**UNIVERZITA PALACKÉHO**

**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**

****

**Katedra buněčné biologie a genetiky**

**Praktická cvičení z obecné virologie**

**pro posluchače Přírodovědecké fakulty UP**

Milan Navrátil

Pavla Válová

Jana Rohožková

**Olomouc 2014**

## CVIČENÍ Z OBECNÉ VIROLOGIE

##

## kód MBB/OBVSV

## MBB a BE, I. ročník, 2015/2016, zimní semestr

## rozsah: 2 hod týdně

## vedoucí: Mgr. Aneta Grycová, Ph.D.

**Úvodní cvičení:** Osnova cvičení. Vzor protokolu. Seminární práce. Bezpečnost práce. Zásady práce ve virologické laboratoři.Materiálně technické vybavení virologické laboratoře. Termíny odběru krve na testování protilátek. (2 hod)

1. **EM** – princip elektronového mikroskopu a příprava preparátů virů pro transmisní elektronový mikroskop. (2 hod)
2. **Mechanický přenos rostlinného viru.** (2 hod)
3. **Morfologie virionu.** Stanovení velikosti a tvaru vybraných virů.(2 hod)
4. **Stanovení virového antigenu dvojitou imunodifúzí v agarovém gelu.** (2 hod)
5. **a) Diagnostika virů ELISA testem.** Sérologické metody diagnostiky virů;

DAS-ELISA metoda; stanovení rostlinného viru v nainokulovaných rostlinách hrachu.

**b)** **Video: Virus chřipky A.** Virus epidemické a ptačí chřipky. (4 hod)

1. **Lidské viry v ČR důležité z epidemiologického hlediska** - seminář (2 hod)
2. **a) Stanovení koncentrace virových částic ve fágovém lyzátu plakovou metodou.** Životní cyklus bakteriofága; plaková metoda; práce s infekčním materiálem.

**b)** **Diagnostika protilátek IgG proti viru Varicella-Zoster.**

ELISA metoda na stanovení vlastních protilátek.(4 hod)

1. **Virologická laboratoř Mikrochem, a.s.** - Laboratorní průkaz původců lidských virových infekcí.  (2 hod)

**Zápočet –** zápočtový test, kontrola protokolů, zápočet. (2 hod)

**MBB1**

**MBB1 + BE1**

**Úterý:** Skupiny A a B: 2-hodinová cvičení: **A:** 9.45 – 11.15 **B:** 11.30 – 13.00

 4-hodinová cvičení: 9.45 – 12.45

**Úterý:** skupina **C**: 2-hodinová cvičení: **C:** 13.15 – 14.45

 4-hodinová cvičení: 13.15 – 16.15

**Exkurze**: 9.12.2014 skupiny A + B: 10.00–11.00; C + D: 13.00-14.00

Mikrochem, a.s., Nezvalova 984/2, 779 00 Olomouc

RNDr. Marián Luhový

Nezvalova 2 (žlutá budova) – viz mapka

**Studijní literatura:**Dle doporučení a návodů pro cvičení.

**Podmínky udělení zápočtu:**1) účast na cvičeních
2) vypracované protokoly nebo seminární práce z jednotlivých cvičení
3) úspěšně absolvovaný zápočtový test (70 %)

**Kontakt na vedoucí cvičení:** tel.: 585 634 907 e-mail: anetan@centrum.cz

**V případě problémů při předzápisu/zápisu na předměty katedry (KBB), prostřednictvím STAG, kontaktujte Mgr. Danu Šafářovou, Ph.D. dana.safarova@upol.cz; 58563 4900**

**Materiály na internetu:**

internetová adresa Katedry buněčné biologie a genetiky (KBB):

<http://genetika.upol.cz> → výuka → předměty ...... dole studijní materiály

**Cvičení z Obecné virologie (MBB/OBVSB) – rozpis, ZS 2015**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| ***Týden*** | ***Číslo.******cvič.*** | ***Datum*****úterý** | ***Cvičení*** |
| 39. |  | 22.9.2015 | **Úvod:** Bezpečnost práce, protokoly, seminární práce, termíny odběru krve na testování protilátek |
| 40. | **1.** | 29.9. | Seminář:**Elektronový mikroskop při studiu virů** |
| 41. | **2.** | 6.10. | **Mechanický přenos rostlinného viru**  |
| 42. | **3.** | 13.10. | **Stanovení velikosti virových částic pomocí mikrofotografie z elektronového mikroskopu** |
| 43. | **4.** | 20.10. | **Stanovení virového antigenu dvojitou imunodifúzí** |
| 44. | **5.** | 27.10. | 1. **DAS-ELISA**
2. **Virus chřipky A**
 |
| 45. | **5.** | 3.11. | 1. **DAS-ELISA**
2. **Virus chřipky A**
 |
| 46. | **6.** | 10.11. | Seminář: **Viry v ČR důležité z epidemiologického hlediska** |
| 47. | **-** | 17.11. | Státní svátek |
| 48. | **7.** | 24.11. | **a) Stanovení koncentrace fágových částic** **b) Detekce protilátek IgG proti Varicella-Zoster** |
| 49. | **7.** | 1.12. | **a) Stanovení koncentrace fágových částic** **b) Detekce protilátek IgG proti Varicella-Zoster** |
| 50. | **8.** | 8.12. | **Mikrochem, a.s.**RNDr. Marián Luhový |
| 51. |  | 15.12. | Zápočtový test; Kontrola protokolů**Zápočet** |

**Vzor protokolu**

František Novák Datum: 28.11.2014

MBB1, skupina A

**Téma:** xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx

**Úvod:** Teorie a princip úlohy (velmi stručně, neopisovat návod)

**Provedení:** 1. Biologický materiál (organismy, rostliny; vč. platných latinských názvů)

 2. Vybavení laboratoře (včetně názvů přístrojů, firmy)

 3. Chemikálie a použité roztoky (přesný název a firma)

 4. Pracovní postup:Popis **vlastní práce** včetně odchylek od návodu

**Výsledky:** Zaznamenat přesně a přehledně (obrázky, tabulky, grafy, schémata) veškeré naměřené hodnoty nebo pozorování a výpočty. Výsledky popsat i slovně. Na očíslované tabulky, grafy a schémata odkazovat v textu.

**Hodnocení a diskuse:** Zhodnotit získané výsledky a porovnat je s teoretickými nebo literárními údaji, zdůvodnit odchylky od očekávaných výsledků; zdůvodnit odchylky vlastních výsledků od výsledků jiných členů pracovní skupiny.

**Závěr:** Stručně a výstižně podstatné výsledky – závěry práce.

(v závěru uvádět celé názvy organismů, ne zkratky; závěr by měl být pochopitelný i pro nezúčastněné)

Přílohou každého protokolu jsou **originální záznamy** o provedení cvičení včetně záznamů primárních dat.

Protokoly zpracovat na **volných listech** formátu **A4,** nejlépe **oboustranně,** a odevzdat vedoucímu do 1 týdne (po domluvě do 14 dní) od data konání cvičení.

Užívat písmo **Times New Roman** o velikosti **12 (příp. 11).**

**Šetřit papírem, ale ne na úkor přehlednosti** **a řádného zhodnocení výsledků.**

Ze seminářů a exkurze zpracovat **seminární práce** o cca 3 listech formátu A4.

**Parametry seminární práce:**

**3** strany na PC, formát A4; písmo Times New Roman 11 nebo 12, řádkování 1,15. Uvést zdroje informací – nejméně 3 zdroje (správná citace literatury, internetové adresy; u přiložených obrázků uvést zdroj).

Soubor poslat na e-mail vedoucího s označením **příjmení autora, kódu předmětu, stručného názvu práce a rokem vypracování.**

Příklad: Dalíková\_OBVSB\_Elektronová mikroskopie\_2014

Pozn.: Seminární práce **nesmí obsahovat okopírovaný text a musí být z odborného i jazykového hlediska v pořádku!**

 **Úvodní cvičení:**

**Zásady bezpečnosti práce**

 **1.** Každý student je povinen znát a dodržovat základní bezpečnostní předpisy při práci s ohněm, elektrickým proudem a chemikáliemi (zvlášť nebezpečné jedy, ostatní jedy, kyseliny, zásady). Proškolení provede na počátku kurzu vedoucí cvičení.

 **2.** Každé poranění hlásit vedoucímu cvičení a úrazy zapsat do "Sešitu úrazů".

 **3.** Přístup do laboratoře mají pouze osoby, které tam pracují. Studenti se mohou pohybovat pouze v prostorách vyhrazených ke cvičení. Platí přísný zákaz manipulace se zařízením a přístroji, které nejsou určeny k provádění konkrétního cvičení.

 **4.** Vstup do laboratoře je povolen pouze v přezůvkách a ochranném laboratorním plášti (ne z umělých tkanin).

 **5.** Každý student zodpovídá za průběh své práce, za svěřené zařízení, přístroje, nářadí a materiál a za udržování pořádku a čistoty na pracovním stole.

 **6.** V laboratoři platí zákaz pití, jídla a kouření. K pití nikdy neužívat laboratorní nádobí.

 **7.** Vodovodní odpad se nesmí znečišťovat pevným odpadem (zápalkami, filtračním papírem, agarem, apod.)

 **8.** Po ukončení cvičení je nutné vypnout přístroje a zařízení, schovat přístroje, vrátit nástroje a zapůjčené pomůcky, umýt používané sklo a nářadí a uklidit pracovní místo.

 **9.** Po ukončení nebo při přerušení práce si pořádně umýt ruce.

````````````````````````````````````````````````````````````````````````````````````````````````````````

Poznámky:

**Práce s chemikáliemi:**

* Používat ochranné pomůcky (gumové rukavice)
* Při polití kyselinou  důkladně omýt tekoucí vodou a neutralizovat 1% roztokem NaHCO3 (hydrouhličitan sodný)
* Při polití louhem  důkladně omýt tekoucí vodou a neutralizovat 1% roztokem kyseliny octové (příp. citrónovou šťávou)
* Při zasažení očí  oplachovat delší dobu pod proudem vody, **vyhledat lékaře** **!!!**
* Při požití kyseliny  vypít suspenzi oxidu hořečnatého ve studené vodě
* Zásada při zřeďování kyselin: kyselinu vlévat pomalu  **do vody** !!!, užívat ochranný štít na obličej, případně ochranné brýle
* Nikdy nepipetovat ústy !!! (používat pipetovací násadce)

**Úrazy elektrickým proudem:**

* Nemanipulovat s elektrickými šňůrami, zásuvkami, žárovkami
* Při vypínání šňůry elektrického spotřebiče přidržet zásuvku
* Znát umístění hlavního vypínače elektrického proudu pro laboratoř

**Nebezpečí požáru:**

* Znát umístění hasicích přístrojů na pracovišti, jejich náplň a použití
* Znát umístění únikového východu z pracoviště
* V případě vzniku požáru uhasit požár dostupnými hasebními prostředky nebo provést opatření k zamezení jeho šíření
* Vznik požáru ohlásit (nebo zabezpečit jeho ohlášení) na HZS Olomouc (telefonní číslo **150**) a uvést - kde hoří (i město! – ústředna je v Brně), co hoří, kdo volá, odkud volá (tel.č.), zraněné osoby a vyčkat na zpětný dotaz u telefonu
* Provést opatření pro záchranu ohrožených osob a majetku
* Potom vznik požáru ohlásit policii (tel. 158, 156)

**Důležitá telefonní čísla:** Rychlá záchranná služba - **155**

Tísňové volání (Evropa) **- 112** (především pro cizí státní příslušníky)

Lékařská služba první pomoci - **585 544 444**

Policie - tísňové volání - **158** Městská policie **- 156**

Hasiči **- 150**

Informace o telefonních číslech **- 1180**

**Další zásady práce v laboratoři:**

* opatrnost při umývání laboratorního skla
* neochutnávat chemikálie
* nepokládat zátky od chemikálií na pracovní stoly
* při práci s hořlavinami dbát na dobré odvětrávání par, které se mohou vznítit od okolního plamene nebo tepelného zdroje
* při rozlití hořlaviny zhasnout hořáky, vypnout elektrické spotřebiče v pojistné skříni, intenzivně větrat
* při práci s lihovým kahanem **pozor!!!** - plamen je světle modrý a nebývá zřetelný; dbáme na to, abychom delší vlasy měli sepnuté gumičkou a do blízkosti kahanu nedávali hořlavé předměty
* pozor na možné nahromadění par etanolu nad lihem v lihovém kahanu a jejich případné vznícení při zapalování knotu kahanu
* při vzplanutí malého množství lihu v kádince udusit plamen položením nehořlavé misky (Petriho miska) na kádinku, malé množství hořícího lihu nechat vyhořet (z okolí odstranit hořlavý materiál), případně k udušení plamene použít vlhký hadr
* při práci s éterem dbát zvýšené opatrnosti (možnost vznícení či výbuchu i od horkých součástí) a intenzivně větrat

**Hašení požáru na pracovišti:**

* Při vzniku požáru je nutno zachovat klid, neztratit duchapřítomnost a okamžitě a účelně zasáhnout.
* Nejprve pomůžeme osobám zasaženým plamenem (uhašení oděvu), potom vypneme elektřinu a odstraníme hořlaviny z blízkosti plamene.
* Požár menšího rozsahu (př. hořící kapalina v nádobách) se snažíme zadusit přiklopením víka nebo vlhkým hadrem.
* **Voda** není vhodná na hašení látek, s nimiž reaguje za tvorby hořlavých plynů. Je vhodná na hašení hořícího lihu (dobře se s ním mísí). **Elektrické vedení se vodou nehasí !!!**

**Hasicí přístroje:**

* **Práškové přístroje** se hodí k hašení textilu, konfekce, obrazů, archivů. Nesmí se používat k hašení uhelného prachu, hoblovaček, moučného prachu a volně uloženého papíru.
* **Sněhové přístroje** (obsahují kapalný CO2 ) jsou vhodné k hašení potravin a hořlavých kapalin, včetně acetylénu. Můžeme jich využít k hašení elektrického vedení pod proudem. Nesmí se hasit prach a volně uložené organické látky.
* **Pěnové přístroje** se používají k hašení všech minerálních olejů, benzínu, tuků, dehtu, laků a všech organických hmot. Nehodí se k hašení lihu, éteru, které chemickou pěnu rozkládají. Nesmí se používat k hašení zařízení pod elektrickým proudem!

**Nelze-li požár zlikvidovat vlastními silami, je nutné volat hasiče (tel. 150) !!!**

**Cvičení 1:**

**Elektronový mikroskop při studiu virů**

|  |
| --- |
| *prof. RNDr. Milan Navrátil, CSc.; RNDr. Pavla Válová; RNDr. Radko Novotný, Ph.D.* |

## ÚVOD:

Viry - vzhledem k jejich malé velikosti - můžeme pozorovat **elektronovým mikroskopem**, schopným rozlišit objekty o velikosti až 1,5 nm (světelný mikroskop cca 200 nm). Transmisní elektronový mikroskop používá k zobrazení objektů svazek elektronů s asi 100 000x menší vlnovou délkou než je λ světelného paprsku, a může tak dosáhnout zvětšení až 1 000 000x.

Elektronová mikroskopie (dále jen EM) je již mnoho let významným nástrojem virologického výzkumu. Vyžaduje rozsáhlé znalosti o samotném elektronovém mikroskopu a zahrnuje zvládnutí náročných a zdlouhavých postupů přípravy vzorků a jejich pozorování. Náročnost postupů spojená s vysokou cenou elektronového mikroskopu ovšem značně omezuje použití EM při běžné diagnostice virů.

**Příprava vzorků pro pozorování v elektronovém mikroskopu**

Vzorky, které chceme pozorovat v elektronovém mikroskopu, musí být navázány na pevnou podložku. Takovým nosičem nemůže být skleněné sklíčko, které by zachytilo paprsky elektronů, ale obvykle měděná nebo niklová síťka (blanka) potažená tenkou vrstvou umělé hmoty. Tato blanka propouští paprsky elektronů a na stínítku elektronového mikroskopu tak umožní zobrazit pozorovaný objekt. Pozorování objektu je spojeno se zvýrazněním jejich struktur pomocí tzv. *negativního barvení*, jehož princip spočívá v usazování solí těžkých kovů zachycujících elektronový paprsek kolem objektu a v jeho morfologických strukturách bez toho, že by barvivo pronikalo dovnitř. Virion se pak jeví jako světlý objekt (který propouští paprsek elektronů na zobrazující stínítko) umístěný na tmavším pozadí, které elektrony zachycuje. Přestože negativní barvení je rychlé a snadné, může být příčinou poškození virových částic a *vzniku artefaktů*. Je proto potřebné volit takové barvivo a pH prostředí, při kterém můžeme pozorovat viriony v neporušeném stavu. Mezi nejčastěji používaná negativní barviva patří *kyselina fosfovolframová* (PTA, phosphotungstic acid, 1 až 2% roztok, pH 5-8, obvykle 6,8; stabilní při pokojové teplotě a na světle), dále pak *molybdenan amonný* (ammonium molybdate, 2% roztok, pH 3-9; stabilní při pokojové teplotě a na světle) a *uranyl acetát* (uranyl acetate, 1 až 2% roztok, pH 3 až 4; stabilní v tmavé láhvi a ve +4 °C).

**Volba materiálu pro přípravu vzorků**

EM je často využívána při studiu morfologie virionu nebo i jako diagnostická metoda. Pokud známe morfologii virových skupin, můžeme do nich viry zařazovat přímo na základě struktury virionu stanovené pomocí EM. Je však potřebné si uvědomit, že pravděpodobnost nalezení virionů pomocí elektronového mikroskopu se mění v závislosti na stáří rostlin i na konkrétní kombinaci virus-hostitel. Některé viry se nacházejí v hostitelích v tak nízkých koncentracích, že jejich zachycení pomocí EM je nereálné. Proto pro přípravu vzorků volíme ta pletiva, ve kterých je koncentrace viru nejvyšší. Obecně platí, že nejvyšší koncentraci viru předpokládáme v místě lokalizace symptomů. V případě rostlinných virů jsou to např. listy vykazující mozaiky a skvrnitost, případně korunní plátky s barevným proužkováním.

**Pozorování a interpretace výsledků**

Pomocí elektronového mikroskopu snadno rozlišíme většinu virových částic, ať již tyčkovitých (virus mozaiky tabáku), vláknitých (potyviry), baciliformních (virus mozaiky vojtěšky) nebo sférických (virus svinutky bramboru). Musíme však vždy zvažovat, zda se nejedná o *artefakty*, jako např. o fragmenty částic pozorované kolmě k ose nebo bičíky bakterií připomínající vláknité viry. Obtížné je pozorování i sférických částic, jednak vzhledem k jejich většinou nízké koncentraci při přípravě vzorků přímo ze surové šťávy, jednak i vzhledem k buněčným organelám a jiným zbytkům buňky, které se v surovém extraktu vzorku mohou vyskytovat.

**Stanovení velikosti virionu pomocí EM**

Stanovení velikosti virionu pomocí EM rovněž přináší obtíže, jako je rozlišení prodlužování nebo zkracování vláknitých částic v závislosti na vlastnostech prostředí (např. iontová síla extrakčního pufru) a použitém negativním barvivu. Jiným problémem je odlišení polámaných nebo na sebe napojených částic.

Pro měření velikosti virových částic je vhodné použít přímo ve vzorku tzv. *vnitřní standard*. Nejčastěji se jedná o příměs viru mozaiky tabáku (tyčinky o standardní velikosti 300 nm), případně můžeme použít latexové částice o přesné velikosti. Odstraňujeme tak problémy spojené s určením použitého zvětšení elektronového mikroskopu.

**Imunoelektronová mikroskopie**

Imunoelektronová mikroskopie kombinuje techniku EM a sérologie. Spojuje tak výhody, které přináší EM (tj. vizualizace virových částic), se specifičností reakce antigen (virus) - protilátka.

*Imunosorbentní elektronová mikroskopie* - využívá možnosti **aktivovat vazebnou blanku nosiče specifickými protilátkami**, které umožní selektivní zachycení a koncentrování sérologicky homologních virových částic i ze surových vzorků. Tato metoda je často používána pro detekci viru v rostlinné šťávě. Citlivost detekce se tak zvyšuje až 100x oproti zachycení virových částic na blankách, které protilátkami nejsou aktivovány. Navíc stupeň zachycení virových částic umožňuje hodnotit i sérologickou příbuznost virů (sérotypy).

Jiná metoda - tzv.*dekorace* - využívá opět reakce **virus - protilátka**, která virus, zachycený na blance, dekoruje (obaluje). Tato technika nám umožňuje pomocí specifických antisér snadno rozlišovat morfologicky identické nebo podobné viry.

**další informace k EM viz prezentace ve cvičení**

**Doporučená literatura:**

* **Nebesářová J.:** Elektronová mikroskopie pro biology.

<http://www.paru.cas.cz/lem/book/index.html>

* Československá mikroskopická společnost ([http://www.mikrospol.cz](http://www.mikrospol.cz/))
* **Meckes, O., Ottawaová, N. (2006):** Fantastický neviditelný svět. Objevy v mikrokosmu. Euromedia Group k.s. Knižní klub v edici Universum, Praha.
* **Vše, co chcete vědět o elektronové mikroskopii...**

**...ale neodvážili jste se zeptat. Příručka FEI Company, 2002.**

(v anglické verzi - <http://www.fei.com/uploadedfiles/documents/content/2006_06_allyouwanted_pb.pdf>)

* <http://biologie.upol.cz/mikroskopie>
* <http://yunus.hacettepe.edu.tr/~coner/ElectronMicrographImages.htm>

 [(Virus Ultrastructure - Electron Micrograph Images)](http://www.genome.ad.jp/dbget/dbget.links.html)

* <http://www.vscht.cz/nmr/mol_model_bioinfo/lekce/mikroskopie.pdf>
* <http://www.jic.ac.uk/microscopy/intro_em.html>

**Cvičení 2:**

**MECHANICKÝ PŘENOS ROSTLINNÉHO VIRU**

|  |
| --- |
| *prof. RNDr. Milan Navrátil, CSc.* |

## ÚVOD:

 Zjištění, že vizuální symptomy jsou důsledkem virové infekce přenášené z jedné rostliny na druhou, nebylo významné pouze jako jeden ze základních poznatků počátků virologie vůbec, ale přežívá do současnosti jako **základ biologických diagnostických testů**. Navíc přenos viru z infikované rostliny na bylinné nebo dřevité hostitele je nevyhnutelným postupem při izolaci viru a jeho komplexní determinaci. Pro jeho provedení obvykle potřebujeme vytápěný skleník (nebo fytotron) s přisvětlováním. Objektivní, avšak nevyhnutelnou nevýhodou, je trvání testu. Specifické příznaky se mohou objevit až za několik týdnů, v případě dřevitých indikátorů až po měsících.

Ne všechny rostlinné viry jsou přenosné **mechanicky** pomocí šťávy infikovaných rostlin. Často musíme znát přirozené **vektory viru** (hmyz, háďátka a houby) včetně jejich biologie, abychom mohli experimentálně přenos provést, nebo virus musíme přenést **roubováním** nebo **očkováním** (přenos na dřevité indikátory).

Faktory ovlivňující vnímavost a infekčnost:

**1.** ***Zdroj inokula***

 Mechanicky přenosné viry jsou v rostlinných pletivech obvykle ve vysoké koncentraci. Koncentrace viru je většinou vyšší **v mladších částech rostliny**, které často vykazují výrazné vizuální symptomy. Koncentraci viru v rostlině ovlivňují klimatické podmínky a roční období.

**2.** ***Volba pufru pro extrakci viru***

 Nejčastěji jsou používány **fosfátové pufry**. Není to dáno pouze jejich pufrovací schopností, ale i jevem popsaným jako "phosphate effect". Studia totiž ukázala, že fosfáty zvyšují infekčnost inokula, specificky u některých indikátorových rostlin (např. *Phaseolus vulgaris* L.). Ne pro všechny viry jsou fosfátové pufry optimální, např. virus mozaiky salátu (LMV, lettuce mosaic virus) je přenášen ve fosfátovém pufru slabě a optimální se jeví **borátový pufr**. Obecně můžeme říci, že pufry o koncentraci 0,05 - 0,1 M a pH vyšším než 7,0 (příp. 6,5) jsou vhodné pro přípravu inokula. Nižší pH výrazně snižuje infekčnost inokula. Vhodná koncentrace a pH pufru ochraňuje virus během přenosu.

**3.** ***Abraziva***

 Použití vhodného abrasiva (**celit**, karborundum) zefektivňuje homogenizaci infikovaného pletiva a přípravu inokula a především zefektivňuje úspěšnost mechanické inokulace, v případě celitu až 100x. Celit se zdá být šetrnějším abrasivem než karborundum a snižuje pravděpodobnost nespecifického poškození inokulovaných listů. Při poškození listů se doporučuje umístit infikovanou rostlinu na několik hodin do prostředí s vyšší vlhkostí prostředí.

**4.** ***Inhibitory infekce***

 Z hostitelské buňky se během homogenizace uvolňují **inhibitory infekce interferující s procesem infekce nebo inaktivující virus v inokulu**. Úspěšné infekce můžeme dosáhnout v případě, že účinek inhibitorů je malý. Mezi substance inhibující infekci patří nejčastěji vybrané proteiny, enzymy a polysacharidy. Řada inhibitorů však dosud nebyla charakterizována. Pokud nepoužíváme purifikovaný virus, může být infekčnost výrazně redukována aktivitou ribonukleáz. Jejich nepříznivé působení můžeme omezit vhodným ředěním inokula. Jiným inaktivačním systémem je oxidace polyfenolů v extraktech na chinony pomocí polyfenoloxidáz, oxidační produkty se mohou vázat na viriony a inaktivovat je. Aktivita polyfenoloxidáz může být omezena nebo inhibována pomocí přídavků **redukčních činidel**, jako je siřičitan sodný, kyselina thioglykolová, merkaptoetanol a kyselina askorbová, nebo chelatačních agens, jako je EDTA nebo DIECA. V extraktech z dřevin (zejména u *Rosaceae*) jsou viry inaktivovány pomocí taninů. Efekt taninů je omezen použitím pufrů s vyšším pH (tj. 8 až 9) a obsahem kofeinu nebo nikotinu v extrakčním pufru.

**5.** ***Fyziologie testovacích rostlin***

 Vnímavost rostlin k infekci je výrazně ovlivněna fyziologickým stavem rostliny. Rostliny pěstované ve "stinných" podmínkách mají obvykle **světle zelené, "šťavnaté" listy**. Tmavě zelené listy rostoucí v plném osvětlení jsou méně vnímavé (obsahují rovněž méně vody). Vhodné jsou výživové podmínky a teplota zabezpečující rychlý růst. Změn kultivačních podmínek rostlin před inokulací se často používá ke zvýšení vnímavosti. Obvykle se rostliny zastiňují dva dny před inokulací.

**Přenos šťávou infikovaných rostlin:** Mnohé viry mohou být mezi vnímavými rostlinami přenášeny **mechanicky**. Takový přenos zahrnuje úspěšnou extrakci viru z hostitelského materiálu a mechanický přenos viru pomocí infekčního extraktu na povrch listů vnímavé rostliny způsobem, který umožní viru vstup do buňky. Rostlinné viry neumí aktivně překonat celulózovou buněčnou stěnu. Aby byla inokulace úspěšná, musí být povrch inokulovaného listu mechanicky poškozen. Na inokulovaných listech se mohou objevit lokální leze a na ostatních částech infikované rostliny se mohou postupně vyvíjet systémové příznaky rostliny (viz i poznámka na konci návodu).

**Provedení:**

Biologický materiál: - zdravé rostliny **hrachu setého (*Pisum sativum* L.)**určené k inokulaci

- rostliny hrachu setého (*Pisum sativum* L.)infikované virem

**Pea seed-borne mosaic virus -** virus semenem přenosné mozaiky hrachu (PSbMV)\*, izolát L1

Vybavení laboratoře: váhy (váženky, hliníková folie), skleněná pipeta 1 ml, pipetovací násadec, třecí miska s paličkou, pinzeta, pean, nůžky, lihový kahan + zápalky, molitanová houbička, značkovač, tužka, korkovrt (průpiska, ostrá tužka), konvička nebo střička s vodou, jmenovky, lžička na abrazivum a aktivní uhlí, ledová tříšť v podnose

Chemikálie a použité roztoky: - 0,01 M fosfátový pufr, pH 8,0

* celit (případně karborundum - 600 mesh)
* aktivní uhlí
* 96% denaturovaný etanol (1% benzínu)

\***Pea seed-borne mosaic virus - virus semenem přenosné mozaiky hrachu**

Patří do čeledi *Potyviridae.* Vláknité částice o velikosti cca 700 nm; ssRNA. Přenos vektory. Hostitelem je hrách setý (*Pisum sativum*), rozšířený hlavně v mírném pásmu; kromě hrachu napadá i další luštěniny. Příznaky na rostlině: **svinutí listů, prosvětlování žilek, mozaika někdy i nekrózy;** obvykle také deformace a sterilita květů; zakrnělý vzrůst; častá produkce zdeformovaných lusků, které mají málo často zdeformovaných semen. Ekonomický význam:

redukce úrody.

Přenos:

**Pracovní postup:**

1. Pečlivě si umyjeme ruce mýdlem nebo desinfekčním prostředkem (zamezení nechtěné kontaminace lehce přenosnými viry, např. virus mozaiky tabáku, X virus bramboru).
2. Vybereme a jmenovkou označíme jednu testovací rostlinu hrachu. Jmenovka obsahuje tužkou napsané údaje: skupinu, jméno, datum, inokulovaný virus (PSbMV) a izolát viru. Na vybrané rostlině inokulujeme dva starší listy, které označíme vyseknutím terčíku pomocí korkovrtu (propisky).
3. Vybereme vhodný infekční materiál – rostlina hrachu setého (*Pisum sativum* L.)infikovaná virem PSbMV.
4. Infikované listy přidržíme pomocí vysterilizované pinzety a ustřihneme vysterilizovanými nůžkami (sterilizaci provádíme opláchnutím v denaturovaném lihu a ožehnutím nad plamenem lihového kahanu, **pozor!!!** - plamen je světle modrý a nebývá zřetelný). Po orientačním stanovení váhy (0,5 g) na předvážkách je vložíme do vychlazené třecí misky (misky a tloučky vychladíme v +4 °C).
5. K cca 0,5 g infekčních listů přidáme 1 ml fosfátového pufru a na špičku nože celitu a aktivního uhlí. Dbáme na to, abychom abrazivum nevdechovali.
6. Rostlinný materiál pečlivě homogenizujeme.
7. Do peanu (pinzety) uchopíme molitanovou houbičku, nasajeme šťávu z homogenátu a důkladně natřeme (cca10x) dva nejstarší listy\*, předem označené hrotem tužky, které přidržíme a podložíme prsty druhé ruky. Dbáme na to, abychom velkým tlakem inokulovaný list nepoškodili (viz obr. níže).
8. Bezprostředně po inokulaci (tj. 1 - 2 min po inokulaci; před zaschnutím) osprchujeme inokulum z infikovaných listů konvičkou (můžeme použít i střičku nebo odpovídající vodní sprej). Buněčné extrakty inhibují totiž infekci a mohou být příčinou nespecifických reakcí inokulovaných listů.
9. Testovací rostlinu umístíme na vyhrazené místo ve skleníku (min. teplota 15 °C).
10. Veškeré použité pomůcky a nářadí umyjeme ve vodě s jarem (sterilizujeme později - chemicky nebo 1 hodinu/150 °C).

Před další prací si pečlivě umyjeme ruce.

\*Pozn.: Neplést list s lístkem zpeřeného listu.

Inokulovaný lístek listu hrachu

**VÝSLEDKY:**

Foto P. Válová

 Výsledky vyhodnotíme po jednom týdnu od inokulace a po 4 týdnech, kdy hodnotíme vizuální příznaky na inokulovaných listech a v systému rostliny (viz Příklad tabulky na konci návodu). Pozorované příznaky srovnáváme s kontrolní zdravou rostlinou.

Později (po 4 týdnech od inokulace) inokulované rostliny otestujeme na přítomnost virového antigenu pomocí DAS-ELISA testem (dílčí provedení ELISA testu ve cvičení – viz Cvičení DAS-ELISA). Porovnáme vizuální výsledky s výsledky ELISA testu.

**HODNOCENÍ A DISKUSE:**

Zhodnotíme správnost provedení inokulace a výsledky srovnáme s výsledky spolužáků. Zhodnotíme přenos viru PEMV u obou rostlin hrachu.

**ZÁVĚR:**

V závěru uvedeme, zda inokulované rostliny hrachu jevily příznaky napadení virem PEMV a tyto příznaky popíšeme. Rozhodneme, zda inokulace virem byla úspěšná (rostlina musí mít příznaky, být pozitivní na ELISA test, ale inokulaci musí přežít!).

Vizuální výsledky inokulace srovnáme s pozdějšími výsledky ELISA testu.

**Poznámka:** Do závěru uvádíme vždy celý název rostliny (*Pisum sativum* …) a ne jen zkratku (např. R1, R2).

Do přílohy tohoto protokolu vypracujeme **postup přípravy 500 ml 0,01 M fosfátového pufru o pH = 8,0** připraveného ze složek KH2PO4 a Na2HPO4 . 12 H2O.

~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~

**Příklad tabulky: Doplňte n**ázev ...

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Datum pozorování** | **Počet dní od inokulace** | **Příznaky na** **rostlině R1** **(*Pisum sativum*)** | **Příznaky na** **rostlině R2** **(*Pisum sativum*)** | **Příznaky na** **zdravé rostlině** **(*Pisum sativum*)** |
|  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |
| DAS-ELISA test |  |  |  |  |

Poznámka:

**Sledované příznaky (obecně) na inokulovaných rostlinách:**

1. **Lokální leze:** sledujeme průměr, barvu v centru a na okrajích (chlorotická - žlutá, světle zelená, nekrotická - odumírající pletivo), lokální kroužkovitost, dobu objevení se od inokulace.
2. **Systémové příznaky:** jsou více variabilní než lokální leze. Objevují se nekrotické skvrny a kroužky, častěji však mozaiky, skvrnitosti, proužkovitost nebo projevy asociované s žilkami. Prosvětlení žilek (vein clearing) a lemování žilek (vein banding) může být chlorotické nebo nekrotické. Typické mohou být deformace listů (malformace), výrůstky na spodní straně listů, odumírání vrcholů nebo zakrslost.

**Cvičení 3:**

**M o r f o l o g i e v i r i o n u**

**Stanovení velikosti virových částic pomocí elektronového mikroskopu**

|  |
| --- |
| *prof. RNDr. Milan Navrátil, CSc; RNDr. Pavla Válová* |

## ÚVOD:

## VIRUS – základní definice

* submikroskopický obligátní (intrabuněčný) parazit obsahující ve své nukleové kyselině (jeden druh: buď DNA nebo RNA) kompletní genetickou informaci nezbytnou pro nezávislou reprodukci v buňce

## VIRIONY

## virová tělíska = jednotliví jedinci určitého virového druhu

## SLOŽENÍ A MORFOLOGIE VIRIONŮ

## Vnitřní část virionu se nazývá *dřeň* nebo častěji *nukleotid*. Ten obsahuje NK a je obklopen bílkovinným obalem, *kapsidou*. Celek se nazývá *nukleokapsida*. Viriony nejjednodušších virů jsou neobalené (např. pikornaviry, adenoviry, papillomaviry), u jiných je kapsida uložena v další struktuře, ve virovém *obalu* (např. herpesviry, orthomyxoviry, paramyxoviry) velmi podobném biomembránám.

**Virová NK** je buď *RNA*, lineární (jednovláknová - ss, dvouvláknová - ds) nebo *DNA* (ss - jednovláknová nebo ds - dvouvláknová), a to buď lineární, nebo cirkulární.

**Kapsida**  - bílkovinový obal, který obklopuje NK - je sestavena z bílkovinných podjednotek neboli *kapsomer.* Kapsomery se samosestavují (autoagregují) do vyšších útvarů.

**● Podle typu symetrie**, kterým se uspořádání kapsomer řídí, rozeznáváme **symetrii kubickou** (nejčastěji **ikozahedrická**, tj.dvacetistěn - např. herpesviry, adenoviry, pikornaviry; řidčeji dodekahedrická, tj. dvanáctistěn; např. fág Ø X 174), **helikální** (spirální) – kapsomery jsou uspořádány šroubovitě kolem NK (např. virus tabákové mozaiky, orthomyxoviry, paramyxoviry, rhabdoviry), eventuelně **binální** (bičíky bakteriofágů), nebo **komplexní.** Komplexní struktura se vyskytuje např. u některých bičíkatých bakteriofágů, jejichž hlavička je kubické symetrie a bičík binální, nebo u největších živočišných virů (poxviry), kdy nukleotid obklopuje mnoho membrán. Příkladem málo se vyskytujícího tvaru kapsidy podobného bakteriím – tzv. **baciliformní –** je např. virus mozaiky vojtěšky (alfalfa mosaic virus) - virové částice u tohoto viru mají v centrální části pláště helikální uspořádání kapsomer a konce částic mají strukturu podobnou izometrickým virům.

**● Základní tvar** virů je většinou **kulovitý** (sférický, např. virus mozaiky huseníku – ArMV, adenoviry) nebo **tyčinkovitý** (např. virus mozaiky tabáku - TMV) až **vláknitý** (např. virus žluté zakrslosti cibule – OYDV). Obalené viry mají většinou tvar zhruba kulovitý (retroviry) nebo mohou být i nepravidelného tvaru, tzv. **pleimorfní** (orthomyxoviry, paramyxoviry, herpesviry). Rhabdoviry (virus vztekliny) svým tvarem připomínají projektil; mezi viry s komplexní strukturou řadíme např. poxviry (virus pravých černých neštovic), které jsou podobné bochníku.

**● Velikostvirových částic** je velmi různá**,** udává se v nm (1 nm = 10-9 m; starší jednotka je angstrôm – Å, 1 Å = 10-10 m) – obecně jsou to desítky až stovky nanometrů. Mezi nejmenší patří pikornaviry a parvoviry (kolem 20 nm). Mezi největší viry patří např. poxviry (měří kolem 300 x 250 x 100 nm), r. 2013 objeven *Pandoravirus* (délka cca 1 µm, velký genom) a lze je spatřit i světelným mikroskopem. Vláknité viry – potyviry – jsou dlouhé až 800 nm; nejdelší vláknité viry (*Closterovirus*) dosahují až 2 000 nm.

**Provedení:**

Materiál: Elektronové mikrofotografie virionů s daným celkovým zvětšením

**TMV** (Tobacco mosaic virus, virus mozaiky tabáku)

 rod: Tobamovirus, tyčkovitý, neobalený, ssRNA lineární, přenos mechanicky, příznaky na rostlinách: ….

 **OYDV** (Onion yellow dwarf virus, virus žluté zakrslosti cibule)

Potyvirus, čel. *Potyviridae*, tvar vláknitý, přenos mšicemi, vegetativně, ne osivem; příznaky na rostlinách: žloutnutí listů v podélných pruzích, zkroucené listy, zakrslost

 **ArMV** (Arabis mosaic virus, virus mozaiky huseníku)

Nepoviruses, rod: Nepovirus, čel.: *Comoviridae*, sférický tvar, ssRNA, přenos háďátky, příznaky na rostlinách: ….

 **CMV** (Cucumovirus, virus mozaiky okurky)

 čel. *Bromoviridae*, ssRNA, 3x dělený genom, přenos mšicemi i mechanicky, omezeně semenem, příznaky na rostlinách: mozaika na listech a plodech, deformace, zakrslost, i úhyn rostlin

Vybavení laboratoře: papírové měřítko, tužka, kalkulačka, statistický program

Pracovní postup:

1. Vybereme si mikrofotografie jednoho vláknitého (tyčkovitého) a jednoho sférického viru a zapíšeme údaje ze zadní strany mikrofotografie včetně čísla mikrofotografie, použitého celkového zvětšení, použitého negativního barvení a urychlovacího napětí, příp. pH. Pomocí papírového měřítka stanovíme u **50** virových částic (pokud máme dostatek tak 100) **délku** **virionů** **v mm** u jednoho vláknitého (nebo tyčkovitého) viru a **průměr virionů** u jednoho ze sférických virů. Velikosti **zaokrouhlujeme na celé mm**. Hodnoty zapíšeme do předem připravených **tabulek** (tabulky označíme číslem a přesným názvem).
2. Podle daného celkového zvětšení mikrofotografie vypočteme **absolutní velikost** virových části v **nm**, kdy naměřenou hodnotu vydělíme celkovým zvětšením mikrofotografie, a hodnoty doplníme do tabulky.
3. Provedeme **seskupení** (**grupování**) naměřených absolutních hodnot virových částic do velikostních tříd - u vláknitých nebo tyčkových částic stanovíme četnost virových částic v "grupách" vymezených po 20 nm, u sférických po 2 nm. Hodnoty sestavíme do tabulek. Dbáme na to, aby nám tabulky vyšly na jednu stranu; v případě nutného rozdělení tabulky kvůli značnému množství údajů, musíme na druhé straně uvést „Pokračování Tab. 1“ a u sloupců znovu název obsahu.
4. Pro sledované druhy virůsestavíme ze všech hodnot v "grupách" tzv. **frekvenční histogram** (tj. závislost četnosti virových částic na velikostních třídách).
5. Na frekvenčním histogramu počítačově nebo ručně vyznačíme průběh Gaussovy křivky (znázorňující normální rozložení pravděpodobností) a vyloučíme tzv. odlehlé hodnoty, tj. jednoznačně propojené viry (násobky délky obvykle nejpočetnější grupy) nebo jejich zlomky. V histogramu tyto **vyloučené hodnoty** **barevně odlišíme** a ve vysvětlivkách zdůrazníme.
6. Ze zbylých hodnot vypočteme pro jednotlivé druhy virů **průměr** () a stanovíme **směrodatnou odchylku** (**s)**, tj. míru rozptylu naměřených hodnot (viz DODATKY na konci protokolu).

V „Pracovním postupu“ uvedeme **vzorce výpočtů průměru a směrodatné odchylky** a **statistický program** použitý ke zpracování výsledků měření.

**VÝSLEDKY:**

**Ve výsledcích uveďte:**

● Tabulky pro sledované viry s uvedením délky virionů v mm a nm včetně celkového zvětšení použitých mikrofotografií.

● Tabulky s grupováním délky sledovaných virionů po daných skupinách (20 a 2 nm).

● Frekvenční histogramy sledovaných virů s vyznačenými hodnotami vyloučenými ze statistického hodnocení.

● Výpočty průměru a směrodatné odchylky pro sledované druhy virů.

Vypočtené hodnoty vaše, vašich spolužáků a získané z literatury si zapište do přehledné tabulky:

Tab. č. … Název ….

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Získané hodnoty | s virionů ArMV | s virionů OYDV |
| vlastní |  |  |
| spolužáků |  |  |
|  |  |
|  |  |
| z literatury |  |  |

**HODNOCENÍ A DISKUSE:**

Uveďte, proč jste některé hodnoty vyloučili z počítání průměru, a své vypočtené hodnoty srovejte s hodnotami spolužáků a s hodnotami uváděnými v literatuře (na internetu).

**ZÁVĚR:**

 V závěru uveďte zjištěnou průměrnou velikost virionů pro hodnocené druhy virů ve formě (s).

**Důležité připomínky:**

Veškeré tabulky a grafy, případně obrázky, musí mít odpovídající **název** a **popis sloupců**. Pokud je tabulek (grafů, obrázků) několik, označíme je pořadovými čísly, např. Tab. č. 1, Tab. č. 2 … a pod tímto označením se na ně budeme **odvolávat v textu**. **Pokud tabulka přesahuje stránku, je nutné na další straně uvést: Pokračování Tab. č. 1 a znovu popsat sloupce.**

U čísel nezapomínat na **užívání jednotek** (v češtině se mezi číslicí a jednotkou dělá mezera, např. 1 g, 70 %, ale 1% roztok).

~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~

**Poznámka:**

Součástí protokolu jsou všechny výpočty nebo program či kalkulátor (typ a program), který jsme pro zpracování výsledků použili, a zdroj (literatura, internetová adresa) dalších údajů použitých v „Hodnocení a diskuse“.

**DODATKY:**

Průměr a směrodatnou odchylku vypočítáme podle následujících vzorečků:

**Legenda:**

 = průměr

s = směrodatná odchylka

n = počet měření

N = počet stupňů volnosti; 

V = variance

   

**Doporučená literatura:**

**Navrátil, M. (2011):** Základy virologie – Obecná virologie. Olomouc. Skripta UP Olomouc.

**Nečas, O. a kol. (2000):** Obecná biologie pro lékařské fakulty. H&H, Jinočany.

**Votava, M. a kol. (2003):** Lékařská mikrobiologie speciální. Neptun, Brno.

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

<http://expasy.org/viralzone/all_by_species/135.html>

Plant Viruses Online  <http://pvo.bio-mirror.cn/>

**Cvičení 4:**

**STANOVENÍ VIROVÉHO ANTIGENU**

**DVOJITOU IMUNODIFÚZÍ V AGAROVÝCH GELECH**

|  |
| --- |
|  *prof. RNDr. Milan Navrátil, CSc; RNDr. Pavla Válová* |

**ÚVOD:**

 Metoda dvojité imunodifúze (také nazývána metoda podle Ouchterlonyho) je založena na reakci mezi antigeny a specifickými protilátkami. Základem je schopnost imunoglobulinů, především třídy M a G (IgM, IgG), vázat se minimálně na dvě částice antigenu a navzájem je propojovat, t.j. precipitovat.

 V případě dvojité imunodifúze (DID) specifické protilátky (As) a antigen (Ag) difundují v agarovém gelu. Homologní protilátky a antigeny vzájemně sérologicky reagují a vzniklý precipitát vytváří bílou precipitační linii, kterou můžeme vizuálně pozorovat. Precipitační linie se vytvoří v místě reakční rovnováhy mezi antigenem a protilátkou.

**Antigen Protilátka**

Precipitační linie

**PROVEDENÍ:**

Biologický materiál:

**Antisérum (As):** králičí anti-CMV

**Antigen (Ag):** virus mozaiky okurky (CMV)

Cucumovirus, čel. *Bromoviridae*, tvar sférický, průměr

cca ... nm\*, ssRNA, 3x dělený genom, přenos mšicemi

\*zjistíme na cvičení „Morfologie virionů“

Vybavení laboratoře: čistá podložní mikroskopická skla (76 x 26 mm), vodorovná podložka, předvážky, autoklávovatelné nádoby 100 ml, zařízení pro vysekání jamek v agarové vrstvě, membránová (případně vodní) vývěva (případně jen injekční stříkačka), 10 ml pipeta dělená + násadec, dávkovací mikropipeta 2-20 µl + špičky, mikrovlnná trouba, vlhká komůrka (Petriho miska s vlhkým filtračním papírem), fixka (příp. diamant na sklo), tmavé podložky pod podložní skla, stolní lampa

Chemikálie a použité roztoky:

 PBS pufr, pH = 7,4 (viz Dodatky)

 agar pro ELFO (připravit 1% roztok v PBS pufru)

 hovězí sérum albumin (BSA) - 1mg/ml + šťáva ze zdravé rostliny

 destilovaná voda

 KH2PO4, Na2HPO4.12H2O, KCl – k přípravě PBS pufru

 (barvení gelů: NaCl, Serva BLUE R-250, metanol, ledová kyselina octová)

Vlastní provedení:**Detekce viru mozaiky okurky (CMV)**

 Pracujeme ve skupinách po čtyřech studentech.

V autoklávovatelné nádobě si připravíme 50 ml 1% roztoku agaru pro ELFO v PBS pufru. Opatrně rozvaříme v mikrovlnné troubě, až je roztok čirý. Na vodorovné podložce si připravíme čisté podložní sklo, označíme v pravém horním rohu fixkou na sklo (Novák + skupina)\* a 10 ml skleněnou pipetou na něj naneseme 2,5 až 3,0 ml rozvařeného agaru. Agar necháme ztuhnout (min. 5 minut) a pomocí zařízení pro vysekávání jamek vysekáme v gelu jamky podle daných vzorů.

**\***

 **Novák**

 **A**

**Vzor č. 1:** **Vzor č. 2:**

Vzor pro vysekávání jamek do agaru Vzor pro zjištění identity

k detekci neznámého antigenu neznámého antigenu

Do vysekaných jamek pipetujeme po 10 µl roztoků podle níže uvedených schémat.

 1. **Schéma detekce** 2. **Schéma detekce**

 **homologního antigenu:** **identity antigenů:**

 **Ag 2 Ag 3 As**

 **Ag 1 As Ag 4** ? **Ag 1 Ag** ?neznámého

 vzorku

 **Ag 6** ? **Ag 5** ?

 V případě **detekce viru CMV**, kdy zjišťujeme přítomnost homologního antigenu v neznámém vzorku (schéma č. 1), pipetujeme do středové jamky antisérum - **As** (anti-CMV), do jamky **Ag 1** kontrolní vzorek (CMV) – **K+**, do jamky **Ag** **2** - roztok s negativním obsahem CMV (voda) – negativní kontrola - **K-**, do jamky **Ag** **3** pipetujeme negativní kontrolu - roztok BSA o koncentraci 1mg/ml a vylisovanou šťávu zdravé rostliny (kontrolujeme tím možné nespecifické reakce antiséra a vzorku); do jamek **Ag** **4, Ag 5, Ag 6** neznámé vzorky - ?.

**Identitu antigenů** (kontrolního a neznámého) zjistíme pipetováním roztoků podle schématu 2.

 Připravený gel uchováváme ve vlhké komůrce zamezující vysušení gelu. Jamky vysekáváme těsně před pipetováním roztoků a ihned po nanesení vzorků podložní sklo vložíme do vlhké komůrky. Bílé precipitační linie mezi homologními antiséry a antigeny můžeme pozorovat po 12 až 24 hodinách inkubace při pokojové teplotě.

Poznámka:

Citlivost testu můžeme zvýšit **barvením precipitačních linií** pomocí Serva Blue-R 250. Nejdříve musíme z gelu vyluhovat neprecipitované proteiny pomocí roztoku NaCl (25 g/1000 ml, 24 - 48 hodin, 2-3x 200 ml). Potom gel opláchneme v destilované vodě, usušíme při teplotě do 50 °C a barvíme v roztoku Serva BLUE R-250 po dobu 2-3 minut. Pozadí reakce odbarvíme v Serva BLUE odbarvovacím roztoku, který 2 až 3x vyměníme tak, aby bylo pozadí co nejvíce kontrastní k modře obarveným precipitačním liniím.

**VÝSLEDKY:**

Po 24 hodinách inkubace ve vlhkém prostředí při pokojové teplotě vizuálně vyhodnotíme vzniklé precipitační linie, nejlépe v nepřímém světle (okraj rozsvícené stolní lampy, viz obrázek níže), někdy i za pomocí lupy.

Jestliže se pohybují protilátky a antigen proti sobě, má výsledná linie charakter úsečky, jejíž velikost a poloha je dána množstvím jak protilátky, tak antigenu přítomného v gelu.

 Do protokolu v „Postupu“ zakreslíme vzor vysekávání jamek a schéma pipetování jednotlivých vzorků do jednotlivých jamek.

Do **samostatných obrázků** ve „Výsledcích“ zakreslíme (tužkou) přesné umístění a tvar vzniklých precipitačních linií a určíme neznámý vzorek obsahující homologní antigen. Jamky nezapomeneme opět popsat.

Při hodnocení identity antigenů rozhodneme, zda vzniklé precipitační linie mezi kontrolním antigenem a antisérem a mezi antigenem neznámého vzorku a antisérem tvoří kresbu rozšířeného písmena V (tj. úplná identita) nebo se částečně překrývají – tvorba ostruhy (částečná identita) nebo se vzájemně kříží (žádná identita) – viz obr. na cvičení.

****

Příklad vytvořených precipitačních linií; nepřímé osvětlení pomocí lampy. Foto P. Válová.

**HODNOCENÍ A DISKUSE:**

 **Zhodnotíme správnost provedení pokusu** **podle výsledků kontrolních vzorků** (tj. zhodnotíme vznik či nevznikání precipitačních linií mezi As a K+, K- a K- s BSA a šťávou zdravé rostliny).

Vyhodnotíme **umístění** a **tvar** precipitačních linií mezi antisérem (As) a neznámým antigenem (Ag?).

**ZÁVĚR:**

 **V závěru uvedeme:**

1. který neznámý vzorek obsahoval antigen;

2. kde se nacházelo místo reakční rovnováhy (a co to znamená z hlediska koncentrace obou složek);

3. zhodnotíme identitu obou antigenů – kontrolního (K+) a neznámého – Ag?.

~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~

D O D A T K Y :

**Příprava roztoků:**

PBS pufr (pH = 7,4): NaCl 8,0 g

 KH2PO4 0,2 g

 Na2HPO4.12H2O 2,9 g

 KCl 0,2 g

 Doplnit na 800 ml, upravit pH na 7,4 pomocí HCl nebo NaOH, doplnit destilovanou H2O do 1000 ml.

Serva BLUE R-250 barvicí roztok: Serva BLUE R-250 1 g metanol 450 ml

 H2O 450 ml

 led. kys. octová 100 ml

 Serva BLUE R-250 rozpustíme v metanolu a postupně přidáme zbývající složky roztoku.

Serva BLUE R-250 odbarvovač: metanol 100 ml

 led. kys. octová 100 ml

 H2O 800 ml

**Poznámky:**

**Metody detekce virových částic**

Přímý průkaz virů: - elektronový mikroskop

- kultivace na kuřecích embryích a tkáňových kulturách (Hirstův test, hemadsorpce - hemaglutinin aglutinující červené krvinky)

Průkaz antigenů: - hemadsorpce

 - imunofluorescence

 - ELISA (enzymově značená imunovazebná metoda)

 - latexaglutinace

Stanovení protilátek: - ELISA

Molekulární detekce: - polymerázová řetězová reakce (PCR)

**Použití metody DID:** - kvantitativní stanovení antigenů a protilátek

- průkaz identity antigenů různých infekčních agens při použití

 definovaných imunních sér

 - semikvantitativní analýza lidských sérologických systémů (několik

 ředění)

**Antigen:** každá struktura, která je schopna vyvolat imunitní odpověď (tvorbou protilátek v imunokompetentních buňkách a s takto vytvořenou protilátkou specificky reagovat). Z chemického hlediska protein nebo polysacharid, molekulová hmotnost zpravidla vyšší než

10000. Jako cizí je rozpoznávána pouze část makromolekuly, např. úsek několika desítek aminokyselin nebo struktura řetězců u polysacharidů (epitop, antigenní determinanta).

**Receptory** **rozpoznávající antigeny:** jsou proteiny mající vazebné místo se specifickou afinitou pro určitý antigen (povrch buněk, vnitřní strana cytoplazmatické membrány, cytoplazma). Vazba mezi receptorem a epitopem se uskutečňuje prostřednictvím nekovalentních interakcí. Čím více si receptor a epitop prostorově odpovídají, tím větší počet vazeb může vzniknout, a tím je vazba pevnější.

**Protilátka:** imunoglobulinová molekula vytvářená imunokompetentními buňkami na základě stimulu antigenem, která s tímto antigenem specificky reaguje.

**Protilátky:** tetramerní proteiny, skládající se ze dvou stejných řetězců těžkých (H) a ze dvou stejných řetězců lehkých (L). Rozeznáváme 5 strukturních a funkčních tříd: IgA, IgD, IgE, IgG, IgM. Lidský organismus může vytvářet více než 108 různých molekul protilátek.

**Imunitní reakce:** působení imunitního systému proti cizí jednotce (buňce, molekuly).

**Cvičení 5:** 4hodinové,skládá se ze dvou částí

**a) DAS - ELISA**

**(Double antibody sandwich - enzyme linked immunosorbent assay;**

**imunoenzymatická metoda s dvojitými protilátkami)**

|  |
| --- |
| *prof. RNDr. Milan Navrátil, CSc.; RNDr. Pavla Válová* |

## ÚVOD:

 Metody enzymové imunoanalýzy patří k důležitým technikám stanovení řady makromolekul (především proteinů), jejich komplexů (např. viry, buňky), ale i nízkomolekulárních látek (např. hormony, růstové regulátory). Základem všech sérologických technik a jejich modifikací je reakce protilátky s antigenem (látky, nejčastěji protein, stimulující v živočišném organismu tvorbu protilátek, které se na homologní antigeny specificky vážou).

 Běžně používanou variantou ELISA testu je v rostlinné virologii **DAS-ELISA test**, kde antigen nejdříve reaguje se specifickými protilátkami navázanými na povrch pevného nosiče a je pak detekován **specifickými protilátkami značenými enzymem**, který v případě pozitivního vzorku zviditelní reakci rozkladem vhodného chromogenního substrátu (tj. změnou barvy).

***Metoda ELISA testu se vyznačuje:***

1. vysokou specifičností (možnost identifikovat druhy virů, ale i rozlišovat jejich sérotypy\*)
2. vysokou citlivostí (možnost detekce viru až do koncentrace 0,1 - 10 µg viru/ml)
3. možností semi-kvantitativního stanovení
4. nezávislostí na morfologii virových částic
5. možností automatizace celého procesu a dostupností přístrojové techniky
6. možností zpracování velkých sérií vzorků, využívání individuálních a směsných vzorků
7. možností detekce více virů najednou (směsná antiséra)
8. nízkou cenou a relativně dlouhou trvanlivostí reagencií
9. není potřeba zvláštní příprava nebo úprava vzorků

\* u viru PPV sérotypy D a M; sérotyp D běžnější

 ELISA test umožňuje detekovat a determinovat virus. Pomocí tohoto testu lze získat i údaje o sérologické příbuznosti izolátů virů, případně stanovit sérotyp viru. Ve všech případech je výstupní informací provedeného ELISA testu soubor hodnot absorbance. Protože ELISA testem je stanovován proteinový antigen virionu, hodnota absorbance nás neinformuje přímo o stavu virové částice a o její schopnosti vyvolat infekci. Proto hodnocení ELISA testu musíme ověřovat dalšími přesnými exaktními postupy (např. biologickým testem) a využívat empirických poznatků a analogií. Nerespektování těchto faktů může vést k rozdílným závěrům, případně až ke zcela chybným závěrům.

***K nejčastějším chybám při provádění ELISA testu patří:***

1. Výskyt falešných pozitivit.
* kontaminace vzorků nebo materiálu (kapénková kontaminace: lis, špičky, mikropipety, nepřesná práce při promývání nebo pipetováni konjugátu)
1. Vysoké pozadí celé destičky včetně slepého vzorku a negativních kontrol.
* kontaminace substrátu vlivem nečistot a příměsí (styk s kovem, kontaminace enzymem)
* nedostatečné promytí mikrotitrační destičky po inkubaci konjugátu
* inkubace otevřených mikrotitračních destiček (okrajové jamky tmavnou při špatném uzavření mikrotitračních destiček během inkubace)
1. Slabá reakce všech pozitivních vzorků.
* poškození imunoreagencií
* k přípravě roztoků byla použita nekvalitní voda (soli těžkých kovů)
* před pipetováním nových roztoků nebyla destička řádně odsáta nebo vyklepnuta, nedostatečné promytí

**Provedení:**

**V tomto cvičení si pomocí DAS-ELISA metody otestujeme dříve nainokulované rostliny hrachu.**

Biologický materiál: - inokulované rostliny hrachu setého (*Pisum sativum* L.)z pokusu o přenos viru PSbMV (viz Protokol Přenos rostlinného viru)

- zdravé rostliny hrachu setého (*Pisum sativum* L.) – K-

- kontrolní infikované rostliny hrachu setého (*Pisum sativum* L.) – K+

Vybavení laboratoře:

značkovač

mikrotitrační destička + speciální krycí fólie na mikrotitrační destičku

třecí miska s paličkou, ledová lázeň

mikropipeta (200 µl) + špičky,

termostat (37 °C)

střička (nebo Pasteurova pipeta)

ručník nebo buničina na vytřepávání mikrotitrační destičky

spektrofotometr (ELISA reader) s tiskárnou

Chemikálie a použité roztoky: *(složení roztoků a uchovávání viz Dodatky)*

Laboratorní set s polyklonálními králičími protilátkami: Pea Enation Mosaic Virus – polyclonal antibodies ex rabit (Loewe)

1. zásobní roztok specifických protilátek IgG
2. koutovací (potahovací pufr)
3. PBS pufr
4. PBS-Tween pufr (promývací pufr)
5. extrakční pufr pro přípravu vzorků
6. IgG konjugát-alkalická fosfatáza (Anti-Virus\_IgG-AP-conjugate)
7. konjugační pufr
8. substrátový pufr
9. substrát: p-nitrofenylfosfát . Na2 (PNP)

**Pracovní postup:**

**Bod č. 1. – 3. provede vedoucí den před cvičením**

1. Potažení (aktivace) povrchu jamek mikrotitrační destičky specifickými proti1átkami.
* zásobní roztok IgG ředíme podle návodu koutovacím pufrem (200x, tj. 2 µl/598 µl) a pipetujeme po 100 µl do jednotlivých jamek
* inkubujeme při 37 °C po 4 hodiny
1. Promytí destičky - destičku 4 x promyjeme promývacím pufrem.
2. Příprava vzorků a inkubace vzorků s IgG - Vzorky připravíme homogenizací v extrakčním pufru na ledu (ředění 5x, tj. 0,5 g vzorku + 4,5 ml pufru) a pipetujeme po **200 µl** do jednotlivých jamek, každý vzorek, včetně kontrol (viz schéma pipetování vzorků).
* nezapomeneme kromě vzorků na kontroly: **pozitivní kontrolu**, **negativní kontrolu** a **slepý vzorek** (blank; do jamky pipetujeme **200 µl** pouze extrakčního pufru).
* inkubujeme při +4 °C přes noc (mikrotitrační destičku přikryjeme speciální fólií nebo polyetylénovým sáčkem)

**Schéma pipetování vzorků a kontrol pro jednoho studenta:**

 vzorek (homogenát) z rostliny hrachu R1 nebo R2 pozitivní kontrola (K+)

 negativní kontrola (K -)

blank (BL) (slepý vzorek)

**Postup na cvičení:**

1. Destičku s přes noc nakoutovanými protilátkami a vzorky **4x promyjeme promývacím pufrem**.
* pomocí střičky (nebo Pasteurovy pipety), mezi promýváním necháme 2-3 min stát, důkladně vyklepáváme na měkké podložce (složený ručník, buničina)
1. Detekce zachyceného antigenu **konjugátem IgG-alkalická fosfatáza**.
* zásobní roztok IgG-alkalická fosfatáza ředíme podle návodu konjugačním pufrem (200x, tj. ….) a **pipetujeme po 100 µl do jednotlivých jamek**
* zakryté mikrotitrační destičky **inkubujeme při 37 °C po 4 hodiny** (pro účely cvičení 1,5 hod při 37 °C)
1. Destičku **4 x promyjeme promývacím pufrem** (viz bod 4.)
2. **Přidáme substát**, tj. p-nitrophenylfosfát . Na2 (PNP), **v substrátovém pufru**.
* Příprava roztoku (temperovaného) substrátu: 0,75 mg p-nitrophenylfosfátu. (PNP) do 1 ml substrátového pufru bezprostředně před pipetováním!
* **pipetujeme po 100 µl do jednotlivých jamek**
1. Barevnou reakci alkalická fosfatáza-substrát **hodnotíme po 60 minutách inkubace ve tmě** (ve cvičení po 30 minutách) pomocí spektrofotometru při 405 nm (reakci můžeme zastavit napipetováním 50 µl 3M KOH do každé jamky).
* Mikrotitrační destičku vyhodnotíme pomocí ELISA readeru a hodnoty vytiskneme.
* **Stanovíme rozmezí hodnot absorbance pro pozitivitu vzorku.**

Do pracovního postupu si zakreslete **schéma pipetování** kontrol a vzorků do mikrotitračních jamek a **nákres schématu provedení DAS-ELISA metody** pro detekci PEMV viru (viz prezentace na aktuálním cvičení).

**VÝSLEDKY A HODNOCENÍ:**

Do části „Výsledky“ si do **druhého schématu** zaznamenejte vzniklé barevné reakce. Zpracujte **tabulku**, kde k jednotlivým hodnoceným jamkám (kontroly a vaše vzorky) doložte hodnoty absorbance (A) z  ELISA readru. List z ELISA readru - s vyznačenými políčky vašich vzorků a s hodnotami absorbance - je součástí protokolu.

**Zhodnoťte správnost provedení pokusu** (výsledky kontrol K+, K- a blank).

Své výsledky srovnejte s očekávanými reakcemi.

**Příklad tabulky: Název……**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Vzorky** **a kontroly**  | **Vizuální hodnocení****příznaků****na rostlinách** | **Barevná reakce****v jamkách****DAS-ELISA****testu** | **Absorbance****z ELISA readru**při 405 nm | **Hodnocení****přítomnosti** **viru PSbMV**(pozitivní xnegativní) |
| Vzorek z infikovaného hrachu |  |  |  |  |  |  |
| K+ |  |  |  |  |  |  |
| K- |  |  |  |  |  |  |
| Blank |  |  |  |  |  |  |

 **Legenda:** P = pozitivní reakce; N = negativní reakce

**ZÁVĚR:**

Srovnejte výsledky z vizuelního pozorování příznaků na inokulovaných rostlinách (viz Protokol „Mechanický přenos viru“) s hodnotami dosažených pomocí DAS-ELISA reakce (vizuálními, tj. barvou roztoku, a hodnotami absorbance).

Zhodnoťte úspěšnost provedení přenosu viru PSbMV na zdravou rostlinu a jeho úspěšné (případně neúspěšné) uchovávání na rostlině. Berte v úvahu, že správně nainokulovaná rostlina obsahuje virus PSbMV, ale rostlina nesmí hned odumřít!

~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~

DODATKY:

**Příprava roztoků:**

1. Koutovací (p*otahovaci) pufr*

1,59 g Na2C03

 2,93 g NaHCO3

Rozpustíme v destilované vodě a pH upravíme na 9,6; doplníme na 1000 ml destilovanou vodou.

2. *PBS pufr*

 8,0 g NaCl

 0,2 g KH2PO4

 2,9 g Na2HPO4.12H20

 0,2 g KCl

Rozpustíme v destilované vodě a pH upravíme na 7,4; doplníme na 1000 ml destilovanou vodou.

3. *PBS-Tween pufr (promývací pufr)*

 0,5 ml Tween 20 rozpustíme v 1000 m1 PBS pufru.

4. *Extrakční pufr* pro přípravu vzorků

 0,5 ml Tween 20

 2,0 g polyvinylpyrrolidon K-25

5,0 g vaječný albumin (nebo "skin milk", hovězí sérový albumin = BSA)

Rozpustíme v 1000 ml PBS pufru.

5. *Konjugační pufr*

 0,5 ml Tween 20

 20,0 g polyvinylpyrolidon K-25 (můžememe vynechat)

 2,0 g vaječný albumin (nebo BSA, "skin milk")

Rozpustíme v 1000 ml PBS pufru.

6. *Substrátový pufr*

 97,0 ml diethanolamin

Rozpustíme v 800 ml destilované vody, pH upravíme na 9,8 1M HC1 a doplníme do 1000 ml destilovanou vodou.

1. *Substrátový roztok*

1 mg/ml 4-nitrophenyl fosfát di-Na-salt v substrátovém pufru; připravit těsně před použitím!!!

**Uchovávání chemikálií a roztoků:**

*pufry* - uchovávat při +4 °C

*zásobní roztok specifických protilátek IgG* proti antigenu PPV - uchovávat při +4 °C

*konjugát IgG-alkalická fosfatáza* - uchovávat při +4 °C

*p-nitrophenylfosfát.**Na2* *(PNP)*- uchovávat při -20 °C

**Cvičení 6:** druhá část cvičení

**b) Virus chřipky (Influenza virus)**

|  |
| --- |
| *RNDr. Pavla Válová* |

Viz i údaje z dokumentu kanadské televize: Tajemství života – Vetřelci, promítaného na

cvičení.

## ÚVOD:

(Původ slova influenza - z italštiny *= vliv*, původ myxo- z řečtiny: *myxa = sliz*)

**Klasifikace:** Chřipkové viry A, B, C patří do čeledi *Orthomyxoviridae*. Jsou děleny do tří rodů - *Influenzavirus* A*, Influenzavirus* B *a Influenzavirus* C*,* který se od A a Bodlišuje mnoha morfologickými i biologickými vlastnostmi.

**Struktura chřipkového viru:**

* nukleokapsida s helikální symetrií obalená membránou z fosfolipidové dvojvrstvy z povrchové membrány hostitelské buňky v přibližně kulovitý tvar, možné jsou i protaženější tvary (pleiomorfní tvar)
* průměr virionu 90 - 120 nm
* jednořetězcová (ss) RNA (-RNA) kódující 10 polypeptidů
* segmentovaný genom (rody A, B - 8 segmentů; C – 7 segmentů)

**Hostitelé:** **virus chřipky A** - přirozený rezervoár: migrující vodní ptactvo (např. kachna), savci (např. prase, kůň, tuleň, velryba), člověk

**virus chřipky B** - v přirozeném systému pouze lidský virus (genom větší, delší

 nekódující sekvence)

**virus chřipky C** - člověk, prase (virus chřipky C vyvolává pouze sporadická, lehká respirační onemocnění horních cest dýchacích a spojivek)

**Onemocnění: chřipka** (způsobená chřipkovými viry typu A a B) je závažné systémové onemocnění týkající se hlavně respiračního traktu. Projevuje se pouze jako akutní onemocnění bez latentní fáze (krátká inkubační doba – 18 až 48 hod). Příznaky: kašel, bolest hlavy, horečka, bolesti svalů, malátnost. U oslabených jedinců, starých lidí a malých dětí může dojít i k úmrtí. Vyskytuje se sezónně v chladném období roku a způsobuje často epidemie.

**Antigenní vlastnosti viru chřipky:**

Virus chřipky prodělává neustále antigenní změny, aby unikl specifické imunitní reakci člověka, který již v minulosti onemocněl. Může člověka infikovat několikrát za život. Pokud dojde k velké změně v antigenní výbavě viru, označujeme takový virus jako nový **kmen**.

Nejdůležitější antigeny na povrchu viru (cca 500 výběžků o velikosti 10 – 14 nm):

* **hemaglutinin** (H) – trimer (podoba štíhlé tyčinky) – hlavní povrchový antigen, usnadňuje průnik virionu do buňky (glykoprotein)
* **neuraminidáza** (N) – tetramer (houbovitý tvar) - umožňuje uvolňování virionu z buňky (glykoprotein)
* **protein M2** – prostupuje obalem jako iontový kanál
* **protein M1** – matricový membránový protein, stabilizuje virovou částici, důležitý pro kompletaci (pro maturaci a uvolňování z buňky)

# ***Influenzavirus* A:** V současnosti je známo 16 různých podtypů hemaglutininů (H1-H16) a 9 neuraminidáz (N1-N9). Existují kmeny s různými kombinacemi antigenů (např. H1N1, H2N1, H3N2 .... všechny se vyskytují u ptáků; u lidí jen některé kombinace). Při poslední epidemii (2013/2014) u nás kolovaly, kromě chřipky B, hlavně kmeny H1N1 a méně H3N2).

**Změna antigenních vlastností:**

Antigeny se postupně mění - především pomocí **mutací.** Frekvence mutací je obecně u virů vysoká (přirozená mutabilita - mutace jedné virové částice ze 100 000); zvláště ssRNA podléhá mutacím snadněji než DNA a poměrně často. Letální mutace jsou eliminovány.

Ke změně antigenních vlastností dochází kromě mutacemi i **přeskládáním genomu** (angl. reassortment)- i mezi lidskými a zvířecími druhy. Nová genomová kombinace (reassortant) znamená zvýhodnění viru - rychlé šíření, protože v lidské nebo zvířecí populaci proti němu neexistují protilátky.

Postupné malé změny antigenů bodovými mutacemi se označují jako **antigenní posun (drift)** a způsobují, že je populace na nové driftové varianty vnímavější a vznikají epidemie. V případě změn antigenních vlastností tzv. **antigenním skokem (shift) –** výměnou částí genomu - vzniká nový kmen, proti kterému nejsou v populaci vytvořeny protilátky, a může pak vzniknout **pandemie**.

# Evoluce chřipky probíhá hlavně v oblasti jihovýchodní Asie, kde lidé, prasata a kachny žijí dohromady (prasečí chřipka vznikla v Mexiku). Antigenní změny jsou zaznamenávány každý rok.

***Influenzavirus* B:**

Tyto viry nejsou dělené do subtypů; mohou způsobit onemocnění a smrt, ale většinou jsou spojené s mírnějšími epidemiemi než viry chřipky typu A; zatím nezpůsobily pandemii.

**Označení kmenů chřipky:**

např. **A/South Carolina/1/18 (H1N1)** = „Španělská chřipka“

# rod/geografické určení/pořadové číslo kmene/rok izolace (subtyp antigenu H a N)

# **Historie pandemií:** (Pandemie *– z řečtiny: pan = všechen, demos = lid*)

 od roku 1700 do 1890 – předpoklad 10 pandemií

 **1890** – H2N2

zjištěno pomocí tzv. séroarcheologie

**1900** – H3N8

# **1918-1919** - **“Španělská chřipka”** – H1N1 - zemřelo 40-50 miliónů lidí

 virus se znovu objevil r. 1977

**1957-1958** - **"Asijská chřipka"** - kmen H2N2, 2-4 milióny mrtvých

**1968-1969** - **„Hongkongská chřipka“** - kmen H3N2, 1-2 milión mrtvých

 dodnes cirkuluje; objev v Hong Kongu

1977 – hrozba „Ruská chřipka“ („Red flu“) - kmen H1N1 (jen epidemie; únik

z laboratoře???)

1996 – hrozba prasečí chřipky; objevila se v New Jersey v USA

1997 – první hrozba **ptačí chřipky**, kmen H5N1; objevila se v Hong Kongu

2009 – prasečí/Mexická chřipka, oficiálně Pandemic (H1N1) - A(H1N1); objevila se v Mexiku – organizací WHO vyhlášena v červnu 2009 pandemie; oficiálně 18 500 obětí (ve skutečnosti daleko více)

2013 – ptačí chřipka – nový kmen H7N9, původ ….

#### **Definice chřipkové pandemie (**WHO - Světová zdravotnická organizace, listopad 2002):

#### "Chřipkové pandemie jsou náhlé a nepředvídatelné a zatím nevyhnutelné události."

Pandemie přicházejí ve vlnách a trvají 1 až 2 roky.

**3 podmínky pro vznik pandemie:**

- náhlý vznik nového viru chřipky A s odlišným H než se v nedávné době vyskytoval

- absence imunity proti novému kmenu v populaci

- přímé šíření z člověka na člověka

Aby virus způsobil pandemii, musí být **vysoce patogenní a přenosný.** Předtím, než způsobí pandemii, může novým subtypům trvat i několik let, než se adaptují na lidského hostitele.

**Proč dosud nedošlo k pandemii ptačí chřipkou?**

* Provedení rozsáhlých protiepidemiologických opatření
* Možný vliv protilátek proti neuraminidázám N1 a N2
* Nevytvoření nové reassortanty (současné genotypy H5N1 nejsou schopny se šířit

z člověka na člověka)

**Obrana organismu:**

Po prodělání chřipky se vytvoří protilátky, které zajišťují až 20 let obranu organismu proti stejnému kmeni s nezměněnými antigenními vlastnostmi.

K produkci **vakcíny** proti chřipce se používají aktuální antigeny cirkulujících kmenů (nyní kmeny chřipky A subtypy H1N1 a H3N2 a kmeny chřipky B). Antigenní složení chřipkových vakcín je každoročně upravováno podle doporučení Světové zdravotnické organizace (WHO) pro severní polokouli a doporučení EU.

**Složení vakcíny pro minulé období 2012/2013 pro severní polokouli:**

A/California/7/2009 (H1N1)pdm09-like virus

A/Victoria/361/2011 (H3N2)-like virus
B/Wisconsin/1/2010-like virus

**Složení vakcíny pro období 2013/2014:**

A/California/7/2009 (H1N1)pdm09-like virus

A/Victoria/361/2011 (H3N2)-like virus
B/Massachusetts/2/2012-like virus

**Složení vakcíny pro období 2014/2015:**

A/California/7/2009 (H1N1)pdm09 - použitá varianta kmene (NIB-74xp) odvozená z kmene

 A/Christchurch/16/2010

A/Texas/50/2012 (H3N2) - použitá varianta kmene (NYMC X-223A)

B/Massachusetts/02/2012 - použitá varianta kmene (NYMC BX-51B)

Připraveno v oplodněných slepičích vejcích ze zdravých kuřecích chovů.

<http://www.vakciny.net/doporucene_ockovani/chripka.html>; <http://www.google.cz/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CCAQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.sukl.cz%2Fmodules%2Fmedication%2Fdownload.php%3Ffile%3DSPC64012.pdf%26type%3Dspc%26as%3Dfluarix-spc&ei=yDD7U5rzM8f3Oui3geAL&usg=AFQjCNEURtzqLYWF0Dj3CVj_5BAXRKoLsg&bvm=bv.73612305,d.ZWU>

**Složení vakcín:** Inaktivované trivalentní očkovací látky proti chřipce obsahující neživé, subjednotkové (např. očkovací látka Fluad) nebo štěpené (např. očkovací látka Vaxigrip) vakcíny – dvě proti chřipce A (H1N1 a H3N2) a jednu proti B. Píchají se do svalu nebo pod kůži. Vznik imunity u 60-80 % očkovaných. Problémy mohou nastat u některých jedinců v důsledku alergie na vaječné bílkoviny (tvorba vakcín ve vejcích).

**Protivirové přípravky (antivirotika):**

- inhibitory funkce **proteinu M2** (amantavidin, rimantadin) – proti chřipce A; zaznamenán vznik rezistence

- nová skupina – inhibitory funkce virové **neuraminidázy**

(**zanamivir** podávaný inhalačně a **oseltamivir** – tj. preparát Tamiflu - podávaný perorálně) – účinkují proti chřipce A i B

- i inhibitory **proteinu M1**

**Detekce viru chřipky:**

virologická oddělení: Olomouc – např. Laboratoře Mikrochem

Praha – SZÚ, referenční laboratoř pro chřipku

## Přímá detekce viru

* pomocí **elektronové mikroskopie** – pouze výzkumný význam
1. **Kultivační techniky:** záchyt jen v akutní fázi onemocnění - výtěr z nosohltanu a nosu na vatové tampóny do speciálního odběrového média

**Detekce antigenů:**

* **kultivace virů na kuřecích embryích** 10 dní starých, pomnožení virů, průkaz pomocí tzv. **Hirstova testu (**princip: hemaglutinin na povrchu chřipkového viru aglutinuje některé červené krvinky, např. kuřecí nebo morčecí)
* **kultivace na TK** - zjištění viru chřipky pomnoženého na buňkách MDCK, odvozených z psí ledvinné tkáně, pomocí tzv. **hemadsopce** (použití morčecích krvinek)
* **detekce viru v tekutině** u chřipky typu A, B (pouze přímo v odebraném materiálu při vyšší koncentraci virových částic ve vyšetřovaném vzorku) - pomocí **ELISA** testu

**3. Detekce cílových sekvencí virové NK metodou RT-PCR** (polymerázová řetězová reakce s využitím reverzní transkriptázy)

**4. Sérologická detekce -** nejčastější

* **Stanovení protilátek** pomocí tzv. **komplement fixační reakce (KFR)**, která se hodnotí vizuálně. Odběr dvou vzorků krve - první na začátku onemocnění, druhý za 2 týdny; pokud proběhlo onemocnění, sledujeme čtyřnásobné nebo vyšší zvýšení hladiny protilátek nebo tzv. serokonverzi (= vytvoření protilátek oproti původní nepřítomnosti).

~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~

**Poznámky:**

**Respirační infekce:**

- závažné zdravotní i politické důsledky (např. v r. 1995 bylo postižených 395 miliónů lidí);

poměrně častá úmrtí na respirační nemoci (pneumonie), následující po prodělaném chřipkovém onemocnění (r. 1995 - 4,4 mil. lidí);

- u běžné chřipky: v EU každoročně onemocní 40 - 50 mil. lidí, z toho 90 - 120 tis. umírá!!!; u nás: každoročně umírá cca 2 000 lidí onemocnělých chřipkou - často na následné onemocnění, z toho několik desítek až stovek umírá přímo na chřipku.

**Komplement fixační reakce (KFR)** = Konzumpce (spotřeba) komplementu

**Princip:** V krvi je obsažen komplement (= soustava asi 9 enzymů), který je schopen navázat se na komplex protilátka-antigen. Ve vyšetřovaném séru se musí předem zničit přítomný komplement (je termolabilní → 0,5 hod. při 56 oC). Při vyšetření používáme komerčně dodávaný morčecí komplement, beraní krvinky a amboceptor (tj. králičí protilátka proti beraním krvinkám) a komerčně připravený antigen.

**Postup:** Virový antigen je smíchán přes noc při 4 oC s různým ředěním séra pacienta a komplementu, poté se přidají senzibilizované beraní krvinky. Pokud je ve vzorku séra protilátka, reaguje s komerčně připraveným antigenem; komplement se na tento komplex (protilátka-antigen) naváže (tzn. je tím spotřebován) a přidané beraní krvinky s amboceptorem nejsou lyzovány. V jamce destičky vznikne terčík nezlyzovaných krvinek. Pokud ve vzorku séra protilátka není, komplex protilátka-antigen nevznikne, komplement se nespotřebuje a zlyzuje beraní krvinky s amboceptorem → vznikne čirý roztok.

**HIT – Hemaglutinačně inhibiční test:** zjišťuje virové protilátky v séru pacienta

Test pracuje na principu reakce antigen – protilátka a hemaglutinace červených krvinek (kuřecí, morčecí – jsou těžší, mají větší jádro). Viry mají na svém povrchu antigeny, díky nímž se shlukují (aglutinují) erytrocyty. Specifické protilátky vytvořené v organismu tuto hemaglutinaci blokují. Virus s účinkem hemaglutinace je smíchán se sérem pacienta, které je ředěné dvojkovou řadou (1-2-4-16-32-64-…), pak jsou přidány červené krvinky (např. kuřecí). Titr hemaglutinačně inhibiční protilátky se po prodělaném onemocnění zvyšuje z méně než 8 v akutní fázi nemoci na 64.

**Doporučená literatura:**

**Bednář, M. a kol. (1996):** Lékařská mikrobiologie. Praha, Marvil.

**Beran, J. Havlík J. (2005):** Chřipka. Klinický obraz, prevence, léčba. 2. rozšířené vydání. Praha, Maxdorf, 1-175.

**Čiampor, F. (2012):** Chrípka – minulost´ a prítomnost´. Vesmír 2012/1: 18-21.

**Články o chřipce v časopisech:** Vesmír 7, 367, 1997/7; 2012/1\*; Živa 1/2002; 1/2012\*; National Geographic, říjen 2005.

**Havlík, J., Beran, J. (2002):** Chřipka – klinický obraz, prevence a léčba, Maxdorf, Praha.

**Konvalinka, J., Machala, L. (2011):** Viry pro 21. století. Academia, Praha 2011, 144 str.

**Konvalinka,J., Machala, L. (2012):** Chřipka – infekční evergreen. Živa 1/2012: 2-4.

**Krejsek, J., Kopecký, O. (2004):** Klinická imunologie. Nucleus HK. (Influenza a imunitní systém, str. 440-441)

**Nečas, J., Bartošíková, L., Perlík, V., Bartošík, T., Fráňa, P. (2009):** Prasečí (mexická) chřipka – epidemiologie, diagnostika, terapie. Praktické lékárenství 5 (5): 229-232.

**Tůmová, B. (2009):** Ptačí chřipka – trvalá hrozba pandemie. Grada Publishing, a.s.

**Votava, M. a kol. (2003):** Lékařská mikrobiologie speciální. Neptun, Brno.

**Internet:**

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/index.htm>

[www.who.int](http://www.who.int); (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/avian_influenza/en/>) <http://www.eurosurveillance.org/index-02.asp>

<http://www.szu.cz/>

**Očkování proti chřipce:**

<http://www.vakciny.net/doporucene_ockovani/chripka.html>

<http://www.who.int/influenza/>

<http://www.who.int/influenza/vaccines/virus/201302_h5h7h9_vaccinevirusupdate.pdf>

**Pandemický plán České Republiky:**

<http://www.mzcr.cz/verejne/obsah/pandemicky-plan-cr_1093_5.html>

**Cvičení 6:**

**Seminář: Viry v ČR důležité z epidemiologického hlediska**

|  |
| --- |
|  *RNDr. Pavla Válová* |

Viz prezentace studentů na cvičení

**Doporučená literatura:**

**Konvalinka, J., Machala, L. (2011):** Viry pro 21. Století. Academia, Praha, 144 str.

**Votava, M. a kol. (2003):** Lékařská mikrobiologie speciální. Neptun, Brno.

Přednášky prof. Milana Navrátila KBB/HUVIR Humánní virologie (<http://genetika.upol.cz>)

<http://www.szu.cz/uploads/documents/CeM/HIV_AIDS/rocni_zpravy/2012/HIV_AIDS_08_2012.pdf>

**Cvičení 7:** skládá se ze dvou částí

**a) Stanovení KONCENTRACE VIROVÝCH částic**

 **ve fágovém lyzátu plakovou metodou**

|  |
| --- |
| *RNDr. Pavla Válová, prof. RNDr. Milan Navrátil, CSc.* |

## ÚVOD:

 ***Bakteriofágy*** jsou viry bakterií. Jejich reprodukční cyklus může probíhat pouze uvnitř hostitelského organismu a skládá se z několika fází: adsorpce, penetrace nukleové kyseliny, z  nitrobuněčného vývoje a lyze bakteriální buňky. Podle způsobu interakce fága a hostitelské buňky rozdělujeme fágy na ***virulentní*** *(lytický cyklus)* a ***temperované*** *(mírné, lytický i lyzogenní cyklus).*

 Morfologii fágových částic můžeme sledovat pomocí elektronového mikroskopu, většina se skládá z hlavičky a bičíku (velikost: hlavička 40-150 nm, bičík - až 200 nm). Některé typy bakteriofágů však mají pouze hlavičku, jiné podobu flexibilního vlákna.

Ke stanovení koncentrace fágových částic v suspenzi se běžně používá ***plotnová metoda*** (také metoda dvouvrstevného agaru) využívající tvorby tzv. plaků (viz dále).

 Postup, kterým určujeme, kolik fágových částic tvořících plaky (plaque-forming units, PFU) je přítomno v 1 ml fágového lyzátu, označujeme jako ***titraci.*** Odměřené množství vhodně naředěného fága smísíme s přebytkem citlivého kmene ve 3 ml 46 °C teplého 0,6% agaru. Směs nalijeme na Petriho misky s 1,5% živným agarem a po ztuhnutí misky ukládáme dnem vzhůru do termostatu při 37 °C. Protože bakterie jsou přítomny ve velkém přebytku, každá fágová částice infikuje jednu bakterii. Neinfikované baktérie se množí a vytvoří souvislý růstový povlak na povrchu misky. Každá infikovaná bakterie je v krátké době (během 20-30 minut) lyzována a uvolňuje několik set fágových částic, které napadají a lyzují sousední bakterie. Pak dojde k zastavení této řetězové reakce poklesem bakteriálního metabolismu, na němž závisí množení fága. Okrsek lyze se zatím zvětší natolik, že je patrný jako kruhová zóna zbavená baktérií - tyto zóny se nazývají ***plaky***. Jsou vždy odvozené od jediné infekční částice. Plaky vytvořené virulentními fágy jsou **jasné** (všechny infikované bakterie jsou lyzované), zatímco temperované fágy tvoří **kalné** plaky, protože v místě plaku rostou imunní, lyzogenní bakterie (kolonie bakterií).

**PROVEDENÍ:**

Biologický materiál: *Staphylococcus aureus* SA 812 **(infekční organismus!!!)**

 fág 812 (fágový lyzát)

Vybavení laboratoře:

ultratermostat s třepačkou (35 °C)

vodní lázeň (45 °C - 47 °C)

minutky (hodinky)

 sterilní zkumavky + stojany na zkumavky

 sterilní dělené pipety - 10 ml a 1 ml (v alobalu) + pipetovací násadce

 dávkovací mikropipeta (20 - 200 µl) + stojan na mikropipety

 sterilní špičky na dávkovací mikropipetu (žluté)

 sterilní Erlenmayerovy baňky - 25 ml, 100 ml, 500 ml

 Petriho misky o průměru 9 cm s 1,5% MPA (temperované)

 kádinka s dezinfekčním roztokem (na odkládání použitých špiček)

 podnos s dezinfekčním roztokem na odkládání použitého materiálu

 mikrovlnná trouba (na rozvaření MPA 0,6%)

popisovač (Centrofix 1736)

gumové rukavice (**práce s infekčním materiálem !!!**)

ústní maska

školní mikroskop CHK-2 Olympus (k prohlídce plaků)

Chemikálie a použité roztoky: (složení viz DODATKY)

 masopeptonový bujón (MPB)

 masopeptonový agar (MPA) - 0,6 % (MPB + 0,6 % agar-agar) fosfátový pufr 0,067 mol/l, pH = 7,2

 CaCl2 - 0,22 % vodný roztok

Incidur SP - 0,75% (dezinfekční roztok na pomůcky)

Spitaderm (dezinfekce na ruce; **používá se před umytím rukou**)

**Pracovní postup:**

**Příprava bakteriální suspenze SA 812:** (provede vedoucí cvičení)

***1. den:*** *Bakterie*  ***Staphylococcus aureus SA 812*** *(kultivovaný ve zkumavce na šikmém MPA 1,5%, přeočkovávaný 1x za dva měsíce a uchovávaný v chladničce při 4 °C) sterilně přeneseme bakteriální kličkou do 20 ml tekutého MPB v 100 ml Erlenmayerově baňce a kultivujeme přes noc v biologickém ultratermostatu na třepačce při 30 °C.*

***2. den:*** *1 ml připravené suspenze s SA 812 přidáme druhý den do 50 ml MPB (v 500 ml Erlenmayerově baňce; temperace na 35 °C) a kultivujeme 4 hod. v ultratermostatu na třepačce při cca 35 °C. Pomnožením bakterií se roztok* *zakalí.*

**Postup vlastního stanovení počtu fágových částic v lyzátu plotnovou metodou** (viz schéma postupu v návodu i na tabuli):

1. K 50 ml suspenze SA 812 přidáme 0,22% roztok CaCl2 v poměru 1 ml CaCl2 : 9 ml suspenze a inkubujeme v ultratermostatu při 35 °C 10 minut za současného protřepávání.
2. Do mikrovlnné trouby dáme rozvařit 0,6% masopeptonový agar (MPA) v erlence.
3. Připravíme si logaritmickou desítkovou ***zřeďovací řadu fága 812*** (10-1 až 10-5) - **použitá zředění závisí na aktuální koncentraci fágových částic!!! – viz aktuálně na cvičení**): do **pěti sterilních zkumavek** pipetujeme po 0,9 ml fosfátového pufru, do první přidáme 100 µl fágového lyzátu, důkladně protřepeme a 100 µl ředěné suspenze fága přeneseme do druhé zkumavky s pufrem. Analogicky postupujeme až do poslední zkumavky - viz schéma. Přenášíme přesný objem a dobře protřepáváme!
4. Do **tří sterilních zkumavek** pipetujeme po 0,9 ml připravené suspenze SA 812 s CaCl2.
5. Do kádinky s destilovanou vodou umístěné ve vodní lázni 47 °C si dáme temperovat tři krátké sterilní zkumavky.
6. Ze zřeďovací řady fága (viz bod 2) přeneseme po 100 µl z ředění **10-3 až 10-5** do zkumavek se suspenzí SA 812 + CaCl2 a inkubujeme 10 - 15 minut při pokojové teplotě za občasného protřepávání (10 minut je dostačující). **Postupujeme od největšího zředění k nejmenšímu.**
7. Připravíme si **tři Petriho misky** s MPA 1,5% (na boční hranu víka napíšeme Centrofixem stupeň ředění a svůj monogram).
8. Do **tří vytemperovaných zkumavek**, které vložíme do kádinky s teplou vodou, pipetujeme po 3 ml rozvařeného 0,6% MPA (nahřátou skleněnou pipetou) a přeneseme na pracovní místo.
9. Postupně (opět od největšího zředění k nejmenšímu) přeneseme po 100 µl suspenze SA 812 s fágem do zkumavek s  vytemperovaným MPA 0,6%, důkladně promícháme a ihned nalijeme na agarovou plotnu. Misku uzavřeme a krouživým pohybem rozprostřeme agarovou suspenzi po celém povrchu plotny. Necháme ztuhnout (cca 5 min) a obrácené dnem vzhůru umístíme do termostatu. Inkubujeme při 37 °C do druhého dne.

***3. den***

1. Následující den spočítáme vytvořené plaky v jednotlivých Petriho miskách a stanovíme počet fágových částic tvořících plaky (PFU = plaque-forming units) na

1 ml fágového lyzátu.

1. Některé vytvořené plaky **prohlédneme** pod malým zvětšením **mikroskopem**.

**VÝSLEDKY:**

* Do tabulky (viz příklad) si zapište získané **počty plaků v Petriho miskách** u jednotlivých ředění zřeďovací řady fágového lyzátu.
* Vypočtěte **průměrný počet** fágových částic schopných tvořit plaky (PFU) v 1 ml fágového lyzátu.
* Zakreslete **schéma vlastního provedeného pokusu**.
* Popište **tvar, velikost** (v mm) **a vzhled** vytvořených plaků (viz vzhled plaků pod mikroskopem!).
* Na základě charakteru plaků rozhodněte, zda se jedná o fága virulentního nebo temperovaného (mírného).

**Poznámka:** Při počítání plaků vycházíme z předpokladu, že každá životná fágová částice vytvoří jeden plak, tedy kolik je na plotně plaků, tolik bylo v 100 µl odpovídajícího ředění fágových částic. Počet plaků vynásobíme použitým ředěním (zřeďovací řada fága + další ředění suspenzí SA), čímž získáme počet fágových částic schopných tvořit plaky (PFU) přítomných v 0,1 ml neředěného fágového lyzátu a ten dále přepočteme na 1 ml.

**HODNOCENÍ A DISKUSE:**

 Zhodnoťte správnost provedení pokusu a zdůvodněte případné odchylky od návodu. Vaši zjištěnou hodnotu srovnejte s výsledky svých kolegů a zhodnoťte přesnost vaší práce (přesnost pipetování, homogenizace použitých roztoků).

**ZÁVĚR:**

 V závěru uveďte, kolik fágových částic tvořících plaky (PFU) bylo **průměrně** v **1 ml** výchozího fágového lyzátu a jaký charakter měly vytvořené plaky – tj. zda sledovaný fág patří mezi fágy virulentní nebo temperované.

☺

**Příklad tabulky 1:** Název (doplňte)…

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Ředění****ředicí řady****fágového lyzátu** | **Počet plaků****v Petriho misce** | **PFU\*****v 1 ml fágového lyzátu** | **Průměrná hodnota PFU/1 ml** |
|  |  |  |  |
|  |  |  |
|  |  |  |

\* Plaque-forming units – fágy tvořící plaky

**Tab. 2:** Srovnání získaných hodnot PFU v 1 ml s hodnotami spolužáků

|  |  |
| --- | --- |
| **Získané** **hodnoty** | **Průměrná hodnota****PFU/1 ml** |
| vlastní |  |
| spolužáci |  |
|  |
|  |
|  |

~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~

DODATKY:

**Složení používaných bakteriálních půd a roztoků:**

**MPB - Nutrient Broth w/1% Peptone (HiMedia)**

Beef-extract (masový extrakt).......................10 g

Pepton .............................................………. 10 g

NaCl ............................................................ 5 g

destilovaná voda ..................................... 1 000 ml pH = 7,4

**Agar:** Agar-Agar pro bakteriologii puriss.

**1,5% MPA - Nutrient Agar w /1% Pepton MPA (HiMedia)**

 Beef-extract (masový extrakt)....................... 5 g

Pepton .............................................………. 10 g

NaCl ............................................................ 5 g

agar .............................................................. 15 g

destilovaná voda ..................................... 1 000 ml pH = 7,4

**Fosfátový pufr 0,067 mol/l , pH = 7,2 :**

složka A ....... KH2PO4 .................... 9,078 g/l destilované vody

složka B .........Na2HPO4 . 12 H2O.... 23,900 g/l " "

A : B = 3 : 7 - k 7 dílům složky B postupně přidáme 3 díly složky A, změříme pH a případnou odchylku upravíme pomocí 0,1 mol/l HCl nebo 0,1 mol/l NaOH

**CaCl2 0,22% :** 220 mg CaCl2 doplníme do 100 ml destilovanou vodou

**Bakteriální kmen *Staphylococcus aureus* - SA 812:**

 Kmen SA 812 přechováváme ve zkumavce na šikmém agaru MPA 0,8% v chladničce při

4 °C; 1 x za dva měsíce jej přeočkujeme na čerstvé médium, dva dny kultivujeme při pokojové teplotě a po namnožení bakterií přeneseme do chladničky.

**Doporučená literatura:**

**Votava, M. a kol. (2003):** Lékařská mikrobiologie speciální. Neptun, str.: 364-365.

**Doškař, J. (2001):** Bakterie a jejich viry. Živa 3, 2001, str. 101-104.

**Petriho miska s vytvořenými plaky** (Foto P. Válová)



**Mikrofotografie vytvořených plaků** (Z = 40x, foto P. Válová)ů

Vlevo: virulentní fág se všemi zlyzovanými bakteriemi, vpravo: plak s nárůstem imunních bakteriálních kolonií.

 

**Schéma stanovení PFU fága plakovou metodou**

**100 μl**

10-2

10-3

10-4

10-5

10-6

**100 μl**

**100 μl**

10-1

**0,9** ml

fosfátový pufr

**100 μl**

**100 μl**

**100 μl**

Neředěný

fágový lyzát

**0,9** ml

suspenze SA + CaCl2

Inkubace

10 – 15 min

**100 μl**

**100 μl**

**100 μl**

**3 ml**

0,6% MPA

47 °C

Dobře promíchat

a celý obsah neprodleně vylít na P. misku

**vše**

**vše**

**vše**

**Petriho misky**

1,5% MPA

**Cvičení 7:** druhá část cvičení

**b) DETEKCE protilátek IgG v lidském séru**

 **proti viru varicella-zoster**

|  |
| --- |
| *RNDr. Pavla Válová* |

## ÚVOD:

**Virus varicelly-zosteru** (VZV, virus planých neštovic a pásového oparu, lidský herpesvirus 3, *Human herpes 3 varicellovirus*, HHV-3) náleží do a-podčeledi *Herpesviridae*. Průměr virových částic je asi 145 nm. Uvnitř je dsDNA, která je obklopena ikozahedrickou proteinovou kapsidou a obalem obsahujícím komponenty jak z hostitelské buňky, tak z viru.

**Plané neštovice** neboli **varicella** je vysoce nakažlivé akutní onemocnění, které probíhá po primárním kontaktu s virem, zatímco **pásový opar** – **Herpes zoster** – je odpověď částečně imunního hostitele na reaktivaci varicella viru přítomnému v těle v latentní formě v gangliích.

**Varicella** je benigní celkové onemocnění (převážně dětí mezi 2 až 6 lety) charakterizované výsevem puchýřků, běžně jsou i léze na sliznicích. Průběh nemoci je obvykle mírný a komplikovaný pouze u imunodeficientních dětí. Nejčastější komplikací je sekundární bakteriální infekce (infekce kůže, otrava krve, zánětlivé onemocnění ledvin a středního ucha; k závažným komplikacím patří zánět plic, zánět mozku), případně dehydratace organismu. U dospívajících a dospělých mívá onemocnění těžší průběh.

**Herpes zoster** je značně bolestivé onemocnění s typicky jednostranně lokalizovaným výsevem puchýřků uvnitř postiženého inervovaného okrsku (dermatosu), asi v polovině případů v podobě šikmého pásu na hrudníku. Vyskytuje se častěji u starších dospělých (porucha imunitního systému, hormonální disbalance), z nichž onemocní jen někdo a většinou jen jednou za život.

Virus varicelly je obvykle přenášen respiračními sekrety (kapénková infekce) nebo tekutinou z puchýřků. Viry se replikují nejprve v mukózních membránách v horních cestách dýchacích a pak se šíří krví. Zdrojem infekce může být jak nemocný s varicelou, tak se zosterem. Obvyklá inkubační doba je u planých neštovic 10 až 21 dnů, u pásového oparu 14 – 16 dní.

Přítomnost viru, resp. infekce, obecně prokazujeme:

* Mikroskopicky: barvením pomocí Giemsy, elektronovým mikroskopem, imunofluorescenčními metodami
* Sérologicky: detekce antigenů VZV pomocí metody ELISA

**Princip metody ELISA** (Enzyme-linked immunosorbent assay) - kvalitativní imunoenzymatická determinace **protilátek třídy IgG proti VZV** v lidském séru.

Jamky ve stripu jsou potaženy **antigenem Varicella-Zoster viru** (VZV), který váže odpovídající **protilátky ve vzorku**. Po promytí jamek, kdy se odstraní nenavázané složky, je přidána **křenová peroxidáza** (horseradish peroxidase – HRP) označující **anti-human IgG konjugát**. Tento konjugát se naváže na zachycené specifické protilátky VZV. Vzniklý imunokomplex (antigen + protilátky + anti-IgG-konjugát) je vizualizován přidáním **tetramethylbenzidin** substrátu (TMB), přičemž vzniká modrý reakční produkt. Intenzita tohoto produktu je úměrná obsahu specifických IgG VZV protilátek ve vzorku. K zastavení reakce je přidávána **kyselina sírová**, která způsobí **konečné žluté zabarvení roztoku**. Absorbance je měřena při 450 nm na ELISA readru.

**PROVEDENÍ:**

Biologický materiál: lidské krevní sérum

Vybavení: Souprava k detekci protilátek třídy IgG proti Varicella-Zoster Virus, IgG ELISA (NovaTec, Immunodiagnostica GMBH)

Materiál dodaný v soupravě: mikrodestička - 12 x 8 (96 jamek) s jamky potaženými antigenem VZV, držák stripů, doplňky pro krytí mikrotitrační destičky, protokol, distribuční a identifikační plán

Roztoky dodané v soupravě:

* Pufr pro rozpouštění vzorků - IgG Sample Diluent (pH = 7.2, žluté barvy)
* Promývací roztok 20x konc.(pH = 7.2)
* Konjugát VZV anti-IgG – králičí protilátky k lidským IgG značené peroxidázou (červená barva)
* Negativní kontrola VZV IgG (žlutá barva)
* VZV Cut-off kontrola (žlutá barva)
* Pozitivní kontrola VZV IgG (žlutá barva)
* TMB substrát (= chromogen tetramethylbenzidin - bezbarvý nebo lehce namodralé barvy; chránit před světlem)
* Stop roztok (0,2 mol/l H2SO4)

Vybavení laboratoře:

* ELISA reader, absorbance 450/620 nm
* Inkubátor na 37 °C
* Manuální nebo automatická promývačka
* Mikropipety o objemu 10 – 1000 μl + špičky
* Vortex na promíchání
* Deionizovaná voda
* Jednoúčelové eppendorfky (1,5 ml)
* Minutky
* Potřeby pro vytřepávání promývacího roztoku (ručníky, buničina)
* Dezinfekční potřeby (Incidur, Spitaderm, gumové rukavice na jedno použití)

Doba použitelnosti a uložení soupravy: Do expirační doby při teplotě 2 – 8 °C

**Pracovní postup:**

Nastavit inkubátor na 37 °C.

Příprava reagencií:

**Před použitím dát reagencie do pokojové teploty** (20 – 25 °C)

Promývací roztok zředit v poměru 1 : 19, t.z. 10 ml promývacího roztoku + 190 ml deionizované vody (stabilní 5 dnů při pokojové teplotě)

Příprava vzorků ze séra:

Naředit vzorky 1 + 100 IgG Sample Diluent (v eppendorfkách rozpustit 5 μl vzorku v 500 μl IgG rozpouštěcího roztoku a dobře promíchat)

Poznámka: skladování lidskéha séra při 2 - 8 °C nebo rozpipetovat a zmrazit při -20 až

 -70 °C (**po rozmražení už znovu nezmrazovat!**)

Pozitivní a negativní kontroly se neředí.

Příprava testu:

Připravit si odpovídající počet stripů, podle počtu analyzovaných vzorků, 5 jamek vyhradit na kontroly (blank, negativní kontrola, 2 x cut-off kontrola (kontrola vymezující tzv. hraniční mez), pozitivní kontrola) – viz schéma pipetování.

**Provedení:**

1. Do prvních jamek dát po 100 μl kontrol a do potom příslušných jamek naředěné vzorky První jamku nechat pro blank. Pokrýt fólií.

**Schéma pipetování kontrol a vzorků:**

A1 BL

B1 K-

C1 Cut-off

D1 Cut-off

E1 K+

F1 vzorek séra

1. **Inkubovat 1 hod ± 5 min při 37 °C ± 1 °C.**
2. Po inkubaci odstranit fólii, odsát obsah jamek a 3x dobře promýt promývacím roztokem. Vyvarovat se přetečení vzorků z jamek. Doba mezi jednotlivým promytím má být větší než 5 s. Nakonec opatrně odstranit zbývající roztok vytřepáním destičky na buničinu.

Pozn.: **Promytí je důležité! Nedostatečné promytí falešně ovlivňuje hodnoty absorbance.**

1. Přidat 100 μl VZV anti-IgG konjugátu do všech jamek kromě blanku. Pokrýt fólií.
2. **Inkubovat 30 min při pokojové teplotě.** Nedávat na přímé slunce.
3. Opakovat krok 3 (tj. odsátí a 3x promytí).
4. Přidat 100 μl TMB substrátu do všech jamek.
5. **Inkubovat přesně 15 min při pokojové teplotě ve tmě.**
6. Přidat 100 μl Stop roztoku do všech jamek v pořadí jako TMB. Modrá barva přechází ve žlutou.

Pozn.: Vysoce pozitivní vzorky mohou způsobit vysrážení chromogenu. Tyto sraženiny mohou mít vliv při čtení optické hustoty. V tomto případě je doporučováno předředění vzorků fyziologickým roztokem (NaCl), např. 1 + 1. Pak zředit 1 + 100 ředicím pufrem a znásobit výsledky v NTU dvěma.

1. Změřit absorbanci vzorků při 450/620 nm během 30 min po přidání Stop roztoku.
2. Od hodnot absorbance kontrol a vzorků je potřeba odečíst hodnotu blanku.

**HODNOCENÍ POKUSU**

Výsledky absorbance:

* + blank (v A1) - absorbance nižší než 0,100
	+ negativní kontrola (v B1) - nižší než 0,200
	+ Cut-off kontrola (v C1 a D1) - mezi 0,250 a 0,900
	+ Pozitivní kontrola (v E1) - stejná nebo vyšší než cut-off

Výpočet výsledků:

Cut-off (hraniční mez) je průměr absorbačních hodnot z dvou Cut-off kontrol.

Příklad: Absorbance Cut-off kontroly 0,39 + absorbance Cut-off kontroly 0,37 = 0,76 / 2 = 0,38. Cut-off je 0,38.

Interpretace výsledků:

**Vzorky jsou pozitivní, pokud jejich absorbance je o 10 % vyšší než hodnoty absorbance cut-off.**

Vzorky jsou považovány za **negativní,** jestliže jejich absorbance je nižší než 10 % pod hodnotou cut-off.

Vzorky s absorbancí o 10 % vyšší nebo nižší než cut-off nemohou být považovány jako jasně pozitivní nebo negativní, jedná se o tzv. **šedou zónu**. Je doporučováno opakovat test o 2 - 4 týdny později s čerstvými vzorky séra. Pokud výsledky druhého testu jsou opět v šedé zóně, jsou vzorky označeny jako **negativní.**

* Pozitivitu a negativitu vzorků je výhodné hodnotit při přepočtu na NovaTec jednotky.

Výsledky v NovaTec jednotkách (NTU) získáme, podle vzorce:

 **absorbance vzorku pacienta . 10**

 **průměrná hodnota cut-off** Příklad: 1,786 x 10 / 0,38 = 47 NTU

Potom:

Cut-off: 10 NTU

Šedá zóna: 9-11 NTU

Negativní: <9 NTU

Pozitivní: >11 NTU

**VÝSLEDKY:**

Do tabulky uveďte u jednotlivých jamek výsledky vizuálního hodnocení a hodnoty absorbance při 450 nm. Hodnoty absorbance přepočtěte na NovaTec jednotky (NTU).

**Příklad tabulky: Název …**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Kontroly a vzorky** | **Vizuální hodnocení****reakce** | **Absorbance****z ELISA readru**při 450 nm | **Přepočet****na****NTU** | **Hodnocení****vzorků**pozitivní xnegativní |
| Blank |  |  |  |  |
| K- |  |  |  |  |
| Cut-off |  |  |  |  |
| Cut-off |  |  |  |  |
| K+ |  |  |  |  |
| Vzorek |  |  |  |  |

**HODNOCENÍ A DISKUSE:**

Zhodnoťte správnost provedení testu (pozitivní, negativní kontroly, blank) a uveďte, zda test u vašeho vzorku byl pozitivní či negativní.

**ZÁVĚR:**

Na základě hodnot absorbance ve vzorku vašeho séra rozhodněte, zda máte protilátky IgG proti viru varicella-zoster.

~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~

Součástí tohoto protokolu jsou **originální výsledky z ELISA readru** a **aktuální očkovací kalendář** s vyznačenými virovými onemocněními.

**Poznámky:**

Nález protilátek IgG je důležitý ke zhodnocení imunního stavu jedince exponovaného vůči nákaze a pro úvahy o případné imunoprofylaxi (tj. ochrana osob s postiženou imunitou).

**Profylaxe a prevence:** Ochrana osob s postiženou imunitou podáním imunního lidského globulinu (do 48 hodin po kontaktu s nemocným). Preventivně očkování vakcínou z kmene OKA atenuovanou (tj. oslabenou) pasážemi na tkáňových kulturách. V některých zemích se očkují rutinně všechny děti.

**Léčba:** Varicella i zoster – podání **virostatik** - **aciklovir** (selektivní inhibice virové DNA-polymerázy), i antivirotika **valaciklovir** a **famciklovir**, eventuelně **foskanet** a **interferon**.

**Doporučená literatura:**

Protokol diagnostické soupravy NovaTec, Immunodiagnostica GMBH; <http://www.novatec-id.com/products/>

**Votava, M. a kol. (2003):** Lékařská mikrobiologie speciální. Neptun, Brno.

**Roudnická, B., Adam, Z., Vorlíček, J., Burgetová, D.:** Pozor na pásový opar. Příručka Kožní klinika FN Brno, II. interní klinika hematoonkologická FN Brno, Mikrobiologické oddělení FN Brno. (<http://www.fnbrno.cz/pozor-na-pasovy-opar/t1283>)

**Cvičení 8:**

**EXKURZE DO LABORATOŘÍ M I K R O C H E M, a.s.**

**virologické oddělení**

|  |
| --- |
| *RNDr. Miloslav Vála, RNDr. Marián Luhový* |

Laboratoře Mikrochem (založené 1994) se zabývají diagnostikou lidských onemocnění.

Oddělení:

* mikrobiologické = bakteriologické
* specializované oddělení pro diagnostiku *Mycobacterium tuberculosis*
* parazitologické (diagnostika prvoků, červů)
* sérologické a imunologické (protilátková odpověď proti cizorodým agens)
* alergologické
* molekulárně biologické (např. využívání metody PCR)
* **virologické**

Náplní oddělení virologie je laboratorní průkaz původců virových infekcí. Techniky, které se zde používají, se mohou rozdělit do tří skupin:

**a) Přímý průkaz infekčního agens** (kultivační techniky, průkaz antigenů)

 **b) Sledování imunitní odpovědi na infekci** (stanovení protilátek) (95 % vyšetření)

 **c) Molekulární detekce virů**

**Ad a) Kultivační techniky**

 V akutní fázi onemocnění (začátek nemoci) je množství viru v určitých místech (podle typu onemocnění) velmi vysoké - z těchto míst se virus izoluje a určí. Kultivace je časově náročná (minimálně několik dní). Záchytnost infekčního agens (původce onemocnění) je obecně nízká, je velmi ovlivněná dobou, která uběhla od začátku onemocnění, rychlostí transportu odebraného materiálu do laboratoře a rychlostí jeho zpracování, případně vhodností uložení. Z materiálů vhodných pro průkaz virů se nejčastěji odebírá **stolice** (enteroviry, rotaviry, adenoviry), **výtěr z nosu a nosohltanu** (respirační viry), **likvor** (neurotropní viry), **moč** (cytomegalovirus), **BAL – bronchoalveolární laváž** (cytomegalovirus), **stěr ze spojivky** (adenoviry), obsah **puchýřků** (herpetické viry), **leukocytární frakce krve** (cytomegalovirus) nebo různé **tkáně odebrané biopsií** nebo **post mortem** (různé viry).

Určení původce onemocnění (viz neutralizační test) většinou provádí vysoce specializovaná laboratoř (RL SZÚ – referenční laboratoře Státního zdravotního ústavu).

 Nejznámější je **izolace na kuřecích embryích,** kde se provádí záchyt viru chřipky. Během období, kdy se předpokládá výskyt chřipkového viru v populaci a možnost vzniku epidemie, se provádí tzv. surveillance. V jejím rámci je jednou z nejdůležitějších metod kultivace chřipkových virů. U nemocného se provede výtěr z nosohltanu a nosu na vatové tampony a takto získaný materiál se přenese do odběrového média (PBS + albumin + antibiotika). Tímto médiem jsou očkována kuřecí embrya 10 dnů stará. Očkuje se 0,2 ml média do amnionového vaku embrya. Takto očkovaná embrya se inkubují 3 dny, potom se obsah amnia vybere, provádí se test (viz Hirstův test) na přítomnost hemaglutinačního agens a další pasáž tohoto materiálu. Je očkováno další kuřecí embryo, tentokrát do alantoické dutiny (kultivace v allantois je vhodná až od druhé pasáže), kde se virus pomnoží do vyšší koncentrace. V případě nutnosti může proběhnout i třetí pasáž. **Hirstův test:** virus chřipky má na povrchu hemaglutinin, který aglutinuje červené krvinky (např. kuřecí). Ke krvinkám přidáme amniovou nebo alantoickou tekutinu. Po půl hodině sedimentace dojde v případě pozitivního výsledku (přítomnosti viru) k pospojování krvinek, které vytvoří na dně zkumavky krajkovitý povlak. V případě nepřítomnosti viru se vytvoří malý sedimentační terčík.

 **Kultivace na tkáňových kulturách (TK):**

Pro účely kultivace virů se používají TK. Jde o kultury buněk, které jsou derivované z tkání živočichů a člověka. Podle typu odvození a vlastností se dělí na **TK primární** (nebo sekundární) a tzv. **stabilizované linie**. První typ vzniká trypsinizací tkáně a takto uvolněné buňky se dále množí in vitro. Počet jejich dělení je konečný a předem daný, jejich vlastnosti odpovídají buňkám tkáně, ze které vznikly a jsou z velké části diploidní. Druhý typ představují buňky, které byly kultivovány stejně jako první typ, ale během jejich dělení se podařilo zasáhnout v genomu místo regulace buněčného dělení takovým způsobem, že se mohou dělit do nekonečna. Tyto linie mají již odlišné vlastnosti ve srovnání s tkání, ze které vznikly, a mají různé typy ploidie. Viry, které jsou schopny se množit na TK, většinou buňky poškozují. Morfologické změny, ke kterým dochází, nazýváme **cytopatogenním efektem** (CPE). Ten se projeví po infekci buněk zpravidla za několik dní a pro jeho specifický virový původ je třeba provést minimálně alespoň jednu další pasáž (pasáží se rozumí infekce nových zdravých buněk). Zdravé buňky rostou přisedle na dně kultivačních zkumavek, infikované se zakulacují a odpadávají = CPE. Kultivace buněk se provádí ve speciálních médiích, růst probíhá při teplotě 37 oC, práce s nimi se provádí ve sterilním boxu a do odběrových a kultivačních médií se přidávají některá antibiotika pro potlačení bakteriální kontaminace. V laboratoři se používá několik druhů TK, neboť většina virů roste pouze na některé z nich. Níže uvedený seznam uvádí druhy TK a spektrum virů, které lze na nich zachytit:

* **L-132** – linie buněk epiteloidního charakteru, vhodná pro izolaci RS viru, adenovirů, a viru herpes simplex (ten roste na většině TK).
* **MDCK**  – podobné jako předchozí, jsou odvozené ze psí ledvinné tkáně. Používají se pro izolaci viru chřipky.
* **CV-1** – linie odvozená z ledvinné tkáně opice, slouží k izolaci některých enterovirů(vč. poliovirů – původců dětské obrny).
* **LEP** – diploidní buňky tvaru fibroblastů, sloužící k izolaci cytomegaloviru, VZV – viru varicella-zoster, viru herpes simplex (HSV) a řady enterovirů (vč. poliovirů).

**Neutralizační test:** Používá se pro určení izolovaného viru. Neznámý izolovaný virus se určuje pomocí známé protilátky. Virus i protilátka se smíchají ve vhodných koncentracích. Specifická protilátka za určitou dobu virus neutralizuje a ten není schopen infikovat citlivou TK na rozdíl od kontrolního viru (bez protilátky). Tuto techniku používají pouze vysoce specializované laboratoře.

**Průkaz antigenů**

Některé viry na TK vůbec nerostou nebo nezpůsobují CPE a jejich přítomnost se prokazuje jinými metodami. Mezi ně patří hemadsorpce, imunofluorescence (IF), ELISA nebo aglutinace na latexových částicích.

**Hemadsorpce:** Slouží ke zjištění přítomnosti viru, který se pomnožil na TK. Není to metoda, která virus přímo určuje, pouze dává informaci, že se na TK pomnožil virus, který je vybaven **hemaglutininem**. Této metody se používá pro **zjištění viru chřipky** na buňkách MDCK. Virus, který infikoval tyto buňky, se objeví ve velkém množství na jejich povrchu asi za 2 dny od počátku infekce. Po převrstvení této kultury 0,5% suspenzí morčecích krvinek dochází po určité době k jejich adsorpci, což je pozorovatelné pod mikroskopem při malém zvětšení jako husté nalepení krvinek na infikovaných buňkách.

**Imunofluorescence:** Přítomnost viru v buňce se prokazuje pomocí vazby specifické protilátky, která je chemicky označena tzv. fluorochromem, tj. látkou, která vyzařuje světlo jiné vlnové délky než to, které na ni dopadá (ve virologii se většinou používá FITC = fluorescein-izothiokyanát; exitace 490 nm, emise 520 nm). Výsledek této reakce se pozoruje ve speciálním, tzv. fluorescenčním mikroskopu. Tato metoda se používá např. pro průkaz některých **herpetických virů** (CMV).

**ELISA:** Slouží pro průkaz viru v tekutině. Aby mohla být tato reakce použita, je třeba vyšší koncentrace virových částic ve vyšetřovaném vzorku. Komerčně dostupné testy jsou zaměřené na průkaz **respiračních virů** (chřipka typu A a B, adenoviry, respiračně-syncyciální = RS virus, viry parainfluenzy), **rotavirů** a antigenu HBsAg **hepatitidy B**.

**Latexaglutinace:** Užívá se k přímému určení viru v materiálu. Virus je malá částice, která nedává pouhým okem viditelnou reakci s protilátkou. Proto se využívá navázání antivirových protilátek na latexové částice. Po smíchání s virem dojde k pospojování drobných latexových partikulí (protilátka má dvě vazebná místa) a vzniká viditelný aglutinát. Této metody se využívá tam, kde vyšetřovaný materiál obsahuje velké množství virových částic. Používá se u **průjmových** onemocněních (**adenoviry, rotaviry** - způsobují závažné novorozenecké průjmy, v 1 ccm stolice je až 1011 virových částic).

Přímým průkazem viru se zabývá rovněž **elektronová mikroskopie**, která má spíše výzkumný význam a provádí se na vysoce specializovaných pracovištích.

**Ad b) Stanovení protilátek**

Virové infekce vyvolávají v lidském organismu tvorbu různých protilátek. Toho se využívá pro zjišťování momentálně probíhajících onemocnění nebo imunitních stavů přetrvávajících dlouhodobě nebo dokonce celoživotně. Celá problematika je navíc komplikovaná výskytem řady chronických či latentních infekcí, které se mohou za určitých podmínek aktivovat. Pro stanovení protilátek se používá řada sérologických testů. Nejběžnější z nich zmíníme u jednotlivých infekcí. Běžné je nyní také zjišťování protilátek proti stejnému antigenu nebo skupině antigenů určitého viru ve třídách IgG (většinou se tvoří později od počátku infekce a přetrvávají dlouho) a IgM (tvoří se rychle, většinou jen při prvním setkání člověka s virem a rychle mizí – proto se často nazývají akutní protilátky).

 Následuje přehled diagnostikovaných infekčních agens sérologickými metodami na oddělení virologie:

**1. skupina: Respirační infekce**

* **Influenza typ A a typ B** je závažné onemocnění, které se netýká pouze respiračního traktu. V případě oslabených jedinců, starých lidí či malých dětí může dojít i k úmrtí. Vyskytuje se sezónně v chladném období roku a způsobuje často epidemie. Virus chřipky prodělává neustále antigenní změny, aby unikl specifické imunitní reakci člověka, který již v minulosti onemocněl. Tak může infikovat člověka několikrát za život. Pokud dojde k velké změně v antigenní výbavě viru, označujeme takový virus jako nový kmen. U chřipky typu A nyní cirkulují v lidské populaci kmeny označené H1N1 a H3N2. K sérologickému průkazu onemocnění chřipkou požíváme KFR (komplementfixační reakci – viz Protokol Chřipka). Protilátky prokazované v tomto testu se tvoří asi za 14 dní po začátku onemocnění. Proto je nutné odebrat dva vzorky krve – první na počátku onemocnění a druhý za 2 týdny. Pokud proběhlo dané onemocnění, sledujeme čtyřnásobné nebo vyšší zvýšení hladiny protilátek nebo tzv. sérokonverzi = jejich vytvoření oproti původní nepřítomnosti.
* **Adenoviry** způsobují jako chřipka respirační virózy. Mohou způsobovat onemocnění po celý rok. Diagnostika je usnadněná díky společnému antigenu pro všechny typy adenovirů, který vyvolává tvorbu KFR protilátek (pravidla pro jejich vznik a hodnocení jsou jako u chřipky).
* **RS virus** (respiračně-syncyciální virus). Způsobuje těžké postižení respiračního traktu u novorozenců, kojenců a batolat nebo u starých lidí. Stanovení protilátek se provádí v KFR. U těžkých stavů je třeba použít přímý průkaz viru z nosohltanu (viz výše).
* **Viry parainfluenzy**. Jako RS virus postihují především nejmenší děti. Pro průkaz protilátek se používají testy KFR, HIT (hemaglutinačně inhibiční test) nebo ELISA.
* **Rhinoviry** – původci rýmy. Pro velký počet možných kmenů a malou závažnost onemocnění se diagnostika tohoto častého onemocnění běžně neprovádí.

**2. skupina: Viry hepatitidy**

 Jedná se o skupinu nepříbuzných virů, které mají vyhraněnou afinitu k jaterním buňkám, které poškozují. Nyní se rozlišují **viry hepatitidy A, B, C, D, E a G**. Hepatitida A a E se šíří orofekálně (nemoc špinavých rukou), ostatní se šíří především krví a patří také mezi sexuálně přenosné infekce. Hepatitida D je vázána na výskyt společně s hepatitidou B. U hepatitidy G je sporné, zda se jedná o klasickou hepatitidu (není prokázána afinita k jaternímu parenchymu).

* **Hepatitida A.** Diagnostikují se IgM protilátky, které se tvoří v období akutního onemocnění a brzy mizí. IgG protilátky přetrvávají po celý život a jejich přítomnost znamená imunitu proti tomuto onemocnění. Obojí tyto protilátky se prokazují ELISA testem.
* **Hepatitida B.** Známá dříve jako tzv. sérová hepatitida. Virus se množí v játrech, která jsou často vážně poškozována, při aktivní chronické infekci dochází k přestavbě jaterního parenchymu ve vazivovou tkáň (cirhóza jater), která může přejít ve zhoubný hepatom. Člověk, který se nakazí hepatitidou B, prodělává po poměrně dlouhé inkubační době onemocnění, které může být i bezpříznakové nebo postihuje organismus různě těžce. V této době se potvrzuje probíhající onemocnění sérologicky. V testu ELISA se prokazuje přítomnost antigenu HBsAg (historický název Australský antigen), HBeAg a protilátek antiHBc IgG a IgM, anti HBe a antiHBs. Test zaměřený na průkaz HBsAg je nejdůležitější a je nyní již tak citlivý, že vyhovuje nárokům transfúzní služby, která zjišťuje bezinfekčnost dárců krve. Pokud nevymizí tento antigen do šesti měsíců od začátku onemocnění, je to informace, že proces přešel do chronického stádia a nemocný se stává nosičem hepatitidy B. Výše uvedenými testy se pak zjišťuje, zda je hepatitida aktivní - tehdy dochází k tvorbě kompletních virových částic a krev pacienta je vysoce infekční (v krvi prokazujeme HBeAg). V opačném případě se tvoří pouze antigen HBsAg, v krvi jsou protilátky antiHBe. Latentní stav může přejít do aktivního se všemi negativními důsledky.

 Proti této hepatitidě je vyvinuta očkovací látka. Imunizací očkováním se chrání vybrané skupiny populace.

* **Hepatitida C.** Je nejméně stejně závažná jako předchozí hepatitida. Virus přímo poškozuje jaterní buňky (u hepatitidy B dochází k poškozování hepatocytů neadekvátní imunitní reakcí organismu na přítomnost viru, u hepatitidy C dochází k cytopatogennímu působení viru). Onemocnění probíhá často bezpříznakově, ale i tehdy může přejít do chronicity a v konečné fázi způsobit cirhózu jater a posléze karcinom (hepatom). Sérologicky se prokazují protilátky anti HCV (ve třídě IgG a IgM) opět testem ELISA. Tvorba protilátek je často opožděná, a proto je třeba v případě podezření na tuto infekci vyšetření opakovat nebo provést reakci PCR (polymerázová řetězová reakce), kterou se prokazuje přítomnost RNA viru v krvi. Proti hepatitidě C není vyvinuta očkovací látka.

Další zmíněné hepatitidy mají menší význam, běžně se jejich diagnostika neprovádí.

**3. skupina: Herpetické viry**

Lidské herpetické viry jsou velice dobře adaptované na svého hostitele a u řady z nich dochází k celoživotnímu bezpříznakovému nosičství. Významnější problémy mohou způsobovat u imunodeficitních stavů nebo při infekcích plodu a novorozence.

* **Herpes simplex - HSV1 a HSV2** způsobuje nejčastěji onemocnění ve formě drobných puchýřků na kůži nebo erozí na sliznici. Po primoinfekci, která proběhne často už v útlém věku, dochází k usídlení viru ve spinálních gangliích, kde zůstává v latentním stavu. Při poškození, šoku nebo oslabení organismu dochází někdy k jeho aktivaci a šíření po odstředivých nervových vláknech do příslušných okrsků kůže nebo sliznice, kde se vytvoří již zmíněné puchýřky. HSV1 postihuje především kůži a sliznici rtů, HSV2 stejným způsobem především genitálie, což znamená, že je za určitých podmínek sexuálně přenosný. Akutní infekce se projeví přítomností IgM protilátek, které se prokazují v testu ELISA.
* **Virus planých neštovic (varicella - zoster)** – promořuje kompletně dětskou populaci, téměř ve 100 % zůstává v organismu, prodělaná infekce zanechává celoživotní protilátky ve třídě IgG. Virus se může vzácně aktivovat v dospělosti a způsobit tzv. pásový opar. Primoinfekce a některé reaktivace jsou charakteristické přítomností IgM protilátek, které prokazujeme v ELISA testech.
* **Cytomegalovirus (CMV)** – tento virus promořuje lidskou populaci asi ze dvou třetin. V organismu zůstává v latentní formě v lymfocytech. Aktivuje se především při poklesu imunity. Je jedním z agens významně komplikujícím transplantace (nejhorší kombinace je negativní příjemce a pozitivní dárce, onemocnění HIV) a je tak zvaným teratogenním virem (tj. poškozuje vyvíjející se plod; pokud dojde během těhotenství k přenosu viru na plod - k tomu dochází, pokud prodělává matka aktivní nebo akutní infekci a virus cirkuluje v krvi – tento stav se nazývá viremie). Přítomnost protilátek prokazatelných v KFR nebo ve třídě IgG v testu ELISA ukazuje na osídlení organismu virem. Pokud jsou prokázány protilátky ve třídě IgM (ELISA), znamená to, že probíhá akutní nebo aktivní onemocnění.
* **Virus Epsteinův-Barrové (EBV)** – virus promořuje masivně lidskou populaci. K většině infekcí dochází v dětství, z nich pouze zlomek proběhne pod klinickým obrazem **infekční mononukleózy (IM)**, ostatní jsou bezpříznakové. Virus poté zůstává celoživotně v organismu v latentní formě, ve které je udržován imunitním systémem člověka. Pokud dojde k oslabení nebo narušení imunitního dozoru, virus se může aktivovat a způsobovat rozmanitá onemocnění, která se projevují většinou narušením vitality organismu. V endemických oblastech Afriky způsobuje tento virus maligní onemocnění – Burkitův lymfom a podobně ve východní Asii nasopharyngeální karcinom. Laboratorní diagnostika se zaměřuje na stanovení protilátek proti několika antigenům virionu a nestrukturním antigenům (nejsou součástí virionu). Nejčastěji jsou to antigeny kapsidové (VCA), nukleární (EBNA) a časný antigen (EA). Protilátky proti VCA a EBNA ve třídě IgG přetrvávají celý život, protilátky ve třídě IgM znamenají akutní nebo aktivní infekci a po jejím odeznění mizí. Aktivitu viru často prozrazuje i přítomnost protilátek proti EA antigenu. Stanovení protilátek se provádí testem ELISA a imunofluorescenčním (IF) testem (princip stejný jako průkaz antigenu), který je uspořádán v tzv. nepřímé modifikaci.
* Dalšími herpetickými viry jsou **viry HHV6 a HHV7**, které byly nedávno objeveny. Diagnostika HHV6 je v počátcích, HHV7 se zatím nediagnostikuje.

**4. skupina: Exantematické viry** (způsobují vyrážku)

 Do této skupiny patří **virus spalniček a zarděnek** (v anglosaské literatuře se nazývají spalničky **rubeola** a zarděnky **rubella**). Jejich diagnostika se v dnešní době provádí ve velmi malé míře, neboť proti oběma onemocněním se provádí již delší dobu očkování dětské populace, takže dochází k vymizení obou virů. Podobný osud postihuje **virus příušnic (parotitis epidemica).** Akutní onemocnění zarděnkami během těhotenství, hlavně v jeho počátku, znamená možnou infekci plodu a následně jeho vážné poškození. Nejdůležitějším testem, komerčně dostupným, je stanovení IgM protilátek v testu ELISA.

**5. skupina: Různé viry**

**- Virus lidského imunodeficitu - HIV**. Způsobuje jedno z nejzávažnějších onemocnění lidské populace v dnešní době – AIDS. Laboratorní diagnostika je založena na testech na principu ELISA (pouze průkaz protilátek), které jsou velmi citlivé a zachytí 100 % případů všech pozitivních vyšetřovaných (screening test – test první linie). Díky této citlivosti je ale snížená specifita těchto testů. Každý výsledek, který není negativní, se nazývá reaktivní a testuje se dále ve speciálních testech (Western blot – 25 % reaktivních bývá HIV pozitivních.). Nově se vyvíjejí testy, které budou prokazovat také přítomnost virového antigenu v krvi, který se objevuje na počátku infekce před tvorbou prvních protilátek.

* **Virus klíšťové encefalitidy** (Arborivy) se dostává do lidského organismu po přisátí infikovaného klíštěte. Tento virus cirkuluje v přírodních ohniscích mezi různými obratlovci a populací klíšťat. U člověka může vyvolat meningitis (zánět mozkových blan), meningoencephalitis nebo i encephalitis (zánět mozku). Onemocnění probíhá dvoufázově, nejdříve se objeví nespecifická viremická fáze, po jejím odeznění a krátké remisi dochází k fázi neurogenní. V této fázi jsou vytvořeny specifické IgM protilátky, které prokazujeme testem ELISA.
* **Virus vztekliny** - diagnostikou se zabývají veterinární zařízení. V lidském organismu bez léčby napadá neurony, kde už ho protilátky nemohou inaktivovat. Z neuronů se šíří až do CNS, což vede vždy k smrti člověka. Očkování - neutralizace viru, dříve se aplikovalo do břišní oblasti, dnes do ramene. Provádí se preexpoziční očkování (Praha) a při pokousání nenaočkovaného člověka se provádí poexpoziční očkování (infekční oddělení nemocnic). Indie - 30 000 úmrtí ročně na vzteklinu.
* **Virus lymfocytární choriomeningitidy (LCM)** způsobuje onemocnění CNS. Do lidské populace se dostává velmi vzácně, zdrojem jsou někteří hlodavci. Běžným testem, kterým se dá prokázat infekce je KFR.
* V některých laboratořích se provádí diagnostika **hantavirů** (původci hemorhagických horeček) a **parvoviru B 19** (původce aplastické anémie).

**Ad c) Detekce lidských virů pomocí molekulárních metod**

– RNDr. Marián Luhový - viz aktuálně na exkurzi + prezentace