

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Přírodovědecká fakulta  
Katedra medicínské biologie**



## **Metody laboratorní diagnostiky klíšťové encefalitidy**

**Bakalářská diplomová práce**

Vendula Vetišková

Vedoucí práce: Prof. RNDr. Libor Grubhoffer, CSc.  
Školitel specialista: RNDr. Daniel Růžek

České Budějovice 2008

**Vetišková V., (2008):** Metody laboratorní diagnostiky klíšťové encefalitidy [Methods of laboratory diagnostic of tick-borne encephalitis. Bc. Thesis, in Czech] – 32 p., Faculty of Biological Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic

**Annotation:**

This study was focused on the comparison of four template preparation methods for routine laboratory diagnosis of tick-borne encephalitis. The review of developments in tick-borne encephalitis diagnostics is presented. This study shows that the choice of template preparation method has an important role in the diagnostics of tick-borne encephalitis. The commercial available kits were found to be most practical for the detection of RNA.

Projekt byl finančně podporován Výzkumným záměrem MSM 6007665801, grantem Grantové agentury ČR 524/06/1479 (řešitel L. Grubhoffer), výzkumné centrum LC 06009 MŠMT (řešitel L. Grubhoffer).

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě Přírodovědeckou fakultou, elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

Prohlašuji, že jsem uvedenou práci vypracovala samostatně, pouze z využitím uvedené literatury.

V Českých Budějovicích duben 2008

.....  
Vendula Vetišková

**Poděkování:**

Touto cestou bych ráda od srdce poděkovala svému školiteli a úžasnému člověku Prof. RNDr. Liboru Grubhofferovi, Csc. za možnost pracovat na tomto zajímavém tématu a tím i umožnění osobního rozvoje. Velký dík patří mému školiteli-specialistovi RNDr. Danielu Růžkovi za trpělivost v mých laboratorních začátcích, za množství rad, všestrannou pomoc a ochotu zodpovídat vždy s úsměvem mé dotazy. Děkuji též Mgr. Janku Štěrbovi za poskytnutí cenných rad. Dále děkuji kolektivu Laboratoře molekulární biologie vektorů a patogenů za přátelskou atmosféru.

V neposlední řadě chci poděkovat své rodině a přátelům za trpělivost a za to, že mě podporují ve studiu.

# **OBSAH**

<b>1. ÚVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>2</b>
2.1 Virus klíšťové encefalitidy .....	2
2.2 Diagnostika klíšťové encefalitidy .....	7
<b>3. MATERIÁL A METODY</b> .....	<b>11</b>
3.1. Virus .....	11
3.2. Metody přípravy templátu pro RT-PCR a real-time PCR.....	11
3.2.1. Purifikace virové RNA pomocí kitu <i>QIAamp® Viral RNA Mini Kit</i> (QIAGEN)..	11
3.2.2. Purifikace virové RNA pomocí kitu <i>RTP® DNA/RNA Virus Mini kit</i> (Invitex)....	11
3.2.3 Izolace RNA pomocí fenol – chloroformové metody – TRI REAGENT™ (Sigma Aldrich) .....	12
3.2.4. Opracování vzorku pomocí chelexu.....	12
3.3. Dvoukroková RT-PCR.....	12
3.3.1. Reverzní transkripce (RT) .....	12
3.3.2. PCR .....	13
3.4. Real- time RT-PCR .....	14
<b>4. VÝSLEDKY</b> .....	<b>15</b>
4.1. Optimalizace protokolu pro opracování vzorku pomocí Chelex® 100 Resin (BioRad) .....	15
4.2. Porovnání jednotlivých metod opracování vzorku.....	17
<b>5. DISKUZE</b> .....	<b>21</b>
<b>6. ZÁVĚR</b> .....	<b>25</b>
<b>7. LITERATURA</b> .....	<b>26</b>

# 1. ÚVOD

*„Vědecká práce je naší jedinou cestou  
k poznání okolní reality.“*

*Sigmund Freud*

Virus, slovo latinsky znamenající jed, označuje název pro částice, o kterých se vedou spory, zda-li je lze považovat za živý organismus. Pro lidské oko se staly viry viditelné až s objevem elektronového mikroskopu, díky němuž se zjistilo, že vynikají nejrůznějšími geometrickými tvary.

Přestože viry obsahují vlastní genetickou informaci – nukleovou kyselinu, chráněnou bílkovinným obalem (kapsidou), nejsou schopné samostatné existence bez hostitelské buňky. Označujeme je tedy za intracelulární parazity, ovšem svou přítomností hostitelskou buňku nepoškozují, virus pouze využívá metabolismus buňky pro své vlastní potřeby a bez hostitelské buňky není schopen vlastní reprodukce.

Vzhledem k množství a různorodosti virů je lze rozdělit podle nejrůznějších kritérií- např. podle druhu nukleové kyseliny, podle druhu hostitele, podle způsobu replikace aj. Jedním z dalších kritérií je způsob přenosu viru do hostitelského organismu. Rozlišujeme viry přenosné kapénkovou infekcí, potravinami či vodou, přímým kontaktem s infikovanou krví a v neposlední řadě přenos krev sajícími členovci (nejčastěji se jedná o komáry a klíšťata). Pro takové viry používáme termín arboviry. Tento termín je odvozen z řeckého arthropodos – členovec a z anglického slovesného tvaru born – nesen.

V našich geografických podmínkách je nejvýznamnějším arbovirem virus klíšťové encefalidity, který napadá stále větší počet pacientů. Vzhledem k závažnosti onemocnění, které virus způsobuje, je nutné určit co nejdříve správnou diagnózu klíšťové encefalidity.

Předmětem této práce je porovnat některé z dostupných metod přípravy templátu pro RT-PCR a real-time PCR. Ukazuje se totiž, že způsob izolace má nezanedbatelnou roli v diagnostické praxi vzhledem ke ztrátám virové RNA během jejich procedury. To může vést až k falešně negativnímu výsledku a tím pádem k chybné diagnóze pacienta.

## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Virus klíšťové encefalitidy

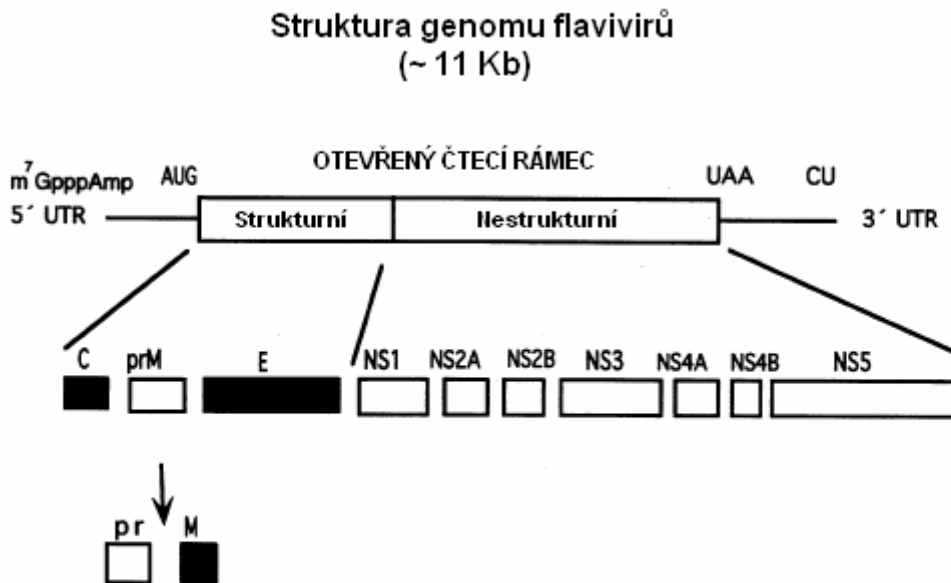
Virus klíšťové encefalitidy (dále KE) je původcem vážného onemocnění – klíšťové encefalitidy, postihujícího centrální nervovou soustavu. Tato arbovirová zoonóza ročně postihuje po celém světě několik tisíců pacientů, přičemž některé případy infekce mohou končit i smrtí. Onemocnění může probíhat od symptomatické infekce až po těžké encefalitidy (Gritsun *et al.*, 2003).

První medicínský popis choroby učinil roku 1931 H. Schneider, který ji pojmenoval „Epidemische akute Meningitis serosa“ (Schneider, 1931). Ale otázka příčiny a přenašeče choroby zůstávala stále nevyřešena. K objasnění příčiny a přenašeče došlo roku 1937 v Rusku, kde vědci izolovali virus z člověka, myši a klíštěte (Zilber, 1939). V Evropě byl virus poprvé izolován v roce 1948 v Československu F. Galliem (Rampas *et Gallia*, 1949). Následně se prokázalo, že onemocnění (virus) se vyskytuje skoro ve všech evropských státech a později i na severu Číny a v severním Japonsku (Hayasaka *et al.*, 1999). Poté výzkum onemocnění a viru pokračoval a studie se v první radě soustředily na vysvětlení cyklu viru v přírodě mezi jeho hlavními vektory - klíšťaty *Ixodes ricinus* a *Ixodes persulcatus* a jejich hostiteli - obratlovci. Většina z těchto studií byla prováděna v Rusku, Československu a Rakousku.

Virus KE řadíme do komplexu virů klíšťové encefalitidy, čeledi *Flaviviridae*, rod *Flavivirus*. (Thiel *et al.*, 2005). V rámci rodu *Flavivirus* nacházíme dalších téměř 80 virů. Zhruba polovina z nich je považována za lidské či zvířecí patogeny – zejména se jedná např. o virus žluté zimnice, virus dengue a virus japonské encefalitidy. Flaviviry lze dělit podle vektora přenosu. Rozlišujeme viry přenosné komáry, klíšťaty a dále viry, pro které není vektor přenosu znám (Calisher *et Gould*, 2003).

Virus klíšťové encefalitidy patří, stejně jako ostatní flaviviry, k obaleným virům. Nukleokapsida viru obsahuje jednořetězcovou RNA pozitivní polarity o délce přibližně 11 kb. Hlavní část virového genomu (cca 90%) tvoří jediný otevřený čtecí rámec (ORF - open reading frame), kódující polyprotein, zhruba o velikosti 3400 aminokyselin. Polyprotein je

následně virovými a buněčnými proteázami na N-konci kotranslačně a posttranslačně štěpen na tři strukturální proteiny a sedm proteinů nestrukturních. Kapsidový protein C (capsid) tvoří spolu s virovou RNA nukleokapsidu. Povrchový protein E (envelope) interaguje s buněčnými receptory a zprostředkovává tak splynutí virové a buněčné membrány a v savčích hostitelích navozuje virus-neutralizační protilátky, které hrají důležitou roli v ustanovení obranné imunitní odpovědi. Tento protein představuje hlavní antigenní determinantu všech flavivirů (Heinz *et al.*, 2000). Membránový protein M (membrane) vzniká z prekurzorového proteinu prM během pučení virionu z buňky (Murphy, 1980). Na C-konci štěpí proteázy polyprotein na 7 nestrukturních proteinů (NS – nonstructural) NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5. Genom viru má na obou koncích netranslatované oblasti (UTR – untranslated region) (Chambers *et Rice*, 1987; Lindenbach *et Rice*, 2003). 5'UTR většinou nese metylguanovinovou čepičku a vytváří charakteristickou sekundární strukturu, která je důležitá při genomové amplifikaci a translaci (Gritsun *et al.*, 1997). 3'UTR obsahuje u různých flavivirů různě dlouhé konzervované sekvence.



**Obr. 1:** Genom flavivirů (McMinn, 1997 – upraveno)

Na základě srovnávací sekvenční analýzy hlavního obalového proteinu E různých kmenů viru KE byl virus rozdělen na tři subtypy (Ecker *et al.*, 1999):

- Subtyp 1 – evropský subtyp, zahrnující prototypový kmen Neudoefl a další kmeny izolované v České republice, Rakousku, Německu, Maďarsku, Švýcarsku, Francii, Slovinsku, Chorvatsku, Finsku, Bělorusku a v evropské části Ruska
- Subtyp 2 – subtyp Dálný východ, jehož prototypový kmen je kmen Sofjin a další kmeny pocházející z východu Ruska, Číny, Japonska, Litvy a Ukrajiny
- Subtyp 3 – sibiřský subtyp, do něhož zařazujeme kmeny Aina a Vasilchenko, vyskytující se v asijské části Ruska

Některé literární prameny řadí mezi virus KE též virus vrtivky (angl. Louping ill virus), vyskytující se jako jediný flavivirus ve Velké Británii (Grard *et al.*, 2007). Je přenášený klíštětem *Ixodes ricinus* a způsobuje smrtelné encefalomyelitidy u ovcí (Gritsun *et al.*, 2003).

Všechny subtypy jsou si antigenně velmi blízce příbuzné (Grešíková *et Kaluzová*, 1997). Avšak sibiřský subtyp je více příbuzný k subtypu Dálný východ nežli k evropskému subtypu (Ecker *et al.*, 1999).

Subtypy klíšťové encefalitidy se vzájemně liší nejenom klinickými příznaky, ale i závažností onemocnění, které způsobují. Subtyp Dálný východ způsobuje těžké formy poruch CNS se sklonem k rozvinutí meningoencefalitidy nebo polyencefalitidy, často doprovázené ztrátou vědomí. V některých případech může docházet k hemiparéze (částečné ochrnutí poloviny těla) či hemiplegii (celkové ochrnutí těla). Během rekonvalescence pacienti trpí dlouhodobými pocity únavy. U velmi těžkých případů dochází k významnému poškození neuronů v různých částech mozku a míchy (Gritsun *et al.*, 2003). U dětí je onemocnění více závažné než u dospělých (Votjakov *et al.*, 1978). Procento úmrtnosti se liší v různých zdrojích literatury a pohybuje se v rozsahu 5-35% (Donoso Mantke *et al.*, 2007), jiná literatura uvádí 20-60% (Gritsun *et al.*, 2003). Pro sibiřský subtyp je charakteristická méně závažnější akutní fáze a častá je neparalytická horečnatá forma. Případy úmrtí vzácně převyšují 1-3%. Tento subtyp má tendenci rozvinout se v chronickou formu KE (Gritsun *et al.*, 2003). Evropský subtyp je typický svým dvoufázovým průběhem. Pro první (viremickou) fázi jsou charakteristické příznaky podobné chřipce, které se objevují nečekaně - náhlé zvýšení teploty (38-39°C), nevolnost doprovázená zvracením a celková slabost (Grešíková *et Kaluzová*,

1997). Během této fáze nejsou zjevné žádné známky poškození CNS. Poté následuje 2 až 10denní období, kdy se zvýšená teplota vrací k normálu a zcela vymizí ostatní příznaky. Asi u třetiny infikovaných se infekce projeví až druhou fází onemocnění. Ta je charakterizovaná horečkou o 1-2 °C vyšší než v první fázi. V této fázi jsou již zjevné příznaky meningitidy či meningoencefalitidy (bolesti hlavy, zvracení, svalový třes, poruchy spánku a soustředění (Gritsun *et al.*, 2003). Ve srovnání se subtypem Dálný východ je infekce evropským subtypem obvykle mírnější a většinou bez následků. Onemocnění bývá u dětí mírnější než u dospělých, zvláště těžce probíhá u osob starších 60 let. Případy úmrtí se pohybují v rozsahu 1-2 % (Burke *et Monath*, 2001, Dumpis *et al.*, 1999, Gritsun *et al.*, 2003).

K onemocnění způsobené virem vrtivky dochází u člověka pouze vzácně. Většinou se jedná o laboratorní personál pracující s tímto virem. Klinický obraz nemoci u člověka je velmi podobný klinickému obrazu Evropského subtypu KE. Obvykle dochází k úplnému zotavení pacientů (Gritsun *et al.*, 2003).

Virus se dostává do těla hostitele během sání infikovaným klíštětem. V místě vstupu (nejčastěji kůže) se virus replikuje a poté je transportován pravděpodobně Langerhansovými buňkami (dendritické buňky imunitního systému) do spádových lymfatických uzlin (Chambers *et Diamond*, 2003). Zde dochází k další replikaci viru a k jeho šíření lymfatickým systémem do krve. Následně virus napadá orgány retikulo-endotelové soustavy (slezina, játra, kostní dřeň), což vede k primární viremické fázi, která je spojena s prvními příznaky onemocnění. Poté nastává sekundární viremická fáze, během níž virus napadá CNS a jsou již zjevné známky neurologického poškození (Haglund *et Günther*, 2003). Mechanismus, kterým virus naruší hematoencefalitickou bariéru není dosud znám (McMinn, 1997). Pravděpodobně by se mohlo jednat o transcytózu, pasivní difúzi (Haglund *et Günther*, 2003), či cestou přes čichový nerv (Avžič-Županc *et al.*, 1995).

Epidemiologie KE je úzce spjata s biologií a ekologií klíšťat. Pro člověka je vysoká pravděpodobnost nákazy virem klíšťové encefalitidy v lesích s hustou vegetací, kde je vysoká relativní vlhkost vzduchu a pro klíšťata proto ideální prostředí. V přírodě se virus udržuje v cyklu zahrnující přenašeče - klíšťata a hostitele (přirozený rezervoár) - malí obratlovci, zejména hlodavci. Klíště se může infikovat v kterémkoli stadiu vývoje (larva, nymfa, imago) sáním krve infikovaného hostitele nebo dochází k přenesení viru z matky na potomstvo (Danielová *et Holubová*, 1991). Nové poznatky prokázaly, že k přenosu viru KE může dojít při společném sání klíšťat (co-feeding) i když hostitel, na němž sají, nemá prokazatelnou



virémii (Labuda *et al.*, 1993). Ačkoli jiná zvířata, jako např. ptáci, vysoká zvěř, koně a krávy, také slouží jako hostitelé viru, pro přenos viru v přírodě mají zřejmě menší význam (Gritsun *et al.*, 2003).

*Ixodes ricinus* je dominantní druh klíštěte v Evropě a je to epidemiologicky nejdůležitější vektor pro evropský subtyp viru KE a viru vrtivky. Aktivita tohoto druhu je v období květen-červen a zaří-říjen. Subtyp Dálný východ a Sibiř jsou přenášeny hlavně klíštětem druhu *Ixodes persulcatus*, který tvoří 80-97% všech druhů klíšťat na Urale, Sibiři a ve východních oblastech Ruska. V severní Evropě dochází k překrytí těchto dvou druhů (Golovljova *et al.*, 2004) Další možná nákaza člověka virem KE je cestou konzumace nepasterizovaného kozího mléka. Experimentálně bylo prokázáno, že virus klíšťové encefalitidy může být izolován z kozího mléka a virus přežívá i v různých mléčných výrobcích, jako jogurty, sýry, máslo (Popov *et Ivanova*, 1968; Gritsun *et al.*, 2003;). K infekci virem klíšťové encefalitidy může dojít též při vdechnutí kontaminovaného aerosolu, např. v laboratořích, pravděpodobně přes čichový nerv (Avšič-Županc *et al.*, 1995).

**Tab.1:** Shrnutí jednotlivých subtypů viru klíšťové encefalitidy (Gritsun *et al.*, 2003; Charrel *et al.*, 2004; Gunther *et al.*, 2005)

Subtypy	Hl. vektor	Výskyt	Průběh onemocnění	Trvalé následky	Úmrtnost (%)
EVROPSKÝ	<i>I. ricinus</i>	Evropa	dvoufázový	nejsou časté	1-2
DÁLŇNÝ VÝCHOD	<i>I. persulcatus</i>	asijská část Ruska, Pobaltské republiky	jednofázový	vzácně	5-60
SIBIŘSKÝ	<i>I. persulcatus</i>	Ural, Sibiř, severní Evropa	částečně dvoufázový	časté, sklon k chronicitě	1-3

Pro onemocnění KE zatím neexistuje účinná léčba. Pacienti jsou převážně léčeni symptomaticky (podávání vitamínů, infuze, klid na lůžku). Nezbytná rekonvalescence trvá 4 až 6 týdnů a i poté se pacient musí vyvarovat po dobu několika měsíců větší fyzické i psychické zátěže (Gritsun *et al.*, 2003).

Nejúčinnější obranou před KE stále zůstává aktivní imunizace. V současnosti se využívá inaktivované vakcíny FSME-IMMUN produkovanou firmou Baxter. Další dostupnou vakcínou je Encepur německé firmy Behringwerke AG, která je užívána k očkování kojenců a dětí. V Rakousku se podařilo výrazně snížit případy onemocnění KE díky inaktivované vakcíně FSME-IMMUN (Süss, 2003, Barrett *et al.*, 2003).

## 2.2 Diagnostika klíčové encefalitidy

Stanovení diagnózy KE je leckdy složitá záležitost vzhledem k rozdílnému průběhu onemocnění. Proto je nutné stanovit diagnózu na základě laboratorních testů.

V současnosti existují 2 rozdílné přístupy stanovení diagnózy KE (Donoso Mantke *et al.*, 2007):

1. přímý průkaz viru nebo virové RNA během počáteční (viremické) fáze infekce, nejčastěji pomocí izolace viru z buněčné kultury nebo metodou RT-PCR
2. nepřímý průkaz virově specifických protilátek sérologickými metodami, jakými jsou ELISA, IFA, virus-neutralizační test

U pacientů, u kterých je podezření na KE se nejčastěji provádí vyšetření krve a mozkomíšního moku. Vyšetření pomocí magnetické resonance a počítačové tomografie přináší pouze omezené výsledky a pro diagnostiku KE mají menší význam (Holzmann, 2003).

Při lumbální punkci lze obvykle prokázat zvýšený nitrolební tlak. Následný cytologický a biochemický rozbor mozkomíšního moku často odhalí mírně zvýšenou hladinu proteinů a pleocytózu (zmnožení buněk; 100-300 buněk/ $\mu$ l). Konkrétně se jedná o lymfocytózu s převahou neutrofilů, která obvykle přetrvává 3-6 týdnů, někdy ale i po dobu 3-4 měsíců. Hladina glukózy bývá v těchto případech normální. Problém s určením diagnózy může nastat v případě provedení lumbální punkce velmi brzy po počátku onemocnění, protože následný rozbor mozkomíšního moku často přináší normální nálezy. Co se týče vyšetření všech počtů krevních buněk, může často docházet k odhalení lymfocytózy – zejména se jedná o neutrofilie. Zvlášť je tomu tak na počátku onemocnění a často jsou tyto hladiny vyšší jak  $15\,000 \times 10^9/l$  (Dumpis *et al.*, 1999). V současnosti jsou také za časné rysy infekce virem KE považovány trombocytopenie a abnormální hladiny jaterních enzymů (Lotric, 1995).

Nejčastěji je laboratorní diagnostika KE založena na základě průkazu specifických IgM a IgG protilátek proti viru KE v séru nebo v mozkomíšním moku sérologickými metodami. Nejvíce užívána je metoda ELISA. IgM protilátky proti viru KE lze obvykle prokazovat na začátku druhé fáze onemocnění, přičemž nejvyšších hodnot dosahují po 2-6 týdnech. IgM protilátky mohou být též prokázány i několik měsíců po prodělané infekci, zatímco IgG protilátky přetrvávají celý život a zprostředkovávají imunitu chránící před reinfekcí. Specifické IgM protilátky v séru jsou přítomny u 97% pacientů, ale chybí u pacientů po pasivní imunizaci (Holzmann, 2003). Kromě přítomnosti specifických IgM

a IgG protilátek je další možností pro stanovení diagnózy KE průkaz intratekální produkce specifických protilátek v mozkomíšním moku, které jsou zde detekovány v důsledku poškození hematoencefalitické bariéry (Kaiser *et al.*, 2000). Lokální syntéza intratekálních protilátek obvykle koreluje s hladinou protilátek v séru (Dumpis *et al.*, 1999). Protilátky v mozkomíšním moku se mohou brzy po počátku nemoci nalézat pouze u 50% pacientů, avšak 10. den onemocnění jsou již intratekální protilátky detekovány u všech pacientů (Holzmann, 2003).

Důležité je načasování těchto sérologických testů, hlavně v případech, kdy se onemocnění objeví bez počáteční horečnaté fáze a protilátky nelze detekovat a jsou detekované až později. Proto se v těchto případech doporučuje testy opakovat 1 týden po počátku horečnaté fáze nemoci (Dumpis *et al.*, 1999). Ovšem nevýhoda diagnostiky KE pomocí sérologických metod tkví v tom, že virus KE je antigenně blízce příbuzný v rámci E proteinu s ostatními flaviviry, které způsobují onemocnění u člověka. Proto může docházet ke zkříženým reakcím protilátek indukovaných jinou flavivirovou infekcí – ať už se jedná o virus dengue, vakcinaci proti viru žluté zimnice či japonské encefalitidě. V současnosti v Evropě tento problém nabírá na důležitosti a to hlavně díky vzrůstající popularitě cestování do tropických a subtropických oblastí, ve kterých se zmíněné flaviviry objevují. Také narůstá počet vakcinovaných osob proti žluté zimnici a japonské encefalitidě. V těchto případech je proto nutné provést virus-neutralizační test, který buď potvrdí nebo vyvrátí pozitivní výsledek z ELISA testu (Dumpis *et al.*, 1999).

Další problém skýtá metoda ELISA v tom, že některá séra obsahují revmatoidní faktor, což jsou autoprottilátky namířené proti vlastním imunoglobulinům. Tato séra proto mohou občas dávat falešně pozitivní výsledek. Frekvence revmatoidního faktoru v populaci je cca 3%. K případům stanovení chybné diagnózy na základě přítomnosti revmatoidního faktoru dochází u právě probíhající KE, protože revmatoidní faktor má vliv pouze na protilátky typu IgM, které se formují na počátku onemocnění, ale vliv na IgG již nemá. Proto je u případů, kdy jsou séra pozitivní na IgM protilátky, ale ne na IgG, vysoká pravděpodobnost falešně pozitivního výsledku díky revmatoidnímu faktoru, protože séra pacientů s diagnózou KE testovaná na počátku onemocnění jsou pozitivní jak na protilátky IgM, tak i na IgG (Hofmann *et al.*, 1978).

V posledních letech dochází k rozvinutí molekulárních metod pro určení správné diagnózy KE. Jednou z těchto metod je RT-PCR. Tato velmi citlivá metoda umožňuje detekci virové RNA na základě amplifikace specifického úseku genomu za použití 2 genově specifických oligonukleotidových primerů. RT-PCR je úspěšně využívána pro detekci RNA

KE v epidemiologii infekčních klíšťat a při vyšetřování virémie u zvířecích hostitelů. V těchto případech se využívá primerů z 5' nekódující oblasti a 5' terminální oblasti kódující C protein, které jsou vysoce konzervované (Ramelow *et al.*, 1993; Whitby *et al.*, 1993). Metoda RT-PCR se ukázala jako velice užitečná při rozlišení zástupců jednotlivých subtypů KE, a to na základě unikátní kombinace oligonukleotidových primerů zacílených na subtypově specifické oblasti proteinu E (Růžek *et al.*, 2007). RT-PCR také jako rychlá a citlivá metoda může běžně nahradit klasickou metodu izolace viru pomocí inokulace do mozků novorozených myšek a tím omezuje použití experimentů na zvířatech (Puchhammer-Stöckl *et al.*, 1995). RT-PCR může prokázat virově specifickou RNA s detekčním limitem 100-1000 kopií v séru během první (viremické) fáze nemoci, pravděpodobně ještě před objevením specifických protilátek proti KE. Vzorky mozkomíšního moku odebrané ještě před objevením specifických protilátek se ukazují jako nevhodné pro molekulární diagnostiku pomocí RT-PCR (Saskida *et al.*, 2005)

U vzácných smrtelných případů KE je možné virus posmrtně detekovat či izolovat pomocí RT-PCR z mozku či jiných orgánů (Tomažič *et al.*, 1997).

Metoda real-time RT-PCR jako další z metod molekulární diagnostiky, která je schopná detekovat a kvantifikovat virovou RNA. Princip real-time RT-PCR spočívá v reverzní transkripci následovanou PCR amplifikací za využití např. dvojité značené TaqMan sondy, která obsahuje na 5' konci fluorescenční zářič (reporter) a na 3' konci fluorescenční zhášec (quancher). Během PCR je TaqMan sonda rozštěpena 5'-3' nukleázovou aktivitou TaqDNA polymerázy a odštěpení zářiče vyústí ve zvýšení fluorescence, která je přímo úměrná hromadění PCR produktů. Výhodou real-time RT-PCR je její jednoduché provedení a mimo jiné i použití vnitřní kontroly během real-time RT-PCR sloužící ke kontrole výskytu případných falešně negativních výsledků. Real-time RT-PCR též dovoluje detekci všech subtypů KE. Detekční limit je pod 10 kopií RNA, z toho tedy vyplývá, že jde o velice citlivou metodu. Tento parametr má velký význam, protože množství viru přítomného v krvi může být v době provádění testu nižší. Dále lze tuto metodu úspěšně využít k detekci RNA KE v klíšťatech (Schweiger *et Cassinotti*, 2003; Dyer *et al.*, 2007).

U vážných případů úmrtí na KE lze virus prokázat v CNS pomocí elektronové mikroskopie. V thalamu byly nalezeny partikule o průměru 40 nm. Virové partikule byly také nalezeny v cytoplasmě nervových buněk v substantia nigra, v mozečku a v porušených neutrofilech (Mázló *et Szantó*, 1978).

**Tab.2:** Shrnutí výhod a nevýhod sérologických a molekulární metod při stanovování diagnózy klíšťové encefalitidy (Donoso Mantke *et al.*, 2007 – upraveno)

<b>Metody</b>	<b>Výhody</b>	<b>Nevýhody</b>
<b>SÉROLOGICKÉ</b>	<p>Spolehlivé určení diagnózy na základě průkazu specifických protilátek v séru a v mozkomíšním moku během druhé fáze nemoci</p> <p>Komerčně dostupné kity</p>	<p>Během 1.viremické fáze nelze detekovat specifické protilátky proti viru klíšťové encefalitidy</p> <p>Zkřížená reaktivita protilátek blízce příbuzných flavivirů</p> <p>Falešně pozitivní výsledky díky přítomnosti revmatoidního faktoru</p>
<b>MOLEKULÁRNÍ</b>	<p>Stanovení včasné diagnózy detekcí virové RNA během první fáze onemocnění</p> <p>Určení konkrétního subtypu viru klíšťové encefalitidy a díky tomu včasné zahájení vhodné léčby</p> <p>Možnost kvantifikovat i malá množství viru</p>	<p>Během 2.fáze, kdy se již virus nenachází v krvi nelze již virovou RNA detekovat</p> <p>Školený laboratorní personál</p>

## 3. MATERIÁL A METODY

### 3.1. Virus

Jako modelový klinický vzorek byla použita mozková suspenze myší infikovaných virem KE. Konkrétně se jednalo o český prototypový kmen KE Hypr, který byl izolován v Brně v roce 1953 z krve desetiletého infikovaného dítěte (Pospíšil et al., 1954). Virus byl mnohonásobně pasážován přes mozky sajících myší a uchován ve formě 20% mozkové suspenze (w/v). Přesný počet pasáží není známý. Kompletní sekvence genomu kmene Hypr je uložena pod přístupovým číslem X75286 v databázi GenBank.

### 3.2. Metody přípravy templátu pro RT-PCR a real-time PCR

#### 3.2.1. Purifikace virové RNA pomocí kitu *QIAamp® Viral RNA Mini Kit* (QIAGEN)

Izolace byla provedena přesně podle firemního protokolu. 20 µl infikované mozkové suspenze (modelový vzorek,  $3,3 \times 10^7$  PFU/ml) bylo v mikrozkuhavce smícháno s AVL pufrům obsahující RNA carrier, který zajistí adsorbci virové RNA na speciální silikagelovou membránu v kolonce. Poté následuje vymývání kontaminant pomocí dvou různých pufrů AW1 a AW2. Nakonec byla virová RNA eluována z kolonky pomocí 60 µl elučního pufru AVE (RNaze free) do mikrozkuhavky a následně uložena do  $-70$  °C.

#### 3.2.2. Purifikace virové RNA pomocí kitu *RTP® DNA/RNA Virus Mini kit* (Invitex)

Izolace byla provedena přesně podle firemního protokolu. 20 µl infikované mozkové suspenze byla v mikrozkuhavce smícháno s vázacím roztokem. Poté byl vzorek vymýván pufrů R1 a R2 a následně byla virová RNA eluována do sterilní mikrozkuhavky pomocí 60 µl elučního pufru R. Mikrozkuhavka s izolovanou RNA byla uložena do  $-70$  °C.

### 3.2.3 Izolace RNA pomocí fenol – chloroformové metody – TRI REAGENT™ (Sigma Aldrich)

Izolace byla provedena podle firemního protokolu. 20 µl infikované mozkové suspenze bylo smícháno s TRI REAGENT (jedná se o komerčně dostupný roztok složený z denaturačního pufru – obsahující guanin thyokyanát a fenol). Následně byl přidán chloroform a centrifugací 15min při 12 000 x g se suspenze rozdělila na tři fáze. Horní vodní bezbarvá fáze obsahovala RNA, která byla odsáta do nové mikrozkušavky a precipitována pomocí isopropanolu. Poté byl vzorek opakovaně promýván ethanolem, vysušen na vzduchu, rozpuštěn v 50 µl vody a následně uchován v -70 °C.

### 3.2.4. Opracování vzorku pomocí chelexu

Pro opracování vzorku byl použit pufr Chelex (BioRad Chelex® 100 Resin). Pufr sám o sobě nepurifikuje virovou RNA, ale vytváří komplexy s nežádoucími inhibitory PCR reakce.

Byl použit 5% roztok Chelexu v TE pufru ( 5g Chelexu rozpustit v 95 ml TE pufru pH 8,0 [10mM Tris.Cl, pH 8,0 a 1 mM EDTA, pH 8,0]). Vzniklý roztok byl přidán do 1,5 ml mikrozkušavek s mozkovou suspenzí – pro optimalizaci protokolu bylo zvoleno množství 25 µl a 50 µl chelexového roztoku / 20 µl mozkové suspenze. Následně byly vzorky inkubovány po dobu 2, 3, 4 hodin při 56 °C. Poté byly vzorky promíchány vortexováním a následně inkubovány 15 min při 70 °C. Vzorky byly dále krátce centrifugovány a vzniklý supernatant byl uložen do – 70 °C pro další použití pro RT-PCR.

## **3.3. Dvoukroková RT-PCR**

### 3.3.1. Reverzní transkripce (RT)

Reverzní transkripce vzorku virové RNA byla provedena pomocí kitu *RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit* (Fermentas) přesně podle firemních instrukcí. Byl použit odpovídající primer E(R) (viz tabulka). Kit je schopen převést templátovou RNA na

cDNA vlákno. Využívá k tomu speciálně geneticky upravenou reverzní transkriptázu (Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase), která nemá aktivitu RNázy H. Reakční směs byla dále využita jako templát pro amplifikaci pomocí PCR a uchována při  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 3.3.2. PCR

Pro amplifikaci bylo jako templátu použito 2  $\mu\text{l}$  reakční směsi připravené předchozí metodou RT. K templátu bylo přidáno 12,5  $\mu\text{l}$  PPP Master Mix (Top-Bio [2x koncentrovány: 150 mM Tris-HCl, pH 8,8, 40 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,02% Tween 20, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 400  $\mu\text{M}$  dATP, 400  $\mu\text{M}$  dCTP, 400  $\mu\text{M}$  dGTP, 400  $\mu\text{M}$  dTTP, 100 U/ml Taq-Purple DNA polymerázy, stabilizátory a aditiva]), po 1  $\mu\text{l}$  od obou primerů (viz Tabulka). Reakční směs byla doplněna do 20  $\mu\text{l}$  deionizovanou vodou.

Následná amplifikace probíhala v automatickém termálním cycleru (Master cycler, Eppendorf) dle následujících podmínek: denaturace 5 min při  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  a 30x opakovaný cyklus složený z denaturace 30 s při  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ , annealing 30 s při  $48\text{ }^{\circ}\text{C}$  a elongace 1 min při  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Poté byla teplota udržována při  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Vzniklé produkty byly separovány v 1% agarozovém gelu (1% agaróza v 1x TAE pufru [1x pracovní roztok: 40 mM Tris-acetát, 2 mM EDTA; 50x zásobní roztok: 242 g Tris base, 57,1 ml ledové kyseliny octové, 37,2 g  $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , pH 8,5,  $\text{H}_2\text{O}$  ad 1000 ml]) a zviditelněny barvivem SYBR Green v 5x loading dye (Molecular probes). Vzorky byly nanášeny do jamek gelu a byla provedena elektroforéza (100 V, 50 min). Poté byl gel pozorován při osvětlení UV zářením na transluminátoru Biometra TI3.

**Tab:** Charakteristika použitých primerů

Název primeru	Sekvence	Teplota annealingu [ $^{\circ}\text{C}$ ]	Pozice v genomu
E (F)	5´- GGG GAC YAC GAG GGT YAC CT -3´	48	1409-1429
E (R)	5´- CCG TTG GAA GGT GTT CAA CT- 3´	48	1587-1607



### 3.4. Real- time RT-PCR

Reakční směs pro real-time PCR byla připravena z 12,5 µl qPCR 2x Master Mix (Top-Bio [2x koncentrovaný: 20 mM Tris-HCl, pH 8,8, 100 mM KCl, 0,2% Triton X-100, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 400 µM dATP, 400 µM dCTP, 400 µM dGTP, 400 µM dTTP, 50 U/ml Taq DNA polymerázy, 38nM monoklonální anti-Taq DNA polymeráza, stabilizátory a aditiva]) po 1 µl od obou primerů (viz Tabulka), 9,4 µl deionizované vody. K směsi byla přidána hydrolyzační dvojitě značená sonda typu TaqMan<sup>®</sup> (Hypr TaqMan 5'-AAC GCC ACT AGC GAC CCT ACA CAA CAG A-3')

Byla vytvořena desítková ředící řada z modelové cDNA kmenu Hypr, jejíž koncentrace v počtech kopií nebyla známa, ale výsledné hodnoty vycházející z kalibrační křivky byly odvozeny z porovnání relativního počtu kopií a titru viru v hodnotách PFU. Jednotlivé vzorky desítkové ředící řady byly prováděny v triplikacích. Podle analýzy ředících řad bylo možné odvodit koncentrace jednotlivých vzorků.

PCR reakce byla provedena v real-time termocykleru Rotor Gene 3000 (Corbett Research). Amplifikační program se skládal z počáteční denaturace 7 min při 95 °C a 40 cyklů tvořených prvním krokem – denaturace 15 s při 95 °C a druhý krokem – 50 s při 61 °C (nasedání primerů a sondy, syntéza nového řetězce a hydrolýza sondy). Odečet fluorescence byl prováděn na konci každého cyklu.

Výsledky real-time PCR byly zpracovány pomocí software Rotor Gene 5.0 (Corbett Research).








## 4. VÝSLEDKY

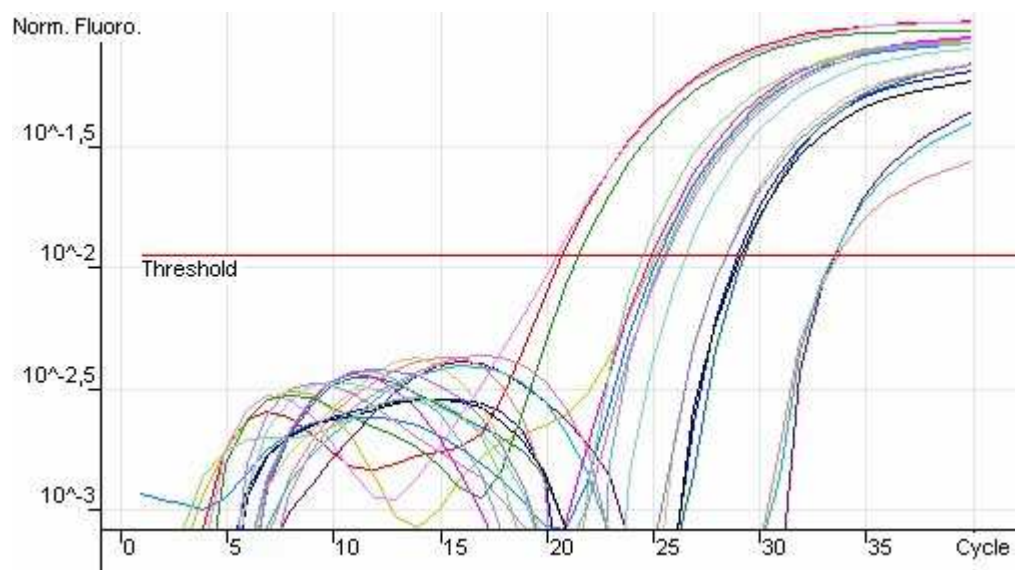
### 4.1. Optimalizace protokolu pro opracování vzorku pomocí Chelex® 100 Resin (BioRad)

Pokus o nalezení vhodné kombinace časových úseků inkubace a množství chelexu za účelem přípravy templátu pro RT-PCR a real-time PCR ukazuje Obr. 1 a Tab.1. Je zde znázorněna analýza jednotlivých vzorků mozkové suspenze opracovaných různým množstvím chelexu v kombinaci s rozdílnou dobou inkubace při 56 °C - inkubace 2 hodiny s použitím 25 µl a 50 µl, inkubace 3 hodiny s použitím 25 µl a 50 µl, inkubace 4 hodiny s použitím 25 µl a 50 µl. Z těchto šesti vzorků byl z hlediska účinnosti – tedy s nejvyšším detekovaným relativním počtem kopií virové RNA nejlépe vyhodnocen vzorek 50µl chelexu / 20 µl mozkové suspenze inkubován 2 h při 56 °C s následnou inkubací 15 min při 70 °C. Z Obr 1. se jednoznačně pro větší výtěžnost jeví coby nejlepší využití většího množství chelexu. Stanovení vhodné kombinace časových úseků inkubace a množství chelexu pro metodu opracování vzorku pomocí chelexu nelze s jistotou předpovědět.

**Tab. 1:** Výsledek real-time PCR

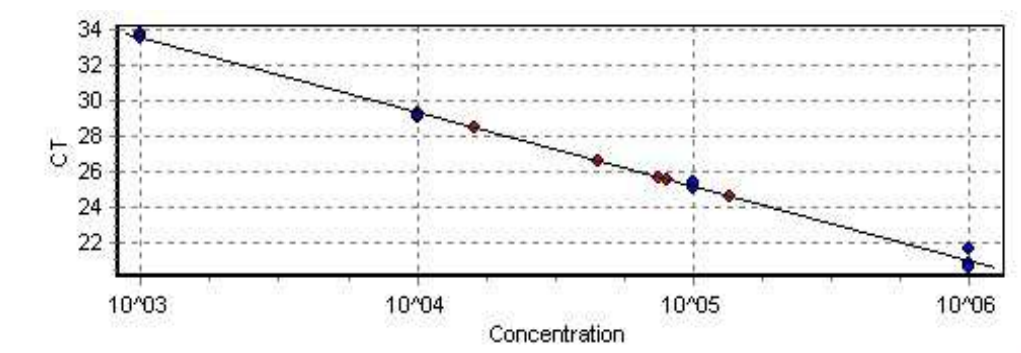
No.	Barva	Název	Typ	Ct	Zadaná konc. (Kopie)	Zjištěná konc. (Kopie)	% Var
1		konc. A	Standard	20,83	1 000 000	1 085 703	8,6%
2		-1 A	Standard	25,25	100 000	95 382	4,6%
3		-2 A	Standard	29,00	10 000	12 102	21,0%
4		-3 A	Standard	33,59	1 000	969	3,1%
5		konc. B	Standard	20,58	1 000 000	1 245 851	24,6%
6		-1 B	Standard	25,36	100 000	89 685	10,3%
7		-2 B	Standard	29,34	10 000	10 054	0,5%
8		-3 B	Standard	33,75	1 000	884	11,6%
9		konc.C	Standard	21,60	1 000 000	711 969	28,8%
10		-1 C	Standard	25,04	100 000	107 391	7,4%
11		-2 C	Standard	29,19	10 000	10 905	9,0%
12		-3 C	Standard	33,54	1 000	994	0,6%

No.	Barva	Název	Typ	Ct	Zadaná konc. (Kopie)	Zjištěná konc. (Kopie)	% Var
13		ch 2h/25µl	vzorek	28,47		16 220	
14		ch 2h/50µl	vzorek	24,60		136 762	
15		ch 3h/25µl	vzorek	26,61		45 076	
16		ch 3h/50µl	vzorek	25,56		80 337	
17		ch 4h/25µl	vzorek	28,47		16 199	
18		ch 4h/50µl	vzorek	25,67		75 637	
19		Neg kontrol	Neg.kontrola				



R	0,99843
R <sup>2</sup>	0,99687
M	4,183
B	46,079
Efficiency	0,73

### Kalibrační křivka



**Obr. 1:** Profil real-time PCR reakce


















## 4.2. Porovnání jednotlivých metod opracování vzorku

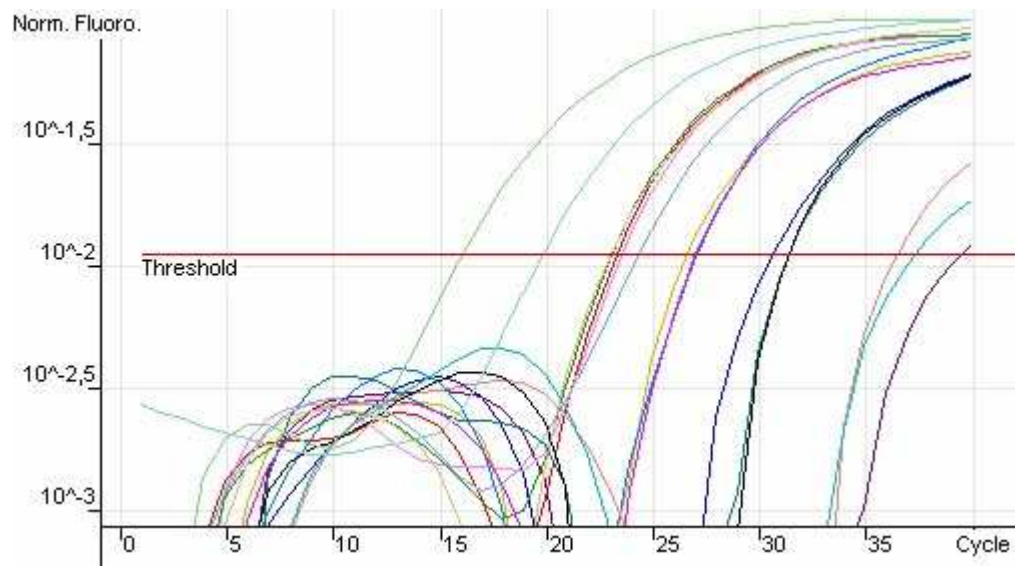
Opracování vzorku pro přípravu templátu na RT-PCR a real-time PCR bylo prováděno čtyřmi různými metodami:

- Purifikace RNA pomocí kitu *QIAamp® Viral RNA Mini Kit* (QIAGEN)
- Purifikace RNA pomocí kitu *RTP® DNA/RNA Virus Mini kit* (Invitek)
- Izolace RNA pomocí TRI REAGENT™ (Sigma Aldrich)
- Opracování vzorku pomocí Chelex® 100 Resin (BioRad)

Obr. 2 a Tab. 2 ukazuje analýzu těchto metod pomocí real-time PCR reakce. Z těchto metod byla podle nárůstu fluorescence vyhodnocena jako nejúčinnější – tedy s nejvyšším relativním počtem kopií virové RNA v námi sledovaném vzorku metoda purifikace pomocí kitu *RTP® DNA/RNA Virus Mini kit* (Invitek). Druhou nejvyšší účinnost a tedy vysoký relativní počet kopií RNA detekovaných ve vzorku měla adaptovaná fenol-chloroformová metoda pomocí roztoku TRI REAGENT™ (Sigma Aldrich). Metoda purifikace RNA pomocí kitu *QIAamp® Viral RNA Mini Kit* (QIAGEN) ukázala podle počtu kopií ztráty virové RNA. Jako nejméně vhodná metoda vykazující největší ztráty virové RNA byla vyhodnocena metoda opracování vzorku chelexem.

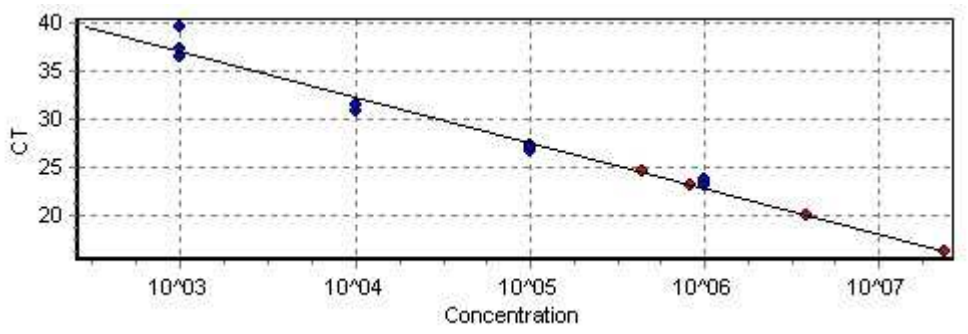
**Tab. 2:** Výsledek real-time PCR

No.	Barva	Název	Typ	Ct	Zadaná konc.(Kopie)	Zjištěná konc.(Kopie)	% Var
1		konc A	Standard	23,38	1 000 000	725 413	27,5%
2		-1 A	Standard	26,66	100 000	148 229	48,2%
3		-2 A	Standard	30,74	10 000	20 603	106,%
4		-3 A	Standard	39,58	1 000	286	71,4%
5		konc B	Standard	23,63	1 000 000	644 622	35,5%
6		-1 B	Standard	27,17	100 000	116 110	16,1%
7		-2 B	Standard	31,47	10 000	14 449	44,5 %
8		-3 B	Standard	36,54	1 000	1247	24,7%
9		konc C	Standard	23,15	1 000 000	813 044	18,7%
10		-1 C	Standard	27,11	100 000	119 228	19,2%
11		-2 C	Standard	31,46	10 000	14 516	45,2%
12		-3 C	Standard	37,37	1 000	833	16,7%
13		cDNA Quigen	Unknown	23,09		836 318	
14		cDNA Invitek	Unknown	16,18		23 698 376	
15		cDNA TriR	Unknown	19,93		3 848 204	
16		cDNA Chelex	Unknown	24,44		434 216	
17		neg.kontrol	Neg.kontrola				



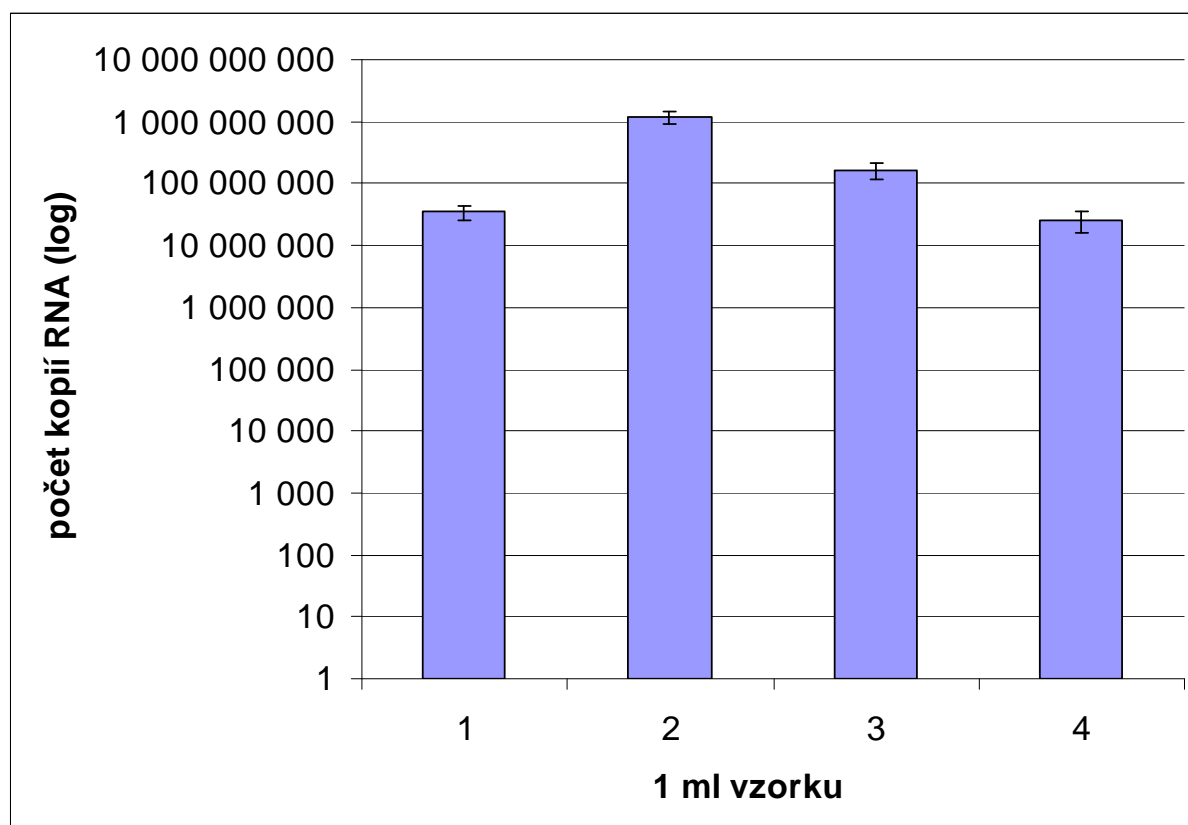
R	0,99099
R <sup>2</sup>	0,98188
M	4,462
B	49,974
Efficiency	0,68

Kalibrační křivka



**Obr. 2:** Profil real-time PCR reakce

Graf 1 ukazuje porovnání jednotlivých metod přípravy templátu pro RT-PCR a real-time PCR z hlediska výtěžnosti. Z tohoto grafu se jednoznačně jeví jako neúčinnější metoda purifikace RNA pomocí kitu *RTP® DNA/RNA Virus Mini kit* (Invitek), která měla 45x vyšší výtěžnost než metoda chelexového opracování vzorku pomocí *Chelex® 100 Resin* (BioRad), která měla nejnižší výtěžnost a jeví se jako nejméně vhodná metoda. Metoda přípravy templátu pomocí kitu *QIAamp® Viral RNA Mini Kit* (QIAGEN) měla 34x nižší výtěžnost než kit *RTP® DNA/RNA Virus Mini kit* (Invitek) a vykazuje tedy druhou nejnižší výtěžnost. Adaptovaná fenol-chloroformová metoda *TRI REAGENT™* (Sigma Aldrich) měla druhou nejvyšší výtěžnost a měla tedy 7x výtěžnost než metoda purifikace RNA pomocí kitu *RTP® DNA/RNA Virus Mini kit* (Invitek).



**Graf 1:** Množství kopií virové RNA ve vzorku detekované různými metodami purifikace či jiné přípravy templátu pro RT-PCR a real-time PCR. **1** - *QIAamp® Viral RNA Mini Kit* (QIAGEN), **2** - *RTP® DNA/RNA Virus Mini kit* (Invitek), **3** - *TRI REAGENT™* (Sigma Aldrich), **4** - *Chelex® 100 Resin* (BioRad). Hodnoty jsou vyneseny jako průměrný počet kopií virové RNA v 1 ml vzorku ± střední chyba průměru.

## 5. DISKUZE

Pro správné laboratorní stanovení diagnózy KE je třeba brát ohled na zvolený způsob metody přípravy templátu pro RT-PCR a real-time PCR z klinických vzorků. Protože, jak bylo prokázáno metodou real-time PCR, různé izolační metody sebou nesou různé množství ztrát virové RNA, které mohou v případě nízkého titru viru vést až k falešně negativním výsledkům. Je nutné postupovat tak, aby nedošlo k degradaci RNA všudypřítomnými RNázami, které jsou velmi odolné.

Fenol-chloroformová metoda (TRI REAGENT<sup>TM</sup>) předchází degradaci vzorku pomocí lyzačního pufru. Ten je složen z chaotrofního činidla – konkrétně guanidium isothyokyanátu. Jedná se o silný detergent, díky němuž zůstává RNA stabilní po velmi dlouhou dobu a umožňuje tak paralelního zpracování většího počtu vzorků, což je výhodou této metody. Nevýhodou je jednoznačně pracnost a časová náročnost této metody (častá centrifugace a inkubace), což může být zdrojem kontaminací. Přestože měla tato metoda podle nárůstu fluorescence v real-time PCR druhou nejlepší účinnost, pro klinickou praxi je podle mého mínění nevhodná, zejména kvůli pracnosti.

Metoda opracování vzorku pomocí Chelex® 100 Resin je nenáročná a jednoduchá. Použitím chelexu nedochází k purifikaci RNA, ale chelex vytváří komplexy s nežádoucími inhibitory PCR reakce. Pro izolaci NK z forenzního materiálu je tato metoda ideální (Walsh et. al.,1991), též se ukázala být účinná při detekci RNA KE v klíčátech (Rudenko *et al.*, 2004). Avšak pro mikrobiologickou diagnostiku je z hlediska účinnosti jeví jako méně vhodná, jelikož při ní dochází k značným ztrátám virové RNA, jak bylo prokázáno metodou real-time PCR, kdy vzorek vykazoval nejmenší množství kopií virové RNA. Ukázalo se, že je zcela zbytečné inkubovat vzorek v chelexovém pufru přes noc při 56 °C, stejných výsledků se dosahovalo už při kratších časových intervalech. Množství použitého chelexu také hraje svou roli, zřejmě je vhodné přihlížet k velikosti/množství vzorku, z kterého chceme NK izolovat.

Komerčně dostupné kity pro izolaci virové RNA *QIAamp® Viral RNA Mini Kit* (QIAGEN) a *RTP® DNA/RNA Virus Mini kit* (Invitek) využívající kolonkový purifikační systém se jeví jako ideální izolační metody. *RTP® DNA/RNA Virus Mini kit* (Invitek) jednoznačně dosahoval nejlepších výsledků, co se týče účinnosti, tak i postupem provedení.



Kit využívá tzv. RTP® technologii (RTP – Ready To Prep). Jedná se o inovační, čas šetřící technologii, jejíž specifickým rysem je použití extrakční zkumavky obsahující předem připravené lyzační nechaotropní činidlo v pevné formě (bílá zrnka). Další výhodou tohoto kitu je značné snížení jednotlivých kroků purifikace a tím zkrácení času zpracování vzorku, díky předem připravených činidel. Z hlediska účinnosti byla tato metoda shledána nejvíce vhodnou, protože vykazovala velmi vysokou účinnost podle nárůstu fluorescence při analýze vzorků metodou real-time PCR. Z toho vyplývá, že se jedná o metodu velmi citlivou, dovolující velmi citlivou detekci viru. Purifikovaná RNA byla získána v řádech desítek minut, díky tomu se tato metoda jeví jako ideální pro použití v diagnostické praxi.

*QIAamp® Viral RNA Mini Kit* (QIAGEN) byl z hlediska pracovního postupu poměrně jednoduchý. Technologie kitu je založena na selektivních vlastnostech QIAamp® silikagelové membrány umístěné v kolonce. Díky tomu se vyhýbá použití fenol/chloroformové extrakci a alkoholové precipitaci, což je jeho jednoznačnou výhodou. Za další výhodu lze považovat fakt, že je purifikovaná RNA bez proteinů, nukleáz a dalších kontaminací a inhibitorů. Bohužel tato metoda prokázala ztráty virové RNA a má tedy menší účinnost. Přesto je ale pro rutinní diagnostickou praxi celkem vhodná, hlavně díky své nenáročnosti a možnosti získat purifikovanou RNA již během 30 minut. Navíc je ideální pro současné zpracování většího počtu klinických vzorků v čase.

**Tab.1:** Shrnutí výhod a nevýhod jednotlivých metod přípravy templátu pro RT-PCR a real-time PCR

<b>Metoda</b>	<b>Výhody</b>	<b>Nevýhody</b>
<i>QIAamp® Viral RNA Mini Kit</i> (QIAGEN)	<ul style="list-style-type: none"> <li>– jednoduché a rychlé provedení</li> <li>– žádná organická extrakce nebo alkoholová precipitace</li> <li>– výsledná RNA bez kontaminantů a inhibitorů</li> </ul>	- nízká účinnost a výtěžnost
<i>RTP® DNA/RNA Virus Mini kit</i> (Invitex)	<ul style="list-style-type: none"> <li>– citlivá metoda</li> <li>– velmi vysoká účinnost a výtěžnost</li> <li>– jednoduché a rychlé provedení</li> </ul>	
TRI REAGENT™ (Sigma Aldrich)	<ul style="list-style-type: none"> <li>– citlivá metoda</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– pracnost a časová náročnost provedení</li> <li>– zvýšené riziko kontaminací</li> </ul>
Chelex® 100 Resin (BioRad)	<ul style="list-style-type: none"> <li>– jednoduchý a nenáročný postup</li> <li>– ideální pro zpracování materiálu forezního původu</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– velmi nízká účinnost a výtěžnost</li> <li>– časová náročnost</li> </ul>

V současnosti se ukazují jako nejefektivnější metodou pro stanovení správné diagnózy KE metody stanovení specifických protilátek – zejména nejčastěji používaná metoda ELISA. Vzhledem k tomu, že v dnešní hektické době lidé nevěnují pozornost svému zdravotnímu stavu a ve valné většina případů vyhledají lékařskou pomoc, až když už jsou u nich zjevné známky neurologického poškození. Též nelze opomenout nový systém placeného zdravotnictví, kdy infikovaní považují první symptomy za běžné nachlazení a raději než by navštívili lékaře a museli platit za vyšetření, spokojí se s volně prodejnými léky a lékařskou pomoc vyhledají až v druhé fázi onemocnění.

Metoda RT-PCR se na první pohled může jevit jako ideální. Avšak právě proto, že je schopna detekovat virovou RNA z patientských vzorků jen během první viremické fáze, nenachází v klinické praxi širšího uplatnění. Jedním z důvodů je i to, že jen minimum infikovaných postřehne přisáté klíště a poté nevěnují pozornost změnám ve svém zdravotním stavu.

Velmi prospěšné je využití RT-PCR v epidemiologii, kdy se detekuje virová RNA přímo v klíšťatech. Je otázkou, zda-li je výhodné využívat RT-PCR jako prognostickou metodu při určování infekčnosti klíšťat po vyjmutí z kůže lidí či domácích zvířat, tak jako ji používají některé firmy (např. Gen-Trend, s.r.o., České Budějovice). To, že v klíštěti detekujeme virovou RNA, ještě neznamená 100% jistotu onemocnění KE a naopak. Navíc pro tyto účely se využívá na opracování vzorku chelex, který vykazuje ztráty virové RNA a problém též nastává, pokud klíště obsahuje větší množství krve. V té jsou pak vyšší titry inhibitorů PCR reakce, které už chelexové částice nedokáží adsorbovat.

Dalším problémem při určování správné diagnostiky KE, je v současné době široká geografická disperze tohoto viru a to hlavně díky narůstající oblíbenosti turistiky. Díky různým klinickým projevům je leckdy obtížné KE odlišit od nemocí, které způsobují též meningitidu nebo encefalitidu – např. mezi možné další infekce důležité z hlediska diferenciální diagnostiky KE řadíme pyogenní meningitidu, leptospirální meningitidu či herpetickou encefalitidu. Záměna těchto nemocí může mít neblahé následky na zdraví pacientů. Problémy nastávají hlavně v oblastech, kde KE není endemická a kde se onemocnění pravděpodobně objevilo od turistů navracejících se z oblastí typických pro výskyt KE (Dumpis et al., 1999). Také je nutné rozpoznat klíšťovou encefalitidu od dvou patogenů, které jsou též přenášeny klíšťaty – jedná se o *Borrelia* sp. a *Ehrlichia* sp. Tyto patogeny se mohou geograficky překrývat s virem klíšťové encefalidity (Dumler et al., 1997) a stejně jako virus KE napadají CNS člověka.

Všeobecně je třeba v diagnostice virových patogenů přihlížet na množství rizik, které

s sebou nesou jednotlivé metody detekce virové nukleové kyseliny. Především se jedná o zvýšené riziko kontaminací, ty mohou mít za následek falešně negativní výsledek. Též je třeba přihlížet na citlivost zvolené metody, která může do podstatné míry ovlivnit výsledek a tím i konečnou diagnózu pacienta.

V mikrobiologické diagnostice lze v současnosti zakoupit pro řadu patogenů komerční kity, které se pro rutinní laboratorní diagnostiku jeví jako ideální, hlavně vzhledem k jednoduchému provedení s možností simultánního zpracování většího množství vzorků. Avšak úspěšnost těchto kitů záleží do značné míry na metodě počáteční přípravy templátu, na což se často zapomíná. Ideální metoda přípravy templátu by měla být dostatečně citlivá, s vysokou účinností, s minimální pravděpodobností kontaminací a na provedení jednoduchá a rychlá. To v našem případě stanovení diagnózy KE do jisté míry splňovala metoda přípravy templátu pomocí purifikace RNA pomocí kitu *RTP® DNA/RNA Virus Mini kit* (Invitex).

## 6. ZÁVĚR

Dle získaných výsledků se potvrdilo, že zvolená metoda přípravy templátu pro RT-PCR a real-time za účelem detekce virové RNA může mít značný vliv na výsledek laboratorního vyšetření a stanovení správné diagnózy KE. Pokud použijeme metodu s nízkou výtěžností, jako se ukázala mít metoda opracování vzorku *Chelexem*® 100 Resin (BioRad), dochází při ní ke značným ztrátám virové RNA, což může mít za následek falešně negativní výsledek a následný dopad na chybně stanovenou diagnózu. Pro diagnostickou praxi je proto tato metoda nevhodná.

Pro rutinní laboratorní mikrobiologickou diagnostiku se jako nejvhodnější jeví využití komerčně dostupných kitů – konkrétně nejlepších výsledků dosahoval kit *RTP*® *DNA/RNA Virus Mini kit* od firmy Invitek. Svou výtěžností jednoznačně vynikal nad ostatními metodami a neshledali jsme u něj zásadní nevýhody.

## 7. LITERATURA

**Avžič- Županc T., Poljak M., Matičič M., Radšel- Medvešček A., LeDuc J.W., Stiašny K., Kunz C., Heinz F.X., 1994.** Laboratory acquired tick-borne meningoencephalitis; Characterisation of virus strain. *Clinical and Diagnostic Virology* 4: 51-59.

**Barrett N.P., Schober-Bendixen S., Ehrlich H.J., 2003.** History of TBE vaccine. *Vaccine* 21: S1/41-S1/49.

**Burke D.S., Monach T.P., 2001.** Flaviviruses. In: Knipe, D.M., Howley, P.M. (Eds.), *Fields Virology*, vol. 1. Lippincott Williams & Wilkins, London, New York, Tokyo, str. 1043–1125.

**Calisher C.H., Gounld. E. A. , 2003.** Taxonomy of the virus family *Flaviviridae*. *Advances in Virus Research* 59: 1-19.

**Chambers T. J., Diamond M. S. 2003.** Pathogenesis of flavivirus encephalitis. *Advances in Virus Research* 60: 273-342.

**Chambers T. J., Rice C. M., 1987.** Molecular biology of the flaviviruses. *Microbiological Sciences* 4: 219-223.

**Charell R.N., Attoui H., Butelko A.M., Clegg J.C., Deubel V., Frolova T.V., Gould E.A., Gritsun T. S., Heinz M., Labuda M., Lashkevich V. A., Loktev V , Lundkvist A., Lvov D. V., Mandl C. W., Niedrig M., Papa A., Petrov V. S., Plyusnin A., Randolph S., Süss J., Zlobin V. I., de Lamballerie X., 2004.** Tick-borne virus diseases of human interest in Europe. *Clinical Microbiology and Infection* 10: 1040-1055.

**Danielová V., Holubová J. 1991.** Transovarial transmission rate of tick-borne encephalitis virus in *Ixodes ricinus* ticks. In: Dusbálek F., Bukva V. (Eds.): *Modern Acarology*. Academia, Prague and SPB Academic Publishing bv, The Hague. Vol. 2: 7-10.

**Donoso Mantke O., Achali K., Niedrig M., 2007.** Serological versus PCR methods for the detection of tick-borne encephalitis virus infection in humans. *Future Virology* 2, on-line.

**Dumpis U., Crook D., Oksi J., 1999.** Tick-borne encephalitis. *Clinical Infectious Diseases* 28: 882-890.

**Dyer J., Chisenhall D.M., Mores C.N., 2007.** A multiplexed TaqMan assay for the detection of arthropod-borne flaviviruses. *Journal of Virological Methods* 145: 9-13

**Ecker M., Allison S. L., Meixner T., Heinz F. X., 1999.** Sequence analysis and genetic classification of tick-borne encephalitis viruses from Europe and Asia. *Journal of General Virology* 80: 179-185.

**Golovljova I., Vene S., Sjölander, K.B., Vasilenko V., Plyusnin A., Lundkvist A., 2004.** Characterization of tick-borne encephalitis virus from Estonia. *Journal of Medical Virology* 74: 580-588.

**Grard G., Moureau G., Charrel R.N., Lemasson L.L., Gonzalez J.P., Gallian P., Gritsun T.S., Holme E.C., Gould E.A., de Lamballerie X., 2007.** Genetic characterization of tick-borne flaviviruses: New insight into evolution, pathogenetic determinants and taxonomy. *Virology* 361: 80-92.

**Grešíková M., Kaluzová M., 1997.** Biology of tick-borne encephalitis virus. *Acta virologica* 41: 115-124.

**Gritsun T.S., Lashkevich V. A., Gould E. A., 2003.** Tick-borne encephalitis. *Antiviral Research* 50: 129-146.

**Gritsun T. S., Venugopal K., Zanatto P. M. DE A., Mikhailov M. V., Sall A. A., Holmes E. C., Polkinghorne I., Dropova T. V., Pobodána V. V., Lashkevich V. A., Gould E. A. 1997.** Complete sequence of two tick-borne flaviviruses isolated from Siberia and the UK: analysis and significance of the 5' and 3'-UTRs. *Virus Research* 49: 37-39.

**Günther G., Haglund M., 2005.** Tick-borne encephalopathies: epidemiology, diagnosis, treatment and prevention. *CNS Drugs* 19(12): 1009-1032.

**Haglund M., Günther G., 2003.** Tick-borne encephalitis – pathogenesis, clinical course and long-term follow-up. *Vaccine* 21: S1/11- S1/18.

**Haysaka D., Suzuki Y., Kariwa H., Ivanov L., Volkov V., Demenev V., Mizutani T., Gojobori T., Takashima I. 1999.** Phylogenetic and virulence analysis of tick-borne encephalitis viruses from Japan and far-eastern Russia. *Journal of General Virology* 80: 3127-3135.

**Heinz F.X., 1986.** Epitope mapping of flavivirus glycoproteins. *Advances in Virus Research* 31: 103–168.

**Heinz F.X., Collett M.S., Purcell R.H., Gould E.A., Howard C.R., Houghton M., Moormann R.J.M., Rice D.M., Theil H.J., 2000.** Family *Flaviviridae*. In: van Regenmortel M.H.V., Fauquet C.M., Bishop D.H.L., Carstens E., Estes M.K., Lemon S., Maniloff J., Mayo M.A., McGeogch D., Pringle C.R., Wickner R.B. (Eds.), *Virus taxonomy*. In: *Proceedings of the 7th International Committee for the Taxonomy of viruses*. Academic Press, San Diego, California, 859-878.

**Hofmann H., Frisch-Niggemeyer W., Heinz F., 1979.** Rapid diagnosis of tick-borne encephalitis by means of enzyme linked immunosorbent assay. *Journal of General Virology* 42: 505-511.

**Holzmann H., 2003.** Diagnosis of tick-borne encephalitis. *Vaccine* 21: S1/36-S1/40.

**Holzmann H., Kundi M., Stiasny K., Clement J., McKenna P., Kunz Ch., Heinz FX, 1996.** Correlation between ELISA, hemagglutination inhibition and neutralizations tests after vaccination against tick-borne encephalitis. *Journal of Medical Virology* 48:102–7.

- Labuda M., Austyn J. M., Žuffová E., Kožuch O., Fuchsberger N., Lysý J., Nuttal P. A. 1996.** Importance of localized skin infection in tick-borne encephalitis virus transmission. *Virology* 219: 357-366.
- Labuda M., Jones L. D., Williams T., Danielová V., Nuttal P. A. 1993.** Efficient transmission of tick-borne encephalitis virus between cofeeding ticks. *Journal of Medical Entomology* 30: 295-299.
- Lindenbach B.D., Rice Ch. M., 2003.** Molecular biology of flaviviruses. *Advances in Virus Research* 59: 23-60.
- Lotric Furlan S., Strle F., 1995.** Thrombocytopenia, leukopenia and abnormal liver function tests in the initial phase of tick-borne encephalitis. *Zentralblatt für Bakteriologie* 282: 275-278.
- Kaiser R., Holzmann H., 2000.** Laboratory findings in tick-borne encephalitis - correlation with clinical outcome. *Infection* 28: 78-84.
- Mázló M., Szantó J., 1978.** Morphological demonstration of the virus of tick-borne encephalitis in the human brain. *Acta Neuropathologica* 43: 351-253.
- McMinn P. C., 1997.** The molecular basis of virulence of the encephalitogenic flaviviruses. *Journal of General Virology* 78: 2711-2722.
- Murphy, F., 1980.** Togavirus morphology and morphogenesis. In: Schlesinger, R.W. (Ed.), *The Togaviruses. Biology, Structure, Replication.* Academic Press, New York, str. 241-316.
- Popov F., Ivanova L.M., 1968.** Epidemiologic features of the alimentary route of infection of tick-borne encephalitis in the RSFSR territory. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii, i immunobiologii* 45, 36-42.
- Pospíšil L., Jandásek L., Pešek J., 1954.** Isolace nových kmenů virusu meningoencefalitidy v brněnském kraji za letní období 1953. *Lékařské listy* 9: 3-5.
- Puchhammer-Stöckl E., Kunz C., Mandl C., Heinz F.X., 1995.** Identification of tick-borne encephalitis virus ribonucleic acid in tick suspensions and in clinical specimens by a reverse transcription-nested polymerase chain reaction assay. *Clinical and Diagnostic Virology* 4: 321-326.
- Rampas J., Gallia F., 1949.** Isolace virusu encefalitidy z klíšťat *Ixodes ricinus*. *Časopis lékařů českých* 88: 1179-1181.
- Ramelow Ch., Süß J., Bernát D., Roggendorf M., Schreier E., 1993.** Detection of tick-borne encephalitis virus RNA in ficks (Ixodes ricinus) by the polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods* 45: 115-119.
- Rudenko N., Golovchenko M., Cihlářová V., Grubhoffer L., 2004.** Tick-borne encephalitis virus-specific RT-PCR – a rapid test for detection of the pathogen without viral RNA purification. *Acta virologica* 48: 167-171.

**Růžek D., Šťastná H., Kopecký J., Golovljova I., Grubhoffer L., 2007.** Rapid subtyping of tick-borne encephalitis virus isolates using multiplex RT-PCR. *Journal of Virological Methods* 144: 133-137.

**Saksida A., Duh D., Lotri-Furlan S., Strle F., Petrovec M., Avšič-Županc T., 2005.** The importance of tick-borne encephalitis virus RNA detection for early differential diagnosis of tick-borne encephalitis. *Journal of Clinical Virology* 33: 331-335.

**Schneider H., 1931.** Über epidemische akute „Meningitis serosa“. *Wiener klinische Wochenschrift* 44: 350-352.

**Schweiger M., Cassinoti P., 2003.** Development of quantitative real-time RT PCR assay with internal control for the laboratory detection of tick-borne encephalitis virus RNA. *Journal of Clinical Virology* 27: 136-145.

**Süss J., 2003.** Epidemiology and ecology of TBE relevant to the production of effective vaccines. *Vaccine* 21: S1/19-S1/35.

**Thiel H.J., Collett M.S., Gould E.A., Heinz F.X., Mezera G., Purcell R.H., Rice C.M., Houghton M., 2005.** Flaviviridae. In: Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J., Desselberger U., Ball L.A., (Eds.) *Virus Taxonomy . Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Academic Press, San Diego: str. 981-998.

**Tomažič J., Poljak M., Popovič P., Matičič M., Beovič B., Avšič-Županc T., Lotrič S., Jereb M., Pikej F., Gale N., 1997.** Tick-borne encephalitis: Possibly a fatal disease in its acute stage. PCR amplification of TBE RNA from postmortem brain tissue. *Infection* 25: 41-43.

**Votiakov I., Protas I. I., Bortkevich S., Nedzved M. K. 1975.** Experimental study of the pathogenesis of tick-borne encephalitis. *Voprosy Virusology* 3: 313-317.

**Walsh P.S., Metzger D.A., Higuchi R., 1991.** Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques* 10: 506-513.

**Whitby J.E., Ni H., Whitby H.E., Jennings A.D., Bradley L.M., Lee J.M., Lloyd G., Stephenson J.R., Barrett A.D., 1993.** Rapid detection of viruses of the tick-borne encephalitis virus complex by RT-PCR of viral RNA. *Journal of Virological Methods* 45: 103-114.

**Zilber L.A., 1939.** Vesennij (vesenne-letnij) epidemičeskij kleščevoj encefalit. *Arkhiv Biologičeskikh Nauk* 56: 2.