

**UNIVERZITA PARDUBICE**  
**FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

**2017**

**Romana Odložilíková**

**Univerzita Pardubice**

**Fakulta chemicko-technologická**

**Virové infekce se zaměřením na mechanismy virových imunomodulátorů**

**Romana Odložilíková**

**Bakalářská práce**

**2017**

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2015/2016

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Romana Odložilíková**  
Osobní číslo: **C13363**  
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Zdravotní laborant**  
Název tématu: **Virové infekce se zaměřením na mechanismy virových imunomodulátorů**  
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

### Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

V dostupné literatuře se seznámte s virovými imunomodulátory, zpracujte jejich přehled a popište jejich účinky na imunitní systém člověka. Popište virové mechanismy proti hostiteli a stručně obranu imunitního systému proti virům.

Stručně se věnujte aktuálnímu přehledu metod v laboratorní diagnostice virových infekcí - přímým a nepřímým. Vyhledejte novinky v diagnostice nových virových nákaz.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

**Zpracujte téma s použitím literatury ne starší 10 let z doporučených databází, např. <http://isiknowledge.com/>, <http://www.pubmed.gov>; <http://www.sciencedirect.com/>; <http://scholar.google.cz>**

Vedoucí bakalářské práce:

**Mgr. Marcela Slováková, Ph.D.**

Katedra biologických a biochemických věd

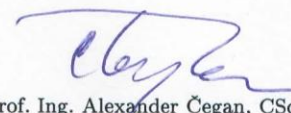
Datum zadání bakalářské práce: **18. prosince 2015**

Termín odevzdání bakalářské práce: **3. července 2016**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.  
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 15. února 2016

## **Prohlášení autora**

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 26. 6. 2017

Romana Odložilíková

## **Poděkování**

Děkuji Mgr. Marcele Slovákové, Ph.D. za odborné vedení, pomoc a cenné rady, které mi poskytla jako konzultantka a vedoucí mé bakalářské práce.

## **ANOTACE**

Tato bakalářská práce se zabývá mechanismem působení hostitelského imunitního systému proti viru a také strategií úniků virů před imunitním systémem, vstupem virů do hostitelské buňky a modulací virových imunomodulátorů, které jsou z dostupných informací stručně shrnuty. V práci je také věnována pozornost běžné, ale i výzkumné přímé a nepřímé diagnostice virových infekcí.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Antivirová imunita, virové imunomodulátory, diagnostika virů, viry

## **TITLE**

Viral infections with focus on mechanism of viral immune modulators

## **ANNOTATION**

This bachelor's thesis deals with the mechanism of influencing host immune system against the virus and also with strategy of viruses to escape before an immune system, entering viruses into the host cell and modulation of viral immune modulators, which are summed up from available informations. There is a dedicated attention for common, but also to research direct and indirect diagnostic of viral infections.

## **KEYWORDS**

Antiviral immunity, viral immune modulators, diagnostics of viruses, viruses

# OBSAH

Seznam ilustrací a tabulek .....	11
Seznam zkratk .....	12
Úvod.....	14
1 Obrana hostitele proti virové infekci .....	15
1.1 Nespecifická imunita.....	15
1.1.1 Interferony .....	15
1.1.2 Komplement.....	17
1.1.3 Fagocytóza .....	17
1.1.4 NK-buňky .....	18
1.1.5 Zánět .....	18
1.2 Specifická imunita.....	20
1.2.1 Imunoglobuliny.....	20
1.2.2 Mechanismus působení protilátek .....	20
1.2.3 B-lymfocyty .....	21
1.2.4 T-lymfocyty .....	21
1.2.5 Mechanismus působení buněčné imunity .....	21
1.3 Dynamika obranných mechanismů imunitního systému .....	22
2 Mechanismy virů proti hostiteli .....	23
2.1 Životní cyklus viru a vstup viru do buňky .....	25
2.1.1 Adsorpce virionu na povrch buňky.....	26
2.1.2 Průnik viru do buňky .....	27
2.1.3 Obnažení genomu .....	28
2.1.4 Replikace a exprese virového genomu .....	28
2.1.5 Maturace a uvolnění virových partikulí z hostitelské buňky .....	29



2.2	Strategie úniků virů před imunitní odpovědí hostitele .....	29
2.2.1	Oslabení humorální imunitní odpovědi .....	30
2.2.2	Oslabení buněčné imunitní odpovědi .....	30
2.2.3	Virové oslabení imunitní efektorovou funkcí .....	32
2.3	Virové imunomodulátory .....	34
2.3.1	Modulátory na povrchu virionů .....	35
2.3.2	Mimikry cytokinů – virokiny a viroreceptory .....	36
2.3.3	Chemokinové homology .....	36
2.3.4	Inhibitory cytokinů .....	37
2.3.5	Virové regulátory komplementu .....	39
2.3.6	Virové inhibitory proteáz – serpiny .....	39
3	Přímé diagnostické metody virových infekcí .....	40
3.1	Kultivace virů .....	40
3.1.1	Izolace viru .....	41
3.1.2	Buněčné kultury pro pasážování viru .....	41
3.1.3	Detekce cytopatického efektu viru .....	42
3.2	Přímá imunofluorescence .....	43
3.3	Imunochromatografická metoda .....	44
3.4	Imunoanalytické testy .....	45
3.5	Amplifikace virových nukleových kyselin .....	46
3.6	Hybridizace nukleových kyselin viru .....	47
3.7	Elektronová mikroskopie .....	48
3.8	Průtoková cytometrie .....	49
3.9	Hmotnostní spektrometrie .....	50
4	Nepřímé diagnostické metody virových infekcí .....	52
4.1	Komplement fixační test .....	52
4.2	Virus neutralizační test .....	52

4.3	Hemaglutinačně inhibiční test.....	54
4.4	Imunoblot .....	54
4.5	Nepřímá imunofluorescence .....	55
4.6	Nepřímá ELISA .....	56
5	Závěr .....	58
	Literatura.....	59

## SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1: Dynamika obranných imunitních mechanismů v primární infekci.....	22
Obrázek 2: Schéma životního cyklu viru.....	26
Obrázek 3: Genová exprese různých virů v závislosti na typu nukleové kyseliny.....	29
Obrázek 4: Hlavní třídy sekretovaných virových imunomodulátorů .....	35
Obrázek 5: Cytopatický efekt v buňkách.....	43
Obrázek 6: Schéma imunochromatografického testu .....	44
Obrázek 7: Schéma přímé kompetitivní ELISA .....	46
Obrázek 8: Negativně barvený monkeypox virus a herpesvirus .....	48
Obrázek 9: Hmotnostní spektra buněk infikovaných poliovirem.....	51
Obrázek 10: Vyhodnocení kvality barvení vzorků nepřímou imunofluorescenční metodou...56	
Obrázek 11: Schéma pro diagnostiku a kvantifikace viru ZIKA.....	57
Tabulka 1: Přehled RNA virů .....	23
Tabulka 2: Přehled DNA virů.....	25

## SEZNAM ZKRATEK

Anti-EboV	specifická protilátka proti viru horečky Ebola
BSL	úroveň biologické bezpečnosti (biosafety level)
cDNA	DNA syntetizovaná podle RNA v reakci katalyzované enzymem reverzní transkriptázou (complementary DNA)
CKBP	cytokiny (chemokiny) vázající proteiny (chemokines-binding proteins)
CPE	cytopatický efekt (cytopathic effect)
DC	dendritická buňka (dendritic cell)
DNA	deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)
dsRNA	dvouvláknová RNA (double-stranded RNA)
EIA	enzymový imunoanalytický test (enzyme immunoassay)
eIF	eukaryotický iniciační faktor (eukaryotic initiation factor)
ELISA	enzymový imunoanalytický test (enzyme linked immunosorbent assay)
EM	elektronová mikroskopie
FISH	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace (fluorescent in situ hybridisation)
GCRs	receptory spřažené s G-proteinem (G-Protein-coupled receptors)
gp	glykoprotein
HLA	human leukocyte antigen
IE1	bezprostředně časný protein 1 (immediate-early protein 1)
IFN	interferon
IgA	imunoglobulin A
IgD	imunoglobulin D
IgG	imunoglobulin G
IgM	imunoglobulin M
IL	interleukin
JAK	Janus kináza
LAMP	loop-mediated amplification
MALDI	laserová desorpce/ionizace za přítomnosti matrice (matrix-assisted laser desorption/ionization)
MALDI-TOF MS	hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí/ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry)
MHC	hlavní histokompatibilní komplex (major histocompatibility complex)

mRNA	mediátorová RNA (messenger RNA)
NASBA	nucleic acid sequence-based amplification
NK-buňka	přírozený zabíječ (natural killer cell)
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
PRNT	plak redukční neutralizační test (plaque reduction neutralization test)
RNA	ribonukleová kyselina (ribonucleic acid)
rRNA	ribosomální RNA (ribosomal ribonucleic acid)
RT-LAMP	reverzní transkriptáza izotermální amplifikace zprostředkovaná smyčkou (reverse transcription loop-mediated isothermal amplification)
RT – PCR	reverzně transkriptázová PCR (reverse transcription PCR)
SDA	amplifikace vytěsněním vlákna (strand displacement amplification)
SEM	rastrovací elektronový mikroskop (scanning electron microscope)
ssRNA	jednovláknová RNA (single-stranded RNA)
STAT	signální přenašeč a aktivátor transkripce (signal transducer and activator of transcription)
Tc-lymfocyt	cytotoxický T-lymfocyt (cytotoxic T-lymphocyte)
TEM	transmisní elektronový mikroskop (transmission electron microscopy)
Th-lymfocyt	pomocný T-lymfocyt (helper T-lymphocyte)
TNF	tumor nekrotizující faktor (tumor necrosis factor)
TNFR	TNF receptor
Ts-lymfocyt	supresorový T-lymfocyt (suppressor T-lymphocyte)
vIL-10	virový IL-10
vSEMA	virový semaforin
vTNFR	virový rozpustný TNF receptor
vVEGF	virový vaskulární endoteliální růstový faktor (viral vascular endothelial growth factor)

## Úvod

Imunitní systém se brání proti virovým infekcím různými mechanismy. Je členěn na nespecifickou imunitu, ve které je první obranou před virem slizniční imunitní systém. Další obranou jsou nespecifické prostředky s různým eliminačním účinkem infekce, kam patří například interferony, fagocytóza nebo NK-buňky. Imunoglobuliny se řadí mezi specifickou imunitu. Tvoří se po několika dnech či týdnech během virové infekce. Důležitou roli hrají také B a T-lymfocyty.

Viry disponují řadou mechanismů k průniku do hostitelské buňky. Po průniku do buňky je zahájena replikace virů, přičemž má každý vir odlišné pomocné proteiny – viroporiny, které napomáhají v šíření infekce. Ukončená replikace dává vznik novým virionům. Viry také vyvinuly řadu strategií, jak obejít imunitní systém hostitele. Těmito strategiemi jsou například snížená exprese molekul MHC II, narušení buněčné signalizace, inhibice apoptózy nebo narušení komplementového systému. Velkou skupinou jsou virové imunomodulátory, které chrání virus před napadením složkami imunitního systému hostitele. Jsou exprimovány jako sekretované proteiny s anti-imunitními vlastnostmi a člení se do hlavních tříd, kterými jsou inhibitory cytokinů, mimikry cytokinů, inhibitory komplementu a inhibitory proteáz.

V poslední době zaznamenala diagnostika virových infekcí velký pokrok. Staré a nové metody byly kombinovány a mnoho testů bylo automatizováno. Nejběžněji využívanými metodami v přímé diagnostice jsou polymerázová řetězová reakce, imunochromatografický test a stále i kultivace virů. V nepřímé diagnostice jsou nejběžněji využívanými metodami nepřímá ELISA, nepřímá imunofluorescence nebo komplement fixační test. Výzkumné laboratorní metody, jako jsou průtoková cytometrie, hmotnostní spektrometrie nebo elektronová mikroskopie, studují například různé fáze životního cyklu viru, ultrastruktury infikované buňky nebo detekují virové kapsidy.

# 1 Obrana hostitele proti virové infekci

Každý lidský organismus má vlastní imunitní systém, který má za úlohu bránit se proti virům. Imunitní systém disponuje řadou mechanismů, kterými rozpoznává antigeny, na které reaguje. Imunitní mechanismy jsou děleny na nespecifické (přírozené, vrozené) nebo specifické (adaptivní, získané) a podle efektorů na buněčné nebo humorální. [1]

Imunitní odpověď je také podmíněna genetickými faktory. Genetická rezistence a genetická vnímavost závisí na působení MHC systému. [2]

V následujících kapitolách jsou uvedeny jednotlivé imunologické mechanismy, které se uplatňují proti virovým infekcím.

## 1.1 Nespecifická imunita

Řada mechanismů nespecifických obranných mechanismů brání průniku virů do organismu a spuštění infekčního procesu. Do obranných prostředků první linie patří slizniční imunitní systém, který se člení např. na střevní lymfatickou tkáň, lymfoidní tkáň spojenou s průduškami. Mezi jeden z mechanismů uplatňujících se ve slizničním imunitním systému je anatomická struktura dýchacího traktu, která zabezpečuje filtraci infekčního aerosolu. Hlen, který kryje sliznici, je důležitý pro zamezení adheze virů a jejich následnou přepravu pomocí řasinek do nosohltanu z horních i dolních dýchacích cest. Dále kyselé pH žaludku a peristaltika, která omezuje přilnutí virů ke sliznici střeva a žaludku. Epitel, který se rychle obměňuje.

Další obranou proti viru jsou nespecifické inhibitory nacházející se v krvi a sekretech. Jedná se o mukopolysacharidy s podobným složením jako buněčné receptory. Dochází k neutralizaci, usnadnění seskupení a mechanické likvidaci ve vazbě na virion.

Teplotní faktor – při obranných mechanismech organismu hraje významnou roli teplota. Při zvýšené teplotě organismu dochází ke snížení virulence viru a tím tak ke zpomalení replikace termosenzitivních mutant patogenních virů.

Pokud obranné mechanismy první linie nestačí, zapojí se do protivirové obrany nespecifické prostředky imunitního systému. Ty jsou zodpovědné za likvidující účinek infekce, vyvolání a řízení specifické imunitní odpovědi a také posilují mechanismus získané obrany. [2, 3]

### 1.1.1 Interferony

Interferony (IFN) patří k humorální složce nespecifické imunity. Jsou to cytokiny s protivirovým účinkem. Jejich působením dochází k inhibici replikace virů. Další účinek IFN

je aktivace makrofágů a přirozených zabíječů (NK-buňky), zvyšují expresi MHC genů, stimulují nebo inhibují buněčnou imunitu a tvorbu protilátek a další. [1, 2, 3, 4]

IFN se rozděluje do dvou skupin. První skupinou jsou „virem vyvolané interferony“. Mezi ně patří IFN- $\alpha$ , který je tvořen lymfocyty, monocyty a makrofágy. Mají schopnost inhibovat množení viru. Dalším interferonem je IFN- $\beta$ , produkován fibroblasty, a IFN- $\omega$ . IFN- $\alpha$  i IFN- $\beta$  zvyšují expresi MHC I.

Druhou skupinou jsou „imunní interferony“, kam se zařazuje IFN- $\gamma$ . Zdrojem IFN- $\gamma$  jsou CD8 cytotoxické T-lymfocyty (Tc-lymfocyty), CD4 pomocné lymfocyty (Th<sub>1</sub>-lymfocyty) a NK-buňky. Tvorba je navozena virovou infekcí. IFN- $\gamma$  je účinným induktorem MHC II molekul. [1, 2, 3, 5]

Během počátečních stádií virové infekce existuje rovnováha mezi virovou propagací a mechanismem virové inhibice. Interferonová odpověď je síť signálních drah, které pomáhají hostitelské buňce bojovat proti viru. Dělí se na dvě fáze. První je intracelulární fáze, ve které infikovaná buňka produkuje IFN. Druhou fází je intercelulární fáze, kde infekcí indukované interferony jsou sekretovány do extracelulárního prostředí. Sekretované IFN se vážou na receptory pro interferon v okolních buňkách. To vede k syntéze antivirových proteinů a většího počtu IFN. [6]

Mezi interferon-indukované proteiny účastníci se antivirové obrany ve virem infikovaných buňkách patří proteinkináza R, 2',5'-oligoadenylát syntetáza, RNáza L, RNA specifická adenosin deamináza a Mx protein GTPáza.

Proteinkináza R je aktivována autofosforylací. Po aktivaci katalyzuje intermolekulární fosforylaci eukaryotického iniciačního faktoru (eIF) 2 $\alpha$  na serin 51. To vede k inhibici translace poškozením eIF-2B, jenž je katalyzovaný guanin nukleotidovou výměnou. Virová infekce způsobí, že fosforylační stav eIF-2 $\alpha$  se zvýší a mRNA translace se sníží. Aktivace proteinkinázy R a následná fosforylace eIF-2 $\alpha$  změní translační vzor hostitelské buňky.

Interferonem navozená odpověď 2',5'-oligoadenylátu vedoucí k degradaci RNA vyžaduje enzymy 2',5'-oligoadenylát syntetázu a RNázu L. 2',5'-oligoadenylát syntetáza katalyzuje syntézu 2',5'-oligoadenylátu. RNáza L se aktivuje vazbou 2',5'-oligoadenylátu oligonukleotidů. Aktivovaná RNáza L katalyzuje degradaci virové a buněčné RNA, včetně rRNA.

Jedním z důležitých enzymů v editaci RNA je RNA specifická adenosin deamináza. IFN- $\alpha$  a IFN- $\gamma$  navozují RNA specifickou adenosin deaminázu k vyvolání transkripce. Posttranskripční úprava v dsRNA, deaminace adenosinu a výměna za inosin, poskytuje



důležitý mechanismus, kterým funkční aktivita virové a buněčné RNA může být změněna. Tím dochází k ovlivnění biologického procesu.

MxA a MxB proteiny patří mezi Mx proteiny GTPázy. Vnitřní GTPázová aktivita je nutná pro antivirovou aktivitu. Mx proteiny jsou navozeny IFN- $\alpha$  a IFN- $\beta$ . Jejich úkolem je inhibice replikace viru. [5]

Mezi další cytokiny s protivirovým účinkem patří interleukin (IL) 28A, IL-28B a IL-29 (souhrnně IFN- $\lambda$ ). Zdrojem jsou virem infikované buňky (např. dendritické buňky, makrofágy a různé nádorové buněčné linie). [1, 7] Jejich funkce se nejvíce uplatňuje v epiteliálních buňkách, kde se podílí na specializovaných imunitních mechanismech, které chrání epiteliální povrchy podléhající působení virů. [8] IFN- $\lambda$  se váže a signalizují prostřednictvím receptorového komplexu složeného z IFN- $\lambda$ R1 řetězce a sdíleného IL-10R2 řetězce. Nejdříve se navážou na IFN- $\lambda$ R1 řetězec. Tento binární komplex způsobuje rychlou konformační změnu, která usnadňuje navázání receptoru druhého řetězce do komplexu. Následně Janus kináza 1 (JAK) a tyrosinkináza 2 zprostředkují transfosforylaci řetězců. To vede k tvorbě fosfotyrozinu obsahující peptidové motivy na intracelulární doméně řetězce IFN- $\lambda$ R1, které poskytují přechodná dokódovací místa pro latentní předem vytvořené cytosolové proteiny z rodiny signálních přenašečů a aktivátorů transkripce (STAT) zahrnující STAT1 a STAT2. Signalizace prostřednictvím IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  nebo IFN- $\lambda$  receptorového komplexu vede k tvorbě transkripčního komplexu interferonem stimulovaného genového faktoru 3, který se skládá ze STAT1, STAT2 a interferon-regulátorového faktoru 9. Interferonem stimulovaný genový faktor 3 se přemístí do jádra, kde se váže na regulační sekvenci ISRE (IFN-stimulated response elements). Dochází tak k indukci protivirové aktivity a zvýšení exprese MHC I molekul. [9]

### 1.1.2 Komplement

Komplement se řadí k důležité humorální složce přirozené obrany. Skládá se ze sérových proteinů (C1 – C9), které se mění z neaktivní formy na aktivní – enzymy. Přeměna neaktivní formy na aktivní probíhá kaskádovitou reakcí vazby C1 na komplex antigen-protilátka. Výsledkem je lýza infikované buňky. Při navázání komplementu na virion dochází k jeho neutralizaci, opsonizaci, usnadněné fagocytóze a následnému zničení virionu. [2, 3] Komplement také posiluje zánětlivou reakci.

### 1.1.3 Fagocytóza

K buněčné složce vrozené imunity se **přirazuje** fagocytóza. Fagocytóza je schopnost buněk pohlcovat částice. Schopnost fagocytovat mají makrofágy, monocyty, buňky

mononukleárního fagocytárního systému, polymorfonukleární leukocyty nebo buňky mezenchymálního původu, především mikroglie, endotel či retikulární buňky. Takové buňky mají na svém povrchu receptory pro C3 složku komplementu a Fc-receptory. Jsou schopné reagovat na podněty, které způsobují chemotaxi.

Viry nepůsobí na mikrofágy chemotakticky a nejsou tak likvidovány leukocyty. Proto mají mikrofágy v protivirové obraně minimální význam. Naopak důležitý význam v nespecifické obraně proti virům mají makrofágy, které jak již bylo zmíněno, pohlcují a degradují viry. Produkty jejich destrukce následně předkládají jako antigeny imunokompetentním lymfocytům a v přítomnosti specifických protilátek vznikají imunokomplexy, které makrofágy naváží na své Fc-receptory a pohltní je. Makrofágy jsou aktivovány lymfokiny, které zesilují virocidní účinek a fagocytózu. Mimo jiné produkují monokiny. Jeden z nejvýznamnějších je IL-1. Pokud mají makrofágy vázané protilátky na Fc-receptor, působí cytotoxicky na infikované buňky. Jedná se o cytolýzu, která je závislá na protilátkách.

Permisivní buňka k virové infekci je buňka, která je metabolicky vybavena k uskutečnění replikace a může tak dojít k množení viru, tedy pohlčení virionu, obnažení genomu a následnému startu replikace. [2, 3]

#### **1.1.4 NK-buňky**

Mezi další buněčnou složku nespecifické imunity patří NK-buňky. Řadí se mezi cytotoxické buňky lymfocytů s povrchovým znakem CD3-, CD16+ a CD56+. Jejich úlohou je likvidace nádorových a infikovaných buněk virem. NK-buňky mají 2 typy receptorů (stimulační a inhibiční). Inhibiční receptory rozpoznávají MHC I (přítomen na téměř všech neinfikovaných buňkách). V případě ztráty MHC I z buněk v důsledku infekce nebo transformace vede k aktivaci NK-buněk. Po aktivaci NK-buněk dochází k lýze cílových buněk a sekreci některých cytokinů, zejména tumor nekrotizujícího faktoru (TNF $\alpha$ ) a IFN- $\gamma$ . Dochází tak ke včasné inhibici replikace viru. Jsou stimulovány společně působícím IL-2 s IFN a některými glykoproteiny viru. Po zahájení infekce se většinou účinek NK-buněk uplatní po 1-2 dnech. [2, 3, 10]

#### **1.1.5 Zánět**

Zánět je komplex obranných reakcí, který reaguje na poškození tkání a buněk v organismu. [1]

Viry vyvolávají zánět tím, že vniknou a zničí buňky těla. Projevem zánětu je zarudnutí, teplo, otok, bolest a porucha funkce. Zarudnutí je způsobeno dilatací malých krevních cév v oblasti zánětlivého ložiska. Teplo je důsledkem zvýšeného průtoku krve ložiskem a je

zaznamenáváno pouze v periferních částech těla, jako je kůže. Otok je způsoben především hromaděním tekutiny mimo cévy. Bolest je spojená s narušením tkáně způsobené otokem a také je vyvolána určitými chemickými mediátory zánětu, jako je bradykinin, serotonin a prostaglandiny. Ztráta funkce je způsobena poškozením tkáně nebo vyplývá z bolesti či těžkého otoku, která brání pohybu.

V první fázi zánětu dochází k vazokonstrikci poraněné tkáně a následné vazodilataci. Zvyšuje se průtok krve. Cévní stěna je více propustná. Exsudát bohatý na bílkoviny se dostává do tkání a koagulační faktory v exsudátu pomáhají předcházet šíření virů v těle. Jiné proteiny zahrnují protilátky, které pomáhají ničit vpadnuté viry. Leukocyty migrují ke stěně cévy.

Druhou fází je buněčná změna. Bílé krvinky se akumulují v místě poranění. Většina z těchto buněk jsou fagocyty, které fagocytují viry nebo zbytky zničených buněk, a neutrofilů, které ničí enzymy a proteiny.

Ve třetí fázi se zapojují chemické mediátory zánětu uvolněné z krevní plazmy, bílých krvinek (bazofily, neutrofilů, monocytů, makrofágy), krevních destiček, žírných buněk, endotelových buněk a poškozených buněk z tkáně. Mezi jeden z nejznámějších mediátorů je histamin, který vyvolává vazodilataci a zvyšuje vaskulární permeabilitu. Mezi další látky podílející se na zvýšení permeability jsou lysozomální sloučeniny uvolňované z neutrofilů. Mnoho cytokinů má vazoaktivní a chemotaktické vlastnosti (chemokiny – viz. kapitola 2.3.3). Prostaglandiny zvyšují účinek jiných látek, které podporují cévní propustnost. Leukotrieny jsou syntetizovány z kyseliny arachidonové a řadí se mezi další chemické mediátory s vazoaktivní funkcí. Dalšími mediátory zánětu jsou kininy, komplement, koagulační faktory a fibrinolytický systém. Aktivované proteiny komplementu slouží jako chemotaktické faktory neutrofilů, zvyšují vaskulární permeabilitu a stimulují uvolňování histaminu ze žírných buněk. Kininový systém aktivovaný koagulačním faktorem XII produkuje látky, které také zvyšují vaskulární permeabilitu. Koagulační systém mění fibrinogen na fibrin, který je hlavní složkou tekutiny exsudátu. Fibrinolytický systém přispívá k zánětu prostřednictvím tvorby plazminu štěpící fibrin na produkty, které mají vliv na cévní propustnost.

Poslední čtvrtou fází je fáze hojení a regenerace. Poškozené buňky proliferují a regenerují.

[11] Důsledkem zánětu může být exsudát, zjizvení tkáně nebo vznik nádorů.

## 1.2 Specifická imunita

Specifická imunita se aktivuje po setkání s daným antigenem z velké části v sekundárních lymfatických orgánech. Dojde k aktivaci složek s antigenně specifickými receptory pro daný antigen. Specifická imunitní reakce se uplatňuje až po několika dnech či týdnech. Na rozdíl od nespecifické imunity má imunologickou paměť. [12]

### 1.2.1 Imunoglobuliny

Imunoglobuliny jsou glykoproteiny nebo též protilátky a patří k humorální složce imunity. Produkují je plazmatické buňky a B-lymfocyty. Specificky se vážou na antigen. Protilátky se nacházejí rozpuštěné v tělních tekutinách, zejména v krevním séru. Rozdělují se do 5 tříd, „izotopů“. [2]

IgG se vyskytuje jako monomer a je procentuálně nejvíce zastoupen v krvi. Uplatňuje se při neutralizaci virů. Další účinek IgG je opsonizace a je typický pro sekundární odpověď. Přítomný v krvi může být i několik let po infekci. Pro jeho malou molekulovou hmotnost může procházet z krevních cév do dalších tělesných tekutin.

IgM je pentamerem. Objevuje se v primární odpovědi a následně je nahrazen IgG. Přítomnost IgM v séru značí probíhající infekci. Vyznačuje se také opsonizací. Ze všech imunoglobulinů má IgM největší molekulovou hmotnost.

IgD společně s IgE mají nejnižší sérovou koncentraci. Na B-lymfocytech tvoří IgD receptory pro antigen. [2, 13]

IgA se vyskytuje jako dimer. Je obsažen v sekretech slin, sliznic a mateřském mléce. Váže se na mikroorganismy a brání jejich adherenci na epitel. Může neutralizovat virus a je procentuálně druhým nejvíce obsaženým imunoglobulinem v krvi. Pokud je IgA v krvi, může to znamenat chronickou virovou infekci. [2, 3, 13]

Imunoglobuliny IgA, IgM a IgG se nejvíce prosazují v obraně proti virům. [2]

### 1.2.2 Mechanismus působení protilátek

Protilátky jsou při protivirové obraně velmi důležité. Neutralizace viru je jeden z nejvýznamnějších účinků. Protilátka musí mít určitou, vysokou afinitu, aby se navázala na epitop virionu. Dojde k blokaci virových povrchových receptorů a také vzniká imunokomplex antigen-protilátka, který má stimulující účinek pro fagocytózu. Tím se zabrání přilnutí viru na hostitelskou buňku. [2, 3, 14]

Dalším účinkem protilátek je aktivace komplementu. Dochází ke zničení obalených virů nebo lýze buněk, které jsou infikované. Na lýze infikovaných buněk se také podílí

na protilátkách cytotoxická aktivita lymfocytů, neutrofilů a makrofágů. Obsahují Fc-receptor, kterým se váží s protilátkou na povrchový antigen obaleného viru nebo infikované buňky. [2, 3]

Capping je dalším účinkem protilátek. Virové antigeny se shlukují v buněčné membráně a následně tyto shluky jsou odtrhnuty buňkou.

Dalším obranným mechanismem protilátek je modulace exprese virových antigenů. Společně s capping vedou k inhibici replikace virů. Naopak za vhodných podmínek, snížení hladiny protilátek, mohou napomáhat perzistenci viru. [3]

### **1.2.3 B-lymfocyty**

B-lymfocyty patří do buněčné složky specifické imunity. Nejvíce B-lymfocytů se nachází v lymfoidních orgánech. [3] Produkují protilátky po aktivaci s antigenem. Vytvoří se komplex antigen-protilátka, který je následně pohlcen fagocyty. Některé B-lymfocyty se mění na buňky paměťové. [15]

### **1.2.4 T-lymfocyty**

T-lymfocyty, stejně jako B-lymfocyty, jsou součástí specifické buněčné obrany. Převážně se nachází v lymfatickém oběhu a krvi. V přítomnosti antigenu dojde k proliferaci a diferenciaci T-lymfocytů na efektorovou buňku. Obsahují specifické T-buněčné receptory, které reagují jen s antigeny svázanými s glykoproteiny vlastního MHC.

Rozeznávají se 2 základní typy T-lymfocytů. Prvními jsou Th-lymfocyty s membránovým znakem CD4, které se diferencují na efektorové buňky po jejich aktivaci. Další funkcí je aktivace makrofágů, produkce lymfokinů a vznik imunopatologických reakcí.

Druhým typem jsou supresorové T-lymfocyty (Ts-lymfocyty) a Tc-lymfocyty s membránovým znakem CD8, které se zapojují zejména v protivirové obraně. [3]

Existují i další druhy T-lymfocytů, a to paměťové, regulující,  $\gamma\delta$  T-lymfocyty.

### **1.2.5 Mechanismus působení buněčné imunity**

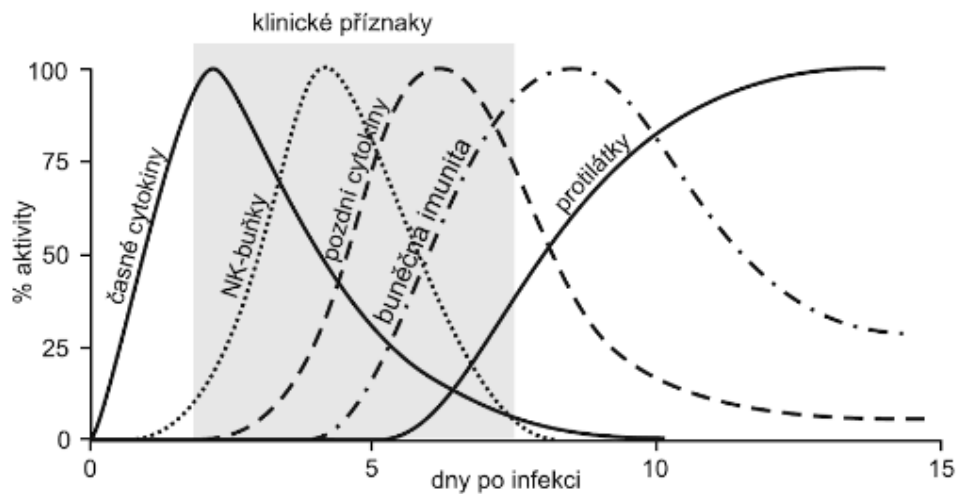
Th-lymfocyty rozpoznávají peptidy virů pomocí antigen prezentujících buněk, které jsou ve spojení s MHC II. Po setkání s antigenem dojde k aktivaci Th-lymfocytů a transformaci na Th<sub>1</sub> buňky, které produkují cytokiny TNF- $\beta$ , IFN- $\gamma$  a IL-2. IL-2 stimuluje Tc-lymfocyty k činnosti.

Dále Tc-lymfocyty rozpoznávají a eliminují infikované buňky tím, že rozeznávají peptidy virů zastoupené na membráně ve spojení s MHC I. Ke zničení infikované buňky je nutná přímá interakce Tc-lymfocytů s virem napadenou buňkou. [2, 14]

### 1.3 Dynamika obranných mechanismů imunitního systému

Obrázek 1 ukazuje, že v počáteční fázi infekce, během několika hodin, se jako první uplatňují IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  a další cytokiny s prozánětlivým účinkem, např. TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6. V pozdní fázi se zapojují IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-12. Během 2-4 dnů se zapojují NK-buňky a ve stejnou dobu vrcholí viremie s klinickými příznaky. Následně se uplatňuje specifická imunita, především Th-lymfocyty, které produkují další cytokiny, a Tc-lymfocyty. Jako poslední se zapojují protilátky. Uplatňují se většinou po ustupujících klinických příznacích, a to 14-21 dní po infekci. [14]

U vakcinovaných jedinců nebo reinfekci se uplatňují paměťové buňky a imunitní odpověď je tak rychlejší.



Obrázek 1: Dynamika obranných imunitních mechanismů v primární infekci, převzato z [14].

## 2 Mechanismy virů proti hostiteli

Viry ve snaze invaze do hostitelské buňky využívají různé způsoby vniknutí a obcházení imunitní hostitelské odpovědi.

Cílem této kapitoly je shrnutí mechanismů virových úniků před hostitelem, virových imunomodulátorů a také životního cyklu a vstupu viru do buňky hostitele.

V současné době je popsáno velké množství virů. Pro přehlednost je zde uveden výčet lékařsky významných virů a jejich zařazení do čeledí a rodů podle typu nukleové kyseliny, genomu (polarita) a strategie replikace (tabulka 1 a 2). [2]

Tabulka 1: Přehled RNA virů. Převzato a upraveno z [16].

Charakteristika	Čeď	Rod	Nejvýznamnější druhy
Neobalené viry s kubickou symetrií; jednovláknová RNA (+ polarity)	<i>Picornaviridae</i>	<i>Enterovirus</i>	poliovirus I, II, III; viry Coxsackie; ECHO viry
		<i>Rhinovirus</i>	lidské rhinoviry
		<i>Hepatovirus</i>	virus hepatitidy A (HAV)
		<i>Aphthovirus</i>	virus slintavky a kulhavky
		<i>Cardiovirus</i>	viry encefalomyokarditidy
	<i>Caliciviridae</i>	<i>Norovirus</i>	virus Norwalk
		<i>Sapovirus</i>	virus Sapporo
	<i>Astroviridae</i>	<i>Mamastrovirus</i>	lidské astroviry
neurčena	Calicivirus-like	virus hepatitidy E (HEV)	
Neobalené viry s kubickou symetrií; dvouvláknová segmentovaná RNA	<i>Reoviridae</i>	<i>Orthoreovirus</i>	lidské reoviry
		<i>Rotavirus</i>	lidské rotaviry
		<i>Orbivirus</i>	skupina virů Kamerovo
		<i>Coltivirus</i>	virus coloradské klíšťové horečky
Obalené viry s kubickou symetrií; jednovláknová RNA (+ polarity)	<i>Togaviridae</i>	<i>Alphavirus</i>	virus Sindbis; virus chikungunya
		<i>Rubivirus</i>	virus zarděnek
	<i>Flaviviridae</i>	<i>Flavivirus</i>	virus žluté zimnice; virus dengue I-IV (DENV); virus klíšťové encefalitidy; virus západonilské encefalitidy; virus Zika
		<i>Hepacivirus</i>	virus hepatitidy C (HCV)

Obalené viry s helikální symetrií; jednovláknová RNA (+ polarity)	<i>Coronaviridae</i>	<i>Coronavirus</i>	lidské koronaviry; původce SARS
Obalené viry s helikální symetrií; jednovláknová RNA (- polarity)	<i>Paramyxoviridae</i>	<i>Respirovirus</i>	viry parainfluenzy 1 a 3; virus Sendai
		<i>Rubulavirus</i>	viry parainfluenzy 2 a 4; virus parotitidy
		<i>Avulavirus</i>	virus newcastleské choroby
		<i>Morbilivirus</i>	virus spalniček; virus dobytčího moru
		<i>Henipavirus</i>	viry Nipah a Hendra
		<i>Pneumovirus</i>	respirační syncyziální virus (RSV)
		<i>Metapneumovirus</i>	lidský metapneumovirus
	<i>Filoviridae</i>	<i>Ebolavirus</i>	virus horečky Ebola (EboV)
		<i>Marburgvirus</i>	virus horečky Marburg
	<i>Rhabdoviridae</i>	<i>Lyssavirus</i>	virus vztekliny
<i>Vesiculovirus</i>		virus vesikulární stomatitidy	
Obalené viry s helikální symetrií; jednovláknová segmentovaná RNA (- polarity)	<i>Orthomyxoviridae</i>	<i>Influenzavirus</i>	viry chřipky A, B, C
	<i>Bunyaviridae</i>	<i>Orthobunyavirus</i>	skupina kalifornských virů; skupina Bunyamwera
		<i>Phlebovirus</i>	virus horečky papatači; virus horečky údolí Rift
		<i>Nairovirus</i>	virus krymsko-konžské hemorhagické horečky
		<i>Hantavirus</i>	virus Hantaan
	<i>Arenaviridae</i>	<i>Arenavirus</i>	virus horečky Lassa; virus lymfocytární choriomeningitidy
neurčena	<i>Deltavirus</i>	virus hepatitidy D (HDV)	
Obalené viry s kubickou symetrií; obsahují dvě jednovláknová RNA (+ polarity) a reverzní transkriptázu	<i>Retroviridae</i>	<i>Lentivirus</i>	virus lidského imunodeficitu 1 a 2 (HIV)
		<i>Deltaretrovirus</i>	lidský T-lymfotropní virus 1 (HTLV)
		<i>Spumavirus</i>	lidský vakuolizující virus



Tabulka 2: Přehled DNA virů. Převzato a upraveno z [16].

Charakteristika	Čeleď	Rod	Nejvýznamnější druhy
Neobalené viry; jednovláknová DNA	<i>Parvoviridae</i>	<i>Erythrovirus</i>	parvovirus B19
		<i>Dependovirus</i>	adenoasociované viry (AAV)
Neobalené viry; dvouvláknová DNA	<i>Polyomaviridae</i>	<i>Polyomavirus</i>	viry JC a BK; opičí virus SV40
Neobalené viry; dvouvláknová DNA	<i>Papillomaviridae</i>	<i>Papillomavirus</i>	viry bradavic
Neobalené viry; dvouvláknová DNA	<i>Adenoviridae</i>	<i>Mastadenovirus</i>	lidské adenoviry
Obalené viry; dvouvláknová DNA	<i>Herpesviridae</i>	<i>Simplexvirus</i>	virus herpes simplex (HSV 1 a 2)
		<i>Varicellovirus</i>	Varicella zoster virus (VZV)
		<i>Lymphocryptovirus</i>	virus Epstein a Barrové (EBV)
		<i>Cytomegalovirus</i>	lidský cytomegalovirus (CMV)
		<i>Roseolovirus</i>	lidský herpetický virus 6 (HHV6); lidský herpetický virus 7 (HHV 7)
		<i>Radinovirus</i>	lidský herpetický virus 8 (HHV8)
Obalené viry; dvouvláknová DNA	<i>Hepadnaviridae</i>	<i>Orthohepadnavirus</i>	virus hepatitidy B (HBV)
Obalené viry; dvouvláknová DNA, komplexní stavba	<i>Poxviridae</i>	<i>Orthopoxvirus</i>	virus varioly; virus vakcinie; viry zvířecích neštovic
		<i>Parapoxvirus</i>	virus paravakcinie; virus Orf
		<i>Yatapoxvirus</i>	virus Yaba; virus Tana
		<i>Moluscipoxvirus</i>	virus molluscum contagiosum

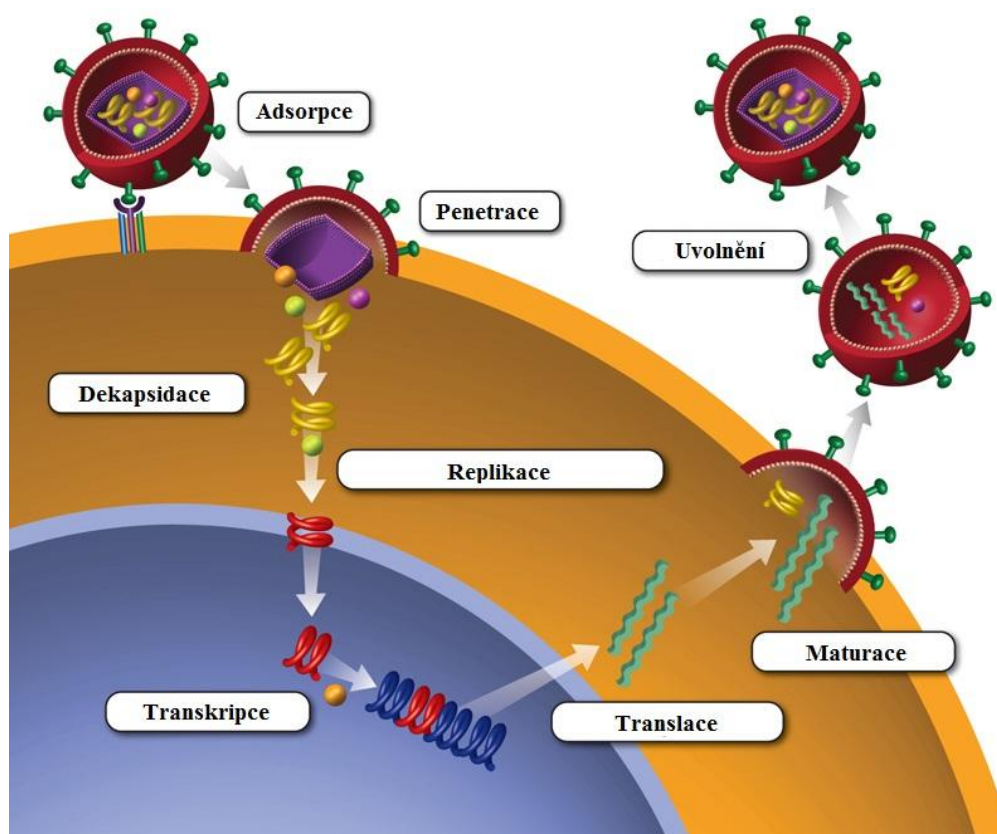
## 2.1 Životní cyklus viru a vstup viru do buňky

Z biologického hlediska jsou viry infekční agens, která se replikují pouze uvnitř živého organismu. Virové genomy kódují strukturální proteiny pro tvorbu virionů. Kódují také enzymatické a pomocné proteiny, které napomáhají infekci a replikaci. Mezi jeden z pomocných proteinů je viroporin. Viroporiny jsou malé, hydrofobní transmembránové

virové proteiny, které oligomerizací tvoří hydrofilní póry v hostitelských buněčných membránách. Pomáhají v některých stádiích virového životního cyklu (od počátku replikace genomu až po uvolnění viru). Každý vir má odlišné viroporiny s různou funkcí v závislosti na buněčném místě v průběhu životního cyklu, např. viroporin M2 chřipkového viru A s funkcí obnažení genomu nebo Vpu viroporin HIV-1 s funkcí degradace CD4. [17]

Životní cyklus je schematicky znázorněn na obrázku 2. Začíná navázáním viru na cílovou buňku, penetrací virionu do buňky, dekapsidací, replikací virového genomu, transkripcí, translací, maturací virionů a končí uvolněním nových virionů z buňky.

Cílem virové částice je transport genomu v replikačně-kompetentní buňce. [18]



Obrázek 2: Schéma životního cyklu viru. Upraveno a převzato z [19].

### 2.1.1 Adsorpce virionu na povrch buňky

Počáteční setkání a adsorpce viru k hostitelské buňce je zprostředkováno pomocí virových povrchových složek – ligandů a receptorů nacházejících se na plazmatické membráně cílových buněk. Tyto první interakce jsou nespecifické a způsobené elektrostatickými silami. Následné interakce jsou již specifické, zapojuje se více receptorů. Receptory jsou buněčné

povrchové molekuly (bílkoviny, sacharidy nebo lipidy), které poskytují funkce nezbytné pro infekční proces. [2, 20, 21] Každý vir se váže na různé receptory. To zvyšuje aviditu, ale také tvorbu mikrodoménových membrán bohatých na receptory, které mohou vyvolat endocytózu. Po navázání viru na povrch buňky a před internalizací se pohybuje vir bočně podél povrchu buňky. Pohyb může být způsoben difúzí. [18]

### **2.1.2 Průnik viru do buňky**

Penetrace zahrnuje přenos genomu a pomocných proteinů do cytosolu. Většina virů využívá ke vstupu do hostitelské buňky procesu endocytózy. Pro vstup viru existuje několik míst, a to cytoplazmatická membrána, časný endozom, zralý endozom, makropinozom a endoplazmatické retikulum. [18]

Po penetraci viry a virové kapsidy využívají cytoplazmatických transportních systémů buňky k přesunu na místo replikace v cytosolu (RNA viry) nebo jádře (DNA viry).

Jakmile jsou membrány v těsné blízkosti, dochází k průniku obalených virů membránovou fúzí, která je zprostředkovávána specifickými membránovými glykoproteiny. [21] Během fúze dochází ke splynutí virů s buňkou. Výsledkem je pak uvolnění virové kapsidy do cytosolu. [18]

Mechanismy průniku neobalených virů jsou méně dobře charakterizovány. Adenoviry způsobují lýzu endozomů umožňující únik do cytosolu. Piconaviry podléhají konformačním změnám, které umožňují částicím vytvářet póry. Přes tyto póry je virová RNA uvolněna do cytosolu. Polyomaviry procházejí endoplazmatickým retikulem a využívají výhod dráhy degradace spojené s endoplazmatickým retikulem ke vstupu do cytosolu.

V cytosolu viry a virové kapsidy musí najít cestu k replikaci v jádře nebo specifických místech v cytoplazmě. Mnoho proteinů pracujících jako molekulární motory (např. dynein, dynactin) umožňují pohyb podél mikrotubulů směrem k jádru. Pro transport do jádra se vážou jaderné importní receptory pomocí virových kapsidů nebo genomů k jadernému pórovému komplexu.

Viry s velkými kapsidami (např. herpesviry, adenoviry) jsou příliš velké k průniku do jádra skrz jaderný pórový komplex. Vyvinuly proto mechanismus k uvolnění genomu a jeho průnik přes jaderný pórový komplex.

Viry s menšími kapsidami (HBV, polyomaviry) mohou projít přes póry v neporušeném nebo upraveném tvaru. Virus chřipky vyřešil problém nadměrné velikosti genomu jeho rozdělením do osmi separovaných RNA segmentů, které jsou individuálně zabaleny

do virových ribonukleoproteinů. Tyto virové ribonukleoproteiny jsou dostatečně malé pro vstup přes póry a každý obsahuje lokalizační signál nezbytný pro import do jádra. [18]

### **2.1.3 Obnažení genomu**

Dalším krokem procesu vstupu viru do buňky je dekapidace. Obnažení genomu z pravidla nastane, jakmile virový kapsid dosáhl konečného umístění. Nicméně obnažení genomu nastává u virů s velkými kapsidy v různých fázích penetrace. Mechanismus obnažení genomu je různý. Některé viry se spoléhají na hostitelské buněčné faktory k destrukci virových obalů (ribozomy, proteazomy, molekulární motory), zatímco jiní zapojují své vlastní strukturální složky (proteolytické enzymy). Adenoviry využívají dynein, kinetin a nukleoporiny k otevření virových kapsidů, které jsou připojeny k jadernému pórovému komplexu. [18]

### **2.1.4 Replikace a exprese virového genomu**

V replikaci virového genomu dochází jednak k replikaci, dále pak transkripci mRNA a translaci.

Během replikace DNA virů nejdříve buněčné DNA polymerázy přepisují vlákna DNA do komplementárních vláken. Dochází k transkripci mRNA, která se uskutečňuje zejména v jádře.

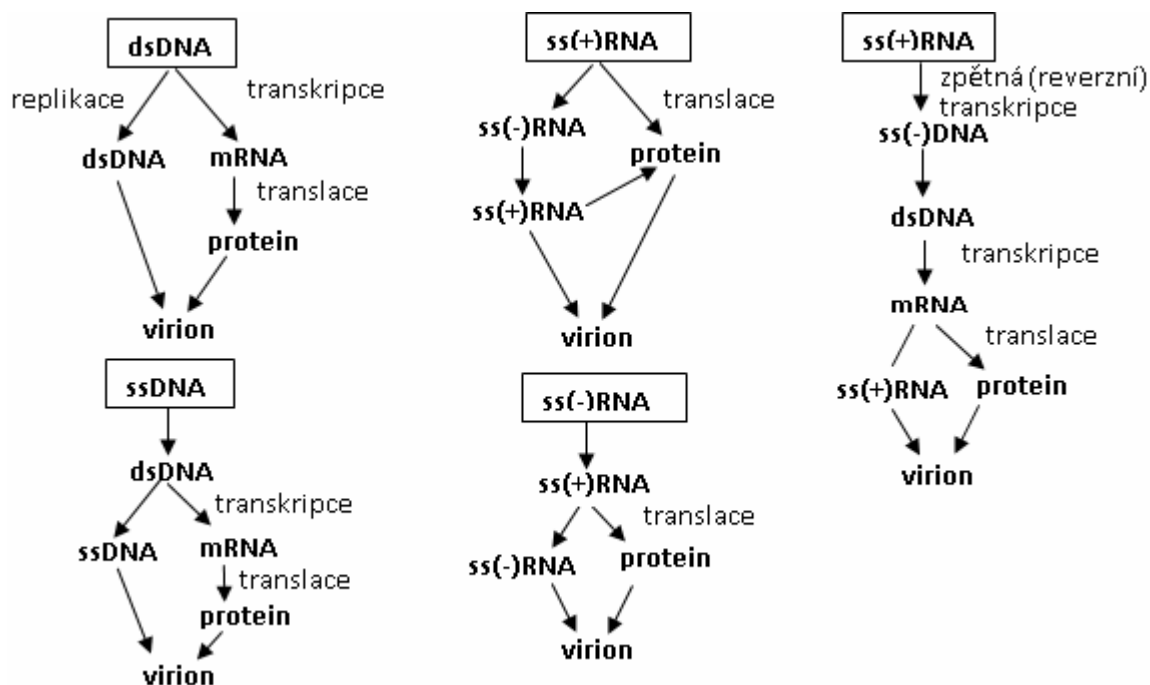
Při genové expresi je mRNA překládána na ribozomech do polypeptidů. Podle uspořádání virového genomu probíhá transkripce a translace několika způsoby (obrázek 3).

RNA viry využívají své vlastní enzymy k syntéze mRNA, která se děje oproti DNA virům v cytoplasmě (mimo retroviry, viry influenzy). Další odlišností je využití enzymu RNA dependentní RNA polymerázy k replikaci a transkripci. Také u RNA virů dochází k různým způsobům transkripce vlivem odlišných genomů.

Polarita virové RNA je důležitým faktorem transkripce. V případě jednovláknových virů s pozitivní polaritou genomu nahradí RNA svou podobou mRNA. V ribozomech tak dojde k překlada na proteiny. Samotná replikace je zahájena vznikem RNA polymerázy.

U jednovláknových nebo dvouvláknových RNA virů s negativní polaritou genomu je RNA přepsána do mRNA a následně pak dochází k její translaci na proteiny. Tyto viry obsahují již funkční RNA polymerázu v nukleokapsidě.

Viry s reverzní transkripcí využívají reverzní transkriptázu k prepisu (+)ssRNA do dvouvláknové DNA. Tím vzniká tzv. provirus, který je přenesen pomocí enzymu integrázy do chromozomu hostitelské buňky. Následně dochází k prepisu a překlada proviru do virových proteinů. [2, 3]



Obrázek 3: Genová exprese různých virů v závislosti na typu nukleové kyseliny. Převzato z [22].

### 2.1.5 Maturace a uvolnění virových partikulí z hostitelské buňky

V místě replikace genomu se shlukují strukturální proteiny neobalených virů a vytvářejí kapsidy, kde se nachází i nukleová kyselina. Většina neobalených virů je uvolněna lýzou buňky. Naopak u obalených virů dochází k pučení.

Nově vzniklé neobalené viry využívají obrácenou pinocytózu k opuštění buňky nebo dochází k lýze buňky a následnému uvolnění.

Mezi další způsoby uvolnění virionů patří prostup mezibuněčnými kanálky a přestup do sousedních buněk po fúzi cytoplazmatické membrány. [2]

## 2.2 Strategie úniků virů před imunitní odpovědí hostitele

Hostitel si vyvinul imunitní systém schopný napadnout viry a infikované buňky, ale také viry vytvořily řadu mechanismů úniků před imunitním systémem hostitele. Čím větší je virový genom, tím rozmanitější mechanismy jsou použity k prodloužení časového okna pro virovou replikaci a šíření virových částic. Strategie úniku před imunitní odpovědí se dělí na tři základní části imunitního systému, a to humorální imunitní reakce, kdy strategie umožňují neobjevení viru před humorální imunitní odpovědí, např. změnou imunodominantních epitopů. Další částí je buněčná imunitní odpověď, kdy strategie narušují fungování buněčné imunitní odpovědi tím, že poškozují funkci NK-buněk. Poslední částí je

imunitní efektorová funkce, kdy strategie narušují imunitní efektory, např. expresí cytokinů nebo zablokováním apoptózy. Členové rodiny *Herpesviridae* jsou schopni zasahovat do imunitního systému hostitele téměř na každé úrovni imunitního působení. Např. protilátkami rozpoznáný virový epitop, prezentace virových peptidů MHC I a II, aktivace komplementu a aktivace apoptózy. To všechno může být narušeno herpesviry. [23]

### 2.2.1 Oslabení humorální imunitní odpovědi

Virus chřipky je typickým příkladem viru, který účinně a efektivně působí na antivirovou imunitu buněk. Virus chřipky typu A vede k rozsáhlým epidemiím po celém světě. Byly způsobeny jediným podtypem viru. Lidské tělo může rychle eliminovat virus tím, že vytvoří ochrannou imunitu proti viru, především směřováním neutralizačních protilátek proti hlavnímu povrchovému proteinu hemagglutininu chřipkového viru. Nicméně chřipkový virus A vyvinul dvě formy antigenních změn, aby nebyl eliminován. Jednou z forem je antigenní drift, který je způsoben bodovými mutacemi genů kódujícími hemagglutinin a neuraminidázu. To může vést k úniku virových variant před neutralizujícími protilátkami oslabením vazby protilátek k epitopům. Druhou formou je antigenní shift. RNA segmenty se vymění mezi virovými kmeny v sekundárním hostiteli, což může vést k významným změnám proteinu hemagglutininu na virovém povrchu. V takovém případě protilátky produkované v reakci na předchozí infekce nemohou rozpoznat virus. [23]

### 2.2.2 Oslabení buněčné imunitní odpovědi

Buněčně zprostředkovávaná imunitní odpověď, zejména CD8<sup>+</sup> a Tc-lymfocyty, hrají důležitou roli při eliminaci virové infekce. Proto viry často interferují s aktivací CD8<sup>+</sup> a CD4<sup>+</sup> blokováním prezentace antigenu v kontextu s MHC I a II. Každý krok v rámci MHC I a II biogeneze a transportní cesty je „pozvánkou“ pro manipulaci virů.

**Narušení proteazomální degradace.** Peptidy, které jsou prezentovány v kontextu s MHC I jsou výsledkem degradace virových proteinů proteazomů v cytosolu. Proteazomální degradace je závislá na proteolytickém štěpení specifických sekvencí uvnitř proteinu. Úpravou částí genomu, a tím i úprava virového proteinu, virus může uniknout zpracováním proteinů do peptidů. Kódovaný nukleární antigen EBNA-1 EBV uniká Tc-lymfocytům a kóduje mechanismus k inhibici tvorby epitopů. Exprese matrice proteinu pp65 (UL83) CMV vede k fosforylaci několika proteinů. Fosforylace zbytků threoninu uvnitř okamžitých-časných proteinů může omezit přístup proteinu k proteazomální degradaci nebo přesměřovat protein na jinou cestu degradace.

**Narušení peptidových transportérů spojených se zpracováním antigenů.** Peptidy projdou membránou endoplazmatického retikula prostřednictvím translokace transportérů spojených se zpracováním antigenů, kde jsou peptidy zkráceny a následně navázány do MHC I. HSV 1 a 2 kóduje cytoplazmatický protein ICP47, který blokuje prezentaci virových peptidů MHC I blokováním peptidové vazby transportérů spojených se zpracováním antigenů prostřednictvím soutěživých peptidů. Protein E3-19k adenoviru je syntetizován na membráně vázaných ribozomů v hostitelské buňce a následně translokován přes drsné endoplazmatické retikulum a glykosylován. V endoplazmatickém retikulu proteiny vázané na MHC I těžkých řetězců s vysokou afinitou inhibují terminální glykosylaci antigenů MHC I. Tím zabraňují translokaci na povrch buněk. Cytoplazmatický HIV-1 Nef polypeptid je zodpovědný za snížení exprese MHC I molekul. Nef je exprimován v prvních fázích virové infekce a je navržen k napojení MHC I molekul ke klathrinem obalené jamce za účasti endocytózy plazmatické membrány a Golgiho aparátu. Také Nef snižuje expresi CD4 stejným mechanismem. Kromě mechanismů, které interferují s MHC I na povrchu buněk, využívá CMV radikálnější přístup. Exprese proteinů US2 a US11 vede k degradaci MHC I. MHC I molekuly jsou transportovány z endoplazmatického retikula zpět do cytosolu, kde jsou degradovány proteazomem. Protein Vpu HIV-1 je malý integrální membránový fosfoprotein s třemi funkcemi. Jedná se o snížení exprese MHC I molekul, zvětšení virové částice z plazmatické membrány infikovaných buněk a degradace virového koreceptoru CD4. HHV-7 kóduje protein U21, který se váže a odkloňuje MHC I molekuly z endoplazmatického retikula do lysozomu. HHV-8 kóduje K3 a K5 protein, který odstraňuje molekuly MHC I z buněčného povrchu. Proteiny tak rychle vyvolají endocytózu molekul.

**Indukce funkční paralýzy dendritických buněk.** Dendritické buňky (DC) mají za úlohu zpracovávat a prezentovat antigeny. Nezralé DC v periferní tkáni přebírají a zpracovávají antigeny, které nejsou tělu vlastní. Po kontaktu s takovým antigenem začínají dozrávat. Zralé DC mají sníženou kapacitu zpracování antigenu a zvyšují buněčné povrchové exprese MHC a kostimulaci molekul. CMV může infikovat nezralé DC a indukuje tak funkční paralýzu. Je snížena exprese MHC molekul a kostimulace molekul. Molekuly se stanou nereagující a nedozrávají. Ztrácí schopnost vylučovat IL-2, IL-12 a vyvolat účinnou odpověď T-lymfocytů. Pozdně infikované buňky CMV mohou vylučovat rozpustné faktory, jako je transformující růstový faktor  $\beta$ 1, který interferuje s dozráváním DC. Výsledkem je křížová prezentace proteinu pp65 a odpověď CD8+ T-lymfocytů je blokována. [23]

**Snížená exprese MHC II molekul.** CMV je schopna zasahovat do CD4+ T-buněčného rozpoznávání infikované buňky inhibicí MHC II endoteliálních a epiteliálních buněk. VZV

inhibuje expresi STAT1 $\alpha$  a JAK2 a tím inhibuje transkripci IFN regulačního faktoru 1 a MHC II transaktivátoru. Exprese proteinu US2 CMV způsobuje degradaci dvou základních proteinů MHC II, a to HLA-DM- $\alpha$  a HLA-DR- $\alpha$ . Exprese US2 sníží nebo zruší schopnost prezentovat antigeny CD4+ T-lymfocytům. Také způsobuje „neviditelnost“ infikovaných makrofágů pro CD4+ T-lymfocyty. Tato vlastnost je důležitá pro reaktivaci viru.

**Vyhnutí se likvidaci NK-buňkami.** CMV se vyhýbá zabíjení NK-buňkami expresí MHC homologů, které zapojují inhibiční receptory NK-buněk a působí jako ochrana před cytotoxicitou NK-buněk. CMV kóduje glykoprotein (gp) UL18 homolog, který váže endogenní peptidy. CMV exprimuje také UL16, který váže členy MHC I (UL-16 vázající protein a polypeptidová sekvence B příbuzná s MHC I). Jsou to ligandy pro receptor aktivující NK-buňky, NKG2D / DAP10 a tato interakce je blokována rozpustným UL16.

**Antigenní varianty T-buněčných epitopů.** Antigenní varianty mají vliv na buněčnou imunitní odpověď. Účinnost zpracování a prezentace epitopů Tc-lymfocytů je určeno sekvencí epitopů, ale také zbylých částí obklopující protein. Proto varianty v relativně široké oblasti mohou vést k pozměnění peptidů vázajících MHC nebo snížení afinity interakce peptid-MHC, což vede k nestabilním peptid-MHC komplexům. Např. u HIV infikovaných jedinců se vyvíjejí varianty, ve kterých jsou epitopy peptidů mutovány. Tyto epitopy fungují jako antagonisté a aktivně umlčují T-lymfocyty specifické pro HIV. [23]

### 2.2.3 Virové oslabení imunitní efektorovou funkcí

Cytokiny jsou důležitými modulátory imunitní odpovědi. CMV homolog imunomodulátoru IL-10 má imunosupresivní vlastnost, inhibuje proliferaci mitogen-stimulované periferní mononukleární buňky. EBV exprimuje protein BCRF1, který je biologicky aktivním homologem IL-10. HIV proteiny Tat a gp120 indukují produkci IL-10 prostřednictvím aktivace hostitelských transkripčních faktorů zahrnující NK- $\kappa$ B. HBV inhibuje produkci IFN- $\alpha$  a snižuje také reakci infikované buňky na IFN. Adenoviry kódují alespoň tři geny, které mají antagonistický účinek k TNF.

**Receptory spřažené s G-proteinem (GCRs).** Spojují vazbu extracelulárního ligandu (hormon, neurotransmitter, chemoatraktivní chemokiny) k procesům uvnitř buňky jejich aktivací asociovaných G-proteinů. Vazba ligandu na jeho receptor spouští signální dráhu molekul vedoucí ke zvýšení hladiny intracelulárního Ca<sup>2+</sup>. Výsledkem je zesílení počátečního signálu převádějící ligandem-GCR interakci do buněčných komplexních procesů, jako je chemotaxe. Virové GCR jsou všudypřítomné a sugescí týkajících se funkcí ve virové



patogenitě zahrnuje imunitní únik sekvestrovanými chemokiny, šíření virů, reaktivaci latentního viru, modulaci buněčného přeprogramování a šíření.

**Narušení buněčné signalizace.** Virová replikace a šíření v hostiteli závisí na vysoce specifických interakcích virových proteinů s infikovanou buňkou. Např. virové proteiny způsobují změnu buněčného cyklu infikované buňky, aby se vytvořilo příznivé prostředí buňky pro replikaci viru. Stejný význam pro úspěšné šíření virů je útlum imunitní odpovědi hostitele. CMV inhibuje interferonem stimulovanou antivirovou odpověď a imunoregulační odpověď blokováním více úrovní interferonového signálu transdukce. Obalový glykoprotein B je mediátor vstupu CMV. Interakce obalového glykoproteinu B s buněčnými receptory je principem mechanismu, kterým CMV pozměňuje expresi buněčných genů během infekce nezávisle na virové replikaci. Mnoho signálních cest, které ovládají chování buněk, jsou regulovány tyrosinkinázou (zvláště ty z rodiny Src). EBV exprimuje protein LMP2A během latentní infekce. Tyrosinkinázová signální kaskáda není spuštěna, pravděpodobně kvůli vazbě tyrosinfosforylovaného LMP2A k doméně Src rodiny kinázy. Spuštění kaskády v buňkách, které neexprimují LMP2A, vede k reaktivaci EBV a lytické fázi infekce. [23]

**Inhibice apoptózy.** Apoptóza je proces programované buněčné smrti. Je indukována aktivací „receptorů smrti“ patřící do rodiny TNF (TNFR). Mezi TNFR patří např. Fas (CD95) nebo TNFR-1. Po aktivaci receptorů jsou signály vedeny přes doménu smrti na cytoplazmatické membráně. Po aktivaci receptoru domény smrti interagují s proteinem asociovaným s Fas doménou smrti nebo proteinem asociovaným s TNFR1 s doménou smrti. Aktivací kaspázy 8 dochází ke spuštění apoptózy. [23] Hostitelské buňky reagují na mnoho virových infekcí indukci a aktivací proapoptického antionkoproteinu p53. Také aktivují transkripci proapoptických genů Bax, Fas, TRAIL receptor 2 a potlačují transkripci antiapoptik genu Bcl-2. [24] Aby viry zabránily předčasné apoptóze a zničení infikované buňky, kódují proteiny, které se vážou a inaktivují p53 různými mechanismy. Vyvinuly inhibitory kaspáz, Bcl-2 homology nebo protein inhibující funkci kaspázy 8. Virový protějšek proteinu inhibující funkci kaspázy 8 je kódován např. HHV-8 nebo HSV (kinázový protein US3). Blokují apoptózu v různých reakčních buněčných typech a usnadňují tak šíření virů. [23] Protein US37 CMV je lokalizovaným virovým mitochondriálním inhibitorem apoptózy. Je lokalizován v membráně mitochondrií jako Bcl-2, ale nemá s ní sekvenční podobnost. Inhibuje Fas-zprostředkovanou apoptózu. Protein UL36 a virový ICA CMV se spojuje s prokaspázou 8 a blokuje její aktivaci. Všechny genotypy kódují virový IAP, který má inhibiční funkci apoptózy. [23, 24]

**Narušení komplementového systému.** Důležitý efektorový mechanismus imunitního systému je komplementový systém, který eliminuje infikované buňky aktivací komplementové kaskády. Hostitelské buňky jsou chráněny proti působení komplementového systému expresí regulátorů aktivace komplementu na jejich membránách. Virové narušení komplementového systému může být různé. Některé viry exprimují proteiny s podobnou funkcí buněčných regulátorů aktivace komplementu. Některé viry začleňují hostitelské regulátory aktivace komplementu do kapsidu nebo vylučují rozpustný protein, který blokuje aktivaci komplementu. Variola virus kóduje homologní kontrolní protein komplementu, kterým je inhibitor enzymů komplementu neštovic. [23]

Mezi další strategie úniků virů je únik virů před neutralizujícími protilátkami. Ebola virus exprimuje transmembránový povrchový glykoprotein, který tvoří trimerní hroty složené z glykoproteinu 1 a 2. Jeden z glykoproteinů je rozpustný a je sekretován ve velkém množství z infikovaných buněk. Váže antivirové specifické protilátky. Tím dochází k obraně viru před neutralizací. [2, 25]

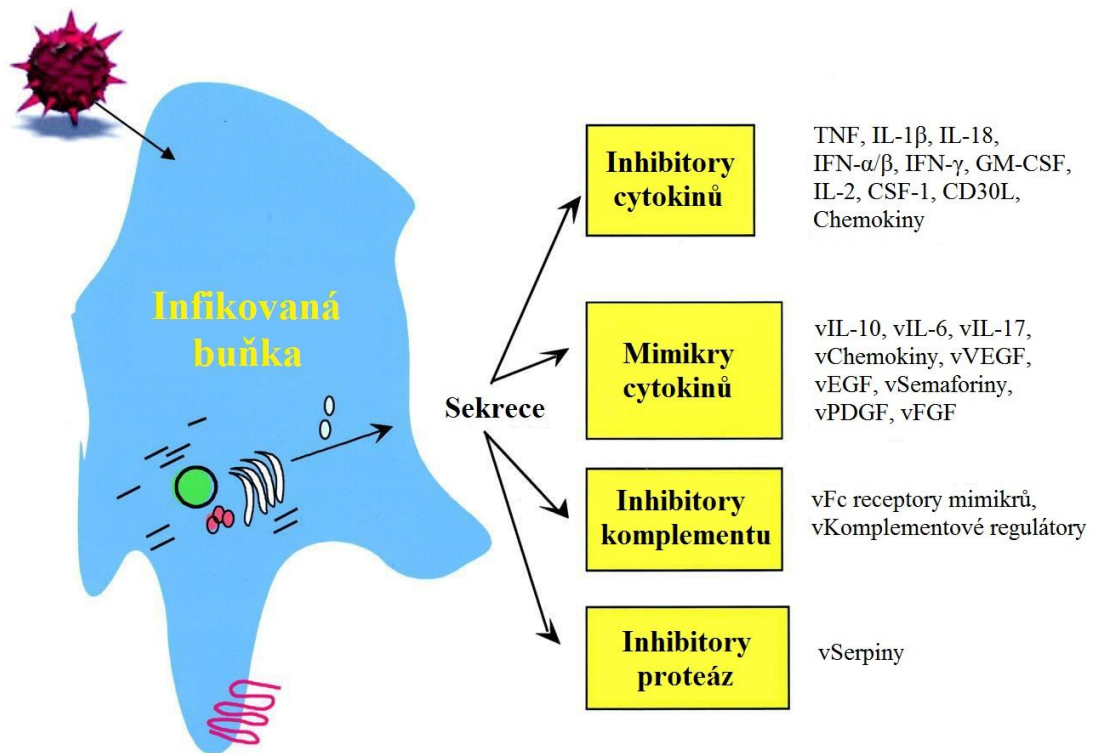
### **2.3 Virové imunomodulátory**

Mnoho virů se naučilo vyhnout nebo rozvrátit protivirovou imunitní odpověď hostitele pomocí kódování a expresí imunomodulačních proteinů, které chrání virus před napadením složek vrozeného nebo získaného imunitního systému. Viry sekretují a exprimují imunomodulátory, které se často vyskytují přechodně v extrémně nízkých dávkách (fentomolárně až nanomolárně) ve vybraném mikroprostředí infikovaných tkání a buněk. Jen zřídka viry globálně potlačují imunitní odpovědi hostitele a obecně se jedná pouze o viry, které se replikují na velmi vysoké titry v krvi nebo lymfatickém systému. Některé z těchto virových anti-imunitních regulátorů jsou exprimovány jako sekretované proteiny. Zachycují specifické hostitelské imunitní cíle v extracelulárním prostředí, kde vykazují silné anti-imunitní vlastnosti. Mnoho virů, které úspěšně napadají imunokompetentní hostitele, získává vlastní ochranné strategie, aby se vyhnuly nebo rozvrátily konsolidované síly vrozené a získané imunitní odpovědi. Obecně, viry jako celek mohou exprimovat efektorové molekuly, které se zaměřují na celou řadu imunitních drah hostitelů.

Virové proteiny, které jsou v této části dále popsány, jsou pouze podskupinou imunomodulačních systémů. Mezi hlavní třídy imunomodulátorů patří inhibitory cytokinů, mimikry cytokinů, inhibitory komplementu a inhibitory proteáz (obrázek 4). [26]

Proteiny, které jsou vylučovány z infikovaných buněk, směřují k vázání a narušování funkcí komplementu, IFN, cytokinů a chemokinů. Naopak intracelulární imunomodulátory

modulují apoptózu, antivirové účinky IFN, vrozenou imunitní signalizaci a genovou transkripci hostitele. [27]



Obrázek 4: Hlavní třídy sekretovaných virových imunomodulátorů. Upraveno a převzato z [26].

### 2.3.1 Modulátory na povrchu virionů

Jeden z prvních způsobů, jak virus zasahuje do imunitního systému před infekcí citlivých buněk, je přes molekuly na vnějším povrchu virionu. Povrchy virových částic jsou pokryty potencionálními virovými proteiny, ale také mohou vykazovat širokou rozmanitost odvozených hostitelských proteinů (obalené viry). Tyto hostitelské proteiny začleněné do virionu mohou být imunoregulátory, receptory CD rodiny, inhibitory komplementu, signalizační ligandy nebo adhezivní molekuly, z nichž každá může přeměnit extracelulární virovou částici do „makro-ligandu“, která může stimulovat imunomodulační odpověď i v nepermissivních buňkách hostitele. Nejvíce studovaným imunomodulátorem je gp120 HIV, který se zapojuje do fáze adsorpce a penetrace. Je jediným proteinem, který vyčnívá přes virionovou membránu. Tvoří charakteristické virionové hroty a hraje významnou roli v zabíjení neinfikovaných T-lymfocytů během pozdní fáze AIDS. [24]

### 2.3.2 Mimikry cytokinů – virokiny a viroreceptory

Virově kódované proteiny byly identifikovány z celé řady virových rodin, ale zdaleka největší počet pochází z DNA virů s velkými genomy, které mohou exprimovat více genů.

Imunomodulátory mohou fungovat v různých buněčných a tkáňových místech. Mohou být exprimovány intracelulárně v infikovaných buňkách, fungují na povrchu infikovaných buněk nebo virionu nebo mohou být také vylučovány do extracelulárního prostředí. Takto sekretované imunomodulátory byly pojmenovány jako viroreceptory a virokiny. [26] Viroreceptory jsou podobné receptorům pro cytokiny. Virokiny jsou podobné cytokinům. Vykazují podobnost s molekulami, které se zapojují negativně do imunitní odpovědi. [14]

Příkladem může být virový IL-10 (vIL-10) EBV, který vykazuje signifikantní sekvenční homologii s cDNA lidského IL-10. Má imunitní inhibiční vlastnost, potlačuje Th<sub>1</sub>-polarizovanou odpověď a inhibuje monocyty. Lidská IL-10 tak ztrácí imunostimulační schopnost (aktivaci DC, NK-buněk a některých T-lymfocytů). Související vIL-10 byl také zaznamenán i u Orf viru nebo CMV, u kterého má vIL-10 imunosupresivní funkci. [14, 26, 28]

První růstový faktor identifikovaný ve viru je homolog epidermálního růstového faktoru (vEGF), který je kódován virem vakcínie a dalšími poxviry. Je to faktor virulence, který zvyšuje proliferaci buněk.

Cytokiny IL-6 a IL-17 mají imunomodulační aktivitu, ale také funkci růstového faktoru. Jejich virové homology mohou zvýšit proliferaci imunitních buněk, které jsou cílem virové replikace. Také virové cytokinové homology by mohly být zodpovědné za některé patologie, které jsou způsobeny virovou infekcí.

Virový vaskulární endoteliální růstový faktor (vVEGF) Orf viru kódovaného homologu má angiogenní vlastnost. Indukuje vaskulární propustnost a angiogenezi. Způsobuje pustulární dermální léze spojené s proliferací vaskulárního endotelu. Tento virový protein podporuje přenos viru.

Homologní virové semaforiny (vSEMA) poxvirů a herpesvirů mají chemoatraktivní a chemorepelentní vlastnosti. Podílejí se tak na procesech v nervovém systému. Mezi vSEMA se řadí CD100. vSEMA se vážou na virem kódované semaforinové proteinové receptory v makrofázích a indukují expresi cytokinů a adhezních molekul. [28]

### 2.3.3 Chemokinové homology

Hostitelské chemokiny jsou chemoatraktivní cytokiny, které regulují operační a efektorové funkce leukocytů. Mají tak důležitou roli při zánětu a imunitní činnosti.

Obsahují malé proteiny, které se rozdělují do čtyř tříd – CC-, CXC-, C- a CX<sub>3</sub>C-chemokiny. Interagují s chemokinovými receptory a glykosaminoglykany prostřednictvím odlišných vazebných sítí. Převádí signály přes vazbu receptoru, zatímco vazba na glykosaminoglykany je důležitá pro tvorbu chemotaktického chemokinového gradientu, podél kterého procházejí buňky přes endotel do tkání. Přerušení chemokinového receptoru nebo tvorba komplexu chemokin-glykosaminoglykan by mohlo způsobit inhibující biologickou aktivitu chemokinů. Některé viry tak modulují chemokinovou síť tím, že produkují vlastní verze chemokinů, chemokinových receptorů nebo vylučují chemokiny vázající proteiny, které nejsou nalezeny v hostiteli. Viry mohou také využít chemokinové receptory k infekci cílových buněk. Např. HIV využívá chemokinové receptory k získání vhodného přístupu do cílových buněk. [28]

Mezi virové chemokiny se řadí i virové chemokinové homology, které působí jako antagonisté nebo agonisté a usnadňují tak spíše šíření viru a růst než vyhýbání se imunitním odpovědím. Příklad homologu je virový makrofágový zánětlivý protein 2 HHV-8, který je širokospektrálním chemokinovým antagonistou. Blokuje Th<sub>1</sub>-polarizované T-lymfocyty a stimuluje odpovědi Th<sub>2</sub>-lymfocytů, kterými negativně ovlivňuje buněčně zprostředkované imunitní odpovědi. Také virový makrofágový zánětlivý protein 1 a 3 stejného viru jsou chemoatraktivní pro Th<sub>2</sub>-polarizované T-lymfocyty. Mohou ovlivnit typ imunitní odpovědi, který je zahájen po infekci. Virus molluscum contagiosum protein MC148 inhibuje aktivitu CC- a CXC-chemokinů, interferuje s funkcí monocytů a váže lidský CCR8. Protein U83 HHV6 a Tat protein HIV indukují migraci monocytů. Podobně virový CXC1 kódovaný CMV indukuje chemotaxi neutrofilů vazbou na CXCR2 receptor, což může vysvětlit spojení neutrofilů s infekcí CMV. [26, 28]

Mezi virové chemokin-receptorové homology patří protein ORF74 HHV-8, který je konstitutivně aktivován a indukuje proliferaci buněk. Může tak napomáhat replikaci viru. Protein U51 HHV-6 snižuje extracelulární akumulaci CC-chemokinů CCL5 sekvestrací chemokinů a snížením exprese CCL5 transkripce. Proteiny US28 a US27 CMV mohou být začleněny do virionů, kde napomáhají počátečním krokům replikace virů. [28]

### **2.3.4 Inhibitory cytokinů**

Inhibitory cytokinů kódované virem obecně fungují jako rozpustné napodobující receptory nebo jako sekretované proteiny vázající cytokiny, aby zachytily cílový ligand pryč od hostitelských receptorů na povrchu imunitních buněk. [26] Mezi takové virové rozpustné receptory patří virový membránový TNFR homolog CMV. Ovlivňuje schopnost buněk

infikovaných CMV reagovat na signály indukované TNF. Mezi další patří vIL-1 $\beta$  receptor, vIFN- $\gamma$  receptor a také homolog CD30 kódovaný poxvirem. vCD30 je vylučován z infikovaných buněk, váže se na ligand CD30 a blokuje zánětlivé odpovědi zprostředkované IFN- $\gamma$  a IL-12, které podporují antivirové odpovědi poskytnuté NK-buňkami a Tc-lymfocyty. [28]

Virové geny kódují proteiny s podobnou sekvencí do extracelulární domény hostitelských cytokinových receptorů. Vážou cytokiny s vysokou afinitou a neutralizují jejich činnost. Tato strategie virů napodobuje rozpustné cytokinové receptory a moduluje tak cytokinovou aktivitu. Některé virové proteiny mají vazebná specifika, která jsou rozdílná k těm v buněčných receptorech. (např. virus vakcínie kóduje IL-1 receptor specifický k IL-1 $\beta$ ).

Mezi rozpustné cytokiny patří i cytokiny vázající proteiny (CKBP), které mají omezené nebo žádné sekvenční podobnosti s buněčnými protějšky. Mezi takové cytokiny patří vIFN- $\alpha$ /GBP viru vakcínie. Patří tak i mezi faktor virulence. Dalšími cytokiny jsou vIL-18BP viru vakcínie a variola viru, který váže a blokuje aktivitu IL-18. vIL-18BP nemají sekvenční podobnost s lidskými receptory IL-18. Dalšími příklady této skupiny jsou granulocytární a makrofágy stimulující faktor GM-CSF/IL-2 Orf viru, vCSF1BP EBV modulující reakci makrofágů s omezenou sekvenční podobností s buněčným protějškem. Také cytokin viru vakcínie vIFN- $\alpha$ /GBP, který byl přizpůsoben tak, aby byl vylučován a přenesen z infikovaných buněk na povrch sousedních neinfikovaných buněk. [28]

V případě virových chemokinů vázající proteiny byly objeveny na základě testů fyzikální chemické vazby a inhibice čtyři odlišné třídy proteinů (typ I – IV).

Typ I je prezentován M-T7 z myxoma viru. Váže se s nízkou afinitou k doméně glykosaminoglykanu širokého spektra chemokinů C/CC/CXC a inhibuje leukocytární taxi v tkáních infikovaných virem. [26]

vCKBP typu II, též virový CC chemokin inhibitor, byl izolován z několika poxvirů. Specificky se vážou s vysokou afinitou a inhibují široké spektrum CC chemokinů. [26] Příkladem je virový CKBP2 chemokinový inhibitor. Vazba na CC přes receptor vázající doménu brání vázání chemokinů na buněčné receptory a biologickou aktivitu. [28]

vCKBP typu III je prezentován proteinem M3 herpesviru, který váže a inhibuje členy všech známých tříd chemokinů a blokuje chemokinové interakce jak s jejich receptory, tak s GAG elementy odpovědnými za chemokinové gradienty.

Typ IV vCKBP byl objeven jen v několika  $\alpha$ -herpesvirech. Specifické izoformy gpG mají schopnost vázat a inhibovat široké spektrum chemokinů C/CC/CXC. [26]

### 2.3.5 Virové regulátory komplementu

Regulace aktivace komplementu v místech zánětu je pod přísnou kontrolou a některé viry specificky zachycují hostitelské regulační složky určené k omezení infekce napadané buňky virem. Konkrétně poxviry a herpesviry získaly a přizpůsobily řadu hostitelských inhibitorů kaskády komplementu, aby zablokovaly počáteční stavy komplementu zprostředkovaných odpovědí v infikovaných tkáních. 35-kDa sekretovaný inhibitor komplementu exprimovaný některými kmeny viru vakcínie byl prvním objeveným regulátorem virového komplementu. Kontrolní protein komplementu viru vakcínie se strukturálně podobá hostitelskému C3b nebo C4b. Blokuje aktivaci komplementu a lýzu endoteliálních buněk zprostředkovanou NK-buňkami. Purifikovaný kontrolní protein komplementu viru vakcínie blokuje aktivaci komplementu v několika stádiích. [26]

### 2.3.6 Virové inhibitory proteáz – serpiny

Serpiny patří do široké skupiny regulačních proteinů, které se uplatňují v regulačních procesech jako koagulace krve, fibrinolýza, aktivace komplementu, humorální odpovědi, embryonální vývoj, apoptóza a zánět. Představují 3 – 10% cirkulujících plazmatických proteinů, které hrají roli v regulaci vrozených zánětlivých reakcí na viry a tkáňová traumata. [26] Většina serpinů inhibuje serinové proteázy, ale také kaspázy nebo papain-like cysteinové proteázy. [29]

Mezi jeden charakteristický znak serpinů patří reaktivní středová smyčka, protein s motivem štěpné vazby mezi částmi P1 a P1', které jsou štěpeny proteázou. Proteáza se naváže na reaktivní středovou smyčku a je tažena k protilehlému konci serpinu. Stane se tak neaktivní. Virové serpiny poskytují vysoce účinná inhibiční činidla, která blokují hostitelskou obranu proti virové proliferaci, šíření a invazi v infikovaných buňkách hostitele. [30]

Poxviry jsou doposud jedinými viry, o kterých je známo, že kódují biologicky aktivní serpiny. Virové serpiny mohou být detekovány v intracelulárním nebo extracelulárním prostředí. [26]

Příkladem sekretovaného virového serpinu je Serp-1, který je kódován myxomavirem. Je exprimován jako 55-kDa sekretovaný glykoprotein, který váže a inhibuje několik lidských hostitelských serinových proteináz, jako jsou aktivátory plazminogenu urokinázového typu, tkáňového typu a plazmin. [26] Chrání tkáň infikované virem před hostitelskou zánětlivou odpovědí. [31]

### 3 Přímé diagnostické metody virových infekcí

Přímá diagnostika se využívá k průkazu přítomnosti virové nukleové kyseliny, infekčního viru nebo virových antigenů. [2]

Metody detekce antigenu jsou obzvlášť užitečné pro viry, které rostou pomalu nebo jsou labilní. Takovými viry jsou např. RSV, virus chřipky, virus parainfluenza, adenovirus v dýchacích vzorcích; HSV, VZV v kožních vzorcích; lidský rotavirus ve vzorcích stolice; CMV a HBV v krevních vzorcích. [32]

V poslední době přinesly nové technologie velké pokroky v diagnostice infekčních nemocí kombinacemi starých a nových metod. Pokroky v diagnostice byly zaznamenány v imunologii, molekulární biologii a amplifikaci nukleových kyselin, dalších amplifikačních testech nukleových kyselin. Více testů bylo automatizováno.

Využití molekulární diagnostiky pro kvantifikaci HIV-1, HBV a HCV je revolucí pro vývoj antivirotik, které by mohly být využity pro řízení a léčení virových infekcí. [33]

V další části práce jsou uvedeny nejběžnější diagnostické metody a metody nové, vysoce citlivé, kterými lze studovat např. životní cyklus virů, jejich interakce s eukaryotními buňkami apod. Ty slouží spíše k výzkumným účelům.

Mezi běžné metody používané v laboratoři se řadí kultivace, přímá diagnostická metoda ELISA, polymerázová řetězová reakce, imunochromatografický test, přímý imunofluorescenční test a DNA hybridizace.

Naopak mezi výzkumné metody patří průtoková cytometrie, elektronová mikroskopie a hmotnostní spektrometrie. Pomocí výzkumných metod se mohou vyvíjet nové laboratorní metody, které budou splňovat nezbytná kritéria a mohou tak nahradit standardní metody.

#### 3.1 Kultivace virů

Kultivace je vysoce specifická metoda. Některé aspekty však omezují její využití. Technika je zdlouhavá s dlouhou inkubační dobou (7-12 dní). Nízká hladina titru viru v séru nebo v krvi není vhodná pro virovou kulturu. [34] Také některé viry jsou obtížně kultivovatelné (koronaviry, HCV) nebo jsou nebezpečné (virus varioly). [33] Z těchto důvodů kultivace není moc praktická v rutinních diagnostických laboratořích, i když je zařazována mezi „zlatý standard“. [34]

Mezi běžně kultivované viry patří např. čeleď *Herpesviridae* (HSV1, HSV 2, VZV, CMV), *Orthomyxoviridae* (virus chřipky A, B), *Adenoviridae*, *Paramyxoviridae*



(virus parotitidy, RSV, parainfluenza 1, 2, 3, 4), *Picornaviridae* (viry Coxsackie, poliovirus), *Caliciviry* (Noroviry), *Reoviridae* (lidské rotaviry), *Caliciviridae* (*Norovirus*). [35]

### 3.1.1 Izolace viru

Virová izolace je stále nezbytnou součástí diagnostických metod, protože se jedná o jedinou techniku schopnou poskytovat životaschopné izoláty, které mohou být použity pro další charakterizaci, např. fenotypové testování protivirové citlivosti. [32]

Klinické materiály odebrané z určitých míst organismu mohou být kontaminovány mikrobiální flórou, proto se přepravují v transportním médiu s antibiotiky, puřovací solným roztokem, proteinovou látkou a indikátorem pH. [36]

Následně může být materiál naočkován do kultivačního média nebo může být adsorbován na monovrstvy po odstranění média. Adsorpce umožňuje přímý kontakt virových částic s buňkami, čímž se zvýší infekčnost viru a počet izolátů. [37]

Pro izolaci se používají pokusná zvířata (bílá myš, sající myšata, morčata), kuřecí embrya nebo buněčné kultury, např. lidské fibroblasty, nádorové buněčné linie. [38, 39]

### 3.1.2 Buněčné kultury pro pasážování viru

Mezi jedny z nejčastěji využívaných buněčných kultur se řadí primokultury. Tyto primární buněčné kultury se připravují izolací buněk z orgánů nebo tkání dárce, na které krátkodobě působí trypsin. Zachovávají si tak fenotypovou i genotypovou vlastnost s původními buňkami. Příkladem jsou embryonální kuřecí fibroblasty nebo buňky embryonálních lidských ledvin.

Další buněčnou kulturou je kontinuální buněčná linie, kterou lze získat ze zdravých tkání nebo zhoubných nádorů. Příkladem mohou být HeLa buňky z karcinomu děložního čípku nebo VERO buňky. [2]

Poslední nejvyužívanější buněčnou kulturou jsou diploidní buněčné linie se zachovaným počtem chromozomů. Tvoří je buňky, které mají schopnost až padesátinásobné subkultivace. Společně s kontinuální buněčnou linií je lze zmrazit na  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  tekutým dusíkem a tak je uchovávat. [2] Jsou to např. buňky z embryonálních lidských plic nebo nově získaná diploidní buněčná linie walwax-2. Walwax-2 byl odvozen z lidské plicní tkáně 3. měsíčního plodu. Mezi úspěšně kultivované viry na walwax-2 byly varicela virus, HAV a virus vztekliny. Výsledky prováděných testů ukazují, že by walwax-2 mohl být využit jako substrát pro vakcíny. [40]

Nicméně každá virologická laboratoř by měla mít standardní buněčné kultury, např. primární opičí ledvinnou buněčnou linii, která se používá pro izolaci respiračních virů a

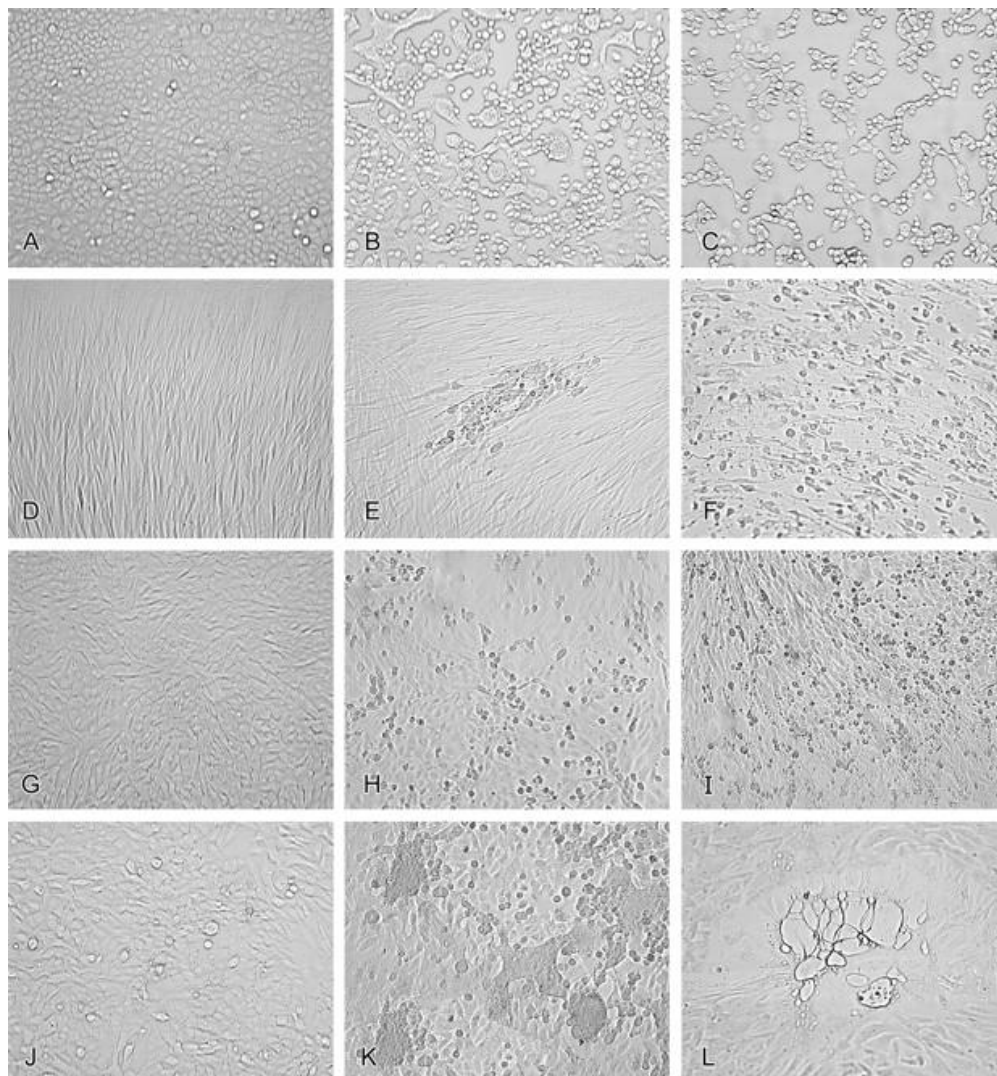
enterovirů. Dále lidské fibroblastové linie k izolaci CMV, VZV a rhinoviru. Kontinuální lidské epiteliální buněčné linie HEp-2 jsou potřeba k izolaci RSV a další.

Další buněčnou kulturou jsou geneticky modifikované buněčné linie. Geny se transferují do indikátorových buněčných linií k přímému vložení virových receptorů na povrchu buňky a/nebo k přímé expresi promotorů, které reagují se specifickými virovými proteiny přítomnými ve vzorku. Aktivaci promotorů spouští reportérový enzym, např.  $\beta$ -galaktosidáza. Toho se nejvíce využívá pro HSV nebo HIV. [32]

### **3.1.3 Detekce cytopatického efektu viru**

Cytopatický efekt (CPE) je změna v morfologii buněk pozorovaná v důsledku replikace viru, která je viditelná pomocí světelného mikroskopu. Při vyhodnocování detailů je nutné histochemické barvení. [2] U většiny virů je CPE viditelný po 5 až 10 dnech inkubace. U CMV je CPE vidět v průměru po 10 až 30 dnech inkubace, naopak u HSV je CPE viditelný už v prvních 24 hodinách. [36] Příklady CPE v buňkách je možno vidět na obrázku 5.

Spektrum změn v morfologii je široký. Např. u viru Cocksackie B3 byly infikované astrocyty zakulacené, vzhledově se podobaly granulím. Při narušení cytoskeletu byla pozorována tvorba puchýřků a s tím související následná lýza buňky. [41] Takové změny buněk se řadí mezi hlavní projevy cytopatického efektu. Mezi další projevy patří agregace buněk do hroznů, tvorba syncytií (tj. soubuní) nebo tvorba inkluzních tělísek. U genitálních HSV je přítomno soubuní, ale i intranukleární inkluze. Může se objevit i fokální nekróza buněk. [2, 42]



Obrázek 5: Cytopatický efekt v buňkách: A – neinfikované buňky A549, B – HSV-2 infikované A549 buňky, C – adenovirus v buňkách A549, D – neinfikované MRC-5 fibroblasty, E – CMV v MRC-5 fibroblastech, F – MRC-5 fibroblasty infikované rhinovirem, G – neinfikované RhMK buňky, H – enterovirus v RhMK buňkách, I – RhMK buňky infikované virem chřipky A, J – neinfikované HEP-2 buňky, K – RSV v HEP-2 buňkách, L – RhMK buňky infikované opičím virem. Zvětšení 85x. Převzato z [36].

### 3.2 Přímá imunofluorescence

Imunofluorescenční metoda je jedna z nejefektivnějších a rychlých diagnostických metod. [43] Je využívána k zobrazení lokalizace cílových virových proteinů (např. buněčných a nebuněčných, intracelulárních a membránových, endogenních a exogenních proteinů) u čeledí virů např. *Herpesviridae* (CMV, HSV 1 a 2, VZV), *Paramyxoviridae* (RSV), *Adenoviridae*, *Paramyxoviridae* (virus parainfluenzy 1, 2, 3, 4). [35, 44]

K přímé detekci RSV se používá kvalitativní imunofluorescenční test IMAGEN™. Principem metody je využití monoklonálních protilátek konjugovaných s fluorescenčními barvivy tzv. fluorochromy (např. fluorescein-5-isothiokyanát). Konjugát se specificky váže na virové antigeny RSV. Obarvený klinický vzorek je fixován a pozorován fluorescenčním mikroskopem. V infikovaných buňkách s přítomností RSV antigenu jsou patrné světle zelené fluorescenční granulóty s kontrastním červeným pozadím neinfikovaných buněk. [45]

Pro detekci se využívají buňky nebo mikroby, kteří jsou fixováni na sklíčka či adherentní buňky, které jsou pěstovány přímo na krycích sklíčkách. Tato metoda zachovává přirozenou morfologii buněk a ukazuje značený cílový protein jasněji a přesněji. [44]

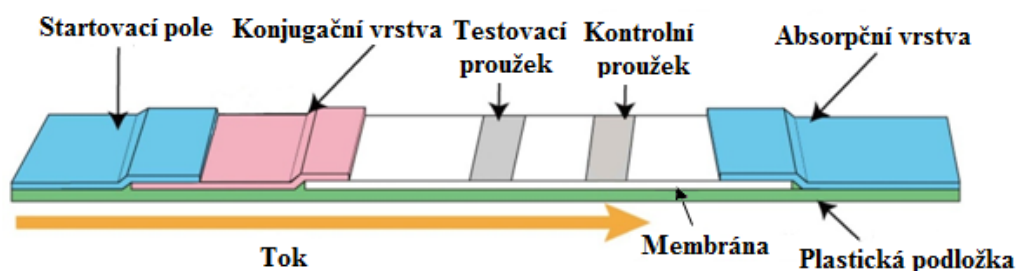
Přímá imunofluorescence je poměrně jednoduchá metoda a citlivá pro určení virů. Kompletní postup včetně přípravy sekcí, jejich barvení a pozorování může být prováděn v jedné až třech hodinách. Naopak nevýhodou je nutnost vysoce kvalitního vzorku, finanční náročnost a také poskytuje nižší signál. [43, 44, 46]

### 3.3 Imunochromatografická metoda

Imunochromatografická metoda pro přímý průkaz viru je jedna z rychlých a účinných technik v detekci virů a k průkazu jejich antigenů ve vzorku. [47]

Tato metoda je aplikována např. pro viry z čeledi *Filoviridae* (virus Ebola), *Adenoviridae*, *Reoviridae* (rotavirus), *Caliciviridae* (rod *Norovirus*), *Flaviviridae* (virus dengue), *Orthomyxoviridae* (viry chřipky A, B), *Paramyxoviridae* (RSV), *Astroviridae*. [35]

Test využívá formátu proužku nebo kazety, které se skládají ze startovacího pole pro vzorek, konjugační vrstvy, nitrocelulóзовé membrány a absorpční vrstvy. Nitrocelulóзовá vrstva se dále dělí na testovací a kontrolní proužek (obrázek 6). Předem imobilizované reagenty se v různých částech proužku aktivují při průtoku kapalného vzorku.



Obrázek 6: Schéma imunochromatografického testu. Převzato a upraveno z [48].

Výhodami této metody jsou nízké náklady, rychlost, jednoduché ovládání. Nevýhodou může být předběžná úprava vzorku nebo nedokonalé vztlínání. [49]

Pro rychlou detekci viru Ebola byl vyvinut proužkový imunochromatografický test ReEBOV™ Antigen Rapid Test, který poskytuje výsledky během 15-25 minut. Je založen na kvalitativní detekci EboV VP40 antigenu v séru, plazmě nebo krvi z prstu. [50] Konkrétně je test určen pro Ebola-Zaire.

Vzorek krve se nanese na startovací konec testovacího proužku. Specifické protilátky proti VP40 antigenu (anti-EboV VP40) konjugované s nanočásticemi zlata jsou imobilizovány na nitrocelulózu testovacího proužku. EboV VP40 antigen ze vzorku vytvoří imunokomplex s anti-EboV VP40 a nanočásticemi zlata. Imunokomplex se pohybuje přes testovací zónu. V případě positivity VP40 antigenu se objeví dvě růžovo-červené čárky. [51]

Výhodou je rychlost a finanční nenáročnost. Naopak nevýhodou je nízká specifita (85 %), citlivost (92 %) a možná falešná pozitivita oproti tradičním metodám. Nicméně test je využíván k rychlé diagnostice EboV ve venkovských oblastech zdravotní ambulance a k rychlému screeningu pacientů s pokročilým stádiem nemoci. [50, 52]

### 3.4 Imunoanalytické testy

Imunoanalytické metody jsou často používány pro detekci a kvantifikaci specifických antigenů nebo protilátek virů v daném vzorku pro vysokou specifitu a senzibilitu. [53]

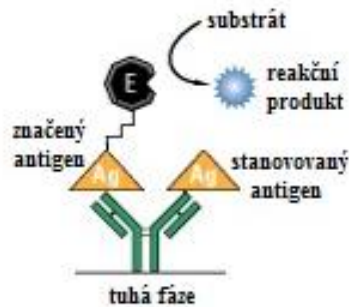
Pro detekci virových antigenů nebo protilátek se využívá různých detekčních značek. Nejčastěji využívanou značkou jsou enzymy, zejména alkalická fosfatáza nebo křemová peroxidáza. Mezi metody využívající enzymové značky patří enzymový imunoanalytický test (EIA) nebo ELISA. Další metody, které používají detekční značky, jsou radioimunoanalýza se značkou radioizotop nebo chemiluminiscenční imunoanalýza se značkou chemiluminofor. [2, 53]

Přímá detekce virů metodou ELISA se využívá k průkazu virů z čeledi např. *Hepadnaviridae* (HBV), *Retroviridae* (HIV 1 a 2), *Reoviridae* (rotaviry), *Adenoviridae* (adenoviry), *Caliciviridae* (*Norovirus*), *Flaviviridae* (HCV). [35]

ELISA využívá heterogenního uspořádání. Antigen nebo protilátka je vázána na pevnou fázi, nejčastěji stěny jamek mikrotitrační destičky. Je nutná mycí fáze pro separaci volné a vázané frakce. [4, 54]

Přímou diagnostiku virů lze provádět v kompetitivním – „soutěživém“ uspořádání (obrázek 7). Principem je adsorpce specifických protilátek na stěny jamek mikrotitrační

destičky. Na tyto specifické protilátky se vážou a soutěží o vazebná místa antigeny ze vzorku se značeným ekvimolárním množstvím antigenu. Vzniklé množství barevného imunokomplexu se následně hodnotí spektrofotometricky změřením absorbance při určité vlnové délce. [2, 55]



Obrázek 7: Schéma přímé kompetitivní ELISA. Převzato a upraveno z [56].

### 3.5 Amplifikace virových nukleových kyselin

Metody amplifikace nukleových kyselin se využívají pro detekci a také často pro kvantifikaci stále rostoucího počtu virů, např. HIV, HBV, HCV nebo CMV. [35]

Amplifikační metody jsou celkově rychlejší a citlivější oproti kultivaci, která je také finančně náročná. Citlivost nejznámější amplifikační metody polymerázové řetězové reakce (PCR) se blíží k 1 viru/ $\mu\text{l}$ .

Pro testování na přítomnost virových nukleových kyselin v klinických vzorcích je třeba extrahovat nukleovou kyselinu z virů, amplifikovat ji a detekovat amplifikovanou sekvenci. Tradiční náročná izolace nukleové kyseliny a její purifikace od nežádoucích látek přítomných v buňkách je v laboratorní praxi velmi náročnou technikou. Proto tyto postupy byly automatizovány platformami nebo jsou zařazeny přímo do jednokrokového kazetového zařízení.

Nové amplifikační metody nukleových kyselin se vyvinuly z běžně používaných metod a real-time PCR na metody modernější, např. amplifikace sekvenčních nukleových kyselin (NASBA), amplifikace zprostředkovaná smyčkou (LAMP), transkripce zprostředkovaná amplifikací nebo amplifikace vytěsněním vlákna (SDA). [33]

Principem PCR je zmnožení specifických virových úseků nukleové kyseliny pomocí polymerázy s následnou vizualizací zmnoženého úseku. Pro průkaz RNA virů se využívá modifikovaná reverzně transkriptázová PCR (RT – PCR). Virová RNA je nejdříve přepsána reverzní transkriptázou na DNA s následnou amplifikací. [2]

Podle Světové zdravotnické organizace v roce 2006 bylo potvrzeno 249 případů nákazy člověka virem ptačí chřipky H5N1. [57]

Pro rychlou detekci chřipkového viru H5 v klinických vzorcích bylo použito v diagnostických laboratořích RT – PCR s podtypem H5 specifickým primerem. [57] Nicméně metoda je časově náročná a hrozí zde riziko kontaminace prostředím vzniklými amplikony. Proto se vyvinul nový způsob detekce virové DNA nebo RNA, a to reverzní transkriptáza izotermální amplifikace zprostředkovaná smyčkou (RT – LAMP). Principem LAMP je izotermální amplifikace virové nukleové kyseliny při 60-65°C v přítomnosti cílově specifických primerů a polymerázy. [57, 58] Celý proces trvá 30-60 minut. Předností je 10-100 násobná citlivost oproti běžné, jednokrokové RT – PCR, rychlost a finanční nenáročnost. Proto se dnes využívá v laboratořích, které nemají dostatek financí na dražší metody. [57]

PCR metodou se mohou dále detekovat viry čeledi např. *Herpesviridae* (EBV, HSV 1 a 2, HHV6, VZV), *Flaviviridae* (virus Zika), *Parvoviridae* (parvovirus B19), *Orthomyxoviridae* (virus chřipky A). [35]

### 3.6 Hybridizace nukleových kyselin viru

Hybridizační metody jsou schopné rozpoznat velký počet různě podobných nukleových kyselin virů. Principem je specifické spojení – hybridizace detekční sondy značené radioaktivním izotopem nebo enzymem s jednovláknovou nukleovou kyselinou.

Metoda se využívá např. pro detekci virů čeledi *Papillomaviridae*, *Flaviviridae*. [35]

Mezi modifikovanou a základní metodu molekulové cytogenetiky patří fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH). [59]

FISH je založena na detekci cílové virové DNA či RNA v buňkách a tkáních za použití sondy značené fluorochromem, která je komplementární k danému úseku virové nukleové kyseliny.

Sonda je po hybridizaci vizualizovaná fluorescenčním mikroskopem. Jedna z výhod FISH, spolu s přesností a přizpůsobivostí, je možnost kombinovat několik oligonukleotidových sond. FISH je proto ideální, když je nutné zjistit více cílových virů ve stejných vzorcích. Kromě toho může být kombinována se standardními detekčními metodami, např. nepřímou imunofluorescencí protilátek, čímž poskytuje lepší detekci cílů. V případě, že nejsou k dispozici účinné protilátky pro daný organismus, FISH může být užitečnou alternativou.

Pro detekci dengue viru sérotyp I – IV byla použita právě FISH metoda s DENV sondou označenou na 5' konci řetězce barvivem. Byly využity 3 sondy, které zesilují hybridizační

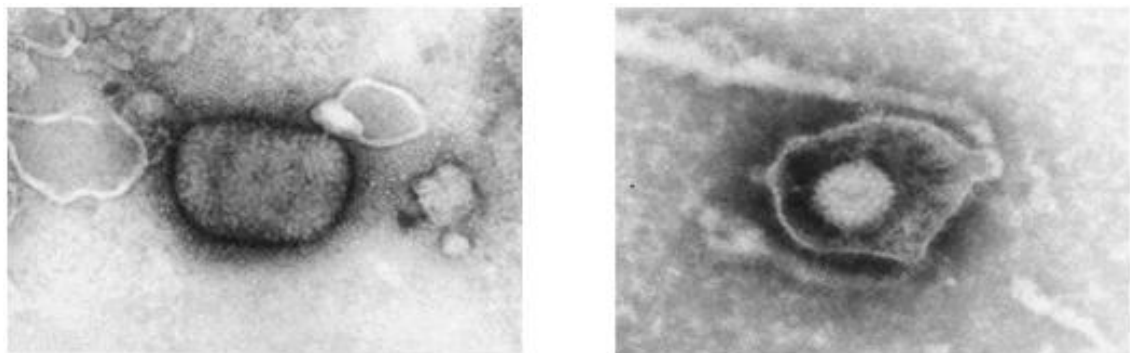
signál. Fluoreskující body, které přísluší sondě s DENV RNA byly pozorovány v cytoplazmě infikovaných buněk. Aby bylo možné posoudit specifičnost sondy k DENV, byl detekován virus žluté zimnice a WestNile virus, které patří společně s dengue virem do rodu *Flavivirus*. Opět bylo použito stejných sond. Jak se dalo očekávat z *in silico* analýz, fluorescence nebyla detekována. [60]

### 3.7 Elektronová mikroskopie

Elektronová mikroskopie (EM) je jedna z metod, která se využívá pro výzkumné účely. Vzhledem k malé velikosti virových částic je nepostradatelná k vizualizaci a identifikaci virů. S vývojem moderních technik, jako je imunofluorescence, EIA nebo PCR, došlo v oblasti virologie k poklesu využití EM. Výhodou použití EM je, že nevyžaduje reagentie specifické pro rozpoznání virů. [61] V současné době je hlavním využitím EM vizualizace různých fází životního cyklu viru (adsorpce, průnik, replikace, transkripce a translace, uvolnění) a studium ultrastruktury infikované buňky. [62]

Mezi základní EM patří transmisní elektronový (TEM) a rastrovací elektronový (SEM) mikroskop.

V TEM jsou viry identifikovány na základě jejich charakteristických morfologických rysů (obrázek 8). [63] Elektronový paprsek prochází skrze vzorek tak, že minimálně polovina svazku elektronů je absorbována a zpracována systémem čoček. Druhá polovina je odražena a rozptýlena. [64, 65]



Obrázek 8: Monkeypox virus negativně barvený (vlevo) a negativně barvený herpesvirus (vpravo).  
Převzato z [63].

Pro detekci malých částic, jako jsou viry, musí být přítomno ve vzorku nejméně  $10^6$ - $10^8$  virových částic/ml. Ovšem některé z malých virů postrádají morfologické znaky, a proto je obtížné je rozlišit. S využitím imunitního shlukování se smíchá suspenze vzorku



s virovou specifickou detekční protilátkou. V přítomnosti cílového viru je protilátka agregována do shluků, které se snáz detekují. Touto metodou byl zjištěn HBV a parvovirus B19. [63]

SEM zobrazuje cenné informace o zevnějšku infikované buňky. [61] Svazek primárních elektronů je zaměřen na vzorek a skenuje povrch vzorku rovnoměrnými čarami. Z místa, kam dopadly primární elektrony, se uvolní zpětně sekundární elektrony a charakteristické rentgenové záření. Elektrony jsou zachyceny detektorem a přeměněny na signál. Takto generované signály jsou shromažďovány za účelem vytvoření obrazu nebo pro analýzu povrchu vzorku. [66] Jako příklad využití SEM lze uvést detekci viru SARS, který má v trojrozměrném vzhladu trimerní strukturu povrchu ve tvaru hrotů. [61]

Mezi další EM se zařazuje imunochemická elektronová mikroskopie, která zvyšuje citlivost detekce virů. Využívá specifickou protilátku, která se váže na virový antigen. Tato mikroskopie je často využívána pro detekci virů způsobujících hepatitidy a gastroenteritidy.

V roce 2003 ukázala EM svou hodnotu v identifikaci respiračních vzorků od pacientů s těžkými akutními respiračními příznaky (Hong Kong, jižní Čína). Laboratorní vyšetření včetně EM vedly k objevu SARS viru, který vykazoval charakteristické ultrastrukturální rysy koronaviru.

Využití EM ve vyšetření „exotických“ infekcí, jako je Dengue, Ebola, Lassa nebo Marburg virus, probíhá pouze ve specializovaných laboratořích s nejvyšší úrovní biologické bezpečnosti (BSL-4). [63]

### **3.8 Průtoková cytometrie**

Po EM je ve výzkumných laboratořích využívána také průtoková cytometrie. V současné době je schopna citlivě detekovat jakoukoliv suspenzi částic, např. viry, fragmenty DNA nebo povrchové znaky virů. [14, 67]

Je používána k imunofenotypizaci leukocytů, které se zvyšují nebo snižují v přítomnosti různých virů. Snížení CD4<sup>+</sup> Th-lymfocytů je zaznamenáno u virů EBV, CMV a HIV. Naopak ke zvýšení CD8<sup>+</sup> Tc-lymfocytů dochází při virové infekci EBV, CMV, HHV 6 a HIV. [35]

Principem je ozáření částic monochromatickým zářením a následná fluorescence. [14, 67]

Průtokový cytometr se skládá z několika částí (fluidika, optika, elektronika), které jsou vzájemně propojeny. Ve fluidním systému dochází v kyvetě k průtoku částic v jedné řadě za sebou. V optickém systému jsou paprskem monochromatického záření zachycovány analyzované částice značené fluorochromem. Fluorochromy jsou konjugovány nejčastěji

s monoklonálními protilátkami, které jsou specifické k dané struktuře na povrchu virů. Elektronický systém převádí optické signály na elektrické impulzy, které jsou zpracovány počítačovým softwarem.

Výhodou průtokové cytometrie je vysoká frekvence analýzy jednotlivých částic a rychlost. Naopak nevýhodou je finanční náročnost. [67]

### 3.9 Hmotnostní spektrometrie

Poslední zmiňovanou výzkumnou metodou je hmotnostní spektrometrie. V dnešní době slouží hmotnostní spektrometrie jako metoda pro potvrzení přítomnosti mikrobiálních proteinů v biologických vzorcích. Příkladem detekce může být poliovirus, HBV, HIV, influenza virus nebo kvantifikace hemaglutininu viru chřipky. [68, 69]

Principem hmotnostní spektrometrie je separace nabitých částic v elektrickém nebo magnetickém poli na základě jejich poměru hmotnosti ku náboji (tj.  $m/z$ ). Hmotnostní spektrometr se skládá z iontového zdroje, analyzátoru a detektoru.

V iontovém zdroji dochází ke vzniku kladných nebo záporně nabitých iontů a převodu vzorku do plynné fáze. Ionizační zdroje se podle daného množství ionizační energie dělí na „měkké“ (laserová desorpce/ionizace za přítomnosti matrice (MALDI), elektrosprej) a „tvrdé“ (elektronová ionizace). Výsledným záznamem detektoru je hmotnostní spektrum. [68]

Pro identifikaci lidského polioviru a pro identifikaci specifických virových proteinových biomarkerů v infikovaných buňkách byla hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpčí/ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem (MALDI-TOF MS) testována jako inovační technologie. [69] Princip metody je stejný jako výše, ale celý proces probíhá ve vakuu.

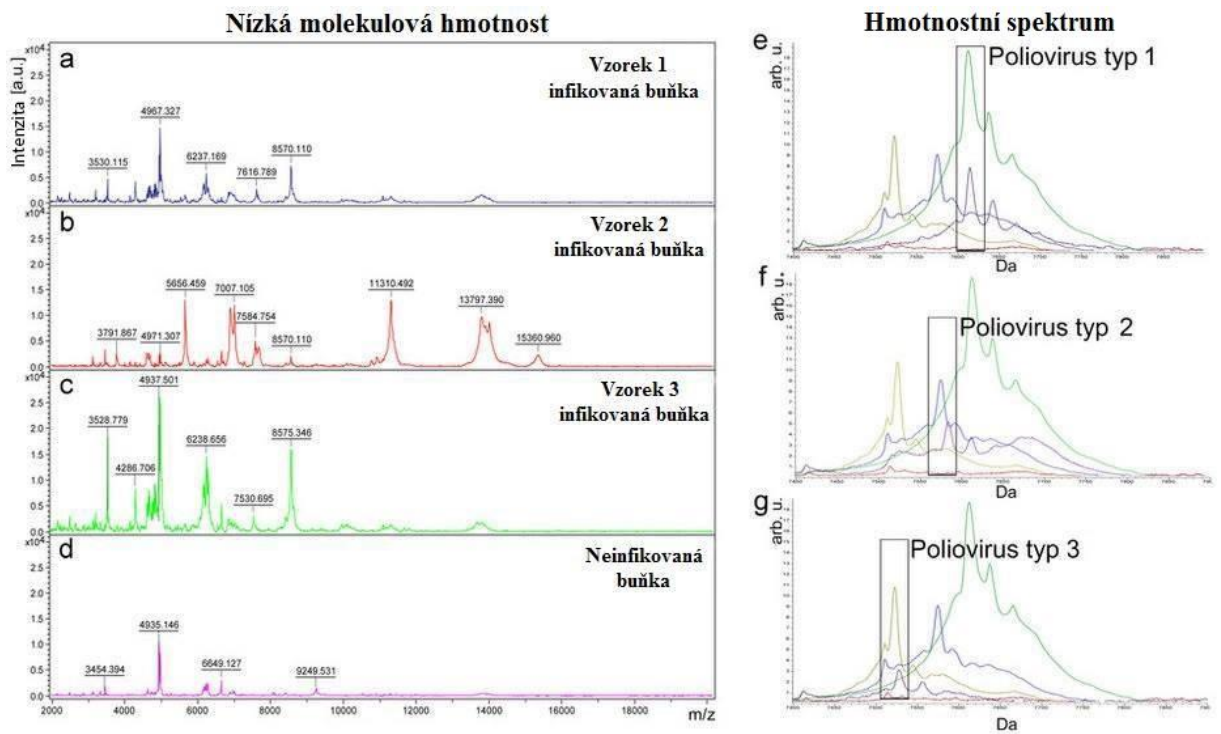
Metoda je vysoce citlivá a rychlejší oproti klasickým metodám. Je schopna rozlišit viry na rodové, druhové a i kmenové úrovni. [70]

Výsledky výzkumu ukázaly, že MALDI-TOF MS je účinný nástroj pro identifikaci sérotypů polioviru.

Sérotypy I, II a III polioviru mají mírně odlišné kapsidové proteiny, které udělují specifitu buněčného receptoru a virovou antigenicitu.

Pro identifikaci sérotypů polioviru byly použity různé klinické vzorky (mozkomíšni mok, výtěr z hrdla a stolice) a neinfikované konfluentní kultury opičí ledvinové epiteliální buněčné linie (LLC-MK2). Osa  $x$  znázorňuje hmotnost iontů ( $m/z$ ) a osa  $y$  intenzitu signálů (obrázek 9). Sérotypy byly rozlišeny v rozmezí 2-20 kDa. Následná identifikace spočívá

ve srovnání získaného spektra s databází. Nejvyšší body píků ukazují protein VP4. Obdélníky vyznačují shodu referenčního proteinu VP4 v klinických izolátech. [69]



Obrázek 9: Nízká molekulová hmotnost LLC-MK2 buněk infikovaných poliovirem izolovaných z různých klinických vzorků a neinfikované buňky (a – d). Zaznamenáno metodou MALDI-TOF. Hmotnostní spektra izolátů polioviru (e – g), kde referenčnímu polioviru 1, 2, 3 odpovídá zelená, modrá, žlutá barva v tomto pořadí ve srovnání s poliovirem izolovaným z klinických vzorků (fialová) a neinfikované LLC-MK2 buňky (červená). Převzato a upraveno z [69].

## 4 Nepřímé diagnostické metody virových infekcí

Nepřímou diagnostikou je detekována antivirová protilátka. Jde tedy o anamnestickou imunitní reakci organismu, nikoli o průkaz onemocnění. Nevýhodou je opožděná tvorba protilátek proti viru během začátku infekce.

Vzhledem k rychlosti provedení se využívá častěji oproti přímé diagnostice. [39]

Mezi běžně využívané metody v laboratořích jsou komplement fixační test, virus neutralizační test, hemaglutinačně inhibiční test, imunoblot, nepřímá imunofluorescence a zejména nepřímá ELISA.

### 4.1 Komplement fixační test

Komplement fixačním testem se prokazují antivirové protilátky v pacientově séru. Principem této metody je reakce imunokomplexu antigen-protilátka s komplementem, který spustí kaskádovitou reakci. Komplement je získán nejčastěji z morčecího séra. Přítomnost protilátek v séru je detekována ovčimi erytrocyty, které jsou senzibilizované specifickými protilátkami proti erytrocytům. V případě nepřítomnosti protilátek, tj. negativní výsledek, dojde k hemolýze erytrocytů v důsledku aktivity komplementu. Naopak u pozitivní reakce, tj. vyvázání komplementu imunokomplexem, nepodléhají senzibilizované erytrocyty lýze.

U komplement fixačního testu je kladen důraz na ekvimolární poměr jednotlivých složek, protože přebytek či nedostatek může způsobit falešnou negativitu nebo naopak pozitivitu. Mezi další nevýhody komplementu je možná reakce s antikomplementárními látkami nebo jeho senzitivita na zvýšenou teplotu a následná inaktivace. [14]

V současné době se tato metoda používá např. k retrospektivní diagnóze atypické chřipky a pro detekci virů z čeledi např. *Herpesviridae* (CMV, HSV, VZV), *Orthomyxoviridae* (virus chřipky A, B), *Paramyxoviridae* (RSV, virus parotitidy), *Adenoviridae*, *Arenaviridae* (virus lymfocytární choriomeningitidy), *Picornaviridae* (poliovirus, ECHO viry, viry Coxsackie), *Flaviviridae* (virus klíšťové encefalitidy). [35, 43]

U pacientů s virovým onemocněním nervového systému lze prokázat protilátky proti viru v mozkomíšním moku, které jsou následně porovnány se sérem potvrzující tvorbu intratekálních protilátek. [43]

### 4.2 Virus neutralizační test

Virus neutralizační test stanovuje protilátky, které neutralizují infekčnost viru ve vyšetřovaném séru. [2]

Ke snížení virové infekčnosti dochází vazbou protilátek na povrch virionu, čímž dojde k blokaci v cyklu replikace viru a zabránění CPE. [14, 71] Využívá se buněčných kultur ve zkumavkách nebo mikrotitračních destičkách popř. lze využít laboratorní zvířata.

Jeho provedení může mít dvě varianty. První varianta využívá konstantního séra a ředěného viru. Po inkubaci dochází ke snížení titru viru, který je porovnán s kontrolou. Kontrolu tvoří negativní sérum inkubované se stejně ředěným virem. Výsledek je vyjádřen neutralizačním indexem. Ten vyjadřuje počet ID<sub>50</sub> daného viru, který je neutralizován vyšetřovaným sérem.

Druhou variantou je konstantní virus a ředěné sérum. Po inkubaci sériově ředěného vyšetřovaného séra a konstantního ředěného viru je výsledek vyjádřen jako ředění séra, které neutralizuje 50 % dávky viru. Je vyjádřen jako poloviční neutralizační dávka. [2]

Virus neutralizační test je vysoce specifický, protože lze typizovat virový kmen a lze jej aplikovat pro viry čeledi např. *Picornaviridae* (viry Coxsackie B 1-6, poliovirus, ECHO viry). [2, 35]

Mezi modifikaci virus neutralizačního testu patří plak redukční neutralizační test (PRNT). Je považován za „zlatý standart“ a nejspecifičtější sérologický test pro diagnostiku flavivirů. [72]

Princip metody je stejný jako u virus neutralizačního testu.

V případě využití živých virů se smísí sériově ředěné sérologické vzorky s určitým počtem živých virů. V případě, že vzorek obsahuje neutralizační protilátky, které inhibují virovou infekci, navážou se na virus a vytvoří komplex protilátka-virus. Směs se nanese na monovrstvy buněk pro změření hodnoty non-neutralizujícího titru viru. Následně se vypočítá procento redukce v počtu plaků v testovaném vzorku ve srovnání s non-neutralizační kontrolou, ve které virus není smíchán s protilátkami proti viru. Obecně platí, že by měl být jako PRNT titr použit faktor ředění s 50-90% redukcí plaků.

Nicméně metoda je finančně náročná a vyžaduje vysoce kvalifikované pracovníky. Je také potřeba zajistit laboratoř s BSL-3 a BSL-4. [72]

K řešení problému požadavku na BSL3 a BSL4 laboratoř byl vyvinut opět modifikovaný PRNT s využitím geneticky modifikovaných rekombinačních flavivirů.

Test PRNT je možno využít i pro detekci dengue viru, viru Zika atd.

### 4.3 Hemaglutinačně inhibiční test

Test je založen na schopnosti přítomných protilátek ve vyšetřovaném vzorku zabránit aglutinaci erytrocytů přidaným virovým hemaglutininem. [73]

Této metody se využívá k identifikaci viru nebo konkrétněji např. pro stanovení imunitní odpovědi na očkování proti viru chřipky H1N1.

Každé sérum musí být před testováním ošetřeno tak, aby došlo k inaktivaci nespecifických inhibitorů aglutinace. Takto ošetřené sérum bylo naředěno 1:10. Séra byla ředěna dvojkovou řadou do V-mikrotitračních destiček. Virus byl upraven na 4 HA jednotky/25 $\mu$ l a přidán do každé z 96 jamek mikrotitrační destičky. Po inkubaci byly přidány čerstvě připravené 0,5% krůtí erytrocyty. Mikrotitrační destička byla krátce protřepána a následně opět inkubována. Pozitivním výsledkem byla jamka mikrotitrační destičky s úplnou inhibicí aglutinace. Jako titr byla stanovena obrácená hodnota posledního ředění séra, a to 5120. [74]

Hemaglutinačně inhibiční test může být použit i pro čeled' např. *Orthomyxoviridae* (virus chřipky A, B). [35]

### 4.4 Imunoblot

Imunoblot (Western blot) je imunoblotová technika, která je často využívána v buněčné a molekulární biologii. Pomocí této metody je možno identifikovat specifické virové proteiny ze směsi proteinů extrahovaných z buněčných lyzátů. [75] Metoda je kombinací elektroforézy a vizualizační metody, např. EIA. Prokazuje se nejčastěji virová DNA, RNA, glykoproteiny nebo proteiny. [4]

Extrakce proteinů by měla být provedena za nízké teploty s inhibitory proteázy, aby se zabránilo denaturaci. Směs proteinů je rozdělena pomocí elektroforézy v polyakrylamidovém gelu na základě elektroforetické pohyblivosti, která závisí na molekulové hmotnosti. Separované proteiny jsou následně přeneseny tzv. blotovány pomocí elektrického pole z gelu na membránu, která je z nitrocelulósy nebo z polyvinyliden difluoridu. Důležitým krokem je blokáce nespecifické vazby protilátek na membránu. K blokáci se využívá 5% roztok hovězího sérového albuminu nebo netučné suché mléko v tris-pufrovaném fyziologickém roztoku a Tween-20. Jednotlivé proteiny na membráně se detekují primární protilátkou. V dalším kroku je primární protilátka detekována sekundární protilátkou značenou nejčastěji enzymem, např. křenovou peroxidázou. Výsledek je vyhodnocen pomocí vizualizační metody.

I přes jednoduché provedení se mohou vyskytnout neočekávané pásy způsobené příliš velkým napětím nebo špatně zvolenou protilátkou. Naopak při použití nesprávné koncentrace

protilátky může dojít k absenci pásů nebo k velkému kontrastu pozadí. Skvrnitost nebo nerovnost na blotu je způsobena nesprávným převodem. [75]

Imunoblot může být použit pro detekci určitých infekcí, např. lidský T-lymfotropní virus nebo HCV, HEV, virus chřipky A, B. [35, 43]

Modifikovanou metodou je tzv. dotblotting. Při této technice jsou využity rekombinantní antigeny, které jsou uměle syntetizovány a nacházejí se v tekuté fázi s následnou imobilizací na membránu. Také mohou být využity silně vyčištěné nativní antigeny. Imobilizovány mohou být i protilátky, pomocí níž můžeme stanovit antigen. Oproti klasickému western blotu je dotblotting nákladnější, ale jednodušší na vyhodnocení. [4]

#### **4.5 Nepřímá imunofluorescence**

Nepřímá imunofluorescence může být využívána pro zobrazení virově specifických protilátek nebo virových genů a určení umístění virových antigenů (proteinů). [44]

Je založena na principu reakce virového antigenu s primární antivirovou protilátkou. Na primární protilátku se následně naváže značená sekundární anti-imunoglobulinová protilátka. [2, 46] Jako sekundární protilátky se používají zvířecí protilátky (kozí, myši, králíčí), které jsou namířeny proti Fc-části lidské imunoglobulinové molekuly. [4]. Citlivost nepřímé imunofluorescence je pět až desetkrát vyšší oproti přímé imunofluorescenci, proto se využívá častěji. [43, 46]

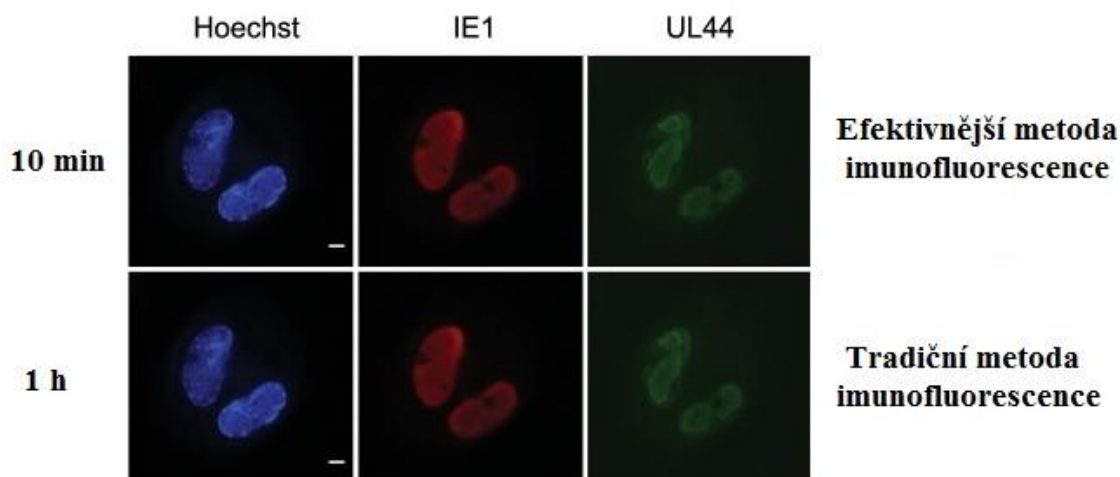
Výhodou je možnost zesílení signálu při použití více sekundárních protilátek, které jsou relativně levné a dostupné. Naopak nevýhodou může být zkřížená reaktivita. [43, 46]

Pro lepší zobrazení exprimovaného pp65, UL44 proteinu a časného proteinu 1 (IE1) CMV bylo použito barvení.

Barvení imunofluorescenčního testu zahrnuje blokování, inkubaci protilátek a mycí fázi. To je časově náročné, a proto byla vyvinuta rychlejší a efektivnější metoda na bázi nepřímé imunofluorescence. Rozdíly oproti klasické metodě spočívají ve využití krycích sklíček, které byly položeny lícem dolů do inkubačního roztoku směrem k membráně parafilmu. To výrazně zvýšilo účinnost fetálního bovinného séra, blokování a reakci protilátek. Doba barvení a množství protilátek se výrazně snížila.

Pro srovnání vyhodnocení kvality obrazů efektivnější metodou a klasickou metodou byly pozorovány HEL buňky fluorescenčním mikroskopem (obrázek 10). Vzorčky byly obarveny Hoechstovým barvivem, anti-UL44 a anti-IE1 protilátkami. Je zřejmé, že efektivnější metoda poskytuje s 10 minutovou inkubací protilátek dostatečně silný signál a je tak zřetelně vidět.

Specifický signál běžné metody byl trochu silnější, ale vzhledem k inkubaci proces trval 1 hodinu. [44]



Obrázek 10: Vyhodnocení kvality barvení vzorků efektivnější a klasickou nepřímou imunofluorescenční metodou. Převzato a upraveno z [44].

Výsledky ukazují, že efektivnější metoda je rychlejší, nákladově efektivnější (použití méně protilátek), má vyšší citlivost a specifitu. Metoda je tak vhodná pro včasnou, rychlou a přesnou diagnózu infekce virem, zejména CMV. [44]

Nepřímá imunofluorescence je využívána k detekci virů např. CMV, HSV, VZV, EBV, HHV6 a 8. [35]

#### 4.6 Nepřímá ELISA

Úzce souvisí s přímou diagnostickou metodou ELISA, ale rozdílem je využití sekundárně značené protilátky. [55]

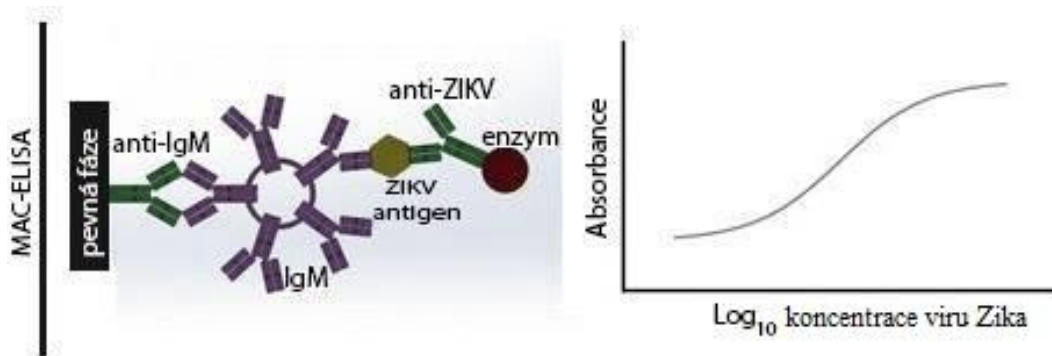
Oproti přímé se nepřímá diagnostika virů metodou ELISA využívá mnohem častěji. Byla prvním testem pro detekci HIV, právě kvůli její vysoké citlivosti. [76] Citlivost je zvýšena primární protilátkou, která obsahuje několik epitopů, které vážou značenou sekundární protilátku. Tím je signál zesílen. [56]

Mezi další viry, které mohou být detekovány jsou např. čeledi *Picornaviridae* (HAV), *Hepadnaviridae* (HBV), *Flaviviridae* (HCV, virus klíšťové encefalitidy), *Herpesviridae* (HSV 1 a 2, VZV, RBV, CMV), *Parvoviridae* (parvovirus B19), *Paramyxoviridae* (virus parotitidy, virus spalniček), *Togaviridae* (virus zarděnek), *Adenoviridae*, *Paramyxoviridae* (RSV, parainfluenza 1, 2, 3, 4). [35]

Mezi nepřímou metodu se řadí tzv. „IgM capture ELISA“ (obrázek 11).



Na bázi tohoto typu ELISA byl vyvinut enzymatický imunotest Zika MAC-ELISA pro detekci viru Zika specifických IgM protilátek z lidského séra nebo mozkomíšního moku během epidemie v roce 2015. Vzorek od pacienta se přidá do mikrotitrační destičky s potaženými protilátkami k zachycení lidského IgM. Následně se přidá specifický antigen viru a promyje se. Nakonec se přidá sekundární protilátka značená enzymem (křenuvová peroxidáza) a pro kvantifikaci chromogenní substrát. Infikovaný vzorek vyvolá opticky změřitelnou hodnotu. [77] S využitím MAC-ELISA bylo zjištěno, že protilátky IgM se objevily 3 dny po nástupu příznaků nemoci. [78]



Obrázek 11: Schéma pro diagnostiku a kvantifikace viru ZIKA. Převzato a upraveno z [77].

## 5 Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo shrnout dostupné informace o virových imunomodulátorech, které napomáhají šíření viru v hostitelských buňkách. Tyto imunomodulátory sekretované jako proteiny se vyskytují ve velice nízkých hodnotách v infikovaných tkáních a buňkách, kde vykazují silné anti-imunitní vlastnosti. Zaměřují se tak na celou řadu imunitních drah hostitele a rozvracejí konsolidované síly vrozené a získané imunitní odpovědi. Ačkoliv se neustále objevují nové viry či jejich mutace, mnoho virových imunomodulátorů již bylo popsáno, ale také se jich mnoho teprve zkoumá nebo nebyly ještě objeveny. Nejvíce studovaným imunomodulátorem je gp120 viru lidského imunodeficitu, který se podílí na zabíjení neinfikovaných T-lymfocytů. Mimo rozvrácení hostitelského imunitního systému viry vyvinuly i různé mechanismy, kterými mohou obejít imunitní systém. Těmito mechanismy mohou viry prodloužit své časové okno pro replikaci a šíření virových částic. Konkrétně virus chřipky A vyvinul antigenní změny, kterými způsobuje genové mutace a tlumí tak funkci imunitního systému.

Naopak imunitní systém se brání proti virové infekci různými mechanismy, přičemž antivirové vlastnosti mají zejména IFN- $\alpha$ , fagocytóza, NK-buňky, T i B-lymfocyty a účinné IgM, IgG, IgA, jejichž funkcí je i neutralizace virů.

Aby vir pronikl do buňky, užívá řady způsobů. Většina virů však využívá procesu endocytózy k průniku do buňky. Replikaci napomáhají kódované enzymatické a pomocné proteiny – viroporiny, které tvoří póry v buněčných membránách hostitele. Příkladem je Vpu viroporin HIV-1 s funkcí degradace CD4. Po skončení replikace jsou nové viriony uvolněny nejčastěji lýzou nebo pučením buňky.

I přes obrovský pokrok v diagnostice virových infekcí je mezi běžné metody v identifikaci virů zařazována kultivace – izolace, která je jedinou technikou schopnou poskytovat životaschopné izoláty. Dalšími metodami využívanými v praxi jsou zejména PCR, nepřímá ELISA, komplement fixační test, imunochromatografický test nebo nepřímá imunofluorescence pro jejich dobrou citlivost. Pomocí výzkumných metod se mohou vyvíjet nové laboratorní metody, které budou splňovat nezbytná kritéria a mohou tak nahradit standardní metody.

## Literatura

1. HOŘEJŠÍ, V.; BARTŮŇKOVÁ, J. *Základy imunologie*. Vyd. 4, Praha: TRITON, 2009, 23-109 s. ISBN 978-80-7387-280-9.
2. CELER, V.; CELER V. ml. *Obecná virologie*. Vyd. 1, Hradec Králové: Nucleus HK, 2010, 82-114 s. ISBN 978-80-87009-70-3.
3. BEDNÁŘ, M. a kol. *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie*. Vyd. 1, Praha: Marvil, 1996, 370-382 s. ISBN 80-238-0297-6.
4. BARTŮŇKOVÁ, J.; PAULÍK, M. a kol. *Vyšetřovací metody v imunologii*. Vyd. 2, Praha: Grada, 2011, 25-54 s. ISBN 978-80-247-3533-7.
5. SAMUEL, C. E. Antiviral actions of interferons. *Clinical Microbiology Reviews* [online]. 2001, 14(4), 778-809 [6. 5. 2017]. ISSN 0893-8512.
6. DEVASTHANAM. A.S. Mechanisms underlying the inhibition of interferon signaling by viruses. *Virulence* [online]. 2014, 5(2), 270-277 [6. 5. 2017]. ISSN 2150-5594.
7. MEAGER, A.; HEATH, A.; DILGER, P.; ZOON, K.; WADHWA, M. Standardization of human IL-29 (IFN- $\lambda$ 1): establishment of a World Health Organization international reference reagent for IL-29 (IFN- $\lambda$ 1). *Journal of interferon & cytokine research: the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* [online]. 2014, 34(11), 876-884 [6. 5. 2017]. ISSN 1557-7465.
8. LAZEAR, H.; NICE, T.; DIAMOND, M. Interferon- $\lambda$ : Immune Functions at Barrier Surfaces and Beyond. *Immunity* [online]. 2015, 43(1), 15-28 [6. 5. 2017]. ISSN 1074-7613.
9. DONNELLY, R. P.; KOTENKO, S. V. Interferon-lambda: A new addition to an old family. *Journal of Interferon and Cytokine Research* [online]. 2010, 30(8), 555-564 [6. 5. 2017]. ISSN 1079-9907.
10. LODOEN, M. B.; LANIER, L. L. Natural killer cells as an initial defense against pathogens. *Current Opinion in Immunology* [online]. 2006, 18(4), 391-398 [6. 5. 2017]. ISSN 0952-7915.
11. ENCYCLOPEDIA BRITANNICA. INFLAMMATION. *Encyclopedia Britannica* [online]. ©2017 [8. 5. 2017]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/science/inflammation>
12. BARTŮŇKOVÁ, J.; ŠEDIVÁ, A.; JANDA, A. *Imunodeficiency*. Vyd. 2, Praha: Grada, 2007, 39 s. ISBN 978-80-247-1980-1.

13. JÍLEK, P. *Základy imunologie*. Vyd. 2, Praha: ANYWAY, 2008, 36 s.  
ISBN 978-80-254-2422-3.
14. TOMAN, M. a kol. *Veterinární imunologie*. Vyd. 2, Praha: Grada Publishing a.s., 2009, 181-363 s. ISBN 978-80-247-2464-5.
15. MOUREK, J. *Fyziologie*. Vyd. 1, Praha: Grada Publishing a.s., 2012, 32 s.  
ISBN 978-80-247-3918-2.
16. BENEŠ, J. *Infekční lékařství*. Vyd. 1, Praha: Galén, 2009, 98-99 s.,  
ISBN 978-80-7262-644-1.
17. SZE, C. W.; TAN, Y.-J. Viral membrane channels: Role and function in the virus life cycle. *Viruses* [online]. 2015, 7(6), 3261-3284 [9. 5. 2017]. ISSN 1999-4915.
18. YAMAUCHI, Y.; HELENIUS, A. Virus entry at a glance. *Journal of Cell Science* [online]. 2013, 126(6), 1289-1295 [10. 5. 2017]. ISSN 0021-9533.
19. infoSIDA. Ensamblaje. *infoSIDA*. [online]. 2017 [15. 5. 2017]. Dostupné z: <https://infosida.nih.gov/understanding-hiv-aids/glossary/4594/ensamblaje>
20. GROVE, J.; MARSH, M. The cell biology of receptor-mediated virus entry. *Journal of Cell Biology* [online]. 2011, 195(7), 1071-1082 [9. 5. 2017]. ISSN 0021-9525.
21. DIMITROV, D. S. Virus entry: Molecular mechanisms and biomedical applications. *Nature Reviews Microbiology* [online]. 2004, 2(2), 109-122 [11. 5. 2017].  
ISSN 1740-1526.
22. BIOLOGIE A GENETIKA PRO BAKALÁŘE. Nebuněčné formy života, elektronové mikroskopy. *Biologie a genetika pro bakaláře*. [online]. 2014 [15. 5. 2017]. Dostupné z: [http://mmp.vfu.cz/opvk2014/?title=teorie-nebunecne\\_formy\\_zivota&lang=cz](http://mmp.vfu.cz/opvk2014/?title=teorie-nebunecne_formy_zivota&lang=cz) web
23. VOSEN, M. T. M.; WESTERHOUT, E. M.; SÖDERBERG-NAUCLÉR, C.; WIERTZ, E. J. H. J. Viral immune evasion: A masterpiece of evolution. *Immunogenetics* [online]. 2002, 54(8), 527-542 [18. 5. 2017]. ISSN 0093-7711.
24. FINLAY, B. B.; MCFADDEN, G. Anti-immunology: Evasion of the host immune system by bacterial and viral pathogens. *Cell* [online]. 2006, 124(4), 767-782 [20. 5. 2017]. ISSN 0092-8674.
25. FELDMANN, H.; GEISBERT, T. W. Ebola haemorrhagic fever. *The Lancet* [online]. 2011, 377(9768), 849-862 [20. 5. 2017]. ISSN 0140-6736.
26. LUCAS, A.; MCFADDEN, G. Secreted immunomodulatory viral proteins as novel biotherapeutics. *Journal of Immunology* [online]. 2004, 173(8), 4765-4774 [24. 4. 2017]. ISSN 0022-1767.

27. BAHAR, M. W.; GRAHAM, S. C.; CHEN, R. A.-J.; COORAY, S. et al. How vaccinia virus has evolved to subvert the host immune response. *Journal of Structural Biology* [online]. 2011, 175(2), 127-134 [25. 4. 2017]. ISSN 1047-8477.
28. ALCAMI, A. Viral mimicry of cytokines, chemokines and their receptors. *Nature Reviews Immunology* [online]. 2003, 3(1), 36-50 [16. 5. 2017]. ISSN 1474-1733.
29. LAW, R. H. P.; ZHANG, Q.; MCGOWAN, S.; BUCKLE, A. M. et al. An overview of the serpin superfamily. *Genome Biology* [online]. 2006, 7(5), 216 [18. 5. 2017]. ISSN 1474-760X.
30. CHEN, H.; ZHENG, D.; DAVIDS, J.; LUCAS, A. et al. Viral serpin therapeutics: From concept to clinic. *Methods in Enzymology* [online]. 2011, 499, 301-329 [17. 5. 2017]. ISSN 0076-6879.
31. DAI, E.; GUAN, H.; LIU, L.; LITTLE, S et al. Serp-1, a viral anti-inflammatory serpin, regulates cellular serine proteinase and serpin responses to vascular injury. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2003, 278(20), 18563-18572 [18. 7. 2017]. ISSN 0021-9258.
32. STORCH, G. A. Diagnostic Virology. *Clinical Infectious Diseases* [online]. 2000, 31(3), 739-751 [16. 4. 2017]. ISSN 1537-6591.
33. CALIENDO, A. M.; GILBERT, D. N.; GINOCCHIO, C. C. et al. Better Tests, Better Care: Improved Diagnostics for Infectious Diseases. *Clinical Infectious Diseases* [online]. 2013, 57 Suppl 3, pp. S139-170 [12. 3. 2017]. ISSN 1058-4838.
34. PARKASH, O.; SHUEB, R. H. Diagnosis of dengue infection using conventional and biosensor based techniques. *Viruses* [online]. 2015, 7(10), 5410-5427 [18. 4. 2017]. ISSN 1999-4915.
35. AGEL laboratoře. Atlas laboratorních vyšetření. *AGEL laboratoře*. 2017 [online]. [25. 5. 2017]. Dostupné z:  
<http://laboratore.agel.cz/odbornici/dokumenty/atlas/atlaslv.pdf>
36. LELAND, D. S.; GINOCCHIO, C. C. Role of cell culture for virus detection in the age of technology. *Clinical Microbiology Reviews* [online]. 2007, 20(1), 49-78 [18. 4. 2017]. ISSN 0893-8512.
37. SINGH, A.; PREIKSAITIS, J.; ROMANOWSKI, B. The laboratory diagnosis of herpes simplex virus infections. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology* [online]. 2005, 16(2), 92-98. [8. 3. 2017]. ISSN 1712-9532.
38. ROUBALOVÁ, K. Laboratorní diagnostika herpetických virů. *Medicína pro praxi* [online]. 2010, 7(5), 241-244. [8. 3. 2017]. ISSN 1803-5310.

39. VOTAVA, M. a kol. *Lékařská mikrobiologie vyšetřovací metody*. Brno: NEPTUN, 2010, s. 371-373. ISBN 978-80-86850-04-8.
40. MA, B.; HE, L.-F.; ZHANG, Y.-L.; et al. Characteristics and viral propagation properties of a new human diploid cell line, walvax-2, and its suitability as a candidate cell substrate for vaccine production. *Human Vaccines and Immunotherapeutics* [online]. 2015, 11(4), 998-1009 [8. 3. 2017]. ISSN 2164-5515.
41. ZENG, J.; WANG, G.; LI, W. et al. Induction of cytopathic effect and cytokines in coxsackievirus B3-infected murine astrocytes. *Virology Journal* [online]. 2013, 10(157) [9. 3. 2017]. ISSN 1743-422X.
42. LEGOFF, J.; PÉRÉ, J.; BÉLEC, L. Diagnosis of genital herpes simplex virus infection in the clinical laboratory. *Virology Journal* [online]. 2014, 11(83) [9. 3. 2017]. ISSN 1743-422X.
43. ZUCKERMAN, A. J.; BANATVALA, J. E.; SCHOUB, B. D.; GRIFFITHS, P. D.; MORTIMER, P. *Principles and Practice of Clinical Virology*. 6th ed., Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 2009, 4-6 s. ISBN 978-0-470-51799-4.
44. DUAN, Y.; MIAO, L.; YE, H. YANG, C. et al. A faster immunofluorescence assay for tracking infection progress of human cytomegalovirus. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* [online]. 2012, 44(7), 597-605 [30. 3. 2017]. ISSN 1672-9145.
45. THERMO FISHER SCIENTIFIC. IMAGEN Respiratory Syncytial Virus (RSV). *THERMO FISHER SCIENTIFIC*. 2012 [online]. [26. 5. 2017]. Dostupné z: <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/X7848A-CS.pdf>
46. SAWANT, P.; KSHAR, A.; BYAKODI, R.; PARANJPE, A. Immunofluorescence in Oral Mucosal Diseases – A Review. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Radiology* [online]. 2014, 2(1), 6-10 [30. 3. 2017].
47. RAVISHANKAR, B.; RAJESH, R.; VENKATANAGARAJU, E.; DIVAKAR, G. et al. Overview on development and applications of immunochromatography. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science* [online]. 2015, 4(12), 344-349 [9. 4. 2017]. ISSN 2278-4357.
48. LI, X.; ZHANG, Q.; HOU, P.; CHEN, M. Gold magnetic nanoparticle conjugate-based lateral flow assay for the detection of IgM class antibodies related to TORCH infections. *International Journal of Molecular Medicine* [online]. 2015, 36(5), 1319-1326 [19. 4. 2017]. ISSN 1107-3756.

49. SAJID, M.; KAWDE, A.-N.; DAUD, M. Designs, formats and applications of lateral flow assay: A literature review. *Journal of Saudi Chemical Society* [online]. 2015, 19(6), 689-705 [9. 4. 2017]. ISSN 1319-6103.
50. STAMM, L. V. Ebola virus disease: Rapid diagnosis and timely case reporting are critical to the early response for outbreak control. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* [online]. 2015, 93(3), 438-440 [7. 4. 2017]. ISSN 0002-9637
51. World Health Organization (WHO). *Public report for ReEBOV™ antigen rapid test kit*. 2015, EA 0011-011-00 [7. 4. 2017]. Dostupné z:  
[http://www.who.int/diagnostics\\_laboratory/procurement/150219\\_reebov\\_antigen\\_rapid\\_test\\_public\\_report.pdf?ua=1](http://www.who.int/diagnostics_laboratory/procurement/150219_reebov_antigen_rapid_test_public_report.pdf?ua=1)
52. SU, S.; WONG, G.; QIU, X.; KOBINGER, G. et al. Diagnostic strategies for Ebola virus detection. *The Lancet Infectious Diseases* [online]. 2016, 16(3), 294-295 [7. 4. 2017]. ISSN 1473-3099.
53. GAN, S. D.; PATEL, K. R. Enzyme Immunoassay and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Journal of Investigative dermatology* [online]. 2013, 133(9), 1-3 [19. 3. 2017]. ISSN 0022-202X.
54. AYDIN, S. A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides* [online]. 2015, 72, 4-15 [19. 3. 2017]. ISSN 1873-5169.
55. CROWTHER, J. *The ELISA guidebook*. 2nd ed. New York: Humana Press, 2009, 566 s. ISBN 978-160-3272-537.
56. THERMO FISHER SCIENTIFIC. Overview of ELISA. THERMO FISHER SCIENTIFIC [online]. [20. 4. 2017]. Dostupné z:  
<https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-elisa.html#/legacy=www.piercenet.com>
57. IMAI, M.; NINOMIYA, A.; MINEKAWA, H. et al. Rapid diagnosis of H5N1 avian influenza virus infection by newly developed influenza H5 hemagglutinin gene-specific loop-mediated isothermal amplification method. *Journal of Virological Methods* [online]. 2007, 141(2), 173-180 [14. 3. 2017]. ISSN 0166-0934.
58. LOS, J. *Detekce nežádoucích mikroorganismů pomocí izotermální amplifikace DNA* [online]. Zlín, 2012, 17s. Bakalářská práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická. Vedoucí práce doc. Mgr. Marek Koutný, Ph.D. [14. 3. 2017]

59. MICHALOVÁ, K.; ZEMANOVÁ, Z. Klasická a molekulární cytogenetika v klinické praxi. *Klinická biochemie a metabolismus* [online]. 2005, 13(34), 63-67 [16. 3. 2017]. ISSN 1210-7921.
60. RAQUIN, V.; WANNAGAT, M.; ZOUACHE, K. et al. Detection of dengue group viruses by fluorescence *in situ* hybridization. *Parasites & Vectors* [online]. 2012, 5(243) [16. 3. 2017]. ISSN 1756-3305.
61. GOLDSMITH, C. S.; MILLER, S. E. Modern uses of electron microscopy for detection of viruses. *Clinical Microbiology Reviews* [online]. 2009, 22(4), 552-563 [13. 4. 2017]. ISSN 0893-8512.
62. ROMERO-BREY, I.; BARTENSCHLAGER, R. Viral infection at high magnification: 3D electron microscopy methods to analyze the architecture of infected cells. *Viruses* [online]. 2015, 7(12), 6316-6345 [10. 4. 2017]. ISSN 1999-4915.
63. CURRY, A.; APPLETON, H.; DOWSETT, B. Application of transmission electron microscopy to the clinical study of viral and bacterial infections: Present and future. *Micron* [online]. 2006, 37(2), 91-106 [11. 4. 2017]. ISSN 0968-4328.
64. WINEY, M.; MEEHL, J. B.; O'TOOLE, E. T.; GIDDINGS JR, T. H. Conventional transmission electron microscopy. *Molecular Biology of the Cell* [online]. 2014, 25(3), 319-323 [14. 4. 2017]. ISSN 1059-1524.
65. JIRKOVSKÁ, M. *Histologická technika: pro studenty lékařství a zdravotnické techniky*. Vyd. 1, Praha: Galén, 2006, s. 67-69. ISBN 978-80-7262-263-4.
66. BOGNER, A.; JOUNEAU, P.-H.; THOLLET, G.; BASSET, D.; GAUTHIER, C. A history of scanning electron microscopy developments: Towards "wet-STEM" imaging. *Micron* [online]. 2007, 38(4), 390-401 [12. 4. 2017]. ISSN 0968-4328.
67. ROUBALOVÁ, L. Průtoková cytometrie. *FONS* [online]. 2012, 22(2), 5-9 [2. 4. 2017]. ISSN 1211-7137.
68. FRIEDECKÝ, D; LEMR, K. Úvod do hmotnostní spektrometrie. *Klinická biochemie a metabolismus* [online]. 2012, 20(41), No. 3, 152-157 [6. 4. 2017]. ISSN 1210-7921.
69. CALDERARO, A.; ARCANGELETTI, M.-C.; RODIGHIEROI. et al. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry applied to virus identification. *Scientific Reports* [online]. 2014, 4(6803) [6. 4. 2017]. ISSN 2045-2322.
70. HUONG, T. T.; KOMÍNKOVÁ, M.; GURÁŇ, R.; RUTTKAY-NEDECKÝ, B. et al. Identifikace mikroorganismů pomocí MALDI-TOF MS. *Journal of Metallomics and Nanotechnologies* [online]. 2014, 1(2), 64-66 [6. 4. 2017]. ISSN 2336-3940.



71. KLASSE, P. J. Neutralization of Virus Infectivity by Antibodies: Old Problems in New Perspectives. *Advances in biology* [online]. 2014, 2014(157895) [23. 3. 2017]. ISSN 2314-7563.
72. MAEDA, A.; MAEDA, J. Review of diagnostic plaque reduction neutralization tests for flavivirus infection. *Veterinary Journal* [online]. 2013, 195(1), 33-40 [27. 3. 2017]. ISSN 1090-0233.
73. TROMBETTA, C. M.; PERINI, D.; MATHER, S.; TEMPERTON, N.; MONTOMOLI, E. Overview of serological techniques for influenza vaccine evaluation: Past, Present and Future. *Vaccines* [online]. 2014, 2(4), 707-734 [29. 3. 2017]. ISSN 2076-393X.
74. GRUND, S.; ADAMS, O.; WÄHLISCH, S.; SCHWEIGER, B. Comparison of hemagglutination inhibition assay, an ELISA-based micro-neutralization assay and colorimetric microneutralization assay to detect antibody responses to vaccination against influenza A H1N1 2009 virus. *Journal of Virological Methods* [online]. 2011, 171(2), 369-373 [29. 3. 2017]. ISSN 0166-0934.
75. MAHMOOD, T.; YANG, P.-C. Western blot: Technique, theory, and trouble shooting. *North American Journal of Medical Sciences* [online]. 2012, 4(9), 429-434 [22. 3. 2017]. ISSN 2250-1541.
76. SINO BIOLOGICAL INC. ELISA for Virus Test. *Sino biological inc.* © 2004-2017 [online]. [25. 5. 2017]. Dostupné z: <http://www.elisa-antibody.com/ELISA-applications/virus-test>
77. NICOLINI, A. M.; MCCRACKEN, K. E.; YOON, J.-Y. Future developments in biosensors for field-ready Zika virus diagnostics. *Journal of Biological Engineering* [online]. 2017, 11(1), 7 [19. 3. 2017]. ISSN 1754-1611.
78. SHUKLA, S.; HONG, S.-Y.; CHUNG, S. H.; KIM, M. Rapid detection strategies for the global threat of Zika virus: Current state, new hypotheses, and limitations. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2016, 7(Oct), 1685 [19. 3. 2017]. ISSN 1664-302X.