

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERZITY KARLOVY V PRAZE

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE



Katedra genetiky a mikrobiologie

Enteroviry a diabetes 1. typu

Enteroviruses and type 1 diabetes

Kateřina Holková

školitel doc. MUDr. Ondřej Cinek Ph.D.

Praha 2012

Poděkování

Poděkování patří mému školiteli doc. MUDr. Ondřeji Cinkovi Ph.D. za odborné konzultace a velkou trpělivost. Také bych ráda poděkovala celému týmu Laboratoře molekulární genetiky v Motole za jejich podporu a přátelské prostředí. Nakonec děkuji mé rodině a přátelům za podporu během celého mého studia.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala sama na základě uvedené literatury a konzultací se svým školitelem.

Praha 2012

Abstrakt

Tato práce je přehledem publikovaných prací z oblasti lidských picornavirů (enterovirus, parechovirus) a jejich možné role v patogenezi diabetu 1. typu, dále je tato práce doplněna krátkou zprávou o testování parechovirové virémie v pilotním souboru krví od jednotlivců, kteří jsou geneticky predisponováni k diabetu 1. typu. Diabetes 1. typu je onemocnění končící absolutním deficitem inzulínu v důsledku autoimunitní destrukce beta buněk pankreatu. Je to typické polygenní, multifaktoriální onemocnění. Zatímco jeho genetická složka se zdá být poměrně dobře definována (*HLA, INS, CTLA4, PTPN22, CTLA4, IFIH1* a mnoho dalších genů), environmentální část etiologie zůstává nejasná: jsou zde četní etiologičtí kandidáti, ale většinou bez nezvratných důkazů o skutečném vztahu s nemocí. Viry jsou v této souvislosti často zmiňovány, zvláště se věnuje pozornost pikornavirům (podskupina Cocksackie z *enterovirového* rodu, nebo Ljungan viru, což je hlodavčí parechovirus). Tato práce se zaměřuje na nedávno dokončené nebo probíhající dlouhodobé studie, které se zabývají enteroviry a diabetem, a okrajově se dotýkají i jiných virů. Usuzuje se, že skupina v současné době dostupných důkazů neumožňuje rozhodnout o úloze virů v patogenezi, ani určit jediný virus, proti kterému by se mohlo očkovat. Nakonec je předložena krátká zpráva o pilotním testování lidského parechoviru z krví, které byly použity v longitudinální studii zaměřené na prediabetes, pomocí vysoce citlivého nested PCR strategii. V tomto testování jsme pozorovali parechoviry tak zřídka (2,1 % v krvích), že nemůže být předložen důkaz o možné významné asociaci s diabetem. To je v rozporu s enterovirem, který - dříve nalezený ve více než 11 % těchto krví za použití stejné detekční strategie - je dobrý cíl pro dlouhodobé epidemiologické studie.

Klíčová slova:

Enterovirus, Parechovirus, Diabetes 1. typu

Abstract

The work is a review of published papers on human picornaviruses (enterovirus, parechovirus) and their possible role in the pathogenesis of type 1 diabetes, complemented with a short report on testing of parechovirus viraemia in a pilot set of bloods from individuals with a high genetic risk of type 1 diabetes. Type 1 diabetes is a disease resulting from an absolute insulin deficiency due to the autoimmune destruction of pancreatic beta cells. It is a typical polygenic, multifactorial disease. While its genetic component seems to be relatively well defined (the *HLA*, *INS*, *CTLA4*, *PTPN22*, *CTLA4*, *IFIH1* and numerous other genes), the environmental part of the etiology remains obscured: there are numerous etiologic candidates, yet mostly without conclusive evidence of actual association with the disease. Viruses are often mentioned, with certain picornaviruses being given especial attention (the Coxsackie subgroup of the *Enterovirus* genus, or the Ljungan virus, a rodent parechovirus). The present review focuses on recently finished or ongoing longitudinal studies on enteroviruses and diabetes, and marginally touches also other viruses. It is concluded that the body of currently available evidence does not allow to decide about the role of the viruses in the pathogenesis, nor to pinpoint a single virus that might be vaccinated against. Finally, a short report is presented on a pilot testing of human parechovirus in bloods from a longitudinal study on prediabetes, using a high-sensitivity nested PCR strategy. In this testing, we observed the parechoviruses so rarely (2.1 % of the bloods) that a meaningful association study with diabetes cannot be envisaged. This is in contrast with enterovirus, which – having been previously found in more than 11 % of these bloods using an identical detection strategy – is a good target for longitudinal epidemiologic studies.

Key words

Enterovirus, Parechovirus, Type 1 Diabetes

Seznam zkratek

T1D – Diabetes 1. typu

HLA – Human Leukocyte Antigen – systém lidských leukocytárních antigenů

HEV – Lidské enteroviry

IRES - Internal Ribosome Entry Site

HPeVs – Lidské parechoviry

IFIH1 - Interferon induced with helicase C domain 1

CTLA4 – Cytotoxic T – lymphocyte antigen 4 gene

PTPN22 – Protein Tyrosin Phosphatase non- receptor 22

HCAR - Human Coxsackievirus and Adenovirus receptor

DAF - Decay accelerating factor

ICAM 1 – Intercellular adhesion molecule 1

VCAM 1 – Vascular cell adhesion molecule 1

RT-PCR – Reverse transcription polymerase chain reaction

RIA – Radio Immuno Assay

ELISA - Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

IFA - Indirect Fluorescence Assay

FRET - Fluorescence resonance energy transfer

LjV – Ljungan Virus

B2M – Beta 2 mikroglobulin

Obsah

1. Úvod	8
2. Enteroviry a parechoviry	9
2.1. Zařazení enterovirů.....	9
2.2. Stavba enteroviru.....	10
2.3. Vazba a replikace enterovirů.....	11
2.4. Přenos enterovirové infekce.....	12
2.5. Patogeneze lidské enterovirové infekce.....	13
2.6. Parechovirus.....	13
3. Diabetes 1. typu	14
3.1. Počátek diabetu 1. typu.....	14
3.2. Faktory ovlivňující vznik diabetu 1. typu.....	15
3.2.1 Genetické faktory.....	15
3.2.2 Environmentální faktory.....	15
3.3. Výzkum diabetu 1. typu.....	16
4. Možné mechanismy patogeneze	16
4.1. Přímá interakce viru s ostrůvky pankreatu.....	16
4.2. Fagocytóza beta buněk infikovaných enterovirem.....	17
4.3. Důsledky procesu.....	17
5. Longitudinální studie virů v patogenezi diabetu 1. typu	17
6. Metody detekce enterovirové infekce	20
6.1. Sérologické důkazy enterovirové infekce.....	20
6.1.1 Sérologické metody a jejich souvislost s heterogenitou studií.....	20
6.1.2 Studie využívající sérologické metody.....	21
6.2. Přímá detekce.....	21
6.2.1 Metody přímé detekce enterovirové RNA.....	21
6.2.2 Srovnání metod.....	21
6.3. Genetická molekulární detekce virů.....	22
6.3.1 Detekce pomocí reverzně transkriptázového PCR.....	22
6.3.2 Reverzně transkriptázové PCR (RT-PCR).....	22
6.3.3 TaqMan sondy.....	22
6.3.4 Real-time RT PCR a virová diagnostika.....	23
6.4. Detekce pomocí monoklonálních protilátek.....	23

7. Přímá detekce ze vzorků stolici	24
8. Přímá detekce v tkáni – střevní stěna, pankreas	24
8.1. Role persistence enterovirové infekce	24
8.2. Způsoby detekce enterovirové RNA ze střevní sliznice.....	25
8.3. Detekce enterovirové RNA ze vzorků pankreatu	25
9. Přímá detekce v krvi a jejích částech.....	26
9.1. Detekce enterovirové RNA ze séra.....	26
9.2. Detekce enterovirové RNA z krevních mononukleárů a z plasmy.....	26
10. Parechovirus a diabetes 1. typu.....	27
10.1. Parechovirus a jeho výskyt ve stolici a krvi	27
10.1.1 Ljungan virus	27
10.1.2 Studie z Norska	27
10.1.3 Studie z Finska	29
11. Závěr	29
12. Praktická část.....	30
12.1. Cíl:	30
12.2. Soubor.....	30
12.3. Materiál a metody	31
12.3.1 Metody	31
12.3.2 Laboratorní materiál.....	31
12.3.2.1 Laboratorní přístroje:.....	31
12.3.2.2 Spotřební materiál:	31
12.4. Postup	32
12.5. Výsledky a závěr.....	35
12.5.1 Příklady stanovení.....	35
12.5.2 Výsledek	36
12.5.3 Závěr	37

1. Úvod

Pikornaviry hrají patrně roli v patogenezi diabetu 1. typu: již od konce šedesátých let je jejich nejznámější rod, *enterovirus*, podezírán z podílu na vzniku a rozvoji prediabetického procesu. Navíc další virus, Ljungan virus, je schopen navodit u některých hlodavců diabetes, který velmi nápadně připomíná právě lidský diabetes 1. typu.

Přes mnoho desetiletí výzkumu však není souvislost mezi enterovirovou infekcí a vývojem autoimunity, resp. rozvojem diabetu 1. typu, objasněna. Tématem se zabývalo a zabývá mnoho studií. Diabetes je však poměrně zákeřné onemocnění, kde mezi začátkem prediabetického procesu a vlastní manifestací choroby uplyne velmi mnoho času, proto je odhalení kauzality pro jakékoli infekční agens velmi komplikované. Navíc jako u každého polygenního, multifaktoriálního onemocnění bude infekční příčina zodpovědná pouze za zlomek případů.

Celkově se na etiologii onemocnění podílejí cirká polovinou faktory genetické, druhou polovinou faktory negenetické, včetně infekcí.

Genetickou predispozici k diabetu 1. typu pak asi z poloviny udávají HLA geny, konkrétně *HLA-DQB1*, *-DQAI*, *-DRB1*. Dále jsou to geny *CTLA4* a *PTPN22*, které přispívají k rozvoji diabetu 1. typu a nově taky studovaný gen *IFIH1*.

Za negenetické faktory jsou považovány především virová infekce a složení potravy dětí. Tato práce se především zabývá faktory způsobené virovou infekcí, hlavně infekcí zapříčiněnou enteroviry, které se dle dostupných studií zdají být nejpravděpodobnějšími kandidáty. K rozvoji autoimunity může dojít abnormální aktivací T buněk imunitního systému či přímou interakcí virů s ostrůvky pankreatických buněk, popřípadě nově objeveným mechanismem, což je fagocytóza beta buněk napadených enteroviry dendritickými buňkami. Výsledkem destrukce beta buněk je absolutní insulinový deficit. Tato práce se zabývá různými dlouhodobými studiemi a jejich výsledky výzkumu enterovirové infekce a její potenciální souvislost s rozvojem diabetu 1. typu

2. Enteroviry a parechoviry

Rody Enterovirus a Parechovirus patří do rodiny pikornavirů. Ta se vyznačuje tím, že jsou to malé neobalené RNA viry. Jednořetězcová RNA má pozitivní polaritu. Do této rodiny mimo Enterovirů a Parechovirů patří také Rhinoviry, Cardioviry, Aphthoviry a Hepatoviry (*Jing-Yi Lin, Tzu-Chun Chen et al. 2009*).

Z lidských patogenů jsou historicky nejlépe prozkoumány tři sérotypy polioviru, který způsobuje (již patrně eradikovanou) závažnou chorobu – poliomyelitis. Znalosti získané studiem poliovirů a vývojem vakcín proti nim je možné více či méně aplikovat i na ostatní podobné viry rodu.

2.1. Zařazení enterovirů

Rod enterovirů patří do rodiny *Picornaviridae*, řádu *Picornavirales*. Do tohoto rodu enterovirů řadíme následující druhy: lidské enteroviry, druhy A-D, lidské rhinoviry, druhy A-C, prasečí enterovirus B a opičí enterovirus A (*Knowles, Hovi, et al. 2011*). Dnes již známe přes 100 sérotypů lidských enterovirů a toto číslo stále roste od doby, kdy se používá k určení metoda založená na sekvencích nukleových kyselin (*Roivainen and Klingel 2010*). Většina znalostí o enterovirové biologii pochází z poznatků o polioviru a několika málo dalších prototypických kmenů enterovirů (*Stene and Rewers 2012*). Dříve lidské enteroviry byly rozděleny na polioviry, Coxsackie A a B viry, echoviry a další nepojmenované, očíslované sérotypy. Toto rozdělení bylo provedeno na základě růstu virů na buněčných kulturách (*Hyoty and Taylor 2002*).

Tab. 1 vycházející z (*Stellrecht K.A. 2011*)

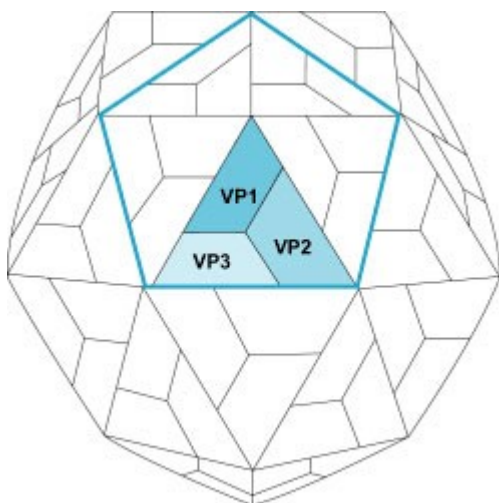
Viry	sérotypy
Druhy lidských enterovirů	
HEV A	Lidské Coxsackie viry: A2-8, A10, A12, A14, A16 Enteroviry: 71, 76, 89-92
HEV B	Lidské Coxsackie viry: A9, B1-6 Lidské echoviry Enteroviry: 71, 76, 89-92
HEV C	Lidské Coxsackie viry: A1, A11, A13, A17, A19-22, A24 Lidské polioviry: 1-3 Enteroviry: 71, 76, 89-92
HEV D	Enteroviry: 68, 70, 94
Lidský rhinovirus A	75 druhů sérotypů
Lidský rhinovirus B	25 druhů sérotypů
Lidský rhinovirus C	

2.2. Stavba enteroviru

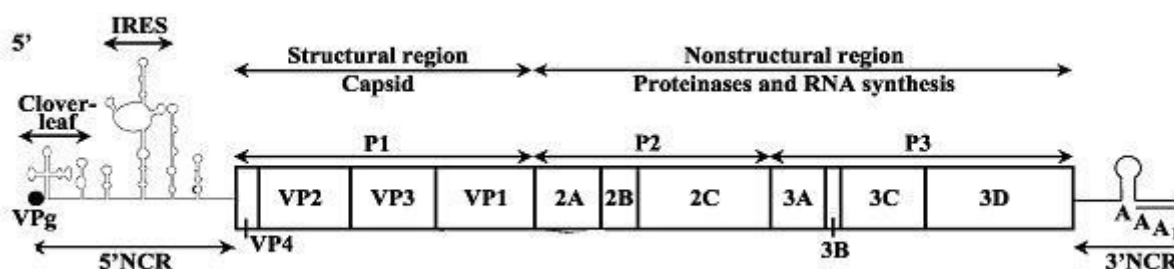
Enteroviry jsou jednořetězcové neobalené RNA viry s dvacetistěnnou symetrií. Jejich jednořetězcová RNA molekula je přibližně 7500 nukleotidů dlouhá, má jeden otevřený čtecí rámec, který má na 5' a 3' koncích nekódující oblasti. RNA je na 5' konci modifikovaná, má připojené malé proteiny, tzv. VPg, které se skládají z 20 až 25 aminokyselin. Na 3' konci je netranslatující oblast čítající 70-100 nukleotidů a poly-A ocásek z po sobě následujících adeninových nukleotidů (*Stellrecht K.A. 2011*). Čtecí rámec je translatován do polypeptidových prekurzorů, které jsou následně naštěpeny virovou proteázou. Polypeptid je rozdělen do tří funkčních oblastí, označovaných jako P1 až P3. Oblast P1 zahrnuje virové kapsidové proteiny označované jako VP1 až VP4 (shrnutí v (*Smura, Blomqvist et al. 2007*)-(*Stanway and Hyypia 1999*)). VP proteiny tvoří vrcholy dvacetistěnu (viz obrázek 1). V molekulární diagnostice enterovirů se využívají zejména dvě oblasti: identifikace na základě VP1 proteinu, který koreluje s charakterem jednotlivých sérotypů, a molekulárně genetická detekce enterovirů, která je založena na amplifikaci vysoce konzervované oblasti enterovirového genomu, tedy na 5' netranslatující oblasti (*Thoelen, Moes et al. 2004*). Doména, která je lokalizována na nejzazším konci 5' netranslatované oblasti, je nezbytná pro replikaci virové RNA. Dále je v 5' netranslatující oblasti IRES (Internal Ribosome Entry Site), kterým se enterovirová RNA váže na ribosom v buňce a tím dochází k translaci pouze virového genomu. Vzhledem k významu, který má 5' netranslatující oblast pro enteroviry, je nukleotidová sekvence této oblasti absolutně nebo téměř absolutně konzervovaná (*Stellrecht K.A. 2011*).

Obr. 1: Enterovirová kapsida, kde P proteiny tvoří vrcholy dvacetistěnu.

(Dostupné z Alex I. Donaldson, "Foot-and-mouth disease," in *AccessScience*, ©McGraw-Hill Companies, 2008. cit. 27.4.2012 z <http://www.accessscience.com>)



Obr. 2 : struktura enterovirového genomu, převzato z (Thoelen, Moes et al. 2004)



Mutace a rekombinace u enterovirů

V enterovirové evoluci hrají důležitou roli dva odlišné mechanismy, mutace a rekombinace. Replikace enterovirové RNA je charakteristická vysokým stupněm mutací a nedostatečnou reparační (proofreading) aktivitou. I přesto je to slučitelné se zachováním jejich genetické integrity a dovoluje jim to rychle nalézat mutace, díky kterým se jsou schopny adaptovat k okolním podmínkám (Domingo 2000). Frekvence spontánních mutací u enterovirů je přibližně jedna mutace na genom za jednu replikaci (Drake and Holland 1999).

Vnitrodruhová rekombinace je mezi enteroviry velmi rozšířená. Mezidruhová rekombinace je také častá, kromě kmenů, které cirkulují v populaci. (Schibler, Gerlach et al. 2012). V procesu rekombinace se enteroviry preferenčně rekombinují v oblastech P1 a P3, nebo na rozhraní 5' nekódujících oblastí a P1 oblastí. Rekombinace v oblastech, které kódují virové kapsidové proteiny, nejsou obvyklé a produkty s rekombinacemi v těchto oblastech přežijí zřídka (Thoelen, Moes et al. 2004).

2.3. Vazba a replikace enterovirů

Specifické receptory jsou hlavním faktorem tropismu neobalených virů k buňkám a tkáním a mohou ovlivňovat projev patogeneze choroby. Ve studii, která se zabývala Coxsackie virem a receptory, na které se tyto viry váží, bylo zjištěno, že buňky včetně ostrůvkových endoteliálních buněk exprimují receptory a koreceptory, konkrétně HCAR (human coxsackievirus and adenovirus receptor), DAF (decay accelerating factor), integriny a adhezivní molekuly ICAM 1 a VCAM 1, které mají odlišnou funkci na virové přichycení k buňkám a následném vstupu viru do buňky. Infekce způsobená enterovirovými Coxsackie virem zvyšuje expresi adhezivních molekul ICAM 1 a VCAM 1, stejně tak pozitivně reguluje

expresi virových receptorů HCAR a DAF a koreceptoru $\alpha_v\beta_3$ integrinu v ostrůvkových endoteliálních buňkách. To, že tkáňová specifita ovlivňuje patologický výsledek infekce, je ukázáno na případu, kdy při infekci dochází k negativní regulaci exprese receptoru HCAR v endoteliálních aortických buňkách. To podává důkazy o tom, že ostrůvkové endoteliální buňky jsou přirozeným cílem a rezervoárem Coxsackie virové persistentní infekce (*Zanone, Favaro et al. 2007*).

Replikace pozitivních RNA virů je zahájena syntézou RNA replikázy, kterou si sám virus kóduje. Rodičovské pozitivní vlákno RNA je transkribováno do negativního vlákna RNA, které slouží opakovaně jako templát pro transkripci pozitivních vláken RNA. Dvouřetězcová RNA (tzv. replikativní intermediát) má pouze krátkou životnost. Balení virové RNA a stukturálních proteinů se odehrává v cytoplasmě. U buněk napadených enterovirem neprobíhá účinně translace buněčné mRNA, protože virové proteázy inaktivují buněčný komplex připojující čepičku na 5' konec, který je potřebný pro navázání buněčné mRNA k ribozomům. Buňka napadená virem není schopna zajistit proteosyntézu svých vlastních komponent. Proteosyntetický aparát buňky je využit preferenčně pro syntézu stavebních komponent viru. Následkem toho napadená buňka lyzuje. Replikace virové RNA začíná během 1 hodiny po infekci buňky a trvá okolo 4 hodin. Po této době buňka lyzuje a je z ní uvolněn téměř milion virových partikul (*Leslie Collier 2000*).

2.4. Přenos enterovirové infekce

Enteroviry jsou přenášeny obvykle fekálně-orální cestou, mohou se ale přenášet i orálně-orální cestou, pomocí kapének nebo kontaminovaných věcí či kontaminovanou vodou. Jsou to odolné organismy, které snesou i vysoké koncentrace chloridu sodného (NaCl) a velké změny teplot. Tyto vlastnosti jim umožňují přežít v povrchových a podzemních vodách, což jsou hlavní rezervoáry těchto patogenů. Enteroviry jsou také stabilní v přítomnosti dvoumocných kationů a kyselin. Jsou velmi odolné vůči nízkému pH, což je důvod proč přežijí i podmínky gastrointestinálního traktu. Viriony zůstávají stabilní v pH 3-5 po dobu 1-3 hodin (*Rajtar, Majek et al. 2008*). Jediným přirozeným hostitelem lidských enterovirů jsou lidé (*D Richman 2002*). V oblastech mírného pásu se enterovirové infekce vyskytují nejčastěji v létě a na podzim (v 70-80 % případů). V oblastech tropického pásu se enterovirové infekce vyskytují v průběhu celého roku, jejich nárůst však může být zaznamenán v období dešťů (*Stellrecht K.A. 2011*).

2.5. Patogeneze lidské enterovirové infekce

Enterovirové infekce obvykle způsobují mírné nebo asymptomatické infekce a nezpůsobují žádné závažné onemocnění. Nejběžnější projevy enterovirové infekce jsou akutní horečnatá onemocnění, která mohou být potencionálně doprovázena i vyrážkou. Tento tzv. virový syndrom je jedna z příčin horečky mezi dětmi. Ačkoli jsou tato onemocnění neškodná, je třeba jim věnovat pozornost, neboť mohou napodobovat jiná vážná onemocnění (*Stellrecht K.A. 2011*). V některých případech se však viry mohou dostat do oběhu díky lymfatickému systému a nakonec dochází k sekundární replikaci v různých místech různých orgánů. V ojedinělých případech se mohou viry rozšířit do myokardu nebo centrálního nervového systému a způsobovat myocarditis, meningitis nebo paralýzu. Akutní virová replikace v těchto orgánech určuje typ symptomů způsobených infekcí (*Roivainen and Klingel 2010*). U novorozenců mohou způsobovat systémovou multiorgánovou infekci, která pro ně může být fatální (*Tauriainen, Oikarinen et al. 2011*).

K primární infekci a replikaci virů dochází ve stěně tenkého střeva a rozšiřuje se do poměrně velké části gastrointestinálního epitelu. Proces je rychlý, což znamená, že infekce má krátkou inkubační dobu, 1-3 dny. Ačkoli je virová replikace omezena povrchem intestálního traktu, účinky mohou být více generalizované. Generalizované infekce probíhají z počátku tak, že virion pronikne epitelovým povrchem, kde dochází k replikaci. Potom migrují místními lymfatickými uzlinami. Některé viry jsou zde pohlceny makrofágy a inaktivovány, jiné však vstoupí do krevního oběhu, což má za následek primární virémii. Z krve mohou prostoupit do jiných orgánů, jako jsou játra, slezina, kostní dřeň či cévní endotelium, kde se znovu množí. Velké množství virů, které je pomnoženo v těchto orgánech, se může zpátky vrátit do krevního oběhu a dochází k sekundární virémii. Z krve se poté viry dostávají do cílového orgánu, který je rozdílný dle druhu viru a jeho tropismu k orgánům (*Leslie Collier 2000*).

2.6. Parechovirus

Poprvé byly dnešní parechoviry izolovány v roce 1956 Wigandem a Sabinem jako neznámé viry z rektálního střeva (*Wigand, Sabin 1961*). Lidské parechoviry (dále označovaný také jako HPeVs) patří do rodiny *Picornaviridae*. Jsou to jednořetězcové pozitivní RNA viry. Genom těchto virů je přibližně 7300 nukleotidů dlouhý (*Stanway, Hyypiä 1999*). Dříve patřily do skupiny lidských enterovirů, kvůli jejich podobnosti v mnoha vlastnostech – proto velká část toho, co je výše uvedeno o enterovirech, platí i o parechovirech, zejména pokud se týká velikosti a stavby virionu, nebo např. i přenosu a patogeneze infekce.

Zejména analýza nukleotidových sekvencí však odhalila významné rozdíly v struktuře jejich replikačních a translačních částí a značné rozdíly v sekvencích kódujících proteiny v porovnání s enteroviry (*Harvala and Simmonds 2009*). Tak byly echoviry 22 a 23 od rodu enterovirů vyčleněny na základě jejich genetické odlišnosti transkripčních a translačních elementů a vytvořily samostatný rod Parechovirů (*King, Brown, et al. 1999*). V čem se od ostatním ze své skupiny liší je skutečnost, že u nich neprobíhá sestřih VP0 oblasti, ze které vzniká protein VP4 a VP2. To může vést ke strukturálním rozdílům v uspořádání virových proteinů v procesu maturace nukleokapsidy.

Z hlediska diabetu 1. typu je velmi zajímavý Ljungan virus, u něhož bylo zjištěno, že vyvolává diabetes u norníka rudého. To poté vedlo k zjišťování možné asociace parechovirů s diabetem 1. typu (*Harvala and Simmonds 2009*).

Lidský parechovirus se běžně vyskytuje u malých dětí, jeho přítomnost ve střevech je většinou asymptomatická, vzácně může být příčinou různých závažných onemocnění. Zajímavé je, že parechovirus je patrně skrytou příčinou velké části tak častého onemocnění jako je zánět středního ucha (*Seppälä, Viskary et al. 2011*) a přerušení vakcinací živou vakcínou proti polioviru mohlo vést k nárůstu frekvence tohoto onemocnění.

3. Diabetes 1. typu

Diabetes 1. typu, také nazývaný insulin-dependentní diabetes mellitus nebo juvenilní diabetes, je autoimunitní choroba představující celkem 5-10 % všech případů diabetu. Tento typ diabetu drtivě převažuje v dětství a adolescenci. Je to chronické onemocnění s vážnými komplikacemi, které mají dopad na kvalitu života jedinců (*Achenbach, Bonifacio et al. 2005*).

3.1. Počátek diabetu 1. typu

U diabetu 1. typu dochází k selektivnímu masivnímu ničení beta buněk pankreatických ostrůvků vlastním imunitním systémem. Jde tedy o autoimunitní chorobu. Výsledkem této destrukce je absolutní nedostatek insulinu, což je hlavním znakem tohoto onemocnění. Již před propuknutím klinických projevů diabetu cirkulují v krvi jedince protilátky. Cílem těchto protilátek se stávají autoantigeny beta buněk, autoprottilátky však nejsou destruktivní. To, že

nejsou destruktivní, je dobře vidět u dětí diabetických matek, které sice mají protilátky, ale nemají diabetes. Protilátky jsou užitečnými markery prediabetického procesu (*Hober and Sane 2010*). Beta buňky jsou ničeny T buněčnou reakcí, která u geneticky predisponovaných jedinců vede k zánětlivé reakci v ostrůvcích. Přítomnost jedné nebo více protilátek může předcházet klinickému počátku diabetu 1. typu v nadcházejících letech nebo desetiletích. S přítomností nebo přetrváváním pozitivita na protilátky stoupá pravděpodobnost vývoje klinické choroby (*Daneman 2006*).

3.2. Faktory ovlivňující vznik diabetu 1. typu

Příčina vzniku diabetu 1. typu dosud není zcela známá. Je však jasné, že jde o interakce mezi imunologickými, genetickými a enviromentálními faktory.

3.2.1 Genetické faktory

Do dnešního dne je známo nejméně 40 oblastí v lidském genomu, které jsou asociovány s lidským diabetem 1. typu, a o mnohých z nich je známo, že jsou významné při antivirové odpovědi (*Tauriainen, Oikarinen et al. 2011*). U většiny genů, které mají potenciální souvislost s rozvojem diabetu 1. typu, stále není známo, zdali se podílejí na vývoji protilátek nebo postupu klinického onemocnění po započetí autoimunity (*Winkler, Lauber et al. 2011*). Lokus hlavního histokompatibilního komplexu (HLA) zahrnuje geny *HLA-DQB1*, *-DQA1*, *-DRB1*, které způsobují podstatnou část rizika rozvoje diabetu 1. typu. Tyto geny zesilují odpověď imunitního systému proti enterovirům (*Sadeharju, Knip et al. 2003*). Mimo dlouho prokázané existence genetických modulátorů rizika, jako jsou rizikové geny, gen *CTLA4* a gen *PTPN22* (*Daneman 2006*), se v poslední době studuje gen *IFIH1* (Interferon induced with helicase C domain 1), který také může mít souvislost s rozvojem diabetu 1. typu. Polymorfismus v tomto genu je asociován s rozvojem diabetu (*Winkler, Lauber et al. 2011*). *IFIH1* gen kóduje sensor, který detekuje virovou dvouřetězcovou RNA, a který je produkován enteroviry právě během replikace v cytoplasmě (*Tauriainen, Oikarinen et al. 2011*).

3.2.2 Environmentální faktory

Environmentální faktory hrají významnou roli v patogenezi diabetu 1. typu. Za nejvýznamnější faktory jsou považovány virové infekce a složení stravy. Tyto faktory mohou ovlivňovat aktivaci T-buněk (*Achenbach, Bonifacio et al. 2005*). Za spouštěče autoimunitního procesu, který vede k rozvoji diabetu 1. typu, jsou považovány, jako nejpravděpodobnější kandidáti, enterovirové infekce (*Knip 2011*). Enteroviry (zvláště Coxsackie B virus), kojení,

nedostatek nebo nadbytek určitých složek potravin v dětství, porodní váha, překrmování v dětství, mateřská ostrůvková autoimunita a negativní stres mohou být spojeny s rozvojem diabetu 1. typu (*Peng and Hagopian 2006*).

3.3. Výzkum diabetu 1. typu

Výzkum přirozeného průběhu diabetu 1. typu je umožněn schopností měřit protilátky asociované s diabetem u pacientů, kterým diabetes ještě nebyl diagnostikován, ale jsou predisponováni k tomuto onemocnění. Výzkum je tedy založen na prospektivním sledování skupin. Studie zabývající se tímto tématem podávají důkazy o vývoji autoimunity u pacientů a pokoušejí se charakterizovat protilátky, které jsou asociované s vývojem diabetu 1. typu (*Achenbach, Bonifacio et al. 2005*).

4. Možné mechanismy patogeneze

Bylo navrženo mnoho teorií o tom, jak mohou enteroviry přispívat k rozvoji diabetu 1. typu. Tedy jak na přítomnost enterovirů reaguje imunitní systém, a co může vést k tomu, že dojde k autoimunitní reakci.

4.1. Přímá interakce viru s ostrůvky pankreatu

Přítomnost enterovirů v ostrůvcích pankreatu získaného autopsií od pacientů s diabetem 1. typu naznačuje, že přímá interakce viru s ostrůvkovými buňkami může být významná v patogenezi diabetu 1. typu. Enteroviry jsou známy tím, že vykazují velkou cytolytickou schopnost. Enteroviry způsobená indukovaná cytolýza beta buněk produkujících insulin je jedním z možných mechanismů patogeneze. Další možný mechanismus destrukce beta buněk může být založen na tzv. bystander aktivaci autoreaktivních T buněk a B buněk (*Roivainen and Klingel 2010*). Bystander aktivace je nepřímá a nespecifická aktivace autoimunitních buněk. Antigen prezentující buňky mohou být aktivovány infekcí způsobenou patogeny, tedy i viry. Poté tyto buňky mohou stimulovat aktivaci a proliferaci autoreaktivních T a B buněk. Navíc se může repertoár receptorů autoreaktivních autoantigen-specifických T a B buněk rozšířit na další epitopy v těle (*Delogu, Deidda et al. 2011*).

4.2. Fagocytóza beta buněk infikovaných enterovirem

Nedávné studii od Barbary Schulte a kol. (*Schulte, Kramer et al. 2010*) byla věnována problematice interakce mezi lidskými dendritickými buňkami a buňkami pankreatických ostrůvků, které jsou napadeny enteroviry. Ve vývoji nebo urychlení vývoje diabetu 1. typu může hrát roli rovnováha mezi efektorovými T buňkami a regulačními T buňkami. Tato rovnováha je převážně nastolována dendritickými buňkami (*Arif, Tree et al. 2004*). Pro výzkum byly použity lidské Langerhansovy ostrůvky jako experimentální model a bylo demonstrováno, že ostrůvky infikované Coxsackie virem byly účinně fagocytovány lidskými dendritickými buňkami vzniklými z monocytů. Fagocytóza těchto buněk infikovaných enterovirem indukovala v dendritických buňkách antivirový stav, který je chrání od dalších infekcí Coxsackie virem. Tento stav byl závislý na přítomnosti intracelulární RNA. Dendritické buňky produkovaly interferony 1. třídy, které mají vliv na aktivitu vrozené imunitní odpovědi. Výsledkem výzkumu tohoto mechanismu patogeneze je, že lidské dendritické buňky mohou fagocytovat pankreatické buňky napadené enterovirem, což může následně indukovat přirozenou antivirovou odpověď. Tato odpověď může mít důležité důsledky na homeostázi imunity a hrát tedy roli v etiologii diabetu 1. typu.

4.3. Důsledky procesu

Výsledek skrytého patogenního procesu je nakonec neschopnost kontroly krevní glukosy, což je následek nedostatku syntézy insulínu. Proces může trvat roky před propuknutím klinických projevů (*Schulte, Kramer et al. 2010*).

5. Longitudinální studie virů v patogenezi diabetu 1. typu

V této kapitole je porovnání 4 longitudinálních studií, které jsou významné svou velikostí a dobou provedení. Studie se zabývají problematikou enterovirových infekcí a možnou asociací těchto infekcí s vývojem diabetu 1. typu. Jmenovitě tyto studie jsou DAISY studie z Colorada, DIPP a DiMe studie z Finska a MIDIA studie z Norska.

- DAISY (Diabetes and Autoimmunity Study in the Young) studie probíhá od roku 1993 a jejím cílem bylo zjistit, zdali enterovirová infekce předchází vývoji diabetu 1. typu u geneticky predisponovaných jedinců, kteří byli opakovaně pozitivní na protilátky proti pankreatickým ostrůvkům. Bylo sledováno 2 365 geneticky predisponovaných dětí k

vývoji autoimunity a následnému vzniku diabetu 1. typu. Vzorčky krve a rektální výtěry byly sbírány každých 3 - 6 měsíců po sérokonverzi ostrůvkových protilátek až do doby diagnostikování diabetu 1. typu. Metoda, která byla použita pro detekci enterovirové RNA ze séra a rektálních výtěrů, je reverzně transkriptázové PCR za použití primerů specifických k 5' netranslatované oblasti enterovirového genomu. To umožnilo detekovat v podstatě všechny enterovirové sérotypy. Výsledkem této studie je, že ze 140 dětí, u kterých proběhla sérokonverze a byla pozorována opakovaná pozitivita na protilátky proti ostrůvkům, se u 50 dětí vyvinul diabetes 1. typu během následujících 4 let. Riziko vývoje klinických projevů diabetu 1. typu ve vzorcích krve, ve kterých byla detekována enterovirová RNA, vzrostlo ve srovnání se vzorky, které byly negativní na enterovirovou RNA. Přítomnost enterovirové RNA v rektálních výtěrech nepředpovídá vznik diabetu 1. typu (*Stene, Oikarinen et al. 2010*).

- DIPP (Diabetes Prediction and Prevention Study) studie pochází z Finska. V roce 2003 tato studie zahrnovala 41 dětí, které se staly pozitivní na protilátky asociované s diabetem během pozorování, a v kontrolní skupině bylo 196 dětí. I v tomto případě byla enterovirová infekce a průměrná hladina enterovirových protilátek častější u dětí s prediabetem než u kontrolní skupiny. Enterovirová infekce byla častější přibližně 6 měsíců před detekcí prvních protilátek. 51 % dětí s prediabetem mělo infekci v tomto období, zatímco u kontrolní skupiny to bylo jen ve 28 % případů (*Salminen, Sadeharju et al. 2003*).

V roce 2004 tato studie prospektivně sledovala 12 dětí, které během studie začaly vykazovat pozitivitu na protilátky asociované s diabetem 1. typu a 53 dětí jako kontroly. Celkem bylo analyzováno 878 vzorků stolice na přítomnost enterovirové RNA pomocí metody RT-PCR. Enterovirové protilátky a RNA byly současně analyzovány ze vzorků sér. 11 enterovirových infekcí bylo diagnostikováno u dětí s prediabetem a 42 infekcí v kontrolní skupině, což bylo určeno přítomností virové RNA ve vzorcích. Děti, které byly opakově pozitivní na enterovirovou RNA, bylo více mezi prediabetickou skupinou. U 83 % dětí se objevila enterovirová infekce před objevem protilátek, zatímco u kontrolní skupiny se vyskytla pouze ve 43 % případů. To dokazuje, že enterovirová infekce má spojitost s přítomností protilátek proti beta buňkám v organismu (*Salminen, Vuorinen et al. 2004*).

- DiMe (Childhood Diabetes in Finland) studie pochází z Finska. V roce 1995 byla provedena první finská studie, která podala důkazy o tom, že infekce Coxsackie viry nebo infekce způsobené jinými enteroviry, které proběhnou ještě před narozením jedince nebo

během dětství, mohou zvyšovat riziko pozdějšího vývoje diabetu 1. typu. Zároveň tyto infekce mohou spustit destruktivní proces beta buněk pankreatických ostrůvků ještě před objevem klinických symptomů diabetu 1. typu (*Hyoty, Hiltunen et al. 1995*).

Následující studie z roku 1997, která je pokračováním DiMe studie, se zabývá sérokonverzí protilátek asociovaných s diabetem 1. typu u finských dětí. Prospektivní kohorta čítala 765 dětí, které byly sourozenci dětí, u kterých byl diagnostikován diabetes 1. typu. Tyto děti byly zároveň negativní na protilátky proti pankreatickým ostrůvkům. Z toho 23 dětí, původně tedy nediabetických a negativních na tyto protilátky, se stalo pozitivních na protilátky během trvání této studie. U třech z nich se vyvinul diabetes 1. typu. U všech dětí, u kterých proběhla sérokonverze protilátek, byla detekována alespoň jedna enterovirová infekce. Přítomnost těchto protilátek je nejspolehlivějším ukazatelem autoimunitního procesu, který vede k destrukci beta buněk. Proto tedy sérokonverze protilátek proti pankreatickým ostrůvkům značí, že započal destruktivní proces (*Hiltunen, Hyoty et al. 1997*).

- MIDIA studie pochází z Norska (*Tapia, Cinek et al. 2011*). Na rozdíl od ostatních nepotvrdila, že enterovirová RNA je hlavním ukazatelem budoucího vývoje autoimunity proti ostrůvkům. Jako materiál byly použity vzorky stolic, které byly měsíčně sbírány od norských dětí s vysokou genetickou predispozicí k diabetu 1. typu. Četnost výskytu enterovirové RNA ve vzorcích stolice u pacientů před sérokonverzí byla u 43 dětí z 339 (12,7 %) a u nediabetických dětí to bylo v 92 případech z 692 (13,6 %). Rozdíl od ostatních studií však je, že enterovirová RNA byla detekována pouze ze vzorků stolic, což, jak se ukázalo, není tím správným místem pro hledání korelace mezi enterovirovou infekcí a následným vývojem protilátek. Vhodnějším materiálem pro hledání důkazů je krev, popř. krevní sérum.

Tab. 2 shrnující studie:

Studie	subjekty studie	intervaly mezi odběry vzorků	typ vzorků a použitých testů	počet testovaných subjektů/subjekty, u kterých proběhla sérokonverze/počet subjektů, u kterých propukl T1D
DAISY	Děti genově predisponovaní k rozvoji autoimunity a vzniku T1D z Colorada	3 - 6 měsíců po sérokonverzi protilátek	vzorky séra a rektálních výtěrů, RT-PCR	2 365 / 140 / 50
DIPP	Děti, které vykazovaly opakovaně pozitivitu na enterovirovou RNA, z Finska	intervaly po 6 měsících	sérum, vzorky stolice, sérologie a RT-PCR	237/41/-
DiMe	Sourozenci nově diagnostikovaných dětí s T1D ve Finsku	intervaly po 6 měsících	sérum, sérologie a RT-PCR	765 / 23 / 3
MIDIA	Děti genově predisponovaní k rozvoji autoimunity a vzniku T1D z Norska	intervaly po 3 měsících do 1 roku věku dětí	vzorky stolice, RT-PCR	339 /43/-

6. Metody detekce enterovirové infekce

Studie zabývající se detekcí enterovirové infekce a její souvislosti s rozvojem diabetu 1. typu využívají různé metody pro tuto detekci: metody, které jsou založeny na PCR a metody sérologické, které se ale využívají méně kvůli jejich náročnosti či nižší senzitivitě.

6.1. Sérologické důkazy enterovirové infekce

Sérologickými metodami se zjišťuje přítomnost protilátky proti různým patogenům.

6.1.1 Sérologické metody a jejich souvislost s heterogenitou studií

Metody, které se používají, jsou např. neutralizační testy, radioimunotest (RIA), dále imunofluorescenční metoda (IFA-Indirect Fluorescence Assay) nebo ELISA (z angl. Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). Díky těmto metodám lze měřit protilátky odlišných virových epitopů. Nicméně to je také důvod, proč je velmi obtížné porovnávat studie využívající tyto metody. Hlavní problém interpretace sérologických studií je nedostatek dat o citlivosti, specificitě metod a obtížná porovnatelnost testů. Sérotypová specificita těchto metod je poměrně nízká a identifikovat asociaci mezi specifickým virovým sérotypem a diabetem

1. typu je komplikované. K tomu přispívají i jiné faktory, jako je např. zkřížená reaktivita mezi enterovirovými sérotypy a mezi enteroviry a příbuznými pikornaviry nebo heterotypická protilátková odpověď na druhotné nebo následné infekce, další mohou být individuální rozdíly v protilátkové odpovědi nebo existence odlišných virových řetězců v rámci jednoho sérotypu, které nejsou rozlišitelné klasickými sérologickými metodami (*Green, Casabonne et al. 2004*).

6.1.2 Studie využívající sérologické metody

Výzkumy využívající sérologické metody k detekci Cocksackie virů se provádějí od roku 1969. Výzkum byl prováděn na sérech posbíraných od různých pacientů nebo od pacientů, kterým už byl diagnostikován diabetes 1. typu (*Gamble, Kinsley et al. 1969*). Studie se však velmi liší velikostí tzn. počtem pacientů a kontrol, použitými metodami a koncepcí. Z toho plyne, že je velmi obtížné provést jejich srovnání. Nakonec i závěry a poznatky se u jednotlivých studií velmi liší. Proto nejde jednoznačně říct, zdali existuje jistá asociace mezi sérologickými důkazy o nedávné či probíhající infekci způsobené Cocksackie virem, a zdali tato infekce má spojitost s propuknutím či vývojem diabetu 1. typu. Navíc se enterovirové infekce šíří mezi populací ve vlnách, a proto načasování studie může mít velký vliv na výsledek (*Gale and Atkinson 2004*).

6.2. Přímá detekce

Ve virové diagnostice jsou mimo metody sérologické hojně využívány i metody přímé detekce.

6.2.1 Metody přímé detekce enterovirové RNA

Molekulární metody, které slouží k detekci virového genomu, jsou především RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction), které umožňují detekovat i malé množství cílové RNA ve vzorku. In situ hybridizace je metoda, která dovoluje přesně lokalizovat specifický segment nukleové kyseliny v histologickém vzorku (*Brown 1998*). Další molekulární metodou je přímá imunofluorescence detekující virové kapsidové proteiny.

6.2.2 Srovnání metod

RT-PCR slouží k detekci enterovirové RNA ze vzorků stolice a krve a může správně fungovat díky sondám a PCR primerům, které jsou specifické k 5' netranslatované oblasti enterovirového genomu. In situ hybridizace se používá také k detekci enterovirové RNA ze vzorků získaných z tkáně. Přímá imunofluorescence slouží k detekci enterovirového kapsidového proteinu VP1. Vzorky pankreatu lze získat autopsií, tedy odebráním vzorku

pankreatu posmrtně. Odebrat vzorky pankreatu biopsií, tedy z živých pacientů, je obtížné vzhledem k jeho extrémní nebezpečnosti pro pacienty. Detekce enterovirové RNA je limitována tím, v jaké fázi je probíhající infekce. Detekce je možná pouze u probíhající infekce nebo v době krátce po infekci. To je důvod, proč nejsme schopni odhadnout, zdali pacienti mají mnohočetné enterovirové infekce nebo se jedná o persistentní infekci před rozvojem autoimmunity nebo diabetu 1. typu (Yeung, Rawlinson et al. 2011).

6.3. Genetická molekulární detekce virů

Mezi metodami, které slouží k detekci enterovirové RNA, dnes jasně převažuje detekce pomocí PCR metody, a to kvůli specifitě, citlivosti a rychlosti reakce (Stene and Rewers 2012).

6.3.1 Detekce pomocí reverzně transkriptázového PCR

Polymerázová řetězová reakce (PCR – z anglického Polymerase Chain Reaction) byla vynalezena roku 1983 (Mullis and Faloona 1987) Kary Mullisem. Princip PCR metody je založen na specifickém pomnožení konkrétního hledaného úseku DNA, který je ve výchozím materiálu.

6.3.2 Reverzně transkriptázové PCR (RT-PCR)

RT-PCR je metoda slouží k detekci RNA a vychází z klasického PCR. RNA je pomocí reverzní transkripce, za použití reverzní transkriptázy, přepsána do cDNA (complementary DNA) a nově nasyntetizovaná cDNA je metodou PCR amplifikována (Bustin, Benes et al. 2005). V současnosti se převážně používá real-time PCR, které současně amplifikovanou cílovou sekvencí detekuje, a tím umožňuje absolutní nebo relativní kvantifikaci cíle ve vzorku (Wong and Medrano 2005). V případě real-time RT-PCR se kvantifikují amplifikované cíle cDNA, která byla vytvořena reverzní transkripcí (Bustin, Benes et al. 2005). To se děje při detekci virů nejčastěji pomocí krátkých fluorescenčně značených sond, např. sond TaqMan.

6.3.3 TaqMan sondy

TaqMan[®] sondy jsou fluorescenčně značené sondy. Jsou to jednořetězcové sekvence, které jsou komplementární k úseku jednoho řetězce amplifikované DNA. TaqMan[®] sondy obsahují reportér a zhášeč. Reportér je navázán na 5' konci sondy a zhášeč na 3' konci. Princip TaqMan sond je založen na FRET (fluorescence resonance energy transfer). FRET je spektroskopický proces, kdy energie přechází mezi dvěma molekulami, které jsou od sebe

vzdálené 10 - 100 Å, a mají překrývající se emisní a absorpční spektra. Pokud jsou reportér i zhášec navázány na sondě, tak zhášec rozptýlí energii přijatou od reportéru v podobě tepla (*Ian M. Mackay 2002*). Energie reportéru je emitována tehdy, když Taq polymeráza amplifikuje úsek, kde sedí sonda, čímž díky exonukleázové aktivitě Taq polymerázy dojde k fyzickému oddělení reportéru od zhášeče. Taq DNA polymeráza má totiž 5'-3' exonukleázovou aktivitu, kterou rozštěpí 5' konec sondy (*Wong and Medrano 2005*).

6.3.4 Real-time RT PCR a virová diagnostika

Real-time RT-PCR umožňuje kvantifikovat virovou nálož v klinických vzorcích a umožňuje stanovit dynamiku virové proliferace. Jednou z nejdůležitějších věcí u této metody, aby bylo dosaženo uspokojivého výsledku, je přesné navrhnutí primerů a sond tak, aby správně fungovaly na cílových sekvencích. Mělo by se jednat o sekvence specifické pro danou rodinu virů, tzn. konzervované sekvence. Virový genom ovšem obsahuje mnoho polymorfických sekvencí, což komplikuje detekci těchto virů. Pokud se polymorfická sekvence nachází v cílovém místě primeru nebo sondy pak může mít PCR test sníženou citlivost nebo vůbec nemusí dojít k detekci požadovaného viru. Další věcí, která může zkreslovat výsledky detekce, jsou technologické podmínky, které musí být vybalancované. Komplikace mohou způsobovat různé inhibitory, špatně extrahovaná nukleová kyselina či špatně navržené primery a sondy. Na špatně nastavené podmínky můžeme přijít díky pozitivním kontrolám při PCR testu, kde se využívají standardy o známé koncentraci viru (*Bustin, Benes et al. 2005*).

6.4. Detekce pomocí monoklonálních protilátek

Metody pěstování buněčných kultur jsou poměrně citlivé pro detekci, kromě některých Coxsackie virů A, které na buněčné kultuře růst nemohou (*Hong, Kang et al. 2011*).

Detekce monoklonálními protilátkami spočívá v tom, že nejprve izolujeme virus z buněčné kultury, kde byl pomnožen, a poté ho pomocí nich značíme. Tento způsob detekce je však velmi obtížný a jen málo laboratoří ve světě jej využívá. Obtížnou se tato metoda stává proto, že je komplikované získat kvalitní monoklonální protilátky. Při detekci může docházet k chybám ve značení, které jsou způsobeny velkou variací v sérotypech enterovirů, nebo může docházet ke zkříženým reakcím s jinými ne-enteroviry. Pouze jedna monoklonální protilátka není schopna detekovat široké spektrum sérotypů, proto bylo nutné vytvořit mix protilátek, který by byl schopen detekovat širší spektrum sérotypů. Tento mix obsahoval monoklonální protilátky proti VP1 proteinu Polio 1 viru, proti VP1 proteinu coxsackie B3 viru, proti

enteroviru 70 a bispecifickou monoklonální protilátku proti enteroviru 71 a coxsackie A16, resp. proti jejich VP1 proteinu. Všechny tyto protilátky byly smíchány a vznikl pan-enterovirový mix. Ten byl následně testován na citlivost a specifitu jejich značení na různé virem infikované buňky. Mix detekoval 40 testovaných sérotypů enterovirů a nevykazoval žádnou zkříženou reaktivitu s 18 odlišnými ne-enterovirovými lidskými viry (*Miao, Pierce et al. 2009*).

7. Přímá detekce ze vzorků stolici

Studie (*Tapia, Cinek et al. 2011*) zabývající se frekvencí enterovirů ve stolici, provedla výzkum u kohorty norských dětí, které měly vysoký genetický potenciál pro vznik diabetu 1. typu. Měla být zjištěna asociace s vývojem protilátek proti pankreatickým ostrůvkům. Vzorky stolice byly sbírány od raného dětství a to proto, že autoimunitní proces začíná měsíce či roky před projevem vlastní nemoci. Na enterovirus bylo testováno více jak 2000 vzorků od 911 dětí (toto číslo zahrnuje pacienty i kontroly). U pacientů byla pozitivita prokázána v 43 případech z celkových 339 (tzn. 12,7 %) a u kontrol to bylo 94 pozitivních vzorků z celkových 692 (13,6 %). Jako metoda bylo použito jedнокrokové RT-PCR s primery a sondami specifickými pro konzervativní 5' netranslatující oblast lidského enterovirového genomu. Nebyl však nalezen žádný důkaz zvýšené frekvence enterovirů ve stolici u pacientů ani kontrol před a po sérokonverzi protilátek proti ostrůvkům. Ani studie pocházející z Colorada (*Graves, Rotbart et al. 2003*) a z Německa (*Fuchtenbusch, Irnstetter et al. 2001*), které byly provedeny o pár let dříve, a které také zkoumaly asociace diabetu 1. typu s vývojem protilátek proti pankreatickým ostrůvkům, nenalezly důkaz této možné asociace.

8. Přímá detekce v tkáni – střevní stěna, pankreas

8.1. Role persistence enterovirové infekce

Četnost detekce enterovirů u diabetických pacientů vedla k navržení teorie, že zde hraje roli virová persistence. Enterovirová persistence byla dříve popsána např. u chronické kardiomyopatie (*Zhang, Li et al. 2004*) a u zvířecích modelů (*Harrath, Bourlet et al. 2004*), kde by enteroviry nebo jiné pikornaviry mohly persistovat po dlouhou dobu. Studie ukázaly, že je zde možnost, že by enterovirus mohl persistovat jako dvouřetězcová RNA bez procesu syntézy proteinů. Je známo z mnoha virových onemocnění, že persistentní infekce může vést

k silné odpovědi imunitního systému, lokálním zánětům a imunitně zprostředkovanému poškození tkáně (*Oikarinen, Tauriainen et al. 2012*).

8.2. Způsoby detekce enterovirové RNA ze střevní sliznice

Studie pocházející z Finska (*Oikarinen, Tauriainen et al. 2012*) se opírá o fakt, že enterovirová persistence je patogenní faktor v souvislosti s destrukcí pankreatických ostrůvků. Hodnotí, zdali může být střevní sliznice rezervoárem enterovirů u diabetických pacientů. Detekce byla provedena 3 různými způsoby a to: in situ hybridizací, imunohistochemickým značením a RT-PCR. Vzorky byly získány pomocí biopsie střevní sliznice v oblasti dvanáctníku od 39 diabetických pacientů, 41 nediabetických pacientů a 40 pacientů s celiakií. Výsledky ukázaly, že enteroviry se vyskytují ve střevní sliznici s větší frekvencí u diabetických pacientů (74 %) než u pacientů nediabetických (29 %) a u pacientů s celiakií (45 %). To značí, že persistence enterovirů ve střevní sliznici může vést k dlouhodobým zánětům, a posléze k poškození tkáně. Přítomnost enterovirové RNA ve střevní sliznici je asociována se vzrůstající prozánětlivou aktivitou, zahrnující jak buňkami zprostředkovanou tak protilátkově zprostředkovanou zánětlivou odpověď.

8.3. Detekce enterovirové RNA ze vzorků pankreatu

Detekce virů v tkáni pankreatu je složitější, neboť není možné nebo je velmi rizikové, odebrat vzorky pomocí biopsie. Vznikla studie (*Richardson, Willcox et al. 2009*), kde byly vzorky pankreatu odebrány posmrtně od 72 diabetických a 163 nediabetických pacientů (z toho bylo 11 vzorků od nediabetických novorozenců, 39 vzorků nediabetických dětí ve věku 6 týdnů až 17 let, 11 vzorků od pacientů s cystickou fibrózou, 5 vzorků pankreatu a srdce infikované Coxsackie virem, 3 vzorky srdce novorozenců, 69 vzorků pankreatu dospělých pacientů a 25 vzorků pankreatu od pacientů s diabetem 2. typu). Vzorky byly značeny pomocí přímé imunofluorescence na inzulin, glukagon, VP1 a na dvouřetězcovou RNA. Buňky, které byly pozitivní na enterovirový VP1 protein, byly detekovány u 44/72 (61 %) pacientů s diabetem. U vzorků pankreatu od nediabetických novorozeneckých a dětských pacientů to bylo ve 3/50 (6 %) případech. To podporuje hypotézu, že enterovirové infekce beta buněk u geneticky predisponovaných dětí mohou vyvolat autoimunitu.

9. Přímá detekce v krvi a jejích částech

Krev je pro enteroviry místem sekundární replikace, tudíž se v krvi neobjevují v raných stádiích infekce, ale vyskytují se zde především během závažnějších infekcí.

9.1. Detekce enterovirové RNA ze séra

Enterovirový genom byl nalezen v krvi u dětí s diabetem 1. typu (*Yeung, Rawlinson et al. 2011*). Otázkou však zůstává, zda se jedná o infekci akutní (probíhá v řádech dnů) či persistentní (dlouhodobá, bezpříznaková infekce). Protilátky, které jsou asociovány s diabetem 1. typu, v periferní krvi dokazují, že započal proces poškozování beta buněk. Detekcí enterovirů z krve se zabývala finská studie (*Oikarinen, Martiskainen et al. 2011*), která sledovala, zdali enterovirová RNA nalezená v krevním séru má souvislost s vývojem autoprotilátek a následným klinickým rozvojem diabetu 1. typu. Vzorky byly odebírány geneticky predisponovaným dětem, u kterých byl později diagnostikován diabetes 1. typu (38), a nediabetickým dětem (140) v krátkých intervalech mezi 3 a 12 měsíci. Krátké intervaly byly zvoleny proto, že jen tehdy je možné sledovat enterovirovou RNA v séru v určitých fázích vývoje nemoci. U diabetických dětí byla enterovirové RNA ze séra detekována v 5,1 % případů (v 17/333 vzorků), zatímco u nediabetických dětí to bylo v 1,9 % případů (v 19/993 vzorků). Nejčastěji je enterovirová RNA detekována 6 měsíců před projevem prvních autoprotilátek, 15,2 % u diabetických dětí a 3,3 % u nediabetických dětí. Po protilátkové sérokonverzi byly vzorky pozitivní na enterovirovou RNA v 3,9 % u diabetických dětí oproti 2,2 % u kontrol. Výhodou této studie je, že vzorky krve se odebíraly v častých intervalech a vzhledem k tomu, že enterovirová viremie trvá 2 týdny, byly zachyceny téměř všechny epizody enterovirové infekce. U diabetických dětí bylo zachyceno 154 episod enterovirové positivity (3,7 episod na 1 dítě) a u nediabetických dětí to bylo 254 episod (1,6 episod na 1 dítě). Tato studie podporuje hypotézu, že enteroviry hrají roli v patogenezi diabetu 1. typu. Přítomnost enterovirů v séru se ukazuje jako rizikový faktor pro vývoj autoimunity proti beta buňkám pankreatických ostrůvků, což následně vede ke klinickým projevům diabetu 1. typu.

9.2. Detekce enterovirové RNA z krevních mononukleárů a z plasmy

Další studie, která se zabývá detekcí enterovirů z krve, byla provedena v roce 2010 Barbarou M. Schulte a kol (*Schulte, Bakkers et al. 2010*). Na enterovirovou RNA byly detekovány vzorky periferních krevních mononukleárů a plasma. Této studii se zúčastnilo 10 čerstvě

diagnostikovaných pacientů s diabetem 1. typu a 20 kontrol. 4 z 10 pacientů byli pozitivní na enteroviry v periferních krevních mononukleárech a 2 z těchto 4 byli pozitivní ve vzorcích plasmy. Nikdo z kontrolní skupiny nebyl pozitivní na enteroviry v krevních mononukleárech ani v plazmě. U běžných infekcí se viry v krvi objevují jen výjimečně. Když už se v krvi vyskytnou, tak během rekonvalescence z krve zmizí a jsou detekovatelné pouze ve stolici. U persistujících infekcí enteroviry v krvi mohou přetrvávat. Enteroviry jsou podezřívány, že persistují v těle pacienta před propuknutím diabetu 1. typu.

10. Parechovirus a diabetes 1. typu

Parechovirus je blízký příbuzný enterovirů, a tak tedy parechovirové infekce stejně jako enterovirové jsou hojné mezi dětskou populací. Na základě poznatků o Ljungan viru, který má souvislost s rozvojem diabetu 1. typu u norníka rudého, se začalo zkoumat, zdali i parechovirové infekce mají souvislost s diabetem u lidí. Největší studie zabývající se četností a možnou souvislostí parechovirů s rozvojem diabetu pocházejí z Norska (*Tapia, Cinek et al. 2008*), (*Tapia, Cinek et al. 2011*) a Finska (*Kolehmainen, Oikarinen et al. 2012*).

10.1. Parechovirus a jeho výskyt ve stolici a krvi

10.1.1 Ljungan virus

Ljungan virus (LjV) je známý tím, že u hlodavců je spojován s mnoha chorobami mezi něž patří i diabetes 1. typu. Proto byla vypracována studie, která se zabývá tím, zda-li Ljungan virus není zapojen do patogeneze diabetu 1. typu i u lidí. Pro tuto studii byly použity vzorky stolice. Pro zjištění přítomnosti Ljungan viru byla použita metoda extrakce DNA/RNA, reverzní transkripce a real-time PCR. Výsledkem této studie je, že LjV nebyl detekován v žádném ze studovaných vzorků. Tento výsledek naznačuje, že výskyt LjV je u norských dětí velmi výjimečný. Typické množství enteroviru a HPeV ve vzorcích stolice (použité ve studii MIDIA) dvakrát až pětkrát převyšuje množství detekčního limitu pro LjV. Nedostatek důkazů pro přítomnost LjV naznačuje, že tento virus jen výjimečně může způsobovat infekce v mukose střeva norských dětí, a je tedy vcelku nepravděpodobné, že by virus způsoboval autoimunitu (*Tapia, Cinek et al. 2010*).

10.1.2 Studie z Norska

Jedna z prvních longitudinálních studií (*Tapia, Cinek et al. 2008*), která se zabývá zjišťováním přítomnosti parechovirů ve stolici a krvi dětí, pochází z Norska. Je to první prospektivní studie

sledující epidemiologii HPeV 1 infekce. Z toho si můžeme udělat obrázek epidemiologie HPeV 1 u dětí. Analýze bylo podrobena 1 941 vzorků od 221 dětí, z toho byl ve 220 vzorcích detekován parechovirus, LjV ani v jednom případě. Vzorky krve byly odebírány v době jejich narození a poté v intervalu 3-6 měsíců. Po dosažení 1 roku věku dětí byly vzorky odebírány v intervalu 6-12 měsíců. Zatímco vzorky stolice byly odebírány každý měsíc. Sérotypově-specifické protilátky proti parechovirům byly měřeny pomocí neutralizačního testu a vzorky stolice byly analyzovány pomocí RT-PCR, kde byly použity specifické primery. Výsledkem této studie je, že průměrný věk, kdy děti měly infekci byl okolo 18 měsíců (což ukazují první pozitivní vzorky na protilátky proti HPeV1). Četnost infekce vzrůstala od 6 měsíců věku dětí. To může být podloženo faktem, že děti v tomto období ztrácejí protilátky přijaté transplacentárně od matky. Tato studie jasně dokazuje, že infekce souvisí s ročním obdobím. Nejvíce infekcí probíhalo v podzimních, zimních a jarních měsících.

Další longitudinální studie probíhala v Norsku o 3 roky později (*Tapia, Cinek et al. 2011*). Zabývala se možnou asociací mezi parechovirovou infekcí v raném dětství a vývojem autoimunity proti pankreatickým ostrůvkům. Pro tuto studii byly použity vzorky stolice a krve. Do této studie byly zapojeny děti, které nesly rizikový typ HLA genotyp pro diabetes 1. typu. Dětem byly odebírány vzorky stolice každý měsíc a to v období mezi 3 a 35 měsícem jejich věku. Aby bylo možné sledovat možný vývoj vzniku autoimunity proti ostrůvkům, byly dětem odebírány ještě vzorky krve. Tyto vzorky byly testovány na protilátky proti dekarboxyláze kyseliny glutamové, proti proteintyrosinové fosfatáze a proti insulinu. Viry byly detekovány pomocí RT-PCR. Nakonec bylo sesbíráno 2027 vzorků stolice od 27 případů a 53 kontrol. Frekvence infekce lidským parechovirem se téměř nelišila u pacientů (13 %) a kontrolních případů (11,1 %). Průměrný věk, kdy děti měly parechovirovou infekci, byl 12,1 měsíce v obou případech, u pacientů i kontrolní skupiny. Děti, u kterých se vyvinula autoimunita proti ostrůvkům, měly více infekcí trvajících 2 i více měsíců, zatímco u dětí bez následného propuknutí autoimunity tomu tak nebylo. Což může vést k teorii, že autoimunita způsobuje větší citlivost k infekcím lidským parechovirem. Výsledkem této studie je, že parechovirová infekce v dětství neprokazuje přímou souvislost s prediabetem nebo později vznikem diabetu 1. typu. Ale i přesto, že parechovirus není tím hlavním spouštěčem diabetu 1. typu, je zde stále reálná možnost toho, že může být zapojen do patogeneze diabetu 1. typu. Vlastnosti, které jsou nezbytné pro to, aby byl lidský parechovirus diabetogenní, tedy

nezbytně nesouvisí s genotypem, virovou náloží, symptomy nebo jinými parametry zkoumanými v této studii.

10.1.3 Studie z Finska

V další studii (*Kolehmainen, Oikarinen et al. 2012*), která byla provedena u zdravých finských dětí, byla sledována frekvence výskytu parechovirů ve vzorcích stolice. Záměrem této studie bylo zaměřit se na identifikování různých typů parechovirů, které kolují mezi běžnou populací. Bylo vybráno 200 dětí (56 dívek a 144 chlapců), jež byly už součástí finské studie, která sledovala enteroviry a jejich spojitost s diabetem 1. typu. Děti byly vybrány podle data a místa narození, pohlaví a HLA typu. V mnoha případech u těchto dětí již byly vytvořeny protilátky asociované s diabetem 1. typu. Byly sbírány vzorky stolice od věku 3 měsíců až do věku přibližně 2 let, a byly odebírány každý měsíc. Nakonec bylo posbíráno 2236 vzorků stolice, které byly analyzovány na přítomnost parechovirové RNA. Detekce této RNA byla prováděna jako v předchozím studii pomocí RT-PCR metod.

Nejčastějším typem parechoviru, který byl detekován, byl HPeV1, dalšími byly HPeV3 a 6. Tyto 3 typy parechovirů se nejčastěji vyskytují u evropské populace. Typy 2 a 5 jsou jen výjimečně detekovány. U finských dětí vůbec nebyl detekován HPeV4. Výskyt parechovirů souvisí i s geografickou oblastí.

11. Závěr

V této práci jsou shrnuty poznatky o negenetických faktorech, které se podílejí na vzniku diabetu 1. typu, především o enterovirových infekcích. Ty se zdají být nejpravděpodobnějšími environmentálními kandidáty v etiologii tohoto onemocnění. Mnoho studií prospektivně sledující kohorty predisponovaných dětí podávají důkazy o tom, že enterovirové infekcí přispívají k vývoji autoimunity a rozvoji diabetu, ač přesný mechanismus tohoto procesu není znám. Zjistit přesný průběh tohoto procesu je obtížné, neboť ten začíná dlouho před klinickými projevy diabetu. Enteroviry jsou nalézány častěji u pacientů s čerstvou manifestací diabetu 1. typu, než by odpovídalo náhodě. Důkazy jsou dostupné z dat využívající sérologii, reverzně transkriptázové PCR, ale i dat, které pocházejí z přímé detekce enterovirů v pankreatech jedinců zemřelých krátce po propuknutí diabetu 1. typu. Interpretace dat je však obtížná kvůli již zmíněnému průběhu choroby, kdy proces destrukce beta buněk začíná o dost dříve než klinické projevy. Z výše uvedených studií vyplývá, že není průkazná asociace

enterovirů ve stolici, tedy v místě primární replice virů. Pravděpodobněji asociace enterovirové infekce a vzniku diabetu souvisí s virovou náloží v krvi a trvání virémie.

Vzhledem k poznatkům o Ljungan viru, který je schopen navodit u některých hlodavců diabetes, který velmi nápadně připomíná právě lidský diabetes 1. typu, se do popředí zájmu dostává i otázka, zdali i parechovirové infekce mohou přispívat k rozvoji diabetu u predisponovaných dětí. Studie provedené v Norsku a Finsku nepodávají jasné důkazy o možné asociaci parechovirové infekce a rozvojem diabetu, ale parechovirus je u dětí velmi frekventovaný. Na téma parechovirových infekcí a možnou souvislostí s rozvojem diabetu bylo vytvořeno jen málo studií a proto je třeba se dále touto otázkou zabývat.

12. Praktická část

12.1. Cíl:

Testovali jsme vzorky krví norských dětí, které byly predisponované k rozvoji autoimunity a rozvoji diabetu 1. typu. Tyto vzorky již byly testovány na přítomnost enterovirů. Naším cílem bylo zjistit, **zdali v těchto vrocích jsme schopni detekovat parechoviry a s jakou frekvencí.** Zjištění frekvence virémie je zásadní pro kalkulaci síly detekce možné asociace virémie s prediabetem a diabetem: pokud bude frekvence příliš nízká, nemá smysl studii takového druhu provádět. Bude-li frekvence srovnatelná s enterovirem, okolo 10-15 %, je síla dostatečná k detekci středně silné asociace i v dostupném souboru.

12.2. Soubor

Celý soubor dostupných krví k vyšetřování čítá 1001 vzorků, každý od jednoho dítěte (průměrný věk 12,3 měsíce, 512 chlapců/ 489 dívek), které patří do norské novorozenecké kohorty MIDIA. Tyto děti byly rekrutovány do studie zaměřené na přirozený rozvoj prediabetu a diabetu 1. typu: od narození jsou v pravidelných intervalech od nich odebrány vzorky stolice a krve. Je znám jejich genotyp HLA-DQB1 a DQA1.

Do EDTA odebrané vzorky krve o objemu 0,5-1 ml byly centrifugovány a po stažení plazmy byl buněčný sediment zamražen při -80 °C do dalšího zpracování. Po šetrném rozmrazení pak byl resuspendován, ošetřen lyzačním roztokem a proteinázou a celková nukleová kyselina

byla izolována pomocí kolonek Qiagen. Roztok této izolované RNA byl výchozím materiálem pro prezentovanou práci.

Z těchto vzorků bylo testováno ke zjištění frekvence parechovirové RNA celkem 234.

12.3. Materiál a metody

12.3.1 Metody

Parechoviry jsme testovali ze vzorků krve norských dětí metodami založenými na RT-PCR. Vzorky byly testovány pomocí reverzní transkripce a poté dvoukolového PCR.

12.3.2 Laboratorní materiál

12.3.2.1 Laboratorní přístroje:

Pipety	Eppendorf; Německo Finnpipette; Finsko Matrix; USA
Vortex MS1 Minishaker	IKA Šerme GmbH & Co; Německo
Centrifuga MiniSpin plus	Eppendorf; Německo
Centrifuga Universal 320 R	Hettich Zentrifugen; Německo
Centrifuga B4i	Jouan; Francie JULABO Labortechnik GmbH; Německo
Vodní lázeň Julabo TW8	
Vodní lázeň PolyScience	PolyScience, USA
Light cycler 480	Roche; Německo

12.3.2.2 Spotřební materiál:

pipetování špičky s filtrem	Sarstedt; Německo Matrix; USA ExpellPlus-BioVentures; USA ThermoScientific; USA
mikrozkumavky 1,5 ml	Eppendorf; Německo
zkumavky 7 ml	Sarstedt; Německo

PCR desky 96/1000 μ l	Eppendorf; Německo
384 jamkové desky Light Cycler 480	Roche; Německo
fólie Aluma Seal II	Sigma-Aldrich; Německo
fólie Light Cycler 480 Sealing foil	Roche; Německo
laboratorní rukavice	Kimberly-Clark, USA

12.4. Postup

Reverzní transkripce

Chemikálie:

Náhodné hexametry c. 500 μ g/ml	Roche Diagnostics GmbH; Německo
Voda (nuclease-free)	Braun; Německo
ImProm-II 5X Reaction Buffer	Promega; USA
MgCl ₂	Promega; USA
dNTP Mix (10 mM dNTP)	
Recombinant RNasin (40 u/ul)	Promega; USA
ImProm-II Reverse Transcriptase	Promega; USA

Pracovní postup:

Připravili jsme si dvě vodní lázně, první měla teplotu 70 °C (vodní lázeň Julabo TW8), druhá měla teplotu 42 °C (vodní lázeň PolyScience). Na ledu jsme smíchali 2 μ l náhodných hexamerů (0,5 μ g/ μ l) s 6 μ l vody a do této směsi jsme přidali 2 μ l RNA. Směs hexamerů s vodou jsme si připravili dohromady pro celou 96 jamkovou destičku do 1,5 ml mikrozkušavky. Počítali jsme i s pipetování chybou, tudíž jsme počítali 120x. Směs jsme rozpipetovali do 96 jamkové destičky po 8 μ l. Do každé jamky jsme připipetovali 2 μ l vzorku RNA. Desku jsme uzavřeli fólií Aluma Seal II a denaturovali 5 minut v lázni při 70 °C. Poté jsme desku dali na tající led na dobu 5 minut. Destičku jsme poté krátce stočili na cetrifuze (centrifuga B4i).

Dále jsme si vytvořili reakční směs na reverzní transkripci, celkový objem byl 10 μ l a obsahoval: 1 μ l vody (nuclease-free), 4 μ l ImProm-II 5X Reaction Buffer, 1,6 μ l MgCl₂, 2 μ l dNTP Mix (10 mM každého), 0,4 μ l Recombinant RNasin (40 u/ul), 1 μ l (kolik U) reverzní

traskriptázy ImProm-II. Alikvotovali jsme po 10 µl do každé jamky připravené 96 jamkové desky s denaturovaným náhodným primerem a vzorkem. Desku jsme uzavřeli fólií Aluma Seal II, zvortexovali a krátce stočili na centrifuze (centrifuga B4i). Reverzní transkripce začala inkubací 10 minut při pokojové teplotě (25 °C) a pokračovala hodinu v lázni při 42 °C. Po inkubaci bylo potřeba inaktivovat reverzní transkriptázu další inkubací při 70 °C po dobu 15 minut.

Dvoukolové PCR

Chemikálie:

PCR voda	Braun; Německo
Pufř 10x	Roche; USA
MgCl ₂ (25 mM)	Roche; USA
dNTP	
AmpliTaq Gold polymerase 5	
U/µl	Roche; USA
par1-f	CACTAGTTGTAAGGCCACGAA
par1-r	GGCCCCAGATCAGATCCA
pardeg-probe	ATGCCCAGAAGGTACCCGYAGGTAACAAGNGACA
parout-R	CCYGGGTTTGGCCCACTAGACGT
parout-F	AAAGCCAAGGTTTAACAGACCCT

Pracovní postup:

Připravili jsme si reakční směs pro PCR. Celkový objem PCR směsi byl 13 µl a obsahoval: 7,15 µl PCR vody, 1,5 µl pufru 10x, 2,1 µl MgCl₂ (25 mM), 0,8 µl dNTP, 0,38 µl primeru paroutF a 0,38 µl primeru paroutR, 0,23 µl sondy pardeg probe, 0,08 µl AmpliTaq Gold poly 5 U/µl. Reakční směs jsme si připravili pro všechny vzorky společně do 7 ml zkumavky, počítali jsme i s pipetovací chybou, tudíž jsme počítali 240x.

Dále jsme si připravili reakční směs pro detekci transkriptu genu B2M (beta 2 mikroglobulin), abychom si byli jistí, zdali naše vzorky obsahují RNA, resp. cDNA. Celkový objem reakční směsi byl 13 µl a obsahoval: 7,15 µl PCR vody, 1,5 µl pufru 10x, 2,1 µl MgCl₂ (25 mM), 0,8 µl dNTP, 0,38 µl primeru B2M F, 0,38 µl primeru B2M R, 0,23 µl sondy B2M probe, 0,08 µl

AmpliTaq Gold poly 5 U/ μ l. Směs jsme připravovali dohromady pro všechny jamky, počítali jsme tedy 120x.

Reakční směs jsme si rozpipetovali po 13 μ l do 384 jamkové destičky, viz tab. 3. K reakční směsi v destičce jsme připipetovali 2 μ l cDNA vzorku, kterou jsme si připravili reverzní transkripcí. Všechny vzorky jsme testovali v duplikátu na parechovirus, současně bylo provedeno PCR na gen B2M jako kontrolou obsahu lidské RNA.

Standardní křivka byla konstruována postupným ředěním reverzně transkribovaného RNA o známé parechovirové náloži. Do každé jamky kalibrační křivky jsme pipetovali 15 μ l reakční směsi. Do první jamky jsme k reakční směsi pipetovali 3 μ l cDNA a řádně promíchali. Z první jamky jsme poté odebrali 3 μ l a pipetovali do druhé jamky a opět řádně promíchali, takto se ředění opakovalo až do osmé jamky, viz obrázek destičky. Od standardů v reakci různé koncentrace se nám následně vytvořila kalibrační křivka, ze které jsme mohli odhadnout kvantitu virové RNA v neznámých vzorcích. 384 jamkovou desku jsme zakryli fólií Light Cycler 480 Sealing foil (Roche; Německo), zvortexovali a krátce centrifugovali (Centrifuga Universal 320 R).

PCR reakci jsme prováděli na přístroji Light cycler 480 (Roche; Německo). První kolo amplifikace proběhlo ve 45 cyklech při teplotách 95 °C 15 sekund a 60 °C 1 minutu, s úvodní denaturací 95 °C 10 minut.

2. kolo PCR

Chemikálie a postup

Použili jsme stejné chemikálie o stejném objemu jako v 1. kole PCR; primery k amplifikaci však byly par1-f a par1-r; sonda byla shodná s 1. kolem.

Jako templát sloužil produkt prvního kola, ředěný na cca 0,5% vodou: připravili jsme 96 jamkovou desku, do každé jamky jsme napipetovali po 800 μ l vody. Poté jsme si pipetou nabrali z každého duplikátu 2,5 μ l a ředili v hluboké desce. Po naředění jsme odebrali z hluboké desky 2 μ l a ty pipetovali do jedné poloviny 384 jamkové destičky, kde jsme již měli připravenou reakční směs pro 2. kolo PCR. Testovali jsme v duplikátu. Desku jsme

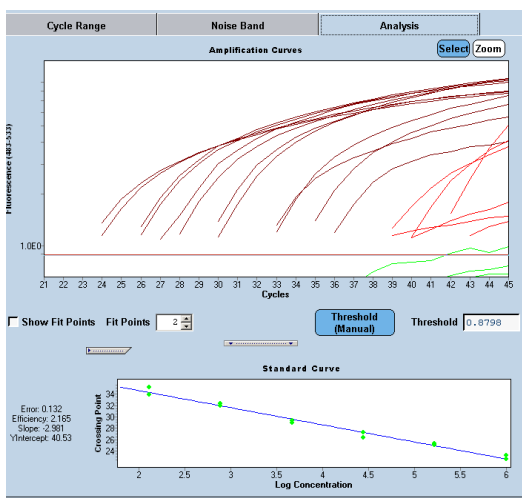
zakryli fólií Light Cycler 480 Sealing foil (Roche; Německo), zvortexovali a centrifugovali (Centrifuga Universal 320 R).

PCR reakci jsme prováděli na přístroji Light cycler 480 (Roche; Německo). Amplifikace proběhla ve 25 cyklech při teplotách 95 °C 15 sekund a 60 °C 1 minutu, s úvodní denaturací 95 °C 10 minut.

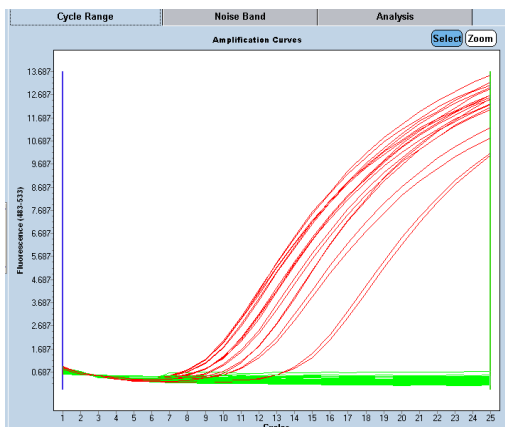
12.5. Výsledky a závěr

12.5.1 Příklady stanovení

Obr. 3 Příklad kalibrační křivky v prvním kole PCR. Kalibrační křivka měla viditelných šest bodů (v grafu nahoře zeleně, v grafu dole zachyceny zelenými body), je zkonstruovaná ze vzorku o známé vysoké pozitivitě parechoviru postupným šestinásobným ředěním cDNA. Červeně je v grafu nahoře několik vzorků se slabou reaktivitou již v prvním kole PCR. Dále jsou vidět negativní kontroly (v grafu nahoře zeleně).

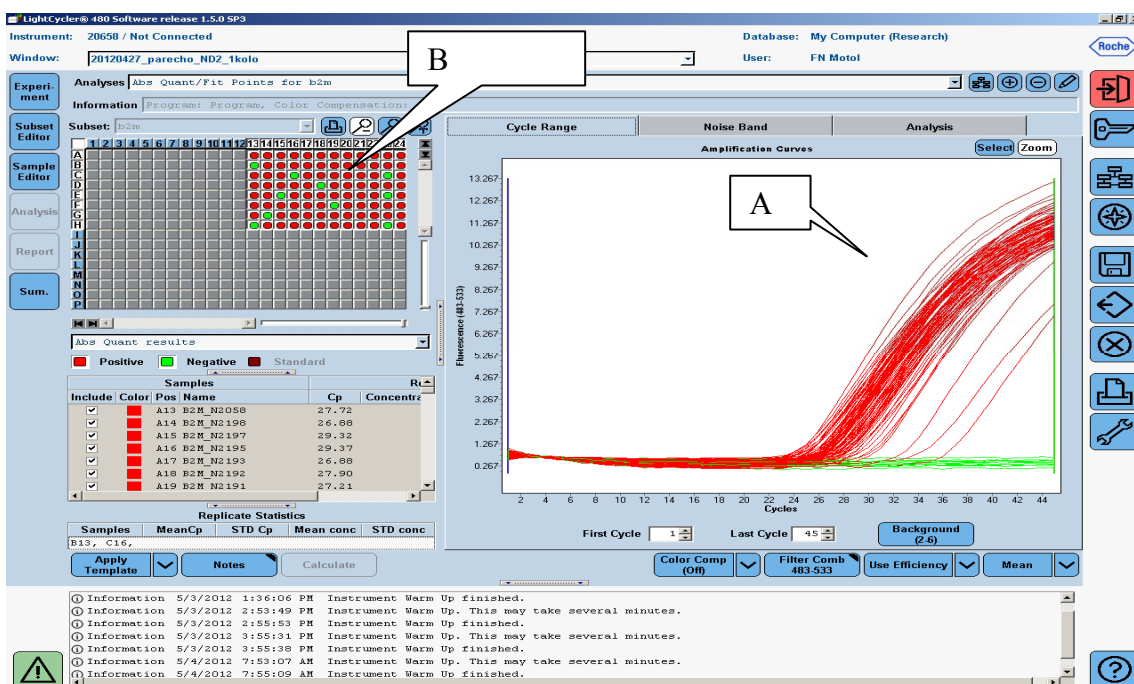


Obr. 4 Tatáž skupina vzorků amplifikovaná v druhém kole PCR vnitřními primery: červeně jsou amplifikované body kalibrační křivky a dále jediný duplikát ze zde stanovených 88 vzorků, který se ukázal skutečně pozitivním na lidský parechovirus. Zeleně jsou vzorky a negativní kontroly, jejichž signál nepřekročil hranici pozitivity.



Obr. 5 Tatáž skupina vzorků, tentokrát její stanovení na transkript lidského genu B2M.

A: ačkoli je B2M velmi prevalentní transkript v lidské RNA, naše vzorky byly směsí buněk, včetně erytrocytů, a zbytku plasmy; navíc prošly celkovým zamražením i se zmiňovanými erytrocyty. Proto je kvantita RNA nižší, než by bylo možno očekávat. Několik ze vzorků obsahuje výrazně méně RNA než ostatní. Osm z pozic mikrotitrační destičky obsahuje negativní kontroly, vodu místo výchozí krve, které prošly všemi kroky metodiky (extrakce, reverzní transkripce, detekce): zde jejich negativita slouží jako kontrola proti kontaminaci.



12.5.2 Výsledek

Z celkem 234 vzorků testovaných na parechovirus bylo pozitivních 5 (2,14 %, CI95 % 0,94 – 4,90 %). Tato relativně nízká frekvence positivity kontrastuje s relativně častou pozitivitou vzorků na enterovirus (jeho RNA byla v předchozí studii detekována v 11,5 % vzorků).

12.5.3 Závěr

Nízká zjištěná frekvence parechovirové virémie neumožní provést analýzu asociace tohoto viru s prediabetem, protože při dané velikosti souboru (nyní 27 dětí s již zjištěným prediabetem, každé s dvěma kontrolami), nedosáhne studie potřebné síly (kalkulace síly např. on-line materiály k studii o enteroviru (*Tapia, Cinek et al. 2011*)).

Citovaná literatura

- Achenbach, P., E. Bonifacio, et al. (2005). "Natural history of type 1 diabetes." Diabetes **54** **Suppl 2**: S25-31.
- Arif, S., T. I. Tree, et al. (2004). "Autoreactive T cell responses show proinflammatory polarization in diabetes but a regulatory phenotype in health." J Clin Invest **113**(3): 451-463.
- Brown, C. (1998). "In situ hybridization with riboprobes: an overview for veterinary pathologists." Vet Pathol **35**(3): 159-167.
- Bustin, S. A., V. Benes, et al. (2005). "Quantitative real-time RT-PCR--a perspective." J Mol Endocrinol **34**(3): 597-601.
- D Richman, R. J. W., Frederick G. Hayden (2002). Clinical virology: Enteroviruses.
- Daneman, D. (2006). "Type 1 diabetes." Lancet **367**(9513): 847-858.
- Delogu, L. G., S. Deidda, et al. (2011). "Infectious diseases and autoimmunity." J Infect Dev Ctries **5**(10): 679-687.
- Domingo, E. (2000). "Viruses at the edge of adaptation." Virology **270**(2): 251-253.
- Drake, J. W. and J. J. Holland (1999). "Mutation rates among RNA viruses." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(24): 13910-13913.
- Fuchtenbusch, M., A. Irnstetter, et al. (2001). "No evidence for an association of coxsackie virus infections during pregnancy and early childhood with development of islet autoantibodies in offspring of mothers or fathers with type 1 diabetes." J Autoimmun **17**(4): 333-340.
- Gale, E. A. and M. Atkinson (2004). "A piece of nucleic acid surrounded by controversy: coxsackievirus and the causes of Type 1 diabetes." Diabet Med **21**(6): 503-506.
- Gamble, D. R., M. L. Kinsley, et al. (1969). "Viral antibodies in diabetes mellitus." Br Med J **3**(5671): 627-630.
- Graves, P. M., H. A. Rotbart, et al. (2003). "Prospective study of enteroviral infections and development of beta-cell autoimmunity. Diabetes autoimmunity study in the young (DAISY)." Diabetes Res Clin Pract **59**(1): 51-61.
- Green, J., D. Casabonne, et al. (2004). "Coxsackie B virus serology and Type 1 diabetes mellitus: a systematic review of published case-control studies." Diabet Med **21**(6): 507-514.
- Harrath, R., T. Bourlet, et al. (2004). "Coxsackievirus B3 replication and persistence in intestinal cells from mice infected orally and in the human CaCo-2 cell line." J Med Virol **74**(2): 283-290.
- Harvala, H. and P. Simmonds (2009). "Human parechoviruses: biology, epidemiology and clinical significance." J Clin Virol **45**(1): 1-9.
- Hiltunen, M., H. Hyoty, et al. (1997). "Islet cell antibody seroconversion in children is temporally associated with enterovirus infections. Childhood Diabetes in Finland (DiMe) Study Group." J Infect Dis **175**(3): 554-560.
- Hober, D. and F. Sane (2010). "Enteroviral pathogenesis of type 1 diabetes." Discov Med **10**(51): 151-160.
- Hong, J., B. Kang, et al. (2011). "Development of a highly sensitive real-time one step RT-PCR combined complementary locked primer technology and conjugated minor groove binder probe." Virol J **8**: 330.
- Hyoty, H., M. Hiltunen, et al. (1995). "A prospective study of the role of coxsackie B and other enterovirus infections in the pathogenesis of IDDM. Childhood Diabetes in Finland (DiMe) Study Group." Diabetes **44**(6): 652-657.
- Hyoty, H. and K. W. Taylor (2002). "The role of viruses in human diabetes." Diabetologia **45**(10): 1353-1361.

- Ian M. Mackay, K. E. A., Andreas Nitsche (2002). "Real-time PCR in virology."
- King, A. M. Q., F. Brown, et al. (1999). "Virus Taxonomy. Seventh report of the international committee for the taxonomy of viruses." Academic press
- Knip, M. (2011). "Pathogenesis of type 1 diabetes: implications for incidence trends." Horm Res Paediatr **76 Suppl 1**: 57-64.
- Kolehmainen, P., S. Oikarinen, et al. (2012). "Human parechoviruses are frequently detected in stool of healthy Finnish children." J Clin Virol.
- Knowles, N.J., Hovi, et al. (2011). *Picornaviridae*. In: Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Ed: King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B. and Lefkowitz, E.J. San Diego: Elsevier, pp 855-880.
- Leslie Collier, J. O. (2000). Human virology, second edition.
- Lin Jing-Yi, Tzu -Chun Chen, et al. (2009). "Viral and host proteins involved in picornavirus life cycle." J Biomed Sci. 16(1)
- Miao, L. Y., C. Pierce, et al. (2009). "Monoclonal antibodies to VP1 recognize a broad range of enteroviruses." J Clin Microbiol **47**(10): 3108-3113.
- Mullis, K. B. and F. A. Faloon (1987). "Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction." Methods Enzymol **155**: 335-350.
- Oikarinen, M., S. Tauriainen, et al. (2012). "Type 1 diabetes is associated with enterovirus infection in gut mucosa." Diabetes **61**(3): 687-691.
- Oikarinen, S., M. Martiskainen, et al. (2011). "Enterovirus RNA in blood is linked to the development of type 1 diabetes." Diabetes **60**(1): 276-279.
- Peng, H. and W. Hagopian (2006). "Environmental factors in the development of Type 1 diabetes." Rev Endocr Metab Disord **7**(3): 149-162.
- Rajtar, B., M. Majek, et al. (2008). "Enteroviruses in water environment--a potential threat to public health." Ann Agric Environ Med **15**(2): 199-203.
- Richardson, S. J., A. Willcox, et al. (2009). "The prevalence of enteroviral capsid protein vp1 immunostaining in pancreatic islets in human type 1 diabetes." Diabetologia **52**(6): 1143-1151.
- Roivainen, M. and K. Klingel (2010). "Virus infections and type 1 diabetes risk." Curr Diab Rep **10**(5): 350-356.
- Sadeharju, K., M. Knip, et al. (2003). "The HLA-DR phenotype modulates the humoral immune response to enterovirus antigens." Diabetologia **46**(8): 1100-1105.
- Salminen, K., K. Sadeharju, et al. (2003). "Enterovirus infections are associated with the induction of beta-cell autoimmunity in a prospective birth cohort study." J Med Virol **69**(1): 91-98.
- Salminen, K. K., T. Vuorinen, et al. (2004). "Isolation of enterovirus strains from children with preclinical Type 1 diabetes." Diabet Med **21**(2): 156-164.
- Seppälä, E., H. Viskary, et al. (2011). "Viral interference induced by live attenuated virus vaccine (OPV) can prevent otitis media." Vaccine **29**(47)
- Schibler, M., D. Gerlach, et al. (2012). "Experimental human rhinovirus and enterovirus interspecies recombination." J Gen Virol **93**(Pt 1): 93-101.
- Schulte, B. M., J. Bakkens, et al. (2010). "Detection of enterovirus RNA in peripheral blood mononuclear cells of type 1 diabetic patients beyond the stage of acute infection." Viral Immunol **23**(1): 99-104.
- Schulte, B. M., M. Kramer, et al. (2010). "Phagocytosis of enterovirus-infected pancreatic beta-cells triggers innate immune responses in human dendritic cells." Diabetes **59**(5): 1182-1191.

- Smura, T., S. Blomqvist, et al. (2007). "Enterovirus surveillance reveals proposed new serotypes and provides new insight into enterovirus 5'-untranslated region evolution." J Gen Virol **88**(Pt 9): 2520-2526.
- Stanway, G. and T. Hyypia (1999). "Parechoviruses." J Virol **73**(7): 5249-5254.
- Stellrecht K.A., L. D. M., Romero J.R. (2011). "Manual of Clinical Microbiology 10th edition; Enterovirus and Parechovirus."
- Stene, L. C., S. Oikarinen, et al. (2010). "Enterovirus infection and progression from islet autoimmunity to type 1 diabetes: the Diabetes and Autoimmunity Study in the Young (DAISY)." Diabetes **59**(12): 3174-3180.
- Stene, L. C. and M. Rewers (2012). "Immunology in the clinic review series; focus on type 1 diabetes and viruses: the enterovirus link to type 1 diabetes: critical review of human studies." Clin Exp Immunol **168**(1): 12-23.
- Tapia, G., O. Cinek, et al. (2010). "No Ljungan virus RNA in stool samples from the Norwegian environmental triggers of type 1 diabetes (MIDIA) cohort study." Diabetes Care **33**(5): 1069-1071.
- Tapia, G., O. Cinek, et al. (2011). "Longitudinal study of parechovirus infection in infancy and risk of repeated positivity for multiple islet autoantibodies: the MIDIA study." Pediatr Diabetes **12**(1): 58-62.
- Tapia, G., O. Cinek, et al. (2011). "Human enterovirus RNA in monthly fecal samples and islet autoimmunity in Norwegian children with high genetic risk for type 1 diabetes: the MIDIA study." Diabetes Care **34**(1): 151-155.
- Tapia, G., O. Cinek, et al. (2008). "Longitudinal observation of parechovirus in stool samples from Norwegian infants." J Med Virol **80**(10): 1835-1842.
- Tauriainen, S., S. Oikarinen, et al. (2011). "Enteroviruses in the pathogenesis of type 1 diabetes." Semin Immunopathol **33**(1): 45-55.
- Thoelen, I., E. Moes, et al. (2004). "Analysis of the serotype and genotype correlation of VP1 and the 5' noncoding region in an epidemiological survey of the human enterovirus B species." J Clin Microbiol **42**(3): 963-971.
- Wigand, R., A. B. Sabin (1961). "Properties of ECHO types 22, 23 and 24 viruses." Arch. Gesamte Virusforsch.
- Winkler, C., C. Lauber, et al. (2011). "An interferon-induced helicase (IFIH1) gene polymorphism associates with different rates of progression from autoimmunity to type 1 diabetes." Diabetes **60**(2): 685-690.
- Wong, M. L. and J. F. Medrano (2005). "Real-time PCR for mRNA quantitation." Biotechniques **39**(1): 75-85.
- Yeung, W. C., W. D. Rawlinson, et al. (2011). "Enterovirus infection and type 1 diabetes mellitus: systematic review and meta-analysis of observational molecular studies." BMJ **342**: d35.
- Zanone, M. M., E. Favaro, et al. (2007). "Human pancreatic islet endothelial cells express coxsackievirus and adenovirus receptor and are activated by coxsackie B virus infection." FASEB J **21**(12): 3308-3317.
- Zhang, H., Y. Li, et al. (2004). "Detection of enterovirus capsid protein VP1 in myocardium from cases of myocarditis or dilated cardiomyopathy by immunohistochemistry: further evidence of enterovirus persistence in myocytes." Med Microbiol Immunol **193**(2-3): 109-114.

Internetové zdroje :

Alex I. Donaldson, "Foot-and-mouth disease," in *AccessScience*, ©McGraw-Hill Companies, 2008. [cit.2012-04-27] Dostupné z <http://www.accessscience.com>

