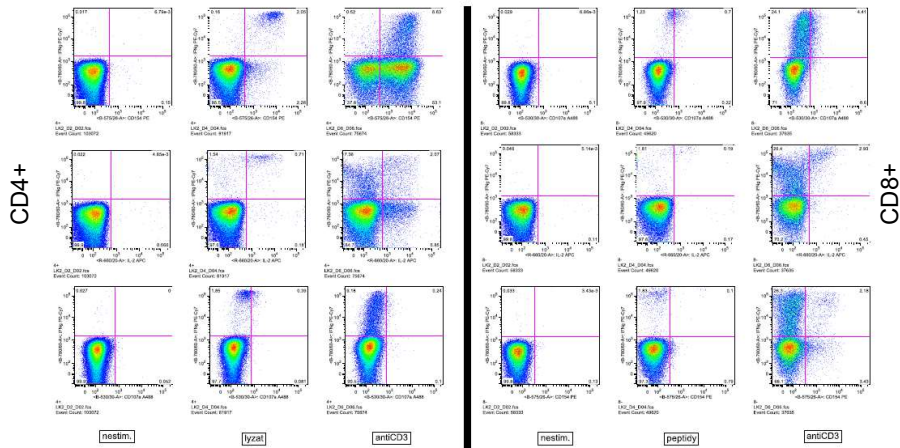
- Technicky se dá zvládnout jednoduše
- Obtížná je interpretace nálezu
  - Často nelze stanovit „normální hodnoty“
  - Citlivost jednotlivých metod závisí na typu použitého antigenu – často obtížná standardizace
  - Imunitní systém každého jedince reaguje unikátně.

## Detekce virus specifických lymfocytů

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



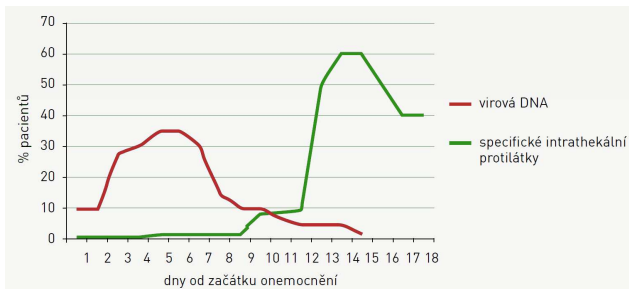
# Detekce virus specifických lymfocytů



## Odběr materiálu ke kultivaci viru

- 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 patogenezi 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**



[xxx.xxx@Lfmotol.cuni.cz](mailto:xxx.xxx@Lfmotol.cuni.cz)