

Nestačí vědět, vědění se musí použít.

Goethe

Tento učební text je určen pro studenty biologických oborů a je zaměřen na problematiku obecné virologie. Neklade si za cíl shrnout a podrobně popsat všechny poznatky o virech, ale klade důraz na vysvětlení základních virologických pojmů a objasnění postavení virů v přírodě.

OBSAH

1	ÚVOD	6
2	HISTORIE VIROLOGIE	8
3	VLASTNOSTI VIRŮ A JEJICH KLASIFIKACE	12
3.1	Klasifikace virů	12
3.2	Přehled vlastností virů	16
3.3	Struktura virionu	18
3.3.1	Velikost a tvar virové částice	20
3.3.2	Architektura virové částice	21
3.3.3	Funkce a význam jednotlivých částí virionu	25
3.3.4	Genom virů	26
3.4	Vztah viru a hostitelské buňky	27
3.4.1	Životní cyklus virů (reprodukce virů)	27
3.4.2	Příklady reprodukčních cyklů vybraných virů	39
4	VIRY – PŮVODCI CHOROB	49
4.1	Cytopatický efekt (CPE)	50
4.2	Jak virus vyvolává chorobu	52
4.3	Patogeneze virové infekce	53
4.4	Patogenita a virulence	55
4.5	Základní znaky patogenetického procesu organismu jako mnohobuněčného systému – patogeneze živočichů	56
4.5.1	Vstupní brána infekce	57
4.5.2	Základní fáze procesu patogeneze	58
4.5.3	Šíření viru v hostiteli	60
4.5.4	Protivirová obrana	63
4.5.4.1	Nespecifické obranné mechanismy	63
4.5.4.2	Specifická protivirová obrana	65
4.5.4.3	Nepříznivé důsledky protivirové obrany	66
4.5.5	Profylaxe a léčba virových chorob	67
4.6	Základní znaky patogenetického procesu organismu jako mnohobuněčného systému – patogeneze rostlin	69
4.6.1	Vstup viru do rostliny	69
4.6.2	Rozvoj infekce a reakce hostitelské rostliny	74
4.6.2.1	Šíření a distribuce viru v rostlině	74
4.6.2.2	Příznaky viróz na rostlinách	75
4.6.2.3	Průběh choroby	78
4.6.2.4	Protivirová obrana rostlin	80
4.6.2.5	Ozdravování rostlin	81
5	EKOLOGIE VIRŮ	83
5.1	Epidemiologie virových infekcí	84
5.2	Přírodní ohniska nálezů	87
5.3	Ochranná opatření	88
6	PŮVOD A EVOLUCE VIRŮ	89
7	METODY VIROLOGIE - LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA VIROVÝCH CHOROB	92
8	VIRY A NÁDORY	94
9	VIROIDY	96

10	SATELITNÍ VIRY	96
11	SATELITNÍ NUKLEOVÉ KYSELINY	97
12	PRIONY	98
13	DOPORUČENÁ STUDIJNÍ A DOPLŇUJÍCÍ LITERATURA	100
14	INTERNETOVÉ STRÁNKY	100

1 ÚVOD

Virologie je věda o virech a jejich interakcích s hostitelskými buňkami, organismy a společenstvy organismů. Studium nesmírné variability existence života vedlo k objevu nebuněčných forem života, významně se odlišujících od forem buněčných. Nebuněčné organismy představují speciální klasifikační problém, poněvadž se nedají zařadit do žádné z pěti říší organismů: *Monera*, *Protista*, *Fungi*, *Plantae* a *Animalia*. Nejedná se o živé organismy v pravém slova smyslu, jejich existence není totiž založena na existenci buňky, která může představovat celý organismus nebo je jeho základním stavebním prvkem. Životní projevy nebuněčných forem života nejsou myslitelné bez interakcí s hostitelskou buňkou. Tyto mikroorganismy nemají vlastní metabolický aparát a také nejsou schopné ukládat volnou energii. Nicméně máme řadu důkazů o probíhající (mikro)evoluci v populacích virů a viroidů, o jejich proměnlivosti a schopnosti adaptace. Také existence vlastní nukleové kyseliny¹, schopné atakovat buňku a částečně nebo úplně převzít řízení buněčných mechanismů s cílem syntetizovat nové identické virové částice, nám umožňuje považovat je po dobu jejich reprodukce v buňce za živé mikroorganismy. Jedná se o **viry**, **viroidy**, **satelity**² a **priony**. Vzhledem k historii jejich poznávání i konkrétním životním projevům a metodám výzkumu jsou tyto nebuněčné mikroorganismy studovány v rámci virologie.

- **Viry** jsou submikroskopičtí obligátní intrabuněční parazité obsahující ve své nukleové kyselině komplex genetických informací nezbytných pro nezávislou reprodukci v hostitelských buňkách.
- **Viroidy** jsou nejmenší známé patogeny (infekční agens vyvolávající onemocnění), představované nahou jednovláknovou RNA (o velikosti 246 - 375 bazí) bez schopnosti kódovat proteiny, které by mohly tvořit plášť.
- **Satelity** (satelitní viry, satelitní nukleové kyseliny) jsou sub-virová agens skládající se z molekul nukleových kyselin, jejichž reprodukce je závislá na ko-infekci hostitelské buňky pomocným virem.

¹ Výjimkou mohou být dosud málo prostudované **priony**.

² Mezi satelity řadíme satelitní viry a satelitní nukleové kyseliny.

- **Priony** jsou infekční agens skládající se pouze z proteinů a jejich existence je s největší pravděpodobností spojena s jadernými geny hostitelské buňky.

Přestože viry a další sub-virové částice jsou v tomto učebním textu představeny jako patogeny, tj. škodlivé mikroorganismy, pomohly vyřešit i řadu vědeckých otázek a staly se součástí řady úspěšných biotechnologií. Viry jsou vynikajícím genetickým modelem: jejich genom je ve srovnání s ostatními organismy malý, jednoduchý, viry se rychle reprodukují a vytvářejí velké populace na malém prostoru. Viry se staly základem vektorů, které mohou dopravit cíleně cizí genetickou informaci do rostlin i živočichů. Virové vektory hrají významnou úlohu při vývoji genových terapií. Na bázi virů byly připraveny klonovací a expresní vektory a virové vektory sloužící pro přípravu genových knihoven. Viry mohou být použity k produkci proteinů. Podařilo se také připravit komerčně úspěšné insekticidy na bázi virů napadajících hmyz. Viry jsou rovněž zdrojem reverzních transkriptáz (AMV, *Avian myeloblasty virus*; MuMLV, *Murine moloney leukemia virus*).

2 HISTORIE VIROLOGIE

Z pohledu historie můžeme výzkum virů a chorob jimi vyvolaných rozdělit do tří etap.

- V první etapě nebyly viry jako původci chorob známí, byly studovány pouze **projevy chorob**.
- Druhá etapa začala **objevem infekční virové částice** (Dmitrij Ivanovskij, 1892).
- Třetí etapa je spojena s využitím **metod rekombinantní DNA a genových manipulací** ve virologii (přelom padesátých a šedesátých let minulého století).

Virové choroby byly studovány celá století před tím, než byly viry objeveny. Již na sklonku prvního tisíciletí byly zaznamenány případy epidemie pravých neštovic. Tehdy Číňané nevědomě použili tzv. variolace³ k ochraně lidí. Obsah vysušených puchýřků vyvolaných virovou infekcí míchali s rozsivkovou zeminou a vtírali do kůže zdravých jedinců a vyvolávali tak umělou infekci, často se slabším průběhem spojeným s navozením imunity. Později, po roce 1790, anglický lékař **E. Jenner** pozoroval, že dojičky často trpí mírnou formou neštovic přenesených z krav a prodělání takové choroby je pak chránilo před nebezpečnými pravými neštovicemi. E. Jenner tak objevil princip vakcinace, kdy protilátky vytvořené proti málo škodlivým kravským neštovicím jsou schopné inaktivovat příbuzný virus pravých neštovic. Na vědecké úrovni pak rozpracoval a prakticky aplikoval vakcinaci až **L. Pasteur** (1884), který objevil například i vakcínu proti vzteklině. K vakcinaci použil extrakt z míchy králíků uměle infikovaných vzteklinou.

Až do 19. století se však všechna pozorování zabývala chorobou a na existenci infekčního agens se usuzovalo jen nepřímou, a to podle přenosu a šíření infekce. Na počátku 19. století se několik skupin vědců snažilo objevit původce infekční choroby tabáku vyvolávající chlorotické mozaiky na listech. Zjistilo se, že se nemůže jednat o bakterie, které bylo možné z homogenátu spolehlivě zachytit

³ Variola major – pravé neštovice.

(odfiltrovat) pomocí porcelánových filtrů. **A. Mayer** se domníval, že může jít o „zvláštní enzymy“. V roce 1892 **D. Ivanovskij** objevil virus mozaiky tabáku a dokázal, že chorobu rostlin může vyvolat organismus menší než bakterie. Obdobné experimenty dokazující existenci menších infekčních částic než bakterie prováděl paralelně i Holanďan **M.W. Beijerinck**, který však své výsledky publikoval až v roce 1898. Následovalo období nalézání nových a nových původců chorob menších než bakterie. V roce 1898 **F. Löffler** a **P. Frosch** prokázali, že slintavka a kulhavka skotu jsou rovněž vyvolávané organismy menšími než bakterie. O čtyři roky později **W. Reed** a **J. Carrol** filtrací infekční krve potvrdili, že v komárovi *Aedes aegypti* může sídlit původce žluté zimnice.

Velmi významný je objev **P. Rouse**, který v roce 1911 zjistil, že viry nejsou pouze infekčními původci chorob, ale u živočichů i člověka mohou rovněž vyvolat tvorbu nádorů.

Rozvoj obecné virologie byl spojen s objevem bakteriálních virů (bakteriofágů) **F.W. Twortem** a **F.H. d'Herellem** ve dvacátých letech tohoto století, které se staly velmi dobrým modelem pro studium životních cyklů virů a interakcí virus - buňka. Tkáňových kultur pro množení živočišných virů poprvé použil **F. Parker** v roce 1925.

Důležitý mezníkem pro rozvoj virologie byl rok 1933, kdy **W.M. Stanley** získal čistý virus mozaiky tabáku z extraktu infikovaných rostlin a zjistil, že purifikovaný virus může krystalizovat. W. Stanley z toho usuzoval, že viry jsou spíše chemické sloučeniny než živé organismy. K jeho překvapení však tyto krystaly byly schopné infikovat rostliny. Domníval se, že virus je enzym, který může pomnožovat sám sebe. Ve stejné době prováděli podobné pokusy i skotští badatelé **N.W. Pirie** a **F.C. Bawden**, kteří označili za nejdůležitější složku purifikovaného viru nukleovou kyselinu. Předstihli tak svou dobu, kdy jako jedni z prvních naznačili možné spojení životních projevů s existencí nukleové kyseliny.

M. von Ardenne a **E. Ruska** v roce 1939 jako první použili k pozorování virů elektronového transmisního mikroskopu. V stejné době **E.N. Pavlovskij** studiem klíšťové encefalitidy položil základ pro vytvoření teorie o přírodních ohniscích virových nákaz.

S nástupem čtyřicátých let začínají převládat výsledky experimentálních oborů nad čistě popisným pozorováním virů. V roce 1941 **G.K. Hirst** popsal aglutinaci červených krvinek virem chřipky. Hemaglutinační reakce se stala na dlouhou dobu základem diagnostiky virů schopných vyvolat tuto aglutinaci červených krvinek. Významným krokem byl objev genetické rekombinace bakteriofágů **M. Delbrückem** a **A. Hersheyem** v roce 1946.

R. Dulbecco zavedl v roce 1952 do virologie plakovou metodu u virů vyvolávajících cytopatický efekt na vnímavých buňkách, umožňující počítat infekční virové částice. Ve stejné době **A.D. Hershey** a **M. Chase** dokázali, že při infekci buněk bakteriofágem proniká dovnitř jen jeho nukleová kyselina, a o rok později jednoznačně potvrdili, že nukleová kyselina je nositelem genetické informace virů. V roce 1956 **H. Fraenkel-Conrat** a **R. Williams** (současně **A. Gierer** a **G. Schramm**) prokázali infekčnost nukleové kyseliny viru mozaiky tabáku. **A. Isaac** a **J. Lindemann** v roce 1957 prokázali spojitost tvorby interferonu s virovou infekcí a rovněž objasnili fenomén interference při virových infekcích. Poznat strukturu virového pláště a jeho podjednotek umožnil objev negativního barvení **S. Brennerem** a **R.W. Hornem** v roce 1959, které rozšířilo využití elektronové mikroskopie při studiu virů.

Sedmdesátá léta jsou spojena s nástupem a rozvojem genetiky, biochemie a molekulární biologie. Ve virologii, snad více než v jiných vědeckých disciplínách, hrají tyto metody klíčovou roli, a to nejen při studiu virů a dalších nebuněčných mikroorganismů. Viry se brzy stávají významným genetickým a molekulárně-biologickým modelem. V roce 1967 **J.R. Kates** a **B.R. McAuslan** prokázali přítomnost RNA polymerázy v purifikátu viru pravých neštovic. Velký význam, a nejen pro virologii, měl později objev **D. Baltimora** a **H.M. Temina**, kteří v roce 1970 nezávisle na sobě objevili reverzní transkriptázu. **M.F. Jacobson** a **D. Baltimore** v roce 1968 popsali translaci genomické RNA poliovirů. RNA sestřih byl pak objeven v roce 1977 **A.J. Bergem** a **P.A. Sharpem** při studiu replikace adenovirů. **D.A. Jackson**, **R.H. Symons** a **P.A. Berg** v roce 1972 dokázali začlenit do DNA viru SV-40 geny fága lambda a galaktózový operon *Escherichia coli* a otevřeli tím nové možnosti využití virů pro genové inženýrství. Až v roce 1983 byla

pak publikována první úplná sekvence bazí DNA bakteriofága λ (48 502 párů bazí).

Devadesátá léta jsou doslova informační explozí objasňující postupně jednotlivé kroky života virů na molekulární úrovni. Přesto řada vlastností a projevů virů dosud zůstává neobjasněna nebo dokonce neobjevena a zůstává zde prostor, ve kterém může každý uplatnit své schopnosti a zájem o vědu.

Metodologický rozvoj virologie a mikrobiologie vedl k objevům nových nebuněčných (subbuněčných) infekčních agens. **S.B. Prusiner** v roce 1979 označil některé dříve popsané nekonvenční viry vyvolávající “pomalé” virové infekce za priony. Později, v roce 1983, **T.O. Diener** odlišil od virů viroidy vyvolávající choroby rostlin a tvořené pouze malými RNA bez proteinového obalu.

Z uvedeného historického přehledu o vývoji virologie je zřejmé, že se jedná o rychle se rozvíjející vědeckou disciplínu stále více a více multidisciplinárního charakteru prolínající se především s genetikou, biochemií a molekulární biologii. Je vhodné si uvědomit, že virologie je zaměřena velmi prakticky do oblastí humánní a veterinární medicíny, případně rostlinolékařství. Velký podíl svého vědeckého potenciálu směřuje na řešení praktických virologických otázek mezi něž patří:

- Kde jsou přirozená ohniska výskytu virů?
- Za jakých podmínek dochází k jejich šíření a ke vzniku epidemií?
- Jaký je vztah patogena a hostitele?
- Jak můžeme omezit negativní vliv působení virů?

3 VLASTNOSTI VIRŮ A JEJICH KLASIFIKACE

Termín “virus” byl dlouhou dobu synonymem pro jed “poison”. Během 19. století se jeho význam rychle měnil. Nejdříve se stal označením pro “mikroba”, později jej začal L. Pasteur používat pro obecné označení infekčního agens (infekční částice). V osmdesátých letech 19. století, s rozvojem kultivace bakterií a hub na živných médiích v aseptických podmínkách, konstrukcí nových výkonnějších optických mikroskopů a vývojem bakteriálních filtrů, se zúžil obsah pojmu virus na označení infekčních agens menších než bakterie, a to tzv. “filterable viruses” - filtrovatelných (ultramikroskopických) virů.

Vlastnosti virů jsou určeny genetickou informací nesenou virovým genomem. Tato genetická informace se dědí z generace na generaci a zejména v případě RNA virů vykazuje vysokou proměnlivost. Další významnou vlastností virů, která je vlastní všem živým organismům, je schopnost adaptace. Virové funkce však nejsou aktivovány mimo buňku, viry nemají svůj vlastní metabolický aparát a nejsou schopny uchovávat volnou energii.

3.1 Klasifikace virů

I když se to na první pohled nezdá, viry představují velice heterogenní skupinu mikroorganismů. Projevuje se to nejen obrovskou šíří hostitelů od bakterií, sinic, řas, prvoků, rostlin až po obratlovce, ale i jejich velkou strukturální variabilitou a reprodukční strategií. V elektronovém mikroskopu můžeme pozorovat virové částice nejrůznějších tvarů a velikostí, a to od nejjednodušších kubických virů o průměru 20 nm (*Picornaviridae*), jako například *Human parvovirus B19*, až po složené velké viry (*Poxviridae*), jako je virus pravých neštovic (*Variola virus*), který má tvar hranolu o hranách 180 x 250 x 350 nm. Stejně variabilní je i struktura jejich genomu nesoucího od jednoho až po několik desítek genů, genomu jednoduchého nebo složeného, genomu tvořeného DNA nebo RNA nejrůznější topologie a polarity. K virům s největšími částicemi a genomem patří zástupci čeledi *Mimiviridae*, jejichž částice dosahují velikosti 400 až 800 nm a genom má cca 1 180 kb.

Existence velkého počtu virových druhů schopných infikovat všechny známé buněčné organismy si vyžádala jejich systematické rozčlenění. O vytvoření prvního taxonomického systému se pokusil v roce 1948 rostlinný virolog **F.O. Holmes**, který vytvořil umělý systém založený na popisu projevů chorob a okruhu hostitelů a navrhnul latinské pojmenování jednotlivých taxonů. Rozlišoval viry bakterií (Phaginae), rostlin (Phytophaginae) a živočichů (Zoophaginae). V roce 1962 byl na zasedání 'Provisional Committee on Nomenclature of Virus' dán základ pro vytvoření LHT⁴ klasifikace virů na základě chemických a fyzikálních charakteristik virů (např. typ nukleové kyseliny, symetrie kapsidy, počet kapsomer, přítomnost lipoproteinového obalu (envelope), velikost virionu). V roce 1971 **D. Baltimore** rozdělil viry do 7 skupin podle způsobu syntézy mRNA. Jednalo se první rozdělení virů podle jejich reprodukční strategie. Až v roce 1991 byla na Mezinárodním mikrobiologickém kongresu v Moskvě z iniciativy tří významných virologů **A. Lwoffa, R.W. Horneho a P. Tourniera** založena Mezinárodní komise pro nomenklaturu virů (později přejmenována na Mezinárodní komisi pro taxonomii virů, **International Committee for Taxonomy of Viruses, ICTV**). Vedly se diskuse, zda stovky druhů virů infikujících všechny živé organismy mají tvořit jednotný systém. Jako obecná kritéria pro tvorbu systému byly přijaty následující vlastnosti virů:

- **typ a organizace virového genomu (typ nukleové kyseliny, počet genomických segmentů, polarita virového genomu),**
- **struktura virionu (symetrie proteinového pláště, přítomnost nebo absence vnějšího lipoproteinového obalu),**
- **reprodukční strategie viru.**

Podle zprávy ICTV (2005) byly definovány a jsou i prakticky využívány tyto taxonomické jednotky: **řád** (order), **čeled'** (family), **podčeled'** (subfamily), **rod** (genus) a **druh** (species).

Pokud nebereme v úvahu detaily, můžeme říci, že virologie prakticky využívá následujících taxonů.

⁴ LHT – název klasifikace virů odvozen od jmen autorů: Lwoff, Horne a Tournier.

- **Řád** je reprezentován skupinami virových čeledí stejné obecné charakteristiky, ve které se liší od jiných řádů a čeledí. Jedná se o následující vlastnosti:
 - chemické složení virionu (biologická a biochemická funkce složek),
 - replikační strategie viru,
 - struktura virové částice (symetrie proteinového pláště, přítomnost nebo absence vnějšího lipoproteinového obalu),
 - organizace genomu.
- **Čeďed'** je reprezentována skupinami virových rodů stejné obecné charakteristiky, ve které se liší od jiných čeledí. Pro zařazení do řádu a čeledí jsou rozhodující:
 - chemické složení virionu a funkce jednotlivých složek,
 - replikační strategie viru,
 - struktura virové částice,
 - organizace genomu.
- **Rod** je reprezentován skupinou virových druhů stejné obecné charakteristiky, ve které se liší od jiných rodů. Kritéria pro stanovení rodů se liší mezi jednotlivými čeleděmi. Obvykle se jedná o strukturální, genetické a biologické odlišnosti (např. přenos/šíření, identita virových produktů).
- **Druh** je základní jednotkou systému virů. V roce 1991 akceptoval ICTV definici virového druhu navrženou van Regenmortelem: **Virový druh představuje polytetickou skupinu virů jednotného původu - definovanou vývojovou řadou a vyskytující se v určité ekologické nise.**

Klasifikace virového druhu je založena především na následujících vlastnostech:

- sekvenční příbuznost genomů,
- přirozený okruh hostitelů,
- buněčný a tkáňový tropismus,
- patogenita a cytopatologie,
- způsob přenosu, vektorový přenos,
- antigenní vlastnosti virových proteinů,
- zeměpisné rozšíření.

Kritéria pro nižší jednotky, než je druh, nejsou jednotná a jsou interpretována různým způsobem.

- **Kmen** (strain) je definován na základě rozdílů v biologických vlastnostech (virulence, patogenita, přenos/šíření, okruh hostitelů ap.), ale i na sekvenční identitě genomické nukleové kyseliny.
- **Izolát** představuje populaci jednoho druhu viru, která se liší v blíže nespecifikovaných vlastnostech od jiných populací téhož druhu.
- **Typ** představuje populace jednoho druhu viru, která se liší od jiných populací v jedné konkrétní vlastnosti:
 - **sérotyp** se rozlišuje na základě sérologických vlastností viru,
 - **patotyp** se odlišuje průběhem patogeneze,
 - **elektroforety** se liší elektromigračními vlastnostmi virionů.

Následující tabulka byla vypracována podle údajů ze zpráv ICTV (1999 - 2009). Poukazuje na to, jak málo jsou dosud viry prozkoumány. Svědčí o tom nejen nárůst popsanych druhů virů a viroidů, ale také skutečnost, že celá řada čeledí a rodů není přiřazena k vyšší taxonomické skupině.

Tab. 1 Vývoj počtů řádů, čeledí, rodů a druhů virů v letech 1999-2009

	Řády	Čeledi	Rody	Druhy
ICTV 1999	3	64	228	1 235
ICTV 2002	3	69	246	1 364
ICTV 2005	3	72	255	1 433
ICTV 2009	6	87	348	2 288

ICTV oficiálně uznává klasickou latinskou nomenklaturu jednotlivých taxonů, obvykle psanou proloženě (kurzívou). V řadě případů se jedná o přepisy dříve mezinárodně používaných anglických názvů. Vedle toho se často používá 'triviálních' názvů v českém jazyce, které jsou považovány za neoficiální (*Poxviridae* – poxviry, *Potyviridae* – potyviry). V odborném projevu je však nutností

používat platné názvy taxonů a virových druhů.

Příklad zařazení viru do systému (tučně jsou zvýrazněny charakteristické přípony jednotlivých taxonů):

Řád: ***Herpesvirales***

Čeleď: ***Herpesviridae***

Podčeleď: ***Alphaherpesvirinae***

Rod: ***Varicellovirus***

Druh: ***Human herpesvirus 3***

3.2 Přehled vlastností virů

Jednotlivé skupiny (druhy, kmeny) virů se vyznačují vlastnostmi, které umožňují jejich přesný popis a zařazení do systému (např. typ nukleové kyseliny, replikační strategie). Jiné vlastnosti (např. okruh hostitelů, geografické rozšíření, sérologické vlastnosti) mají také význam pro diagnostiku a identifikaci jednotlivých virových taxonů. Další používáme při terapii virových infekcí nebo mají dosud pouze význam pro vědu jako součást biologických nebo genetických modelů. Pro přehlednost je uveden přehled charakteristik, které můžeme stanovit a studovat.

I. Vlastnosti virionu

A. Morfologické vlastnosti (struktura virionu)

- velikost virionu
- tvar virionu
- přítomnost nebo absence vnějšího lipoproteinového obalu (envelope)
- symetrie kapsidy a její struktura
- jeden nebo více morfologických typů virionů

B. Fyzikálně-chemické a fyzikální vlastnosti virionu

- molekulová váha virionu
- hustota virionu
- sedimentační koeficient virionu
- stabilita viru: pH stabilita, teplotní stabilita, citlivost vůči organickým rozpouštědlům, detergentům a radiaci
- přítomnost kationtů (Mg^{2+} , Mn^{2+})

C. Vlastnosti genomu

- typ nukleové kyseliny (RNA/DNA)
- velikost genomu nebo jeho jednotlivých segmentů

- jednovláknová/dvouvláknová nukleová kyselina
- lineární/cirkulární genom
- segmentovaný genom (počet a velikost segmentů)
- smysl nukleové kyseliny - sense (+)/antisense (-), ambisense⁵
- sekvence nukleotidů
- přítomnost repetitivních sekvencí
- poměr G+C párů bazí
- přítomnost nebo absence kovalentně vázaného peptidu na 5'-konci
- přítomnost nebo absence čepičky na 5'-konci
- přítomnost nebo absence poly(A) sekvence na 3'-konci (nebo jiné specifické sekvence)

D. Vlastnosti proteinů

- počet, velikost a funkční aktivity strukturálních proteinů; počet, velikost a funkční aktivity ne-strukturálních proteinů
- funkční aktivity proteinů (virová transkriptáza, reverzní transkriptáza, hemaglutinin, neuraminidáza)
- sekvence aminokyselin
- glykosylace, fosforylace, metylace
- epitopové mapování

E. Tuky

- přítomnost nebo absence lipidů
- původ a charakteristika lipidů

F. Cukry

- přítomnost nebo absence cukrů
- původ a charakteristika cukrů

II. Organizace genomu a replikační strategie

- organizace genomu
- replikační strategie nukleové kyseliny
- počet a umístění ORF (otevřený čtecí rámec)
- charakteristika transkripce
- charakteristika translace a posttranslační úpravy
- lokalizace akumulace virových proteinů, místo skládání a shromažďování virionů a uvolnění
- cytopatologie, inkluze

⁵ 'Ambisense' genom – část genomu má smysl (+), část (-).

III. Antigenní vlastnosti

- sérologické vztahy mezi viry
- mapování epitopů

IV. Biologické vlastnosti

- okruh hostitelů, přirození a experimentální hostitelé
- patogenita, asociace s chorobou
- tkáňový tropismus, patologie, histopatologie
- přirozený způsob přenosu
- vztah k vektoru
- zeměpisné rozšíření

3.3 Struktura virionu

Virová částice představuje vysoce organizovanou strukturu skládající se z nukleové kyseliny a proteinového pláště (kapsidy), případně vnějšího lipoproteinového obalu. Níže jsou uvedeny a vysvětleny základní termíny používané k popisů virových částic.

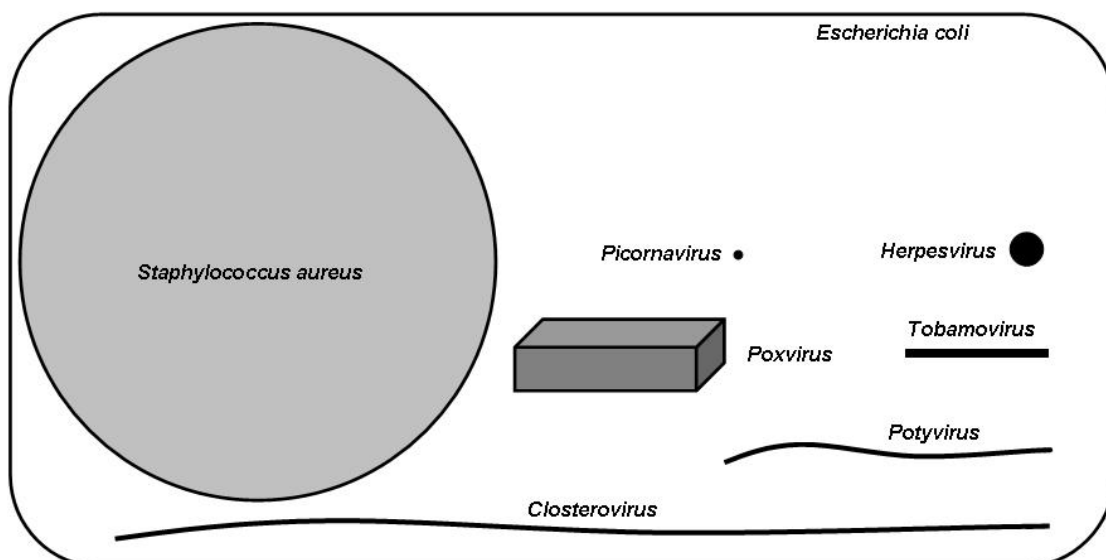
- **VIRION** je kompletní infekční virová částice.
- **KAPSIDA (PROTEINOVÝ PLÁŠŤ)** je proteinový obal virové nukleové kyseliny skládající se ze strukturních jednotek nebo kapsomer.
- **STRUKTURNÍ JEDNOTKY (PROTOMERY)** jsou nejmenší funkční ekvivalenty stavebních jednotek proteinového pláště (molekuly proteinů).
- **KAPSOMERY** jsou morfologické jednotky pozorovatelné na povrchu částice a často je představují shluky strukturních jednotek.
- Kapsida (proteinový plášť) společně s uzavřenou nukleovou kyselinou představuje **NUKLEOKAPSIDU**.
- Virová nukleokapsida může být obalena **vnějším lipoproteinovým OBALEM (ENVELOPE)**, jehož základ pochází z hostitelské buňky, ale může obsahovat i materiál virového původu. Vnější obal se skládá z lipidové dvojvrstvy a transmembránových glykoproteinů, které tvoří výběžky na povrchu virionu.

- Vnitřní struktura virionu představuje **JÁDRO VIRU** (dřeň, shell), tvoří je obvykle nukleokapsid, případně vrstva virového membránového proteinu, která nukleokapsid obaluje.

Viriony je možné pozorovat pouze v elektronovém mikroskopu. Částečnou výjimku tvoří zástupci čeledi *Poxviridae*, jejichž velikost leží na hranici rozlišitelnosti světelným mikroskopem. Nepatrné rozměry virů zvláště vyniknou, srovnáme-li velikost mezofylové buňky tabáku ($2 \times 10^{15} \text{ nm}^3$) a malého rostlinného viru ($2 \times 10^4 \text{ nm}^3$). Vidíme, že rozdíl se pohybuje řádově 10^{11} .

Studium struktury virionu je spojeno s významnými objevy fyziky a chemie. Jako první byla určena velikost virů, a to na základě průchodnosti filtry, nejdříve porcelánovými, později celofánovými. Pomocí Chamberlandových porcelánových filtrů (1884) mohly být virové částice odfiltrovány od bakterií. Později v roce 1907 **H. Bechhold** v Německu vyvinul postup přípravy propustných filtrů s žádanou velikostí pórů a **W.J. Elford** v Anglii je použil ke stanovení velikosti bakteriofágů a některých živočišných virů. Během druhé světové války byl v elektronovém mikroskopu pozorován virus mozaiky tabáku. Pozdější objev negativního barvení (**H.E. Huxley**, 1957) umožnil zhotovit první kontrastní fotografie. Zdokonalená technika elektronové mikroskopie a krystalografie umožnila detailně poznat strukturu virové částice.

Obr. 1 Porovnání velikostí bakterií a zástupců různých skupin virů (velikost *Staphylococcus aureus* cca 1 000 nm)



3.3.1 Velikost a tvar virové částice

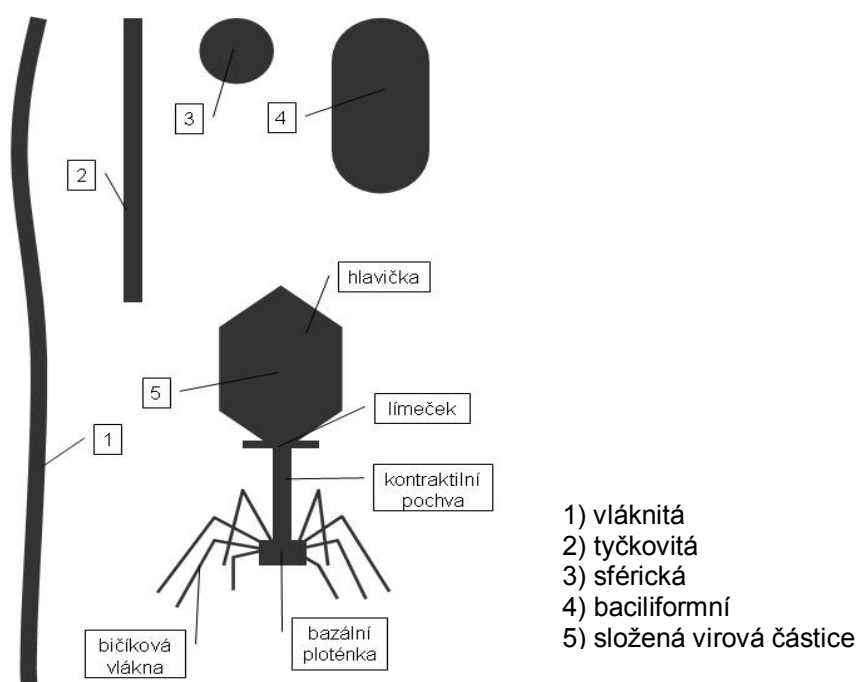
Viry jsou, co se týče velikosti, velice variabilní. Malé viry s velice jednoduchou strukturou představovanou neobalenými nukleoproteiny jsou zástupci čeledi *Picornaviridae* a *Parvoviridae*, průměr jejich částic se pohybuje kolem 20 nm. Zástupci čeledi *Potyviridae* mají vláknité částice o délce 680 - 720 nm a průměru 18 nm. Nejdelší vláknité částice, až 2 000 nm, mají zástupci rodu *Closterovirus*. K největším virům patří viry z čeledi *Poxviridae*, například rod *Orthopoxvirus* má rozměry větší než 200 x 200 x 250 nm.

Při pozorování a popisu virionu v elektronovém mikroskopu má význam jejich tvar. Pro potřeby popisu rozlišujeme tvar:

- izometrický/sférický (*Picornavirus*),
- baciliformní (*Alfalfa mosaic virus*),
- tyčkovitý (*Tobamovirus*),
- vláknitý (*Potyvirus*, *Closterovirus*),
- složený (*Myoviridae* – izometrická hlavička, kontraktilní bičík),
- atypický, komplexní (*Poxvirus*).

Některé viry se vyznačují jedním morfologickým typem částic, jiné více typy morfologicky ale i geneticky různých částic.

Obr. 2 Příklady morfologie virových částic



U obalených virů není možné charakterizovat jejich tvar podle symetrie a pevné struktury kapsidy. Vnější lipidový obal je částečně amorfni a vytváří viriony obvykle ovoidního až dlouze protáhlého tvaru. Tento typ uspořádání virionu často označujeme jako komplexní, přestože vnitřní nukleokapsid je obvykle uspořádán podle ikosohedrické nebo helikální symetrie.

Příklady morfologie virových částic:

<i>Alfalfa mosaic virus</i>	baciliformní (4 druhy částic)	18 x 58, 48, 36, 28 nm
<i>Carlavirus</i>	vláknitý - flexibilní	12-15 x 600 - 700 nm
<i>Closterovirus</i>	vláknitý - flexibilní	12 x 1250 – 1 800 nm
<i>Hordeivirus</i>	tyčkovitý (3 druhy částic)	22 x 100 - 150 nm
<i>Myoviridae</i>	izometrická hlavička, kontraktilní bičík	
<i>Potexvirus</i>	vláknitý - flexibilní	13 x 470 - 580 nm
<i>Potyvirus</i>	vláknitý - flexibilní	11 x 720 - 770 nm
<i>Tobamovirus</i>	tyčkovitý	18 x 300 nm

Příklady virů s komplexním uspořádáním virové částice:

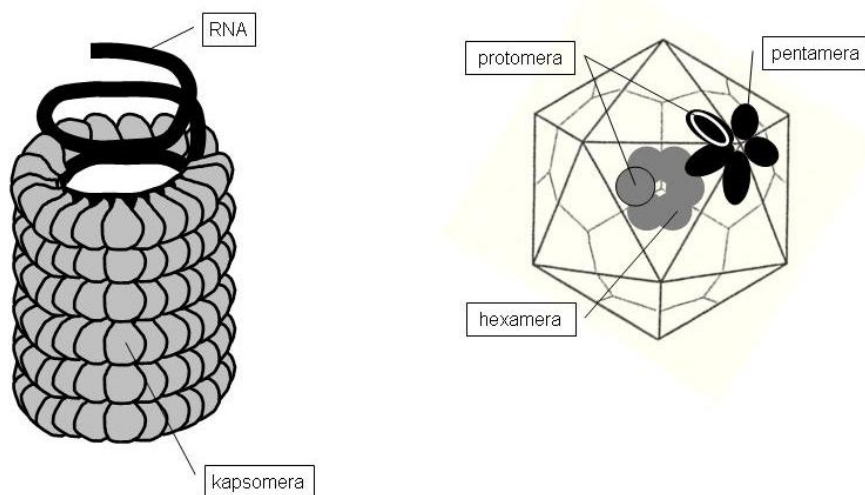
<i>Flaviviridae</i>	komplexní	40 - 50 nm
<i>Herpesviridae</i>	komplexní	120 - 300 nm
<i>Orthomyxoviridae</i>	komplexní	80 - 120 nm
<i>Paramyxoviridae</i>	komplexní	150 - 300 nm
<i>Retroviridae</i>	komplexní	80-130 nm
<i>Filoviridae</i>	komplexní	80 x 970 nm
<i>Poxviridae</i>	komplexní	170 - 260 x 300 - 450 nm
<i>Rhabdoviridae</i>	komplexní	50 - 95 x 130 - 380 nm

3.3.2 Architektura virové částice

Z biologického hlediska je nejdůležitější složkou virionu **nukleová kyselina** (RNA nebo DNA) představující virový genom. **Proteinový plášť**, který obaluje virovou nukleovou kyselinu, je tvořen jedním nebo více druhy proteinových molekul, které se v průběhu skládání virové částice k sobě navzájem řadí podle fyzikálních a chemických afinit. Jedná se o proces autoagregace (samouspořádání, 'self assembly'). Interakce mezi nukleovou kyselinou a proteinovým pláštěm je vysoce specifická a hraje důležitou roli v utváření konzervativní struktury virové částice. Uspořádání proteinového pláště určuje **symetrii virové částice**, a to helikální nebo kubickou (ikosohedrickou). Výjimku tvoří mnohé obalené viry, např. poxviry,

které se vyznačují komplexní strukturou, nebo některé asymetrické bakteriofágy. Symetrie nukleokapsidy (kapsidy) je charakteristická pro jednotlivé taxonomické skupiny virů.

Obr. 3 Schéma helikálního (vlevo) a ikosohedrického (vpravo) uspořádání proteinového pláště

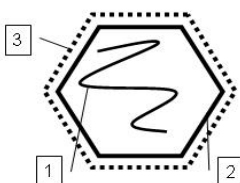


Obr. 4 Příklady architektury virových částic

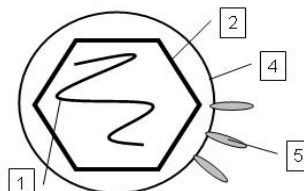
Nahá nukleokapsida



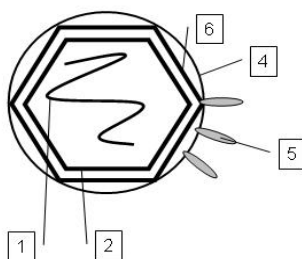
Enkapsidovaná nukleokapsida



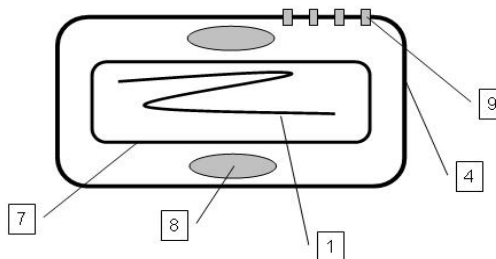
Obalená nukleokapsida



Obalená nukleokapsida



Složený virion



1) nukleová kyselina; 2) proteinová kapsida; 3) enkapsidovaná kapsida; 4) lipidová membrána (envelope); 5) proteinový výčnělek (peplomera); 6) tegument; 7) obal dřeně; 8) laterální tělíska; 9) povrchové tubuly. Příkladem nahé nukleokapsidy jsou viriony pikornavirů nebo parvovirů, příkladem enkapsidované nukleokapsidy jsou částice reovirů, obalené nukleokapsidy pak viriony togavirů (I) a herpesvirů (II). Složený virion představují částice poxvirů.

Viriony s **helikální symetrií** jsou tvořeny proteinovými molekulami (strukturálními jednotkami), které se řadí za sebou ve spirále podél vlákna virové nukleové kyseliny. Příkladem helikální symetrie jsou částice viru mozaiky tabáku (*Tobacco mosaic virus*). Její virion má tvar pevné tyčky o průměru 18 nm a délce 300 nm. Virus obsahuje jednovláknovou molekulu DNA a cca 2 130 kopií proteinu složeného ze 158 aminokyselin. Jeden závit ve šroubovici se skládá z 16 a 1/3 strukturálních podjednotek. V průběhu polymerizace proteinových monomerů dochází k tvorbě různých struktur, z nichž nejvýznamnější je tzv. disk (34 bílkovinných monomerů). Skládáním disků vzniká helikální kapsida. V infikované buňce dochází ke skládání disku a vzniku helixu v přítomnosti virové nukleové kyseliny. Řazení jednotlivých disků je vyvoláno specifickou sekvencí nukleotidů virové RNA. Většina vláknitých virů má helikální symetrii proteinového pláště (*Potexvirus*, *Carlavirus*). U flexibilních (ohebných) vláknitých virů je striktní helikální symetrie v místě ohybu narušena. U řady obalených virů může být vláknitá nukleokapsida různě stočena; je součástí dřeně virové částice a je obalena membránovými proteiny a/nebo vnějším lipoproteinovým obalem (*Orthomyxovirus*, *Paramyxovirus*, *Rhabdovirus*).

Představa o **ikosoedrické symetrii** je složitější. Obvykle má virion tvar dvacetistěnu se třemi osami souměrnosti, který vzniká autoagregací kapsomer dvojího druhu: pentony tvoří 12 vrcholů dvacetistěnu, hexony tvoří jeho stěny. Pentony jsou tvořeny pěti, hexony šesti identickými polypeptidy - strukturálními jednotkami. Ikosoedrická symetrie je ideální pro vytvoření stabilní struktury z identických stavebních složek. Jedny z nejmenších virů (*Parvoviridae*) mají proteinový plášť vytvořen pouze ze 60 identických strukturálních podjednotek složených do 12 pentamerů (morfologických jednotek). Kapsidy větších ikosoedrických virů jsou tvořeny násobkem počtu 60 strukturálních podjednotek.

Jak bylo již uvedeno, ne všechny viry jsou charakterizovány jediným typem symetrie virionu. Baciliformní částice viru mozaiky vaječnice (*Alfalfa mosaic virus*) mají helikální uspořádání kapsomer v centrální části pláště, konce částic mají strukturu podobnou izometrickým virům.

Zajímavá je i složená struktura bakteriofága T4, kde můžeme pozorovat jak kubickou (kapsida hlavičky), tak helikální symetrii (kontraktilní pochva), ale např. i zvláštní vláknité struktury (bičíková vlákna).

Viriony poxvirů jsou pleiomorfní a vyznačují se typickou komplexní strukturou. Nejčastěji zaujímají tvar cihly o maximálních rozměrech 450 x 260 x 260 nm. Jejich částice jsou obalené flexibilní lipoproteinovou membránou s četnými tubulárními a globulárními strukturami. Povrchová membrána uzavírá dřeň piškotového tvaru, v bočních prohlubeninách se pak nacházejí dvě tělíška. Atypickou komplexní strukturou mají i zástupci r. *Baculovirus*.

Mnohé viry jsou obaleny vnějším lipoproteinovým obalem (lipidová dvojvrstva hostitelského původu), kterou se nukleokapsida obalí při průchodu lipoproteinovou membránou buňky. V některých případech mají viry, které jsou stabilizovány vnější membránou, vytvořenou vnitřní strukturu tzv. dřeň (core), skládající se z proteinů a virové nukleové kyseliny. Kromě proteinů kapsidy se na virovou nukleovou kyselinu mohou navázat různé virové proteiny s regulační nebo enzymatickou funkcí, které jsou rovněž součástí dřeně. Většina obalených virů získává vnější obal během uvolňování z buňky pučením na buněčné membráně (např. *Herpesviridae*, *Orthomyxoviridae* a *Paramyxoviridae*). Na vnitřní straně lipidové dvojvrstvy se u některých obalených virů nachází druhově specifický protein, který spojuje obal s nukleokapsidou a je označován jako membránový (M) protein. Na povrch obalu vystupují výčnělky (peplomery) biologicky aktivních molekul, obvykle glykoproteinů upevněných v M proteinu nebo pouze v lipidové dvojvrstvě hydrofóbními interakcemi. Uplatňují se především při adsorpci virionu na povrch vnímavých buněk, ale mohou plnit i další funkce. Obalené viry mají řadu společných fyzikálně-chemických a biologických vlastností odvoditelných z obecných vlastností lipidového obalu. Např. všechny obalené viry jsou snadno dezintegrovatelné éterem a jinými rozpouštědly tuků a jsou méně stabilní vůči různým fyzikálním a chemickým vlivům než viry neobalené, představované pouze nukleokapsidou. Jsou rovněž inaktivovatelné kyselým pH, a proto běžně nepronikají dále do trávicího traktu. Nemoci, které způsobují, se zpravidla přenášejí přímým stykem nebo kapénkovou infekcí.

Rostlinné viry jsou až na výjimky tvořeny jednoduchým nukleoproteinem bez vnějšího obalu. Pouze zástupci rodů *Reovirus*, *Fijivirus* a *Oryzavirus* mají dvojvrstevnou proteinovou kapsidu. Typický lipidový obal mají pouze zástupci čeledi *Rhabdoviridae*.

Jak již bylo uvedeno, neobalené (nahé) viry jsou obvykle tvořeny jen nukleokapsidou. Nahé viriony jsou většinou rezistentní k organickým rozpouštědlům a relativně odolné k vlivům prostředí.

Obalené viry, tj. viry, které mají na povrchu lipoproteinový obal, jsou citlivé vůči organickým rozpouštědlům, jsou citlivé vůči kyselému pH a jsou méně stabilní než nahé viry. Většina obalených virů dozrává (kompletuje se, upravuje a obaluje) na cytoplazmatické membráně nebo na membránách endoplazmatického retikula. Proces dozrávání je spojen s modifikacemi cytoplazmatické membrány (vlození transmembránových proteinů tvořících výběžky) mnohdy již před obalením virové částice. Tyto transmembránové virové proteiny slouží často jako virové receptory pro rozpoznání a vazbu na cílovou buňku.

3.3.3 Funkce a význam jednotlivých částí virionu

Virová nukleová kyselina je nositelkou genetické informace a představuje genom viru.

Strukturní proteiny⁶ – proteiny tvořící strukturu virové částice (proteiny kapsidy, membránové proteiny, asociované funkční proteiny, receptorové proteiny atd.).

- **Asociované funkční proteiny** se podílejí na zahájení replikace viru. Tyto enzymy a signální proteiny nemohou být nahrazeny buněčnými proteiny.
- **Strukturální proteiny vytvářející kapsidu a membránové proteiny** na povrchu virové částice mají následující funkce.
 - **Rozpoznávací** - kapsomery (eventuálně strukturní jednotky) rozpoznávají svoji nukleovou kyselinu a obalují ji.

⁶ Nestrukturní proteiny představují všechny virem kódované proteiny, které nejsou součástí zralé virové částice (virionu). Jsou však nezbytné pro replikaci virových částic a nejsou nahraditelné buněčnými proteiny.

- **Interakce s hostitelem** - kapsida se aktivně podílí na zahájení procesu virové infekce, a to vazbou na receptory a zprostředkováním vstupu viru do buňky u všech virů s výjimkou virů rostlin. U nich se primární interakce mezi virionem a hostitelskou buňkou odehrává v cytoplazmě. **Vnější lipidový obal** a především **integrované glykoproteiny** se podílejí na interakci s hostitelskou buňkou a rozpoznání viru specifickými protilátkami.
- **Mutace** - změna genu kódujícího strukturní jednotky se může projevit ve změně struktury kapsidy nebo proteinů integrovaných do obalu a může zamezit rozpoznání viru protilátkami připravenými v průběhu předcházející infekce nebo vakcinace jiným sérotypem viru. Může také dojít ke změně interakcí s hostitelskou buňkou a hostitelem obecně.

3.3.4 Genom virů

Genom virů je velice variabilní. Představuje ho deoxyribonukleová (DNA) nebo ribonukleová kyselina (RNA), a to jednovláknová (ssDNA, ssRNA) nebo dvouvláknová (dsDNA, dsRNA), lineární nebo cirkulární. Důležitou vlastností je velikost genomu a počet segmentů. Genom dále charakterizují terminální sekvence připojené na 5'- nebo 3'-konec. Velký význam pro klasifikaci a diagnostiku virů má nukleotidová sekvence genomu. Genom může být dále charakterizován kódující kapacitou (počet genů, počet otevřených čtecích rámců – ORF). Význam mají i regulační sekvence-signály jako zesilovače transkripce, promotory nebo terminátory. Některé taxony virů s děleným genomem vytvářejí více druhů morfologicky i geneticky odlišných částic.

Příklady virů vytvářejících morfologicky i geneticky odlišné typy částic:

<i>Alfalfa mosaic virus</i>	ssRNA	3 lineární segmenty; 4 druhy částic
<i>Furovirus</i>	ssRNA	2 lineární segmenty; 2 druhy částic
<i>Hordeivirus</i>	ssRNA	3 lineární segmenty; 3 druhy částic nesoucích po jednom genomickém segmentu
<i>Cucumovirus</i>	ssRNA	3 lineární segmenty; 3 druhy částic nesoucích obvykle 2 ze 3 genomických segmentů

Virus mozaiky vojtěšky je typickým zástupcem vytvářejícím morfologicky (B, M, T_a, T_b) a geneticky rozdílné částice. B částice nesou největší genomický segment, M částice menší a T_b částice nejmenší segment. T_a částice nesou dvě molekuly subgenomické RNA (mRNA kódující plášťový protein). Pro infekci je nutná přítomnost tří větších segmentů i subgenomické mRNA.

3.4 Vztah viru a hostitelské buňky

Poznání interakce virus - hostitelská buňka je centrem snah a aktivit většiny virologů. Právě v tomto bodě je možné objevovat obecné, ale i jedinečné principy životních projevů virů. Získané poznatky mají svůj teoretický význam nejen ve virologii, ale umožňují studovat nové a nové projevy hostitelských buněk, orgánů a organismů. Praktické aplikace potom nacházíme v řadě technologií a postupů; např. rezistentní šlechtění, terapie virových infekcí, studium kancerogeneze, biologická ochrana, genová terapie.

Viry jako intracelulární parazité jsou závislé na hostitelské buňce, a to především na energii a syntetickému aparátu makromolekul. Navíc virus využívá buňky jako pracovní dílny pro replikaci svého genomu, syntézu funkčních a strukturálních částí virionů a skládání nových virionů. Pro tyto účely virus využívá obrovské množství mechanismů k ovládnutí a využití funkcí hostitelské buňky. Zdá se tedy, že jejich největší "nevýhodou" je prakticky stoprocentní závislost vlastní reprodukce a všech životních projevů na hostitelské buňce. Zatímco u všech vyšších forem života začíná dceřiná buňka svoji existenci s kompletní genetickou informací, s enzymy nezbytnými pro její replikaci, transkripci a translaci, virus je vybaven pouze nukleovou kyselinou nesoucí jeden až několik desítek genů a někdy také enzymy schopnými nastartovat proces reprodukce.

3.4.1 Životní cyklus virů (reprodukce virů)

Jak již bylo uvedeno, viry jsou obligátní intrabuněční parazité, jejichž reprodukce probíhá pouze v živých (metabolicky aktivních) buňkách živočichů, rostlin, hub a bakterií. Nejjednodušší viry mají virion složený pouze z malé nukleové kyseliny a asociovaného proteinového pláště. Velké viry mají ve své nukleové kyselině zakódované až několik desítek genů, nesou nezbytné reprodukční enzymy a jsou

obaleny lipidovou membránou obsahující virem kódované glykoproteiny. Kompletní životní cyklus většiny virů od vstupu do buňky až po uvolnění nových virových částic proběhne za 30 min až několik málo dní a v jedné infikované buňce vznikne průměrně 10^3 až 10^5 nových virionů.

Koncepčně můžeme reprodukci viru rozdělit do šesti fází:

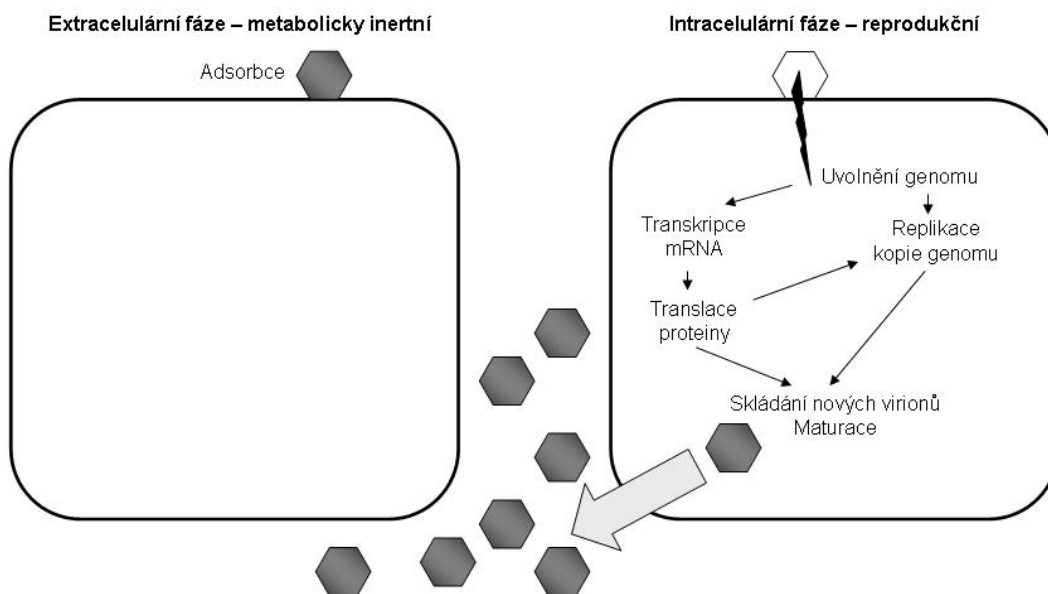
1. **adsorpce** na vnímavou buňku,
2. **penetrace** (průnik) virionu do buňky,
3. **rozbalení virionu** (uvolnění virové nukleové kyseliny),
4. **replikace a exprese** (transkripce, translace) virového genomu,
5. **skládání a maturace** (zrání) virionů,
6. **uvolnění** zralých virionů z buňky.

Infekce začíná adsorpcí virionu na povrch buňky prostřednictvím kapsidy nebo specifických glykoproteinů vnějšího obalu (envelope). Všechny viry mají na svém povrchu proteiny vytvářející **receptor-vazebná místa** (receptor-binding site), které mají často strukturu "kapsy" nebo "výčnělku", který rozpoznává odpovídající **receptory** na buněčném povrchu. V případě rostlinných virů dochází ke geneticky podmíněné interakci až v cytoplazmě infikované buňky, kde viriony rozpoznávají cytoplazmatické receptory. Buňka bez odpovídajícího receptoru nemůže být napadena.

Jako receptory využívají viry různé skupiny molekul a jejich komplexů, především proteinů, lipidů a oligosacharidů. Receptory jsou často molekuly s jinými přirozenými funkcemi (vazba ligandů, endocytóza, rozpoznávání buněk aj.). Například receptorem pro poliovirus a lidský rhinovirus je *ICAM-1 protein*, pro HIV-1 *CD4 protein*, pro virus Epstein-Barrové *CR2 protein* patří ke skupině imunoglobulinů. Na druhé straně u receptoru pro myší C retrovirus nebyla zjištěna dosud žádná jiná buněčná funkce, stejně jako u glykoproteinů obsahujících kyselinu sialovou, která je součástí receptorů pro paramyxoviry a orthomyxoviry.

Přestože adsorpce je podmíněna geneticky, na její účinnost má vliv řada faktorů, jako např. fyziologický stav buněk, pH prostředí, přítomnost a vhodná koncentrace iontů v prostředí (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Na^+ , K^+) nebo kofaktorů (např. L-tryptofan).

Obr. 5 Životní cyklus virů



Tento velice přesný a specifický mechanismus vzájemného rozpoznávání vysvětluje, proč některé viry mají úzký okruh hostitelů nebo mají afinitu jen k některým pletivům nebo tkáním a jiné viry mohou napadat široký okruh hostitelů a infikovat je systémově. Velmi úzký okruh hostitelů má například HIV-1 virus, který rozpoznává a reaguje specificky pouze s receptory vybraných T-lymfocytů (*CD4 protein*), nemůže infikovat jiné buňky, a proto je jeho epidemiologický výskyt omezen prakticky jen na člověka. Podobně virus dětské obrny může interagovat pouze s buňkami primátů a nemůže infikovat jiné živočichy. Příkladem viru s širokým okruhem hostitelů může být virus chřipky A (*Influenza virus A*), jehož přirozeními hostiteli kromě lidí může být i kuň, vepř, domácí i divoce žijící ptáci a někteří mořští savci. Podobně u rostlinných virů máme druhy s úzkým okruhem hostitelů (např. virus svinutky listů bramboru – *Potato leaf roll virus*), ale i s širokým okruhem hostitelů (např. virus mozaiky tabáku – *Tobacco mosaic virus*, virus mozaiky huseníku – *Arabidopsis mosaic virus*, virus mozaiky okurky – *Cucumber mosaic virus*). Obecně platí, že živočišné viry jsou více specializované na určitý typ buněk, které mohou infikovat. Mají obvykle užší okruh hostitelů, ale i tkáňovou či orgánovou specifitu, než rostlinné viry.

Po adsorpci musí virion **proniknou** (penetrace) **do buňky a uvolnit svůj genetický materiál**. Tento proces probíhá různým způsobem u bakteriálních, živočišných a rostlinných virů.

U **bakteriofágů** dochází po adsorpci k **penetraci nukleové kyseliny** do cytoplazmy, přičemž kapsida zůstává až na výjimky mimo buňku. Na injekci virové nukleové kyseliny do buňky se podílí řada dosud málo prostudovaných mechanismů. Bakteriofágy mohou narušit buněčnou membránu v místě zachycení například pomocí enzymu lysozymu. U bakteriofágů s kontraktilním bičíkem může k injekci virové nukleové kyseliny do buňky dojít smrštěním bičíku. Současné výsledky výzkumu naznačují, že se na vstupu virové nukleové kyseliny podílejí také některé specifické proteiny buněčného nebo virového původu, které mají za úkol transportovat nukleovou kyselinu přes buněčnou membránu.

U **živočišných virů** je proces penetrace spojen s termínem **receptorem zprostředkovaná endocytóza** (receptor-mediated endocytosis, viropexis). Jedná se o stejný mechanismus, kterým buňky transportují mezi sebou důležité růstové faktory, peptidové hormony anebo jiné velké molekuly, pro které je plazmatická membrána neprostupná (nepermeabilní). Viriony se váží na odpovídající buněčné receptory a posunují se do prohlubenin buněčné membrány úzce spojených s částí cytoskeletu buňky odpovídajícího za proces endocytózy (clathrin-coated pits). Vedle klatrinu se na různých mechanismech endocytózy mohou podílet dynamin, laveolin nebo lipidový draft. Výsledkem endocytózy je váček (endozóm) obsahující obalený virion. Následně dochází k propojení virového obalu s membránou endozómu a uvolnění virového nukleoproteinu do cytoplazmy. U neobalených virů dochází k přímému uvolnění virionu do cytoplazmy. Důležitou roli v uvolnění a rozbalení virové částice obvykle hraje kyselé pH endozómu, které se podílí na vzniku konformačních změn kapsidy. Tímto způsobem dochází například k průniku a rozbalení zástupců orthomyxovirů, poliovirů nebo adenovirů.

Druhou možností je přímá fúze virového obalu s buněčnou membránou, proniknutí virového nukleoproteinu do cytoplazmy a uvolnění virové nukleové kyseliny do buňky. Pro tyto viry je charakteristický "fúzovací protein" ve virovém lipoproteinovém obalu s krátkým řetězcem hydrofóbních aminokyselin, který

zprostředkovává fúzi mezi lipoproteinovou membránou viru a buněčnou membránou. Přímá fúze s vnější plazmatickou membránou je strategií průniku a rozbalení virové částice využívanou paramyxoviry (spalničky, příušnice), herpesviry a např. i virem HIV 1.

Některé neobalené viry mohou procházet buněčnou membránou i přímo. Tento mechanismus je dosud velmi málo prostudován.

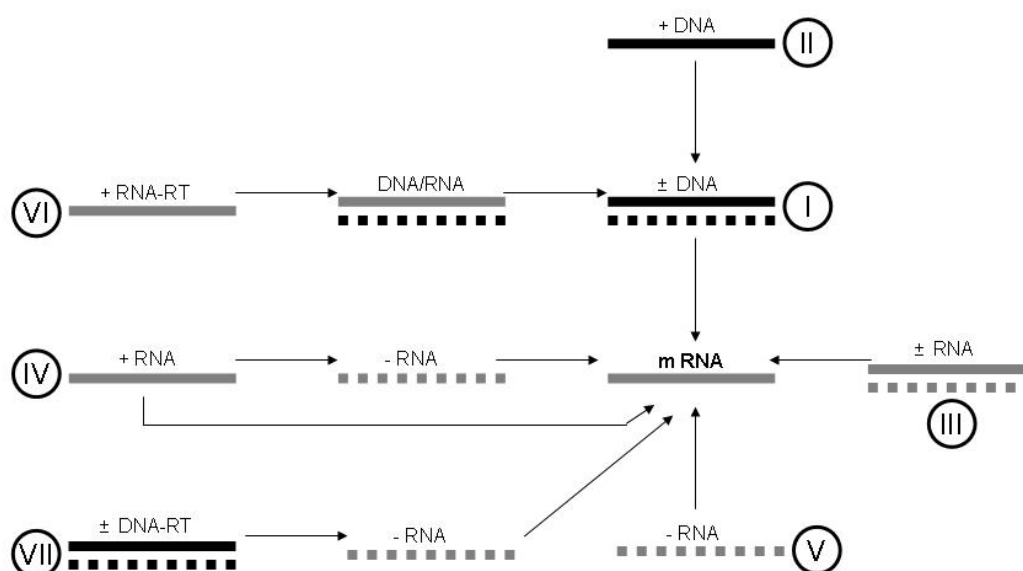
Před **rostlinnými viry** stojí překážka ve formě kutikuly a buněčné stěny, která znemožňuje přímou interakci viru s cytoplazmatickou membránou, jako je tomu u bakteriofágů a živočišných virů. To je s největší pravděpodobností důvodem, proč se tak rozšířil vektorový přenos, při kterém je virus injikován infekčním vektorem přímo do buňky. Rostlinné viry tedy pronikají do hostitelské buňky pasivně a geneticky podmíněné interakce s proteiny hostitelské buňky se odehrávají až v cytoplazmě.

Po infekci buňky následuje až několik hodin dlouhá perioda, během které se zdá, že se z pohledu infikovaného organismu nic neděje. První fáze infekce buňky jsou totiž spojeny s pochody rozbíhajícími se na molekulární úrovni bez přímého poškození buňky (např. rozbalení virionu, transkripce časných virových genů). Během průniku virionu do buňky nebo bezprostředně poté dochází k jeho dezintegraci, která je spojena jak se ztrátou jeho fyzické identity, tak většinou i se ztrátou infekčnosti během počátku reprodukce. Tuto fázi nazýváme **ekliptickou fází** (eclipse phase). Ekliptická fáze je ukončena vznikem prvního virionu v buňce. Následuje **produktivní fáze**, během které jsou tvořeny nové virové částice a ty dále uvolňovány z buňky.

Replikace a exprese virového geonomu se odehrává pouze v živých, metabolicky aktivních buňkách. V životním cyklu virů představuje vedle iniciace virové infekce (adsorpce, penetrace, rozbalení) a uvolnění (včetně předcházející maturace virionů) nejvýznamnější fázi jejich existence. Například kontrola exprese rozhoduje o průběhu virové infekce (akutní, chronická, perzistentní, latentní). Strategie replikace a exprese virového geonomu je zároveň významným taxonomickým kritériem. Jako první navrhnul rozdělení virů podle strategie replikace a exprese geonomu David Baltimore (1971).

Vlastní reprodukce virionů je spojena se syntézou viru-specifických makromolekul, a to nukleových kyselin a proteinů. Syntéza virových nukleových kyselin je katalyzována jak virovými enzymy, tak enzymy původem z hostitelské buňky. Strategie replikace a transkripce virového genomu je typická pro jednotlivé skupiny virů (např. viry s genomem (+)RNA nebo (-)RNA, DNA a RNA viry) a jejich studium umožňuje přesně stanovovat evoluční a příbuzenské vztahy mezi jednotlivými virovými taxony. Obvykle platí, že DNA viry se replikují v jádře s výjimkou zástupců *Poxviridae*, RNA viry se pak replikují v cytoplazmě. Výjimku tvoří např. zástupci čeledi *Orthomyxoviridae*.

Obr. 6 Baltimorova klasifikace virů (skupiny I až VII)



Replikační strategie RNA a DNA virů:

I. dsDNA

- Replikace probíhá výhradně v jádře a je značně závislá na buněčných faktorech. Templátové (nekódující) vlákno DNA slouží jako templát pro syntézu mRNA (např. *Adenoviridae*, *Herpesviridae*).
- Replikace probíhá v cytoplazmě (např. *Poxviridae*). Viry řazené do této skupiny mají komplexní viriony nesoucí všechny potřebné faktory pro zahájení transkripce a replikace. Jedná se o viry nejméně závislé na

buňce. Reprodukce těchto virů však v žádném případě není možná bez produktivní infekce buňky. Nekódující vlákno DNA slouží jako templát pro syntézu mRNA.

II. ssDNA

Repikace genomu probíhá v jádře a zahrnuje tvorbu dvouvláknových DNA meziproductů při syntéze ssDNA genomů; (–)DNA vlákno slouží jako templát pro syntézu mRNA (např. *Parvoviridae*).

III. dsRNA

Tato skupina virů je charakteristická segmentovaným genomem. Jednotlivé segmenty se nezávisle semikonzervativně replikují; (–)RNA vlákna se přepisují do jednotlivých monocistronických⁷ mRNA (např. *Reoviridae*).

IV. ss(+)RNA

- a. Viry, jejichž genom tvoří RNA s funkcí polycistronické mRNA, se replikují přes více nebo méně stabilní dsRNA meziproduct. Syntéza polyproteinů probíhá přímo translací virové ss(+)RNA. Vzniklý polyprotein je štěpen za vzniku funkčních proteinů (např. *Potyvirus*).
- b. Viry s komplexní transkripcí. Dva cykly translace (*Togavirus*) nebo subgenomické RNAs (*Tobamovirus*) jsou potřebné pro syntézu genomických RNA a mRNA.

U virů **ss(+)RNA** (positive-strand RNA viruses, sense) je virová RNA přímo využita jako **mRNA** a je překládána bezprostředně po průniku do buňky do řetězců aminokyselin (proteinů) na buněčných ribozómech. Primárním translačním produktem je polyprotein, který se štěpí na jednotlivé funkční a strukturní proteiny. Štěpení polyproteinu je zahájeno již během translace a je zprostředkováno autokatalytickou aktivitou proteázy kódované virem. **Replikace** zdrojového (rodičovského) genomu pak probíhá přes dsRNA formu, která slouží k syntéze mnoha kopií virového genomu. Tento proces je zprostředkován po infekci buňky syntetizovanou virovou RNA polymerázou (např. *Picornaviridae*, *Togaviridae*, *Flaviviridae*, *Calciviridae*, *Coronaviridae*, *Potyviridae*).

⁷ Monocistronická mRNA kóduje jeden funkční protein. Polycistronická mRNA kóduje polyprotein, který se posttranslačně štěpí za vzniku více funkčních proteinů.

V. ss(-)RNA

- a. Viry s nesegmentovaným genomem⁸ se replikují přes monocistronické mRNA, které se syntetizují pomocí virové RNA-dependentní-RNA polymerázy (RdRp)⁹. Tyto mRNA slouží jak pro syntézu proteinů, tak jako templát pro syntézu ss(-)RNA kopií (např. *Bunyaviridae*).
- b. Viry se segmentovaným genomem, které se replikují v jádře pomocí virové transkriptázy za vzniku monocistronických mRNA, které slouží jak pro syntézu proteinů, tak jako templát pro syntézu ss(-)RNA kopií (např. *Orthomyxoviridae*).

U **(-)RNA** virů (negative-strand RNA viry, non-sense) virová RNA nemůže být přímo překládána do sekvence aminokyselin v proteinech. Nejdříve je virová (-)RNA přepsána odpovídající RNA polymerázou virového původu do jednotlivých (+)RNA s funkcí mRNA. Tato RNA polymeráza je integrovanou součástí infekčního virionu. Replikace je zahájena přepisem virové (-)RNA do (+)RNA (plné délky, full lenght), která je templátem pro syntézu nových virových (-)RNA. Pro tuto skupinu virů je charakteristická přítomnost dsRNA meziprojektu, který slouží i k syntéze genomických (-)RNA řetězců pro skládání nových virových částic (např. *Paramyxoviridae*, *Rhabdoviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Filoviridae*, *Bunyaviridae*, *Arenaviridae*).

VI. ss(+)RNA s DNA meziprojektu

Tímto způsobem se replikují a exprimují genomy retrovirů (+)RNA, které jsou jedinečné tím, že jsou 'diploidní'. Genom neslouží jako templát pro syntézu proteinů přímo. Přepisuje se dsDNA, která se integruje do genomu hostitelské buňky a na nekódujícím vlákně se syntetizují polycistronické mRNA a kopie genomu (např. *Retroviridae*).

⁸ Některé z těchto virů mají 'ambisense' organizaci genomu tzn., že část molekuly genomické RNA je představovaná sense(+)RNA a část non-sense(-)RNA.

⁹ Virová RNA polymeráza je součástí virionu.

Retroviry vyznačující se komplexní translační a replikační strategií. Virová RNA je přepisována pomocí virem nesené a kódované reverzní transkriptázy do ssDNA kopie, která se nachází ve formě DNA-RNA hybridního dvouvlákna. Následuje odbourání RNA vlákna a jeho nahrazení DNA vláknem za vzniku dsDNA molekuly. Tato je integrována do chromozómu hostitelské buňky jako tzv. provirus (provirová DNA). Virové proteiny jsou syntetizovány na matrici virové mRNA, která vzniká přepisem z provirové DNA. Kompletní kopie virové RNA, vzniklé přepisem provirové DNA, jsou rovněž použity jako kopie genomické RNA pro skládání nových virionů.

VII. dsDNA s RNA meziproduktem

I tato skupina využívá reverzní transkripci. Reverzní transkriptáza slouží k opravám přerušovaného (gapped) genomu. Virové mRNA jsou syntetizovány na nekódujícím vlákně DNA (např. *Hepadnavirus*).

Regulace exprese virových genů na úrovni transkripce jsou základním mechanismem, který řídí realizaci virového genomu vedoucí k jeho reprodukci. Viry disponují celou řadou mechanismů kontrolujících a efektivně řídících genovou expresi. Můžeme tvrdit, že exprese virových genů je rozdělena do dvou chronologických fází. Během časné fáze jsou syntetizovány enzymy a regulační proteiny, kdežto strukturní proteiny jsou připravovány později (pozdní fáze infekce). Znamená to, že nejdříve jsou přepisovány do mRNA geny pro syntézu časných proteinů a teprve později geny kódující pozdní proteiny, převážně strukturální proteiny. Úroveň transkripce je velice přesně kontrolována a řízena. Je tak zabezpečena časová posloupnost syntézy jednotlivých proteinů a jejich množství.

Vedle regulačních proteinů uplatňujících se na úrovni virových operonů se na regulaci exprese virových genů podílí i rychlost transkripce různých genů. Významnou regulační roli hraje pak stabilita virových mRNA a rozdílná translační úspěšnost jednotlivých virových mRNA. Výsledek transkripce je rovněž ovlivněn paralelním využitím kompletních transkripčních templátů pro replikaci virového genomu.

Virové proteiny jsou syntetizovány pomocí ribozómů infikované buňky a je při tom využíván kompletní translační systém (ribozómy, tRNA, iniciační faktory ap.).

Za čtení genetické informace viru pomocí tripletového kódu jsou zodpovědné enzymy a faktory hostitelské buňky stejně jako ve zdravé buňce. Virové funkční proteiny jsou obvykle syntetizovány velice rychle (během několika minut) po infekci buňky, strukturní proteiny jsou syntetizovány později. Nejedná se však o oddělené pochody, ale ve většině případů se tyto pochody částečně překrývají nebo dokonce splývají. Virové mRNA jsou převážně monocistronické a jsou překládány do řetězce aminokyselin podobně jako buněčné mRNA. V některých případech (např. zástupci rodu *Potyvirus*) jsou virové proteiny syntetizovány jako části velkého multiproteinu, který je post-translačně upraven štěpením proteolytickými enzymy ve specifických místech. Vznikají tak jednoduché "malé" funkční virové proteiny. Tento mechanismus překonává neschopnost eukaryotických ribozómů překládat do proteinů polycistronické mRNA a zároveň umožňuje v jedné virové mRNA kódovat informaci pro více proteinů. Podobně jako buněčné proteiny jsou i virové proteiny post-translačně modifikovány (glykosylace, fosforylace atd.) pomocí buněčných enzymů.

V průběhu infekce hostitelské buňky je zvýhodňována virová genetická informace na úkor buněčné genetické informace. Obecně můžeme tvrdit, že virová informace se vyznačuje vyšší afinitou vůči translačnímu aparátu než buněčné mRNA. Translace buněčných mRNA během virové infekce může být ovlivněna:

- proteolytickou inaktivací iniciačních faktorů translace odpovědných za výhradnost nebo preferenci buněčných mRNA,
- selektivní degradací buněčných mRNA,
- změnou intrabuněčného prostředí vedoucího k preferenci virových mRNA.

Typickým příkladem ovlivnění translace buněčných mRNA je blokování funkce iniciačního faktoru translace eIF2 (eucaryotic initiation factor 2), který je nezbytný pro zahájení translace eukaryotní mRNA, jeho fosforylací (např. *Poxviridae*, *Reoviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Adenoviridae*, *Picornaviridae*).

Mimo zvýhodnění translace virové genetické informace je po infekci zpomalena nebo zastavena transkripce a replikace buněčné DNA. Zatímco zastavení transkripce je opět spojeno s inaktivací specifických transkripčních faktorů, inhibice

syntézy buněčné DNA je výsledkem časně selektivní inhibice syntézy buněčných proteinů odpovědných za replikaci.

Mimo potřebné enzymy, transkripční faktory, prekuzory proteinů a nukleových kyselin využívá virus buněčné transportní dráhy molekul a jejich komplexů, které usnadňují jak infekci buňky, tak skládání nových virionů. Kompletní infekční viriony ani funkční a strukturní proteiny nebo jejich komplexy se v buňce nepohybují náhodně. Příkladem je transport virového genomu podél vláken cytoskeletu. Genom, který je transportován až do jádra hostitelské buňky, prochází přes póry jaderné membrány a v jádře se potom pohybuje podél vláken jaderného skeletu.

Utváření nukleoproteinu a skládání virionů je v infikované buňce zahájeno ve chvíli, kdy bylo vytvořeno dostatečné (nadlimitní) množství kopií virových genomů a strukturních proteinů, a pokračuje tak dlouho, dokud je infikovaná buňka metabolicky aktivní. Dosud je velmi málo známo o molekulárním mechanismu kontrolujícím proces autoorganizace (samouspořádání) virových částic. Proteinový plášť se vytváří vazbou virových proteinů (kapsomer) nebo jejich aglomerátů na nativní virovou nukleovou kyselinu, kterou obaluje. Důležitou roli zde hraje tzv. zabalovací signál (specifická sekvence virového genomu), která slouží k rozpoznání virové nukleové kyseliny plášťovými proteiny. Během skládání virové částice jsou do virionu integrovány důležité proteiny (hemagglutinin, neuraminidáza ap.). Ke vzniku virového nukleoproteinu dochází v cytoplazmě, obvykle v blízkosti cytoplazmatické membrány, nebo v jádře (většina živočišných DNA virů). V případě, že se jedná o konečnou formu virové částice, může dojít k integraci virových glykoproteinů do povrchových struktur a k uvolnění virové částice z buňky. Nukleoproteiny obalených virů jsou obvykle transportovány do míst zdrojů lipoproteinové membrány. Zástupci čeledí *Paramyxoviridae*, *Orthomyxoviridae* a *Rhabdoviridae* se obalují cytoplazmatickou membránou. Jiné viry se obalují mebránami vnitrobuněčného membránového systému (např. Golgiho aparát, endoplazmatické retikulum nebo jaderná membrána). V místě obalování jsou v nadlimitní koncentraci připraveny virové glykoproteiny. Dochází k interakci virového nukleoproteinu s příslušnou membránou, a to prostřednictvím virových glykoproteinů, a k jejich obalení procesem analogickým exocytóze (pučení). Přitom dojde k uvolnění buněčných proteinů z lipoproteinové membrány a jejich nahrazení

proteiny specifickými pro viry. Nicméně proces obalení není vždy zcela přesný. Během směsné infekce dvěma kmeny téhož viru s děleným genomem může dojít k výměně genomických segmentů mezi kmeny (genetic reassortment)¹⁰ nebo záměně protomer nebo kapsomer (fenotypové míšení).

Proces zrání (maturace) nově poskládaných virových částic je složitý málo prostudovaný proces. Představuje strukturní změny v nezralé (neinfekční) virové částici, jejichž výsledkem je vznik zralého infekčního virionu, který se může uvolnit z buňky. Často je zrání spojeno s funkcí virových proteolytických enzymů, které specificky štěpí kapsidové proteiny nebo vedou ke konformačním změnám strukturních proteinů. Příkladem může být štěpení kosterních proteinů kapsidy a strukturních polyproteinů herpesvirů nebo štěpení kapsidových proteinů HIV, kdy změny můžeme pozorovat pomocí elektronového mikroskopu. Složitým procesem zrání procházejí i 'nahé' (vegetativní) částice poxvirů. Pro virus chřipky je typická aktivace HA glykoproteinu (hemagglutininu) pomocí buněčných proteáz. Vznik HA1 a HA2 peptidu je nezbytný pro navození fúze membrán.

Uvolnění viru z infikované buňky je nezbytné pro kolonizaci hostitele i pro další šíření viru. **Lytické viry** jsou schopné lyzovat hostitelskou buňku – narušit cytoplazmatickou membránu, což vede k uvolnění nových virových částic a smrti buňky. K zástupcům této skupiny virů patří např. lytické bakteriofágy nebo *Poliovirus*. Lyzi buňky často navozují neobalené viriony. Uvolňování virů z buňky je spojeno se změnami ve struktuře cytoskeletu a propustnosti cytoplazmatické membrány. Obalené viry se běžně uvolňují z buňky po kompletizaci na buněčné membráně (*Paramyxoviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Rhabdoviridae*). Tento závěrečný krok uvolnění do extracelulárního prostoru označujeme jako **pučení**. Předchází tomu složitý proces exocytózy, do kterého jsou zapojeny transportní váčky a membránové struktury jako endoplazmatické retikulum nebo Golgiho aparát.

¹⁰ Přeskupení (genetic reassortment) je přeuspořádání genomických segmentů vzájemnou výměnou mezi dvěma nebo více antigenně odlišnými viry při směsné infekci a je příčinou antigenního zvratu (shift). V přírodě tak dochází například ke vzniku antigenně zcela nových chřipkových virů.

Rostlinné viry mohou pomocí transportních proteinů procházet přes plasmodezmata spojující buňky. Některé viry mohou procházet přes kanály (connecting pores) vzniklé fúzujícími membránami.

3.4.2 Příklady reprodukčních cyklů vybraných virů

Reprodukční cyklus bakteriofága T4

Prvním stupněm interakce fága s hostitelskou buňkou je adsorpce fága na vnější membránu vnímavé buňky. Zprostředkují ji slabé nekovalentní vazby mezi bílkovinnými strukturami fága a tzv. buněčnými receptory. Funkci receptorů mají proteiny bakteriální stěny včetně určitých polysacharidů a lipopolysacharidů. Účinnost adsorpce je ovlivněna řadou faktorů, mezi které patří především fyziologický stav buněk, přítomnost a vhodná koncentrace iontů Mg^{2+} , Ca^{2+} , Na^+ a K^+ . T4 fág vyžaduje pro efektivní adsorpci navíc kofaktor (L-tryptofan). Po adsorbci dochází k proniknutí fágové nukleové kyseliny do buněčného cytosolu, přičemž proteinový obal zůstává mimo buňku.

Genom T4 fága je tvořen dsDNA, která se replikuje mechanismem replikační vidličky z RNA primeru. K replikaci dochází po transkripci ranných fágových genů a následné syntéze jejich produktů, které zahajují a zabezpečují syntézu kopií fágové DNA (např. iniciační replikační proteiny, DNA polymeráza, helikáza, ligáza). V procesu replikace vznikají zřetěžené jednovláknové molekuly DNA, tzv. kontamery. Typickou vlastností T4 DNA je přítomnost 5-hydroxymetylcytosinu, jehož syntéza je kódována fágem. Modifikované báze pravděpodobně chrání fágovou DNA před hostitelskými, ale i před vlastními nukleázami. Je možné, že plní i funkci transkripčních a replikačních signálů nebo stimulují průnik fágové DNA do buňky a obalení fágového genomu proteinovým pláštěm.

Transkripci fágových genů do mRNA můžeme rozdělit na časnou a pozdní fázi. U komplexních fágů, jako je T4 fág, buněčná RNA polymeráza přepisuje pouze časné geny. Mechanismus, kterým fág preferuje transkripci vlastních genů, je založen na záměně sigma (σ) podjednotky buněčné RNA polymerázy za fágem kódovanou sigma podjednotku. K zajímavostem genomu T4 fága patří objev autokatalytického procesu „self-splicing“, kterým upravují například pre-mRNA kódující tymidylátsyntetázu.

Enzymy kódované fágem následně vyvolají destrukci genetické výbavy hostitelské buňky vedoucí až k zastavení buněčného metabolismu. Následuje lýze buňky a uvolnění fágových částic. Před lýzí buňky dochází ke kompletizaci virionů, a to v následujících krocích:

- uspořádání proteinů kapsidu a finální úprava hlavičky,
- současné uspořádání zbylých fágových struktur (bičík + bazální destička, bičíková vlákna),
- zabalení fágové nukleové kyseliny do připravené hlavičky pomocí fágových zabalovacích proteinů,
- kompletizace fágové částice z jednotlivých předem složených částí (bičík + bazální destička + kompletní hlavička + kompletní bičíková vlákna).

Reprodukční cyklus bakteriofága lambda (lytický a lyzogenní cyklus)

Životní cyklus fága lambda se od T4 fága liší v některých bodech. Dvouvláknová DNA fága je po vstupu do buňky upravena do kruhové formy spojením kohezních konců pomocí ligázy. Pokud se životní cyklus vyvíjí směrem k lýzi buňky, replikuje se DNA mechanismem otáčejícího se kruhu, jehož výsledkem je vlákno dsDNA složené z několika molekul fágového genomu.

Pro přesnou a přednostní transkripci pozdních genů jsou využívány proteiny kódované fágem, které usměrňují hostitelskou RNA polymerázu k přednostnímu rozpoznání fágových promotorů a modifikují RNA polymerázový transkripční komplex.

Infekční cyklus bakteriofága lambda však nemusí vést vždy k zániku hostitelské buňky v průběhu lytického životního cyklu. DNA fága má schopnost integrovat se po průniku do buňky mechanismem místně-specifické rekombinace do bakteriálního chromozómu a stát se jeho nedílnou součástí. Integrovaná forma fágové DNA se nazývá **profág** a z tohoto stavu odvozený životní cyklus fága označujeme jako **lyzogenní**. Obecně označujeme fágy schopné reprodukce v lyzogenním cyklu jako mírné (temperované); fágy schopné reprodukce v lytickém cyklu jako virulentní. Zjednodušeně můžeme navození a udržování lyzogenního stavu charakterizovat jako komplexní proces, ve kterém se zúčastňují produkty fágových, ale i buněčných genů. Ne všechny částice mírného fága jsou při kultivaci

s vnímavou bakterií schopné navodit stav lyzogenie, část buněk podléhá lýze (proběhne lytický cyklus bakteriofága). Lyzogenie však není nezvratný stav. Vlivem určitých faktorů (např. UV-záření, teplotní šok) dochází k vyštěpení profága z chromozómu hostitelské buňky (lyzogenní konverze) a změně životního cyklu bakteriofága na lytický. K uvolnění profága dochází pomocí fágem kódovaného enzymu excisionázy. V některých případech se může fágová DNA vyštěpit i se sousedními bakteriálními sekvencemi, případně geny. Vznikají tak fágy nesoucí i bakteriální geny, které mohou přenést po následné infekci do nových hostitelských buněk. Tento přenos nazýváme **transdukce**.

Jednostupňová růstová křivka znázorňuje závislost počtu virionů (PFU¹¹) uvolněných průměrně z jedné buňky na době, která uplynula od její infekce. Počáteční interval, během kterého počet virionů neroste, je tzv. **latentní fáze**. Následuje období, během kterého se začínají nové viriony z buněk uvolňovat, což se projevuje prudkým vzestupem křivky. Toto období je označováno jako **fáze vzestupu**. V určitém okamžiku dosáhne počet uvolněných částic maxima. Touto hodnotou je vyjádřen **fágový výnos**, který označuje maximální počet virionů vytvořených průměrně v jedné buňce za daných experimentálních podmínek.

Jednostupňová růstová křivka nepopisuje děje probíhající v infikované buňce. Významným parametrem intracelulárního růstu fága je **ekliptické období**, které stanoví dobu nezbytnou k vytvoření jednoho virionu. Jakmile se v buňce vytvoří první virion, znamená to konec ekliptické fáze a začátek období **zrání** fága. Během maturace se z morfologických a strukturálních složek fága sestavují viriony. Maturace končí přibližně v okamžiku, kdy buňka začne lyzovat. Tento okamžik je z extracelulárního pohledu koncem latentní fáze a počátkem fáze vzestupu.

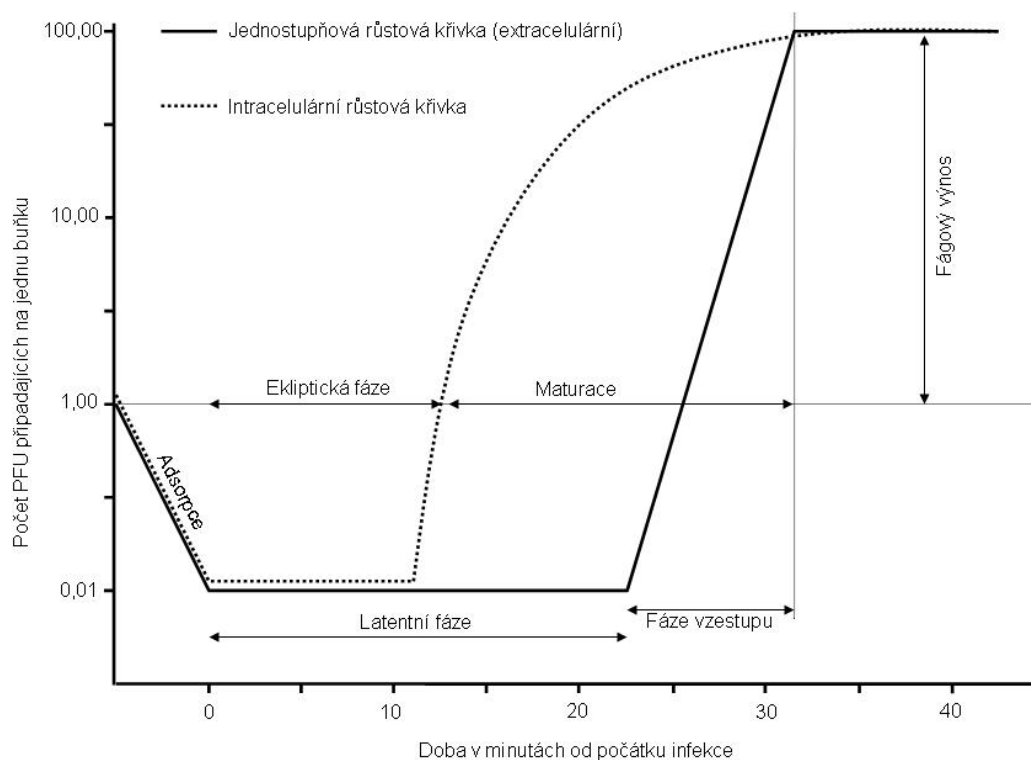
Při studiu reprodukčního cyklu lytických bakteriofágů (respektive lytických virů) sehrála mimořádnou úlohu **plaková metoda** umožňující stanovit počet virionů schopných vytvářet **plaky** ve virové suspenzi např. fágovém lyzátu¹². Naočkujeme-li na bakteriální plotnu bakteriální suspenzi, ve které jsou i bakterie

¹¹ PFU (plaque-forming unit); ve virologii představuje oblast lyzovaných buněk v jednovrstevné buněčné kultuře, která je iniciována infekcí jednou virovou částicí. Jednotka PFU se používá pro vyjádření počtu virových částic stanovených plakovou metodou (např. PFU/ml).

¹² Virová suspenze vzniká lýzí infikovaných bakteriálních buněk lytickým fágem.

infikované virulentním fágem, objeví se v souvislém porostu bakterií sterilní kruhové zóny (plaky, plaques). Při velkém ředění fága je plak výsledkem lýze jedné infikované buňky.

Obr. 7 Jednostupňová růstová křivka bakteriofága



Reprodukční cyklus viru pravých neštovic (*Variola virus*, *Poxviridae*)

Reprodukční cyklus poxvirů probíhá v cytoplasmě. Tato nezávislost na jádře, výjimečná pro živočišné DNA viry, měla za následek, že se u poxvirů vyvinul rozsáhlý genom. Ten kóduje řadu enzymů nezbytných pro replikaci a transkripci virové genetické informace, které nahrazují buněčné enzymy lokalizované v jádře. Některé z nich jsou přímo součástí infekční virové částice.

Virus vstupuje do buňky po rozpoznání specifických povrchových buněčných receptorů a po vazbě na ně, a to fúzí plazmatické membrány buňky a povrchové virové membrány. Virus však může do buňky proniknout i endocytózou. Následuje rychlé rozbalení virového jádra. Během několika minut je zahájena transkripce virové DNA pomocí enzymů nesených virem a funkčních proteinů (virová transkriptáza, transkripční faktory, metylační enzymy, polyadenyltransferáza).

Virové mRNA mají na 5'-konci čepičku a na 3'-konci poly(A) sekvenci. Translaci ranných mRNA vznikají časné proteiny, jako např. DNA polymeráza nebo timidinkináza. Zjistilo se, že asi polovina virového genomu se realizuje před zahájením replikace virové DNA. Během syntézy časných proteinů se zastaví syntéza buněčných makromolekul. Některé virové proteiny jsou post-translačně modifikovány např. proteolytickým štěpením, fosforylací nebo glykosylací.

Replikace virové DNA probíhá v oddělených sektorech cytoplazmy a vede ke vzniku cca 10 000 kopií genomu. Předpokládá se, že se replikace účastní pouze virové proteiny. Skládání virových částic je komplikované a zahrnuje tvorbu nahých virionů, obsahujících povrchovou membránu, laterální tělíska a komplex nukleoproteinového jádra. Viriony potom získávají vnější lipoproteinový obal během exocytózy, a to z membrán Golgiho aparátu. Nahé virové částice se mohou uvolnit z buňky v důsledku její lýze. Obalené i neobalené viriony jsou infekční.

Reprodukční cyklus *Human herpesvirus 1* (HSV1, *Herpesviridae*)

K velmi dobře prostudovaným reprodukčním cyklům patří produktivní infekce epitelových buněk herpetickými viry. Infekce začíná adsorbí viru na buňku, kdy se virus zachytí svými výběžky na receptorové glykoproteiny umístěné na povrchu cytoplazmatické membrány. Adsorpce herpetických virů na povrch buňky je velice variabilní a využívá se k tomu řada virových i buněčných glykoproteinů. HSV1 může infikovat dva typy buněk, a to epitelové buňky a neurony. Virus se dostává do buňky fúzí, jejímž výsledkem je uvolnění nukleokapsidu z vnějších virových obalů a jeho průnik do cytoplazmy. Nukleokapsid potom putuje podél vláken cytoskeletu k pórům jádra. Po následující ztrátě proteinového obalu proniká virová nukleová kyselina do jádra, kde cirkularizuje. Během postupného rozbalování jsou z virionu uvolňovány důležité regulační proteiny, např. VHS (virion host shut-off) protein, který inhibuje syntézu buněčných makromolekul, nebo alfa-TIF protein, který aktivuje transkripci virových genů.

Transkripce a replikace genomové DNA je zahájena bezprostředně po její cirkularizaci v jádře buňky. Postupně se realizují časné, pozdní a velmi-pozdní geny. Pro strukturu genomu herpetických virů platí:

- jednotlivé geny jsou uloženy na různých vláknech dsDNA a pouze zřídka se překrývají,
- jednotlivé geny nebo jejich shluky mají své promotory,
- jednotlivé geny se transkribují v různých směrech,
- transkripci katalyzuje buněčná RNA polymeráza II,
- sestřih se uplatňuje jen při úpravě malé části různých druhů mRNA,
- transkripce a replikace genomu probíhá v jádře,
- mRNA jsou transportovány z jádra do cytoplazmy, kde jsou na ribozómech syntetizovány jednotlivé proteiny,
- syntetizované proteiny jsou transportovány zpět do jádra, kde se účastní na regulaci transkripce a replikace genomu a na maturaci nukleokapsidu,
- regulace genové exprese (transkripce, translace) má kaskádový charakter; zjednodušeně se dá říci, že časné proteiny aktivují expresi pozdních genů a pozdní proteiny expresi velmi pozdních genů,
- proteiny jsou post-translačně upravovány např. štěpením proteázami, fosforylací, glykosylací.

Již na konci ranné fáze infekce buňky dochází mimo inhibice syntézy buněčné DNA, RNA a proteinů i k degradaci buněčného chromatinu a dezintegraci jadérek. Ve stejném čase je zahájena replikace virové DNA za pomoci virových enzymů (DNA polymeráza, primáza, helikáza, proteiny stabilizující ssDNA a dsDNA). Detailní mechanismus syntézy není znám, předpokládá se, že virová dsDNA se převážně replikuje mechanismem otáčejícího se kruhu, přitom vznikají lineární oligomery (kontamery) dsDNA, ze kterých specifickým štěpením vznikají molekuly virového genomu jednotkové délky.

Syntéza pozdních genů (převážně strukturních genů) je aktivována ranně-pozdními proteiny a replikací genomu. V jádře buňky se z kapsidových proteinů skládají nejdříve prázdné kapsidy, do kterých se potom ukládá nukleoproteinové jádro obsahující molekulu virové DNA. Virová nukleokapsida získává při průchodu

přes jadernou membránu obal. Zajímavostí je, že virové glykoproteiny vnějšího obalu jsou tvořeny v cytoplazmě a jsou integrovány do jaderné membrány do míst, kterými virová nukleokapsida proniká a kde se obaluje. Zralé viriony se hromadí mezi vnitřní a vnější lamelou jaderné membrány a v endoplazmatickém retikulu a jsou transportovány pomocí měchýřků Golgiho aparátu přes cytoplazmu k cytoplazmatické membráně a přes ni ven.

Mimo produktivní infekci jsou herpetické viry schopné navodit neproduktivní latentní infekci. Například při latentní infekci neuronů virem HHV-1 (*Human herpesvirus 1*) se infekční virus nemnoží, virová DNA je cirkularizována a zůstává v jádře buňky jako tzv. epizóm¹³. Typická exprese virových genů pak neprobíhá a jsou syntetizovány pouze specifické RNA transkripty blokující zahájení transkripce virových genů. Latentní infekce se může vlivem různých faktorů (stres ap.) změnit na produktivní.

Reprodukční cyklus viru imunitní nedostatečnosti (*Human immunodeficiency virus*, *Retroviridae*)

Zástupci čeledi *Retroviridae* představují skupinu virů vyznačujících se zvláštním reprodukčním cyklem, který využívá obráceného překladu genetické informace z RNA do DNA a její začlenění do genomu hostitelské buňky. Vyvolávají celou škálu chorob od infekcí bez zjevných patogenních projevů, přes neurodegenerativní a imunologické poruchy až po zhoubné nádorové nemoci.

Výzkum reprodukce retrovirů je spojen s objevem **reverzní transkripce**, tj. přenosu genetické informace z RNA do DNA. Tento přenos není typický jen pro zástupce čeledi *Retroviridae*, ale i pro rody *Hepadnavirus*, *Caulimovirus* a řadu neinfekčních genetických elementů (např. retrotranspozóny).

Viriony retrovirů pronikají do buňky na základě interakce jejich obalových glykoproteinů se specifickými buněčnými receptory. Receptorem pro HIV je CD4 protein (molekula imunoglobulinového typu s jednou transmembránovou doménou). Interakce má za následek průnik viru do buňky, a to endocytózou.

Prvním krokem reprodukce je přepis genomové ssRNA do dsDNA virovou reverzní

¹³ Epizóm – genetický materiál existující nezávisle na chromozómech.

transkriptázou. Tento proces se skládá z celé řady kroků zahrnujících tvorbu RNA primerů, syntézu negativního a pozitivního vlákna DNA. Celý proces reverzní transkripce se odehrává v cytoplazmě hostitelské buňky uvnitř struktury odvozené z virové kapsidy.

Dalším nevyhnutelným krokem v životním cyklu retrovirů je vznik **proviru**. Po ukončení reverzní transkripce nukleoproteinový komplex vstoupí do jádra buňky a virová dsDNA se začleňuje do buněčné DNA na různých místech vyznačujících se transkripční aktivitou. Integrovaný provirus je relativně stabilní, k jeho ztrátě nebo poškození může dojít náhodnými delecemi nebo rekombinacemi v rámci buněčné DNA.

Virové mRNA jsou syntetizovány transkripcí z provirové DNA pomocí buněčné RNA polymerázy II. Jsou upravovány podobně jako buněčné mRNA, a to metylací na 5'-konci a polyadenylací na 3'-konci. Signály iniciující transkripci se nacházejí v LTR¹⁴ sekvencích proviru a jsou podobné buněčným regulačním elementům (např. TATA box, "enhancery").

Translace probíhá na volných polyribozómech a ribozómech asociovaných s endoplazmatickým retikulem. Většina primárních translačních produktů jsou polyproteiny, které jsou štěpeny na funkční produkty. Genomová RNA vzniká úplným přepisem provirové DNA. Tvorba nových virionů a jejich uvolňování z buňky probíhá paralelně. Zahrnuje interakce virových proteinů s genomovou RNA a cytoplazmatickou membránou. Zvlášť exportovaný a upravovaný glykoprotein se inkorporuje do virové obalové membrány. Nové viriony se uvolňují z buňky pučením.

Reprodukční cyklus viru chřipky A (*Influenza virus A*, *Orthomyxoviridae*)

Virus chřipky se prostřednictvím **hemagglutininu** (HA) připojuje na receptor vnímavé buňky, kterým je kyselina sialová vázaná na membránový glykoprotein nebo glykolipid. Viriony pronikají do buňky endocytózou. Nukleokapsida se vlivem kyselého pH uvolňuje z endozómu do cytoplazmy a společně s transkriptázovým komplexem je transportován do jádra, kde probíhá transkripce a replikace virové RNA.

¹⁴ LTR – Long Terminal Repetitions (dlouhé koncové repetice).

Transkripční mechanismus vyžaduje kooperaci virových a buněčných enzymatických aktivit. Virový transkripční komplex není schopen modifikovat 5'-konec virových mRNA přidáním čepičky nebo metylací, ani syntetizovat nezbytné primery pro zahájení transkripce virové RNA. Výsledkem transkripce je 8 virových mRNA kódujících všechny virové proteiny.

Replikace virových segmentů probíhá přes komplementární RNA vlákna (cRNA), které jsou kompletními vlákny pozitivní polarity, ss(+)RNA, bez čepičky a poly(A) sekvence. Na rozdíl od transkripce jsou syntetizovány bez pomoci buněčných enzymů. Tyto komplementární RNA (cRNA) slouží dále jako templáty pro syntézu genomové RNA viru. Nukleoproteinový komplex obsahující i virovou transkriptázu je transportován do cytoplazmy, kde probíhají závěrečné fáze skládání virionu.

Jeden z významných povrchových antigenů, hemaglutinin, je v Golgiho aparátu glykosylován a integruje se do cytoplazmatické membrány v místě pučení viru společně s druhým důležitým virovým proteinem, **neuraminidázou** (NA). Ta usnadňuje přístup virionu k vnímavé buňce v respiračním traktu obsahujícím mucíny a je na konci reprodukčního cyklu viru chřipky nezbytná pro uvolnění virionů z povrchu buňky. Těsně před pučením se virion kompletizuje a obaluje cytoplazmatickou membránou s integrovanými molekulami hemaglutininu a neuraminidázy.

Reprodukční cyklus viru šarky švestky (*Plum pox virus*, *Potyvirus*)

Virus se dostává do buňky nejčastěji pomocí hmyzích vektorů. Replikace potyvirů probíhá v cytoplazmě a využívá při tom i replikázový komplex vázaný na membrány. Progenové virové RNA jsou syntetizovány na přechodných (-)RNA kopiích. Po určitou dobu můžeme v buňce detekovat replikativní formu dsRNA.

Genom potyvirů představuje ss(+)RNA o velikosti cca 9 600 nukleotidů. 95 % jeho délky představuje jeden velký otevřený čtecí rámec kódující 9 až 10 funkčních proteinů. Virem kódovaný Vpg protein je kovalentně vázán na 5'-konec nukleotidového řetězce a poly(A) sekvence je přítomna na 3'-konci. Celý čtecí rámec se nejdříve přepisuje do jediného polyproteinu, který je proteolyticky štěpen za vzniku funkčních virových proteinů: P1 (proteáza), HC-Pro (proteáza, vektorový

přenos), P3, CI (RNA helikáza), CP (strukturní protein kapsidu, vektorový přenos, transportní protein), NIa-VPg (iniciace syntézy RNA), NIa-Pro (proteáza), NIb (RNA dependentní RNA polymeráza), 6K1 a 6K2.

Reprodukční cyklus viru mozaiky tabáku (*Tobacco mosaic virus*, *Tobamovirus*)

Virion nese lineární genomovou ss(+)RNA a kapsid helikální symetrie složený přibližně s 2 100 molekul obalového proteinu. Ihned po vstupu do buňky se virová genomová RNA začíná rozbalovat a současně dochází k vazbě na ribozómy a k translaci replikačních proteinů (metyltransferáza, helikáza, RNA polymeráza). Po úplném rozbalení virové RNA se může vytvořit replikační komplex, který je schopný syntetizovat ke genomické nukleové kyselině komplementární vlákna ss(-)RNA, které slouží jako matrice pro syntézu pozitivních vláken genomické RNA, ale i subgenomových mRNA. Jedna z nich nemá čepičku na 3'-konci ani nekódující sekvenci na 5'-konci a napomáhá při transportu genomové RNA na krátkou vzdálenost, tj. do okolních buněk přes modifikovaná plasmodesmata. Tento přenos nevyžaduje plášťový protein, ovšem k šíření na velkou vzdálenost vodivými pletivami je přítomnost proteinového pláště nutná. Metabolismus napadené buňky se dlouho nemění i přes hromadění virových komponent.

Prvním krokem maturace nových virionů je vznik proteinových disků, přičemž první se ukládá asi v $\frac{1}{4}$ virové RNA od 3'-konce, a z tohoto iniciačního místa se postupně přidávají disky kapsidových proteinů, až je dokončeno obalování celé genomické virové RNA. Izolovaná RNA a kapsidový protein jsou schopné reasociace *in vitro*. Virus se šíří v rostlině plasmodesmaty a vodivými pletivy. K jeho aktivnímu uvolňování nedochází, což je typická vlastnost rostlinných virů.

4 VIRY – PŮVODCI CHOROB

Velký teoretický i praktický význam má důkaz, že daný virový druh (kmen) je původcem určité choroby (případně, že choroba je virového původu, tzn. virové etiologie). Důkazem je naplnění **Kochových postulátů**¹⁵. Pro viry, které jsou *in vitro* v čisté kultuře nekultivovatelné, bylo nutné tato pravidla upravit:

- 1) virus vždy provází projevy dané choroby,
- 2) je nezbytné virus izolovat, purifikovat a stanovit jeho vlastnosti,
- 3) je nutné vyvolat identickou chorobu inokulací¹⁶ zdravého hostitele,
- 4) je nutné potvrdit výskyt identického viru a opakovaná izolace z infikovaného hostitele.

Virová choroba je výsledkem interakce mezi patogenem a hostitelem. Tento patogenní vztah, primárně **determinovaný genetickými vlastnostmi** viru a hostitele, může být výrazně ovlivněn **podmínkami prostředí**. V humánní a veterinární medicíně se uplatňují pro stanovení chorobného stavu organismu určité parametry - normy biologických konstant (např. normální tepová frekvence, teplota, glykémie, pH krve, sedimentace). Ve fytopatologii obdobné objektivní míry normalnosti (zdraví) chybí. Za nemocnou se považuje ta rostlina, která má příznaky choroby obvykle pozorovatelné vizuálně. Někteří autoři považují za nemocné všechny infikované rostliny.

Interakce viru s hostitelským organismem začíná napadením buňky, které je prvním krokem infekčního procesu. Tato interakce je podmíněna geneticky, a to specifickými, navzájem se rozpoznávajícími receptory kódovanými virem a buňkou. Nejznámějším příkladem je hemaglutinin (HA) viru chřipky, který rozpoznává odpovídající receptor v epitelových buňkách dýchacích cest (kyselinu sialovou). Adsorbce a penetrace probíhá v časovém sledu a je následována expresí virového genomu, k čemuž je využíván metabolismus hostitelské buňky. Membránové systémy buňky, včetně vnější lamely jaderné membrány, endoplazmatického

¹⁵ Mikroorganismus musí být nalezen ve všech případech choroby; musí být izolovatelný a kultivovatelný v čisté kultuře a následně musí být determinován; infekce stejného zdravého hostitele musí vyvolat stejnou chorobu a stejný mikroorganismus musí být izolovatelný z infikovaného experimentálního hostitele.

¹⁶ Inokulací rozumíme přenos patogenních jednotek na hostitele buď přirozeným, nebo umělým způsobem. Zdrojem inokula může být každé místo (každý materiál), kde se virus rozmnožuje nebo přežívá.

retikula a Golgiho aparátu, se stávají místem, kudy jsou nově syntetizované virové proteiny transportovány a kde se hromadí. Změny na buněčné, tkáňové a orgánové úrovni mohou být tak významné, že vedou k jejich funkčním a morfologickým změnám. Změny odehrávající se na buněčné, případně tkáňové úrovni jsou označovány jako cytopatický efekt.

4.1 Cytopatický efekt (CPE)

Pojem **cytopatický efekt** se používá pro označení změn, které vznikají v buňce jako důsledek infekce virem a které způsobují nevratné narušení jejich metabolických procesů. Dochází například k narušení sodíkové pumpy; draselné ionty unikají z buňky a v buňce se hromadí sodíkové ionty a voda. Postupně se mění permeabilita buněčné membrány, která se stává prostupnou i pro větší molekuly. Dochází k proliferaci membrán hladkého endoplazmatického retikula a Golgiho aparátu, ribozómy se uvolňují z membrán drsného endoplazmatického retikula, a dochází tak ke zvýšení relativní plochy hladkého endoplazmatického retikula. Zvětšuje se vakuolizace napadených buněk, stejně jako jejich dýchání. V jádře a cytoplazmě se hromadí nové virové částice nebo jejich komponenty; vznikají jaderné nebo cytoplazmatické inkluze. V důsledku buněčných změn může dojít až k **imunitní cytolyze**, která vede ke smrti buňky.

U rostlinných buněk se běžně setkáváme s analogickým pojmem **cytologický efekt**, který rovněž zahrnuje patologické efekty vyvolané virovou infekcí buňky. Jedná se především o vývoj abnormálních membránových systémů v mitochondriích, strukturální a biochemickou degradaci chloroplastů, změny v buněčné stěně (abnormální ztlustěnin, vznik výčnělků, změna struktury plasmodezmat, ukládání materiálu mezi cytoplazmatickou membránou a buněčnou stěnou). Možným zakončením infekčního procesu je smrt buňky. V jádře i cytoplazmě pak můžeme pozorovat virové inkluze, které jsou tvořeny přebytečnými proteiny virového původu. Nejčastěji zjištěné fyziologické a biochemické změny v infikovaných buňkách jsou snížení aktivity fotosyntézy (degradace fotosyntetických pigmentů a chloroplastových ribozómů), zvýšení dýchání, zvýšení aktivity určitých enzymů (např. polyfenoloxidázy) a snížení aktivity růstových regulátorů.

Cytopatický efekt vyvolaný na buněčné úrovni se pak promítá do histologických změn rostlinných pletiv i živočišných tkání. Příkladem jsou nekrózy vyvolané odumřením celých skupin buněk, hypoplazie (buňky se nediferencují a nedělí) nebo hyperplazie (nadměrné dělení plně diferenciovanych buněk).

Je nutné připomenout, že mnohé virové infekce nejsou doprovázeny snadno pozorovatelným (nebo měřitelným) cytopatickým efektem. Řada degenerativních změn buňky vyvolaných virovou infekcí je nespecifická a může být vyvolána i jinými stresovými faktory. Typickým příkladem je reakce buňky na aplikaci herbicidů. Stejně tak geneticky různé buňky mohou reagovat na infekci konkrétním virem rozdílně.

Přehled metabolických změn a poškození živočišných buněk během virové infekce:

1. Inhibice syntézy buněčných makromolekul

- inhibice syntézy buněčných RNA
- zamezení iniciace translace (asociace ribozómů s buněčnou mRNA)
- inhibice syntézy buněčné DNA

2. Upřednostění syntézy makromolekul specifických pro virus

- syntéza časných makromolekul specifických pro virus (mRNA, časné proteiny)
- hromadění strukturních virových proteinů toxických pro buňku
- inkorporace proteinů a glykoproteinů specifických pro virus do membránového systému buňky (důsledkem je imunitní cytolyza)
- syntéza virové genomické DNA nebo RNA

3. Aktivace buněčných lyzozómů

4. Změny buněčných mikrofibril a mikrotubulů

5. Přestavba membrán endoplazmatického retikula, jádra a buněčné membrány

- změna permeability cytoplazmatické membrány pro ionty a vodu
- únik makromolekul z buňky

6. Imunitní cytolyza¹⁷

- rozrušení antigenně změněné cytoplazmatické membrány, lýze buňky

Některé viry (např. paramyxoviry nebo herpesviry) kódují specifické proteiny (fusion proteins), které zprostředkovávají průchod viru přes buněčnou membránu. Stejné proteiny mohou vyvolat tvorbu mnohojaderných velkých buněk (syncytií). Vytváří se tak alternativní možnost šíření viru v pletivu, a to přímým přechodem z buňky do buňky, na rozdíl od uvolnění infekčních virionů z buňky a opětovnou infekci okolních buněk.

K typickým metabolickým změnám a poškozením rostlinných buněk během virové infekce patří:

- snížení fotosyntézy,
- zvýšení dýchání,
- opožděná translokace škrobu (škrobové léze) z infikovaných pletiv,
- akumulace škrobu a cukrů v infikovaných listech (křehkost, lámavost listů),
- produkce virových nukleoproteinů,
- zrychlení stárnutí, předčasné stárnutí,
- snížení koncentrace růstových regulátorů: axinů a giberelinů,
- zvýšení koncentrace kyseliny abscisové a ethylenu.

4.2 Jak virus vyvolává chorobu

Patogeneze virové infekce je proces vyjadřující komplex interakcí mezi virem a hostitelem, jehož výsledkem je nemoc¹⁸.

Infekce hostitelského organismu **virem** (patogenem¹⁹) je sled pochodů od průniku virionů do buňky až k vzájemnému se rozpoznání, které vyústí v navázání **parazitického vztahu virus – hostitel**. Jednou z významných vlastností patogenů

¹⁷ Rozrušení antigenně změněné buněčné membrány infikované buňky zprostředkované protilátkami, komplementem, nebo lymfocyty.

¹⁸ Choroba (disease) je škodlivou odchylkou od normálního průběhu fyziologických procesů trvající dostatečně dlouhou dobu, aby se životně důležité funkce narušily nebo zpomalily. Zdraví (healthy) se definuje jako optimální průběh fyziologických procesů živých systémů, který umožňuje, s přihlédnutím ke stupni optimalizace vnějších podmínek, plně využít neporušený genetický potenciál.

¹⁹ Patogen je buněčný nebo nebuněčný organismus, který je schopen způsobovat chorobu na jednom hostiteli nebo okruhu hostitelů.

je jejich infekčnost²⁰, tj. infekčnost je schopnost mikroorganismu způsobovat onemocnění po vniknutí do těla hostitele. V rostlinné virologii tento termín vyjadřuje i kvantitu určitého viru v pletivech hostitele, schopnost množit se v něm, ale i stabilitu viru *in vitro* v prostředí mimo hostitele.

V předchozích kapitolách byl kladen důraz na poznání struktury virionu a jejího významu při infekci buňky a vyvolání onemocnění. Ve většině již popisovaných příkladů proběhla po infekci buňky **produktivní infekce**, tj. došlo k reprodukci viru, kdy vznikly nové biologicky i morfologicky zralé viriony se stejnými vlastnostmi jako měl rodičovský virus. Produktivní infekce může proběhnout pouze ve **vnímavých (permissivních) buňkách**. Pokud buňka **není vnímavá (nepermissivní)**, nemůže k infekci buňky dojít. Tato vlastnost buňky je podmíněna absencí některých molekul, struktur nebo biochemických drah, které umožňují průběh všech fází reprodukčního cyklu konkrétního viru. Pokud například chybí receptory v cytoplazmatické membráně, nemůže dojít k primární interakci viru a hostitelské buňky; virus se na povrchu buňky nezachytí a nepronikne dovnitř. Podobně i absence nebo nedostatek buněčných enzymů, které jsou pro virus nezbytné (esenciální), má za následek poruchy v expresi virem kódovaných proteinů, případně zabránil kompletizaci nových virových částic.

4.3 Patogeneze virové infekce

Vztah viru a hostitelské organismu (makroorganismu) v průběhu infekčního procesu je předmětem studia **patogeneze virových nákaz** (infekcí). Viry ovlivňují hostitele nejrůznějšími způsoby, např. cytotoxicitou (*Herpes simplex virus*), produkcí toxinů (*Rotavirus*), pozměňují růst a dělení buněk (*Human papilloma virus*, lidské herpesviry, řada rostlinných virů) nebo navozují imunopatogenicitu²¹ (*Hepatitis B virus*) a imunosupresi²² (*Human immunodeficiency virus*, *Cytomegalovirus*). Je důležité získat také poznatky o tom, jak virus proniká do hostitele, jak se v hostiteli pomnožuje a šíří a jakými mechanismy vyvolává onemocnění. Vývoj a konečné důsledky tohoto procesu závisí na patogenitě nebo

²⁰ Infekčnost - schopnost patogena vyvolat infekci.

²¹ Infekce navozuje stav snížené imunity.

²² Stav, kdy je omezena schopnost organismu reagovat na antigenní podnět tvorbou protilátek nebo buněčnou reakcí: stav snížené imunity.

virulenci²³ virového druhu (kmene) a účinnosti protivirové obrany hostitele. Mnohé virové infekce nevyvolávají příznaky. Vyvolaná choroba může mít různý průběh, od mírného až po velmi silné projevy infekce končící smrtí hostitele. Infekce může probíhat jen krátkou dobu (**akutní infekce**, obvykle silnější příznaky) nebo je dlouhodobá (**chronická infekce**, slabé nebo mírné příznaky), která přetrvává po celý život hostitele. U živočichů můžeme pozorovat oba typy infekce, pro rostliny jsou typické 'chronické' infekce. Obvykle u nich nedochází k aktivnímu ozdravení.

Chronická infekce může být spojena s neustálou reprodukcí virových částic a jejich uvolňováním (**perzistentní infekce**) nebo replikace viru neprobíhá a virus je v neaktivní fázi (**latentní neproduktivní infekce**). V určitých případech i v průběhu latentní (bezpříznakové) infekce může docházet k replikaci a uvolňování virů, potom se jedná o **latentní produktivní infekci**. Během latence může docházet periodicky (případně i jednorázově) k reaktivaci infekce a zvratu k perzistentní infekci.

Virové patogeneze je obvykle spojována s reprodukcí virových částic a s jejich uvolňováním, které je nezbytné pro další šíření infekce a udržení virové genetické informace. Můžeme se však setkat i s jinými mechanismy patogeneze, jako je např. podíl viru na indukci onkogeneze, potlačení (suprese) funkcí imunitního systému nebo jiných specifických buněčných funkcí bez usmrcení infikované buňky. **Pomalé virové infekce** se vyznačují mnoho let trvajícím asymptomatickým latentním perzistencí viru v organismu. Aktivace infekce, spojená často s imunosupresí, vede k projevům onemocnění napadeného organismu často s rychlým letálním koncem. V některých případech má infekce za následek transformaci buňky.

Jiný pohled na virové infekce je dělí na lokalizované a systémové. V případě lokalizovaných infekcí dochází pouze k poškození buněk v místě infekce (*Rhinoviruses*). Systémová infekce (např. spalničky – *Measles virus*, *Paramyxoviridae*) je pak spojena s šířením viru po organismu a má za následek jak subklinické infekce (bez projevů), tak akutní (neperzistentní) infekce, perzistentní

²³ Virulence porovnává sílu chorob vyvolaných různými kmeny téhož mikroorganismu.

infekce (chronická, latentní, pomalá), transformace až infekce s fatálním výsledkem.

Interakce viru a buňky může mít mnoho forem.

- **Cytocidní produktivní infekce** (lytická), při které proběhne kompletní reprodukce virů, buňka je však tak poškozená, že odumírá.
- **Produktivní infekce bez cytotických změn**, při které proběhne kompletní reprodukce virů, avšak po jejich uvolnění buňka neodumírá, ale obnovuje svoji funkci.
- **Perzistentní infekce**, během které se virové částice tvoří trvale, nedochází ale k poškození buňky. Pokud se jedná o dělící se buňky, virus může přecházet do dceřiných buněk (většina rostlinných virů).
- **Neproductivní infekce** (latentní), při které virový genom přetrvává v organismu, nové částice se netvoří a exprese virových genů je minimální.
- Interakce viru s buňkou vede k její **transformaci**, při které se mění vlastnosti buňky (morfologie, genom, karyotyp) a dochází k poruchám buněčného dělení, diferenciace a růstu (onkoviry).
- **Abortivní infekce**, při které virus pronikne do buňky, ale vzhledem k absenci některých enzymů nebo faktorů v buňce jsou syntetizovány jen některé složky reprodukčního cyklu viru. Kompletní částice se netvoří nebo jsou defektní.

4.4 Patogenita a virulence

Pojmy patogenita a virulence se často zaměňují nebo používají ve stejném slova smyslu. Stručně řečeno: **patogenita** porovnává sílu chorob vyvolaných různými mikroorganismy (např. virus vztekliny je více patogenní než virus spalniček). **Virulence** porovnává sílu chorob vyvolaných různými kmeny téhož mikroorganismu (např. dva kmeny herpes simplex viru (A, B) inokulované do kůže myši mohou vyvolat tvorbu vesikulárních lézí a způsobit smrt; v případě kmene A inokulační dávka méně než 10 virionů může již vyvolat smrt, v případě kmene B potřebujeme infekční dávku až 10 000 virionů. To znamená, že kmen A je cca 1000x virulentnější než kmen B).

Proč je jeden kmen viru virulentnější než druhý?

Využití metod molekulární biologie a genetiky, jako je např. sekvencování, pomáhá odpovědět na tuto komplikovanou otázku. Její vyřešení je nesmírně důležité mimo jiné pro přípravu atenuovaných (oslabených) kmenů virů nezbytných pro přípravu vakcíny. Příčinou jsou s největší pravděpodobností malé mutační změny. Například byly porovnány sekvence virulentního 'typu III' polioviru a odvozeného atenuovaného kmene. Pouze 10 mutačních bodů ze 7 430 bylo detekováno v atenuovaném kmenu. Následně se zjistilo, že pouze tři z nich mohou vést ke změně aminokyseliny, a dále, že pouze jedna změna aminokyseliny odpovídá za oslabení virulence u atenuovaného kmene. Podobně záměna aminokyseliny u viru chřipky B v blízkosti jeho receptor vazebného místa (receptro-binding site) na vrcholku molekuly hemaglutininu snižuje jeho virulenci.

4.5 Základní znaky patogenetického procesu organismu jako mnohobuněčného systému – patogeneze živočichů

Ačkoliv jednotlivé kroky virové patogeneze se liší v detailech odlišujících konkrétní virové druhy a hostitele, můžeme nalézt řadu společných obecně platných vztahů a zákonitostí. Virus musí přežít v prostředí, atakuje a vstupuje do vnímavého hostitele, množí se (vytváří inokulum²⁴), šíří se z místa primární infekce (vstupu) do vybraných pletiv a orgánů hostitele a vyvolává chorobu jako projev infekce. Vzhledem k rozdílům v průběhu patogeneze živočišných a rostlinných organismů, které se liší jak konkrétními procesy a mechanismy patogeneze, tak i historicky zavedenou terminologií, budou tyto části popsány zvlášť.

²⁴ Inokulum chápeme jako materiál obsahující virové částice (mikroorganismy), které mohou být přeneseny do hostitele.

4.5.1 Vstupní brána infekce

Živočišné viry jsou schopné infikovat buňky přes **kůži**²⁵ nebo **sliznice**²⁶. Zdravá kůže, skládající se z několika nepoškozených vrstev, je dostatečnou bariérou virové infekci. K jejímu zahájení je nezbytné **poškození kůže** a oslabení obranných mechanismů uplatňujících se v kůži. Některé viry mohou vstupovat do organismu více cestami. Například virus pravých neštovic (*Varicella major*) může infikovat organismus oděrkami kůže, ale také respiračním traktem. Výrazně zranitelnějšími místy jsou sliznice dýchacího traktu (respirační), zažívacího traktu (gastrointestinální), urogenitálního systému a spojivek. Na rozdíl od kůže, infekce buněk sliznic nevyžaduje jejich porušení, obvykle je postačující malé trauma (oslabení organismu a tedy i obrany sliznic), které umožní primární infekci a pomnožení viru.

V mírném klimatu je běžnou vstupní bránou **respirační trakt**. Ideálním nosičem mikrobů včetně virů je aerosol vznikající při kýchání nebo kašlání. Malé kapičky (kapénková infekce) se mohou šířit vzduchem a k infekci pak dochází jejich vdechnutím, kdy dochází nejčastěji k primárním infekcím plicních nebo tracheálních sliznic. Infekce je často usnadněna faktory poškozujícími ochranou hlenovou vrstvu, jako je kouření nebo znečištění ovzduší. Obranné mechanismy jsou spojeny se sekrecí ochranného hlenu a s koordinovaným pohybem vláken obrvených epiteliálních buněk, které pomáhají zachytit cizorodý materiál a odstranit jej. Doplňujícími obrannými mechanismy jsou sekrece imunoglobulinu A (IgA) a fagocytóza buněk alveolárními makrofágy. Především v podzimním a zimním období jsou přeplněné obchody, autobusy, ale i školní třídy, ideálním prostředím pro šíření kapénkových infekcí.

Infekce přes **gastrointestinální trakt** je obvykle spojena s nízkým standardem hygieny. Tento způsob infekce je znám jako fekal-orální cesta, u nás známá při šíření hepatitidy A, která je nazývána jako 'nemoc špinavých rukou'. Virus je

²⁵ Příklady virů infikujících organismus přes poranění kůže: lidské papillomaviry, poxviry, *Herpes simplex virus 1*; kontaminované injekční jehly: *Hepatitis B virus*, *Lentivirus* (HIV); pomocí vektorů a pokousáním: Arboviruses, *Lyssavirus*.

²⁶ Příklady virů infikujících organismus přes sliznice: sliznice respirační - *Orthomyxovirus*, *Paramyxovirus*, *Rhinovirus*, *Varicella-zoster virus*; trávicí trakt - *Poliovirus*, *Enterovirus*, *Rotavirus*; spojivka - *Enterovirus*, *Adenovirus*; urogenitální sliznice - *Hepatitis B virus*, *Herpes simplex virus 2*, lidské papillomaviry.

vylučován stolicí a cestou špinavých klik a nemytého ovoce je přenášen do gastrointestinálního traktu zdravého jedince. Viry, které jsou schopné infikovat hostitele přes gastrointestinální trakt, musí být schopné přežít v kyselém prostředí žaludku, nemohou být inaktivovány proteolytickými enzymy ani žlučovými solemi. Právě tyto podmínky v gastrointestinálním traktu jsou hlavními nespecifickými obrannými mechanismy inaktivujícími viry.

Řada lidských virů, včetně HIV (*Human immunodeficiency virus*) nebo HSV 2 (*Herpes simplex virus 2*), je **pohlavně přenosná**. Malé ranky a oděrky sliznic pochvy, ale i uretry a konečníku během sexuální aktivity mohou vést k infekci. K obranným mechanismům sliznic urogenitálního systému patří mukózní hleny, kyselé pH sekretů, chemické složení povrchu a čistící funkce sliznic uretry a přítomnost sekrečního IgA.

Místem primární infekce viry může být i **oční spojivka**. Nejčastěji se jedná o infekci adenoviry nebo enteroviry vyvolávajícími lokální infekci (zánět oční spojivky). Jen vzácně se infekce šíří dále z očí do nervového systému.

Plod (fetus) může být infikován z matky, a to **transplacentární cestou** (zarděnky - *Rubella virus*, plané neštovice – *Varicella-zoster virus*, hepatitida B – *Hepatitis B virus*, *Human immunodeficiency virus*), nebo v průběhu porodu může dojít k **perinatální nákaze** (cytomegalovirus, *Enterovirus*, *Human papillomavirus*).

Jinou cestou šíření virů se staly **transplantace** a **trasfuze**, kdy především dva herpesviry, a to cytomegalovirus (*Human herpesvirus 5*) a Epstein-Barr virus (*Human herpesvirus 4*), jsou velice nebezpečné.

4.5.2 Základní fáze procesu patogeneze

Viry jsou příčinou celé řady velmi závažných chorob, jejichž vývoj je závislý jak na viru v tom nejobecnějším slova smyslu, tak na hostiteli. Ve všech případech však můžeme pozorovat stejnou posloupnost obecných kroků infekce organismu, vývoje a průběhu choroby.

K základním fázím patogeneze patří:

Vstup viru do hostitele - primární infekce hostitele je spojena s překonáním

epitelové nebo kožní bariéry. Zdravou neporaněnou kůží nemohou viry proniknout. Sliznice jsou chráněny obrannými mechanismy, jako vrstva hlenu, pohyb řasinek, pH, nespecifické inhibitory, IgA protilátky. Viry se setkávají s makrofágy retikuloendotelového systému.

Primární pomnožení - v místě inokulace ve vnímavých buňkách dochází k zahájení množení viru. Vyvíjí se zápalová reakce (zánět) a dochází k poškození buněk v místě infekce. Virus musí překonat lokální nespecifické obranné mechanismy, jako jsou interakce s makrofágy (fagocytóza), nespecifické inhibitory virů (např. interferon), snížení pH, lokální prokrvení, lokální zvýšení teploty. Pokud nedojde v této fázi k potlačení virové infekce, následuje pomnožení virů. Viriony jsou lymfou dopraveny do místních lymfatických uzlin, kde mohou být fagocytovány a virové antigeny jsou prezentovány imunokompetentním buňkám.

Šíření v hostiteli; buněčný a tkáňový tropismus - viry překonají cévní bariéry a začínají se šířit lymfatickými a krevními cévami po organismu, dojde k primární viremii. Následně viry mohou proniknout do nervových zakončení a šířit se podél nervových vláken. Šíří se k cílovým tkáním a orgánům.

Imunitní odpověď – paralelně se šířením viru po organismu je aktivován imunitní systém a virus je konfrontován se specifickou protivirovou obranou, kterou reprezentují specifické protilátky a buněčná imunitní odpověď. Pokud množení viru překoná obranné kapacity buněčné imunity, dojde k sekundární viremii, která je obvykle doprovázená zvýšením teploty.

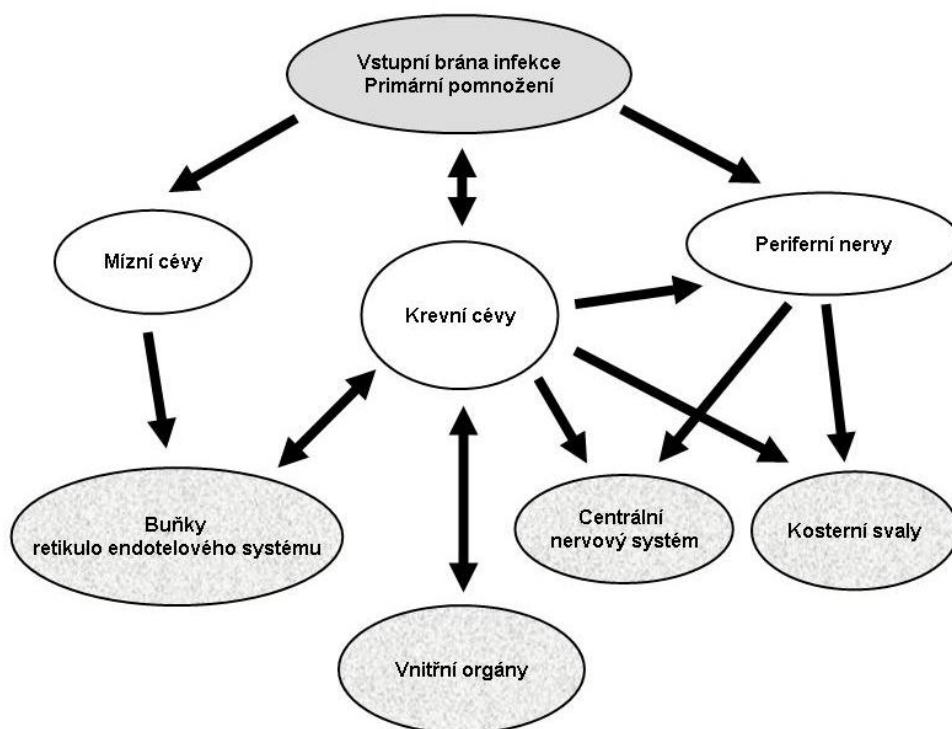
Sekundární pomnožení – virus se usídluje a pomnožuje v cílových tkáních a orgánech. V důsledku protilátkové obrany se tvoří imunokomplexy, které jsou odbourávány specifickými složkami komplementu²⁷ a makrofágy. Dochází k přímému poškození hostitelských buněk vlivem replikace viru, imunitní cytolyzy nebo cytotoxickými T lymfocyty.

²⁷ Komplement tvoří skupina krevních bílkovin, které se podílejí na některých imunitních a alergických reakcích (patří k nespecifické imunitě). K aktivaci komplementu klasickou cestou vede zejména komplex antigen-protilátka.

4.5.3 Šíření viru v hostiteli

V organismu hostitele se viry rozmnožují a šíří v buňkách různého typu tvořících tkáň a orgány. Celý organismus je spojen lymfatickými a krevními cévami a nervy.

Obr. 8 Schéma šíření virové infekce



Virus se v organismu zachytí v primárním místě infekce. Po jeho pomnožení začíná proces jeho šíření, který končí usídlením viru v cílovém orgánu. Pojmeme cílový orgán označujeme ten orgán, jehož poškození vyvolává klinické příznaky nemoci. Projevům klinických příznaků předchází bezpříznaková inkubační doba a stadium nespecifických 'předzvěstných' příznaků. Když se cílový orgán shoduje s místem primární infekce (plíce - chřipka), je inkubační doba krátká a předzvěstné příznaky (teplota - horečka) se dostavují rychle a plynule přecházejí do rozvinutých příznaků nemoci. U nemocí, kdy místo primární infekce a cílový orgán jsou vzdálené, anatomicky i fyziologicky chráněné (dětská obrna – poliovirus (*Human enterovirus C*), vzteklinu - *Rabies virus*, infekční žloutenka – *Hepatitis A virus*), je inkubační doba delší.

Pokud se viry vyvolávající onemocnění sliznic množí výhradně v buňkách slizničního epitelu (*Rhinovirus*), zůstává infekce lokalizována v místě primární infekce.

Přímá inokulace viru do krevního řečiště je poměrně vzácná. Můžeme se s ní setkat u arbovirů²⁸, které jsou přenášeny vektory, nebo při inokulaci injekční jehlou během transfúze infekční krve nebo krevních derivátů, případně při aplikaci drog injekční stříkačkou opakovaně používanou více osobami. Nejčastější je proniknutí viru do krevního (lymfatického systému) z místa primárního pomnožení viru (infikovaná tkáň - sliznice, svaly, subkutánní pletiva ap., místní lymfatické uzliny). Virus je uvolňován do krevního řečiště (primární viremie²⁹) a krevními a lymfatickými cévami se šíří organismem. Virus se může šířit volně v plazmě nebo asociován s krevními buňkami. Příkladem volného šíření mohou být zástupci r. *Togavirus*, na straně druhé HIV se šíří v monocytech, makrofázích nebo T buňkách, Virus Epstein-Barrové infikuje B lymfocyty. Krok, kterým viry infikují z krevního řečiště vnímavé tkáně, není zcela detailně prostudován. V některých případech virus napadá epitelové buňky a šíří se do hlouběji lokalizovaných buněk šířením z buňky do buňky.

Viry spojované s infekcí centrálního nervového systému, se často šíří nervy nebo podél nervových vláken Schwannovými buňkami. Typickým příkladem je virus vztekliny, herpes simplex virus nebo *Varicella zoster virus*. Mnohé studie potvrzují, že kapacita a efektivnost šíření viru dráhami na velkou vzdálenost, ale i z buňky do buňky, je určena specifickými virovými proteiny.

Z krevního řečiště se viry šíří dál do jater, sleziny, kostní dřeně, kde se virus dále množí. Jeho opětovné masové uvolnění do krevního řečiště může být příčinou sekundární viremie.

Na závěr virus napadá cílové orgány (tkáně). Tento proces je závislý na tkáňovém tropismu, koncentraci viru, ale i stavu hostitelského organismu.

²⁸ Viry přenášené členovci – Arthropod-borne viruses.

²⁹ Viremie označuje stav, kdy viry vstupují do krevního řečiště hostitelského organismu a krví jsou roznášeny do dalších orgánů.

Schopnost viru selektivně infikovat určitou populaci buněk (tkáň) v orgánu je označována jako **tropismus**. Virový tropismus je ovlivněn a určen řadou virových a hostitelských faktorů. Vybrané z nich jsou uvedeny v následujícím textu.

- **Virové receptory**

Jak již bylo uvedeno, před zahájením infekce se virus musí vázat na buňku. Vstup viru do buňky tak můžeme chápat jako výsledek interakce viru se specifickými buněčnými receptory. Potom může následovat receptory-zprostředkovaná endocytóza nebo přímá fúze virového lipoproteinového obalu s cytoplazmatickou membránou a vstup virového nukleoproteinu do buňky.

- **Virové proteiny atakující buňku**

Interakce viru s buněčnými povrchovými receptory je zprostředkována jedním nebo více virovými proteiny. U obalených virů se jedná o glykoproteiny (např. HA – virus chřipky A, gp120 - HIV). Podobnou roli mají kapsidové proteiny neobalených virů.

- **Tkáňově specifické promotory, zesilovače (enhancery) a transkripční aktivátory**

Ačkoliv je vazba na povrchové buněčné receptory nezbytným krokem zahájení infekce buňky, existují i jiné faktory ovlivňující zahájení reprodukčního cyklu viru. Viry mohou obsahovat různé genetické elementy, např. promotory a zesilovače, které mohou zesílit transkripci určitých genů podílejících se na buněčné, tkáňové nebo druhové specifitě viru.

- **Místo vstupu a dráhy šíření**

Rovněž místo vstupu virové infekce do organismu může ovlivnit rozvoj infekce. Typickým příkladem jsou některé viry šířené v organismu neurony. Jejich šíření je ovlivněno dostupností neuronových drah v místě proniknutí viru do organismu.

- **Hostitelské faktory**

Je důležité si uvědomit, že i vlastnosti hostitelského organismu mohou kriticky ovlivnit vznik infekce a její patogenezi. Mezi takové faktory patří: stáří, pohlaví, genotyp, stav imunitního systému (immune status) a stav výživy. Vliv stáří a pohlaví na rozvoj virové infekce můžeme pozorovat u planých neštovic, příušnic a zarděnek, které vyvolávají mírnější průběh u dětí, na rozdíl od rotavirových infekcí, kde je situace obrácena. Tento jev je vyvolán řadou příčin, jako je vývoj imunitního systému, množství a distribuce mitoticky aktivních buněk nebo stav diferenciac

buněk. Rozdíly mezi infekcí mužů a žen může být vyvolána rozdílným rizikem vystavení se mechanismu přenosu. Například HIV infekce se vyskytuje častěji u mužů než u žen. Ne vždy však hrají tuto roli epidemiologické faktory. Příkladem může být až 3x vyšší výskyt neurologických komplikací u průšnicemi infikovaných chlapců než dívek. Prokázalo se, že i experimentálně podávané hormony včetně steroidních, mohou ovlivnit určité experimentální infekce, např. herpes simplex viru.

4.5.4 *Protivirová obrana*

Obratlovci disponují řadou nespecifických a specifických mechanismů, kterými se brání vzniku a rozvoji virové infekce. Pokud virus překoná všechny bariéry a dojde ke vzniku nemoci, je běžné, že díky aktivaci imunitního systému dojde k ozdravení organismu.

4.5.4.1 *Nespecifické obranné mechanismy*

- **Mechanické, fyzikální a chemické bariéry**

Místem průniku viru do organismu jsou sliznice, případně kůže. Tyto orgány jsou první bariérou účelně vybavenou k zamezení průniku virové infekce. Patří k nim efektivní anatomické a funkční vybavení. Klasickým příkladem je dýchací trakt, kde utváření horních dýchacích cest zajišťuje účinnou filtraci infekčního aerosolu a jen kapénky menší než 5 až 7 µm mohou proniknout k plicnímu parenchymu. **Vrstva mukózního hlenu** brání adsorpci virových částic a pohyb řasinek je pak transportuje jak z nosní dutiny, tak z dolních cest do nosohltanu, odkud je většina infekčního materiálu polykána a zneškodněna kyselým pH v žaludku. Podobně pracují i nespecifické obranné mechanismy v zažívacím traktu. Významnou úlohu v protivirové obraně hrají i **nespecifické inhibitory**, které představují molekuly napodobující buněčné receptory a vykytují se v sekretech a v krvi. Vazba virionu na nespecifický inhibitor má za následek jeho neutralizaci. Nespecifickým faktorem je i **vnitřní teplota organismu** zpomalující pomnožení termosenzitivních mutantů virů.

Na straně druhé se virus brání svými vlastnostmi. Množení virulentních kmenů virů není obvykle ovlivněno zvýšenou teplotou; neobalené viry jsou často rezistentní ke

kyselému pH; neuraminidáza uvolňuje vazbu virionu na nespecifické inhibitory a zkapalňuje hleny.

- **Místní nespecifické obranné mechanismy**

V místě primární infekce se vyvíjí **zápalová reakce (zánět)**. Lokální obranné mechanismy jsou aktivovány bezprostředně po průniku viru do organismu. Destrukční účinek virové infekce na tkáň vede k produkci cytokinů a aktivaci kininů. Zvyšuje se průtočnost cévních systémů a permeabilita cév jak krevních, tak lymfatických. Do postiženého místa pronikají z krevního oběhu leukocyty a v místě infekce se hromadí makrofágy. Hlavní účinek zánětu v první nespecifické fázi protivirové obrany spočívá v místním zvýšení teploty, snížení pH, inaktivaci virů nespecifickými inhibitory a likvidaci virů a zničených částí tkání fagocytózou. Z nespecifických obranných mechanismů hraje důležitou roli **komplement**. Jedná se o soubor sérových proteinů (C1 - C9), které mají charakter proenzymů a které jsou kaskádovitě aktivovány po vazbě C1 na komplex antigen-protilátka. Podmínkou pro aktivaci komplementu je tedy rozpoznání virionu nebo virových produktů specifickými protilátkami. Konečným výsledkem je neutralizace mikroorganismů včetně virů, ale i lýze somatických buněk nesoucích na svém povrchu cizí antigeny jako důsledek virové infekce (imunitní cytolyza). Mnohé viry mohou aktivovat komplement alternativní (nespecifickou) cestou bez vazby protilátek na virion.

Důležitou roli v nespecifické protivirové obraně hrají buňky se zvláštním vybavením pro **fagocytózu**, a to **mikrofágy**, **monocyty** a **makrofágy**. Tyto buňky obvykle nesou Fc-receptory pro vazbu specifických protilátek, receptory pro C3 složku komplementu a vyznačují se zvlášť účinnými prostředky pro ničení pohlcených mikroorganismů a schopností reagovat na chemotaktické podněty. Klíčovou úlohu v protivirové obraně hrají makrofágy, které pohlcují a degradují viry a produkty jejich rozkladu předávají jako antigeny imunokompetentním lymfocytům. Později, za přítomnosti specifických protilátek, jsou makrofágy hlavním nástrojem odstraňování imunokomplexů, které na sebe váží svými Fc-receptory a pohlcují je. Je-li makrofág vůči viru vnímavý, po jeho pohlcení dochází k rozbalení virionu a

zahájení životního cyklu. Příkladem dočasné permisivity (vnímavosti) makrofágů vůči herpes simplex viru mohou být letální infekce novorozenců.

Interferony patří k nejlépe prostudovaným cytokinům potlačujících pomnožování virů v nejčasnějších fázích infekce. Mimo přímého inhibičního efektu na replikaci virů interferony potlačují i buněčnou proliferaci, modulují produkci protilátek a buněčnou imunitu. V pozdějších fázích protivirové obrany rovněž omezují imunopatologické důsledky protivirové obrany. Interferony se tvoří a uplatňují v organismu dříve, než dojde k produkci specifických protilátek a než se rozvine specifická imunitní odpověď.

4.5.4.2 *Specifická protivirová obrana*

Klíčovou úlohu specifické protivirové obrany hrají protilátky, které se podílejí jak na přímé neutralizaci virionů, tak na zprostředkování informace vedoucí k aktivaci komplementu nebo fagocytóze.

- **Imunitní systém, protilátková-humorální a buněčná obrana**

Specifické protilátky jsou produkovány plazmatickými buňkami, které představují konečné stadium diferenciací stimulovaných B lymfocytů. Každá jednotlivá buňka je základem klonu produkujícího protilátky stejné třídy a stejné specifity (např. IgA, IgG, IgM rozeznávají vždy jednu formu antigenní determinanty). Plazmatické B lymfocyty, které se diferencují v ranném stadiu infekce, produkují protilátky třídy M (IgM), později se diferencují plazmatické buňky produkující protilátky třídy IgA a IgG. Přítomnost IgM je v krevním séru dočasná a svědčí vždy o začínající nebo právě probíhající infekci. Až 70 % imunoglobulinů v séru má charakter specifických IgG, které přetrvávají v séru dlouho po infekci, někdy i trvale.

Sérové specifické protilátky se vyskytují v krvi, lymfě, peritoneu a mozkomíšním moku. Blokují šíření viru krví a lymfou. Jsou proto velmi důležité u systémových nákaz, kdy jejich včasná produkce může zamezit poškození cílových orgánů. Sérové protilátky matky chrání do jisté míry dítě v prvních měsících života.

IgA jsou nejdůležitějšími protilátkami obsaženými v sekretech sliznic, ve slinách, kolostru a mateřském mléce. Podílejí se na neutralizaci infekčních virionů pronikajících k vnímavým epitelovým buňkám. Specifické IgA přetrvávají po

překonané infekci v sekretech sliznic relativně krátkou dobu (několik týdnů až měsíců), po této době je reinfekce opět možná.

Specifické protilátky se v protivirové obraně uplatňují různými způsoby:

- Jedním z nejdůležitějších účinků je **neutralizace viru**, při které vazba protilátek na virion brání např. jeho adsorpci na vnímavou buňku, penetraci nebo rozbalení virionu.
- Vznik **imunokomplexů** usnadňuje mechanické odstranění virových produktů a jejich eliminaci fagocytózou.
- **Komplement** je aktivován přítomností imunokomplexů tvořených specifickými protilátkami IgA a IgG a virovými produkty. Výsledkem je destrukce imunokomplexů i některých obalených virů a lýze infikovaných buněk označených virovými antigeny v cytoplazmatické membráně (imunitní cytolyza).

Nezastupitelnou úlohu při eliminaci virové infekce z organismu hrají speciální buňky, a to **NK** (natural killer cells) **buňky**, **monocyty** a **makrofágy**, v pozdějších fázích infekce také velmi efektivní **T lymfocyty**. Význam T lymfocytů v protivirové obraně spočívá v odstraňování infikovaných buněk, zpřístupnění viru ukrytého v infikované buňce protilátkám a produkci lymfokinů, které jsou signálem pro soustředění a aktivaci buněčné složky obrany v místě infekce.

Obrana je ovlivněna celou řadou dalších faktorů jako věk, výživa, hormonální rovnováha, genetické faktory a druhová geneticky podmíněná rezistence.

4.5.4.3 *Nepříznivé důsledky protivirové obrany*

Virová infekce organismu a rozvoj choroby je spojen s řadou nepříznivých příznaků, které jsou mnohdy vyvolány obranou reakcí organismu. Příkladem může být horečka, bolesti ve svalech nebo nechutenství. Pokud jsou klinické příznaky choroby vyvolané převážně imunologickými mechanismy, označujeme je jako imunopatologické projevy.

Velmi nepříznivé důsledky pro rozvoj imunitní obranné odpovědi mají virové infekce monocytů a makrofágů bez cytopatického účinku, které mohou vést k množení a šíření viru v organismu. Později obvykle dochází k poruchám

fagocytární funkce a ke snížení odolnosti organismu i vůči možné bakteriální infekci. Stavy přechodné imunologické nedostatečnosti provázejí řadu běžných virových nákaz a mohou být spojeny se zvýšenou vnímavostí vůči infekci. Typickým příkladem trvalé imunologické nedostatečnosti³⁰ je HIV infekce.

Virové antigeny jsou často produkovány ve velkém nadbytku. Vážou na sebe velkou část neutralizačních protilátek a blokují tak jejich neutralizační funkci. Když množství vzniklého imunokomplexu přesahuje kapacitu fagocytárního systému, dochází k ucpávání cév a usazování imunokomplexu v různých místech s možností vzniku zánětu. V průběhu akutních infekcí dochází často k přechodnému zvýšení hladiny cirkulujících imunokomplexů, což se projeví bolestmi ve svalech, kloubech, svěděním a někdy i výrazným exantémem³¹.

V průběhu některých virových nákaz vznikají protilátky proti vlastním tkáním. Může to být způsobeno podobností některých antigenních determinant patogena s membránovými antigeny hostitele nebo imunitní odpovědí vůči vlastním antigenním determinantám se začleněnými virovými doménami, případně vůči vnitřním složkám buněk destruovaným virovou infekcí.

4.5.5 Profylaxe a léčba virových chorob

Virové vakcíny

Specifická prevence virových chorob zahrnuje opatření směřující ke vzniku specifické imunity, a to pasivní a aktivní imunizací.

Aktivní imunizace patří doposud k nejúčinnějším a nejúspěšnějším prostředkům obrany proti virovým nákazám. Vyvolává vznik specifické imunitní odpovědi (specifické imunity) aplikací živých nebo neživých očkovacích látek. Virové vakcíny dělíme na živé a neživé. V praxi nejúčinnější virové **vakcíny** patří mezi **živé**, které stimulují všechny obranné mechanismy hostitele. K nejúspěšnějším živým vakcínám patří virus vakcinie, **přírozně nepatogenní virus**, který byl poprvé použit k očkování proti pravým neštovicím Edwardem Jennerem již v roce 1796. Za necelých 200 let umožnila existence této vakcíny celosvětovou eradikaci pravých

³⁰ Imunologická nedostatečnost - nedostatečná odolnost, malá obranyschopnost.

³¹ Vyrážka.

neštovic. Ke klasickým živým **atenuovaným vakcínám** patří také Sabinova očkovací látka proti dětské obrně (poliomyelitidě), vakcína proti spalničkám, vakcína proti zarděnkám a příušnicím. Mezi viry spalniček, zarděnek a příušnic dochází k interferenci a vakcíny jsou proto často používány v trojkombinaci. Při přípravě živých vakcín má rozhodující úlohu výběr vhodných virových kmenů, tzv. **atenuovaných (oslabených)**³².

Neživé očkovací látky se připravují tak, že pomnožený virus se inaktivuje např. UV zářením nebo formalínem. Antigenní podnět je však relativně malý a k dosažení spolehlivé imunity musí být aplikovány v několika po sobě následujících dávkách. K inaktivovaným celovirionovým vakcínám patří např. očkovací látka proti vzteklině, která se používá u osob, které byly vystaveny nebezpečí nákazy (postexpoziční vakcinace), Salkova neživá vakcína proti poliomyelitidě nebo protichřipkové vakcíny. Je možné rovněž použít subjednotkové vakcíny³³, kde k nejznámějším patří subjednotková (HBs antigen) vakcína proti hepatitidě B. V posledních letech se aktivně pracuje na vývoji vakcín založených na geneticky manipulovaných virech nebo *in vitro* připravovaných rekombinantních proteinech.

Při prevenci a terapii virových nákaz se v některých odůvodněných případech uplatňuje také **pasivní imunizace**, tj. aplikace specifických hyperimunních globulinů. K dispozici jsou např. hyperimunní globuliny proti infekci virem varicella-zoster, proti cytomegaloviru nebo viru hepatitidy B.

Terapie virových infekcí

Vyhlídky na širší uplatnění specifické protivirové chemoterapie se zdály dlouhou dobu málo reálné, především vzhledem k naprosté závislosti množení viru na buněčném metabolismu. Až poslední doba přinesla poznatky týkající se životní strategie virů na molekulární úrovni, které je možné ve vybraných případech s efektem využít při léčení virových nákaz.

K principům, na kterých fungují současná virostatika, patří:

- inhibice adsorbce viru na vnímavou buňku,

³² Atenuované virové kmeny je možné odvodit např. z přirozeně se vyskytujících atenuovaných virů nebo mutací.

³³ Očkovací látka (virový antigen) je produkována pomocí rekombinantních DNA-technologií např. v *Escherichia coli* nebo *Saccharomyces cerevisiae*.

- zabránění uvolnění virové nukleové kyseliny,
- interference s transkripcí a translací virových genů,
- inhibitory DNA polymeráz,
- inhibitory RNA polymeráz,
- inhibitory reverzní transkriptázy,
- interferon alfa.

4.6 Základní znaky patogenetického procesu organismu jako mnohobuněčného systému – patogeneze rostlin

Podobně jako u živočišných virů i rostlinné viry jsou obligátními parazity. Ve většině případů jsou typickými patogeny, což dokazuje interakce virus – hostitel, jejímž výsledkem je choroba (nemoc). Virové choroby (virózy) se vyznačují poškozením jednotlivých funkcí rostliny. U hospodářských plodin je výsledkem snížení kvality a kvantity produktu, a tedy i ekonomické ztráty. Rozvoj choroby je spojen s množením viru, poškozením funkcí buňky (pletiv, orgánů) a následným vývojem symptomů.

Patogeneze rostlin zahrnuje řadu následných kroků:

- vstup viru do rostliny,
- rozvoj infekce a reakce hostitelské rostliny,
- průběh choroby.

4.6.1 Vstup viru do rostliny

Podobně jak se liší životní projevy (fyziologie) a stavba těla (buňky, tkáně/pletiv, orgánů) rostlin a živočichů, odlišují se i reprodukční strategie jejich virů. Fytopatogenní viry pronikají do pletiv hostitelů pasivně na rozdíl od aktivního průniku bakteriálních a živočišných virů. Nedokážou totiž aktivně proniknout kutikulou ani pevnou buněčnou stěnou a vyžadují vznik malých poranění, které jim umožní styk s živou cytoplazmou. Pokud by poranění bylo příliš velké, došlo by k odumření buňky a virová infekce by se nemohla rozvinout. Výjimku tvoří zástupci čeledi *Phycodnaviridae* infikující zelené řasy, kteří pronikají do buněk hostitele podobně jako bakteriofágy.

Přirozená infekce rostlin je obvykle spojena s přenosem infekčních virionů pomocí vektorů nebo vegetativně. Virus vstupuje do rostliny pasivně v místě poranění způsobených hmyzem a ostatními živočichy, včetně člověka (např. sání, požerky, okus nebo mechanické poškození).

Přenos rostlinných virů mezi hostiteli a jejich rozšiřování:

- **Přímý přenos reprodukčním rostlinným materiálem - vegetativní přenos.** Přenos reprodukčním a jiným rostlinným materiálem se týká prakticky všech rostlinných virů. Jedná se o přenos a šíření **rouby a očky, řízky, odkopky a sadbovým materiálem**³⁴ většinou spojený s činností člověka. I v přirozených společenstvech rostlin se setkáváme s vegetativním šířením virů pomocí oddenků, hlíz, kořenových výmladků, cibulí, pacibulek apod. Vedle toho byly popsány případy přenosu virů kořenovými srůsty mezi dřevinami. Analogickým příkladem je šíření virů hub po fúzi hyf.
- Zvláštním typem přenosu je šíření virů parazitickou **kokoticí** (*Cuscuta campestris*, *C. europea* ap.), která pomocí haustorií proniká do hostitelských rostlin a vytváří mezi nimi přirozený most.
- Dalším způsobem rozšiřování virů je přenos **semenem**. Viry bývají vázány na **embrya, endosperm** nebo **testu**. Rostliny vyrůstající z napadených semen mají velký epidemiologický význam jako primární zdroj infekce. Obvykle je procento přenosu semeny nízké kolem 0,1 %, ale může dosáhnout až jednotek, výjimečně desítek procent. Dobře je prostudován přenos viru obecné mosaiky fazolu (*Bean common mosaic virus*) semeny fazolu nebo viru mozaiky salátu (*Lettuce mosaic virus*) semeny salátu, který ve vybraných případech může dosáhnout až několika desítek procent. Úspěšnost přenosu semeny závisí jak na druhu viru (kmenu) a hostitele (genotypu), tak na době infekce a na vnějších podmínkách. V případě viru šarky švestky (*Plum pox virus*) bylo prokázáno, že může infikovat embryo myrobalánu, klíčící rostliny jsou však zdravé. Tento jev se vysvětlil tím, že infikovaná semena nebyla životaschopná a neprorůstala.

³⁴ Příklady: virus šarky švestky (*Plum pox virus*), Y virus bramboru (*Potato virus Y*).

- Virus mozaiky tabáku může být přenášen na **povrchu semen** rajčat (seedborne) a k infekci klíčících rostlin dochází v místech poranění při klíčení a růstu malých rostlinek. Povrchová dezinfekce je jednoduchým způsobem, jak virové infekci v tomto případě předejít.
- Viry mohou být přenášeny i **pylem**. Větší epidemiologický význam byl pozorován u *Prunus necrotic ringspot virus* infikující např. třešně a višně a *Raspberry bushy dwarf virus* napadající např. maliník.
- **Přenos pomocí vektorů (zoochorie).** Členovci (*Arthropoda*) jsou známi jako typičtí vektorů rostlinných virů. Přenos virů vektory nezahrnuje jenom mechanický přenos, ale je velmi specifickou biologickou interakcí mezi virem a hostitelem. Běžným nejvýznamnějším hmyzím vektorem rostlinných virů jsou **mšice** (*Aphis*). Z epidemiologického hlediska jsou významnými přenašeči někteří zástupci dalších skupin hmyzu jako **brouci**, **molice**, **třásněnky** a také zástupci pavoukovců (*Arachnida*) - **roztoci**. Škvoři, housenky motýlů, ale i mery a křísi, přenášejí rostlinné viry jen sporadicky, bez většího epidemiologického významu. Vektorů přenášejí viry buď neperzistentně na svých stíletech nebo poměrně vysoce specificky perzistentním způsobem, kdy virus přetrvává ve vektoru po dlouhou dobu. Příkladem neperzistentního přenosu je přenos viru mozaiky okurky (*Cucumber mosaic virus*) nebo Y virus bramboru (*Potato Y virus*); příkladem perzistentního přenosu virus svinutky bramboru (*Potato leafroll virus*).

V případě **neperzistentního přenosu** jsou viry přenášeny mechanicky na povrchu sacího nebo kousacího ústrojí vektora. I když by se zdálo, že takový vztah virus – vektor není příliš specifický, opak je pravdou. Například u zástupců r. *Potyvirus* bylo zjištěno, že jejich úspěšný přenos je podmíněn přítomností DAG motivu³⁵ na počátku genu kódujícího plášťový protein. Kmeny viru, které tento motiv nenesou, nejsou přenosné mšicemi. K nabytí (akvizici) viru stačí krátká doba sání (sekundy až minuta). Vektor si uchovává infekčnost jen po krátkou dobu (minuty až několik hodin) a je

³⁵ Motiv - specifická sekvence aminokyselin odpovědná za určitou funkci proteinu (D – kyselina asparagová, A – alanin, G – glycin).

infekční ihned po nabývacím sání, ale infekčnost ztrácí při sání následném. Specifita a efektivnost přenosu neperzistentních virů je velmi variabilní. Například mšice broskvoňová (*Myzus persicae*) přenáší více než 70 druhů virů. Efektivnost přenosu závisí nejen na druhu viru nebo jeho kmeni, ale i na vývojovém stadiu vektora (okřídlení a neokřídlení jedinci), chovné rostlině pro mšice, druhu hostitelské rostliny jako zdroje inokula a faktorech vnějšího prostředí.

Perzistentní přenos vyžaduje dlouhé akviziční sání (minuty až hodiny). Virus projde celým zažívacím ústrojím vektora a přes hemolymfu do slinných žláz, odkud může být opět sacím (kousacím) ústrojím vylučován. Doba, během níž virus prochází tělem vektora, se nazývá inkubační; po tuto dobu není vektor infekční (dny až měsíc). Vektor zůstává infekční po dlouhou dobu (týdny) až celý život; neztrácí svoji infekčnost ani po svlékání. Jestliže dochází ve vektoru k množení virů, hovoříme o **propagativním** typu přenosu, pokud ne, nazýváme jej **cirkulativním** typem perzistentního přenosu. V případě perzistentního propagativního přenosu je vektor druhým hostitelem viru.

Semiperzistentní přenos tvoří přechod mezi neperzistentním a perzistentním přenosem. Vektor obvykle získá virus po delším sání, ale přenáší ho prakticky ihned, bez latentní periody. Při svlékání ztrácí pak vektor svoji infekčnost.

U mšic byl popsán také **transovariální přenos** viru z matky na potomstvo.

- Kromě hmyzu mohou viry přenášet i **roztoči** (*Acarina*). Příkladem jsou zástupci málo prostudovaného r. *Alexivirus*, infikující např. česnek, přenášení roztočem *Aceria tulipae*.
- **Hádátka** (*Nematoda*) mohou přenášet viry buď neperzistentně povrchově, nebo perzistentně v zažívacím traktu. Na šíření virů se převážně podílejí hádátka r. *Xiphinema*, *Longidorus* a *Trichodorus*. Typickým příkladem přenosu virů hádátky jsou zástupci r. *Nepovirus*. K zástupcům této skupiny

patří např.: virus mozaiky huseníku (*Arabis mosaic virus*) a virus černé kroužkovitosti rajčete (*Tomato black ring virus*).

- Některé viry využívají k přenosu na zdravé hostitele a ke svému šíření aktivního pohybu **zoospor hub** (např. *Tobacco necrosis virus* – *Olpidium brassicae*, *Beet necrotic yellow vein virus* (původce rhizománie řepy) – *Polymyxa bethae*).
- **Mechanický přenos** je nejběžnější experimentální metoda přenosu virů na testovací nebo experimentální rostliny. Mechanický přenos spočívá ve vpravení infekčního virionu, v některých případech jen infekční virové nukleové kyseliny, do rostliny přes porušenou kutikulu. Vznik a průběh následující infekce závisí na vlastnostech inokula³⁶ (zdroj viru, koncentrace a stabilita viru, způsob přípravy, složky inokula). K mechanickému přenosu může docházet i přirozeně, a to v případě vysoce stabilních virů vyskytujících se v pletivech ve vysoké koncentraci (např. virus mozaiky tabáku – *Tobacco mosaic virus*, virus nekrózy tabáku – *Tobacco necrosis virus*, X virus bramboru – *Potato virus X*). Tyto viry mohou být přenášeny přímo z rostliny na rostlinu rukou, na oděvech nebo nástrojích. Byla rovněž zjištěna kontaminace půdy, vody a vzdušných aerosolů stabilními viry.

Příklady přenosu infekce rostlinných virů:

Neperzistentní přenos mšicemi: např. *Cucumovirus*, *Carlavirus*, *Potyvirus*

Perzistentní přenos mšicemi: např. *Luteovirus*, *Rhabdovirus*

Bemisia tabaci (molice): *Tomato leaf curl virus*, *Begomovirus*

Frankliniella occidentalis (třásněnka): *Tomato spotted wilt virus*

Coleoptera: někteří zástupci *Comovirus*, *Tymovirus* a *Bromovirus*

Hádátka r. *Xiphinema*: *Nepovirus*

Hádátka r. *Trichodorus*: *Tobravirus*

Eriophyes tulipae (roztoč): *Wheat streak mosaic virus*

Semenem a pylem: většina zástupců *Ilarvirus* a *Hordeivirus*

Zoospory *Olpidium brassicae*: *Tobacco necrosis virus*

Zoospory *Polymyxa betae*: *Beet necrotic yellow vein virus*

³⁶ Inokulum je připraveno homogenizací nejlépe mladých listů vykazujících symptomy v pufru obsahujícím abrasivum (poškození buněčné stěny) a přísady chránící virus (antioxidanty - aktivní uhlí apod.).

4.6.2 Rozvoj infekce a reakce hostitelské rostliny

Jestliže je infikovaná buňka vnímavá na virovou infekci, dochází během několika hodin ke změně jejího metabolismu a je nastartován reprodukční cyklus viru. Infekce je zahájena v místě inokulace a po namnožení se virus šíří rostlinou. V místě vstupu viru do rostliny se vyvíjejí **lokální příznaky infekce** (chlorotické nebo nekrotické leze, mozaiky). Pokud dochází k šíření viru v rostlině, reagují rostliny na virovou infekci i **systémovými příznaky** (mozaiky, diskolorace, zakrslost, svinování a krabacení listů, proužkovitost) .

4.6.2.1 Šíření a distribuce viru v rostlině

V rostlině se virus šíří od buňky k buňce plasmodezmaty. Tímto způsobem se šíří přednostně celé virové částice. Existují však i důkazy, že v parenchymu dochází k mezibuněčnému transportu infekční virové nukleové kyseliny³⁷. Na větší vzdálenosti je velice efektivní šíření virionů cévními svazky (floém, xylém).

Důležitou roli hrají specifické transportní proteiny tzv. 'movement proteins'³⁸ (MP). Jsou to specializované virem kódované proteiny, které modifikují plasmodezmata případně další transportní dráhy v buňce, a umožní tak transport virionů nebo v některých případech virového genoforu do sousedících buněk. V řadě případů bylo experimentálně zjištěno, že MP proteiny virů různých druhů, rodů i čeledí se mohou zastupovat (komplementovat). Je-li potom tento protein exprimován v transgenní rostlině, způsobí výrazné zvýšení prostupnosti plasmodezmat pro viry. Na straně druhé, mutace v genu pro transportní MP protein může znemožnit efektivní šíření viru po rostlině; replikační schopnost viru však zůstane neovlivněna. Vedle typických MP proteinů se na transportu virionů a jejich částí podílejí i další virové proteiny s transportní funkcí. Při svém šíření v rostlině virus nebo infekční RNA nepřechází přes cytoplazmatickou membránu, ale všechny dráhy probíhají pouze přes intercelulární spoje. Jedná se o významnou adaptaci, která odlišuje rostlinné viry od živočišných.

³⁷ V případě rostlinných virů ss(+)RNA může být tato sama o sobě infekční, viz virus mozaiky tabáku.

³⁸ Transportní proteiny včetně MP proteinů ovlivňují propustnost plasmodezmat a podílejí se na transportu virových nukleových kyselin.

Šíření viru na větší vzdálenosti v rostlině probíhá pasivně spolu s obsahem cévních svazků. Rozhodující fáze pro tento způsob šíření je vstup a výstup virů z vodivých pletiv. Významnou roli zde hrají např. proteiny bílkovinného pláště (např. *Potyvirus*), specifické virem kódované proteiny nebo i virem kódované replikační proteiny (např. *Potyvirus*, *Cucumovirus*, *Tombusvirus*).

Některé viry omezují infekci jen na inokulovaný list, jiné se šíří celou rostlinou. Jestliže se virus replikuje pouze v primárně infikované buňce a nešíří se do okolních buněk, je taková infekce prakticky nedetekovatelná. U řady virových infekcí je šíření viru z místa vstupu omezeno, výsledkem jsou pak malé zóny infikovaných buněk - lokální chlorotické nebo nekrotické leze.

Především u dřevin je **distribuce viru v rostlině** nerovnoměrná. Koncentrace viru je proměnlivá v závislosti na klimatických podmínkách v průběhu roku a je různá i v jednotlivých orgánech nebo částech stromu nebo keře. Typická je i nerovnoměrná distribuce viru v mozaice listů. V chlorotických sektorech můžeme detekovat virus ve vysoké koncentraci, v tmavě zelených se virus nevyskytuje nebo jen sporadicky (např. virus šarky švestky). Virus se často nevyskytuje v apikálních, případně bočních meristémech nebo jeho koncentrace je zde velmi nízká, čehož se využívá při **ozdravování pomocí meristémových kultur**.

4.6.2.2 Příznaky viróz na rostlinách

Virová infekce může probíhat bez vnějších příznaků nebo můžeme na celé rostlině nebo v jejích jednotlivých částech pozorovat symptomy virózy.

Vlivem virové infekce dochází k **barevným změnám listů**. Systémově infikované listy jsou u řady viróz mozaikovitě nebo difúzně chloroticky skvrnité. Dalšími příznaky jsou žloutnutí žilek, okrajová nebo celková chloróza listů, proužkovitost (u jednoděložných), prosvětlení žilek, lemování žilek, antokyanizace a bronzovitost. Na květních obalech³⁹ můžeme pozorovat např. pestrobarevnost (tulipány). Také plody mohou projevovat barevné, deformační a nekrotické změny. Šíření viru v rostlině může být spojeno i s vývojem celkových nekróz, odumíráním cévních svazků, vrcholů nebo celých výhonů a může vést až k odumření celé rostliny.

³⁹ Okvěti nebo kalich a koruna.

V místě primární infekce buď dochází k odumření infikovaných buněk (tvoří se tzv. lokální nekrotické leze), nebo virus buňky jen poškozuje (nejčastěji chloroplasty) a vyvolává vznik lokálních **chlorotických lezí**. V závislosti na druhu nebo kmeni viru se vytvářejí lokální **nekrotické léze** malé (1 mm), ale i velké až 5 mm v průměru. Možný je také vznik nepravidelných kroužkovitých skvrn a **kroužkových lezí** (ringspot), které se vyznačují kruhem odumřelých buněk s nekrotickým centrem, mezi kterými je pás neporušených buněk.

Pro některé virózy je typický vznik **listových malformací** jako svinutka listů, úzkolistost nebo kadeřavost a drsnost listů a vrásčitost kmene. Některé viry vyvolávají charakteristické příznaky virové infekce, pomocí kterých můžeme určit původce (virus výrůstkové mozaiky hrachu – výrůstky na spodní straně listů hrachu, virus svinutky bramboru – svinování a nezvyklá tuhost listů bramboru).

Často je systémová infekce rostliny doprovázena zpomalením růstu rostliny, čímž je oslabena její vitalita a vzniká **zakrslost**.

Obdobně jako u živočišných virů příznaky choroby mohou být **makroskopické** (vzhled rostliny, vizuální symptomy), **histologické** (změny v pletivech) a **cytologické** (změny na úrovni buňky). Vlivem virové infekce mohou buňky zvětšit nebo zmenšit svůj objem, může se snížit nebo zvýšit počet buněk, může být zpomalen nebo urychlen jejich dělení nebo jejich proliferace se urychlí. Může dojít i k nekrotizaci floému. Některé viry vyvolávají v cytoplazmě nebo jádře tvorbu amorfních, granulárních nebo krystalických **inkluzí**. Tyto inkluze jsou tvořeny shluky virových částic anebo virových proteinů. Pro určité skupiny virů je vznik inkluzí a jejich typ vysoce charakteristický a má tedy vysokou diagnostickou hodnotu. Inkluze mohou být pozorovatelné po obarvení i ve světelném mikroskopu. Příkladem specifických inkluzí jsou například vějířovité 'pinwhells' inkluze v buňkách napadených potyviry.

Směsné infekce dvěma nebo více viry jsou u rostlin zcela běžné. Jejich výsledkem může být zesílení efektu virové infekce (synergismus) nebo její oslabení (antagonismus). Ve většině případů se jedná o **interkaci nepřímou**, zprostředkovanou hostitelem. Příkladem synergismu může být směsná infekce rajčat virem mozaiky rajčete (*Tomato mosaic virus*) a X virem bramboru (*Potato virus X*), kdy dochází k vývoji velmi silných příznaků infekce, a tím i k výraznému

snížení výnosu. Infekce jednotlivými viry je potom velmi málo patogenní. **Přímá interakce**⁴⁰ mezi viry je méně častá a relativně méně prostudovaná. Pravděpodobně se podílí na jevu křížové ochrany⁴¹ (cross-protection). Rostlina systémově infikovaná jedním kmenem viru se stává odolnou k pozdějším infekcím jinými kmeny téhož viru, včetně vysoce virulentních kmenů.

Je nutné upozornit, že přehled projevů virové infekce je pouze rámcový a obdobné příznaky mohou být vyvolány celou řadou biotických i abiotických faktorů. Příznaky podobné virózám může vyvolat infekce jednoduchými intrabuněčnými bakteriemi, jako jsou fytoplazmy, spiroplazmy a rickettsie, ale i toxiny produkované některými členovci. Řada změn bývá vyvolána v důsledku genetických změn, poruch výživy a metabolismu, vysokou teplotou, herbicidy a jedovatými emisemi.

Některé rostlinné viry označujeme jako „**latentní**“. Tyto obvykle nevyvolávají příznaky infekce, ale u některých hostitelů nebo ve směsných infekcích mohou mít ekonomický význam. V posledních letech byly popsány i tzv. **kryptické** viry, které nezpůsobují vizuální příznaky infekce.

Příklady symptomů virové infekce rostlin:

Diskolorace květů	<i>Tulip breaking virus</i> (tulipány)
Zakrslost	<i>Barley yellow dwarf virus</i> (ječmen)
Chlorotická mozaika	<i>Tobacco mosaic virus</i> (<i>Nicotina tabacum</i>) Zucchini yellows mosaic virus (cukety, okurky)
Červenání listů	<i>Carrot red leaf virus</i> (mrkev, petržel)
Lemování žilek	<i>Cauliflower mosaic virus</i> (zelí)
Bronzovitost	<i>Tomato spotted wilt virus</i> (rajče)
Nekrózy, odumírání	<i>Ban common necrosis mosaic virus</i> (fazol obecný)
Lokální nekrotické leze	<i>Bean common mosaic virus</i> (fazol obecný)

⁴⁰ Heterologní enkapsidace (phenotyping mixing) – částečná výměna kapsomer mezi kmeny viru nebo úzce příbuznými viry. Výsledkem může být zamezení přenosu vektory.

⁴¹ Mechanismus křížové ochrany není přesně znám. Předpokládá se platnost více modelů. Mezi všeobecně přijímané teorie patří myšlenka, že plášťový protein ochranného kmene brání rozbalení nukleoproteinu nového pronikajícího viru. Je rovněž možné, že je to právě interakce nukleových kyselin ochranného a virulentního kmene.

4.6.2.3 Průběh choroby

Infekce rostliny je obvykle nejdříve spojena se změnami buněčného metabolismu. Po iniciační fázi infekce, kdy dochází k postupnému vývoji lokálních příznaků v místě inokulace, může dojít k šíření viru do systému rostliny. Následuje akutní fáze, která je charakteristická rychlou reprodukcí viru a jeho šířením v rostlině, postupně však dochází ke snížení koncentrace viru a jejímu ustálení na nižší hladině. V některých případech, a to i vlivem vnějších podmínek (např. vysoké teploty), může dojít k vymizení příznaků a snížení koncentrace viru v pletivech až na/pod mez detekovatelnosti. Tento stav není obvykle trvalý, v určitých intervalech může docházet k rozvoji příznaků. Virózy s cyklickým průběhem mohou vyvolat zástupci r. *Nepovirus* nebo *Tomato spotted wilt virus*. Jiným příkladem je vymizení příznaků a snížení koncentrace viru v pletivech dřevin, zejména ovocných stromů, v horkých letních měsících nebo ve skleníku. Jen výjimečně byly popsány případy úplného ozdravení rostlin, například u viru mozaiky okurky (*Cucumber mosaic virus*) nebo viru mozaiky vojtěšky (*Alfalfa mosaic virus*).

Podle reakce rostliny na inokulaci virem rozlišujeme následující interakce:

- **Nehostitelský vztah**

Nehostitelský vztah se zakládá na nepřítomnosti geneticky podmíněných faktorů interakce, které vedou k infekci rostliny. V takovém případě nikdy nebyla pozorována přirozená infekce rostliny daným virem a neúspěšné byly i experimentální inokulace. Hypoteticky rostlina nenese geny nezbytné pro navození primární interakce s daným virem, a tedy ani mutace a přirozená hybridizace nemůže tento stav změnit.

- **Imunita⁴²**

Virus se v imunních rostlinách nemnoží, nevznikají příznaky virové infekce a přítomnost viru není možné dokázat žádnou dosud známou metodou. Hypoteticky může dojít k primární interakci s napadenou buňkou, ale reprodukční cyklus viru není dokončen a virus se v rostlině nešíří. Taková rostlina není hostitelem viru. Přestože mechanismus takovéto odolnosti není přesně prostudován, předpokládá

⁴² Je-li rostlina opakovaně inokulována správným způsobem infekčním agens, buď dojde k infekci, nebo ne. Když opakovaná inokulace nevyvolá infekci, označuje se hostitel jako imunní. **Imunita** je stav, který u rostlin vylučuje vznik infekce (nedochází k reprodukci a šíření viru v rostlině).

se, že imunita je navozena absencí 'faktorů vnímavosti', přítomností 'pozitivních inhibitorů' reprodukce viru a v některých případech se nevylučuje bariéra virové infekci zabráňující šíření mezi buňkami. Jinými slovy můžeme říci, že v imunních rostlinách fungují faktory rezistence na 100 %.

- **Rezistence**⁴³

Rezistentní rostlina je sice hostitelem viru, ale na různých úrovních se brání vstupu virové infekce do rostliny, jeho rozmnožení a šíření po rostlině. Rezistentní rostliny nemohou být zdrojem viru pro další šíření. Obvykle se hovoří o rezistenci kultivarů spojenou s existencí genů resistance. Typickým příkladem je rezistence hrachu vůči viru mozaiky hrachu přenosného semenem (*Pea seed-borne mosaic virus*), která je podmíněna recesivní alelou *sbm1*, kdy recesivní homozygot je rezistentní, heterozygot a dominantní homozygot vnímavý.

- **Tolerance**

Tolerance není formou rezistence. Tolerantní genotypy jsou vnímavé k virové infekci, virus se v nich pomnožuje podobně jako ve vnímavých rostlinách, ale nevyvolává snížení kvality produkce a výnosů. Pěstování tolerantních odrůd se doporučuje v případech, kdy nemáme v zamořených oblastech k dispozici kvalitní rezistentní odrůdy. Riziko pěstování tolerantních odrůd spočívá ve skutečnosti, že jsou významným zdrojem pro další šíření virů.

- **Vnímavost**⁴⁴

Virus se ve vnímavých rostlinách snadno a rychle množí, indukuje tvorbu charakteristických příznaků. Infikované kulturní rostliny mají obvykle silně redukovanou užitkovou hodnotu.

- **Hypersenzitivita**

Hypersenzitivita (přecitlivělost) představuje extrémní vnímavost (citlivost) na infekci daných virovým druhem nebo kmenem. Jedná se rychlou a prudkou reakci

⁴³ Pojmy rezistence a náchylnost charakterizují neschopnost či schopnost hostitelské rostliny potlačit reprodukci a šíření viru. **Rezistence** (odolnost) je schopnost hostitele potlačit nebo oddálit aktivitu patogenního agens.

⁴⁴ **Citlivost** (senzitivita) je neschopnost infikovaného hostitele snášet činnost patogenního agens bez více nebo méně silné reakce, což vyústí ve vznik různě silných symptomů a poškození. Naproti tomu **náchylnost** je neschopnost hostitele se bránit invazi patogenního agens, případně neschopnost překonat její následky.

hostitele na infekci, která vyústí v okamžité odumření infikovaných buněk a v některých případech i celé rostliny, čímž se zpravidla zabrání dalšímu šíření patogena. Hypersenzitivita je podmíněna geneticky.

Průběh a výsledek interakce virus - hostitel závisí primárně na genetickém vybavení hostitele a patogena. Důležitým znakem, jímž se choroby rostlin odlišují od chorob živočichů, je lokalizovaná reakce na infekci. Na rozdíl od živočichů nedisponují rostliny centrálním mechanismem rozpoznání a eliminování patogenních mikroorganismů. Odezva rostliny na patogena je určována reakcemi několika buněk bezprostředně po kontaktu obou organismů. Poslední výzkumy však nevylučují možnost předávat signál vyvolávající „odolnost“ rostliny na větší vzdálenost (např. System Acquired Resistance - SAR).

4.6.2.4 *Protivirová obrana rostlin*

Rostliny využívají ke své obraně před virovou infekcí následující mechanismy:

- obranné reakce spojené s odpovědí na biotický a abiotický stres,
- geneticky podmíněnou rezistenci,
- genové umlčování, RNA interferenci.

Pro šíření viru je důležitá i genetická výbava hostitele. Rostliny nemají imunitní systém, podobný živočišnému, ale mají k dispozici mechanismy, kterými rostlina reaguje na nepříznivé podmínky – biotický a abiotický stres, a tedy i infekci virem. Je známa celá řada proteinů – enzymů, které se po infekci virem objevují v buňkách nebo se zvyšuje jejich aktivita. Jedná se například o peroxidázy, polyfenoloxidázy a ribonukleázy. Vedle hypersenzitivní reakce zabraňující šíření virové infekce z místa primární inokulace, byly v posledních letech objeveny mechanismy rezistence nebo lépe řečeno prevence reprodukce a šíření viru v rostlině, které jsou vyvolány virovou reakcí (např. SAR, získaná systémová rezistence). Ukazuje se, že významnou roli v nespecifické protivirové obraně rostlin hraje produkce a odbourávání reaktivních forem kyslíku (H_2O_2 , O_2 , $OH^\cdot$), kysličníku dusného (NO), signální dráhy kyseliny salicylové, kyseliny jasmonové, etylénu a sperminu. Na těchto procesech se podílejí i PR proteiny (pathogenesis related proteins) jako β -1,3-glukanáza a chitináza, které byly objeveny při studiu hypersenzitivní reakce rostlin na virovou infekci.

V posledních letech je velká pozornost věnována studiu '**RNA-silencing**' mechanismům obrany rostlin vůči virové infekci. Jak již bylo řečeno výše, rostliny na rozdíl od živočichů nemají vyvinutý imunitní systém. Současné poznatky ale potvrdily, že rostliny využívají k obraně vůči virům sekvenčně specifický mechanismus degradace mRNA (RNA-silencing/umlčování). Tento mechanismus označovaný jako posttranskripční genové umlčování (PTGS, Post-Transcriptional Gene Silencing) je buňkou využíván ke kontrole genové exprese u široké škály organismů. Zároveň je RNA-umlčování považováno za jeden z nejúčinnějších přirozených mechanismů obrany rostlin vůči akumulaci virů. Proces je iniciován dvouvláknovými RNA molekulami, které jsou produkovány v průběhu virové replikace. Tyto dsRNA jsou rozeznány rostlinou jako 'cizí' a následně jsou štípány rostlinou kódovanými 'Dicer-like' enzymy za vzniku siRNA⁴⁵ molekul o délce 21-25 nukleotidů. Vzniklé siRNA pak vyvolávají sekvenčně specifickou RNA degradaci pomocí siRNA-indukovaného umlčovacího komplexu (RISC), který zničí nežádoucí RNA. U řady rostlinných virových druhů však byly popsány supresory genového umlčování, které umožňují produktivní infekci hostitele.

4.6.2.5 Ozdravování rostlin

Viry vyvolávají celou řadu hospodářsky významných chorob kulturních plodin. Omezení jejich negativního působení je spojeno s řadou agrotechnických a epidemiologických opatření. Výchozím bodem je ve všech případech **bezvirózní pěstitelský materiál**, který se rozmnožuje podle schválených schémat výroby certifikované sadby. K množení je ideální použít imunní nebo rezistentní odrůdy. Protože však nejsou u řady plodin k dispozici, k namnožení sadbového materiálu se využívají bezvirózní rostliny, které je možné získat výběrem nebo ozdravením. Běžným postupem ozdravení rostlin je kombinace termoterapie nebo chemoterapie a meristémové kultury.

Během **termoterapie** jsou rostliny vystaveny zvýšené teplotě 35 – 40 °C po dobu několika týdnů. V případě „termolabilních“ virů dochází ke snížení jejich koncentrace v meristémech, které jsou bezprostředně po ukončení termoterapie izolovány (0,1 až 0,5 mm) a jsou z nich v podmínkách *in vitro* dopěstovány celé

⁴⁵ siRNA – short interfering RNA (krátké interferující RNA).

intaktní rostliny. Po ověření jejich viru prostého stavu (virus free) pomocí biologických a laboratorních testů jsou získané bezvirózní rostliny použity jako matečné pro množení a výrobu sadbových materiálů. V určitých případech se ukazuje jako účelné nahradit termoterapii chemoterapií, kdy jsou rostliny nebo jejich části vystaveny působení antivirovým látkám, např. ribavirinu.

5 EKOLOGIE VIRŮ

Viry způsobují škody zemědělcům, významně ovlivňují zdravotní stav lidské populace, ale jsou i nedílnou součástí 'nedotknuté' přírody. Studium virů v přírodě i laboratoři vede k získání řady informací o jejich výskytu a interakcích s okolním prostředím, tj. jejich ekologií. Ekosystém virů však není reprezentován pouze výše uvedenými vztahy, ale zahrnuje i prostor a čas, ve kterých jednotlivé faktory působí a mění se.

Termín "ekologie virů" nemůžeme zúžit na pouhou interakci mezi virem a jeho bezprostředním životním prostředím, tj. buňkou. Tuto interakci obvykle chápeme na úrovni vícebuněčných organismů a jejich populací. Je zcela správné pod tento pojem zahrnout vztahy virů, hostitelských organismů, vektorů až na úrovni jejich populací, které rozhodují o šíření a cirkulaci virů v ekosystémech.

Ekologie virů se zabývá vztahy mezi virem, hostitelem a okolním prostředím.

Studium ekologie virů zahrnuje i sledování vztahů hostitelských organismů, protože mají velký význam pro dynamiku virové nákazy, její rozšiřování a cirkulaci⁴⁶. Příkladem viru s jednoduchou cirkulací je virus dětské obrny, který se přenáší přímo z infikované osoby na zdravou. Jeho hostitelem je pouze člověk a k přenosu není potřebný vektor. Složitější může být udržování virů v ekosystému vyznačujících se širokým spektrem různých hostitelů. U rostlinných virů se jedná především o udržování virové infekce ve vytrvalých rostlinách a rychlé šíření v populaci jednoletých rostlin. Významu zde nabývá způsob přenosu virů (např. mšicemi, semeny, zoosporami hub). U živočišných virů se může jednat o vztah mezi dlouhověkými hostiteli (např. kopytníci) a krátkověkými (např. hlodavci). Jedním z nejkomplicovanějších ekologických vztahů představují arboviry⁴⁷. Arboviry vyžadují v přírodě střídavé rozmnožování v členovcích sajících krev (komáři, klíšťata), kteří plní i funkci vektorů, a v teplokrevných obratlovcích (drobní hlodavci).

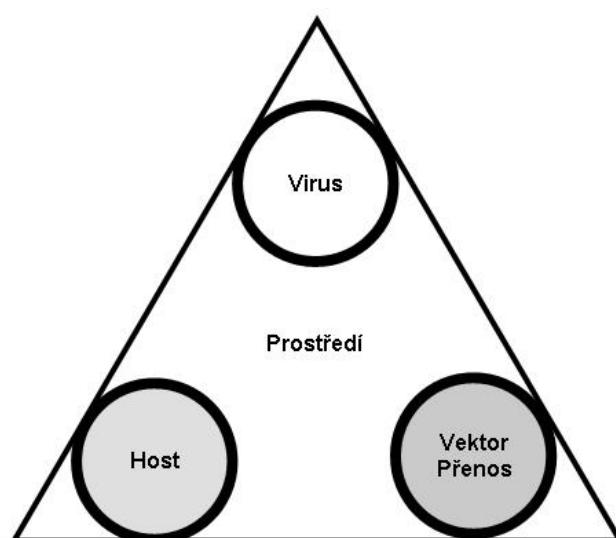
⁴⁶ Cirkulace představuje uzavřený okruh přenosů.

⁴⁷ Taxonomicky nesourodá skupina živočišných virů přenášených členovci, ve kterých se i rozmnožují (ARthropod BORne VIRUSes).

5.1 Epidemiologie virových infekcí

V užším slova smyslu je ekologie virů a virových infekcí chápána jako jejich epidemiologie. Epidemiologie (virových chorob) se zabývá příčinami, rozšířením a frekvencí výskytu virových chorob. Stručně řečeno, studuje interakci mezi virem (virovou populací) a populací hostitele. V poslední době se řada autorů přiklání k názoru, že epidemiologie se zabývá kvantitativními faktory interakce virus – hostitelská populace.

Obr. 9 Schematické znázornění faktorů ovlivňujících epidemiologii virových nákaz



Pojem **epidemiologie** je odvozen z řečtiny a znamená 'ovlivňující-trápící lidi'. Tento pojem je primárně spojen s humánní virologií. V současnosti se používá i ve veterinární a rostlinné virologii. Analogickým termínem užívaným při studiu interakce viru a společenstev živočichů je **epizootologie**.

Základem pro naplnění cílů epidemiologie je získání poznatků o časo-prostorových změnách ve výskytu virových chorob a jejich původců.

Epidemiologické studie se zaměřují na:

- cílené monitorování konkrétní situace, diagnostika,
- předpověď epidemiologické situace (vytváření matematických modelů),
- zavedení nových, vylepšených nebo modifikovaných kontrolních opatření.

Způsob, kterým viry a ostatní paraziti ovlivňují společenstva hostitelů, neustále posouvá rovnováhu mezi virem a hostitelem. Během evoluce tento boj vedl ke vzniku řady mechanismů ataku a obrany, které zabezpečují přežití jak virů, tak hostitelů. Výsledkem je konkrétní projev interakce virus – hostitel na úrovni populací.

Přehled a charakteristika hlavních epidemiologických faktorů:

- **Virus**

Biologická charakteristika viru, patogenita/virulence, způsob přenosu (šíření) a hostitelská specifita hlavní měrou ovlivňují (určují) charakter interakce virus – hostitel, a tedy i úroveň (hladinu) poškození populace hostitelů a návazných interakcí v daném ekosystému. Velký význam pro překonání genetických a fyziologických bariér má vysoká přirozená variabilita virů.

- **Hostitel**

Existence vnímavého hostitele je druhou určující podmínkou existence virové populace v ekosystému. Druhy vyznačující se vysokou přirozenou genetickou variabilitou jsou schopné vytvořit v interakci s virem rovnovážný stav, který se nevyznačuje fatálním dopadem virové infekce na populaci hostitele. Posun od genetické variability ke genetické homogenitě hostitelských populací (kulturní plodiny, plemena živočichů) a systémy pěstování ve velkoplošných monokulturách nebo velkochovy významně snižují odolnost hostitelské populace vůči virům. Podobnou situaci můžeme pozorovat i v lidské populaci, kde se uplatňují faktory jako věková a pohlavní struktura populace, genetické faktory a imunita populace, příslušnost k etnické skupině, ale i výživa, zaměstnání a ekonomická úroveň.

Velkou roli pro navození epidemiologické situace hraje **infekčnost**. Jedná se je stav infikovaného organismu, během kterého mohou být ze zdroje infikování další jedinci. Infekční stav ovlivňuje množství vylučovaného viru, délka období, po které se virus vylučuje, stabilita viru vůči podmínkám prostředí, cesta, kterou se virus vylučuje a výskyt (klinických) projevů choroby. Rostliny aktivně viry nevylučují na rozdíl od živočichů včetně člověka. Lidské viry jsou vylučovány kůží, sliznicemi, hleny a mukózními sekrety, krví, slinami, stolicí a močí.

- **Přenos/šíření viru**

Pro efektivní šíření viru je nezbytná **populace efektivního vektora**. Přenos usnadňuje struktura hostitelské populace (monokultury, velkochovy, dopravní prostředky). Významnou roli hraje globalizace (internacionalizací) ekonomiky umožňující přemísťování infikovaného materiálu, tj. zdrojů infekce, na dlouhé vzdálenosti mezi regiony nebo i kontinenty. Významným zdrojem infekce mohou být i genové sbírky a pěstitelský nebo chovatelský materiál, který je často bez kontroly převážen nebo zasílán na velké vzdálenosti. Podobné faktory působí i přímo v lidské populaci (např. cestování na velkou vzdálenost, nahromadění lidí v dopravních prostředcích nebo školách).

Důležitý je **přenos viru z infikovaného hostitele na zdravého**. U rostlin se viry šíří vegetativními částmi rostlin, hmyzími vektory, hádčátky, pylem, semeny, parazitickou rostlinou kokoticí, zoosporami hub. U lidských virů je významný přenos přímým kontaktem, aerosoly (kapénkové infekce), pokousáním, vektorem, pohlavním stykem, fekal-orální cestou, kontaminovanou potravou, vodou, alimentárně, transfúzí, transplantací a z matky na plod.

- **Faktory prostředí**

Klimatické podmínky (teplota, světlo ap.) mohou ovlivnit predispozici hostitele k virové infekci, především pak modulují průběh choroby (např. rychlost rozvoje choroby, klinické příznaky, symptomy). Naše klimatické podmínky významně ovlivňují sezónní výskyt hostitelů a vektorů. V lidské populaci má význam geografická lokalizace, socio-ekonomická úroveň společnosti, hygiena, osídlení. Jinak se bude virová infekce šířit ve městě a na vesnici.

Epidemiologická pozorování jsou nezbytná pro **prognózu zdravotního stavu** populace a uskutečnění a vyhodnocení regulačních opatření. Pečlivá klinická pozorování vedoucí k přesnému popisu jednotlivých případů umožňují posoudit epidemiologickou situaci. Terénní pozorování jsou v současnosti nahrazovány laboratorními testy. Příkladem je sérologický průzkum lidské populace, který na základě přítomnosti specifických protilátek v krevním séru umožňuje získat představu o výskytu virů v dané oblasti a umožňuje předpovídat odolnost populace

vůči virové chorobě. Epidemiologické informace musí být sbírány a porovnávány na místní, národní i mezinárodní úrovni.

Mimořádný význam má tzv. **molekulární epidemiologie**, která studuje mutační změny, často významné pro vznik epidemie. Nejlepším příkladem je virus chřipky A, který svojí proměnlivostí obchází přirozenou imunitu populace a významně omezuje použití již vyvinutých vakcín.

Epidemiologie využívá k popisu situace odborné termíny, z nichž nejdůležitější jsou uvedeny níže.

- **Prevalence** je počet případů choroby zaznamenaný k určitému datu na 100 tisíc obyvatel.
- **Incidence** je počet případů choroby zaznamenaný v určené populaci během dané časové periody, obvykle jeden rok vyjádřený na 100 tisíc obyvatel.
- **Mortalita** je úmrtnost za určitou chorobu v určité oblasti přepočtená na 100 tisíc obyvatel a rok.
- **Letalita** je smrtnost vyjádřená procentem zemřelých na určitou chorobu z celkového počtu nemocných.
- **Endemický výskyt** – choroba se přirozeně a dlouhodobě vyskytuje na určitém místě, a to na průkazné úrovni.
- **Epidemie** je neobvyklé zvýšení počtu případů ve společnosti (komunitě)⁴⁸. Hromadné rozšíření nakažlivé nemoci.
- **Pandemie** je epidemie rozšířená na několik kontinentů v témže čase.

5.2 Přírodní ohniska nákaz

Přírodní ohnisko nákazy definujeme jako místo, kde původce choroby, jeho specifický vektor a zvířata (rezervoáry původce choroby) existují neomezeně dlouhý čas v přírodních podmínkách nezávisle na člověku. Existence přírodního ohniska nákazy závisí na vzájemných vztazích v rámci biocenózy, a to především na těch, které zabezpečují nepřetržitou cirkulaci choroby v ohnisku. Nejdůležitější jsou trofické vztahy, které zabezpečují neustálý přenos viru.

⁴⁸ Zvýšení počtu výskytu choroby je relativní; například 100 případů spalniček v Praze není epidemií, na druhé straně 100 případů Lassa horečky je epidemií.

Typickým příkladem virů, jejichž přítomnost v přírodě je spojena s existencí přírodních ohnisek nákazy, jsou **arboviry**. Arboviry střídají specifické vektory a specifické hostitele, kteří se vyznačují vyhraněným (určitým) geografickým rozšířením. Dominantní úlohu pro jejich šíření má areál výskytu vektorů. Výsledkem je, že jednotlivé geografické oblasti mají své specifické arboviry. Pro arbovirové infekce je dále typické mozaikovitě rozšíření. Takové malé území nazýváme **přírodní ohnisko**. Člověk se potom může nakazit náhodně během pobytu v přírodním ohnisku; u nás například virem klíšťové encefalitidy při přísátí infekčního klíštěte (*Ixodes ricinus*).

5.3 Ochranná opatření

Realizace kontrolních a ochranných opatření proti šíření virové infekce se liší v případě rostlinných a lidských (veterinárních) viróz. Omezení negativního vlivu viróz rostlin na zemědělskou produkci je spojeno s pěstováním rezistentní kultivarů a viruprostých materiálů. Pro zamezení nebo snížení pravděpodobnosti infekce je doporučována mechanická nebo prostorová izolace, likvidace zdrojů infekce případně i redukce vektorů.

Šíření lidských virů je možné výrazně omezit správnými hygienickými návyky, nerizikovým chováním, karanténou. V důležitých případech je velice účinné zvýšení imunity populace plošnou vakcinací. Důležitou roli hraje i dozor nad nezávadností potravin, vody, krevních produktů, ale i kontrola zdrojů a vektorů (dezinfekce, deratizace).

6 PŮVOD A EVOLUCE VIRŮ

Názory na původ a evoluci virů se nemohou opřít o výsledky paleontologických studií. Neexistují žádné zkameněliny virů nebo jejich otisky. Neexistují důkazy o přítomnosti virů a jejich změnách v minulých geologických dobách. Současné názory na původ a evoluci virů se opírají o molekulárně genetické analýzy virového genomu, informace o jeho struktuře a sekvenci nukleotidů a poznatky o reprodukčních strategiích virů.

Je zřejmé, že buňky jsou vývojově starší než viry, které vznikly až na jejich základě. Svědčí o tom skutečnost, že 1) všechny prokaryotní i eukaryotní organismy mají své viry; 2) známe procesy, kterými se buňka může zbavit části své genetické informace (např. transpozóny schopné vkládat nebo vyštěpovat informaci uloženou v chromozómech); 3) mnohé viry se mohou integrovat do DNA hostitelské buňky (provirus). Existence virů je úzce spojena s hostitelskou buňkou, protože viry využívají její biosyntetický aparát. Žádný virus nenese informaci pro sestavení vlastních ribozómů ani negeneruje vlastní energii. Předchůdci prvních virů byly pravděpodobně malé segmenty nukleových kyselin, které časem získaly schopnost množit se (replikovat) nezávisle na chromozómech hostitelské buňky a postupně získaly genetickou výbavu pro syntézu vlastních proteinů umožňujících jejich reprodukci.

V současnosti jsou nejvíce diskutovány tři teorie o původu virů:

- Podle **regresivního modelu** je virus degenerovanou formou intrabuněčného parazita (mitochondrie, chloroplasty). Náhodnými mutacemi v genech, které kódují proteiny subcelulárních struktur, mohly vzniknout kapsidové proteiny. Genetický element mohl být vybaven informací pro zahájení a průběh replikace a interakce s hostitelskou buňkou. Tento model nedovoluje však vysvětlit vznik RNA virů.
- **Buněčný model** vychází z předpokladu, že viry vznikly z buněčné DNA nebo RNA, a to uvolněním segmentů nukleových kyselin během replikace, rekombinace, transpozice nebo transkripce. Model předpokládá, že DNA viry vznikly na základě DNA plazmidů, RNA viry z retrotranspozónů nebo v procesu sestřihu. Vzniklé genetické elementy musely dále získat počátek replikace, gen

pro plášťový protein nezbytný pro extracelulární existenci a v případě RNA virů i odpovídající RNA polymerázy.

- **Prebiotický RNA model** předpokládá původ virů v nezávislých auto-replikujících se molekulách, tzn. primitivního prebiotického 'RNA světa'. Tento model nejlépe vysvětluje původ viroidů a některých typů satelitních RNA, pro samotné viry však není vhodný.

Vztah mezi virem a jeho hostitelem představuje **evoluční konflikt**, v průběhu kterého se virus i hostitel snaží získat reprodukční výhody. Zdrojem genetické variability populací RNA virů jsou **bodové mutace** (delece, inserce) a u virů se segmentovaným genomem **přeskupení segmentů** (reassortment). Příčinou vysoké frekvence bodových mutací je skutečnost, že RNA polymerázy nemají reparační aktivitu, výsledkem čehož je vysoká frekvence chyb (10^{-3} až 10^{-4}). Vysoká frekvence bodových mutací má za následek vznik 'quasi-species', které představují molekulární varianty virové populace, které se mohou vyznačovat různým fitness. Typickým příkladem evoluce RNA virů s děleným genomem je **evoluce viru chřipky A**. Genom viru se skládá z osmi segmentů. Na různých segmentech jsou kódovány dva významné proteiny: hemagglutinin a neuraminidáza. Zatímco bodové mutace jsou odpovědné za malé změny v antigenních vlastnostech virionů (antigenní posun, drift), přeskupení segmentů vyvolává podstatné změny antigenních vlastností (antigenní zvrát, shift), přičemž nejvýznamnější jsou změny v kombinacích různých typů hemagglutininu a neuraminidázy. **Rekombinace** je u RNA virů méně běžná. Frekvence rekombinantů je obvykle u RNA virů nízká, protože eukaryotické buňky nemají a RNA viry nekódují enzym katalyzující účinnou RNA rekombinaci. **Zdroje variability DNA virů jsou mutace a rekombinace.**

Zjednodušené schéma evoluce viru chřipky A:

- 1874 --- (H3N8)
- 1890 --- (H2N2)
- 1902 --- (H3N2)
- **1918** --- (H1N1) 'Španělská' chřipka
- 1933 --- (H1N1)
- 1947 --- (H1N1)
- **1957** --- (H2N2) 'Asijská' chřipka
- **1968** --- (H3N2) 'Hong Kong' chřipka
- 1976 --- (H1N1) 'Prasečí' chřipka
- **1977** --- (H1N1) [+ (H3N2)] 'Ruská' chřipka
- Současnost (H1N1) + (H3N2)
 - Ptačí chřipka (H5N1)
 - Prasečí chřipka (H1N1)

7 METODY VIROLOGIE - LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA VIROVÝCH CHOROB

Metodologie virologie je velice široká a zahrnuje celé spektrum biologických, fyzikálních, chemických a v neposlední řadě genetických a molekulárně genetických metod a přístupů. Vzhledem k rozsáhlosti a variabilitě metodických přístupů budeme se v tomto učebním textu pouze stručně zabývat metodami izolace viru a jeho udržování, detekcí přítomnosti virových antigenů a detekcí virové DNA nebo RNA.

Mechanický nebo vektorový přenos na experimentální hostitele, který reaguje na virovou infekci specifickými příznaky, je základem **izolace rostlinných virů**. Smyslem izolace je získání 'jednodruhového' izolátu viru z potenciální směsi virů vyskytující se na zdrojové rostlině. K tomuto účelu můžeme využít rozdílnou hostitelskou specifitu, jednolezové izoláty (lokální chlorotické nebo nekrotické leze na inokulovaných listech jsou často vyvolány jen bodovou infekcí jedním druhem viru), rozdílný teplotní bod inaktivace nebo konečný bod ředění.

U **živočišných virů** pro izolaci využíváme primární inokulaci kuřecího zárodku, mozku laboratorní myši a rozdílné vnímavosti buněčných kultur (např. buňky z ledvin člověka, králíka, opice, lidské fibroblasty, nádorové buněčné linie). Vedle vnímavosti buněk na virovou infekci používáme k rozlišení virových izolátů projevy cytopatického efektu, hemoadsorpce, imunofluorescence, tvorbu plaků a cytocidních účinků na buněčnou kulturu.

Pro **identifikaci** izolovaných rostlinných a živočišných virů pomnožených na experimentálních hostitelích nebo hostitelských systémech, stejně jako pro jejich přímou diagnostiku, využíváme **laboratorní testy**. K nejčastěji používaným patří **sérologické testy** (hemaglutinin fixační test, komplement fixační test), **imunochemické testy** (ELISA – enzyme linked immunosorbent assay), **Western blotting**, **DNA nebo RNA hybridizace** (Southern blotting, Northern blotting), **detekce virové DNA nebo RNA** (PCR – polymerázová řetězová reakce). V případě rostlinných virů detekujeme přítomnost virové částice nebo jejích komponent přímo v pletivech rostlin nejčastěji pomocí ELISA testu (proteinová kapsida, virové proteiny) nebo PCR (virová RNA, DNA).

Analogicky můžeme postupovat i v případě **lidských virů**, kdy detekujeme a identifikujeme virus v buněčné kultuře, kuřecím zárodku nebo v odebraných vzorcích přímo nebo po izolaci na buněčné kultuře (likvor; nosohltanový, vaginální, rektální výtěr; krev, stolice, moč, sputum; biopsie jater, lymfatických uzlin atd.). U obratlovců včetně člověka můžeme pro diagnostiku původce choroby využít také detekce specifických protilátek vytvořených v souvislosti s virovou infekcí. Vedle ELISA testu je možné použít Western blotting a sérologické testy. Výhodou detekce protilátek v krevním séru je použití univerzálního vzorku, jednotný metodický postup (ELISA) a na základě analýzy skladby a koncentrace protilátek (IgG, IgM, IgA) můžeme usoudit i na průběh nemoci.

Virologický výzkum i diagnostika vyžaduje dlouhodobé udržování a skladování izolátů virů. Izoláty bakteriofágů skladujeme po delší dobu ve formě fágového lyzátu nebo purifikované virové suspenze, temperované fágy ve formě infikované bakteriální suspenze, zamražené na -20 °C a -80 °C. Viry rostlin skladujeme nejčastěji jako vysušené infikované listy (lyofilizace, silikagel, CaCl₂) při -20 °C nebo -80 °C. Živočišné viry uchováváme ve formě infikované buněčné nebo tkáňové kultury nebo jako purifikovaný virus zamražené v -80 °C.

8 VIRY A NÁDORY

Již v roce 1911 došel **P. Rouse** k závěru, že slepičí zhoubný nádor je vyvolán přenosným agens menším než jsou bakterie. Jednoznačný experimentální důkaz, že viry mohou vyvolat nádorové bujení podali v roce 1963 **M. Fogt** a **R. Dulbecco**, kteří *in vitro* pomocí viru transformovali normální buňku na nádorovou. O tři roky později byla formulována hypotéza o existenci a působení onkogenů⁴⁹ a první onkogen byl objeven v roce 1976 (D. Stehelin, H.E.Varmus, J.M.Bishop a P.K. Vogt).

Jako nádorové označujeme buňky, které se trvale a nekoordinovaně množí, protože se vymanily z kontrolních mechanismů, jež regulují jejich růst a diferenciaci. Schopnost vyvolat nádorové bujení nezískává buňka najednou, ale v důsledku postupných genetických změn. Rovněž viry se na vzniku zhoubných nádorů nepodílejí izolovaně, ale v součinnosti s dalšími genetickými změnami buněk, které mají jiný než virový původ. Primární faktory, které se podílejí na transformaci buňky označujeme jako **kancerogeny** (karcinogeny), které mohou být chemické, fyzikální nebo virové.

Na základě původu a funkce rozlišujeme onkogeny DNA a RNA virů. **OnkoDNA viry** nesou **onkogeny virového původu**. Jejich produkty jsou nezbytné pro reprodukci viru, která obvykle vede ke smrti buňky. Z toho vyplývá, že transformována může být pouze buňka, ve které se virus efektivně nereprodukuje. K transformaci buňky není potřebný celý virový genom, ale pouze jeho část kódující onkoprotein. Segment nesoucí onkogen může nebo nemusí být zabudován do genomu hostitelské buňky. Příkladem jsou nádory kůže a sliznic vyvolané zástupci *Papillomaviridae*, karcinom nosohltanu (*Epstein-Barr virus*) nebo nádory jater (*Hepatitis B virus*).

Onkogeny onkoRNA virů odpovědné za transformaci buněk byly **odcizeny** hostitelským organismům. Často se jedná o modifikované buněčné protonkogeny. Produkty těchto onkogenů se nepodílejí na množení (reprodukci) viru a replikace

⁴⁹ Onkogeny jsou geny, které kódují proteiny regulující buněčný růst a diferenciaci buňky, a jejich poruchy vedou ke ztrátě růstové kontroly a transformaci buňky normální v buňku nádorovou.

viru je obvykle kompatibilní s životností buňky. K typickým charakteristikám onkoRNAvirů patří reverzní transkripce virové RNA a integrace virové cDNA do hostitelského chromozómu, exprese integrované cDNA a případné odcizení a přenos buněčných onkogenů (např. transdukci). Virová cDNA integrovaná do genomu hostitelské buňky může vyvolat tvorbu nádoru nejen vnesením onkogenu, ale i aktivací exprese buněčného onkogenu svým promotorem nebo 'enhancerem'. Příkladem onkogenních RNA virů jsou retroviry (*Rous sarcoma virus*, leukemické retroviry).

9 VIROIDY

Viroidy byly objeveny v USA **T.O. Dienerem** a **W.B Raymerem** v roce 1967. Jedná se o **nejmenší patogeny rostlin** představované pouze jednovláknovou kruhovou nebo lineární molekulou RNA. Velikost jejich genomu je 246 – 375 nukleotidů. Částice viroidů jsou neobalené a jejich nukleová kyselina nekóduje žádný protein. Viroidy se replikují v jádře (*Pospiviroidae*) nebo v chloroplastech (*Avsunviroidae*). K syntéze komplementárních RNA vláken využívají jaderné RNA polymerázy II a jaderným genomem kódované chloroplastové RNA polymerázy. Některé z viroidů jsou patogenní, jiné se replikují bez vyvolání příznaků. Viroidy se šíří vegetativně, většina je přenosná mechanicky. Přenášejí se i semenem nebo pylem. Vektory se nepřenáší. Na rozdíl od satelitních virů a satelitních nukleových kyselin nepotřebují pro svou reprodukci a rozšiřování pomocný virus.

Příklady viroidů:

Potato spindle tuber viroid (PSTVd)

Chrysanthemum stunt viroid (CSVd)

Hop stunt viroid (HSVd)

Hop latent viroid (HLVd)

Coconut cadang-cadang viroid (CCCVd)

10 SATELITNÍ VIRY

Satelitní viry jsou **malé jednovláknové ikosohedrické RNA viry** (o velikosti 500 – 2 000 nukleotidů), které se vyskytují a jsou schopné životních projevů pouze v asociaci s **pomocnými viry** (helper virus). Jejich genom se neliší od genomu pomocného viru. Kódují pouze obalové proteiny a jejich replikace musí být zabezpečena kooperací s pomocným virem. K nejdůležitějším enzymům sdíleným s pomocným virem patří replikázy. Satelitní viry samy o sobě nejsou infekční. Většinou zeslabují příznaky infekce pomocným virem.

Příklady satelitních virů a jejich pomocných virů:

Tobacco necrosis satellite virus

Tobacco necrosis virus

Chronic bee-paralysis satellite virus

Chronic bee-paralysis virus

11 SATELITNÍ NUKLEOVÉ KYSELINY

Satelitní nukleové kyseliny jsou subvirové částice, kterým chybí geny kódující proteiny. Satelitní nukleové kyseliny jsou malé jednovláknové (lineární nebo kruhové) nebo dvouvláknové RNA a jednovláknové DNA o velikosti cca 500 - 2000 nukleotidů, které se vyskytují a jsou schopné životních projevů pouze v asociaci s pomocnými viry a ke svému přenosu využívají kapsidu pomocného viru. Satelitní nukleové kyseliny se vyznačují nukleotidovými sekvencemi značně odlišnými od genomu hostitelské buňky i pomocného viru.

Příklady satelitních DNA a RNA:

Tomato leaf curl virus satellite (ssDNA)

Saccharomyces cerevisiae M virus satellite (dsRNA)

Arabidopsis mosaic virus large satellite RNA (lineární ssRNA)

Cucumber mosaic virus satellite RNA (lineární ssRNA)

Tobacco ringspot virus satellite RNA (kruhová ssRNA)

12 PRIONY

Priony byly původně označovány jako 'nekonvenční viry'. Tyto částice se na rozdíl od virů ukázaly jako **velice odolné** teplotě, proteázám, UV záření a běžným dezinfekčním prostředkům. Přes veškeré snahy se dále v preparátech tzv. 'nekonvenčních virů' nepodařilo prokázat nukleovou kyselinu. První případy spongiformních encefalopatií vedoucích k demenci a smrti byly zaznamenány u ovcí v 17. století. Jednalo se o infekční smrtelnou chorobu nazvanou 'scrapie', pro kterou byla charakteristická 2 až 3 roky dlouhá inkubační doba, po které následovala podrážděnost, ztráta koordinace a smrt. První případy neurodegenerativních chorob u lidí zaznamenali na počátku 20. let minulého století rakouský neurolog **A.M. Jakob** a Němec **H.G. Creutzfeld**. Podle nich byla nemoc označena jako Jakob-Creutzfeldova choroba. Po druhé světové válce byla na Nové Guineji objevena choroba 'kuru', později spojována s rituálním kanibalismem. V 80. letech minulého století byla v Anglii zaznamenána epidemie spongiformní encefalopatie skotu. Intenzivní výzkumy vedly k objevu prionů – infekčních proteinových částic. Velkou roli při studiu prionů sehrál syrský křeček, který se vyznačuje inkubační dobou pouhých 70 dnů ve srovnání s laboratorní myší, u které je inkubační doba 1 rok. Patogenní prion vzniká v infikovaných buňkách z buněčného prionové proteinu, který se vyskytuje jako přirozený protein v řadě buněk včetně neuronů. Funkce nativního prionového proteinu není zcela objasněna a předpokládá se, že se podílí na ukládání informací do paměti, a je možné, že se podílí i na funkci tzv. biologických hodin.

K vlastní infekci dochází alimentárně kontaminovanou potravou. Patogenní prion zůstává infekční v kontaminované potravě a půdě řadu let. V trávicím traktu prion odolá nízkému pH i enzymům, ve střevu je zachycen buňkami sliznice a pronikne do mizních uzlin a odtud přes folikulární dendritické buňky do nervových zakončení bloudivého nervu a následně se šíří do míchy a mozku. V infikované nervové buňce působí patogenní prion jako matrice pro změnu konformace prionového proteinu. Priony se množí 'řetězovou reakcí'. Patogenní protein je pro buňku toxický a jeho molekuly se shlukují za tvorby amyloidních plaků. Výsledkem jsou poruchy ve fungování neuronů. K projevům prionových chorob patří tvorba

amyloidních plaků. Spongiformní degenerace nervové tkáně s pojena s úbytkem neuronů, následuje vyčerpanost, demence, poruchy koordinace a smrt.

Jak již bylo uvedeno, patogenní prion je velice odolný protein, který není v buňce degradován proteazomem. Je vysoce odolný teplotě, je inaktivován až po 10 minutách vystavení 600 °C nebo po nejméně 20 minutách autoklávování (134 °C, 3 bary). Není inaktivován běžnými dezinfekčními činidly (formaldehyd, líh, peroxid vodíku, lyzol). Může být zničen působením koncentrovaného louhu.

Testy na priony jsou založeny na detekci prionů nedegradovaných proteázami protilátkou proti prionovému proteinu, na histologickém vyšetření mozku a na biologických testech.

V posledních letech byly zaznamenány spongiformní encefalopatie, které nebyly vyvolány infekcí patogenním prionem, nýbrž mutací prionového proteinu.

Příklady prionových chorob:

BSE prion - Bovine spongiform encephalopathy

Scrapie prion - scrapie

CJD prion - Creutzfeldt-Jakob disease

Kuru prion – kuru

13 DOPORUČENÁ STUDIJNÍ A DOPLŇUJÍCÍ LITERATURA

- Bednář, M., Fraňková, V., Schindler, J., Souček, A., Vávra, J.: Lékařská mikrobiologie. Marvil (Praha), 1996.
- Bos, L.: Plant viruses, unique and intriguing pathogens - a textbook of plant virology. Backhuys Publishers Leiden, 1999.
- Cann, A.J.: Principles of Molecular Virology (3rd Edition). Elsevier Academic Press (London), 2001.
- Daneš, L.: Přírodně ohniskové nákazy. Karolinum (Praha), 2003.
- Flint, S.J., Enquist, L.W., Racaniello, V.R., Skalka, A.M.: Principles of virology (2nd Edition). ASM Press (Washington, D.C.), 2004.
- Hill, S.A.: Methods in plant virology. Blackwell Scientific Publications (London), 1984.
- Loebenstein, G., Carr, J.P.: Natural resistance mechanisms of plants to viruses. Springer, 2006.
- Rajčáni, J., Čiampor, F.: Lekárska virológia. Veda (Bratislava), 2006.
- Votava, M., Černohorská, L., Heroldová, M., Holá, V., Kejzlíková, L., Ondrovčík, P., Růžicka, F., Dvořáčková, M., Woznicová, V., Zahradníček, O.: Lékařská mikrobiologie speciální. Neptun (Brno), 2003.
- Votava, M.: Lékařská mikrobiologie obecná (2. přepracované vydání). Neptun (Brno), 2005.
- Žemla, J., Čiampor, F., Labuda, M.: Špeciálna virologie. SAP (Bratislava), 1998.
- Žemla, J., Čiampor, F., Leššo, J.: Všeobecná virológia. SAP (Bratislava), 1995.

14 INTERNETOVÉ STRÁNKY

Description of Plant Viruses: <http://www.dpvweb.net/>

International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV): <http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?bhcp=1>

ICTVdb: <http://www.ictvdb.org/>

NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

ViralZone: <http://expasy.org/viralzone/>

Big Picture Book of Viruses: http://www.virology.net/big_virology/BVHomePage.html

All the Virology in the WWW: <http://www.virology.net/>