

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

Katedra medicínské biologie



**Porovnání metod detekce patogenů
(*Borrelia burgdorferi s.l.* a viru klíšť'ové
encefalitidy) v klíšťeti (*Ixodes ricinus*)**

Diplomová práce

Bc. Vendula Vetišková

Školitel: Prof. RNDr. Libor Grubhoffer CSc.

Školitel specialista: Mgr. Hana Tykalová

České Budějovice 2011

Vetišková, V., 2011: Porovnání metod detekce patogenů (*Borrelia burgdorferi* s.l. a viru klíšťové encefalidity) v klíšťeti *Ixodes ricinus*. [Comparison of detection methods of tick-borne pathogens (*Borrelia burgdorferi* s.l. and tick-borne encephalitis virus) in *Ixodes ricinus* tick. Mgr. Thesis, in Czech.] – 91 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

Different approaches of RNA/DNA extraction and particularly their efficacy in tick-borne pathogen detection in epidemiological studies are compared. Detection limits, financial, time and skill demands are evaluated for each of the methods and most optimal solutions for different applications are proposed.

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

14. prosince 2011
v Českých Budějovicích

.....
Bc. Vendula Vetišková

Poděkování:

Chtěla bych poděkovat svému školiteli Prof. RNDr. Liboru Grubhofferovi, CSc. za možnost stát se součástí jeho laboratorního týmu a možnost pracovat na zajímavém tématu. Jeho podpora pro mě byla velkou motivací.

Velké díky patří mé školitelce – specialistce Hance Tykalové za pomoc, ochotu, přínosné rady a připomínky, předané zkušenosti a hlavně za vstřícný a trpělivý přístup. Děkuji též Vašku Hönigovi za pomoc v začátcích, za poskytnutí klíšťat na přípravu homogenátu a za ochotu kdykoli vyřešit jakýkoli problém týkající se mé práce.

Moc děkuji Honzovi Erhartovi za poskytnutí klíšťat pro inokulaci z chovu Parazitologického ústavu AV ČR České Budějovice, Jankovi Šterbovi za borélie a konzultace jich se týkající a Dianě Hierwegové za pomoc s inokulací klíšťat. Bez nich bych tato práce nemohla vzniknout.

Nemohu též opomenout poděkovat Zuzce, Helče, Páje, Jarce, Jirkovi, Patrikovi a dalším kolegům z Laboratoře molekulární biologie vektorů a patogenů za pomoc a vytvoření přátelského prostředí.

V neposlední řadě děkuji svým rodičům a příteli za to, že mě podporovali a stáli při mně v časech dobrých i zlých.

Obsah:

1	Úvod.....	1
2	Cíle práce	2
3	Literární přehled	2
3.1	Klíště, vektor přenosu klinicky významných patogenů	2
3.2	Virus klíšťové encefalitidy.....	4
3.2.1	Molekulárně-biologická charakteristika viru.....	5
3.2.2	Subtypy viru KE.....	6
3.2.3	Cirkulace viru v přírodě	7
3.2.4	Replikace viru v hostiteli	8
3.2.5	Klíšťová encefalitida	9
3.3	Spirochéta <i>Borrelia burgdorferi</i>	9
3.3.1	Stavba buňky	11
3.3.2	Genom	12
3.3.3	Proteiny vnější povrchové membrány	12
3.3.4	Přenos spirochény <i>Borrelia burgdorferi</i>	14
3.3.5	Lymeská borelióza.....	14
3.4	Metody izolace nukleových kyselin.....	15
3.4.1	Obecné schéma izolace NK.....	16
3.4.2	Narušení buňky, lýza a denaturace	16
3.4.3	Extrakce NK	18
3.5	Real-time polymerázová řetězová reakce (PCR).....	21
3.5.1	Princip real-time PCR	22
3.5.2	Nespecifická detekce amplikonu	23
3.5.3	Specifická detekce amplikonu	23
3.5.4	Detekce patogenů v klíšťatech	25
4	Materiál a metody	27
4.1	Virus a bakterie	27
4.2	Klíšťata.....	27
4.3	Příprava homogenátu klíšťat	27
4.4	Testovací vzorky a příprava ředících řad	28
4.5	Metody extrakce nukleových kyselin.....	28
4.5.1	Extrakce pomocí suspenze Chelex® 100 Resin (Bio-Rad).....	29
4.5.2	Extrakce pomocí hydroxidu amonného	29
4.5.3	Extrakce pomocí RNAGEM™ Tissue (ZyGEM)	30
4.5.4	Fenol-chloroformová extrakce RNA – TRIzol® Reagent (Invitrogen)...	30
4.5.5	Purifikační metody založené na adsorpci na silikagel	31
4.5.5.1.	RTP® DNA/RNA Virus Mini kit (Invitek)	31
4.5.5.2.	Perfect Pure™ RNA Cell & Tissue (5 Prime)	31
4.5.5.3.	NucleoSpin® RNA Virus (Macherey-Nagel)	31
4.5.5.4.	QIAamp® Viral RNA Mini Kit (Qiagen).....	32
4.5.5.5.	RNeasy Mini Kit (Qiagen)	32
4.5.5.6.	DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen)	32

4.5.5.7.	Metoda podle Crowder et al. 2010 využívající reagenty z kitů QIAamp® Viral RNA Mini Kit (Qiagen) a DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen).....	32
4.5.6	Kombinace extrakčních metod	33
4.5.7	Extrakce suspenze Chelex® 100 Resin (BioRad) a přečištění přes QIAamp® Viral kolonku z QIAamp® Viral RNA Mini Kitu (Qiagen).....	33
4.5.8	Extrakce puřrem Chelex® 100 Resin (BioRad) a přečištění přes RNeasy kolonku z RNeasy Mini Kitu (Qiagen)	33
4.5.9	Extrakce pomocí TRIzol® Reagent (Invitrogen) a přečištění přes QIAamp® Viral a Rneasy kolonku (Qiagen).....	34
4.6	Metody detekce patogenů	36
4.6.1	Reverzní transkripce (RT).....	36
4.6.2	Polymerázová řetězová reakce (PCR)	36
4.6.3	Real-time PCR	37
4.7	Reverse line blotting (RLB).....	40
4.8	Infekce klíšťat inokulací	43
4.8.1	Inokulace	44
4.8.2	Inokulace virem klíšťové encefalitidy	44
4.8.3	Inokulace spirochétami <i>Borrelia burgdorferi</i>	44
4.8.4	Vyšetřování inokulovaných klíšťat.....	45
5	Výsledky	47
5.1	Porovnání účinnosti extrakčních metod.....	47
5.1.1	Metody extrakce RNA VKE.....	47
5.1.1.1.	Kombinace metod extrakce RNA	50
5.1.2	Metody extrakce DNA <i>Borrelia burgdorferi</i>	52
5.1.3	Metody simultánní izolace VKE a DNA ze spirochét <i>B. burgdorferi</i>	57
5.2	Infekce klíšťat inokulací	59
5.2.1	Inokulace klíšťat virem KE.....	59
5.2.2	Inokulace klíšťat spirochétou <i>B. burgdorferi</i>	62
5.3	Další faktory ovlivňující citlivost detekce patogenů ve vzorku.....	64
5.4	Stanovení detekčního limitu RLB.....	67
6	Diskuze	69
7	Závěrečné shrnutí.....	78

SEZNAM ZKRATEK

B. burgdorferi - *Borrelia burgdorferi* sensu lato

cDNA - komplementární DNA

CNS - centrální nervová soustava

C_t - treshold cycle

CTAB - cetyltrimethylammonium bromid

DEPC - diethylpyrocarbonát

DNA - deoxyribonukleová kyselina

EDTA - kyselina etylendiamintetraoctová

FRET - fluorescenčně rezonančního přenosu energie

KE - klíšťová encefalitida

NK – nukleová kyselina

ORF - otevřený čtecí rámec (z angl. „open reading frame“)

Osp – protein vnější membrány (z angl. „outer surface protein“)

PBS - fosfáty pufrovaný fyziologický roztok (z angl. „phosphate buffered saline“)

PCR - polymerázová řetězová reakce (z angl. „polymerase chain reaction“)

PFU - plakotvorná jednotka (z angl. „Plaque-forming unit“)

RT-PCR - reverzně transkriptázová (zpětná) PCR

RNA - ribonukleová kyselina

RLB – „reverse line blotting“

SDS - sodium dodecylsulfát

UTR - netranslatovaná oblast (z angl. „untranslated region“)

VKE - virus klíšťové encefalidity

1 Úvod

V České republice, ale celkově i v Evropě a ve světě, je pozorován nárůst počtu případů klíšťaty přenášených onemocnění a současně také rozšiřování oblasti výskytu klíšťat. Vzhledem k závažnosti těchto onemocnění jsou v klinické praxi důležité přesné a dostatečně citlivé metody detekce jednotlivých patogenů v klíšťatech. V praxi jsou ale diagnostické postupy komplikovány různorodostí klíšťaty přenášených patogenů (viry, bakterie, prvoci), náročností práce se vzorky a v neposlední řadě také cenovou dostupností různých vyšetřovacích metod.

V mé práci se proto zabývám porovnáním různých metod sloužících k detekci klíšťaty přenášených patogenů, popř. jejich kombinací s cílem zvýšení detekčního limitu. Závěry mé práce mohou sloužit jako pomůcka při výběru vhodné metody s ohledem na citlivost i cenu v diagnostických klinických laboratořích.

2 Cíle práce

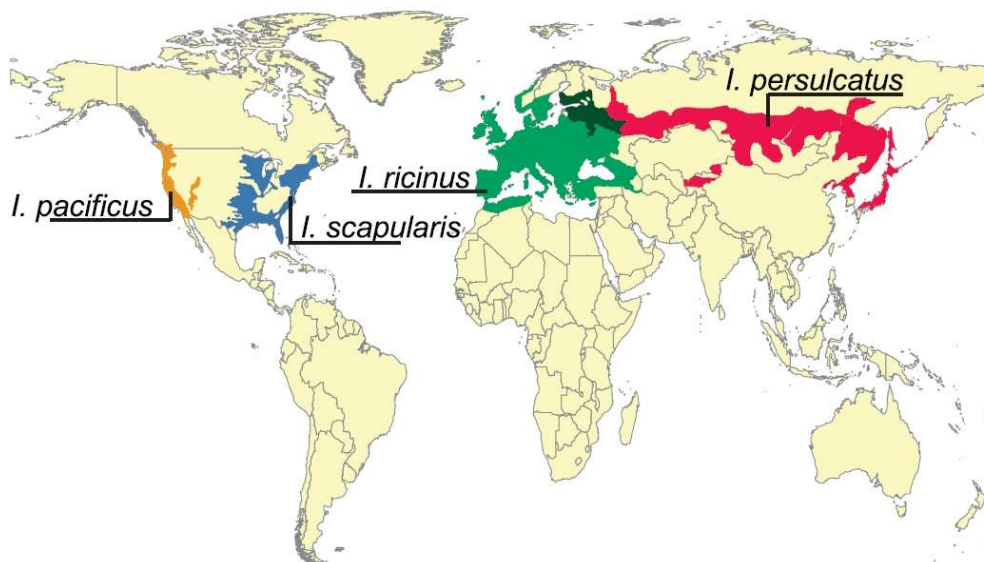
1. Vypracovat literární rešerši k tématu, se zaměřením na obecné charakteristiky *Borrelia burgdorferi* sensu lato a viru klíšťové encefalitidy, zpracovat metody extrakce nukleových kyselin a real-time PCR.
2. Porovnat různé postupy extrakce nukleových kyselin (DNA/RNA) patogenů *Borrelia burgdorferi* s.l. a viru klíšťové encefalitidy z klíšťat *Ixodes ricinus*, co do náročnosti zpracování a citlivosti metod; stanovit detekční limit jednotlivých metod.
3. Vypracovat metodiku real-time PCR pro kvantifikaci výtěžků jednotlivých metod
4. Ověřit vybranou metodu v praxi vyšetřováním klíšťat arteficiálně infikovaných *Borrelia burgdorferi* s.l. a virem klíšťové encefalitidy.

3 Literární přehled

3.1 Klíště, vektor přenosu klinicky významných patogenů

Klíšťata jsou hematofágní členovci, kteří parazitují na obratlovcích téměř po celém světě. Taxonomicky je řadíme do podkmene klepítkatci (*Chelicerata*), třídy pavoukovci (*Arachnida*), potřídy roztoči (*Acarina*), řádu klíšťata (*Ixodida*).

V rámci tohoto řádu je z pohledu přenosu patogenů nejvýznamnější je čeleď klíšťatovití (*Ixodidae*). Zástupci této čeledi se podle přítomnosti chitinového dorsálního štítku označují anglicky jako tzv. „hard ticks“. Do této čeledi patří kromě dalších rodů klinicky významný rod *Ixodes*, zahrnující důležité přenašeče patogenů: zejména *I. ricinus*, hojně se vyskytující v Evropě, dále *I. scapularis* a *I. pacificus* nacházející se na severoamerickém kontinentu a *I. persulcatus* vyskytující se převážně v Asii (Obr. 1). Do této čeledi dále patří klinicky méně významné rody klíšťat *Dermacentor*, *Haemaphysalis* nebo *Hyalomma* (Parola & Raoult, 2001, Swanson et al., 2006)



Obr. 1 Geografická distribuce klíšťat rodu *Ixodes*, převzato od Swanson et al., 2006.

Klíšťata slouží jako vektory nejrůznějších bakteriálních, protozoálních a virových patogenů. Z hlediska humánní medicíny patří mezi nejvýznamnější bakteriální patogeny přenosné klíšťaty spirochéty komplexu *Borrelia burgdorferi* sensu lato (s.l.) způsobující lymeskou boreliózu, původce tularémie *Francisella tularensis*, *Anaplasma phagocytophilum* způsobující lidskou granulocytární anaplazmóza, původce skvrnitého tyfu *Rickettsia conorii*, *Coxiella burnetii* způsobující Q horečka. Z významných protozoálních patogenů přenášejí klíšťata např. původce babesiózy *Babesia microti* či *Theileria parva* způsobující theileriózu. Mezi klinicky významné viry přenosné klíšťaty patří flaviviry způsobující klíšťovou encefalitidu či omskou hemoragickou horečku (Swanson et al., 2006).

Klíště *I. ricinus* prochází během svého života třemi vývojovými stádii - larva, nymfa a dospělec (Sonenshine, 1991). Jedná se o klíště trojhostitelské – každé stádium saje na jiném hostiteli nepřetržitě po dobu několika dní, kromě dospělých samců, kteří nesají vůbec. Po úplném nasátí, se klíště odpojí od hostitele. Poté klíště nasátou krev tráví a následně metamorfuje na další vývojové stádium (Parola & Raoult, 2001, Randolph, 2004).

Životní cyklus klíštěte je obvykle dokončen v rozmezí 2-3 let. Délku života ovšem ovlivňují různé faktory prostředí, jakými jsou klimatické podmínky, dostupnost hostitelů aj. V závislosti na těchto faktorech může délka života klíštěte trvat až 6 let (Anderson & Magnarelli, 2008).

Pro výskyt klíšťat v přírodě je důležitý ekosystém, ve kterém se nacházejí. Klíšťata jsou poměrně citlivá na nízkou vlhkost, proto se nejčastěji nacházejí v prostředí s vysokou relativní vlhkostí (80 %). Kromě vlhkosti jsou důležitými faktory výskytu a přežití klíšťat

v přírodě také teplota, dostupnost hostitelů a neméně důležité je také mikroklima daného místa. Nejčastějšími biotopy výskytu jsou např. smíšené a listnaté lesy, pastviny atd. (Süss et al., 2008).

Klíště patogena získá během sání na infekčním hostiteli a tyto patogeny přežívají dále v klíštěti i během jeho metamorfózy do dalšího vývojového stádia (tzv. transstadiální přenos). Přenos transovariální, tzn. přenos patogena ze samice klíštěte do vajíček, byl prokázán u *Babesia divergens* (Brunet et al., 1995, Swanson et al., 2006). U viru klíšťové encefalitidy a bakterií rodu *Rickettsia* byl transovariální přenos prokázán v malé míře (cca 1%), ale i přesto je považován za jeden z faktorů udržení patogena v přírodě (Nefedova et al., 2004; Rehacek, 1962). U ostatních klíšťaty přenášených patogenů nebyl transovariální přenos zatím prokázán a zřejmě nemá významný vliv na cirkulaci těchto patogenů v přírodě (Nefedova et al., 2004, Rehacek, 1962, Swanson et al., 2006).

Jako hostitele si klíšťata vybírají nejrůznější obratlovce. Larvy a nymfy sají převážně na drobných savcích, ptácích a plazech, dospělé samice preferují spíše větší savce. Člověka napadají všechna tři vývojová stádia, nejčastěji však nymfy (Süss, 2003). Klíšťata během sání do rány vylučují sliny a společně s nimi mohou do hostitele přecházet také patogeny. Sliny obsahují řadu bioaktivních molekul (protisrážlivé faktory, vazodilátory, blokátory histaminu aj.), které klíšťatům umožňují zdárný průběh a dokončení sání (Jones et al., 1989, Sauer et al., 1995). Malé rozměry nymf (cca 1 mm) jim umožňují sát na lidech po dostatečně dlouhou dobu, díky čemu dochází k úspěšnému přenosu patogenů. Nymfy proto z klinického hlediska představují pro lidi nejrizikovější životní stadium klíšťat (Swanson et al., 2006).

Klíšťata mohou být nakažena několika různými patogeny současně. Tento jev označujeme jako koinfekce. Vyskytuje se v menší míře a byl popsán např. v případě spirochét z komplexu *B. burgdorferi* s.l. a *A. phagocytophilum* (Stanczak et al., 2004, Swanson et al., 2006). Různé patogeny v jednom klíštěti se navzájem pravděpodobně neovlivňují, protože každý v klíštěti napadá jiný orgán, tkáň či buněčnou strukturu (Süss, 2011).

3.2 Virus klíšťové encefalitidy

Virus klíšťové encefalitidy (VKE) je závažný lidský patogen. Způsobuje onemocnění zvané klíšťová encefalitida (KE) postihující centrální nervovou soustavu (CNS). Onemocnění může probíhat různě, od asymptomatické infekce až po těžké meningoencefalitidy, končící smrtí. V evropských i asijských zemích bylo v posledních

letech zaznamenáno kolem 10 000 případů ročně (Süss, 2011); <http://data.euro.who.int/cisid/>).

První medicínský popis onemocnění učinil roku 1931 H. Schneider (Schneider, 1931), ale původce onemocnění a rezervoárový hostitel (přenašeč) onemocnění zůstávali stále neznámí. Roku 1937 v Rusku, v průběhu expedice, která měla objasnit původ onemocnění, byl vědci izolován virus jak z lidských pacientů, tak z klíšťat a také z hlodavců (Zilber, 1939). V Evropě byl virus poprvé izolován v roce 1948 v Československu na dvou místech prakticky současně Dr. Rampasem a Dr. Galliou ve středních Čechách a Dr. Krejčím na Moravě (J. Rampas, 1949). Následně byl prokázán výskyt onemocnění (tedy i viru) téměř ve všech evropských státech a později i na severu Číny a v severním Japonsku (Hayasaka et al., 1999).

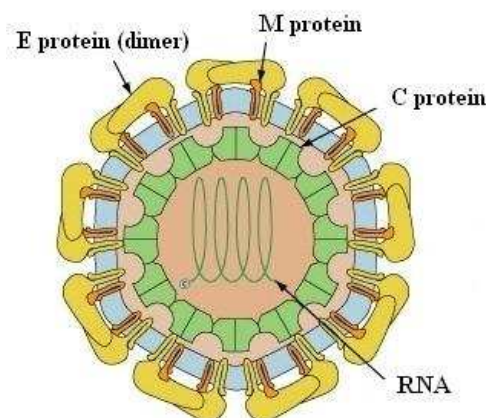
Taxonomicky řadíme VKE do rodu *Flavivirus*, do čeledi *Flaviviridae* (Heinz et al., 2000). V rámci čeledi rozdělujeme jednotlivé zástupce dle vektorů na viry bez známého vektora, na viry přenosné komáry a viry přenášené klíšťaty. VKE řadíme mezi klíšťaty přenášené viry a spolu s ním také další medicínsky významné viry: virus omské hemoragické horečky, virus horečky Kyasanurského lesa, virus Alkhurma, virus Langat, virus Powassan. Blízce příbuzným VKE je virus vrtivky (Louping ill), který je považovaný některými autory za jeden ze subtypů VKE. Tento virus způsobuje u lidí encefalidu jen ve výjimečných případech (Grard et al., 2007, Hubálek et al., 1996). Medicínsky významné flaviviry přenosné komáry jsou zejména virus žluté zimnice, virus západního Nilu, viry dengue, virus japonské encefalitidy. Mezi viry, u kterých zatím nebyl odhalen vektor přenosu patří viry Modoc, Apoi, Rio Bravo aj. (Gould et al., 2003, Gould & Solomon, 2008, Süss, 2011, Varelas-Wesley & Calisher, 1982).

3.2.1 Molekulárně-biologická charakteristika viru

VKE sdílí s ostatními flaviviry shodnou stavbu virionu a organizace genomu a životní cyklus jsou také podobné. Viriony flavivirů jsou obalené částice oválného tvaru o velikosti 40-60 nm. Lipidový obal má v sobě zabudované dva strukturní proteiny. Jedná se o povrchový glykoprotein E („envelope protein“), který interaguje s buněčnými receptory a zprostředkovává splnutí virové a buněčné membrány. Tento protein představuje hlavní antigenní determinantu všech flavivirů. Dalším proteinem je membránový protein M („membrane protein“), který vzniká z prekursorového proteinu prM během pučení virionu z buňky. Uvnitř virového obalu se nachází nukleokapsida, obsahující kapsidový protein C

(„core protein“) a virový genom. Genom tvoří jednořetězcová RNA pozitivní polarity o celkové délce 11 kb (Obr. 2). Hlavní část virového genomu (cca 90 %) tvoří jediný otevřený čtecí rámec (ORF – „open reading frame“), kódující polyprotein o velikosti 3400 aminokyselin. Polyprotein je virovými a buněčnými proteázami ko- a post- translačně štěpen na tři strukturální proteiny (E, M, C) a sedm proteinů nestrukturních (NS). Proteiny jsou v ORF uspořádány následovně: 5'-C-prM-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5-3'.

Na 5' a 3' koncích genomu se nachází netranslatované oblasti (UTR – „untranslated region“). 5' konec nese metylguanidinovou čepičku a vytváří charakteristickou sekundární strukturu, která je důležitá při replikaci virového genomu a translaci. 3' konec obsahuje konzervované a variabilní oblasti a u různých flavivirů se vyskytují různě dlouhé konzervované sekvence (Gritsun & Gould, 2006, Gritsun & Gould, 2007).



Obr. 2 Stavba virionu flavivirů (VKE), převzato a upraveno z www.viralzone.expasy.org.

3.2.2 Subtypy viru KE

Na základě srovnávací sekvenční analýzy genů kódující hlavní obalový protein E u různých kmenů VKE byly rozlišeny tři subtypy viru. Evropský subtyp, s prototypovým kmenem Neudoerfl, se vyskytuje v oblasti střední a východní Evropy. Další subtyp označovaný jako dálně-východní, je endemický v oblastech východního Ruska, severní a východní Číny a v Japonsku. Jeho prototypový kmen je kmen Sofjin. Sibiřský subtyp, do něhož řadíme kmeny Aina a Vasilchenko, se nachází v severních oblastech Ruska a ve Finsku (Ecker et al., 1999, Süs, 2011) (Obr. 3). Všechny subtypy jsou si antigenně velmi blízce příbuzné (Gresikova & Kaluzova, 1997), avšak sibiřský subtyp je více příbuzný k subtypu dálně-východnímu nežli k evropskému (Ecker et al., 1999).



Obr. 3 Geografická distribuce jednotlivých subtypů VKE, převzato a upraveno z www.tbe-europe.com.

Hlavním vektorem evropského subtypu viru je klíště *I. ricinus*. Jedná se o dominantní druh klíštěte v Evropě, toto klíště přenáší těž virus vrtivky, příbuzný VKE. Dálno-východní a sibiřský subtyp jsou přenášeny zejména klíštětem *I. persulcatus*, které tvoří 80-97 % všech druhů klíšťat na Sibiři a ve východních oblastech Ruska (Süss, 2011). V severní Evropě a v evropské části Ruska dochází k překrytí areálů výskytu subtypů (Obr. 3). Tento fakt má za následek vyšší míru úmrtnosti pacientů nakažených VKE v těchto oblastech než ve zbytku Evropy a to hlavně v důsledku vyšší mortality u dálně-východního a sibiřského subtypu (Golovljova et al., 2004). V Estonsku například v letech 1999-2008 činilo procento úmrtnosti 53,5 % u osob nad 40 let (Epstein & Kutsar, 2009).

3.2.3 Cirkulace viru v přírodě

Z ekologického hlediska řadíme VKE mezi arboviry, tedy viry přenosné prostřednictvím krevsajícího členovce. Cirkulace VKE v přírodě zahrnuje přenašeče, kterými jsou klíšťata a hostitele, kterými jsou obratlovci. Výskyt klíšťat a současná přítomnost vhodného hostitele jsou zásadní pro udržení cirkulace viru v dané lokalitě (Nuttall et al., 2005, Süss, 2011).

Klíště se může infikovat v kterémkoli stadiu svého vývoje (larva, nymfa, dospělec) sáním krve infikovaného hostitele, který právě prodělává virémii. Během metamorfózy klíštěte se VKE přenáší na další stádia.

Transovarialní přenos ze samice na potomstvo představuje další možnou cestu přenosu viru. Přestože tento přenos není příliš efektivní (jen 7,6 % snůšek vajíček infikovaných samic obsahovalo virus, přičemž efektivita přenosu na larvy není přesně stanovena), hraje důležitou roli v cirkulaci viru v přírodě při nedostatečném množství vhodných hostitelů (Danielova & Holubova, 1991, Danielová et al., 2002). Přenos VKE může nastat při tzv. sousání („co-feeding“), kdy dochází k přenosu patogenu u klíšťat sajících v těsné blízkosti na témže hostiteli, i když hostitel, na němž sají, nemá prokazatelnou virémii (Labuda et al., 1993, Randolph et al., 1996).

Hlavními hostiteli a rezervoáry viru jsou v přírodě drobní hlodavci (Dumpis et al., 1999). Další zvířata jako ptáci a velcí savci (vysoká zvěř, dobytek) mohou být virem infikováni, ale pro přenos viru v přírodě mají zřejmě menší význam. Člověk je pouze náhodným hostitelem, cyklus přenosu viru u něho končí a tudíž nehraje žádnou roli v udržení cirkulace viru v přírodě (Gritsun et al., 2003).

3.2.4 Replikace viru v hostiteli

Člověk se nejčastěji infikuje VKE při sání infikované klíštěte. Virus se pomnoží v místě sání a poté je lymfatickou cestou transportován do spádových lymfatických uzlin (Albrecht, 1968). Tam se virus dále replikuje a proniká do krevního řečiště. Tím nastává viremická fáze onemocnění, během níž napadá virus orgány retikulo-endotelové soustavy (Haglund & Günther, 2003, Malkova & Frankova, 1959). Po překonání hematoencefalické bariéry se virus dostává do CNS, kde primárně napadá neurony. Infekce vyvolává histopatologické a zánětlivé změny. Poškození neuronů je způsobeno jak samotnou replikací viru, tak zánětlivou reakcí spuštěnou virem (Chambers & Diamond, 2003, Ruzek et al., 2009).

Další možnou cestou přenosu VKE je alimentární nákaza. Dochází k ní po požití nepasterizovaného mléka nebo mléčných výrobků pocházejících z infikovaného zvířete (ovce, koza) (Holzmann et al., 2009, Kříž et al., 2009). K infekci VKE může dojít též při inhalaci kontaminovaného aerosolu při práci v laboratoři. Virus pak vstupuje do mozku přes čichový nerv přímou cestou, proto mají takové nákazy rychlý průběh a závažné následky (Avžič-Županc et al., 1994).

3.2.5 Klíšťová encefalitida

Klinické příznaky onemocnění se liší v závislosti na subtypu VKE, kterým byl člověk infikován. Dálně-východní subtyp způsobuje těžké formy poruch centrální nervové soustavy se sklonem k rozvinutí meningoencefalitidy až polyencefalitidy a byly popsány i hemoragické příznaky (Gritsun et al., 2003). U dětí je onemocnění závažnější než u dospělých (Votjakov et al., 1975). Mortalita se pohybuje v rozsahu 20-60 % (Gritsun et al., 2003). Pro infekci sibiřským subtypem je charakteristický méně závažný průběh s tendencí k přechodu onemocnění v chronickou formu. Případy úmrtí nepřevyšují 1-3 % (Gritsun et al., 2003). Infekce Evropským subtypem probíhá v 70 % bezpříznakově, ve zbylých případech probíhá onemocnění obvykle (72-87 %) ve dvou fázích (Lindquist & Vapalahti, 2008). Inkubační doba onemocnění v délce 4-14 dní je následována první fází onemocnění s příznaky připomínajícími chřipku (zvýšená teplota, nevolnost, slabost). Tyto příznaky však po několika dnech odeznívají a nastává přibližně týdenní bezpříznakové období, kdy se postiženému jedinci uleví a cítí se zdrav. Poté však přichází druhá fáze onemocnění se zjevnými příznaky napadení nervového systému. Nejčastěji se jedná o meningitidu či meningoencefalitidu (Gritsun et al., 2003, Holzmann, 2003). Po prodělané infekci Evropským subtypem viru KE mohou u 46 % pacientů přetrvávat dlouhodobé neurologické potíže jako např. bolesti hlavy, poruchy sluchu, poruchy rovnováhy. V 10 % případů dochází k rozvinutí tzv. post-encefalitického syndromu, projevujícího se paralýzou spinálních nervů (Haglund & Günther, 2003). Infekce mívá u dětí mírnější průběh než u dospělých, zvláště těžce ale probíhá u osob starších 60 let. Případy úmrtí se pohybují v rozmezí 1-2 % (Dumpis et al., 1999, Gritsun et al., 2003).

3.3 Spirochéta *Borrelia burgdorferi*

Spirochéta *Borrelia burgdorferi* s.l. je původcem lymeské boreliózy. Jedná se o nejčastější klíšťaty přenášené onemocnění v oblastech mírného pásu severní polokoule. Počet případů lymeské boreliózy se celosvětově pohybuje kolem 255 000 ročně (Rudenko et al., 2011). Taxonomicky je tato spirochéta zařazena do říše *Eubacteria*, kmene *Spirochaetes*, třídy *Spirochaetes*, řádu *Spirochaetales*, čeledi *Spirochaetaceae*, rodu *Borrelia*. Do kmene *Spirochaetes* patří kromě rodu *Borrelia* i několik dalších pro člověka patogeních spirochét jako jsou *Treponema pallidum* způsobující syfilis a *Leptospira interrogans* způsobující leptospirózu (Tilly et al., 2008).

B. burgdorferi byla poprvé izolována v roce 1982 v USA z klíštěte *I. scapularis* (dříve *I. dammini*) (Burgdorfer et al., 1982), poté byla spirochéta detekována také v patientských vzorcích jak v USA (Benach et al., 1983), tak v Evropě, kde byla spirochéta vyizolována z klíštěte *I. ricinus* (Ackermann et al., 1984). Izoláty se ovšem genotypově značně lišily. Následné genetické analýzy ukázaly že se jedná o druhově heterogenní skupinu spirochét, proto byla *B. burgdorferi* rozdělena na více genomických druhů, označovaných jako genospecies a celkově nazvána jako druhový komplex *B. burgdorferi* sensu lato. Doposud bylo identifikováno 19 druhů a lze očekávat, že toto číslo bude dále stoupat. Jednotlivé druhy se kromě jiného navzájem liší místem výskytu i hlavním vektorem (Tab. 1). Mezi prokazatelně patogenní druhy (původce lymeské boreliózy) řadíme *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. bavariensis* a *B. spielmanii*. U ostatních genospecies je patogenita zatím nejasná, ovšem druhy *B. bissetti*, *B. lusitaniae*, *B. kurtenbachii*, *B. valaisina* můžeme též považovat minimálně za potencionálně patogenní pro člověka, vzhledem k jejich průkazu ve vzorcích pacientů s příznaky lymeské boreliózy (Rudenko et al., 2011).

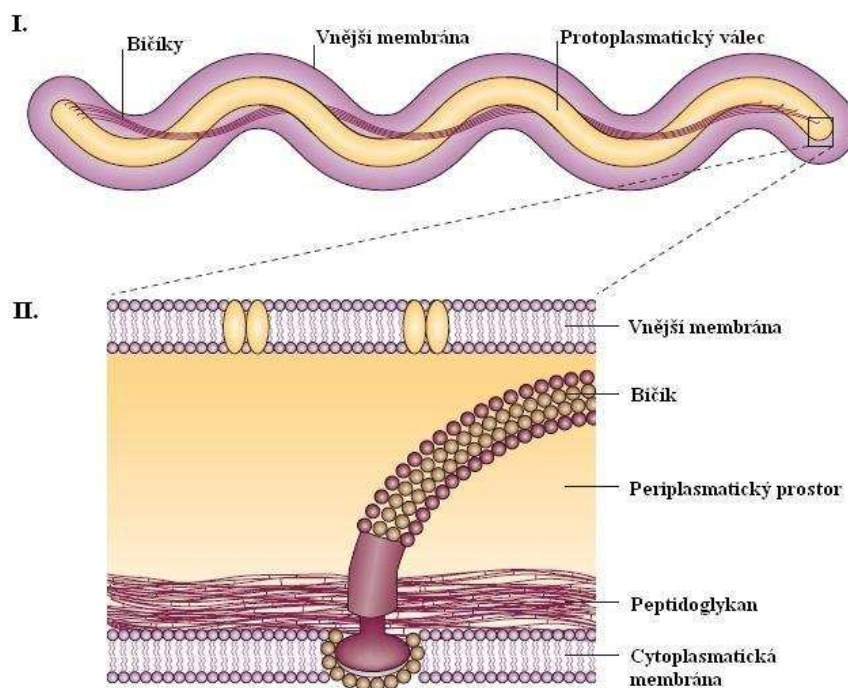
Tab. 1 Dosud identifikované druhy v rámci komplexu *B. burgdorferi* sensu lato; upraveno podle Rudenko et al. (2011).

Druhy <i>B. burgdorferi</i>	Vektor přenosu	Geografická distribuce	Citace
<i>B. afzelii</i>	<i>I. ricinus</i> , <i>I. pacificus</i>	Evropa, Asie	(Canica et al., 1993)
<i>B. americana</i>	<i>I. pacificus</i> , <i>I. minor</i>	USA	(Rudenko et al., 2009a)
<i>B. andersonii</i>	<i>I. dentatus</i>	USA	(Marconi et al., 1995)
<i>B. bavariensis</i>	<i>I. ricinus</i>	Evropa, Asie	(Margos et al., 2009)
<i>B. bissetti</i>	<i>I. ricinus</i> , <i>I. scapularis</i> , <i>I. pacificus</i> , <i>I. minor</i>	Evropa, USA	(Postic et al., 1998)
<i>B. burgdorferi sensu stricto</i>	<i>I. ricinus</i> , <i>I. scapularis</i> , <i>I. persulcatus</i>	Evropa, USA	(Baranton et al., 1992)
<i>B. californiensis</i>	<i>I. pacificus</i> , <i>I. jellisonii</i> , <i>I. spinipalpis</i>	USA	(Postic et al., 2007)
<i>B. carolinensis</i>	<i>I. minor</i>	USA	(Rudenko et al., 2009b)
<i>B. garinii</i>	<i>I. ricinus</i> , <i>I. persulcatus</i> , <i>I. hexagonus</i> , <i>I. nipponensis</i>	Evropa, Asie	Baranton et al., 1992
<i>B. japonica</i>	<i>I. ovatus</i>	Asie	(Kawabata et al., 1993)

<i>B. kurtenbachii</i>	<i>I. scapularis</i>	USA	Margos et al. 2009
<i>B. lusitaniae</i>	<i>I. ricinus</i>	Evropa	(Le Fleche et al., 1997)
<i>B. sinica</i>	<i>I. ovatus</i>	Asie	(Masuzawa et al., 2001)
<i>B. tanukii</i>	<i>I. tanukii</i>	Asie	(Fukunaga et al., 1996)
<i>B. turdi</i>	<i>I. turdus</i>	Asie	Fukunaga et al., 1996
<i>B. spielmanii</i>	<i>I. ricinus</i>	Evropa	(Richter et al., 2006)
<i>B. valaisiana</i>	<i>I. ricinus. I. granulatus</i>	Evropa, Asie	(Wang et al., 1997)
<i>B. yangtze</i>	<i>Haemaphysalis longicornis,</i> <i>I. granulatus</i>	Asie	(Chu et al., 2008)
Genospecies 2	<i>I. pacificus</i>	USA	Postic et al., 2007

3.3.1 Stavba buňky

Borrelia burgdorferi je charakteristická jedinečným spirálovitým tvarem buňky se závití ve vzdálenosti 2,2 μm . Velikost buňky kolísá v rozmezí 10 až 20 μm , průměr buňky činí přibližně 0,33 μm (Goldstein et al., 1996). Buňku tvoří protoplasmatický válec, obklopený vnitřní membránou a peptidoglykanovou vrstvou (vnější membránou). Oblast mezi vnitřní membránou a peptidoglykanovou vrstvou označujeme jako periplasmatický prostor. V periplasmatickém prostoru se nacházejí bičíky (Obr. 4). Ty jsou zakotveny na obou koncích buňky, rozšiřují se směrem ke středu a jsou tak dlouhé, že překrývají spirochétu v celé její délce (Holt, 1978, Motaleb et al., 2000). Hlavní komponentou bičíků jsou proteiny FlaA (38 kDa) a FlaB (41 kDa), přičemž více je zastoupen protein FlaB (Ge et al., 1998). Bičíky jsou zodpovědné za charakteristický šroubovitý tvar buňky, který umožňuje pohyb ve vysoce viskózním prostředí pro ostatní bakterie nepřístupném jakou je např. mezibuněčná hmota (Charon & Goldstein, 2002, Kimsey, 1990). Buněčná stěna odpovídá svým složením gramnegativním bakteriím, avšak obsahují lipopolysacharidy s jedinečnými oligosacharidovými motivy a velké množství lipoproteinů. Z hlediska chemického složení bakteriální stěny tedy nepatří *B. burgdorferi* mezi typické gramnegativní bakterie (Fraser et al., 1997, Takayama et al., 1987).



Obr. 4. I. Morfologie buňky *B.burgdorferi*, **II.** Detail zakotvení bičíku, převzato a upraveno z Rosa et al., (2005).

3.3.2 Genom

Jedním z nejcharakterističtějších rysů *B. burgdorferi* je její genom. Jedná se o neobvyklý segmentovaný genom, jehož největší část tvoří jediný lineární chromosom o velikosti přibližně 900 kbp (Baril et al., 1989). Genom navíc obsahuje 12 lineárních a 9 kruhových plazmidů o celkové velikosti 610 kbp. Plazmidy bývají vzhledem ke své velikosti někdy označovány jako mikro-chromosomy (Casjens et al., 2000).

Lineární chromosom obsahuje celkem 769 genů, z toho 90 % tvoří kódující sekvence, které jsou homologní ke genům nalezeným i u jiných bakterií. Jsou to geny kódující základní proteiny nutné pro replikaci, translaci, transkripci, energetický metabolismus buňky, aj. Oproti tomu plazmidy obsahují velké množství nekódujících sekvencí a pseudogenů. Z celkového počtu 419 plazmidových genů je jich mnoho unikátních a pouze u 10 % byla určena jejich funkce (Casjens et al., 2000, Fraser et al., 1997). Na plazmidech je, kromě jiného, kódována řada genů ovlivňujících patogenitu či určující virulenci spirochéty. Tyto sekvence jsou zcela odlišné od ostatních dobře prostudovaných bakterií (Rosa et al., 2005).

3.3.3 Proteiny vnější povrchové membrány

Mezi nejvýznamnější na plazmidech kódované proteiny vnější membrány Osp („Outer surface protein“). Původně byly nazývány abecedně (OspA, OspB, OspC, OspD, OspE,

OspF). Poté se terminologie změnila podle jejich funkce či molekulové hmotnosti např. Dbp („Decorin binding protein“ – dekorin vázající protein). Lipoproteiny vnější membrány hrají důležitou roli v interakci spirochéty s klíštěcími a savčími tkáněmi. Jsou též zodpovědné za zánětlivou odpověď hostitele během infekce (Singh & Girschick, 2004). Při sání klíštěte je exprese některých z lipoproteinů snižována, zatímco u jiných je exprese naopak zvyšována (Schwan et al., 1988).

Mezi nejvíce prostudované patří lipoproteiny OspA a OspB (Templeton, 2004). Oba sdílejí stejný promotor na lineárním plazmidu lp54 a jsou nutné pro úspěšnou kolonizaci střeva klíštěte. Během vstupu spirochéty do klíštěte je jejich exprese zvyšována, zatímco během sání na hostiteli dochází ke snížení exprese. (Chu et al., 2008). Lipoprotein OspA se váže na receptor ve střevě klíštěte označovaný jako TROSPA („Tick receptor for OspA“) a slouží k uchycení spirochéty ve střevě klíštěte. Jakmile začne klíště sát, je exprese OspA snižována a to umožňuje spirochétám uvolnění se z povrchu střeva, průnik do hemolymfy a migraci do slinných žláz (Schwan et al., 1988). Dalším důležitým povrchovým lipoproteinem je OspC. U borélií ve střevech nenasátých klíšťat není OspC exprimován. Jeho exprese se spouští během sání klíštěte a je výrazně zvýšena v průběhu průniku borélie do slinných žláz. Protein je dále přítomen na povrchu borélií i v průběhu infekce hostitele, jeho úloha ovšem není zcela objasněna (Grimm et al., 2004, Pal et al., 2004, Xu et al., 2008).

Řada povrchových proteinů ovlivňuje imunitní reakci hostitele. Proteiny označované jako CRASP 1-5 („Complement regulator-acquiring surface proteins“) nebo Erp („OspE/F related proteins“) proteiny váží regulátory komplementu a tím zabraňují spuštění alternativní komplementové dráhy, borélie tak unikají této základní hostitelské obraně proti mikroorganismům (Singh & Girschick, 2004).

Jak bylo zmíněno výše, některé povrchové proteiny borélií jsou důležité pro jejich patogenitu. Například proteiny DbpA, B a Bgp se váží na dekorin a glykosaminoglykany, látky nacházející se v extracelulární matrix a pojivové tkáni savců. Tím umožňují úspěšnou kolonizaci cílových tkání v hostiteli a také ovlivňují virulenci borélií (Shi et al., 2008).

Další povrchové proteiny, podobně jako proteiny Osp, jsou různě exprimovány v průběhu infekce hostitele, čímž je zajištěna antigenní variabilita borélií a omezená odpověď hostitelského imunitního systému, zejména její humorální složka. Příkladem jsou např. proteiny VlsE („Variable major protein-like sequence expression site“) (Chu et al., 2008, Liang et al., 2004, Xu et al., 2008).

3.3.4 Přenos spirochéty *Borrelia burgdorferi*

Spirochéty *B. burgdorferi* jsou mezi hostiteli přenášeny pomocí vektorů, zejména klíšťat rodu *Ixodes*. V Evropě se jedná zejména o klíště *I. ricinus*, v Asii o *I. persulcatus* a v Severní Americe o *I. scapularis*, *I. pacificus*.

Borélie mohou infikovat klíště ve všech stádiích jeho vývoje (larva, nymfa, dospělec), přičemž každé stádium preferuje jiný druh hostitele. Díky tomu se spirochéty musí přizpůsobovat nejenom podmínkám v klíšťatech, ale i v hostitelích, jakými jsou různé druhy obratlovců od drobných hlodavců, ptáků až po velké savce včetně člověka. Ten je ovšem hostitelem náhodným. (Fraser et al., 1997, Kurtenbach et al., 2002). Konkrétní genospecies jsou specificky spjaty s určitými hostiteli, např. *B. afzelii*, *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. bavariensis* s malými hlodavci (Hu et al., 1997, Margos et al., 2009, Poupon et al., 2006), *B. spielmanii* zejména s plchy ale byly izolovány i z ježka (Skuballa et al., 2007). *B. garinii* a *B. valaisiana* byly izolovány zejména z ptáků (Poupon, Lommano et al. 2006). *B. lusitaniae* bývá nalézána převážně u plazů (Richter et al., 2006). Tyto hostitelské specifity jsou zřejmě spjaty s rozdíly v komplementovém systému hostitelů (Kurtenbach et al., 2002).

Klíště získá spirochétu po sání na infekčním hostiteli. Spirochéta osidluje střevo, kde setrvává i během metamorfózy. Jakmile dojde k dalšímu sání, spirochéta se namnoží a migruje ze střeva do slinných žláz, aby byla společně se slinami přenesena do hostitele (Ribeiro et al., 1987). V místě sání se spirochéta lokálně namnoží a zůstává zde po dobu několika dní, poté se šíří do dalších tkání a orgánů (Gern & Rais, 1996).

Během přeměny klíštěte do dalšího vývojového stádia v něm spirochéta přežívá, v tom případě se jedná o transstadiální přenos. V nasátých klíšťatech se nachází spirochéta ve střevě, ale v některých případech se dostává i do dalších orgánů (Lebet & Gern, 1994), pouze ve vzácných případech se mohou spirochéty dostat i do vaječnicků a díky tomu dochází k transovariálnímu přenosu spirochéty ze samičky na potomstvo (Magnarelli et al., 1987).

3.3.5 Lymeská borelióza

Infekce spirochétou *Borrelia burgdorferi* způsobuje multisystémové onemocnění, které je označováno jako lymeská borelióza. V současné době se jedná o nejčastější klíšťaty přenášené onemocnění na severní polokouli (Margos et al., 2009). Nemoc napadá hlavně kůži, nervovou soustavu, klouby a srdce (Steere 1989; Pfister, Wilske et al. 1994) a projevuje se různými klinickými příznaky v závislosti na genospecies spirochéty. Infekce *B. burgdorferi* sensu stricto postihuje zejména klouby a způsobuje těžké artritidy. *B. afzelii* vyvolává převážně kožní obtíže (acrodermatitis chronica atrophicans, lymfocytom). *B.*

garii má afinitu k nervové soustavě a způsobuje různě závažná neurologická poškození, projevující se jako meningitida či meningoencefalitida (Rosa et al., 2005, Wang et al., 1997).

Nejčastěji mívá průběh lymeské boreliózy tři fáze (Nocton et al., 1994). Několik dnů nebo týdnů po přisátí klíštěte dochází k lokalizované infekci v místě sání klíštěte, která se u části pacientů (60-80%) projeví charakteristickou skvrnou na kůži označovanou jako erythema chronicum migrans. Jedná se o načervenalou skvrnu se světlým středem o velikosti větší než 5 centimetrů v průměru (Berger, 1993). Během této fáze může infikovaný pozorovat příznaky podobné chřipce (horečka, únava, bolesti hlavy a kloubů). V některých případech však může probíhat počáteční infekce zcela bez příznaků (Cerar et al., 2010, Guy & Stanek, 1991). V případě neléčení, přechází onemocnění během několika týdnů do další fáze. Dochází k rozšíření infekce do dalších orgánů, do kloubů, srdce a nervové soustavy. Mezi příznaky druhé fáze lymeské boreliózy patří artritida, neuroborelióza (nejčastěji meningoencefalitida) (Halperin, 2008), ve vzácných případech karditida (Wang et al., 2003). Terapie spočívá v 2-4 týdenním podávání vysokých dávek antibiotik. Účinnost léčby závisí na včasném podání během raných fází infekce. Vzácně se může onemocnění rozvinout do třetí fáze a to v případě, kdy není nákaza léčena, a nebo u pacientů nereagujících na antibiotickou léčbu. Třetí fáze onemocnění se objevuje několik měsíců až let po prvních dvou fázích onemocnění. Lze pozorovat příznaky trvalého poškození organismu, jakými jsou chronická artritida, chronická neuroborelióza, lymfocytom a nebo chronické poškození kůže zvané acrodermatitis chronica atrophicans, při kterém dochází k degeneraci podkoží. Některé z komplikací jsou pravděpodobně spojeny s autoimunitní reakcí (Rosa et al., 2005).

3.4 Metody izolace nukleových kyselin

Extrakce nukleových kyselin (NK) tj. DNA a RNA je jednou z nejdůležitějších molekulárně- biologických metod. Je počátečním krokem pro další analýzy a nejvýznamnějším krokem diagnostických metod. DNA a RNA mohou být izolovány z jakéhokoli biologického materiálu ať už živého či zakonzervovaného. Izolaci DNA, během které dochází k jejímu přečištění/purifikaci, můžeme rozdělit do dvou různých kategorií: izolace extrachlomezomálních fragmentů DNA jako jsou plazmidy či bakteriofágy a izolace chromozomální či genomové DNA z prokaryot a eukaryot. V případě RNA se zejména jedná o izolaci ribozomální RNA, dále pak o mediátorové a transferové RNA. V neposlední řadě se izoluje virová RNA (Tan & Yiap, 2009). Izolace RNA je vždy mnohem náročnější než izolace DNA. RNA je nestabilní molekula, citlivá na vysokou teplotu a na všudypřítomné

RNázy. Je nutné pracovat ve sterilním prostředí, zajistit potřebnou inaktivaci RNáz a vzorek dlouhodobě uchovávat hluboce zmražený (Farrell, 2009)

3.4.1 Obecné schéma izolace NK

Úspěšná izolace NK zahrnuje několik důležitých kroků:

1. Lýza buňky a uvolnění nukleoproteinu
2. Denaturace nukleoproteinu s následnou extrakcí NK
3. Precipitace či purifikace NK

V běžné praxi dochází ke slučování jednotlivých kroků izolace za použití speciálních komerčně dostupných roztoků či kitů (Tan & Yiap, 2009).

Je několik aspektů, které je nutné při izolaci NK kontrolovat. Během izolace je nutné zabránit jakýmkoli kontaminacím ať již mezi různými vzorky navzájem nebo nukleovými kyselinami, případně nukleázami z prostředí. Další nutností je inaktivace nukleáz ve vzorcích obsažených, které by mohly poškodit vyizolovanou NK, tzn. při izolaci DNA inaktivujeme DNázy, při izolaci RNA inaktivujeme RNázy. Dlouhodobě je nejvhodnější uchovávat vyizolovanou NK při teplotě -70 °C. Výsledná kvalita získané NK má přímý vliv na výsledky následných metod (Riedmaier et al., 2010, <http://www.roche-applied-science.com>).

3.4.2 Narušení buňky, lýza a denaturace

Nejprve musí dojít k narušení biomembrán a k uvolnění NK z buněčného obsahu. Není jednoduché nalézt ideální postup pro lýzu buněk, který bude dostatečně účinný, aby narušil výchozí materiál, a zároveň musí být natolik šetrný, aby zachoval cílovou nukleovou kyselinu (Grard et al., 2007). Dalším důležitým aspektem je rychlost lýzy, při pomalém narušení dochází k poškození NK endogenními nukleázami. Buňku můžeme poškodit buď mechanicky nebo jinými šetrnějšími způsoby (chemicky, fyzikálně, enzymaticky) (Middelberg, 1995, <http://www.roche-applied-science.com>).

Mechanická disrupce využívá k rozmělnění tkáně a následnému narušení buněk fyzikálních sil. Tento proces se též nazývá homogenizace. Nejsnadněji lze vzorek homogenizovat ve zkumavce rozřezáním sterilním skalpelem, což bývá u většího počtu vzorků časově náročné. Dále je možné využít homogenizaci podle Dounce, využívající zkumavky a skleněného pístu. Zkoumaný vzorek lze také homogenizovat rozemletím pomocí kuliček různých velikostí a materiálů – sklo, ocel, keramika. Zvolená velikost a

materiál kuliček se odvíjí od typu vzorku, který potřebujeme zpracovat (Geciova et al., 2002). Dalším způsobem mechanického narušení tkáně je sonikace. Jedná se o metodu ultrazvukového rozbíjení buněk, při které dochází k narušení interakcí mezi molekulami v mezibuněčném prostoru i v plasmatické membráně buněk (Engler, 1985). Buňku lze též narušit pomocí silného homogenizačního tlaku typu French press. Ten funguje na principu dekomprese a střižných sil (Simpson et al., 1963). Řada firem vyrábí homogenizátory pracující na různých principech a umožňující rychle zpracovat velké množství vzorků.

Mnohem šetrněji lze buňku narušit jinak než mechanickými způsoby, které vyvolají lýzu buněk. Rozlišujeme fyzikální, chemickou a enzymatickou lýzu. Mezi fyzikální způsoby řadíme např. osmotický šok, kdy je buňka vystavena vysokému osmotickému tlaku (Middelberg, 1995). Chemický způsob využívá permeability buněčné membrány, která je propustná pro řadu chemických činidel. Enzymatické narušení buňky pak spočívá v enzymatickém rozmělnění proteinů např. pomocí proteinázy K nebo stěpení polysacharidové části bakteriálního peptidoglykanu pomocí lysozymu (Andrews & Asenjo, 1987). Běžně se využívají lyzační roztoky, obsahující činidla, která buňku lyzují, poté denaturují uvolněný nukleoprotein a současně inaktivují nukleázy (Geciova et al., 2002).

Součástí lyzačních roztoků bývá kombinace několika chemických činidel:

- Detergenty, jako např. sodium dodecylsulfát (SDS), které rozvolňují hydrofobní interakce v lipidové dvojvrstvě plasmatické membrány (Helenius et al., 1979).
- Chelatační činidla, která vychytávají dvoj- a trojmocné ionty z roztoku. Tyto ionty jsou esenciálními kofaktory nukleáz a jejich odstraněním z roztoku tak chelatační činidlo chrání NK před degradací. V praxi se jako chelatační činidlo využívá např. EDTA (kyselina etylendiamintetraoctová) (Vaara, 1992) nebo komerčně dostupný roztok Chelex (Singer-Sam et al., 1989).
- Chaotropní činidla, jako např. GuSCN (guanidium thiokyanát), narušují stabilizující intramolekulární interakce a tím rozpouštějí buněčnou membránu. (Naglak et al., 1990). Jsou též silnými denaturačními činidly, které současně inaktivují nukleázy. Při jejich vysoké koncentraci NK adherují na sloučeniny křemíku (Boom et al., 1990, Chirgwin et al., 1979, Mason et al., 2003).
- Nepochopitelná organická rozpouštědla, jako např. fenol denaturují proteiny a následně je extrahují (Sambrook & Russell, 2001).
- Hydroxidy (NaOH) způsobují alkalickou hydrolýzu buňky (Birnbom & Doly, 1979)

V praxi se často využívá kombinace mechanického narušení a chemické lýzy. Lýza buněk bývá často doplněna o teplotní denaturaci, kdy za zvýšené teploty 45-100 °C dochází k rozvolnění nukleoproteinu (Naglák et al., 1990).

3.4.3 Extrakce NK

Jakmile se NK uvolní z vazby na proteiny, je nutná její extrakce z buněčného lyzátu. V současné době existuje několik metod extrakce NK. Tyto metody lze obecně rozdělit dle principu na extrakci pomocí organických činidel a na extrakci na bázi adsorpce na pevné částice.

3.4.3.1. Extrakce pomocí organických činidel

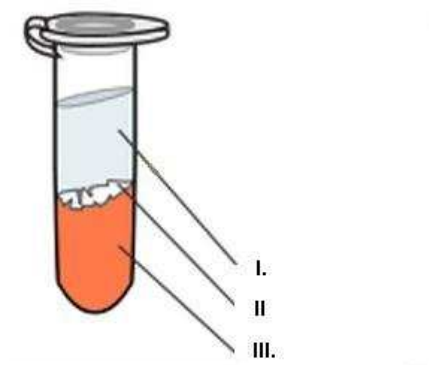
Fenol-chloroformová metoda

Metoda pracuje na principu rozdílu v hydrofobicitě mezi NK a proteiny. Po přidání hydrofóbního organického činidla (fenolu a chloroformu) se vzorek rozdělí na dvě fáze. Je-li pH organického roztoku rovno 4, RNA se přednostně udržují ve vodné fázi a DNA v mezifázi. Při extrakci DNA se pH nastavuje na hodnotu kolem 7 a do vodné fáze potom přechází RNA i DNA. Proteiny zůstávají ve spodní organické fenol-chloroformové fázi bez ohledu na pH roztoku (Kirby, 1957).

Fenol efektivně denaturuje proteiny, avšak není schopen úplně inaktivovat nukleázy. Proto se k fenolu přidává chloroform a isoamyl alkohol v poměru 25:24:1. Následnou centrifugací dojde k rozdělení emulze na dvě složky na základě rozdílu v hydrofobicitě: proteiny, lipidy, sacharidy a buněčné zbytky zůstávají v organické spodní vrstvě, zatímco v horní polární „vodné“ vrstvě zůstávají NK. Horní vrstva obsahující NK se odebere, aby přítomná NK mohla být precipitována etanolem či isopropanolem (poměru 2:1; 1:1). Precipitace etanolem nebo isopropanolem umožňuje převedení NK do malého objemu roztoku a přečištění od zbytků fenolu a chloroformu. Vzniklý precipitát je zachycen pomocí centrifugace v podobě peletu. K odstranění přebytečných proteinů se pelet promývá 70% etanolem. Následuje centrifugace a supernatant je poté odstraněn. Pelet obsahující NK je rozpuštěn v pufru TE (Tris - EDTA) nebo ve sterilní destilované vodě (Sambrook & Russell, 2001, Tan & Yiap, 2009).

Tato metoda byla modifikována použitím chaotropního činidla o vysoké koncentraci – 4 M guanidium isothokyanátu umožňuje simultánní extrakci DNA a RNA z jednoho vzorku.

RNA se vyskytuje v horní vodné fázi, zatímco DNA v mezifázi a zbylé proteiny zůstávají v dolní organické fázi (Obr. 5). Zvlášť odebereme jednotlivé fáze tj. horní fázi s RNA a mezifázi s DNA. V obou případech následuje precipitace etanolem/isopropanolem (Chomczynski, 1993). Existuje několik komerčně dostupných roztoků umožňující modifikovanou fenol-chloroformovou extrakci: TRIzol^R Reagent, Invitrogen (Simms et al., 1993); TRI reagent, Molecular Research Center (www.mrcgene.com/tri.htm).



Obr. 5 Fenol-chloroformová extrakce, rozdělení roztoku na jednotlivé fáze; I. vodná fáze obsahující RNA, II. mezifáze obsahující DNA, III. organická fáze obsahující proteiny, převzato a upraveno z www.enotes.com

Alkalická extrakce

Alkalická extrakce je metoda využívající silný anionogenní detergent SDS a nízké pH. Metoda se úspěšně používá zejména k izolaci plazmidů z bakterií. Alkalická lýza rozruší párování bází, vlákna cirkulární plazmidové DNA se však od sebe neoddělí, protože zůstanou topologicky propletena. Poté, když zvýšíme pH, snadno renaturují narozdíl od genomické DNA. Denaturovaná DNA, proteiny a zbytky buněčných kompartmentů jsou propleteny do velkých komplexů a obaleny SDS. Po odstranění denaturovaného materiálu centrifugací získáme plazmidovou DNA ze supernatantu (Birnboim & Doly, 1979, Sambrook & Russell, 2001).

Extrakční metoda využívající CTAB

Kationogenní detergent cetyltrimethylammonium bromid (CTAB) je schopen z roztoku precipitovat NK a polysacharidy se slabými iontovými vazbami. Užívá se při extrakci nukleových kyselin u organismů, které produkují velké množství polysacharidů – u rostlin a Gram-negativních bakterií. Součástí metody je alkoholová precipitace a centrifugace s

cílem získat pelet s NK, který se následně rozpustí v pufru TE nebo ve sterilní destilované vodě (Sambrook & Russell, 2001).

3.4.3.2. Purifikace NK pomocí pevného nosiče

Pod pojmem pevný nosič rozumíme pevné částice připravené z různých materiálů, které svou podstatou mohou mít afinitu k cílové molekule (např. celulóza k NK (Su & Comeau, 1999)) nebo jsou na ně molekuly s afinitou k cílovým molekulám navázány (např. využití vysoké afinity streptavidinu k biotinu) (Berensmeier, 2006, Nargessi, 2005). V praxi se často setkáváme s pevným nosičem v podobě magnetických kuliček tzv. „magnetic bead“, fungujících na principu afinitivní imobilizace biomolekul na paramagnetických čisticích. Tyto částice se stávají magnetickými v magnetickém poli, ale tuto vlastnost ztrácejí, jakmile je z magnetického pole vyjmeme. Paramagnetické částice tedy slouží jako pevný nosič. Na něm jsou navázány ligandy mající afinitu k cílové molekule v našem případě k NK. Řada firem poskytuje magnetické kuličky v rámci svých kitů, užívaných pro řadu aplikací (Kostecka et al., 2008, Tan & Yiap, 2009).

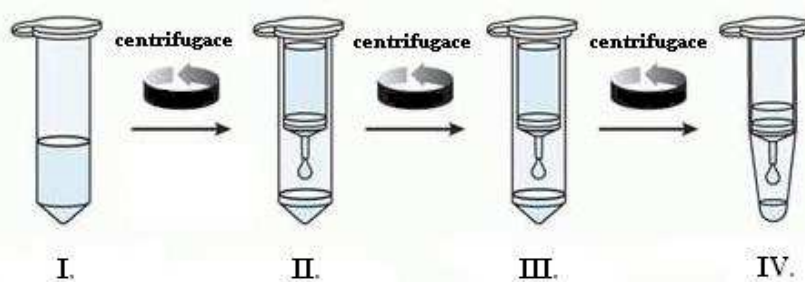
Extrakce adsorbci na pevné částice oxidu křemičitého

Metoda využívá principu selektivního navázání NK na křemík v prostředí s vysokou koncentrací chaotropních činidla. Následně je NK uvolňována z vazby na křemík v prostředí o nižší koncentraci chaotropního činidla. Jako sůl se nejčastěji využívá guanidium thiokynát či guanidium hydrochlorid, které během extrakce též inaktivují nukleázy (Boom et al., 1990).

Tato metoda je nejčastěji aplikována v kolonkách, jejichž součástí je filtr z oxidu křemičitého. Průchod vzorku a pufrů filtrem je zajištěn pomocí centrifugace nebo vakuové filtrace (Tan & Yiap, 2009).

Proces lze obecně shrnout do tří kroků (Obr. 6):

1. adsorpce na filtr
2. promývání filtru
3. eluce vzorku



Obr. 6 Schéma procesu purifikace NK pomocí adsorbce na filtr (silikamembránu) v kolonce; I. ošetření vzorku pomocí lyzačního pufru, II. navázání NK na filtr v kolonce, III. promývání filtru, IV. eluce vzorku, převzato a upraveno z www.tools.invitrogen.com

Prvotním krokem je úprava podmínek v kolonce tak, aby docházelo k adsorpci vzorku na filtr. Vhodné pH zajistí příslušný pufr. Vzorek se na kolonku nanáší poté, co byl lyzován lyzačním pufrem. NK adsorbuje na filtr v prostředí „vázebného“ pufru. Ten obsahuje vysoké koncentrace solí a má vysoké pH. Poté promýváme filtr z důvodu odstranění nežádoucích proteinů na něj navázaných. Součástí promývacích pufrů bývá nejčastěji 80% alkohol. NK je uvolňována z vazby na filtr pomocí elučního pufru obsahujícího nízkou či nulovou koncentraci solí. Eluce může být prováděna též sterilní vodou (Kojima & Ozawa, 2005, Tan & Yiap, 2009). Jako pevná částice se místo křemičitého filtru používá např. sklo ve formě prášku nebo kuliček, využívané při izolaci DNA z agarózového gelu (Dederich et al., 2002). Jednobuněčné řasy rozsivky obsahující více jak 94% křemíku bývají využívány při purifikaci plazmidové DNA (Little, 1991).

3.5 Real-time polymerázová řetězová reakce (PCR)

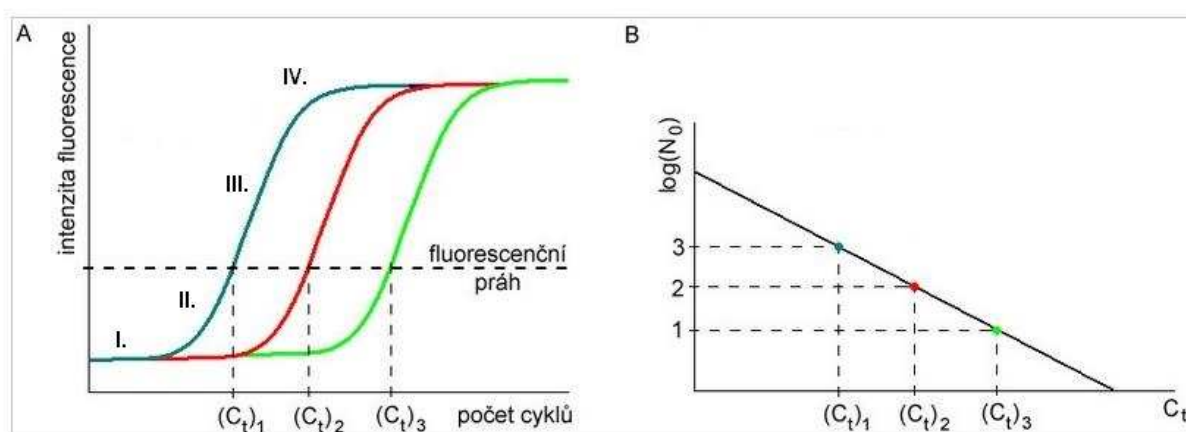
Real-time PCR je molekulární metoda umožňující kvantifikaci cílové DNA molekuly. Podobně jako při klasické PCR, dochází k enzymatické amplifikaci DNA *in vitro*. Výsledný produkt je detekován, namísto až po proběhnutí celé reakce, v reálném čase bezprostředně po svém vzniku během jednotlivých amplifikačních cyklů. To činí tuto metodu rychlejší a citlivější. Další výhodou oproti klasické PCR je, že odpadá nutnost postamplifikační manipulace se vzorkem, čímž se snižuje riziko kontaminace s tím spojené.

Pomocí real-time PCR můžeme detekovat též RNA. Samotné real-time PCR však musí předcházet reverzní transkripci (RT), která pomocí reverzní transkriptázy, enzymu retrovirového původu, přepíše RNA na cDNA. V tom případě se jedná o real-time RT-PCR. Metoda se využívá zejména pro genové expresní analýzy, ale také například v diagnostice RNA virů (Bustin, 2000).

3.5.1 Princip real-time PCR

Při real-time PCR detekujeme množství hromadícího se amplifikovaného produktu v reakci zaznamenáváním fluorescence. Do reakce se přidávají fluorescenční barviva, značené primery nebo sondy, jejichž fluorescenční signál, detekovaný v každém cyklu, odráží množství PCR produktu přítomného v reakci. Fluorescence je měřena během každého cyklu pomocí speciálního optického systému v termocycleru. Přístrojový software současně získaná data analyzuje a zpracovává a výsledkem je graf amplifikační křivky, zaznamenávající nárůst fluorescence (osa y) v závislosti na počtu jednotlivých cyklů PCR reakce (osa x). Křivka má typický sigmoidní tvar a několikafázový průběh. Na počátku není detekován nárůst fluorescence z důvodu nerozpoznání signálu oproti pozadí. V přítomnosti dostatečného množství templátu začne křivka exponenciálně růst, za ideálních podmínek dochází k nárůstu o log 10 každé 3 cykly. Poté se reakce v důsledku nahromadění inhibitorů PCR reakce zpomaluje, dochází k vyčerpání polymerázy, primerů, nukleotidů. Křivka přechází do fáze plató, kdy již není naměřen žádný nárůst fluorescence. Cyklus, ve kterém hodnota fluorescence překročí stanovenou mez, se nazývá „threshold cycle“ (C_t). Hodnoty C_t závisí na počátečním množství templátu (Obr. 7). Čím větším množstvím templátu je v reakci na počátku, tím dříve je nárůst fluorescence detekován a tím nižší je hodnota C_t (Bustin, 2000, Mackay et al., 2002).

Amplikon můžeme detekovat dvěma způsoby, nespecificky nebo specificky (Mackay, 2004).



Obr. 7 Průběh real-time PCR reakce; A – Jednotlivé fáze amplifikace, I. fáze, kdy není detekován nárůst fluorescence, II. fáze exponenciální, III. fáze lineární, IV. fáze plató, B – Kalibrační křivka, C_t – threshold cycle, N_0 – výchozí koncentrace, převzato a upraveno z www.generi-biotech.com, Real-time PCR kvantifikace

3.5.2 Nespecifická detekce amplikonu

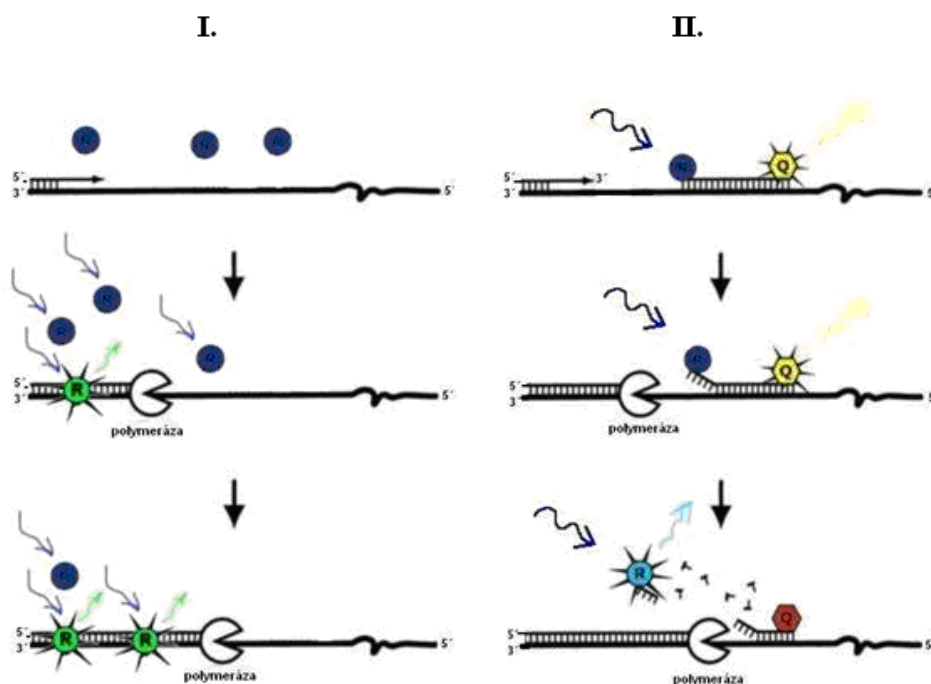
Tato varianta real-time PCR využívá fluorescenční interkalační barviva (např. SYBR Green I, ethidium bromid), která se váží do malého žlábků nově vznikajících amplikonů při extenzi primerů bez ohledu na sekvenci vznikajícího produktu. Fluorescenční signál se zvyšuje se vzrůstajícím množstvím PCR amplikonů. Výhodou tohoto přístupu je jednoduchý návrh a provedení reakce a nízká pořizovací cena. Nevýhodou je nemožnost využití v tzv. „multiplex“ reakcích (reakce s několika páry primerů). Vzhledem k nespecifitě vazby může docházet k navázání na nespecifické PCR produkty či dimery primerů a tím ke zkreslení výsledků (Higuchi et al., 1992, Higuchi et al., 1993, Mackay et al., 2002).

3.5.3 Specifická detekce amplikonu

Pro sekvencně specifickou detekci se používají sondy nebo primery komplementární k žádané sekvenci, které mají ve své struktuře fluorescenčně značené oligonukleotidy. Ke značení se používají specifické molekuly fluoroforů emitujících světlo určité vlnové délky po předchozí absorpci světla odlišné vlnové délky. Vyzářená vlnová délka světla je vždy vyšší než absorbovaná. Existuje několik přístupů fluorescenčního značení založených na různých principech. Nevýhodou specifické detekce je vyšší finanční nákladnost vzhledem k specifickému návrhu sond. (Mackay, 2004).

Mezi nejčastější princip specifické detekce patří dvojitě značené oligonukleotidy, označované též jako sondy, které na sobě nesou v blízkosti molekuly fluorescenčního zářiče a tzv. zhášече. Využívá se zde principu fluorescenčně rezonančního přenosu energie (FRET). Zářením o určité vlnové délce (dle typů fluoroforů) dochází k excitaci zářiče, která vede k emisi záření, jehož část je pohlcena zhášечem. Je-li zářič v dosahu vlivu zhášече, ten zabrání jeho fluorescenci. Jsou-li tyto dvě molekuly od sebe odděleny dochází k emisi fluorescence. V praxi se setkáváme např. se značením zářiče na 5' konci pomocí fluoroforu 6-FAM (6-karboxy-fluorescein) a zhášечem na 3' konci pomocí fluoroforu TAMRA (6-karboxy-tetramethyl-rhodamin). K dosažení optimálního zhášení je potřeba, aby se absorpční spektrum zhášече překrývalo s emisním spektrem zářiče (Logan et al., 2009). Mezi nejpoužívanější dvojitě značené sondy patří hydrolyzační sonda TaqMan. Při nasedání na templát sonda hybridizuje s cílovou sekvencí Taq DNA polymeráza v průběhu syntézy nového vlákna, postupně nahrazuje a hydrolyzuje sondu díky své 5' exonukleázové aktivitě. Zářič se tak dostává z vlivu zhášече a vyzařuje energii v podobě fluorescence. Následně je

z vlákna vytěsněna i část sondy nesoucí zhášec. Po denaturaci vláken DNA na jedno z nich opět specificky nasedne další volná sonda a celý proces se opakuje (Mackay et al., 2002) (Obr. 8).



Obr. 8 Princip detekce aplikonu během real-time PCR reakce; R – zářič (reporter), Q – zhášec (quencher), **I.** - nespecifická detekce pomocí interkalačního barviva, **II.** - specifická detekce pomocí TaqMan sondy, upraveno dle Mackay et al. (2004).

Modifikací dvojité značených oligonukleotidů jsou vlásenkové sondy, někdy též označované jako tzv. molekulární majáky. V přítomnosti specifické komplementární sekvence sonda hybridizuje a otvírá se do lineární konformace (Tyagi et al., 1998). Mezi další možnosti specifické detekce můžeme zařadit pár přiléhajících značených oligonukleotidů, známé též jako „HybProbes“ nebo „kissing probes“ (Wittwer et al., 1997). Oligonukleotid na 3' konci funguje jako donor a sonda je na 5' konci značena akceptorovým fluoroforem. Dojde-li k hybridizaci obou sond, jsou lokalizovány v těsné blízkosti (Mackay et al., 2002, Wittwer et al., 1997). Pro specifickou detekci amplikonu mohou též sloužit specificky fluorescenčně značené primery, sloužící současně jako sonda, např. Scorpions[®], AmpliFluor[™] (Hernández et al., 2004, Whitcombe et al., 1999).

3.5.4 Detekce patogenů v klíšťatech

Detekce patogenů v klíšťatech je důležitým nástrojem epidemiologických studií včetně epidemiologické surveillance neboli bdělosti neboli „surve. Tento pojem shrnuje komplexní a soustavné získávání všech dostupných informací o výskytu určitého onemocnění (v našem

případě klíšťové encefalitidy, lymeské boreliózy) a faktorů zevního prostředí, které toto onemocnění ovlivňují (Raška, 1983).

Mapy výskytu klíštěcích patogenů jsou většinou vytvářeny podle evidence klinických případů onemocnění. Je ovšem těžké přesně identifikovat lokalitu, kde došlo k přísátí infikovaného klíštěte. Navíc jsou systémy založené na evidenci klinických případů ovlivňovány mírou aktivity člověka v daných oblastech či postinfekční či postvakcinační imunitou populace. Proto je výhodné zmapovat rizika výskytu klíšťaty přenášených patogenů pomocí detekce jejich NK přímo z klíšťat (Daniel et al., 2006). Díky vyšetřování klíšťat jsme schopni zjistit prevalenci těchto patogenů v klíšťatech a zmapovat tak přírodní ohniska nákazy. Zmapování přírodních ohnisek výskytu klíštěcích patogenů má preventivní přínos pro obyvatele a návštěvníky v dotčených lokalitách (Bröker & Gniel, 2003). Pomocí detekce patogenů z klíšťat byla např. zjištěna infikovaná klíšťata i v oblastech městské zeleně nebo příměstských parků (Vavrušková, 2010).

S objevem PCR se tato molekulárně-biologická metoda začala využívat v epidemiologických průzkumech zabývajících se detekcí patogenů v klíšťatech. Velkou výhodou této detekční metoda byla její citlivost a rychlost (Ramelow et al., 1993). Umožňovala také například v rámci detekce VKE vyhnout se použití laboratorních zvířat, protože již nebylo zapotřebí izolovat virus pomocí inokulace do mozků sajících myšek (Puchhammer-Stöckl et al., 1995).

Další vývoj přinesl objev real-time PCR, která umožňuje ještě rychlejší a citlivější detekci patogenů v klíšťatech bez nutnosti vizualizace výsledků pomocí gelové elektroforézy. Její výhodou je manipulace s větším počtem vzorků a možnost určit jak prevalenci, tak také intenzitu nákazy klíšťatech a to i v případech nízkého množství patogena v klíštěti. Real-time PCR též umožňuje detekovat v klíštěti větší počet patogenů např. *Francisella tularensis*, *Ehrlichia phagocytophalla*, *Borrelia burgdorferi* s.l., virus klíšťové encefalitidy (Leutenegger et al., 1999, Wang et al., 2003, Wicki et al., 2000). Metoda se využívá i pro detekci NK klíštěcí patogenů v patientských vzorcích (Schwaiger & Cassinotti, 2003, Schwaiger et al., 2001).

4 Materiál a metody

4.1 Virus a bakterie

V experimentální části byl použit virus klíšťové encefalitidy (dále VKE), kmen Neudoerfl. Jedná se o prototypový kmen evropského subtypu, který byl izolován v roce 1971 v Rakousku z klíšťe *Ixodes ricinus* (Mandl et al., 1988). Virus byl uchováván ve formě 20% mozkové suspenze při -70°C . Jde o čtvrtou pasáž viru v mozcích sajících myšek.

V práci byly použity bakterie *Borrelia burgdorferi* s.s. kmen B31 (dále jen *B. burgdorferi*), jednalo se o nejvýše 16. pasáž borélií v kompletním mediu BSK-H (Sigma Aldrich).

S patogeny a izolovanými nukleovými kyselinami bylo manipulováno sterilně v bezpečnostním boxu s laminárním prouděním (Telstar-Bioultra, třída II.).

4.2 Klíšťata

Pro účely diplomové práce byla použita klíšťata druhu *I. ricinus* jednak z volné přírody a i klíšťata z laboratorních chovů.

Pro stanovení citlivosti izolačních metod pro detekci klíšťecích patogenů byla použita klíšťata *I. ricinus* (stadia nymf a dospělců) nasbíraná vlnkáním v okolí Českých Budějovic. Z klíšťat byl připraven homogenát, který byl přidáván k ředícím řadám testovacích vzorků.

Pro arteficiální infekci klíšťat VKE a spirochétou *B. burgdorferi* byly použity nymfy a dospělé samice *I. ricinus* z chovů Parazitologického ústavu BC AVČR, v.v.i., České Budějovice. Klíšťata byla chována ve standardizovaných podmínkách při vlhkosti 96 %, teplotě 24°C a světelný režim byl nastaven na 15 hodin světla /9 hodin tmy. Použitá klíšťata byla první generací odchovanou v laboratoři, pocházela ze snůšek dospělých samic odchycených v přírodě.

4.3 Příprava homogenátu klíšťat

Vzorky tkání jsou obtížným výchozím materiálem pro detekci patogenů, neboť je v tkáních přítomna řada látek, které mohou inhibovat detekci patogenů pomocí PCR. Pro přiblížení našeho testování reálné detekci patogenů z klíšťat byl do vyšetřovaného vzorku přimíchán homogenát klíšťat. Ten byl vytvořený z nymf a dospělců klíšťe *I. ricinus* nasbíraných v přírodě.

Klíšťata byla rozdělena do homogenizačních zkumavek po pěti dospělých, popř. po deseti nymfách a bylo k nim přidáno 150 μ l PBS (phosphate buffered saline; 137mM NaCl, 2,7mM KCl, 1,5 mM KH_2PO_4 , 8,1mM Na_2HPO_4 ; pH 7,3). Následně byla do každé homogenizační zkumavky umístěna ocelová kulička o průměru 5 mm. Homogenizace proběhla v homogenizátoru TissueLyser II (Qiagen) 2 minuty při 30 Hz. Vzniklý homogenát byl uchován pro následné pokusy při -70°C .

Dále byla testována homogenizace podle protokolu Crowdera et al. (2010), která využívá speciálních kuliček, vyrobených z yttria stabilizovaného oxidem zirkonia. Homogenizace byla provedena ve speciálních homogenizačních zkumavkách (Sarstedt), jejichž součástí byly výše zmíněné kuličky o průměru 2,0 mm (Glen Mills). Do homogenizační zkumavky bylo přidáno 150 μ l PBS a 5 dospělých samic/10 nymf *I. ricinus* na zkumavku. Homogenizace proběhla v homogenizátoru 2 minuty při 30 Hz.

4.4 Testovací vzorky a příprava ředících řad

Pro stanovení detekčního limitu jednotlivých metod extrakce NK byly ze zásobních vzorků VKE a spirochéty *B. burgdorferi* zhotoveny desítkové ředící řady (kalibrační řady) s klesající koncentrací, zvláště pro VKE a zvláště pro *B. burgdorferi*. Koncentrace zásobních vzorků činila u viru KE 2×10^7 PFU/ml, u spirochéty *B. burgdorferi* 10^8 bakteriálních buněk/ml.

Testovací vzorky vznikly smícháním 40 μ l klíštěcího homogenátu s 10 μ l vzorků o jednotlivých ředěních. Výsledkem bylo 8 testovacích vzorků pro virus KE o koncentraci 4×10^6 -0,4 PFU/ml a 8 testovacích vzorků pro spirochétu *B. burgdorferi* o koncentraci 2×10^7 -2 bakterie/ml.

Pro testování metod izolace umožňujících simultánní extrakci DNA a RNA byla připravena ze zásobních vzorků (koncentrace viz výše) desítková ředící řada o klesající koncentraci obou patogenů. V jednotlivých zkumavkách bylo smícháno 40 μ l homogenátu, 10 μ l od každého ředění z desítkové ředící řady VKE o klesající koncentraci a 10 μ l od každého ředění z desítkové ředící řady spirochéty *B. burgdorferi* o klesající koncentraci

Výsledkem bylo 8 směsných testovacích vzorků obsahujících $3,3 \times 10^6$ PFU/ml KE a $1,67 \times 10^7$ bakterií/ml *B. burgdorferi* až 0,3 PFU/ml KE a 1,67 bakterií/ml *B. burgdorferi*.

4.5 Metody extrakce nukleových kyselin

Do každé metody bylo vždy použito 12,5 μ l z testovacího vzorku. Pro VKE tedy vždy vstupovalo do extrakční reakce množství 5×10^4 - 5×10^3 PFU. Pro spirochétu *B. burgdorferi* do každé extrakční metody vždy vstupovalo $2,5 \times 10^5$ - $2,5 \times 10^2$ bakterií. Při každé

extrakční metodě byla připravena negativní kontrola, obsahující 12,5 µl homogenátu bez přídavku VKE nebo borélií. Po extrakci byly všechny vzorky NK uskladněny při teplotě -70°C.

4.5.1 Extrakce pomocí suspenze Chelex® 100 Resin (Bio-Rad)

Metoda extrakce nukleových kyselin pomocí pryskyřice Chelex® je založena na principu vychytání dvoj- a trojmocných iontů, jež slouží jako kofaktory nukleáz, které by mohly degradovat NK ve vzorku. Zároveň, díky alkalickému pH v roztoku, dochází k narušení buněčných membrán a k uvolnění NK (Sweet et al., 1996, Walsh et al., 1991). Pro extrakci testovacích vzorků bylo použito 10% (w/v) roztoku Chelex® v pufru TE (10mM Tris-HCl a 1 mM EDTA, pH 8,0). Roztok byl rozplněn po 400 µl do 1,5 ml mikrozkušavek. Poté bylo k roztoku přidáno 12,5 µl od každého testovacího vzorku. Vzorky byly inkubovány přes noc při teplotě 56 °C za mírného míchání v termálním bloku (Mixing block MB-102, Bioer). Poté byly vzorky promíchány protřepáním (vortexováním) a následně inkubovány 10 minut při 98°C. Po krátké centrifugaci byl odebrán vzniklý supernatant o objemu 250-350 µl.

Dále byl testován modifikovaný postup extrakce. Pro zvýšení citlivosti byla extrakce suspenzí Chelex® 100 Resin rozšířena o ošetření proteinázou K (Qiagen). Ke každému vzorku bylo společně se suspenzí Chelex® přidáno 25 µl proteinázy K (20 mg/ml), její inaktivace proběhla při závěrečné inkubaci při 100°C po dobu 10 minut.

Extrakce pomocí pryskyřice Chelex® umožňuje simultánní izolaci DNA i RNA a proto byla zařazena pro testování simultánní extrakce nukleových kyselin testovacích vzorků obou patogenů.

4.5.2 Extrakce pomocí hydroxidu amonného

Metoda extrakce nukleových kyselin pomocí hydroxidu amonného je založena na alkalické hydrolýze testovaného vzorku. Byl zvolen postup podle protokolu Guye a Stanka (Guy & Stanek, 1991). K 12,5 µl testovacího vzorku bylo přidáno 100 µl 0,7M hydroxidu amonného. Vzorky byly zahřívány po dobu 15 minut při 100°C. Po zchlazení na laboratorní teplotu, byly vzorky ponechány otevřené v termálním bloku při 100 °C po dobu 15 min, aby se ze vzorku odpařil amoniak. V průběhu této inkubace byl termální blok umístěn v boxu s laminárním prouděním. Pro úplné odstranění amoniaku byly vzorky dosušeny ve vakuu po dobu maximálně 30 minut. Poté byly vzorky rozmíchány v 50 µl sterilní DEPC (diethyl pyrokarbonátem) ošetřené vody.

Tato metoda byla zvolena pro zpracování testovacích vzorků obou patogenů, tedy pro VKE i spirochéty *B. burgdorferi*.

4.5.3 Extrakce pomocí RNAGEM™ Tissue (ZyGEM)

Tento kit byl původně vyvinut k rychlé extrakci RNA ze savčích tkání. Součástí kitu je kromě pufrů i speciální roztok RNAGEM™. Jedná se o směs reagensů, umožňující efektivní lýzu buněk, odstranění nukleáz a současně proteolytické ošetření templátu. Postup byl proveden přesně podle manuálu výrobce (www.zygem.com). Po 12,5 µl z každého testovacího vzorku bylo smícháno s RNAGEM™ a pufrém SILVER. Vzorek byl doplněn sterilní DEPC vodou do 50 µl. Poté byly vzorky promíchány a inkubovány při 75°C po dobu 5 min. Následně bylo ke každému vzorku přidáno 5 µl pufru. Konečný objem každého vzorku tedy činil 55 µl.

Metoda byla použita pro extrakci nukleových kyselin z testovacích vzorků obou mnou zkoumaných patogenů, pro VKE i spirochéty *B. burgdorferi*.

4.5.4 Fenol-chloroformová extrakce RNA – TRIzol® Reagent (Invitrogen)

Jedná se o modifikaci fenol-chloroformové metody extrakce využívající komerčně dostupný roztok TRIzol® Reagent. Ten obsahuje chaotropní činidlo, guanidin isothiokyanát, způsobující inaktivaci nukleáz a denaturaci nukleoproteinu.

Metoda byla provedena podle protokolu výrobce (www.invitrogen.com). Po 12,5 µl testovacího vzorku bylo doplněno na 100 µl pomocí PBS. Vzorek byl smíchán s 300 µl roztoku TRIzol® Reagent. Následně bylo přidáno 60 µl chloroformu a vzorek byl centrifugován 15 min při 12 000xg čímž došlo k rozdělení suspenze na tři fáze. Horní vodní bezbarvá fáze obsahující RNA byla odebrána do nové 1,5 ml mikrozkušavky. RNA byla z odsátého roztoku precipitována pomocí 150 µl 100% isopropanolu (vychlazený na -20°C). Poté byly vzorky opakovaně promývány 300 µl 75% etanolu (vychlazený na -20°C), sušeny po dobu 45 min při pokojové teplotě v boxu s laminárním prouděním a poté rozpuštěny v 50 µl sterilní DEPC vody.

Z interfáze a spodní fáze byla precipitována DNA stejným způsobem jako RNA (viz výše). Na závěr byla DNA rozpuštěna v 50 µl sterilní DEPC vody.

Metoda umožňuje extrakci RNA i DNA, byly jí proto izolovány testovací vzorky obou zkoumaných patogenů.

4.5.5 Purifikační metody založené na adsorpci na silikagel

S metodou se setkáváme nejčastěji v podobě komerčních kitů, využívajících pro izolaci nukleových kyselin kolonky s náplní silikagelu (oxidu křemičitého). V přítomnosti pufru obsahujícího vysokou koncentraci chaotropního činidla (nejčastěji guanidin thiokyanát) se NK aktivně váže na membránu, po odstranění chaotropního činidla se NK uvolní do roztoku. Průchod vzorku membránou je zajištěn pomocí centrifugace či vakuové filtrace (Tan & Yiap, 2009).

4.5.5.1. RTP® DNA/RNA Virus Mini kit (Invitex)

Purifikace byla provedena přesně podle pokynů výrobce (www.invitex.de). Po 12,5 µl z každého testovacího vzorku bylo smícháno se 187,5 µl PBS. Objem vzorku byl doplněn do 400 µl sterilní DEPC vodou. Vzorek byl přenesen do mikrozkušavky obsahující lyzační činidlo, proteinázu K a nosičovou RNA (RNA carrier – zajišťuje adsorpci NK na membránu v kolonce). Dále byl přidán vazebný pufr a směs byla přenesena do kolonky. Po promytí pufru R1 a R2 byla NK eluována pomocí 60 µl elučního pufru R.

Kit umožňuje simultánní izolaci RNA i DNA, byly jí proto zpracovány oba mnou zkoumané patogeny.

4.5.5.2. Perfect Pure™ RNA Cell & Tissue (5 Prime)

Purifikace byla provedena přesně podle návodu výrobce (www.5prime.com). Po 12,5 µl z každého testovacího vzorku bylo přidáno ke 400 µl lyzačního roztoku, předem smíchaného se 4 µl 0,5 M TCEP (tris(2-karboxyetyl)fosfin), který slouží jako inhibitor nukleáz. Vzniklý vzorek byl přenesen do přečišťovací kolonky, která pomocí centrifugace vzorek zbavila nežádoucích zbytků buněk. Následně byla nezachycená frakce přemístěna do purifikační kolonky. Po promytí od znečišťujících látek byla NK z kolonky eluována 80 µl elučního roztoku.

Kit je určen pro purifikaci celkové RNA z buněk, v našem případě byla otestována purifikace RNA viru KE.

4.5.5.3. NucleoSpin® RNA Virus (Macherey-Nagel)

Purifikace byla provedena v souladu s pokyny výrobce (www.mn-net.com). Po 12,5 µl z každého testovacího vzorku bylo smícháno se 137,5 µl PBS a pufrem RAV1 s nosičovou RNA. Vzorek byl přenesen na kolonku a promýván. Nejdříve došlo k vymytí inhibitorů PCR reakce pomocí pufru RAW. Následovalo 2x promytí pufrem RAV3, který odstranil zbylé kontaminanty. Vzorek byl z kolonky eluován do 50 µl DEPC ošetřené vody, předehřáté na 70°C.

Kit byl použit na purifikaci RNA VKE.

4.5.5.4. QIAamp® Viral RNA Mini Kit (Qiagen)

Purifikace byla provedena přesně podle manuálu výrobce (www.qiagen.com). Ke 12,5 µl od každého modelového vzorku bylo přidáno po 127,5 µl PBS. Vzniklý roztok byl smíchán s pufrem AVL obsahujícím nosičovou RNA. Po přidání čistého etanolu byl roztok přenesen na QIAamp® Viral kolonku. Následovalo vymývání kontaminant pufrů AW1 a AW2. Poté byl vzorek eluován z kolonky pomocí 2 x 40 µl elučního pufru AVE.

Kit je určen pro purifikaci virové RNA, byla jím extrahována RNA VKE.

4.5.5.5. RNeasy Mini Kit (Qiagen)

Purifikace byla provedena dle pokynů výrobce (www.qiagen.com). Z každého testovacího vzorku bylo odebráno 12,5 µl a smícháno s 600 µl lyzačního pufru RTL. Po centrifugaci při maximální otáčkách byl vzniklý supernatant odebrán a přenesen do nových zkumavek. K supernatantu bylo přidáno 600 µl 70% etanolu, vzniklý roztok byl přenesen do RNeasy kolonky. Následovalo vymývání kontaminant pomocí pufrů RW1 a RPE. Nakonec byl vzorek z kolonky eluován 2 x 40 µl DEPC ošetřené vody.

Kit je určen pro purifikaci celkové RNA z živočišných buněk a tkání, z bakterií a kvasinek. Kitem jsem purifikovala RNA VKE.

4.5.5.6. DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen)

Purifikace byla provedena dle návodu výrobce (www.qiagen.com). Po 12,5 µl z každého testovacího vzorku bylo pomocí PBS doplněno na objem 200 µl. Vzorek byl smíchán s pufrem AL a proteinázou K. Během inkubace při 56°C po dobu 1-3 hodiny docházelo k lýze buněk. Následně byl přidáván čistý etanol a vzorek byl přenesen do DNeasy kolonky. Poté následovalo promývání pufrů AW1 a AW2. Eluce DNA z kolonky byla provedena 200 µl pufru AE.

Kitem byla purifikována DNA spirochéty *B. burgdorferi*.

4.5.5.7. Metoda podle Crowder et al. 2010 využívající reagentie z kitů QIAamp® Viral RNA Mini Kit (Qiagen) a DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen)

Tato metoda využívá reagentie z výše zmíněných kitů a používá je k simultánní izolaci DNA a RNA z klíšťat. Pro homogenizaci využívá speciální kuličky (viz Kapitola 4.4). Pro porovnání jaký vliv má způsob homogenizace na účinnost extrakce nukleových kyselin byla metoda izolace podle Crowdera (Crowder et al., 2010) provedena také s homogenizací pomocí ocelových kuliček.

Byly vytvořeny dvě sady testovacích vzorků. Vzorky desítkových ředících řad pro oba patogeny (virus KE a spirochéty *B. burgdorferi*, Kap. 4.4) byly smíchány s homogenátem vytvořeným homogenizací klíšťat ocelovými kuličkami (jedna sada testovacích vzorků) nebo pomocí speciálních kuliček (druhá sada testovacích vzorků) (kap. 4.3). Každá sada byla zvlášť izolována podle metody Crowder et al. (2010).

Průběh izolace byl následující. Byla připravena směs ATL pufru, proteinázy K a nosičové RNA, která byla rozplněna po 450 μ l. Ke směsi bylo přidáno 12,5 μ l od každého směšného testovacího vzorku a 400 μ l pufru AL a vše bylo inkubováno při laboratorní teplotě po dobu 10 min. Ke vzorku bylo přidáno 480 μ l čistého etanolu a směs byla inkubována 5 min při laboratorní teplotě. Následně byl vzorek přenesen do DNeasy Mini spin kolonky, která byla posléze promývána 500 μ l pufru AW1, 500 μ l pufru AW2 a 500 μ l etanolu. Eluce vzorku z kolonky byla provedena 200 μ l pufru AVE.

4.5.6 Kombinace extrakčních metod

Dalším možným přístupem jak docílit simultánní izolace jak DNA, tak RNA z téhož vzorku současně, je kombinace použití chaotropních pufrů v kombinaci s izolačními kolonkami (Triant & Whitehead, 2009). Tento přístup umožňuje simultánní extrakci RNA viru KE a DNA spirochéty *B. burgdorferi* ze vzorků klíšťat. Do extrakce bylo použito 12,5 μ l testovacích vzorků ze směšné ředící řady (Kap. 4.4.).

4.5.7 Extrakce suspenze Chelex® 100 Resin (BioRad) a přečištění přes QIAamp® Viral kolonku z QIAamp® Viral RNA Mini Kitu (Qiagen)

Nejprve byla provedena extrakce NK z 12,5 μ l z testovacích vzorků pomocí suspenze Chelex® (Kap. 4.5.1). Po extrakci bylo 140 μ l získaného supernatantu smícháno s 560 μ l etanolu. Vzniklý roztok byl nanesen na QIAamp® QIAamp® Viral kolonku. Následovalo promývání kolonky přesně podle manuálu výrobce (Kap. 4.5.5.4). Finální objem vzorku činil 80 μ l.

4.5.8 Extrakce pufrům Chelex® 100 Resin (BioRad) a přečištění přes RNeasy kolonku z RNeasy Mini Kitu (Qiagen)

Po extrakci pomocí suspenze Chelex® 100 Resin (Kap. 4.5.1) bylo 140 μ l supernatantu z extrakce smícháno s 560 μ l etanolu (70%). Vzniklý roztok byl přenesen na RNeasy kolonku, která je součástí RNeasy Mini kitu. Následovalo promývání kolonky přesně podle instrukcí výrobce (Kap. 4.5.5.5). Finální objem vzorku po eluci činil 80 μ l.

4.5.9 Extrakce pomocí TRIzol® Reagent (Invitrogen) a přečištění přes QIAamp® Viral a RNeasy kolonku (Qiagen)

Během extrakce pomocí TRIzol® Reagent, kdy se suspenze rozdělila na fáze byla na QIAamp® Viral kolonku přepipetována horní vodná fáze, obsahující RNA VKE. Pro extrakci DNA *B. burgdorferi* byla použita RNeasy kolonka, na kterou byla přenesena dolní fáze.

Při dalším testovaném postupu bylo 12,5 µl z každého testovacího vzorku doplněno do 100 µl pomocí PBS. Vzorek byl smíchán s 300 µl roztoku TRIzol® Reagent. Poté bylo k vzniklému roztoku přidáno 60 µl chloroformu a centrifugací 15 minut při 12 000xg se roztok rozdělil na tři fáze. RNA z horní fáze i DNA ze interfáze a spodní fáze byly precipitovány (Kap. 4.5.4). RNA z horní fáze byla přemístěna na QIAamp® Viral kolonku. Následovalo promývání kolonky přesně podle manuálu výrobce pro QIAamp® Viral RNA Mini kitu (Kap. 4.5.5.4). Finální objem vzorku činil 80 µl.

Precipitovaná DNA ze spodní fáze, byla přepipetována na RNeasy kolonku. Následovalo vymývání kontaminant z kolonky podle instrukcí výrobce (Kap. 4.5.5.5). Konečný objem vzorku činil 80 µl.

Tab. 2 Shrnutí použitých extrakčních metod.

Metoda extrakce	Homogenizace	RNA VKE	DNA Bor	RNA VKE + DNA Bor	Výsledný objem vzorku (μl)	Faktor ředění *
Chelex® 100 Resin	ocel. kuličky	●	●		300	24 x
hydroxid amonný	ocel. kuličky		●		50	4 x
RNAGEM™ Tissue	ocel. kuličky			●	55	3,6 x
TRIzol® Reagent	ocel. kuličky	●	●		50	4 x
RTP® DNA/RNA Virus Mini KIT	ocel. kuličky			●	60	4 x
Perfect Pure™ RNA Cell & Tissue	ocel. kuličky	●			80	6,4 x
NucleoSpin® RNA Virus	ocel. kuličky	●			50	4 x
QIAamp® Viral RNA Mini Kit	ocel. kuličky	●			80	6,4 x
Rneasy Mini Kit	ocel. kuličky	●			80	6,4 x
DNeasy Blood & Tissue Kit	ocel. kuličky		●		200	16 x
Crowder et al. 2010	ocel. kuličky			●	200	13,3 x
Crowder et al. 2010	yttriové kuličky			●	200	13,3 x
Chelex® 100 Resin + QIAamp® Viral kolonka	ocel. kuličky			●	80	5,3 x
Chelex® 100 Resin + RNeasy kolonka	ocel. kuličky			●	80	5,3 x
TRIzol® Reagent+ QIAamp® Viral kolonka	ocel. kuličky			●	80	5,3 x
TRIzol® Reagent + Rneasy kolonka	ocel. kuličky			●	80	5,3 x

* Přepočtení zohledňující naředění vzorku během extrakční metody; podíl koncentrace ve vzorku před extrakcí a po extrakci

Bor = *Borrelia burgdorferi*

VKE = virus klíšťové encefalitidy

4.6 Metody detekce patogenů

4.6.1 Reverzní transkripce (RT)

Detekci RNA VKE předcházela reverzní transkripce, která přepisuje templátovou RNA na cDNA („complementary DNA“). Byl použit kit RevertAidTM H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas). Postup byl proveden přesně podle instrukcí výrobce (www.fermentas.com). Do reakce byly použity 2 μ l templátové RNA. Jako primery byly použity náhodné hexanukleotidy (Fermentas). Získaná cDNA (25 μ l) byla uchována při -70°C a sloužila jako templát pro následnou amplifikaci.

4.6.2 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Amplifikace DNA *B. burgdorferi* a cDNA VKE byla provedena pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR). Jako templát byly použity 4 μ l DNA/cDNA z každé izolační metody či z RT. Reakční směs o celkovém objemu 25 μ l byla připravena z 12,5 μ l Combi PPP Master Mixu (Top-Bio) (75 mM Tris-HCl; pH 8,8; 20 mM (NH₄)₂SO₄; 0,01% Tween20; 2,5 mM MgCl₂; 200 μ M ATP; 200 μ M CTP; 200 μ M DTP; 200 μ M dTTP; 2,5 U Taq purple DNA polymerázy, 38nM monoklonální protilátka anti-Taq; stabilizátory a aditiva); forward a reverse primeru odpovídajících konkrétnímu patogenu v množství uvedeném v Tab. 5 a DEPC ošetřené vody (Top-Bio). PCR reakce probíhala v automatickém termálním cycleru GenePro (Bioer) anebo Uno II (Biometra) za následujících podmínek:

1. počáteční denaturace 95°C/10 min.
2. denaturace 95°C/15 s
nasedání primerů 60°C/30 s
elongace 72°C/30 s
35 cyklů
3. udržovací teplota 14°C

PCR produkty z reakce byly vizualizovány elektroforetickou separací v agarózovém gelu v pufru TAE (40 mM Tris-acetát, 2 mM EDTA, pH 8,3; Merck). Byl použit 1,7% agarózový gel pro PCR produkt *B. burgdorferi* a 2% agarózový gel pro PCR produkt viru KE. Po 13 μ l vzorku bylo smícháno s 3,2 μ l nanášecího pufru 5x Orange DNA Loading Dye (Fermentas) s 5x koncentrovaným barvivem SYBR Green I (Invitrogen). Vzorky byly naneseny do jamek gelu a poté byla provedena elektroforetická separace při 100 V/60 min. Výsledek byl pozorován při osvětlení UV zářením na transluminátoru.

4.6.3 Real-time PCR

Další detekční metodou byla real-time PCR. Real-time PCR reakce o finálním objemu 25 µl obsahovala 12,5 µl Probe qPCR Master Mixu 2x ((NH₄)₂SO₄, MgCl₂, KCl; dNTPs, Hot Start Taq DNA polymeráza; přesné složení není výrobcem uváděno) (Fermentas), forward a reverse primery o příslušné koncentraci (Tab. 5), hydrolyzační TaqMan sondy (Tab. 5) a 4 µl templátové DNA či cDNA a DEPC ošetřená voda. Reakce byla provedena v termálním cyklieru Rotor Gene 3000 (Corbett Research) za těchto podmínek:

1. denaturace 95 °C/10 min.
2. denaturace 95 °C/15 s
3. nasedání primerů, elongace 60 °C/60 s

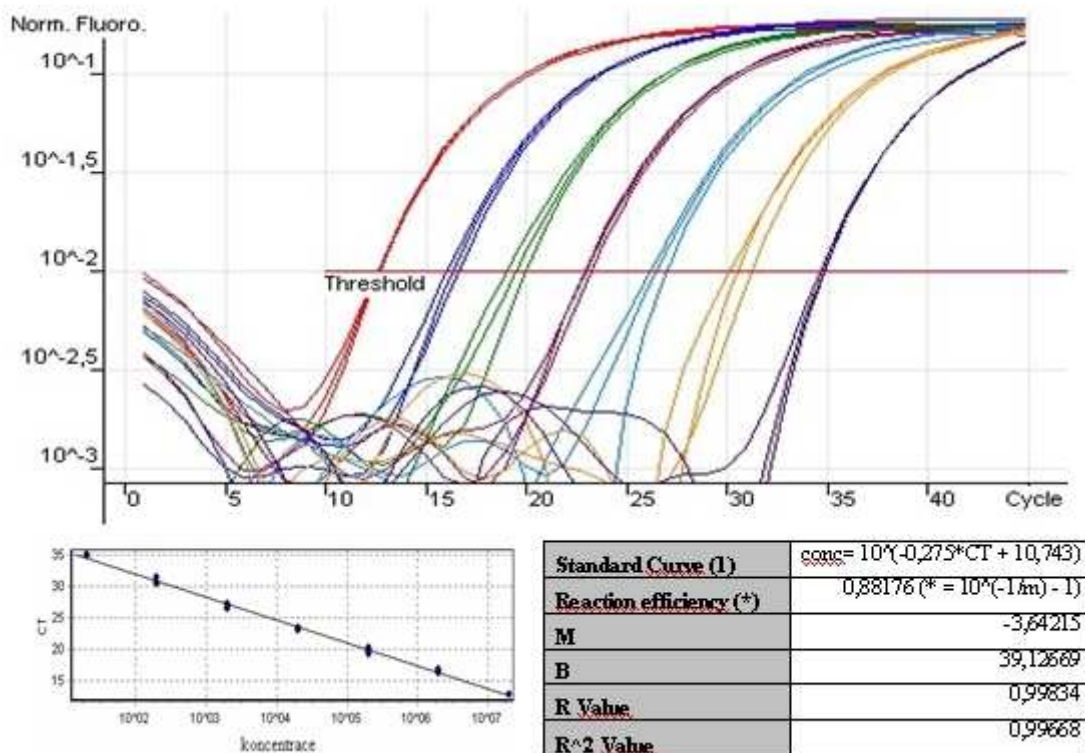
45 cyklů pro detekci VKE

40 cyklů pro detekci spirochéty *B. burgdorferi*

Koncentraci DNA/cDNA v jednotlivých vzorcích je možno odvodit srovnáním s řadou standardních vzorků (kalibrační křivka) o známé koncentraci. Pro detekci VKE jako kalibrační křivka posloužila desítková ředící řada cDNA viru KE o koncentraci 2,8x10⁶-2,8x10⁻¹ PFU/ml. RNA viru KE, kmen Neudoerfl, byla extrahována ze 140 µl virové mozkové suspenze o titru 2x10⁷ PFU/ml pomocí kitu QIAamp® Viral RNA Mini Kit a 2 µl byly přepsány reverzní transkripcí na cDNA. Pro spirochétu *B. burgdorferi* představovala kalibrační křivku desítkově ředěná DNA o klesající koncentraci odpovídající 2x10⁷-20 buněk/ml. DNA byla extrahována z 200 µl suspenze buněk o koncentraci 10⁸ bakterií/ml pomocí kitu DNeasy Blood & Tissue Kit.

V každé kvantifikační reakci byl přítomen vybraný vzorek z kalibrační křivky o příslušné koncentraci (tzv. kalibrátor). Ten umožňoval přímé porovnání vzorku s kalibrační křivkou, která byla provedena v separátní reakci.

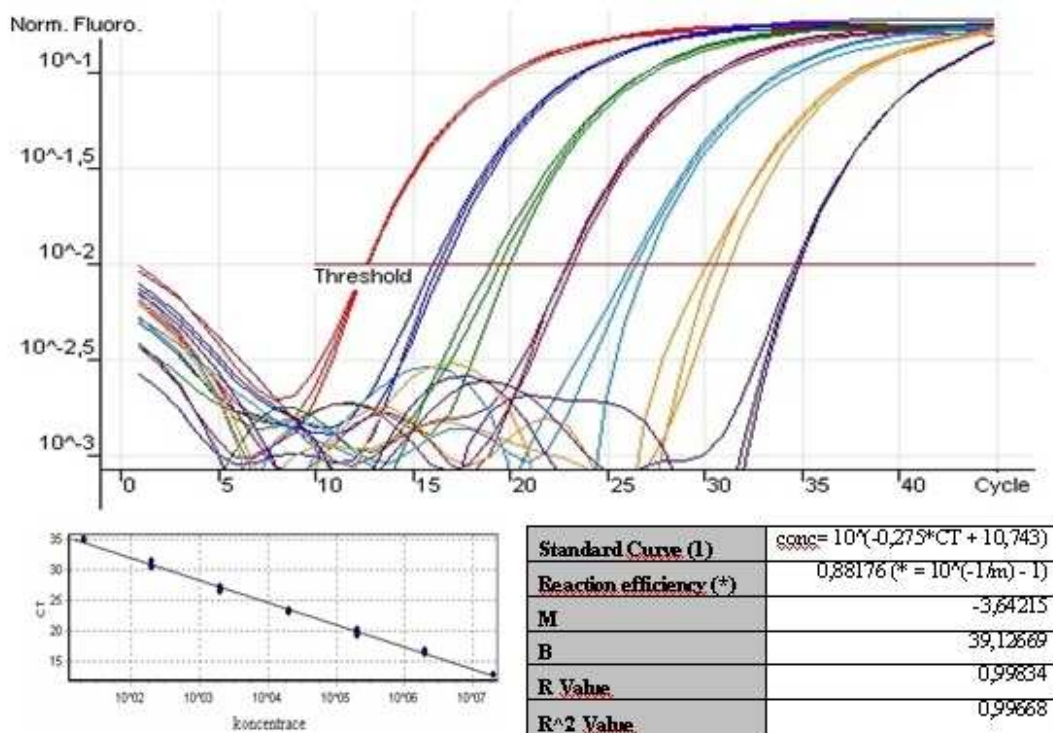
Testovací vzorky i vzorky kalibračních křivek byly analyzovány v triplikacích. Do každé reakce byla zahrnuta také negativní kontrola. Výsledky byly analyzovány pomocí softwaru Rotor Gene 5.0 (Corbett Research).



Obř. 9 Profil real-time PCR kalibrační křivky pro VKE. Barvy jednotlivých křivek odpovídají barevným kódům v tabulce 3.

Tab. 3 Naměřené hodnoty kalibrační křivky pro VKE.

BARVA	NÁZEV	TYP	Ct	ZADANÁ KONC (kopie/reakce)	ZJIŠTĚNA KONC (kopie/reakce)	% VAR
Red	-1	Standard	19,75	2 800 000,00	3 101 143,51	10,80%
	-1	Standard	18,88	2 800 000,00	5 576 084,11	99,10%
	-1	Standard	18,52	2 800 000,00	7 122 449,14	154,40%
Blue	-2	Standard	23,46	280 000,00	254 689,39	9,00%
	-2	Standard	23,74	280 000,00	210 606,61	24,80%
	-2	Standard	23,44	280 000,00	257 825,49	7,90%
Green	-3	Standard	27,28	28 000,00	19 422,14	30,60%
	-3	Standard	27,19	28 000,00	20 632,87	26,30%
	-3	Standard	26,82	28 000,00	26 316,87	6,00%
Magenta	-4	Standard	30,8	2 800,00	1 807,95	35,40%
	-4	Standard	31,42	2 800,00	1 189,12	57,50%
	-4	Standard	30,94	2 800,00	1 638,15	41,50%
Cyan	-5	Standard	33,59	280	276,37	1,30%
	-5	Standard	33,82	280	236,4	15,60%
	-5	Standard	34,65	280	134,44	52,00%
Pink	-6	Standard	35,29	28	87,6	212,90%
	-6	Standard	35,39	28	82,1	193,20%
	-6	Standard		28		
Yellow	NTC	NTC				
	NTC	NTC				



Obr. 10 Profil real-time PCR kalibrační křivky pro *B. burgdorferi*. Barvy jednotlivých křivek odpovídají barevným kódům v tabulce 4.

Tab. 4 Naměřené hodnoty kalibrační křivky pro *B. burgdorferi*.

BARVA	NÁZEV	TYP	Ct	ZADANÁ KONC (kopie/reakce)	ZJIŠTĚNA KONC (kopie/reakce)	% VAR
Red	0	Standard	12,72	20 000 000,00	17 826 093,50	10,90%
	0	Standard	12,72	20 000 000,00	17 850 184,56	10,70%
	0	Standard	12,8	20 000 000,00	16 865 857,23	15,70%
Blue	-1	Standard	16,17	2 000 000,00	2 004 700,24	0,20%
	-1	Standard	16,75	2 000 000,00	1 394 031,77	30,30%
	-1	Standard	16,44	2 000 000,00	1 691 011,53	15,40%
Green	-2	Standard	20,08	200 000,00	169 544,89	15,20%
	-2	Standard	19,63	200 000,00	224 837,96	12,40%
	-2	Standard	19,13	200 000,00	309 236,61	54,60%
Purple	-3	Standard	23,07	20 000,00	25 663,43	28,30%
	-3	Standard	23,02	20 000,00	26 437,38	32,20%
	-3	Standard	23,36	20 000,00	21 299,70	6,50%
Cyan	-4	Standard	26,3	2 000,00	3 316,81	65,80%
	-4	Standard	27,09	2 000,00	2 020,52	1,00%
	-4	Standard	26,59	2 000,00	2 771,48	38,60%
Orange	-5	Standard	30,25	200	273,04	36,50%
	-5	Standard	30,61	200	217,61	8,80%
	-5	Standard	31,34	200	137,12	31,40%
Yellow	-6	Standard	34,76	20	15,78	21,10%
	-6	Standard	34,9	20	14,51	27,40%
	-6	Standard	34,95	20	14,01	29,90%
Yellow	NTC	NTC				
	NTC	NTC				

Tab.5 Charakteristika použitých primerů a TaqMan sond v PCR a real-time PCR

Patogen	Primer, sonda	Polarita	Sekvence (5'→3')	Poloha v genomu	Teplota nasedání (°C)	Velikost produktu (bp)	Koncentrace do reakce (nM)	Citace
Virus klíšťové encefalitidy	F-TBE 1	F	GGG CGG TTC TTG TTC TCC	11 054 -11071 *	60	68	50	Schwaiger and Cassinotti, 2003
	R-TBE 1	R	ACA CAT CAC CTC CTT GTC AGA CT	11099 - 11121 *	60	68	300	
	TBE-Probe-WT		BHQ1-TGA GCC ACC ATC ACC CAG ACA CA-FAM ****	11073-11095 *	60	x	200	
<i>Borrelia burgdorferi</i>	FlaF1A	F	AGC AAA TTT AGGTGC TTT CCA A	792 - 813 **	60	147	300	Schweiger et al, 2001
	Fla R1	R	GCA ATC ATT GCC ATT GCA GA	965 - 946 **	60	147	900	
	FlaProbe1		BHQ1-TGC TAC AAC CTC ATC TGT CAT TGT AGC ATC TTT TAT TTG-FAM ****	918 - 880 **	60	x	200	
	SL1	F	AAT AGG TCT AAT AAT AGC CTT AAT AGC	21 - 47 ***	65	308	400	Demaerschalck et al. 1995
	SL2	R	CTA GTG TTT TGC CAT CTT CTT TGA AAA	302-328 ***	65	308	400	

* Číslování pozice v genomu odpovídá viru KE , kmene Neudoerfl (accession number: U27495). Primery nasedají do 3' nekódující oblasti viru.

** Číslování pozice odpovídá genomové sekvenci genu kódujícího proteinu flagelin *Borrelia burgdorferi* sensu stricto kmen B31.(Flagellin gene sequence of *Borrelia burgdorferi* (GeHo) X15660

*** Číslování odpovídá genomové sekvenci genu ospA *Borrelia burgdorferi* sensu stricto kmen B31

**** duální značení sond BHQ1= black hole quencher-1, FAM= fluorescein

4.7 Reverse line blotting (RLB)

Metoda slouží k detekci a identifikaci genospecií *B. burgdorferi* sensu lato. Princip metody spočívá v hybridizaci značených PCR produktů se sadou genospecies-specifických oligonukleotidových sond kovalentně navázaných na membránu. Každá sonda je specifická k určité genospecii *B. burgdorferi* sensu lato.

Pomocí PCR je amplifikována část oblasti genomu borélií obsahující variabilní mezerník mezi dvěma tandemovými opakováními genů pro ribozomální RNA (rRNA) podjednotek 23S a 5S. Amplifikované produkty hybridizují za přesně specifikovaných podmínek se sondami navázanými na membránu. Po odmytí nespecificky navázaných produktů je díky označení jednoho z primerů biotinem možné detekovat hybridizovaný produkt pomocí chemiluminiscence.

Stanovována byla citlivost metody RLB pro detekci borélií. Jako templátová DNA byla využita testovací ředící řada *B. burgdorferi* sensu stricto kmen B31 (Kap.4.4) extrahovaná

pomocí Chelex® 100 Resin (Kap. 4.5.1). Použitá metoda RLB byla adaptována podle Gern et al., (2010).

Pro RLB byla použita membrána Biodyne® C (Pall Corporation) aktivovaná 10 minut při laboratorní teplotě v roztoku 16% EDAC (N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride) (Merck). Na aktivovanou membránu byly v miniblotteru naneseny 5' amino značené sondy (Tab. 6) předem naředěné na koncentraci 500 nM v roztoku 500 mM NaHCO₃ o pH 8,4. Sondy byly inkubovány 1 minutu při laboratorní teplotě, poté byla membrána inaktivována ve 100 mM NaOH po dobu 10 minut při laboratorní teplotě. Následovalo promývání membrány v roztoku 2x SSPE/0,1 % SDS po dobu 5 minut při 60°C. Poté byla membrána připravena k použití.

Byla namíchána PCR reakce s primery 23Sbor a 5Sbor (Tab. 6.). Amplifikační PCR směs o celkovém objemu 25 µl byla připravena z 12,5 µl Combi PPP Master Mixu (složení viz Kap. 4.6) 400 nM primerů a 10,5 µl vzorku. Amplifikační reakce probíhala v automatickém termálním cycleru Master cycler nebo Master cycler Gradient (Eppendorf) za následujících reakčních podmínek:

Počáteční denaturace 94°C/5 min

I. část programu – touch down PCR (9 cyklů)

1. Denaturace 94°C/20 s
2. Nasedání primerů 60°C/30 s – v každém následujícím cyklu se teplota nasedání snížila o 1 °C, dokud nedosáhne 52°C
3. Elongace 72°C/30 s

II. část programu – amplifikace (40 cyklů)

4. Denaturace 94°C/20 s
5. Nasedání primerů 52°C/30 s
6. Elongace 72°C/30 s

III. část programu

7. Finální elongace 72°C/7 min
8. Udržování při 14°C, dokud nebyly vzorky vyndány z cycleru

Značené PCR produkty byly ředěny v roztoku 2x SSPE/0,1 % SDS (20 µl produktu + 180 µl roztoku 2x SSPE/0,1 % SDS) a denaturovány po dobu 10 minut při 99°C. Denaturované vzorky byly ihned zchlazeny na ledu a membrána byla inkubována v 2x SSPE/0,1 % SDS 5 minut při laboratorní teplotě. Membrána byla uzavřena do blotteru tak, že sondy byly kolmo na sloty blotteru. Připravené vzorky byly naneseny do slotů. Poté

následovala hybridizace 60 minut při 42°C. Vzorke byly odsáty ze slotů a membrána byla promývána 2x v roztoku 2x SSPE/0,5 % SDS (170 ml H₂O, 20 ml 20x SSPE, 10 ml SDS 10 %) po 10 min. při 52°C. Poté byla membrána inkubována v roztoku konjugátu streptavidin-peroxidáza (2x SSPE/0,5 % SDS + 3 µl konjugátu) 30 minut při 42°C. Nakonec byla membrána promývána v roztoku 2x SSPE/0,5 % SDS 10 minut při 42°C a poté 2x v roztoku 2x SSPE po dobu 5 minut při laboratorní teplotě.

Hybridizovaná DNA byla na membráně detekována pomocí chemiluminiscenčního detekčního kitu ECL detection kit (GE Healthcare) podle instrukcí výrobce. K membráně byl v temné komoře přiložen citlivý film KODAK® (BioMax Light Film). Expozice probíhala po dobu 2 hodin. Film byl následně vyvolán standardním postupem.

Pro další použití byla membrána dehybridizována v 2x 30 min. v roztoku 1 % SDS (180 ml H₂O, 20 ml SDS 10 %) 80 °C a promyta v roztoku 20 mM EDTA o pH 8,0 po dobu 15 minut při laboratorní teplotě. Pro dlouhodobé skladování byla membrána uložena v plastovém sáčku při 4°C.

Tab. 6 Charakteristika použitých primerů a sond pro RLB.

Primery, próby	Cíl	Sekvence (5'→3')	Citace
23Sbor	<i>B. burgdorferi</i> s.l. (rrf-rrl spacer)	TCAGGGTACTTAGATGGTTCACCTT	(Alekseev et al., 2001)
5SBor	<i>B. burgdorferi</i> s.l. (rrf-rrl spacer)	5'-biot - GAGTTCGCGGGAGAGTAGGTTATT	Alekseev et al., 2001
SL	<i>B. burgdorferi</i> s.l.	5'-amino - CTTTGACCATATTTTTATCTTCCA	(Rijpkema et al., 1995)
SS	<i>B. burgdorferi</i> s.s.	5'-amino - ACACCAATATTTAAAAAACATAA	Rijpkema et al., 1995
AF	<i>B. afzelii</i>	5'-amino - AACATTTAAAAATAAATTCAAGG	Rijpkema et al., 1995
GA	<i>B. garinii</i>	5'-amino - AACATGAACATCTAAAAACATAAA	Rijpkema et al., 1995
GANE	<i>B. garinii</i>	5'-amino - CAAAAACATAAATATCTAAAAACATAA	Poupon et al., 2006
GANE1	<i>B. garinii</i>	5'-amino - AAAATCAATGTTTAAAGTATAAAAAT	Gern et al., 2010
VSNE	<i>B. valaisiana</i>	5'-amino - TATATCTTTTGTTCATCCATGT	Poupon et al., 2006
LUSINE	<i>B. garinii</i>	5'-amino - TCAAGATTTGAAGTATAAAAATAAA A	(Poupon et al., 2006)
LusiNE1	<i>B. garinii</i>	5'-amino - CATTCAAAAAATAAACATTTAAAAACAT	(Gern et al., 2010)
LusiNE2	<i>B. garinii</i>	5'-amino - AAATCAAACATTCAAAAAATAAAC	Gern et al., 2010
SpiNE2	<i>B. spielmanii</i>	5'-amino - GAATGGTTTATTCAAATAACATA	Gern et al., 2010
SpiNE3	<i>B. spielmanii</i>	5'-amino - GAATAAGCCATTTAAATAACATA	Gern et al., 2010
BisNE1	<i>B. bissettii</i>	5'-amino - AAACACTAACATTTAAAAAACAT	Gern et al., 2010
BisNE2	<i>B. bissettii</i>	5'-amino - AACTAACAAACATTTAAAAAACAT	Gern et al., 2010
RFLNE	Relapsing fever-like	5'-amino - CATTCCATTGATCAATGC	Gern et al., 2010

4.8 Infekce klíšťat inokulací

Nejcitlivější extrakční metody jsem otestovala na reálném vzorku klíšťat infikovaných *B. burgdorferi* a VKE. Vzhledem k prevalenci viru KE a *B. burgdorferi* v přírodě (v Jihočeském kraji: virus KE 1,2 %, spirochéty z komplexu *B. burgdorferi* s.l. 12,13 % (Hönig et al., 2011)) bych pro otestování metod musela vyšetřit příliš velký vzorek klíšťat z přírody,

abych získala dostatek údajů. Proto jsem se rozhodla pro uměle vytvořenou infekci klíšťat z laboratorního chovu. Tento přístup navíc přináší tu výhodu, že klíště je infikováno definovaným množstvím patogenu. Pro pokusy byly použity dospělé samice *I. ricinus* z chovů Parazitologického ústavu BC AVČR, v.v.i., České Budějovice (Kap. 4.2), které pocházely z první generace odchovanou v laboratoři a existoval u nich předpoklad, že jsou prostá infekce.

Pro ověření, že mnou použitá klíšťata nebyla infikována VKE nebo boréliemi, jsem vyšetřila 110 nymf (stejný původ jako dospělci) na přítomnost spirochéty *B. burgdorferi* a viru KE. 110 nymf z chovu bylo rozděleno do skupin po 10 a homogenizováno postupem (Kap. 4.3). Ze 12,5 µl homogenátu byla vyextrahována DNA pomocí Chelex® (Kap. 4.5.1), RNA pomocí *RNA GEM*™ Tissue (Kap. 4.5.3) Přítomnost viru a borelie byla ověřena standardní (RT-)PCR popsanou v kap. 4.6.

4.8.1 Inokulace

Klíšťata byla znehybněna přilepením na oboustrannou lepicí pásku na podložním sklíčku a byla umístěna pod binolupu (Motic). Infekce injikací byla provedena pomocí skleněné kapiláry napojené na injekční pumpu (Harvard Pump 11 Plus Single Syringe, Harvard Apparatus).

4.8.2 Inokulace virem klíšťové encefalitidy

Pro infekci VKE bylo injikováno 0,5 µl virové suspenze (infekční dávka 5000 PFU) do membrány lokalizované mezi coxa a trochanter druhého páru končetin (Obr. 11) .

Nejprve byla inokulována 3 klíšťata PBS. Tato klíšťata sloužila jako negativní kontrola inokulace. Poté bylo inokulováno 16 klíšťat virem KE. Z infikovaných klíšťat bylo náhodně vybráno 5, která sloužila jako pozitivní kontrola inokulace a která byla ihned zmrazena (-70°C) a uchována pro pozdější vyšetření. Zbývající klíšťata (11 infikovaných a 5 kontrolních) byla umístěna zpět do chovů. Po 10-ti dnech byla klíšťata, která přežila zamrazena (-70°C).

4.8.3 Inokulace spirochétami *Borrelia burgdorferi*

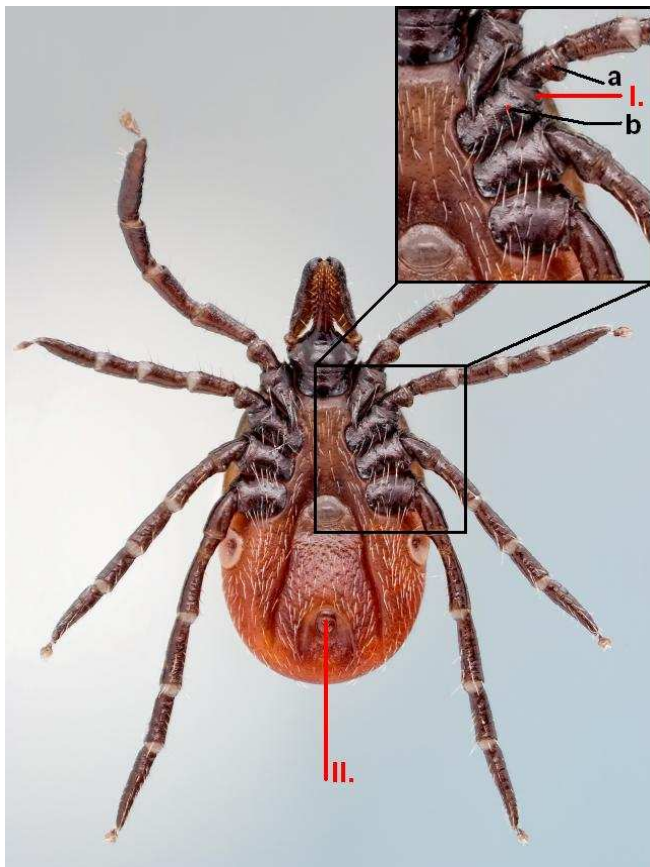
Do klíšťat bylo injikováno 0,3 µl bakteriální suspenze *B. burgdorferi* v médiu (koncentrace 10⁷ bakterií/ml; infekční dávka 3000 bakterií). Inokulace byla provedena do análního otvoru klíštěte (Obr. 11.).

Celkem bylo inokulováno 40 klíšťat. Nejdříve byla provedena inokulace 3 klíšťat BSK-H médiem. Tato klíšťata sloužila jako negativní kontrola inokulace a byla ponechána v klíštěcích chovech po dobu 21 dní. Bakteriální suspenzí *B. burgdorferi* bylo infikováno 37 klíšťat, která byla náhodně rozdělena do čtyř skupin. První skupina sloužila jako pozitivní

kontrola inokulace a byla ihned zamrazena. Zbývající tři skupiny byly umístěny do chovů a byly odebírány v definovaných časových intervalech a byl tak sledován průběh infekce boréliemi.

- 1. skupina - 5 klíšťat - pozitivní kontrola inokulace
- 2. skupina - 11 klíšťat - infekce po dobu 7 dní
- 3. skupina - 11 klíšťat - infekce po dobu 14 dní
- 4. skupina - 10 klíšťat - infekce po dobu 21 dní

Po uplynutí příslušných časových intervalů byli přeživší jedinci zamrazeni (-70°C).



Obr. 11 Dospělá samice *I. ricinus*, označena místa vpichu kapiláry při inokulaci. **I.** místo infekce VKE - do membrány lokalizované mezi a) trochanter a b) coxa; **II.** místo infekce spirochétami *B. burgdorferi* do řitního otvoru. Obrázek převzat a upraven z www.photomacrography.net.

4.8.4 Vyšetřování inokulovaných klíšťat

Inokulovaná zmrazená klíšťata byla rozdělena do zkumavek a individuálně zhomogenizována ocelovými kuličkami, postup (Kap. 4.3). Z homogenátů byla extrahována RNA (VKE) nebo DNA (*B. burgdorferi*). RNA byla přepsána reverzní transkripcí do cDNA.

Detekce proběhla pomocí PCR a real-time PCR. Pro vyšetření byly zvoleny tři metody pro virus a spirochétu, které byly v předchozích pokusech vyhodnoceny jako nejcitlivější.

Pro VKE byly zvoleny metody:

- purifikace pomocí QIAamp® Viral RNA Mini Kitu
- extrakce pomocí TRIzol® Reagent
- extrakce pomocí kitu RNAGEM™ Tissue

Pro spirochétu *B. burgdorferi* byly zvoleny metody:

- purifikace pomocí DNeasy Blood & Tissue Kitu
- extrakce pomocí suspenze Chelex® 100 Resin
- extrakce pomocí RNAGEM™ Tissue

5 Výsledky

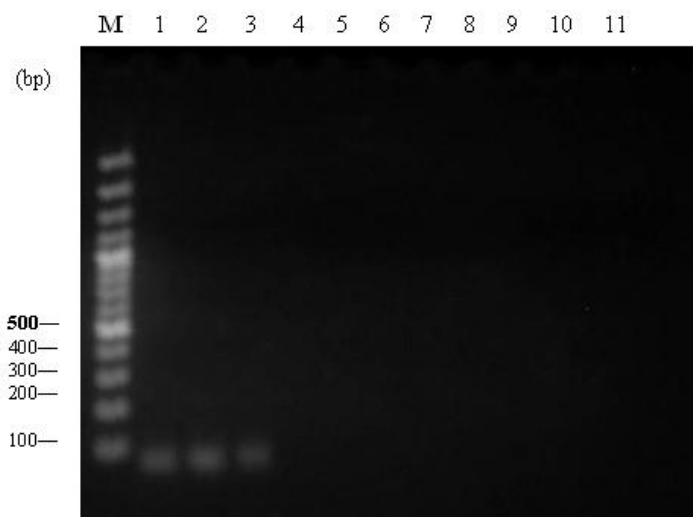
5.1 Porovnání účinnosti extrakčních metod

Jako pozitivní byly vyhodnoceny vzorky splňující následující kritéria:

- detekce produktu požadované velikosti v porovnání s negativní kontrolou po 35 amplifikačních cyklech při PCR reakci
- změna nárůst fluorescence alespoň o 15 % oproti počáteční fluorescenci, hodnota C_t menší než 35 cyklů a alespoň pro dva pozitivní vzorky z triplikace při real-time PCR reakci

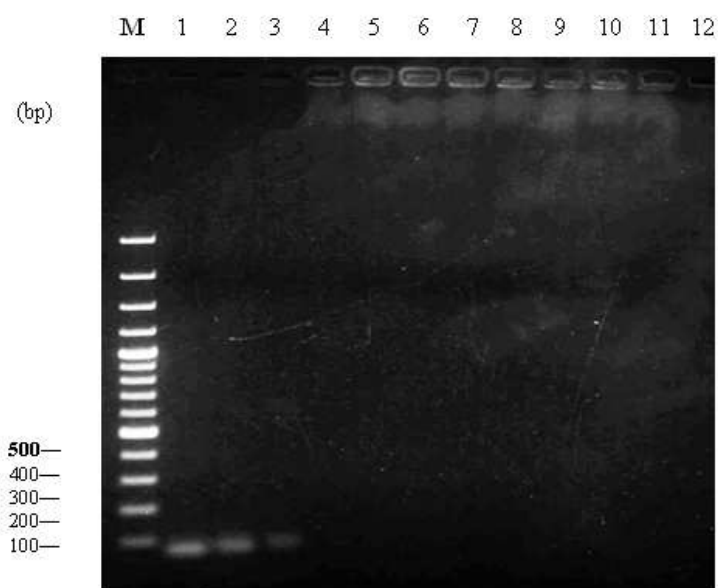
5.1.1 Metody extrakce RNA VKE

Extrakce RNA viru KE pomocí suspenze Chelex® 100 Resin je snadnou a jednoduchou metodou umožňující manipulaci s větším počtem vzorků. Z provedených experimentů vyplývá, že pro izolaci RNA VKE je tato metoda málo citlivá. Detekční limit podle našich výsledků byl v PCR reakci pouze 5×10^3 PFU/extakční reakci a v real-time PCR reakci 5×10^2 PFU/extakční reakci (Tab. 5). Přidání Proteinázy K k suspenzi Chelex® nevedlo ke zvýšení citlivosti, spíše naopak. RNA VKE se po přidání proteinázy K nepodařilo vyextrahovat vůbec. Extrakce RNA VKE pomocí hydroxidu amonného se nezdařila. PCR produkt nebyl detekovatelný v žádném z testovacích vzorků. Metoda extrakce vzorku pomocí kitu obsahujícího speciální roztok *RNAGEM*[™] umožňovala rychlou extrakci virové RNA s vysokou citlivostí, detekční limit v PCR reakci byl $4,1 \times 10^2$ PFU/extrakční reakce (Obr. 12), v real-time PCR reakci 4,1 PFU/extrakční reakce. V porovnání s ostatními extrakčními metodami patřila mezi nejcitlivější pro izolaci RNA VKE (Tab. 5).

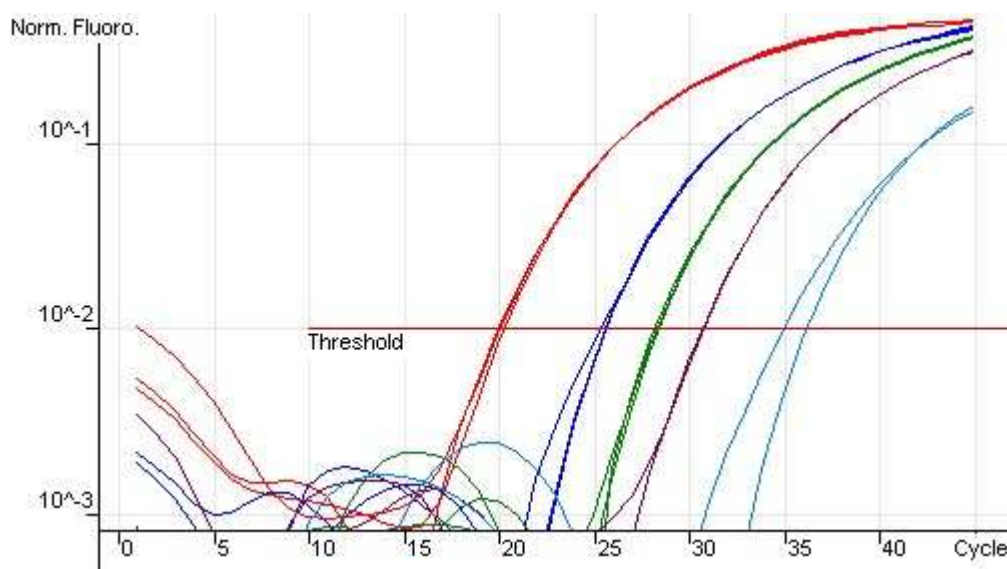


Obr. 12 Extrakce RNA VKE pomocí kitu *RNAGEM*TM a vliv na detekci pomocí PCR; M = marker, 1-8 ředící řada viru obsahující $4,1 \times 10^4$ - $4,1 \times 10^{-3}$ PFU, 9 – negativní kontrola z extrakce, 10 – negativní kontrola z RT, 11 – negativní kontrola z PCR reakce

Fenol-chloroformová extrakce pomocí komerčního roztoku TRIzol® Reagent byla velmi účinná pro izolaci RNA VKE a umožnila detekci i při malém množství viru. Detekční limit metody pro PCR reakci činil 5×10^2 PFU/extrakční reakci (Obr. 13) a v real-time PCR dokonce 5 PFU/extrakční reakci (Obr. 14). Tato extrakční metoda proto patřila mezi nejúčinnější metody extrakce RNA VKE (Tab. 7).

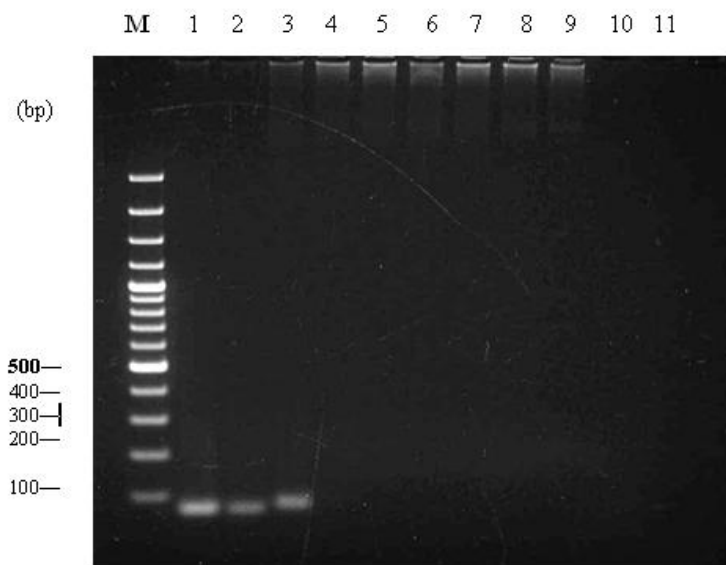


Obr. 13 Extrakce RNA VKE pomocí kitu TRIzol® Reagent a vliv na detekci pomocí PCR, M = marker, 1-8 ředící řada viru obsahující $5 \times 10^4 - 5 \times 10^3$ PFU/extrakční reakce, 9 – negativní kontrola z extrakce, 10 – negativní kontrola z RT, 11 – negativní kontrola z PCR reakce



Obr. 14 Průběh real-time PCR reakce pro extrakci RNA VKE pomocí kitu TRIzol® Reagent, pozitivní vzorky: ■ množství RNA 5×10^4 PFU/extrakční reakce, ■ množství RNA 5×10^3 PFU/extrakční reakce, ■ množství RNA 5×10^2 PFU/extrakční reakce, ■ množství RNA 50 PFU/extrakční reakce, ■ množství RNA 5 PFU/extrakční reakce

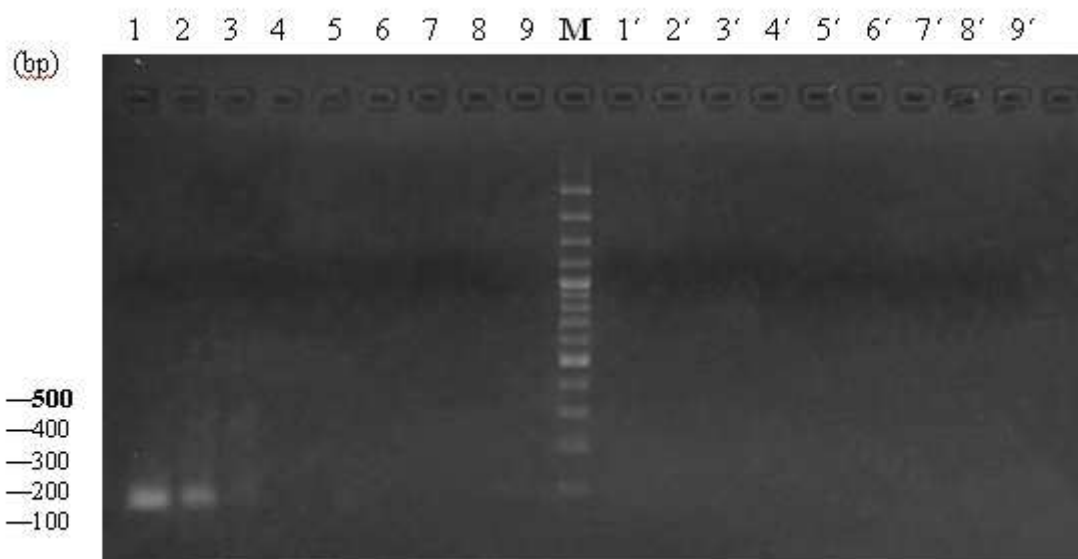
Metody, využívající komerční kity s membránou z oxidů křemíku, umožňují snadnou extrakci virové RNA. Jsou velmi často laboratorně používány, hlavně v podobě komerčních kitů. Z mnou testovaných kitů patřily mezi nejcitlivější kit QIAamp® Viral RNA Mini Kit (Obr. 15) a Rneasy Mini Kit s detekčním limitem 5×10^2 PFU/extrakční reakci v PCR reakci a v real-time PCR reakci 5 respektive 50 PFU/extrakční reakci. Srovnatelně citlivý vycházel RTP® DNA/RNA Virus Mini kit s detekčním limitem v PCR reakci $4,1 \times 10^2$ PFU/extrakční reakci a v real-time PCR 41 PFU/extrakční reakci. Nižší detekční limit byl zaznamenán u kitů Perfect Pure™ RNA Cell & Tissue a NucleoSpin® RNA Virus. Detekční limit obou těchto kitů činil pro PCR reakci 5×10^3 PFU/extrakční reakci. Vzhledem k nízké citlivosti těchto izolačních metod byla detekce pomocí real-time PCR provedena pouze pro kit Perfect Pure™ RNA Cell & Tissue. Detekčního limit tohoto kitu činil v real-time PCR 5×10^2 PFU/extrakční reakci (Tab. 7).



Obr. 15 Extrakce RNA VKE pomocí QIAamp® Viral RNA Mini Kit a vliv na detekci v PCR, M = marker, 1-8 ředící řada viru obsahující 5×10^4 – 5×10^3 PFU/extrakční reakce, 9 – negativní kontrola z extrakce, 10 – negativní kontrola z RT, 11 – negativní kontrola z PCR reakce

5.1.1.1. Kombinace metod extrakce RNA

Pokusila jsem se o zvýšení účinnosti extrakce kombinací extrakčních metod pracujících s hrubým lyzátem s izolací pomocí kolonky. Testováním kombinací extrakčních metod Chelex® 100 Resin + QIAamp® Viral kolonka a TRIzol® Reagent + QIAamp® Viral kolonka se, bohužel, nepodařilo zvýšit jejich detekční limit (Obr.16). Naopak, RNA VKE nebyla po extrakci kombinovanými metodami detekována vůbec (Tab. 7).



Obr. 16 Porovnání detekčního limitu extrakce RNA VKE; TRIzol® Reagent a TRIzol® Reagent + QIAamp® Viral kolonka. **1-8 vzorky** extrahované TRIzol® Reagent, desítková ředící řada o klesající koncentraci 5×10^4 - 5×10^{-3} PFU, 9 – negativní kontrola z extrakce. **1' - 8'** vzorky extrahované pomocí TRIzol® Reagent + QIAamp® Viral kolonka, desítková ředící řada o klesající koncentraci $4,1 \times 10^4$ - $4,1 \times 10^{-3}$ PFU, 9 –negativní kontrola z PCR.

Tab. 7 Detekční limity jednotlivých metod extrakce RNA VKE v PCR a real-time PCR reakci.

Metoda extrakce RNA	Množství zachycené pomocí PCR (PFU/extrakční reakci)	Množství zchycené pomocí real-time PCR (PFU/ extrakční reakci)
Chelex® 100 Resin	5×10^3	5×10^2
Chelex® 100 Resin + proteináza K	X	X
hydroxid amonný	X	X
RNAGEM™ Tissue PLUS	$4,1 \times 10^2$	4,1 *
TRIzol® Reagent	5×10^2	5 *
RTP® DNA/RNA Virus Mini KIT	$4,1 \times 10^2$	41
Perfect Pure™ RNA Cell & Tissue	5×10^3	5×10^2
NucleoSpin® RNA Virus	5×10^3	X
QIAamp® Viral RNA Mini Kit	5×10^2	5 *
RNeasy Mini Kit	5×10^2	50

Crowder et al. 2010 homogenát z ocel.kuliček	4,1x10 ³	41 *
Crowder et al. 2010 homogenát z kuliček ze spec.stabilizovaného yttria	4,1x10 ²	4,1 *
Chelex® 100 Resin + QIAamp® Viral kolonka	X	X
TRIzol® Reagent + QIAamp® Viral kolonka	X	X

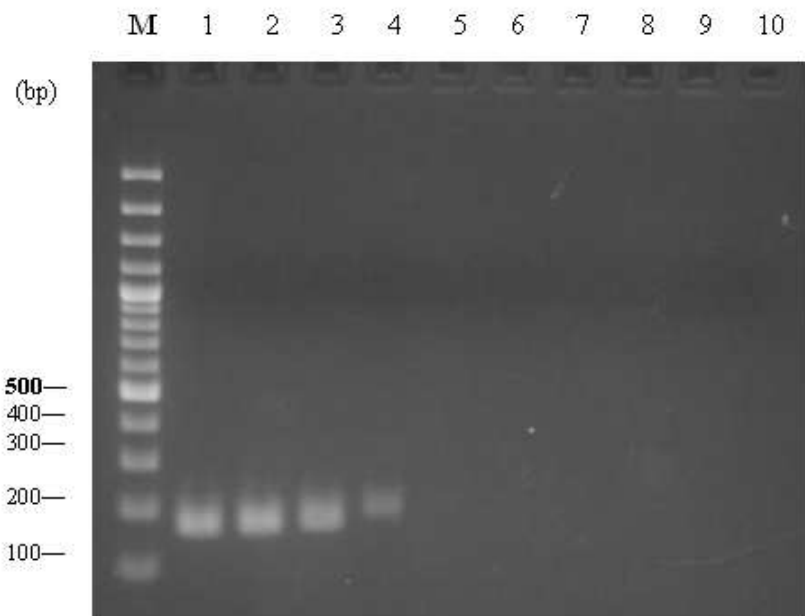
* nárůst fluorescence zaznamenán u 2 vzorků z triplikace

5.1.2 Metody extrakce DNA *Borrelia burgdorferi*

Testovala jsem několik extrakčních metod umožňující extrakci DNA *B. burgdorferi* Extrakce pomocí suspenze Chelex® vysokou citlivost, s detekčním limitem v PCR reakci 2,5x10² borélií/extrakční reakce, v real-time PCR 25 borélií/extrakční reakce (Tab. 6.) . V porovnání s ostatními metodami patřila tato metoda mezi nejcitlivější. O další zvýšení citlivosti jsem se pokusila modifikací, kdy byla k suspenzi Chelex® přidána proteináza K. Po přidání proteinázy K byl detekční limit v PCR reakci pro extrakci DNA *B. burgdorferi* snižen o 2 řády na 2,5x10⁴ borélií/extrakční reakce v PCR reakci. Detekční limit metody nebyl zkoumán pomocí real-time reakci vzhledem k její nízké citlivosti v PCR reakci.

Extrakce DNA *B. burgdorferi* hydroxidem amonným vykazovala vysokou citlivost, v porovnání s ostatními metodami. Detekční limit v PCR reakci činil 2,5x10² borelií/extrakční reakce (Tab. 6). Při pokusu detekovat boréliovou DNA pomocí real-time PCR nebyl zaznamenán žádný nárůst fluorescence v průběhu amplifikační reakce. Po ověření přítomnosti DNA pomocí opakované PCR reakce (specifické produkty byly přítomny), jsem vyvodila závěr, že tento způsob izolace nějakým způsobem interferoval s nárůstem fluorescence ve vzorcích při real-time PCR. Shodný výsledek jsem pozorovala i při opakováních, kdy byly důkladně odpařeny všechny zbytky amoniaku ze vzorků v exsikátoru.

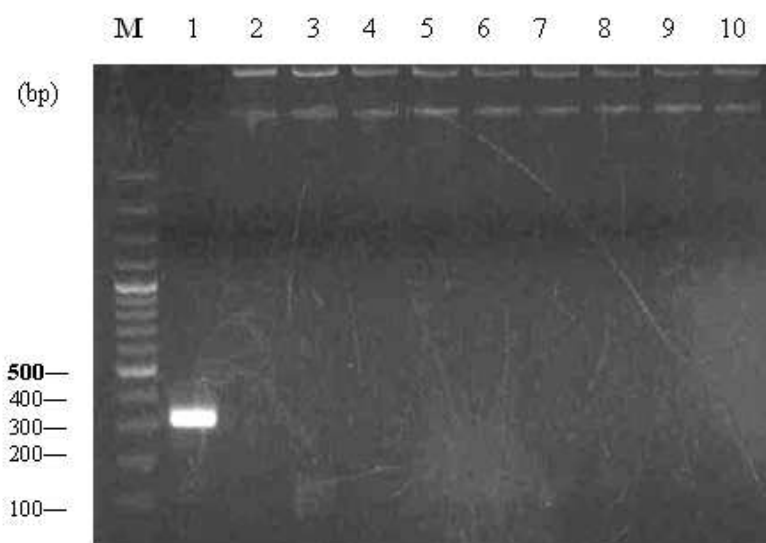
Extrakce DNA *B. burgdorferi* pomocí speciálního roztoku RNAGEM™ vykazovala vysokou citlivost, detekční limit metody v PCR činil 2x10² borélií/extrakční reakci (Obr. 17), v real-time PCR 20 borélií/extrakční reakce. Tato metoda patřila mezi nejcitlivější z testovaných metod.



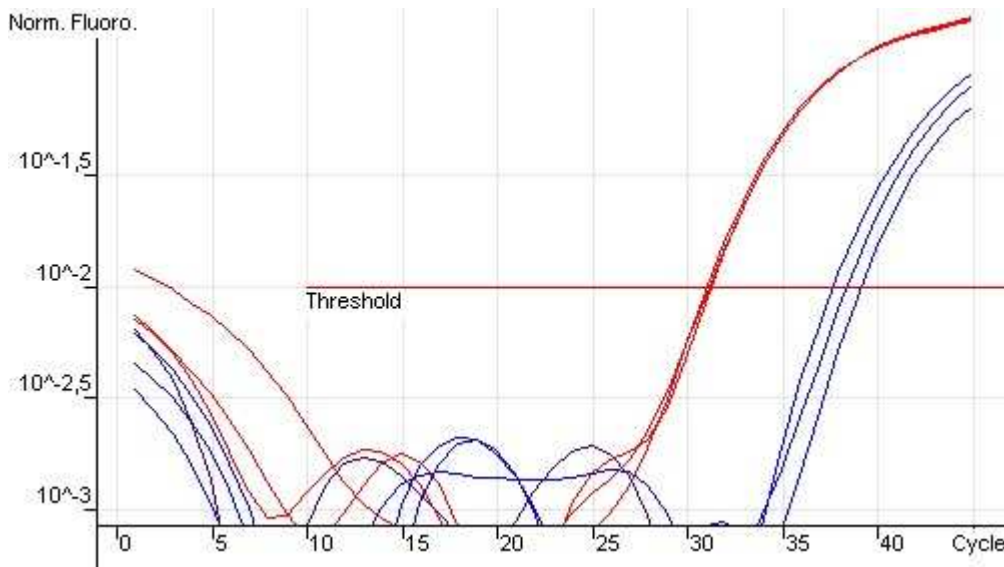
Obr. 17 Extrakce DNA *B.burgdoferi* pomocí RNAGEM™, vliv na detekci v PCR reakci; M = marker, 1-8 ředící řada borélie obsahující 2×10^5 -0,02 borélií/extrakční reakce.

5.1.2.1. Modifikovaná fenol–chloroformová extrakce

Fenol-chloroformová extrakce pomocí roztoku TRIzol® Reagent DNA *B.burgdoferi* vykazovala nejnižší citlivost z mnou zkoumaných metod extrakce DNA. Detekční limit v PCR byl $2,5 \times 10^5$ borélií/extrakční reakci (Obr. 18), detekční limit v real-time PCR byl $2,5 \times 10^4$ borelií/ extrakční reakci (Obr.19. Tab. 8).



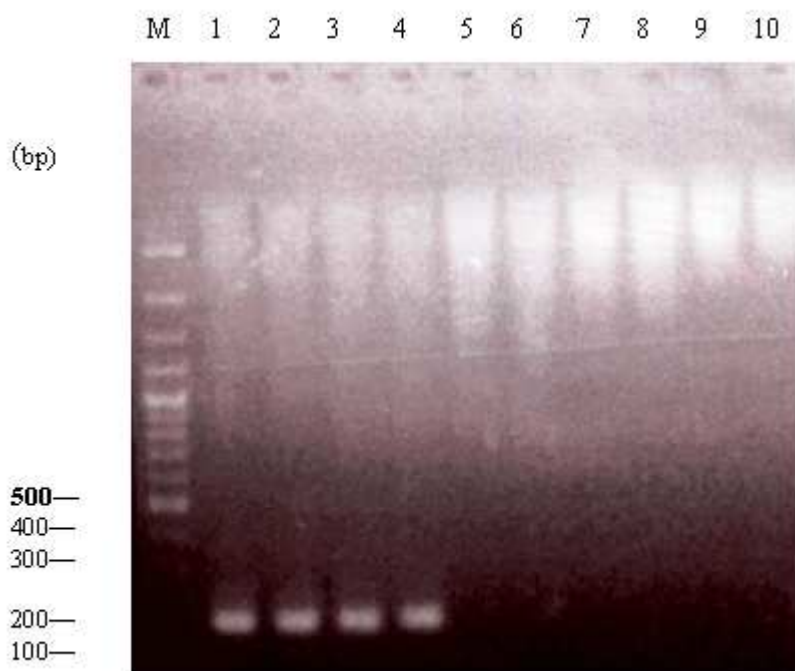
Obr. 18 Extrakce DNA *B.burgdorferi* pomocí TRIzol® Reagent, vliv na detekci pomocí PCR reakci; M = marker, 1-8 ředící řada borélie obsahující $2,5 \times 10^5$ – $0,025$ borélií/extrakční reakce, 9 – negativní kontrola z extrakce, 10 – negativní kontrola z PCR reakce



Obr. 19 Průběh real-time PCR reakce pro extrakci DNA *B. burgdorferi* pomocí kitu TRIzol® Reagent, pozitivní vzorky: ■ množství DNA $2,5 \times 10^5$ borélií/extrakční reakce, ■ množství DNA $2,5 \times 10^4$ borélií/extrakční reakce

5.1.2.2. Extrakce pomocí adsorpce DNA na silikagel

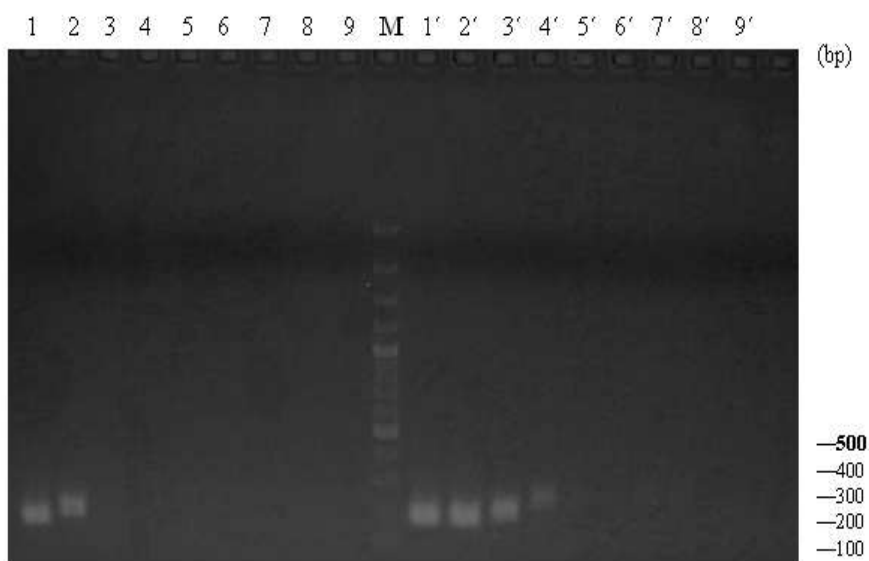
DNeasy Blood & Tissue Kit vykazoval vysokou citlivost. Jeho detekční limit v PCR činil $2,5 \times 10^2$ borélií/extrakční reakci (Obr.20), v real-time PCR 25 borélií/extrakční reakci. RTP® DNA/RNA Virus Mini KIT byl v porovnání s DNeasy Blood & Tissue Kit o řád méně citlivý, detekční limit v PCR byl $2,5 \times 10^2$ borélií/extrakční reakci a v real-time PCR 25 borélií/extrakční reakci. Ve srovnání s ostatními metodami je tento kit citlivý, nejedná se ovšem o nejcitlivější metodu extrakce (Tab. 8).



Obr. 20 Extrakce DNA *B.burgdorferi* pomocí DNeasy Blood & Tissue Kit, vliv na detekci v PCR reakci; M = marker, 1-8 ředící řada borélie obsahující $2,5 \times 10^5$ – $0,025$ borélií/extrakční reakce, 9 – negativní kontrola z extrakce, 10 – negativní kontrola z PCR reakce

5.1.2.3. Kombinace metod pro extrakci DNA *B. burgdorferi*

Testováním kombinací extrakčních metod Chelex® 100 Resin + RNeasy kolonka a TRIzol® Reagent + RNeasy kolonka jsem ověřila, zda by tyto kombinované metody nemohly přinést vyšší citlivost detekce spirochét v klíšťatech. V případě kombinace Chelex® + RNeasy kolonka byla citlivost snížena o 2 řády. Původní detekční limit v PCR 2×10^2 borélií/extrakční reakci pro Chelex® byl snižen na 2×10^4 borélií/extrakční reakci (Obr. 21). Nedošlo tedy ke zvýšení detekčního limitu, naopak ke snížení. V případě TRIzol® Reagent + RNeasy kolonky nebyla citlivost metody zvýšena ani snížena a detekční limit $2,5 \times 10^5$ borélií/extrakční reakci byl řádově stejný jako při extrakci samotným roztokem TRIzol® Reagent (Tab. 8)



Obr. 21 Porovnání detekčního limitu extrakce DNA *B. burgdorferi* Rneasy Mini Kitem s kombinovanou metodou využívající Chelex® a RNeasy kolonku; **1- 8 vzorky** extrahované suspenzí Chelex® + RNeasy kolonka, ředící řada borélie obsahující $2 \times 10^5 - 0,02$ borélií/extrakční reakce, , 9 – negativní kontrola z extrakce
1' - 8' vzorky extrahované pomocí suspenze Chelex®, ředící řada borélie obsahující $2 \times 10^5 - 0,02$ borélií/extrakční reakce, 9' – negativní kontrola z extrakce, 10' – negativní kontrola z PCR reakce

Tab. 8 Detekční limity jednotlivých metod extrakce DNA *B. burgdorferi* v PCR a real-time PCR reakci

Metoda extrakce DNA	Množství zachycené pomocí PCR(N bakterií/reakci)	Množství zachycené pomocí real-time PCR(N bakterií/reakci)
Chelex® 100 Resin	$2,5 \times 10^2$	25
Chelex® 100 Resin + proteináza K	$2,5 \times 10^4$	X
hydroxid amonný	$2,5 \times 10^2$	X
RNAGEM™ Tissue PLUS	2×10^2	20
TRIzol® Reagent	$2,5 \times 10^5$	$2,5 \times 10^4$
RTP® DNA/RNA Virus Mini KIT	2×10^3	2×10^2
DNeasy kit	$2,5 \times 10^2$	25
Crowder et al. 2010 homogenát z ocel.kuliček	2×10^5	2×10^4
Crowder et al.2010 homogenát z kuliček ze spec.stabilizovaného yttria	2×10^3	2×10^2
Chelex® 100 Resin + Rneasy kolonka	2×10^4	X
TRIzol® Reagent + Rneasy kolonka	2×10^5	X

5.1.3 Metody simultánní izolace VKE a DNA ze spirochét *B. burgdorferi*

Několik mnou testovaných metod lze využít při současné extrakci RNA VKE a DNA *B. burgdorferi*. Málokterá ovšem dokázala obě NK extrahovat s vysokou účinností. Suspenze Chelex® byla schopna extrahovat DNA *B. burgdorferi* s vysokou citlivostí, detekční limit v PCR reakci $2,5 \times 10^2$ borélií/extrakční reakce, v real-time PCR 25 borélií/extrakční reakce (Tab. 6). RNA VKE extrahoval s nízkou citlivostí, detekční limit v PCR reakci 5×10^3 PFU/extakční reakci, v real-time PCR 5×10^2 PFU/extakční reakci. Kit RNAGEM™ je schopen extrahovat NK obou mnou zkoumaných klíštěcích patogenů. V porovnání s ostatními metodami je to metoda dostatečně citlivá pro detekci RNA i DNA, Detekční limit pro RNA VKE byl v PCR reakci $4,1 \times 10^2$ PFU/extrakční reakce (Obr.12) a v real-time PCR 4,1 PFU/extrakční reakce. Detekční limit po extrakci DNA *B. burgdorferi* kitem RNAGEM™ byl v případě v PCR reakce 2×10^2 borélií/extrakční reakci (Obr. 17), v real-time PCR 20 borélií/extrakční reakce. Roztok TRIzol® Reagent byl velmi citlivý pro extrakci RNA VKE, detekční limit této metody v PCR byl 5×10^2 PFU/extrakční reakce (Obr. 13) a v real-time

PCR 5 PFU/extrakční reakce (Obr. 14). DNA *B. burgdorferi* detekoval pouze ve vzorku s nejvyšší koncentrací bakteriální DNA, citlivost této metody pro extrakci DNA je tudíž nízká. Detekční limit metody pro DNA *B. burgdorferi* činil v PCR reakci $2,5 \times 10^5$ borelií/extrakční reakci (Obr. 18), detekční limit v real-time PCR byl $2,5 \times 10^4$ borelií/extrakční reakci (Obr. 19). RTP® DNA/RNA Virus Mini kit extrahoval RNA viru KE a DNA *B. burgdorferi* s dostatečně vysokou citlivostí, detekční limit pro RNA VKE v PCR reakci byl $4,1 \times 10^2$ PFU a v real-time PCR 41 PFU. Detekční limit metody pro DNA *B. burgdorferi* činil v PCR reakci 2×10^3 borelií/extrakční reakci a v real-time PCR 2×10^2 borelií/extrakční reakci. Metodou podle Crowdera et al. (2010), která využívá reagentie z kitů QIAamp® Viral RNA Mini Kit a DNeasy Blood & Tissue Kit byla extrahována RNA VKE a DNA *B. burgdorferi*. Bylo posouzen jednak vliv způsobu homogenizace na citlivost detekce obou patogenů, tak byla také zhodnocena citlivost této extrakční metody v porovnání s ostatními extrakčními metodami. Metoda, která detekovala NK z vzorků obsahující homogenát vzniklý pomocí ocelových kuliček měla detekční limit v PCR reakci pro VKE $4,1 \times 10^3$ PFU/extrakční reakci, v real-time 41 PFU/extrakční reakci (Tab. 7). Detekční limit v PCR reakci pro *B. burgdorferi* byl 2×10^5 borelií/extrakční reakci, v real-time PCR reakci 2×10^4 borelií/extrakční reakci (Tab. 8). Metoda extrahující patogeny z homogenát vzniklý pomocí kuliček z yttria stabilizovaného oxidem zirkonia vykazovala pro RNA viru KE detekční limit v PCR i v real-time PCR reakci o řád citlivější než v případě ocelových kuliček. Detekční limit v PCR reakci byl $4,1 \times 10^2$ PFU/extrakční reakci, v real-time PCR reakci 4,1 PFU/extrakční reakci (Tab. 7). Pro DNA *B. burgdorferi* byla citlivost zvýšena o dva řády oproti extrakci z homogenátu vzniklého z ocelových kuliček. Detekční limit činil v PCR reakci 2×10^3 borelií/ extrakční reakci, v real-time PCR 2×10^3 borelií/ extrakční reakci (Tab. 8).

Tab. 9. Spektrofotometrické stanovení koncentrace NK ve vyextrahovaných vzorcích

NK patogena	Metoda extrakce	Naředění vzorku	Naměřená koncentrace mg/ml
RNA viru klíšťové encefalitidy	QIAamp® Viral RNA Mini Kit	bez homogenátu	61, 5
	QIAamp® Viral RNA Mini Kit	s homogenátem	85, 4
DNA <i>Borrelia burgdorferi</i>	DNeasy Blood & Tissue Kit	bez homogenátu	1,225
	DNeasy Blood & Tissue Kit	s homogenátem	12,3

5.2 Infekce klíšťat inokulací

4.3.1. Kontrola absence patogenů v klíšťatech z chovů

11 směsných vzorků po deseti nymfách z chovů Parazitologického ústavu AV ČR bylo vyšetřeno na přítomnost viru KE a *B. burgdorferi* za účelem ověření absence VKE a spirochéty *B. burgdorferi* v chovech. Extrakce byla provedena pomocí dvou vybraných metod. Extrakce pomocí DNeasy Blood & Tissue Kit a v žádném z 11 vzorků neprokázala DNA *B. burgdorferi*. Extrakce RNAGEM™ prokázala přítomnost v jednom vzorku z 11 vzorků, konkrétně se jednalo o vzorek č. 9.

5.2.1 Inokulace klíšťat virem KE

Do klíštěte bylo injikováno 0,5 µl virové suspenze (infekční dávka 5000 PFU). Pokusná infekce klíšťat VKE proběhla úspěšně. Z 11 inokulovaných klíšťat po 10 dnech přežilo 10 jedinců. Klíšťat byla jednotlivě testována na přítomnost VKE poté co byla RNA izolována třemi různými extrakčními metodami Úspěšnost jednotlivých extrakčních metod shrnuje Tab.7. Nejcitlivější byla fenol-chloroformová extrakce roztokem TRIzol® Reagent, která detekovala v PCR i real-time PCR reakci RNA VKE v 9 z 10 klíšťat. Metoda tedy prokázala 90% úspěšnost při detekci RNA VKE. Menší citlivost měla izolace RNA kitem QIAamp® Viral RNA Mini Kit. Ten detekoval virovou RNA v 7 z 10 klíšťat tj. (70%) v případě PCR detekce a v 8 z 10 klíšťat (80 %) při real-time PCR detekci. Nejméně citlivá byla extrakce pomocí kitu RNAGEM™ Tissue, v jejímž případě byla prokázána virová RNA jen v 6 z 10 klíšťat (60 %) v PCR a v 7 klíšťat z 10 (70 %) v real-time PCR (Obr. 22, Tab. 10,11).

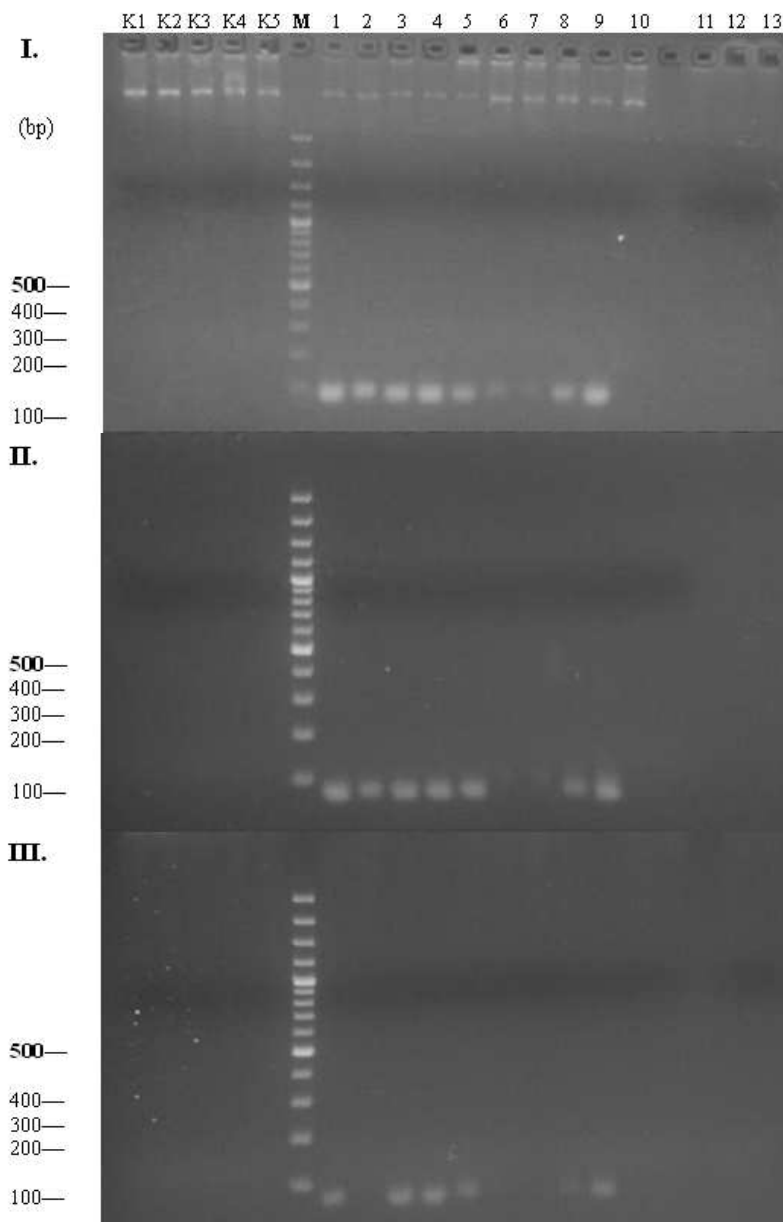
V pěti klíšťatech, která sloužila jako pozitivní kontrola inokulace, nebyla detekována RNA viru KE (Obr. 22).

Tab. 10 Výsledky detekce VKE v inokulovaných klíšťatech

Metody extrakce RNA	Pozitivní klíšťata v PCR/real-time PCR	Klíšťata inokulovaná virem KE (10 dní)									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
QIAamp® Viral RNA Mini Kit	7/10	●	●	●	●	●			●	●	
	8/10	■	■	■	■	■		■	■	■	
TRIzol® Reagent	9/10	●	●	●	●	●	●	●	●	●	

	9/10	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
RNAGEM™ Tissue	6/10	●		●	●	●			●	●	
	7/10	■	■	■	■	■	■		■	■	

- detekce v PCR reakci
- detekce v real-time PCR reakci



Obr. 22 Detekce RNA VKE v klíšťatech inokulovaných VKE

K1 – K5 pozitivní kontrola inokulace, 1-10 klíšťata infikovaná VKE po dobu 10 dní, 11 – negativní kontrola extrakce, 12 – negativní kontrola z RT, 13 – negativní kontrola z PCR; **I.** extrakce RNA VKE pomocí QIAamp® Viral RNA Mini Kit; **II.** extrakce pomocí TRIzol® Reagent; **III.** extrakce pomocí RNAGEM™ Tissue

Tab. 11 Množství VKE zachycené v real-time PCR pro inokulovaná klíšťata VKE od každé zvolené extrakční metody

Metody extrakce RNA	Počet kopií VKE/reakce										Průměr
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
QIAamp® Viral RNA Mini Kit	31291 ± 5942	3945 ± 377	15639 ± 540	35588 ± 2021	6280 ± 316	X	658 ± 114	3923 ± 136	86065 ± 3158	X	22923
TRIzol® Reagent	52601 ± 3441	7054 ± 137	58171 ± 7866	61815 ± 1067	23436 ± 16	755 ± 438	1573 ± 110	7315 ± 1076	70968 ± 2706	X	31520
RNAGEM™ Tissue	5782 ± 490	827 ± 77	6026 ± 1144	6251 ± 1477	1547 ± 477	115 ± 50	X	885 ± 239	6041 ± 602		3434

5.2.2 Inokulace klíšťat spirochétou *B. burgdorferi*

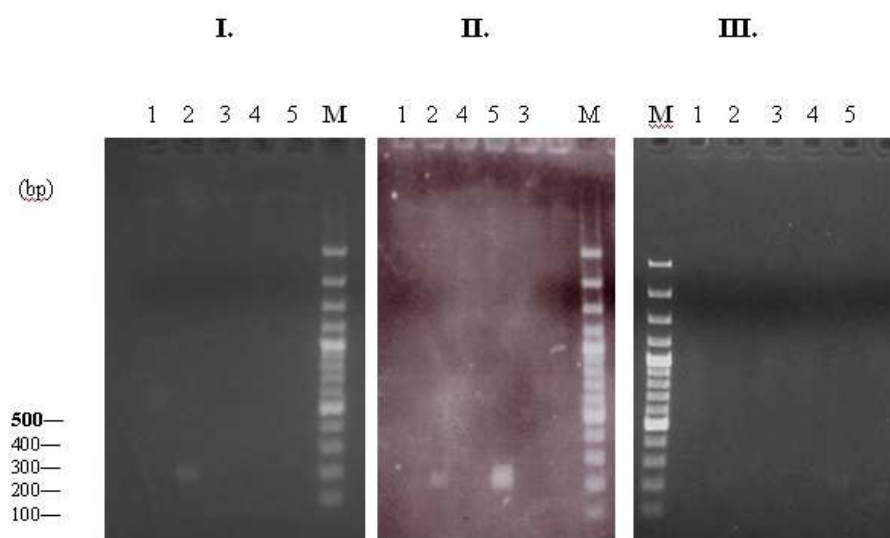
Inokulace klíšťat spirochétou *B. burgdorferi* nebyla úspěšná. Z počtu 35 inokulovaných klíšťat ponechaných v klíšťecích chovech přežilo 33 jedinců. DNA *B. burgdorferi* byla extrahována třemi výše zmíněnými metodami Z 11 inokulovaných a ponechaných 7 dní v chovech přežili všichni jedinci a DNA *B. burgdorferi* nebyla detekována v žádném z klíšťat. Z 11 inokulovaných klíšťat a ponechaných 14 dní v chovech přežilo 10 jedinců. V žádném z nich nebyla detekována DNA *B. burgdorferi*. Z 10 klíšťat inokulovaných a ponechaných po dobu 21 dní v chovech přežili všichni jedinci. V žádném z nich nebyla detekována DNA *B. burgdorferi*. Z tří klíšťat inokulovaných puřem PBS přežila dvě, obě byla negativní na detekci DNA *B. burgdorferi*.

Do klíšťat bylo injikováno 0,3 µl bakteriální suspenze *B. burgdorferi* v médiu (infekční dávka 3000 bakterií). DNA *B. burgdorferi* se podařilo detekovat pouze u klíšťat, která sloužila jako pozitivní kontrola inokulace (Obr. 23). Tato klíšťata byla zmrazena ihned po nainfikování. DNA byla extrahována pomocí tří metod: DNeasy Blood & Tissue Kitem, suspenzí Chelex® a kitem RNAGEM™ Tissue (Tab 9.). Z nichž nejcitlivější detekci v real-time PCR měla metoda využívající k extrakci suspenzí Chelex®, která detekovala DNA *B. burgdorferi* v 2 z 5 klíšťat tj. (40 %) v případě PCR detekce a v 4 z 5 klíšťat (80%) při real-time PCR. Zbylé dvě metody dosáhly shodného výsledku detekce DNA *B. burgdorferi*. Metoda extrakce pomocí kitu DNeasy Blood & Tissue detekovala DNA *B. burgdorferi* v PCR reakci 1 z 5 klíšťat (20 %) v real-time PCR v 3 z 5 klíšťat (60 %). Metoda extrakce kitem RNAGEM™ Tissue detekovala v PCR 1 z 5 klíšťat (20 %) a v real-time PCR ve 3 z 5 klíšťat (60 %).

Tab. 12 Výsledky detekce DNA *B. burgdorferi* v inokulovaných klíšťatech

Metody extrakce DNA	Pozitivní klíšťata v PCR/real-time PCR	Klíšťata inokulovaná <i>B. burgdorferi</i> (ihned zmrazena)				
		1	2	3	4	5
DNeasy Blood & Tissue Kit	1/5		●			
	3/5		■	■		■
Chelex® 100 Resin	2/5		●			●
	4/5		■	■	■	■
RNAGEM™ Tissue	1/5					●
	3/5		■	■		■

- detekce v PCR reakci
- detekce v real-time PCR reakci



Obr. 23 Detekce DNA *B. burgdorferi* u klíšťat po inokulaci ihned zmrazených;

1 – 5 inokulovaná klíšťata spirochétou *B. burgdorferi*, ihned zmrazena; **I.** extrakce DNA DNeasy Blood & Tissue Kitem, pozitivní vzorek č. 2 ; **II.** extrakce DNA pomocí Chelex® 100 Resin, pozitivní vzorek č. 2, 5; **III.** extrakce RNAGEM™ Tissue, pozitivní vzorek č. 5

Tab. 13 Množství DNA *B. burgdorferi* zachycené v real-time PCR pro inokulovaná klíš'ata spirochétou *B. burgdorferi* od každé zvolené extrakční metody

Metody extrakce DNA	Počet borélií/ reakce					Průměr
	1	2	3	4	5	
DNeasy Blood & Tissue Kit	X	5,1 ± 2,7	2,4 ± 0,7	X	10,4 ± 1,3	5,9
Chelex® 100 Resin	X	13,2 ± 3	10,4 ± 5,6	2,3 ± 0,7	9,9 ± 3,7	8,95
RNAGEM™ Tissue	X	22,4 ± 5,8	10,7 ± 0,7	X	8 ± 1,4	13,7

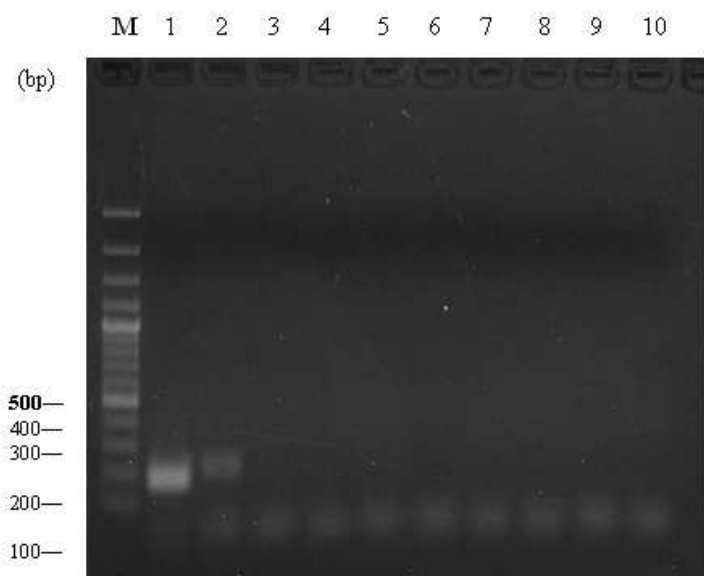
5.3 Další faktory ovlivňující citlivost detekce patogenů ve vzorku

Zjistila jsem, že kromě důsledného výběru primerů a kontroly jejich senzitivity a specificity pro detekci klíš'aty přenášených patogenů, hrají důležitou roli i další faktory, které mohou zásadně ovlivnit výsledek analýzy.

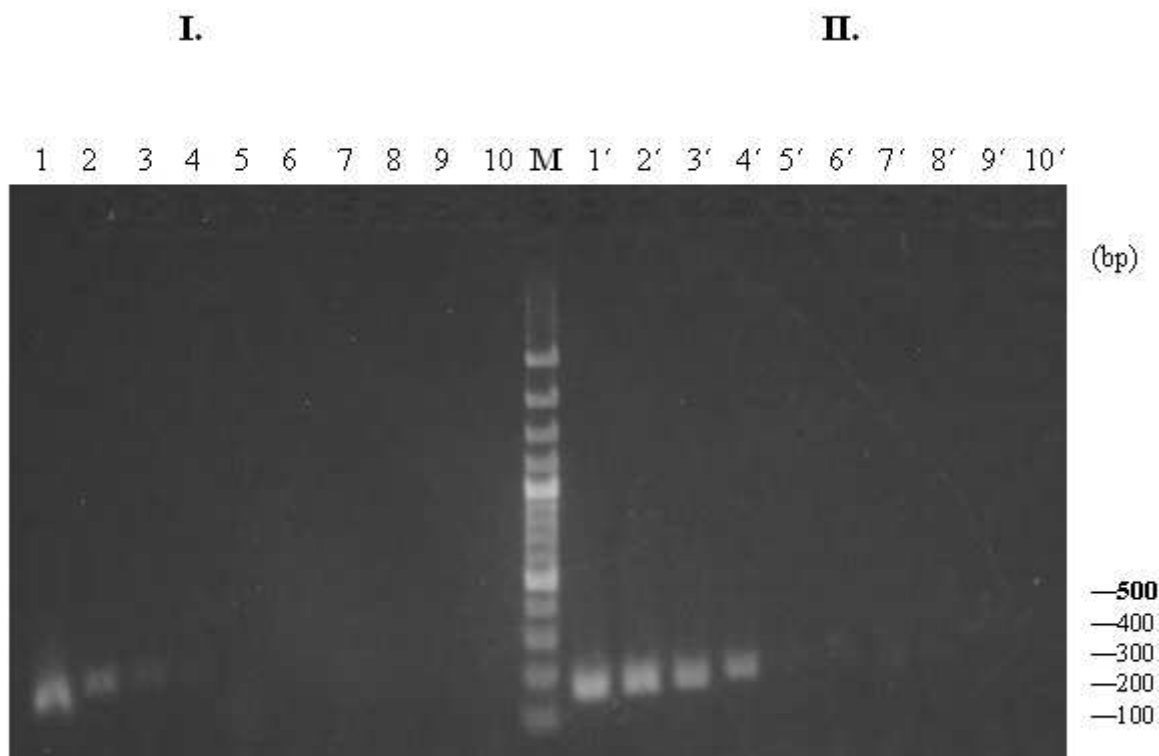
Nutností je do experimentů zahrnout jak negativní, tak pozitivní kontrolu. Aby nedocházelo k falešně negativnímu či pozitivnímu ovlivnění během provádění metod.

Prvním takovým faktorem byla kvalita použitých laboratorních přístrojů. V některých případech vznikaly v PCR reakci dimery primerů (Obr. 24). Tento problém ovšem vymizel, byly-li tytéž vzorky, při shodných podmínkách amplifikovány v jiném cycleru. Dalším faktorem který ovlivňuje zásadním způsobem výsledek detekce, je počet amplifikačních cyklů v PCR reakci. Stejně jako v real-time PCR, je počet cyklů, ve kterém množství PCR produktu v reakci překročí detekovatelnou hranici, závislý na koncentraci templátu vstupujícího do reakce. U klasické PCR, jsme ovšem odkázáni na detekci produktu až po proběhnutí celé reakce a ztrácíme tak informace, které by nám poskytla detekce v reálném čase. Výsledek proto může být zavádějící. Při příliš nízkém počtu amplifikačních cyklů ovšem můžeme dostávat falešně negativní výsledky. Tento fakt byl dokumentován např. v případě stanovení detekčního limitu PCR pro DNA *B. burgdorferi* extrahovanou pomocí hydroxidu amonného. Pro PCR o 40 cyklech byl detekční limit stanoven na 2 borelie/ml, což neodpovídalo našim předchozím výsledkům. Proto byla stejná PCR reakce provedena při 30 a 35 cyklech. Výsledkem byl detekční limit 2×10^5 borelií/ml pro amplifikaci při 30 cyklech a detekční limit 2×10^4 borelií/ml pro amplifikaci při 35 cyklech (Obr.25). Proto jsem optimalizovala počet

amplifikačních cyklů při našich experimentech pro detekci RNA viru KE a DNA *B. burgdorferi* na 35.



Obr. 24 Dimery, vznikající během PCR amplifikace extrakce DNA *B.burgdorferi* pomocí suspenze Chelex® 100 Resin + proteináza K; M = marker, 1-8 ředící řada borélie obsahující $2,5 \times 10^5$ – 0,025 borélií/extrakční reakce, 9 –negativní kontrola z extrakce, 10 – negativní kontrola z PCR reakce

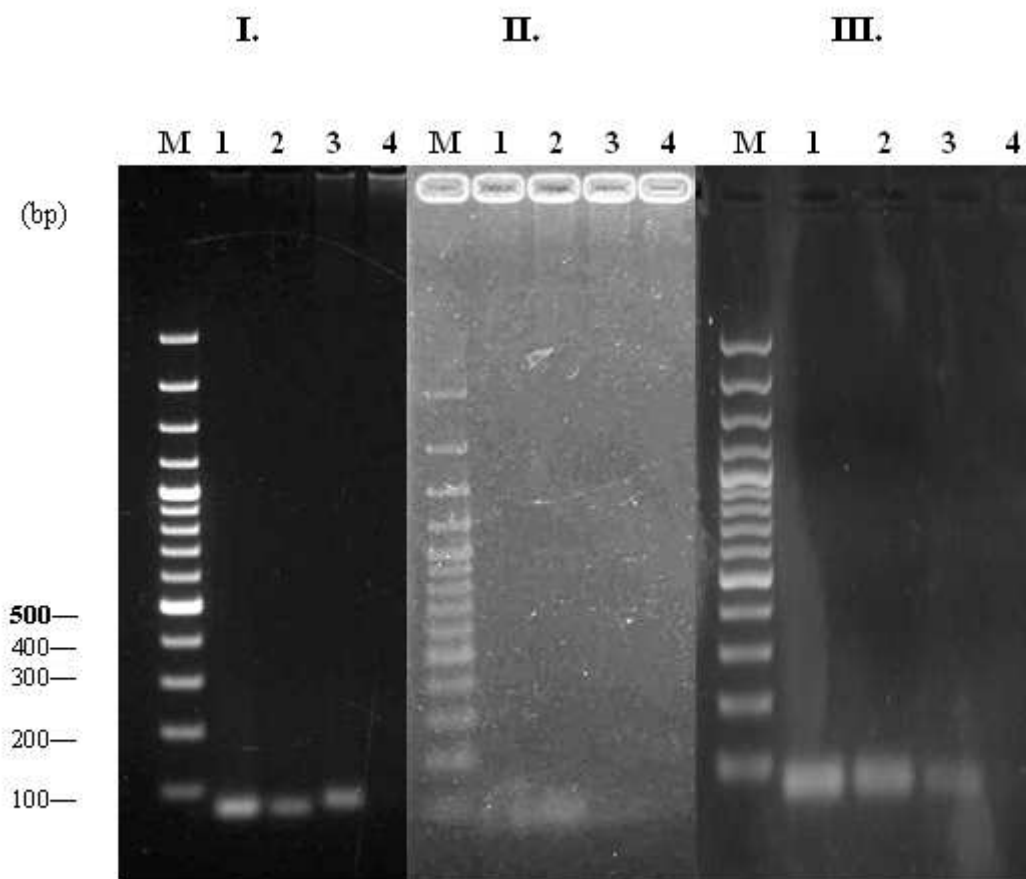


Obr. 25 Vliv počtu amplifikačních cyklů na detekční limit extrakce hydroxidem amonným;

I. PCR s 30 amplifikačními cykly, 1-8 vzorky desítkové ředící řada DNA *B. burgdorferi* $2 \times 10^7 - 2$ borélií/ extrakční reakci; **II. PCR s 35 amplifikačními cykly**, 1'-8' vzorky desítkové ředící řada DNA *B. burgdorferi* $2 \times 10^7 - 2$ borélií/ extrakční reakce

Dalším klíčovým bodem při detekci PCR produktů se ukázala být samotná vizualizace PCR produktů v gelu. V naší laboratoři rutinně používáme interkalační barvivo SYBR Green I, jako součást nanášecího pufru. Pozorovala jsem, že SYBR Green ovlivňuje mobilitu vzorků různě, v závislosti na koncentraci templátu (Zipper et al., 2004). Po překročení určitého poměru mezi množstvím molekul PCR produktu a barviva, dochází ke snížení rychlosti migrace. Čím nižší množství NK se v reakci nachází, tím více se zpomaluje průchod DNA gelem. Proto se vzorky s malou koncentrací templátu jeví na gelu vizuálně větší (Obr. 26, I). Pokoušela jsem se dobarvovat gel v 2% roztoku SYBR Green I v TAE pufru (30 minut), dodatečně až po proběhnutí elektroforetické separace. Takto vizualizované vzorky již neměly ovlivněnou mobilitu koncentrací PCR produktu ve vzorku. Po dobu barvení avšak došlo k difuzi vzorku v gelu, protože finální produkty našich PCR jsou velmi malé (Obr. 26, II). Metoda tak neposkytla dostatečně uspokojivý výsledek. Další otestovanou variantou byla separace PCR produktů na gelu, jehož součástí bylo barvivo ethidium bromid. Výsledek po

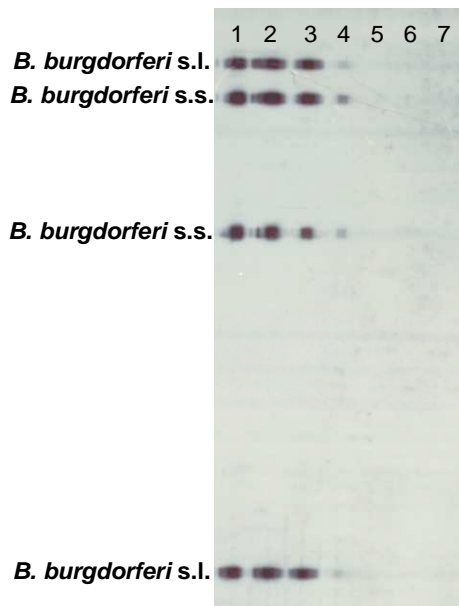
elektroforetické separaci přinesl požadovaný výsledek. Produkt měl požadovanou velikost a nedošlo k difuzi vzorku do gelu (Obr. 26, III).



Obr. 26 Extrakce VKE pomocí QIAamp® Viral RNA Mini Kit, různé metody vizualizace vzorků v gelu. **I.** Barvivo SYBR Green I bylo součástí nanášecího pufru 5x Orange DNA Loading Dye; **II.** PCR produkty smíchaný se samotným nanášecím pufrům 5x Orange DNA Loading Dye, gel I po proběhnutí elektroforetické separace dodatečně dobarvován v roztoku s 2% SYBR Green I v TAE pufru; **III.** Vizualizace pomocí ethidium bromidu, který byl součástí agarózového gelu

5.4 Stanovení detekčního limitu RLB

Citlivost metody RLB byla zjišťována za účelem potvrdění jejího detekčního limitu s PCR a real-time PCR reakce. Detekční limit metody RLB podle našich pokusů činil $2,5 \times 10^2$ borélií/extrakční reakce. Metoda RLB správně identifikovala testovací ředící řadu *B. burgdorferi* zhotovená z kmene B31 jako genospecii *B. burgdorferi* sensu stricto (Obr. 27).



Obr. 27 Detekce *B. burgdorferi* pomocí metody RLB; 1-7 vzorky extrahované DNA *B. burgdorferi* o koncentraci $2,5 \times 10^5$ - $2,5 \times 10^{-1}$ borélií/extrakční reakce

6 Diskuze

V této diplomové práci bylo porovnáváno několik extrakčních metod co do účinnosti extrakce NK a citlivosti následné detekce patogenů přenášených klíšťaty ze vzorků klíšťat. S tímto záměrem byly připraveny testovací vzorky obsahující definovaná množství viru klíšťové encefalitidy a/nebo spirochéty *B. burgdorferi* v homogenátu z klíšťat. Byly porovnávány jak „metody extrakční“, jejichž produktem je hrubý lyzát (Chelex®, RNAGEM™ Tissue, hydroxid amonný), tak „metody izolační“ zahrnující extrakční (TRIzol® Reagent) a purifikační kroky (veškeré komerční purifikační kity). Některé z kroků různých metod byly kombinovány za účelem zvýšení jejich citlivosti.

Volba extrakční metody pro detekci patogenů v klíšťatech může mít zásadní dopad na výsledek celé detekce (Bergmann et al., 2002). Extrakční metody pracují s různou účinností a také se mohou lišit množstvím ztrát, které s sebou nesou v průběhu extrakce, mírou degradace cílové NK, čistotou NK, množstvím inhibitorů ve výsledném vzorku a podobně. Množství borélií resp. kopií jejich genomu v klíšťeti stanovené mikroskopickými metodami i real-time PCR se pro obě metody shodně pohybuje v rozmezí od několika jednotek až do tisíců (Hubalek et al., 1998, Rauter et al., 2002, Stünzner et al., 2006). Množství VKE se pohybuje v rozmezí 500-10⁹ kopií virového genomu v klíšťeti (Brinkley et al., 2008). Při nízkém množství patogenů v klíšťeti může vést volba nesprávné extrakční metody k falešně negativním výsledkům.

6.1 Extrakce RNA VKE

Porovnávala jsem účinnost několika metod extrakce RNA VKE. Extrakční metody, které umožnily nejcitlivější detekci RNA VKE jsou extrakce pomocí kitu RNAGEM™ Tissue, roztoku TRIzol® Reagent, kitu QIAamp® Viral RNA Mini Kit, kitu RNeasy Mini Kit, kitu RTP® DNA/RNA Virus Mini kit, extrakce podle Crowdera et al. (2010) využívající k homogenizaci kuličky z yttria stabilizovaného oxidem zirkonia. Detekční limit těchto metod byl 50 PFU/ extrakční reakci, tj. 4x10⁴ PFU/ml. Ostatní extrakční metody měly o řád nižší citlivost. Jednalo se o kit Perfect Pure™ RNA Cell & Tissue a NucleoSpin® RNA Virus, suspenzi Chelex® a extrakci podle Crowdera et al. (2010) využívající k homogenizaci ocelové kuličky. RNA VKE se nepodařilo detekovat, pokud byla RNA extrahována pomocí

suspENZE Chelex® s přídánou proteinázou K, hydroxidem amonným nebo kombinací QIAamp® Viral kolony se suspenzí Chelex® nebo roztokem TRIzol® Reagent.

Oproti publikovaným výsledkům, kde byla detekce NK viru po extrakci roztokem TRIzol® Reagent o jeden až dva řády citlivější v porovnání s komerčními kity (Brassard et al., 2009, Deng et al., 2005, Kramer et al., 2002), vyšla v mých experimentech extrakce roztokem TRIzol® Reagent podobně účinná jako extrakce kity firmy Qiagen. Rozdíl v citlivosti mezi těmito metodami jsem zaznamenala až při detekci v real-time PCR reakci. Některé publikace prokázaly vysokou účinnost kitů RNeasy Mini Kit a QIAamp® Viral RNA Mini Kit v detekci VKE pomocí real-time PCR reakce (10 – 100 kopií/reakci) (Klaus et al., 2009, Schrader & Süß, 1999), což se shoduje s mými výsledky. V real-time PCR reakci jsem ovšem dosáhla vyšší citlivosti (5 – 50 PFU/reakci). Tento drobný rozdíl však může být způsoben i chybami při ředění vzorků a podobně.

V jiné publikaci byla detekována RNA VKE v klíšťatech po extrakci roztokem Tri Reagent (Sigma) s citlivostí 10^3 PFU/ml. V porovnání s mými výsledky (4×10^4 PFU/ml) byla účinnost jejich extrakce o řád vyšší. Použili ovšem větší množství vzorku při extrakci a ke vzorkům nepřidávali homogenát z klíšťat, který obsahuje, jak je známo, řadu inhibitorů detekce (Rudenko et al., 2004).

Extrakce suspenzí Chelex® nebyla pro RNA VKE příliš účinná. Dle dostupné publikace bylo prokázáno, že když byla RNA extrahována pomocí suspenze Chelex® ze vzorků neobsahujících zbytky tkání, účinnost této metody byla vyšší než u klasických metod (fenol-chloroformová extrakce). V případě extrakce z materiálů obsahujících tkáň byl výsledek opačný (Arnal et al., 1999). To by mohlo vysvětlovat, proč byla extrakce suspenzí Chelex® tak málo účinná v případě detekce VKE z mých testovacích vzorků.

Všeobecně se soudí, že přidání proteinázy K v průběhu extrakce napomáhá ke zvýšení výtěžku (García et al., 2004, Halos et al., 2004). V mém případě jsem zaznamenala jev opačný, kdy po extrakci RNA VKE suspenzí Chelex® s přídánou proteinázou K nebyl v PCR reakci detekován specifický produkt ani ve vzorku s nejvyšší koncentrací viru. Tento výsledek si vysvětluji tak, že pravděpodobně nebyla inaktivována veškerá proteináza K ze vzorku a mohlo dojít ke štěpení a inaktivaci polymeráz v reverzní transkripci nebo samotné PCR.

Extrakce metodami RTP® DNA/RNA Virus Mini kit, RNAGEM™ Tissue, extrakce podle Crowdera a metody využívající kombinací extrakčních metod budou zhodnoceny v kapitole zabývající se simultánní extrakcí NK.

Shodné citlivosti detekce RNA VKE bylo dosaženo po extrakci RNeasy Mini kitem a QIAamp® Viral RNA Mini Kitem, který byl speciálně vyvinut pro izolaci virové RNA.

RNeasy Mini Kit je tedy dostatečně citlivou alternativou v laboratořích, které běžně neizolují virovou RNA.

6.2 Extrakce DNA *B. burgdorferi*

Dále jsem hodnotila účinnost extrakčních metod pro detekci DNA *B. burgdorferi*. Nejcitlivější detekci DNA *B. burgdorferi* umožnila extrakce suspenzí Chelex®, kitem RNAGEM™ Tissue, hydroxidem amonným a kitem DNeasy Blood & Tissue Kit. Jejich detekční limit dosahoval 25 borélií /extrakční reakci (tj. 2×10^4 borélií/ml). O řád nižší citlivost detekce DNA *B. burgdorferi* byla zaznamenána po extrakci RTP® DNA/RNA Virus Mini kitem, po extrakci podle Crowdera et al. (2010) využívající k homogenizaci speciální kuličky, po extrakci suspenzí Chelex® s přidanou proteinázou K a suspenzí Chelex® v kombinaci s RNeasy kolonkou. Nejméně citlivá byla detekce DNA *B. burgdorferi* po extrakci roztokem TRIzol® Reagent, po extrakci podle Crowdera et al. (2010) využívající k homogenizaci ocelové kuličky a po použití roztoku TRIzol® Reagent v kombinaci s RNeasy kolonkou.

Extrakce pomocí suspenze Chelex® našla své uplatnění hlavně v oblasti forenzní genetiky, kde se využívá kromě jiného i pro simultánní extrakci DNA v RNA v případě limitovaného množství vzorků (Bauer & Patzelt, 2003) nebo z materiálů, u kterých by jiné metody selhávají (Coombs et al., 1999). V rámci klíšťaty přenášených patogenů se extrakce pomocí suspenze Chelex® ukázala jako účinná a citlivá pro detekci DNA *B. burgdorferi* ze vzorků pacientů (Rudenko et al., 2005).

Rauter s kolegy porovnávali účinnost extrakce DNA *B. burgdorferi* z klíšťat suspenzí Chelex® a DNeasy Blood & Tissue Kitem a došli ke stejným výsledkům jako já, a to že tyto dvě metody extrakce DNA *B. burgdorferi* jsou stejně citlivé (Rauter et al., 2002). Detekční limit v real-time PCR reakci byl pro obě metody 1-10 borélií/reakci, což se řádově shoduje s mými výsledky. Vysoká citlivost extrakce DNeasy Blood & Tissue Kitem byla též potvrzena v článku Schwaiger a Cassinoti (2003), kdy byla citlivost v real-time PCR reakci též 10 borélií/reakci.

Exner a Lewinski porovnávali extrakci DNA *B. burgdorferi* pomocí kitu DNeasy Blood & Tissue (Qiagen) s fenol-chloroformovou metodou. V porovnání s mými výsledky zjistili v případě kitu podobný detekční limit (řádově 10^3 borélií/ml). Vyšší citlivosti naopak dosáhli pomocí fenol-chloroformové extrakce, kdy byli schopni detekovat DNA o tři řády citlivěji. Tento velký rozdíl v citlivosti lze vysvětlit tím, že v této práci použili jiný způsob přípravy

vzorků z klíšťat, kdy mechanický způsob homogenizace doplnili o chemickou a enzymatickou lýzu pomocí SDS a proteinázy K. Dalším možným vysvětlením vyšší citlivosti detekce může být, že do extrakce vstupovalo 40x větší množství vzorku než v případě mého testování (Exner & Lewinski, 2003).

Extrakce DNA *B. burgdorferi* roztokem TRIzol® Reagent byla o tři řády méně účinná než nejlepší z mnou testovaných metod. K podobným výsledkům došli autoři Amemiya a kol. (1999), kdy v případě pokusu o simultánní extrakci DNA a RNA z živočišných tkání roztokem TRIzol® Reagent byl snížený výtěžek DNA. Autoři navrhují vysvětlení, že část DNA přechází při extrakci do vodné fáze a tím se sníží její množství v organické fázi (Amemiya et al., 1999).

Extrakce metodami RTP® DNA/RNA Virus Mini kit, RNAGEM™ Tissue, hydroxidem amonným, extrakce podle Crowdera a metody využívající kombinaci extrakčních metod budou zhodnoceny v následující kapitole o simultánní extrakci NK.

6.3 Simultánní extrakce RNA VKE a DNA *B. burgdorferi*

Pro detekci patogenů přenášených klíšťaty je výhodné mít dostupnou metodu, která by byla schopná extrahovat zejména virovou RNA tak i bakteriální DNA současně. Za tímto účelem jsem otestovala několik metod extrakce.

V případě simultánní extrakce RNA VKE a DNA *B. burgdorferi* se jako nejcitlivější jevíly metoda extrakce kitem RNAGEM™ Tissue a kitem RTP® DNA/RNA Virus Mini kit. Detekční limit byl u obou těchto metod pro VKE 50 PFU/extrakční reakci a pro *B. burgdorferi* 25 borélií/extrakční reakci. Zbylé extrakční metody (hydroxid amonný, extrakce podle Crowdera a metody využívající kombinaci extrakčních metod) nevykazovaly dostatečnou citlivost pro NK obou patogenů současně.

Překvapivých výsledků bylo dosaženo po extrakci NK kitem RNAGEM™ Tissue. Tato extrakční metoda je určena zejména pro izolaci RNA při kvantifikaci genové exprese. Vzhledem k jednoduchosti celé procedury byla účinnost extrakce velmi působivá (Ansari et al., 2011, Baker, 2011). Účinnost této metody pro simultánní izolaci DNA a RNA nebyla dosud v žádné publikaci popsána. Dle mého názoru se proto jedná o zásadní zjištění, které by mohlo vést k intenzivnímu používání této extrakční metody. Vzhledem k jednoduchosti a relativní finanční dostupnosti se tato metoda jeví jako vhodná pro zpracování velkého množství vzorků pro epidemiologické studie.

Dalším vhodnou volbou pro simultánní izolaci NK je RTP® DNA/RNA Virus Mini kit, používá se ovšem zejména pro extrakci NK RNA a DNA virů (Sanlidag et al., 2009, Schmidt-Chanasit et al., 2008). Tímto kitem se mi podařilo extrahovat DNA *B. burgdorferi*, což rozšiřuje další možnost aplikace této extrakční metody na izolaci bakteriální DNA..

Další metodou testovanou pro simultánní extrakci bylo využití extrakce NK pomocí hydroxidu amonného. Tato metoda založená na principu alkalické hydrolyzy byla úspěšně použita v případě DNA *B. burgdorferi* (Guy & Stanek, 1991). Detekce DNA *B. burgdorferi* extrahovaná pomocí hydroxidu amonného vykazovala vysokou citlivost v PCR reakci, srovnatelnou s komerčními kity. Problém ovšem nastal při detekci DNA *B. burgdorferi* pomocí real-time PCR. U vzorků extrahovaných hydroxidem amonným nebylo možné detekovat nárůst fluorescence. PCR produkt byl v reakci ovšem přítomen. Hydroxid amonný vykazuje totiž za určitých podmínek fluorescenci (čehož se využívá v některých chemických analýzách) (Schneider & Lehotay, 2004). Emitované záření se však částečně překrývá s vlnovou délkou, kterou emituje fluorescein, kterým je značena TaqMan sonda (Sjöback et al., 1995). Tuto extrakční metodu nelze tedy doporučit v případě, že NK chceme detekovat pomocí real-time PCR, neboť hydroxid amonný ve vzorcích v určitém množství zůstává přítomen. Pro extrakci RNA VKE nebyla tato metoda úspěšná. Možným vysvětlením je průběh přípravy vzorku, kdy je nutné ponechat zkumavku se vzorkem desítky minut otevřenou. Během této doby se mohly do vzorku dostat všudypřítomné nukleázy a vzorek tak degradovat. V literatuře však dosud o nemožnosti izolace RNA touto metodou nebyla žádná zmínka, proto jsme se rozhodli tuto variantu ověřit.

Mé výsledky, o jeden až dva řády citlivější extrakce při použití kuliček z yttria stabilizovaného oxidem zirkonia ve srovnání s ocelovými kuličkami, jsou ve shodě se zjištěním Crowdera et al. (2010). Při použití kuliček z oceli nebo z jiných těžkých kovů totiž může docházet k inhibici PCR reakce (Allender et al., 2004). Tato metoda je vhodná k simultánní izolaci, ale vzhledem k použití reagensů ze dvou různých kitů a homogenizačních kuliček ze speciálního materiálu, je její využití v běžné praxi velmi nákladné.

Kombinované metody měly být další alternativou pro simultánní extrakci RNA VKE a DNA *B. burgdorferi*. Kombinace extrakčních metod (Chelex® nebo TRIzol® Reagent + RNeasy kolonka) umožňovaly detekovat DNA *B. burgdorferi*, ovšem RNA VKE po extrakci všemi testovanými kombinacemi nebylo možné detekovat. Možným vysvětlením je, že vůbec nedošlo k navázání RNA na silikamembránu v QIAamp® Viral kolonce, protože k navázání je potřeba prostředí s dostatečnou koncentrací chaotropního činidla. Suspenze Chelex® není

chaotropním, ale chelatačním činidlem a pravděpodobně tedy neumožňuje navázání NK na membránu v kolonce (Walsh et al., 1991). Dalším možným vysvětlením může být fakt, že vzorek neprošel kolonkou z důvodu vysoké viskozity vzorku (Triant & Whitehead, 2009). Nízký detekční limit při extrakci DNA *B. burgdorferi* mohl být zapříčiněn buď příliš nízkou (TRIzol® Reagent) nebo příliš vysokou (Chelex®) koncentrací vzorku, která nespádala do optimálního rozmezí koncentrací, které je kolonka schopna izolovat (RNeasy Mini Kit Handbook, www.qiagen.com).

6.4 Celkové zhodnocení extrakčních metod

Citlivost detekce je sice jedním ze základních parametrů pro výběr optimální metody, ovšem není jediným faktorem, který je potřeba zhodnotit. Každá metoda extrakce má své výhody i nevýhody a výběr se odvíjí od konkrétních potřeb dané aplikace, případně vybavení pracoviště. V našem případě jsme se soustředili na metody extrakce NK, vhodné pro detekci patogenů v klíšťatech. Pro celkové zhodnocení jsme vybrala několik kritérií, která v tomto případě hrají nejdůležitější roli: citlivost detekce, cena, doba a náročnost provedení (Tab. 12). Ceny byly porovnávány podle finančních nákladů za jednu reakci. Doba provedení extrakce byla zhodnocena podle doby potřebné na provedení uvedené v manuálech ke každé metodě. Náročnost provedení byla hodnocena subjektivně dle vlastních zkušeností.

Tab. 12 Zhodnocení vybraných extrakčních metod z hlediska praktického využití; Každá metoda byla hodnocena známkami 1-5 (1- nejlepší, 5- nejhorší) podle toho, jak splňovala zadaná kritéria, X = nelze vyhodnotit, *Bor* = *B. burgdorferi*.

Metoda extrakce	Citlivost		Doba provedení extrakce	Náročnost provedení	Cena
	VKE	<i>Bor</i>			
Chelex® 100 Resin	3	1	5	2	1
RNAGEM™ Tissue	1	1	1	1	3
TRIzol® Reagent	1	5	3	4	2
RTP® DNA/RNA Virus Mini KIT	2	1	2	3	4
Perfect Pure™ RNA Cell & Tissue	3	X	2	3	4
NucleoSpin® RNA Virus	3	X	2	3	5

QIAamp® Viral RNA Mini Kit	1	X	2	3	4
RNeasy Mini Kit	1	X	2	3	5
DNeasy Blood & Tissue Kit	X	1	4	3	4

Z tabulky vyplývá, že časové nároky na provedení extrakce jsou u purifikačních kitů časově méně náročné než u zbylých metod a to hlavně díky sloučení jednotlivých kroků izolace a předem připraveným reagensiím. Výjimku tvořila extrakce DNeasy Blood & Tissue Kitem, která byla časově náročnější, kvůli preinkubaci s proteinázou K. U extrakce suspenzí Chelex® byla doba provedení extrakce prodloužena v důsledku inkubace vzorků přes noc. Extrakce pomocí RNAGEM™ Tissue, byla naopak rychlá, neboť vyžadovala pouze krátkodobou inkubaci, proto extrakce jednoho vzorku nepřesáhla dobu 15 min. U metod, u kterých zpracování vzorků trvalo déle, je automaticky zvýšené riziko degradace NK, případně i kontaminace vzorků.

Kromě výhod (rychlá práce, purifikovaná NK bez kontaminant) mají kity i své nevýhody jako je jejich vyšší cenou ve srovnání s ostatními metodami. Jednoduché metody založené na principu získání hrubého buněčného lyzátu jsou v porovnání s kity přibližně 10x levnější. Nejnákladnější z kitů (NucleoSpin® RNA Virus, RNeasy Mini Kit) stály 140 Kč na jednu reakci. Oproti tomu nejlevnější z extrakcí (suspenze Chelex®) stála pouze 3 Kč na jednu reakci. Toto zjištění může zásadně ovlivnit volbu extrakce v případě testování velkého počtu vzorků. Nebylo potvrzeno, že by vyšší cena extrakční metody odpovídala její citlivosti.

Použití vhodné extrakční metody je kritické pro úspěšné a spolehlivé studie na klinických, experimentálních či environmentálních vzorcích. Správné metody extrakce by měly být pečlivě voleny s ohledem na typ vzorku (McOrist et al., 2002). Pro epidemiologické studie, zabývající se detekcí NK klíšťaty přenášených patogenů v klíšťatech nebo hostitelích, musejí být voleny takové extrakční metody, které budou dostatečně citlivé pro záchyt NK patogenů a zároveň nebudou příliš finančně náročné. V případě vzorků nasátých klíšťat obsahujících velké množství krve je potřeba volit metody, které umožňují účinné vymytí inhibitorů PCR.

V klinické praxi se často provádí detekce klíšťaty přenášených patogenů v patientských vzorcích. Pro tyto účely je nutno zvolit citlivou, rychlou, jednoduchou variantu extrakce s důrazem na její spolehlivost. Komerční kity představují v tomto případě vhodnou variantu,

kteřá je zárukou vysoké standardizovanosti a získání čisté NK bez kontaminant, které by mohly ovlivnit výsledek detekce. V řadě vědeckých studií s touto tématikou se u klinických vzorků využívají komerční kity (Nocton et al., 1994, Rudenko et al., 2009b, Schwaiger & Cassinotti, 2003).

6.5 Metody detekce

Kromě porovnání citlivostí metod extrakce byly porovnávány také dvě metody detekce. Ve většině případů byla citlivost detekce v real-time PCR reakci o jeden řád vyšší v porovnání s detekcí pomocí PCR reakce. V případě některých vzorků VKE byl tento rozdíl dva řády (Lanciotti et al., 2000, Locatelli et al., 2000).

U vzorků DNA *B. burgdorferi* byl mě mimo detekce pomocí PCR a real-time PCR stanoven detekční limit často používané metody RLB. Po extrakci DNA suspenzí Chelex® byla zjištěna citlivost RLB 25 kopií/reakci obdobně jako v práci Rijpkema et al. (1995) (20 kopií/reakci). Tato hodnota se shoduje s citlivostí detekce pomocí real-time PCR reakce. Citlivost detekce PCR reakcí byla o řád nižší. Detekční limit metody se teoreticky může lišit pro různé genospecies *B. burgdorferi*. V našem případě jsme detekovali pouze DNA *B. burgdorferi* s.s.

6.6 Problematické kroky během extrakce

Častým jevem při detekci klíšťaty přenášených patogenů byla během naší práce kontaminace. Procento kontaminovaných vzorků bylo podstatně zvýšeno pracovalo-li se s větším počtem vzorků. Všeobecně platí, že je nutné při extrakcích NK dbát na čistotu a pečlivost, aby se předcházelo případným kontaminacím. Mezi základní opatření pro zamezení kontaminací patří: používání špiček s filtrem, prostorová separace místa pro přidání templátu od prostoru, kde je prováděna extrakce a v místech určených pro extrakci používání přípravků degradujících kontaminující DNA (např. DNA RemoverTM(Minerva Biolabs)).

Při časté manipulaci se vzorkem ve smyslu častého rozmrazování a zmrazování byla citlivost detekce patogenů snížena, tento jev byl výraznější u RNA viru KE. Zřejmě se jedná o postupnou degradaci NK ve vzorku. Je tedy nutné pracovat s alikvoty vzorků ideálně pouze 1x zamraženými (Bellete et al., 2003).

6.7 Úspěšnost infekce klíšťat

Infekce klíšťat VKE byla úspěšná. Po 10 dnech po inokulaci byl virus detekován v závislosti na použité extrakční metodě v 60-90 % klíšťat. Z testovaných extrakčních metod byla nejvyšší citlivost po extrakci pomocí TRIzol® Reagent; s jeho použitím bylo zachyceno o řád nižší počet oproti zbylým dvěma metodám, extrakce QIAamp® Viral RNA Mini Kitem a nejméně citlivou metodou kitem RNAGEM™ Tissue. Na reálném vzorku jsme tedy ověřili, že tyto metody jsou vhodné pro detekci VKE v klíšťatech, metoda RNAGEM™ Tissue je ovšem méně citlivá než TRIzol® Reagent a QIAamp® Viral RNA Mini Kit.

Nepodařilo se nám infikovat klíšťata boréliemi. Jednou z možností je, že neúspěšná infekce byla zapříčiněna nízkou infekční dávkou, která byla do klíšťat vpravena. Vzhledem k tomu, že se v přírodě množství borélií v klíšťatech pohybuje mezi několika sty až tisíci na jedince, k této možnosti se spíše nepřikláníme (Brunet a Burkot, Piesman 2001, Wang et al., 2003). Další a pravděpodobnější možností je, že se injikované borélie v klíšťeti neuchytily z důvodu buď nízkého fitness bakterií z kultury a nebo kvůli vysokému množství pasáží, které mnou injikované borélie v kultuře prodělali (Golde & Dolan, 1995, Schwan et al., 1988). DNA *B. burgdorferi* byla detekována pouze u klíšťat, která sloužila jako pozitivní kontrola inokulace. Při detekci v PCR reakci byly borélie zachyceny v 20-40 % klíšťat, v závislosti na extrakční metodě. V real-time PCR reakci v 60-80 % klíšťat. Z použitých extrakčních metod byla nejvyšší citlivost po extrakci suspenzí Chelex®, méně citlivé byly metody extrakce DNeasy Blood & Tissue Kitem a kitem RNAGEM™ Tissue. Nezaznamenala jsem výraznější rozdíl mezi metodami co do počtu kopií v real-time PCR reakci.

7 Závěrečné shrnutí

Ve své práci jsem porovnála různé metody extrakce NK klíšťaty přenášených patogenů – RNA viru klíšťové encefalitidy a DNA spirochéty *Borrelia burgdorferi* – z klíštěte *Ixodes ricinus*. Jednotlivé metody byly mezi sebou porovnány nejenom na základě citlivostí pro extrakci výše zmíněných patogenů, ale i podle dalších kritérií, jako je cena, náročnost a doba provedení extrakce. Pro detekci viru klíšťové encefalitidy se zdají být nejvhodnější především komerčně prodávané kity, určené právě pro detekci virové RNA, dobré výsledky (porovnatelné s těmito kity) jsem získala i při použití roztoku TRIzol® Reagent, jehož výhodou je nižší cena. Tato metoda je ale výrazně časově náročnější.

V případě detekce DNA spirochét *B. burgdorferi* vyšly jako nejcitlivější opět některé komerční kity. Dobré výsledky jsem získala i s použitím suspenze Chelex® anebo extrakce hydroxidem amonným, které jsou levnější, ale znovu časově náročnější varianty.

Za nejvhodnější ale považuji simultánní extrakci virové RNA i bakteriální DNA pomocí kitu RNAGEM™ Tissue a RTP® DNA/RNA Virus Mini kit. V případě obou těchto kitů byla při simultánní izolaci obou NK zachována vysoká citlivost a současná izolace umožňuje velkou úsporu času i financí.

Zjištěné výsledky mohou být přínosem jak pro epidemiologické, tak diagnostické účely, kdy je nutné detekovat oba patogeny současně, ať už v klíšťatech či v jiných členovcích. Mé výsledky bude možné aplikovat i pro případnou detekci jiných patogenů z jiných vzorků.

Seznam použité literatury

- Ackermann, R., Kabatzki, J., Boisten, H. P., Steere, A. C., Grodzicki, R. L., Hartung, S. & Runne, U. (1984). Ixodes ricinus spirochete and European erythema chronicum migrans disease. *The Yale Journal of Biology and Medicine* **57**, 573.
- Albrecht, P. (1968). Pathogenesis of neurotropic arbovirus infections. *Current topics in microbiology and immunology* **43**, 44.
- Alekseev, A. N., Dubinina, H. V., Van De Pol, I. & Schouls, L. M. (2001). Identification of *Ehrlichia* spp. and *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes* ticks in the Baltic regions of Russia. *Journal of Clinical Microbiology* **39**, 2237-2242.
- Allender, C. J., Easterday, W. R., Van Ert, M. N., Wagner, D. M. & Keim, P. (2004). High-throughput extraction of arthropod vector and pathogen DNA using bead milling. *Biotechniques* **37**, 730-733.
- Amemiya, K., Schaefer, H. & Pachner, A. R. (1999). Isolation of DNA after extraction of RNA To detect the presence of *Borrelia burgdorferi* and expression of host cellular genes from the same tissue sample. *Journal of clinical microbiology* **37**, 2087-2089.
- Anderson, J. F. & Magnarelli, L. A. (2008). Biology of ticks. *Infectious disease clinics of North America* **22**, 195-215.
- Andrews, B. A. & Asenjo, J. A. (1987). Enzymatic lysis and disruption of microbial cells. *Trends in Biotechnology* **5**, 273-277.
- Ansari, K. I., Hussain, I., Shrestha, B., Kasiri, S. & Mandal, S. S. (2011). HOXC6 is transcriptionally regulated via coordination of MLL histone methylase and estrogen receptor under estrogen environment. *Journal of Molecular Biology* **411**, 334-349.
- Arnal, C., Ferre-Aubineau, V., Besse, B., Mignotte, B., Schwartzbrod, L. & Billaudel, S. (1999). Comparison of seven RNA extraction methods on stool and shellfish samples prior to hepatitis A virus amplification. *Journal of virological methods* **77**, 17-26.
- Avžič-Županc, Poljak M., Matičič M. & A., R.-M. (1994). Laboratory acquired tick-borne meningoencephalitis; Characterisation of virus strain. *Clinical and Diagnostic Virology* **4**, 51-59.
- Baker, M. (2011). qPCR: quicker and easier but don't be sloppy. *Nature methods* **8**, 207-212.
- Baranton, G., Postic, D., Saint Girons, I., Boerlin, P., Piffaretti, J. C., Assous, M. & Grimont, P. A. D. (1992). Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* sp. nov., and group VS461 associated with Lyme borreliosis. *International Journal of Systematic Bacteriology* **42**, 378-383.
- Baril, C., Richaud, C., Baranton, G. & Girons, I. S. (1989). Linear chromosome of *Borrelia burgdorferi*. *Research in microbiology* **140**, 507-516.
- Bauer, M. & Patzelt, D. (2003). A method for simultaneous RNA and DNA isolation from dried blood and semen stains. *Forensic science international* **136**, 76-78.
- Bellete, B., Flori, P., Hafid, J., Raberin, H. & Tran Manh Sung, R. (2003). Influence of the quantity of nonspecific DNA and repeated freezing and thawing of samples on the quantification of DNA by the Light Cycler®. *Journal of microbiological methods* **55**, 213-219.
- Benach, J. L., Bosler, E. M., Hanrahan, J. P., Coleman, J. L., Habicht, G. S., Bast, T. F., Cameron, D. J., Ziegler, J. L., Barbour, A. G. & Burgdorfer, W. (1983). Spirochetes isolated from the blood of two patients with Lyme disease. *New England Journal of Medicine* **308**, 740-742.
- Berensmeier, S. (2006). Magnetic particles for the separation and purification of nucleic acids. *Applied microbiology and biotechnology* **73**, 495-504.
- Berger, B. W. (1993). Erythema migrans. *Clinics in dermatology* **11**, 359-362.

- Bergmann, A. R., Schmidt, B. L., Derler, A. M. & Aberer, E. (2002). Importance of sample preparation for molecular diagnosis of Lyme borreliosis from urine. *Journal of clinical microbiology* **40**, 4581-4.
- Birnboim, H. C. & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic acids research* **7**, 1513.
- Boom, R., Sol, C. J., Salimans, M. M., Jansen, C. L., Wertheim-van Dillen, P. M. & Van der Noordaa, J. (1990). Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of clinical microbiology* **28**, 495.
- Brassard, J. B. J., Lamoureux, L. L. L., Marie-Josée Gagné, M. J. G., Poitras, A. P. A., Yvon-Louis Trottier, Y. L. T. & Houde, A. H. A. (2009). Comparison of commercial viral genomic extraction kits for the molecular detection of foodborne viruses. *Canadian journal of microbiology* **55**, 1016-1019.
- Brinkley, C., Nolskog, P., Golovljova, I., Lundkvist, Å. & Bergström, T. (2008). Tick-borne encephalitis virus natural foci emerge in western Sweden. *International Journal of Medical Microbiology* **298**, 73-80.
- Bröker, M. & Gniel, D. (2003). New foci of tick-borne encephalitis virus in Europe: consequences for travellers from abroad. *Travel Medicine and Infectious Disease* **1**, 181-184.
- Brunet, L. R., Spielman, A. & Telford 3rd, S. R. (1995). Short report: density of Lyme disease spirochetes within deer ticks collected from zoonotic sites. *The American journal of tropical medicine and hygiene* **53**, 300.
- Burgdorfer, W., Barbour, A. G., Hayes, S. F., Benach, J. L., Grunwaldt, E. & Davis, J. P. (1982). Lyme disease—a tick-borne spirochetosis? *Science* **216**, 1317.
- Bustin, S. A. (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of molecular endocrinology* **25**, 169.
- Canica, M. M., Nato, F., Merle, L., Mazie, J. C., Baranton, G. & Postic, D. (1993). Monoclonal antibodies for identification of *Borrelia afzelii* sp. nov. associated with late cutaneous manifestations of Lyme borreliosis. *Scandinavian journal of infectious diseases* **25**, 441-448.
- Casjens, S., Palmer, N., Van Vugt, R., Mun Huang, W., Stevenson, B., Rosa, P., Lathigra, R., Sutton, G., Peterson, J. & Dodson, R. J. (2000). A bacterial genome in flux: the twelve linear and nine circular extrachromosomal DNAs in an infectious isolate of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Molecular microbiology* **35**, 490-516.
- Cerar, D., Cerar, T., Ruzic-Sabljić, E., Wormser, G. P. & Strle, F. (2010). Subjective symptoms after treatment of early Lyme disease. *The American journal of medicine* **123**, 79-86.
- Coombs, N. J., Gough, A. C. & Primrose, J. N. (1999). Optimisation of DNA and RNA extraction from archival formalin-fixed tissue. *Nucleic Acids Research* **27**, e12-i-e12-iii.
- Crowder, C. D., Rounds, M. A., Phillipson, C. A., Picuri, J. M., Matthews, H. E., Halverson, J., Schutzer, S. E., Ecker, D. J. & Eshoo, M. W. (2010). Extraction of total nucleic acids from ticks for the detection of bacterial and viral pathogens. *Journal of medical entomology* **47**, 89.
- Daniel, M., Zitek, K., Danielova, V., Kriz, B., Valter, J. & Kott, I. (2006). Risk assessment and prediction of Ixodes ricinus tick questing activity and human tick-borne encephalitis infection in space and time in the Czech Republic. *International Journal of Medical Microbiology* **296**, 41-47.
- Danielova, V. & Holubova, J. (1991). Transovarial transmission rate of tick-borne encephalitis virus in Ixodes ricinus ticks. *Modern acarology* **2**, 7-10.

- Danielová, V., Holubová, J., Pejcoch, M. & Daniel, M. (2002). Potential significance of transovarial transmission in the circulation of tick-borne encephalitis virus. *Folia parasitologica* **49**, 323-325.
- Dederich, D. A., Okwuonu, G., Garner, T., Denn, A., Sutton, A., Escotto, M., Martindale, A., Delgado, O., Muzny, D. M. & Gibbs, R. A. (2002). Glass bead purification of plasmid template DNA for high throughput sequencing of mammalian genomes. *Nucleic Acids Research* **30**, e32.
- Demaerschalck, I., Ben Messaoud, A., De Kesel, M., Hoyois, B., Lobet, Y., Hoet, P., Bigaignon, G., Bollen, A. & Godfroid, E. (1995). Simultaneous presence of different *Borrelia burgdorferi* genospecies in biological fluids of Lyme disease patients. *Journal of clinical microbiology* **33**, 602.
- Deng, M. Y., Wang, H., Ward, G. B., Beckham, T. R. & McKenna, T. S. (2005). Comparison of six RNA extraction methods for the detection of classical swine fever virus by real-time and conventional reverse transcriptional PCR. *Journal of veterinary diagnostic investigation* **17**, 574.
- Dumpis, U., Crook, D. & Oksi, J. (1999). Tick-borne encephalitis. *Clinical infectious diseases* **28**, 882.
- 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.
- Engler, C. R. (1985). Disruption of microbial cells.
- Epstein, E. & Kutsar, K. (2009). Epidemiological Trends of Tick-Borne Encephalitis in Estonia. *EpiNoth* **10**, 58-62.
- Exner, M. M. & Lewinski, M. A. (2003). Isolation and detection of *Borrelia burgdorferi* DNA from cerebral spinal fluid, synovial fluid, blood, urine, and ticks using the Roche MagNA Pure system and real-time PCR. *Diagnostic microbiology and infectious disease* **46**, 235-240.
- Farrell, R. E. (2009). RNA methodologies: laboratory guide for isolation and characterization: Academic Press.
- Fraser, C. M., Casjens, S., Huang, W. M., Sutton, G. G., Clayton, R., Lathigra, R., White, O., Ketchum, K. A., Dodson, R. & Hickey, E. K. (1997). Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature* **390**, 580-586.
- Fukunaga, M., Hamase, A., Okada, K. & Nakao, M. (1996). *Borrelia tanukii* sp. nov. and *Borrelia turdae* sp. nov. found from ixodid ticks in Japan: Rapid species identification by 16S rRNA gene-targeted PCR analysis. *Microbiology and immunology* **40**, 877-871.
- García, G. L. A., Rodrigo, T. J. P., Sánchez, L. P., Ramos, S. & Suárez, N. C. (2004). DNA extraction using Chelex resin for oncogenic amplification analysis in head and neck tumours]. *Acta Otorrinolaringológica Española* **55**, 139-144.
- Ge, Y., Li, C., Corum, L., Slaughter, C. A. & Charon, N. W. (1998). Structure and expression of the FlaA periplasmic flagellar protein of *Borrelia burgdorferi*. *Journal of bacteriology* **180**, 2418.
- Geciova, J., Bury, D. & Jelen, P. (2002). Methods for disruption of microbial cells for potential use in the dairy industry--a review. *International Dairy Journal* **12**, 541-553.
- Gern, L., Douet, V., López, Z., Rais, O. & Cadenas, F. M. (2010). Diversity of *Borrelia* genospecies in *Ixodes ricinus* ticks in a Lyme borreliosis endemic area in Switzerland identified by using new probes for reverse line blotting. *Ticks and Tick-borne Diseases* **1**, 23-29.
- Gern, L. & Rais, O. (1996). Efficient transmission of *Borrelia burgdorferi* between cofeeding *Ixodes ricinus* ticks (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology* **33**, 189-192.

- Golde, W. T. & Dolan, M. C. (1995). Variation in antigenicity and infectivity of derivatives of *Borrelia burgdorferi*, strain B31, maintained in the natural, zoonotic cycle compared with maintenance in culture. *Infection and Immunity* **63**, 4795-4801.
- Goldstein, S. F., Buttle, K. F. & Charon, N. W. (1996). Structural analysis of the *Leptospiraceae* and *Borrelia burgdorferi* by high-voltage electron microscopy. *Journal of bacteriology* **178**, 6539.
- Golovljova, I., Vene, S., Sjölander, K. B., Vasilenko, V., Plyusnin, A. & Lundkvist (2004). Characterization of tick borne encephalitis virus from Estonia. *Journal of medical virology* **74**, 580-588.
- Gould, E. A., de Lamballerie, X., Zanotto, P. M. A. & Holmes, E. C. (2003). Origins, evolution, and vectorhost coadaptations within the genus Flavivirus. *Advances in Virus Research* **59**, 277-314.
- Gould, E. A. & Solomon, T. (2008). Pathogenic flaviviruses. *The Lancet* **371**, 500-509.
- Grard, G., Moureau, G., Charrel, R. N., Lemasson, J. J., Gonzalez, J. P., Gallian, P., Gritsun, T. S., Holmes, E. C., Gould, E. A. & de Lamballerie, X. (2007). Genetic characterization of tick-borne flaviviruses: new insights into evolution, pathogenetic determinants and taxonomy. *Virology* **361**, 80-92.
- Gresikova, M. & Kaluzova, M. (1997). Biology of tick-borne encephalitis virus. *Acta virologica* **41**, 115.
- Grimm, D., Tilly, K., Byram, R., Stewart, P. E., Krum, J. G., Bueschel, D. M., Schwan, T. G., Policastro, P. F., Elias, A. F. & Rosa, P. A. (2004). Outer-surface protein C of the Lyme disease spirochete: a protein induced in ticks for infection of mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 3142.
- Gritsun, T. S. & Gould, E. A. (2006). The 3'untranslated region of tick-borne flaviviruses originated by the duplication of long repeat sequences within the open reading frame. *Virology* **350**, 269-275.
- Gritsun, T. S. & Gould, E. A. (2007). Origin and evolution of flavivirus 5'UTRs and panhandles: trans-terminal duplications? *Virology* **366**, 8-15.
- Gritsun, T. S., Lashkevich, V. A. & Gould, E. A. (2003). Tick-borne encephalitis. *Antiviral research* **57**, 129-146.
- Guy, E. C. & Stanek, G. (1991). Detection of *Borrelia burgdorferi* in patients with Lyme disease by the polymerase chain reaction. *Journal of clinical pathology* **44**, 610.
- Haglund, M. & Günther, G. (2003). Tick-borne encephalitis – pathogenesis, clinical course and long-term follow-up. *Vaccine* **21**, S11-S18.
- Halos, L., Jamal, T., Vial, L., Maillard, R., Suau, A., Le Menach, A., Boulouis, H. J. & Vayssier-Taussat, M. (2004). Determination of an efficient and reliable method for DNA extraction from ticks. *Veterinary research* **35**, 709-713.
- Halperin, J. J. (2008). Nervous system Lyme disease. *Infectious disease clinics of North America* **22**, 261-274.
- Hayasaka, 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.
- Heinz, F. X., Collett, M. S., Purcell, R. H., Gould, E. A., Howard, C. R., Houghton, M., Moormann, R. J. M., Rice, C. M. & Thiel, H. J. (2000). Family Flaviviridae. *Virus Taxonomy: Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, 859 - 878.
- Helenius, A., McCaslin, D. R., Fries, E. & Tanford, C. (1979). Properties of detergents. *Methods Enzymol* **56**, 734-49.

- Hernández, M., Esteve, T., Prat, S. & Pla, M. (2004). Development of real-time PCR systems based on SYBR Green I, Amplifluor (TM) and TaqMan technologies for specific quantitative detection of the transgenic maize event GA21. *Journal of Cereal Science* **39**, 99-107.
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P. S. & Griffith, R. (1992). Simultaneous amplification and detection of specific DNA-sequences. *Bio-Technology* **10**, 413-417.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G. & Watson, R. (1993). Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Nature Biotechnology* **11**, 1026-1030.
- Holt, S. C. (1978). Anatomy and chemistry of spirochetes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **42**, 114.
- Holzmann, H. (2003). Diagnosis of tick-borne encephalitis. *Vaccine* **21**, S36-S40.
- Holzmann, H., Aberle, S. W., Stiasny, K., Werner, P., Mischak, A., Zainer, B., Netzer, M., Koppi, S., Bechter, E. & Heinz, F. X. (2009). Tick-borne encephalitis from eating goat cheese in a mountain region of Austria. *Emerging Infectious Diseases* **15**, 1671.
- Hönig, V., Zubrikova, D., Vögerl, M., Švec, P., Pfister, K. & Grubhoffer, L. (2011). Klíšťata a jimi přenášená onemocnění v Jihočeském kraji a Bavorsku, 1.vydání edn, pp. 80. České Budějovice: Jihočeská univerzita
- Hu, C. M., Humair, P. F., Wallich, R. & Gern, L. (1997). *Apodemus* sp. rodents, reservoir hosts for *Borrelia afzelii* in an endemic area in Switzerland. *Zentralblatt für Bakteriologie* **285**, 558-564.
- Hubalek, Z., Halouzka, J. & Juricova, Z. (1998). Investigation of haematophagous arthropods for borreliae-summarized data, 1988-1996. *Folia parasitologica* **45**, 67-72.
- Hubálek, Z., Pow, I., Reid, H. W. & Hussain, M. H. (1996). MH. Antigenic similarity of Central European encephalitis and louping-ill viruses. *Acta virologica*, 251-256.
- Chambers, T. J. & Diamond, M. S. (2003). Pathogenesis of flavivirus encephalitis. *Advances in virus research* **60**, 273-342.
- Charon, N. W. & Goldstein, S. F. (2002). Genetics of motility and chemotaxis of a fascinating group of bacteria: the spirochetes. *Annual Review of Genetics* **36**, 47-73.
- Chirgwin, J. M., Przybyla, A. E., MacDonald, R. J. & Rutter, W. J. (1979). Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* **18**, 5294-5299.
- Chomczynski, P. (1993). A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques* **15**, 532-537.
- Chu, C. Y., Liu, W., Jiang, B. G., Wang, D. M., Jiang, W. J., Zhao, Q. M., Zhang, P. H., Wang, Z. X., Tang, G. P. & Yang, H. (2008). A novel genospecies of *Borrelia burgdorferi* sensu lato from rodents and ticks of southwestern China. *Journal of clinical microbiology*, 877-882.
- J. Rampas, F. G. (1949). Isolace virusu encefalitidy z klíšťat *Ixodes ricinus*. *Časopis lékařů českých* **88**, 1179-1181.
- Jones, L. D., Hodgson, E. & Nuttall, P. A. (1989). Enhancement of virus transmission by tick salivary glands. *Journal of general virology* **70**, 1895.
- Kawabata, H., Masuzawa, T. & Yanagihara, Y. (1993). Genomic analysis of *Borrelia japonica* sp. nov. isolated from *Ixodes ovatus* in Japan. *Microbiology and immunology* **37**, 843-848.
- Kimsey, R. B. (1990). Motility of Lyme disease spirochetes in fluids as viscous as the extracellular matrix. *Journal of Infectious Diseases* **162**, 1205.
- Kirby, K. S. (1957). A new method for the isolation of deoxyribonucleic acids: evidence on the nature of bonds between deoxyribonucleic acid and protein. *Biochemical Journal* **66**, 495.

- Klaus, C., Hoffmann, B., Hering, U., Mielke, B., Sachse, K., Beer, M. & Süß, J. (2009). Tick-borne encephalitis (TBE) virus prevalence and virus genome characterization in field-collected ticks (*Ixodes ricinus*) from risk, non-risk and former risk areas of TBE, and in ticks removed from humans in Germany. *Clinical Microbiology and Infection* **16**, 238-244.
- Kojima, K. & Ozawa, S. (2005). Method for isolating and purifying nucleic acids: Google Patents.
- Kostecka, P., Nemcovd, K. & Pivonkovd, H. (2008). Magnetic beads-based electrochemical DNA and protein sensing strategies: prospective tools for molecular diagnostics. *Bioelectrochemistry Research Developments*, 81.
- Kramer, L. D., Wolfe, T. M., Green, E. N., Chiles, R. E., Fallah, H., Fang, Y. & Reisen, W. K. (2002). Detection of encephalitis viruses in mosquitoes (Diptera: Culicidae) and avian tissues. *Journal of medical entomology* **39**, 312-323.
- Kříž, B., Beneš, C. & Daniel, M. (2009). Alimentary transmission of tick-borne encephalitis in the Czech Republic (1997-2008). *Epidemiologie, Mikrobiologie, Imunologie* **58**, 98-103.
- Kurtenbach, K., De Michelis, S., Etti, S., Schäfer, S. M., Sewell, H. S., Brade, V. & Kraiczy, P. (2002). Host association of *Borrelia burgdorferi* sensu lato – the key role of host complement. *Trends in Microbiology* **10**, 74-79.
- Labuda, M., Jones, L. D., Williams, T., Danielova, V. & Nuttall, P. A. (1993). Efficient transmission of tick-borne encephalitis virus between cofeeding ticks. *Journal of medical entomology* **30**, 295-299.
- Lanciotti, R. S., Kerst, A. J., Nasci, R. S., Godsey, M. S., Mitchell, C. J., Savage, H. M., Komar, N., Panella, N. A., Allen, B. C. & Volpe, K. E. (2000). Rapid detection of West Nile virus from human clinical specimens, field-collected mosquitoes, and avian samples by a TaqMan reverse transcriptase-PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology* **38**, 4066.
- Le Fleche, A., Postic, D., Girardet, K., Peter, O. & Baranton, G. (1997). Characterization of *Borrelia lusitaniae* sp. nov. by 16S ribosomal DNA sequence analysis. *International journal of systematic bacteriology* **47**, 921-925.
- Lebet, N. & Gern, L. (1994). Histological examination of *Borrelia burgdorferi* infections in unfed *Ixodes ricinus* nymphs. *Experimental and Applied Acarology* **18**, 177-183.
- Leutenegger, C. M., Pusterla, N., Mislin, C. N., Weber, R. & Lutz, H. (1999). Molecular evidence of coinfection of ticks with *Borrelia burgdorferi* sensu lato and the human granulocytic ehrlichiosis agent in Switzerland. *Journal of clinical microbiology* **37**, 3390.
- Liang, F. T., Yan, J., Mbow, M. L., Sviat, S. L., Gilmore, R. D., Mamula, M. & Fikrig, E. (2004). *Borrelia burgdorferi* changes its surface antigenic expression in response to host immune responses. *Infection and immunity* **72**, 5759.
- Lindquist, L. & Vapalahti, O. (2008). Tick-borne encephalitis. *The Lancet* **371**, 1861-1871.
- Little, M. C. (1991). Process for the purification of DNA on diatomaceous earth: Google Patents.
- Locatelli, G., Santoro, F., Veglia, F., Gobbi, A., Lusso, P. & Malnati, M. S. (2000). Real-time quantitative PCR for human herpesvirus 6 DNA. *Journal of clinical microbiology* **38**, 4042.
- Logan, J., Edwards, K. & Saunders, N. (2009). Real-time PCR: current technology and applications: Caister Academic Pr.
- Mackay, I. M. (2004). Real time PCR in the microbiology laboratory. *Clinical Microbiology and Infection* **10**, 190-212.

- Mackay, I. M., Arden, K. E. & Nitsche, A. (2002). Real-time PCR in virology. *Nucleic acids research* **30**, 1292.
- Magnarelli, L. A., Anderson, J. F. & Fish, D. (1987). Transovarial transmission of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes dammini* (Acari: Ixodidae). *The Journal of infectious diseases* **156**, 234-236.
- Malkova, D. & Frankova, V. (1959). The lymphatic system in the development of experimental tick-borne encephalitis in mice. *Acta virologica* **3**, 210.
- Mandl, C. W., Heinz, F. X. & Kunz, C. (1988). Sequence of the structural proteins of tick-borne encephalitis virus (western subtype) and comparative analysis with other flaviviruses. *Virology* **166**, 197-205.
- Marconi, R. T., Liveris, D. & Schwartz, I. (1995). Identification of novel insertion elements, restriction fragment length polymorphism patterns, and discontinuous 23S rRNA in Lyme disease spirochetes: phylogenetic analyses of rRNA genes and their intergenic spacers in *Borrelia japonica* sp. nov. and genomic group 21038 (*Borrelia andersonii* sp. nov.) isolates. *Journal of clinical microbiology* **33**, 2427.
- Margos, G., Vollmer, S. A., Cornet, M., Garnier, M., Fingerle, V., Wilske, B., Bormane, A., Vitorino, L., Collares-Pereira, M. & Drancourt, M. (2009). A new *Borrelia* species defined by multilocus sequence analysis of housekeeping genes. *Applied and environmental microbiology* **75**, 5410.
- Mason, P. E., Neilson, G. W., Dempsey, C. E., Barnes, A. C. & Cruickshank, J. M. (2003). The hydration structure of guanidinium and thiocyanate ions: Implications for protein stability in aqueous solution. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**, 4557.
- Masuzawa, T., Takada, N., Kudeken, M., Fukui, T., Yano, Y., Ishiguro, F., Kawamura, Y., Imai, Y. & Ezaki, T. (2001). *Borrelia sinica* sp. nov., a lyme disease-related *Borrelia* species isolated in China. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **51**, 1817-1824.
- McOrist, A. L., Jackson, M. & Bird, A. R. (2002). A comparison of five methods for extraction of bacterial DNA from human faecal samples. *Journal of microbiological methods* **50**, 131-139.
- Middelberg, A. P. J. (1995). Process-scale disruption of microorganisms. *Biotechnology advances* **13**, 491-551.
- Motaleb, M. A., Corum, L., Bono, J. L., Elias, A. F., Rosa, P., Samuels, D. S. & Charon, N. W. (2000). *Borrelia burgdorferi* periplasmic flagella have both skeletal and motility functions. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**, 10899.
- Naglak, T. J., Hettwer, D. J. & Wang, H. Y. (1990). Chemical permeabilization of cells for intracellular product release. *Bioprocess technology* **9**, 177.
- Nargessi, R. D. (2005). Magnetic isolation and purification of nucleic acids: Google Patents.
- Nefedova, V. V., Korenberg, E. I., Gorelova, N. B. & Kovalevskii, Y. V. (2004). Studies on the transovarial transmission of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in the taiga tick *Ixodes persulcatus*. *Folia parasitologica* **51**, 67-71.
- Nocton, J. J., Dressler, F., Rutledge, B. J., Rys, P. N., Persing, D. H. & Steere, A. C. (1994). Detection of *Borrelia burgdorferi* DNA by polymerase chain reaction in synovial fluid from patients with Lyme arthritis. *New England Journal of Medicine* **330**, 229-234.
- Nuttall, P. A., Labuda, M., Goodman, J. L., Dennis, D. T. & Sonenshine, D. E. (2005). Tick-borne encephalitis. *Tick-borne diseases of humans*, 150-163.
- Pal, U., Yang, X., Chen, M., Bockenstedt, L. K., Anderson, J. F., Flavell, R. A., Norgard, M. V. & Fikrig, E. (2004). OspC facilitates *Borrelia burgdorferi* invasion of *Ixodes scapularis* salivary glands. *Journal of Clinical Investigation* **113**, 220-230.

- Parola, P. & Raoult, D. (2001). Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. *Clinical infectious diseases* **32**, 897.
- Postic, D., Garnier, M. & Baranton, G. (2007). Multilocus sequence analysis of atypical *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates—description of *Borrelia californiensis* sp. nov., and genomospecies 1 and 2. *International journal of medical microbiology* **297**, 263-271.
- Postic, D., Ras, N. M., Lane, R. S., Henderson, M. & Baranton, G. (1998). Expanded diversity among Californian *Borrelia* isolates and description of *Borrelia bissettii* sp. nov. (formerly *Borrelia* group DN127). *Journal of Clinical Microbiology* **36**, 3497-3504.
- Poupon, M. A., Lommano, E., Humair, P. F., Douet, V., Rais, O., Schaad, M., Jenni, L. & Gern, L. (2006). Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in ticks collected from migratory birds in Switzerland. *Applied and environmental microbiology* **72**, 976-979.
- Puchhammer-Stöckl, E., Kunz, C., Mandl, C. W. & 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.
- Ramelow, C., Suss, J., Berndt, D., Roggendorf, M. & Schreier, E. (1993). Detection of tick-borne encephalitis virus RNA in ticks (*Ixodes ricinus*) by the polymerase chain reaction. *Journal of virological methods* **45**, 115-119.
- Randolph, S. E. (2004). Tick ecology: processes and patterns behind the epidemiological risk posed by ixodid ticks as vectors. *Parasitology* **129**, S37-S65.
- Randolph, S. E., Gern, L. & Nuttall, P. A. (1996). Co-feeding ticks: epidemiological significance for tick-borne pathogen transmission. *Parasitology Today* **12**, 472-479.
- Raška, K. (1983). Epidemiologic surveillance in the control of infectious disease. *Review of Infectious Diseases* **5**, 1112.
- Rauter, C., Oehme, R., Diterich, I., Engele, M. & Hartung, T. (2002). Distribution of clinically relevant *Borrelia* genospecies in ticks assessed by a novel, single-run, real-time PCR. *Journal of clinical microbiology* **40**, 36.
- Rehacek, J. (1962). Transovarial transmission of tick-borne encephalitis virus by ticks. *Acta virologica* **6**, 220.
- Ribeiro, J. M. C., Mather, T. N., Piesman, J. & Spielman, A. (1987). Dissemination and salivary delivery of Lyme disease spirochetes in vector ticks (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology* **24**, 201-205.
- Riedmaier, I., Bergmaier, M. & Pfaffl, M. W. (2010). Comparison of two available platforms for determination of RNA quality. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* **24**, 2154-2159.
- Richter, D., Postic, D., Sertour, N., Livey, I., Matuschka, F. R. & Baranton, G. (2006). Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato species by multilocus sequence analysis and confirmation of the delineation of *Borrelia spielmanii* sp. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **56**, 873-881.
- Rijpkema, S. G., Molkenboer, M. J., Schouls, L. M., Jongejan, F. & Schellekens, J. F. (1995). Simultaneous detection and genotyping of three genomic groups of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Dutch *Ixodes ricinus* ticks by characterization of the amplified intergenic spacer region between 5S and 23S rRNA genes. *Journal of clinical microbiology* **33**, 3091.
- Roche (2007). Nucleic acids isolation and purification. *Roche Diagnostics GmbH* **3rd edition**.
- Rosa, P. A., Tilly, K. & Stewart, P. E. (2005). The burgeoning molecular genetics of the Lyme disease spirochaete. *Nature Reviews Microbiology* **3**, 129-143.

- Rudenko, N., Golovchenko, M., Cihlarova, 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.
- Rudenko, N., Golovchenko, M., Grubhoffer, L. & Oliver Jr, J. H. (2009a). *Borrelia carolinensis* sp. nov., a new (14th) member of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex from the southeastern region of the United States. *Journal of clinical microbiology* **47**, 134.
- Rudenko, N., Golovchenko, M., Grubhoffer, L. & Oliver Jr, J. H. (2011). Updates on *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex with respect to public health. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 123-128.
- Rudenko, N., Golovchenko, M., NÄ›mec, J., Volkaert, J., Mallatova, N. & Grubhoffer, L. (2005). Improved method of detection and molecular typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in clinical samples by polymerase chain reaction without DNA purification. *Folia microbiologica* **50**, 31-39.
- Rudenko, N., Golovchenko, M., RĹžzÄ›ek, D., Piskunova, N., MallÄ›tovÄ›, N. & Grubhoffer, L. (2009b). Molecular detection of *Borrelia bissettii* DNA in serum samples from patients in the Czech Republic with suspected borreliosis. *FEMS microbiology letters* **292**, 274-281.
- Ruzek, D., Salat, J., Palus, M., Gritsun, T. S., Gould, E. A., Dykova, I., Skallova, A., Jelínek, J., Kopecky, J. & Grubhoffer, L. (2009). CD8+ T-cells mediate immunopathology in tick-borne encephalitis. *Virology* **384**, 1-6.
- Sambrook, J. & Russell, D. W. (2001). Molecular cloning: a laboratory manual: CSHL press.
- Sanlidag, T., Akcali, S., Ozbakkaloglu, B., Ertekin, D. & Akduman, E. (2009). Distribution of hepatitis C virus genotypes in Manisa region, Turkey. *Mikrobiyoloji bülteni* **43**, 613-618.
- Sauer, J. R., McSwain, J. L., Bowman, A. S. & Essenberg, R. C. (1995). Tick salivary gland physiology. *Annual Review of Entomology* **40**, 245-267.
- Shi, Y., Xu, Q., McShan, K. & Liang, F. T. (2008). Both decorin-binding proteins A and B are critical for the overall virulence of *Borrelia burgdorferi*. *Infection and immunity* **76**, 1239.
- Schmidt-Chanasit, J., Olschlager, S., Gunther, S., Jaeger, G., Bleyemehl, K., Schad, S. G., Heckel, G., Ulrich, R. G. & Doerr, H. W. (2008). Molecular analysis of varicella-zoster virus strains circulating in Tanzania demonstrating the presence of genotype M1. *Journal of clinical microbiology* **46**, 3530 - 3533.
- Schneider, H. (1931). Über epidemische akute „Meningitis serosa“. *Wiener klinische Wochenschrift*. **44**, 350-352.
- Schneider, M. J. & Lehotay, S. J. (2004). Rapid fluorescence screening assay for tetracyclines in chicken muscle. *Journal of AOAC International* **87**, 587-591.
- Schrader, C. & Süß, J. (1999). A nested RT-PCR for the detection of tick-borne encephalitis virus (TBEV) in ticks in natural foci. *Zentralblatt für Bakteriologie* **289**, 319-328.
- Schwaiger, M. & Cassinotti, P. (2003). Development of a quantitative real-time RT-PCR assay with internal control for the laboratory detection of tick borne encephalitis virus (TBEV) RNA. *Journal of Clinical Virology* **27**, 136-145.
- Schwaiger, M., Peter, O. & Cassinotti, P. (2001). Routine diagnosis of *Borrelia burgdorferi* (sensu lato) infections using a real time PCR assay. *Clinical microbiology and infection* **7**, 461-469.
- Schwan, T. G., Burgdorfer, W. & Garon, C. F. (1988). Changes in infectivity and plasmid profile of the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*, as a result of in vitro cultivation. *Infection and immunity* **56**, 1831-1836.

- Simms, D., Cizdziel, P. E. & Chomczynski, P. (1993). TRIzol: A new reagent for optimal single-step isolation of RNA. *Focus* **15**, 99-102.
- Simpson, K. L., Wilson, A. W., Burton, E., Nakayama, T. O. M. & Chichester, C. O. (1963). Modified French press for the disruption of microorganisms. *Journal of Bacteriology* **86**, 1126.
- Singer-Sam, J., Tanguay, R. L. & Riggs, A. D. (1989). Use of Chelex to improve the PCR signal from a small number of cells.
- Singh, K. S. & Girschick, J. H. (2004). Molecular survival strategies of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *The Lancet Infectious Diseases* **4**, 575-583.
- Sjöback, R., Nygren, J. & Kubista, M. (1995). Absorption and fluorescence properties of fluorescein. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **51**, L7-L21.
- Skuballa, J., Oehme, R., Hartelt, K., Petney, T., BÄLcher, T., Kimmig, P. & Taraschewski, H. (2007). European hedgehogs as hosts for *Borrelia* spp., Germany. *Emerging Infectious Diseases* **13**, 952.
- Sonenshine, D. E. (1991). *Biology of ticks*. Volume 2: Oxford University Press.
- Stanczak, J., Gabre, R. M., Kruminis-Lozowska, W., Racewicz, M. & Kubica-Biernat, B. (2004). *Ixodes ricinus* as a vector of *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia microti* in urban and suburban forests. *Ann Agric Environ Med* **11**, 109-14.
- Stünzner, D., Hubalek, Z., Halouzka, J., Wendelin, I., Sixl, W. & Marth, E. (2006). Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in the tick *Ixodes ricinus* in the Styrian mountains of Austria. *Wiener Klinische Wochenschrift* **118**, 682-685.
- Su, X. & Comeau, A. M. (1999). Cellulose as a matrix for nucleic acid purification. *Analytical biochemistry* **267**, 415.
- Süss, J. (2003). Epidemiology and ecology of TBE relevant to the production of effective vaccines. *Vaccine* **21**, S19-S35.
- Süss, J. (2011). Tick-borne encephalitis 2010: Epidemiology, risk areas, and virus strains in Europe and Asia - An overview. *Ticks and Ticks.borne Diseases* **2**, 2-15.
- Süss, J., Klaus, C., Gerstengarbe, F. W. & Werner, P. C. (2008). What makes ticks tick? Climate Change, Ticks, and Tick-Borne Diseases. *Journal of travel medicine* **15**, 39-45.
- Swanson, S. J., Neitzel, D., Reed, K. D. & Belongia, E. A. (2006). Coinfections acquired from *Ixodes* ticks. *Clinical microbiology reviews* **19**, 708.
- Sweet, D., Lorente, M., Valenzuela, A., Lorente, J. A. & Alvarez, J. C. (1996). Increasing DNA extraction yield from saliva stains with a modified Chelex method. *Forensic science international* **83**, 167-177.
- Takayama, K., Rothenberg, R. J. & Barbour, A. G. (1987). Absence of lipopolysaccharide in the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *Infection and immunity* **55**, 2311.
- Tan, S. C. & Yiap, B. C. (2009). DNA, RNA, and protein extraction: the past and the present. *J. Biomed. Biotechnol.*
- Templeton, T. J. (2004). *Borrelia* outer membrane surface proteins and transmission through the tick. *The Journal of experimental medicine* **199**, 603-606.
- Tilly, K., Rosa, P. A. & Stewart, P. E. (2008). Biology of infection with *Borrelia burgdorferi*. *Infectious disease clinics of North America* **22**, 217-234.
- Triant, D. A. & Whitehead, A. (2009). Simultaneous extraction of high-quality RNA and DNA from small tissue samples. *Journal of Heredity* **100**, 246.
- Tyagi, S., Bratu, D. P. & Kramer, F. R. (1998). Multicolor molecular beacons for allele discrimination. *Nature Biotechnology* **16**, 49-53.

- Vaara, M. (1992). Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **56**, 395.
- Varelas-Wesley, I. & Calisher, C. H. (1982). Antigenic relationships of flaviviruses with undetermined arthropod-borne status. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **31**, 1273.
- Vavrušková, Z. (2010). Výskyt klíšťat a jimi přenášených patogenů v městském parku v Českých Budějovicích. In *Katedra medicínské biologie*, pp. 35. České Budějovice: Přírodovědecká fakulta Jihočeská univerzita.
- Votiakov, V. I., Protas, I. & Bortkevich, V. S. (1975). Experimental study of the pathogenesis of tick-borne encephalitis. *Voprosy virusologii*, 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.
- Wang, G., Liveris, D., Brei, B., Wu, H., Falco, R. C., Fish, D. & Schwartz, I. (2003). Real-time PCR for simultaneous detection and quantification of *Borrelia burgdorferi* in field-collected *Ixodes scapularis* ticks from the northeastern United States. *Applied and environmental microbiology* **69**, 4561.
- Wang, G., Van Dam, A. P., Le Fleche, A., Postic, D., Peter, O., Baranton, G., De Boer, R., Spanjaard, L. & Dankert, J. (1997). Genetic and phenotypic analysis of *Borrelia valaisiana* sp. nov. (*Borrelia* genomic groups VS116 and M19). *International journal of systematic bacteriology* **47**, 926-932.
- Whitcombe, D., Theaker, J., Guy, S. P., Brown, T. & Little, S. (1999). Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence. *Nature Biotechnology* **17**, 804-807.
- Wicki, R., Sauter, P., Mettler, C., Natsch, A.,ENZLER, T., Pusterla, N., Kuhnert, P., Egli, G., Bernasconi, M. & Lienhard, R. (2000). Swiss Army Survey in Switzerland to determine the prevalence of *Francisella tularensis*, members of the Ehrlichia phagocytophila genogroup, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, and tick-borne encephalitis virus in ticks. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* **19**, 427-432.
- Wittwer, C. T., Ririe, K. M., Andrew, R. V., David, D. A., Gundry, R. A. & Balis, U. J. (1997). The LightCycler™: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. *Biotechniques* **22**, 176-181.
- Xu, Q., McShan, K. & Liang, F. T. (2008). Modification of *Borrelia burgdorferi* to overproduce OspA or VlsE alters its infectious behaviour. *Microbiology* **154**, 3420.
- Zilber, L. A. (1939). Vesennij (vesenne-letnij) epidemičeskij kleščevoj encefalit. *Arhiv Biologičeskikh Nauk* **56**, 2.
- Zipper, H., Brunner, H., Bernhagen, J. & Vitzthum, F. (2004). Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic acids research* **32**, e103-e103.

Elektronické informační zdroje (11.12.2011)

Chelex® 100 Resin

www.bio-rad.com/webmaster/pdfs/9184_Chelex.PDF

DNeasy Blood & Tissue Kit

handbookwww.qiagen.com/products/genomicdnastabilizationpurification/dneasytissuesystem/dneasybloodtissuekit.aspx#Tabs=t2

NucleoSpin® RNA Virus

www.mn-net.com/Portals/8/attachments/Redakteure_Bio/Protocols/Viral%20nucleic%20acids/UM_ViralRNA.pdf

Perfect Pure™ RNA Cell & Tissue

www.5prime.com/media/3418/perfectpure%20rna%2096%20cell%20kit%20manual_5prime_1044351_032007.pdf

QIAamp® Viral RNA Mini Kit handbook

www.qiagen.com/products/rnastabilizationpurification/cellviralrnapurificationsystems/qiaampviralrnaminikit.aspx#Tabs=t2

RNAGEM™ Tissue PLUS

www.zygem.com/Products/Products-RG-Tissue.html

RNeasy Mini Kit handbook

www.qiagen.com/products/rnastabilizationpurification/rneasyystem/rneasymini.aspx#Tabs=t2

Roche, Nucleic Acid Isolation and Purification

http://www.roche-applied-science.com/publications/print_mat/nucleic_acid_purification_isolation.pdf

RTP® DNA/RNA Virus Mini KIT

www.invitex.de/e1531/e1658/e2414/e2678/e2728/ip_manual4692/RTPDNA-RNAVirusMiniKit0411.pdf

tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/trizol_reagent.pdf

www.photomacrography.net

www.enotes.com/topic/Phenol-chloroform_extraction

www.generi-biotech.com/real-time-pcr-sondy-kvantitativni-real-time-pcr/