

**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
UNIVERZITY KARLOVY V PRAZE**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Monitoring chřipkového viru v populaci ptáků pomocí
RT-PCR**

**Mgr. Štěpán RYBA
2007**

vedoucí práce: Doc. Mgr. P. Stopka, PhD.

Ryba, Š., 2007: Monitoring chřipkového viru v populaci ptáků pomocí RT-PCR.
[Monitoring influenza virus in a bird population by RT-PCR] – Mgr Thesis (in Czech), 51 pp. Faculty of Sciences, Charles University in Prague, The Czech Republic.

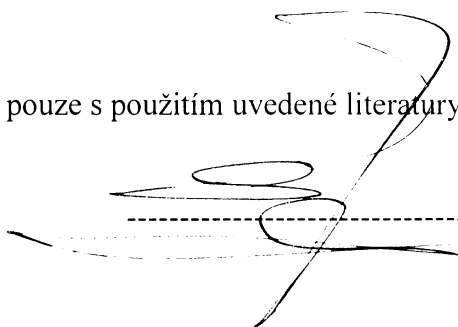
Annotation:

The recently raised awareness of the threat of a new influenza pandemic has stimulated interest in the detection of *Influenza A viruses* in human as well as animal secretions. A novel virus isolation and multiplex reverse transcription – PCR (RT-PCR) assay was developed to allow in one test detection of multiple viral infections. Many of previously described PCR methods are sensitive, but only for specific species. I have used a specific set of primers, based on highly conserved region of the matrix gene for typing *Influenza A virus* and specific flu primers for influenza subtyping. The total amount of samples was 205 and I have detected 8 samples (3.9%) of *Influenza A virus*. Seasonal variations in the rates of detection of the different organism were observed, as was expected from the literature.

There are three methods used for the isolation of total RNA. Concluded, the best results were achieved by Qiagen, very good results were achieved by purification with Chelex – 100. It was not acquired any applicable RNA by Trizol method.

Series of circular vectors, containing fragments of H5 and M gene, were prepared entirely from cloned cDNA and sequenced. The use of these vectors enabled us to prepare vaccines, dissects a studying from influenza pathogenesis and it allows highly efficient generation of clones without technical limitations as well.

Prohlašuji, že jsem uvedenou práci vypracoval sám, pouze s použitím uvedené literatury.

A handwritten signature in black ink, consisting of several loops and a long horizontal stroke at the bottom.

Poděkovat bych chtěl především svému školiteli Doc. Pavlu Stopkovi za vedení mé práce a trpělivost. Poděkování patří i Doc. Jitce Forstové za množství cenných rad a panu Dr. Táčnerovi ze SZÚ za poskytnutí virových standardů.

OBSAH

1.	SEZNAM ZKRATEK	6
2.	ÚVOD	7
3.	LITERÁRNÍ PŘEHLED	8
3.1	Klasifikace	8
3.2	Struktura genomu	9
3.3	Hemagglutinin	9
3.4	Neuraminidáza	12
3.5	Matrix gen M	13
3.6	Vysoce patogenní ptačí chřipkové viry – subtyp H5N1	13
3.7	Metody detekce	13
3.8	Porovnání metod izolace virové RNA	14
3.9	Možnosti detekce chřipkového viru a jejich subtypů	15
3.10	Klonování cDNA chřipkových segmentů do plazmidu	16
4.	CÍLE PRÁCE	17
4.1	Dílčí cíle a jejich splnění	17
4.1.1	Metoda izolace celkové RNA	17
4.1.2	Monitoring chřipkových virů v ptačí populaci během sezóny	17
4.1.3	Zaklonování hemagglutininového genu do vektoru	17
5.	MATERIÁL A METODY	18
5.1	Bakteriální kmeny a plazmidy	18
5.2	Virové standardy	18
5.3	Primery	18
5.4	Média, materiál pro izolaci RNA, tvorbu cDNA a elektroforézu	20
5.4.1	Média a další roztoky pro kultivaci bakterií:	20
5.4.2	Média pro Chelexovou metodu	20
5.4.3	Média pro izolaci plazmidů	20
5.4.4	Materiál na elektroforézu a izolaci DNA z gelu:	20
5.4.5	Materiál a média pro izolaci delších amplifikátů H5 genu	21
5.5	Materiál pro zaklonování genu do plazmidu	21
5.6	Izolace plazmidové DNA z bakterií	21
5.6.1	Izolace plazmidů metodou <i>mp</i> ("minipreps")	21
5.6.2	Izolace plazmidů metodou <i>pr</i> ("z proužků").	22
5.6.3	Izolace plazmidů – Qiagen plasmid minikit	22
5.7	Izolace RNA ze vzorků	23
5.7.1	Izolace RNA pomocí TRIZOLU	23
5.7.2	Izolace RNA pomocí Qiagenu	24
5.7.3	Izolace RNA chelexovou metodou	24
5.8	Syntéza cDNA	24
5.8.1	Metoda pomocí hexanukleotidů	24
5.8.2	Metoda pomocí specifického primeru	25
5.9	PCR amplifikace	25
5.9.1	Standardní	25
5.9.2	Gradientová	25
5.9.3	Amplifikace delších kusů H5 genu	25
5.10	Gelová elektroforéza	26
5.11	Sekvence amplifikátu H5	26
5.12	Příprava vektoru H5-pCR [®] TOPO [®]	26
5.12.1	Příprava vektoru	26
5.12.2	Transformace buněk a výsev na plotny	27

5.12.3	Naklonování plazmidu v baktériích	27
6.	VÝSLEDKY	28
6.1	Srovnání izolace vRNA chřipkového viru (3 metody).....	28
6.1.1	Izolace RNA pomocí TRIZOLU.....	28
6.1.2	Izolace RNA pomocí kolonek od Qiagenu	28
6.1.3	Blokování inhibičních látek chelexovou metodou	28
6.2	Srovnání metod tvorby cDNA.....	28
6.3	Diagnostika chřipkového viru v populaci kachen	29
6.3.1	Časové rozdělení vzorků	30
6.3.2	Monitoring ZOO, Hluboká nad Vltavou	31
6.3.3	Monitoring Kachny divoké (<i>Anas platyrhynchos</i>) – podzimní odstřel	34
6.3.4	Monitoring vzorků – stanoviště Nábřeží Hlávkův most	34
6.3.5	Monitoring vzorků – stanoviště rybníky Hluboká nad Vltavou.....	35
6.3.6	Monitoring vzorků – stanoviště rybníky Soběslav.....	35
6.4	Gradientová PCR amplifikace.....	36
6.5	Vektor H5- pCR [®] 4-TOPO [®]	37
7.	DISKUZE.....	40
7.1	Srovnání izolace vRNA chřipkového viru	40
7.2	Diagnostika chřipkového viru v populaci kachen	41
7.3	Problémy s PCR chřipkové cDNA	42
7.4	Vektor H5-pCR [®] TOPO [®]	42
8.	ZÁVĚR.....	43
9.	LITERATURA.....	44
10.	INTERNETOVÉ ZDROJE A POUŽITÉ PROGRAMY	51

1. SEZNAM ZKRATEK

cDNA	„Copy“ DNA
CTAB	Cetyltrimethylamonium-bromid
DEPC	diethyl pyrokarbonát
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Etylendiamintetraacetát
EIA	Enzyme Immuno Assay; Enzyme-linked Immunosorbent Assay
Elfo	Elektroforéza
HA	Hemagglutinin
HAI	Hemagglutinin inhibiční test
HPAI	Vysoce-patogenní aviární chřipka
IPTG	Isopropylthiokyanát
LB	Luria-Bertani medium
LPAI	Nízko-patogenní aviární chřipka
M	Matrix – gen
NA	Neuraminidáza, exo- α -sialidáza, též acetylneuraminyl hydrolasa
NS	Nestrukturní gen
PCR	„Polymerase chain reaction“ polymerázová řetězová reakce
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RT-PCR	Reversně transkripční – PCR
TAE	Tris-Acetát-EDTA pufr
TBE	Tris-Borax-EDTA pufr
TE	Tris-EDTA pufr
TRIS	Tris(hydroxymetyl)-aminometan
SA	Kyselina sialová
SDS	Sodium-dodecylsulfát
SZU	Státní Zdravotní Ústav
UTR	Nepřekládaná oblast
WHO	Světová zdravotnická organizace

2. ÚVOD

Detekce virů, pomocí molekulárních metod založených na PCR, se ve virologii objevila již poměrně dávno a dosáhla při monitorování těchto agens velmi významných teoretických i praktických výsledků. Molekulární metody vynikají obrovským potenciálem amplifikace produktu a i velmi vysokou citlivostí, ve srovnání se staršími metodami, mezi něž patří především fixace komplementu (CF), hemagglutinin-inhibiční test (HAI) a enzymatická imuno-analýza (EIA).

Samotné PCR reakci předchází izolace virové RNA (vlastně totální RNA), která musí být prostá inhibičních látek. Jejich přítomnost totiž obvykle interferuje s následující reakcí reverzní transkripce. Virová RNA je přepsána do cDNA za pomoci specifických virových primerů nebo je přepsána totální vyizolovaná RNA za pomoci náhodných hexanukleotidů.

Vlastní dvoustupňová PCR detekce se provádí s primery pro Matrix gen (Fouchier et al., 2000), pomocí kterého se stanoví přítomnost chřipkového viru a následně jsou pozitivní vzorky subtypizovány se specifickými primery pro hemagglutinin. RT-PCR detekce chřipky představuje rychlou a spolehlivou alternativu k starším postupům, založených na sérologických testech.

Kromě detekce chřipkového viru v ptačí populaci jsem pomocí PCR amplifikace připravil i cirkulární vektory (H5-pCR4[®]-TOPO[®]) odvozené od vektoru pCR4[®]-TOPO[®] (Invitrogen, USA), s inzertem genu H5 – ptačí chřipky, dále vektor (M-pCR4[®]-TOPO[®]) odvozený od vektoru pCR4[®]-TOPO[®] (Invitrogen, USA), s inzertem genu M – ptačí chřipky.

3. LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Klasifikace

Chřipka je celosvětově závažné infekční onemocnění, jedinečné svojí schopností vyvolávat sezónní epidemie (Webster et al., 1992) a v nepravidelných několikaletých intervalech pandemie (Gibbs et al., 2001, Simonsen et al., 1997). Dokáže infikovat úspěšně široké spektrum živočišných druhů a unikat obratně imunitní odpovědi, a to vše díky schopnosti rychle měnit antigenní vlastnosti dvou povrchových glykoproteinů (Munoz et al., 2005).

Chřipkové viry patří do čeledi *Orthomyxoviridae*, která zahrnuje 5 rodů. *Influenzavirus A*, *Influenzavirus B*, *Influenzavirus C*, *Thogoto virus* (zahrnuje viry Thogoto a Dhori) a *Isavirus* (Cox et al., 1998). Počet a struktura RNA segmentů je hlavním rozlišujícím faktorem na těchto pět rodů. Zatímco rod *Influenzavirus B* infikuje pouze člověka, *Influenzavirus A* a *Influenzavirus C* je virulentní pro více druhů (Lamb et al., 1991). *Influenzavirus A* infikuje vodní a pobřežní ptáky, prasata, koně, drůbež, tažné ptáky, delfíny, norky, velbloudy, tuleně a v neposlední řadě také člověka (Wright et al., 2001). Rod *Influenzavirus A* zahrnuje jediný druh *Influenza A virus*. Z obalových antigenních proteinů na povrchu *Influenza A viru* známe 16 subtypů hemagglutininu (H1..H16) a 9 subtypů neuraminidázy (N1..N9). Právě oba tyto glykoproteiny a jejich mutace jsou zodpovědné za antigenní vlastnosti chřipky. Navíc jsou ve většině případů úzce druhově specifické, takže chřipkový virion opatřený hemagglutininem humánního typu není schopen efektivně infikovat ptačího hostitele a naopak (Gambaryan et al., 2005).

To při stanovení pomocí PCR technik ztěžuje celou situaci a je náročné na celkové množství specifických primerů. U vodních ptáků, zvláště kachen a u racků se vyskytují všechny typy hemagglutininů a neuraminidázy. Na rozdíl od savců, u nichž se replikují viry jen v tracheálních buňkách, u ptáků se pomnožují i v buňkách střevního epitelu (Hatta et al., 2002). Ptačí viry jsou tedy exkretovány do vodního prostředí s fekáliemi a jsou znovu přijímány oro-fekální cestou z kontaminované vody. Fylogenetické studie zaměřené na ekologii chřipky potvrdily hypotézu, že savčí typ chřipky je derivovaný z původně ptačího - staršího typu a virus našel u savců způsob adaptace v horních cestách dýchacích. Studie zaměřená na fylogenetickou analýzu nukleoproteinu, NS genu a hemagglutininu ukázala rozdělení chřipky z původně ptačího typu na 5 nových: původní koňskou, recentní koňskou, chřipku u racků, prasečí a lidskou (Fanning et al., 1999; Spackman et al., 2005; Suarez et al., 1998).

3.2 Struktura genomu

Všechny chřipkové viry mají segmentovaný genom a obsahují 6-8 molekul negativně orientované RNA. Každá z těchto RNA molekul kóduje 1-2 virové proteiny (Lamb et al., 2001), které jsou glykosylované (Nakamura et al., 1978, 1979). Z povrchových glykoproteinů, zodpovědných za antigenní vlastnosti *Influenza A viru*, rozlišujeme dva. Hemagglutinin a Neuraminidázu. Třetí transmembránový protein nacházející se zčásti na povrchu virionu je M2 protein, který tvoří iontový kanál a sehrává důležitou roli při uvolňování virionu a virových RNA do cytozolu buňky. Stanovení chřipky, její typizace a subtypizace, se prokazuje přítomností vRNA právě těchto tří proteinů.

Na koncích každého segmentu rozeznáváme 3' a 5' UTR sekvenci. Tato sekvence obsahuje promotory, polyadenylační signál a terminační signál transkripce, vazebné místo pro chřipkové polymerázy, pro transkripci a pakážovací signál do pučení vznikajícího virionu. Prvních 12 a posledních 11 – 15 nukleotidů je velice přísně konzervováno pro celý druh *Influenza A virus* (Szymkowiak et al., 2003). V rámci jednoho virového druhu se pak liší sekvence pro jednotlivé segmenty (1-8). Této skutečnosti lze využít při klonování celých segmentů do plazmidu (*Obr.1*).

```
A:
H1      AGCAAAGCAGGGGATAATCAAATCAATCGAGATG
H3      AGCAAAGCAGGGGATACTTTCATTAATCATG
H5      AGCAAAGCAGGGGTATAATCTGTCAAATG
H7      AGCAAAGCAGGGGATACAAAATG

B:
H1      GGAAAAACACCCTTGTTTCTACT
H3      TTAAAAACACCCTTGTTTCTACT
H5      TTAAAAACACCCTTGTTTCTACT
H7      GGAAAAACACCCTTGTTTCTACT
```

Obr. 1: Konzervativní sekvence Hemagglutininu (HA)

A: začátek mRNA virového segmentu 4, Hemagglutininu; B: konec mRNA virového segmentu 4, Hemagglutininu. Zvýrazněny jsou podtržením sekvence primerů U12 (začátek) a U13 (konec). V rámečku je zvýrazněn iniciační triplet ATG. H1 - H1N1 |4585160|gb|AF091309.1|AF091309 *Influenza A virus A/duck/Alberta/35/76*(H1N1); H3 - gi h3n8 |324189|gb|J02109.1|FLAHAMU *Influenza A virus A/duck/ukraine/1/63* (h3n8), hemagglutinin (seg 4); H5 - gi H5N1 |73852954|ref|NC_007362.1| *Influenza A virus (A/Goose/Guangdong/1/96)*(H5N1)) segment 4; H7 - gi H7N7 902752|gb|U20459.1| *Influenza A virus (A/chicken/Leipzig/1/79)*(H7N7)) segment 4. Zpracováno programem BioEdit v.7.0.4.1. (Hall, 1999).

3.3 Hemagglutinin

Hemagglutinin je hlavní povrchový glykoprotein zodpovědný za vazbu na povrch hostitelské buňky. Rozeznává oligosacharid terminálně ukončený kyselinou sialovou (SA) jako receptor.

Lidské chřipkové viry jsou prevalenčně vázány na SA s propojením galaktózy $\alpha 2,6$ vazbou (SA $\alpha 2,6$ Gal) (Paulson, 1985). Takto ukončené vazebné spojení SA se přednostně nacházejí v dýchacím traktu savců. Ptačí chřipkové typy preferují vazebné spojení v SA galaktózy $\alpha 2,3$ (SA $\alpha 2,3$ Gal) (Ito et al., 1997, 1998). Tato vazebná spojení SA najdeme u ptáků jak v horních cestách dýchacích, tak v epitelu střeva (Coucerio et al., 1993). Aminokyselinové sekvence (stejně jako její vRNA templát) jsou v tomto místě vysoce konzervované a vytváří receptor-vazebné místo. V sekvenci jsou důležité 2 aminokyseliny, rozhodující o preferenci k budoucímu hostiteli. Jsou to aminokyseliny v hemagglutininové sekvenci na pozici 226 a 228 (Vines et al., 1998).

Celkový počet hemagglutininových subtypů, známých v dnešní době, je 16. Čtrnáct subtypů hemagglutininu a 9 subtypů neuramidinázy bylo zařazováno podle reaktivity založené na EIA testech (Memorandum WHO). Tato technika umožňuje rozlišit mezi jednotlivými viry a jejich subtypy HA na základě sérologických principů. Moderní metody subtypizace mohou využívat i molekulární přístupy. Pokud se HA1 region liší o více než 30% ve své aminokyselinové sekvenci od ostatních subtypů, jde obvykle o nový subtyp. Podobným způsobem byl zařazen nový subtyp H15 nalezený v kachnách a vodních ptácích v Austrálii (Rohm et al., 1996) a H16 pocházející z racků (*Laurus ridibundus*) z pobřežních oblastí Švédska (Fouchier et al., 2004).

Na nukleotidové (a aminokyselinové) sekvenci hemagglutininu H5 (**Obr. 2**) jsou vyznačena místa nasedajících primerů, použitých pro stanovení a amplifikaci H5 patogenního subtypu *Influenza A viru*.

Další primerový set použitelný pro detekci H5-hemagglutininu je založen na kombinaci 2 párů primerů, vnitřní próbě a Real-Time RT-PCR. Porovnáním citlivosti jednotlivých technik má rychlý antigenní test (DFA) hranici citlivosti o dva řády nižší vůči klasické RT-PCR technice (Yuen et al., 1998) a o 3 řády nižší vůči metodě Real-Time PCR (Ng et al., 2005).

Vyhledání vhodných primerů na hemagglutininu je nemalý problém. Primery musí nasednout v rámci jednoho subtypu tak, aby vytvořily amplifikát vždy, ale nenesedávat na jiné subtypy hemagglutininu. Celou situaci ztěžuje veliká mutabilita způsobená nepřesným čtením RNA polymerázy a přeskokováním z templátu na templát. Navíc se může, díky degenerovanému kódování, měnit genetická informace ve vRNA, aniž by se změnila aminokyselinová sekvence. Primerové sekvence se proto nejčastěji cílí do vysoce konzervovaných míst (Lee, 2001; Marschall, 1995).

3.4 Neuraminidáza

Neuraminidáza je tetramerní glykoprotein vyčnívající na povrch virionu svojí globulární částí. K vysoké patogenitě chřipkových virů přispívá více faktorů. Jedním z nich je právě spolupráce Neuraminidázy a Hemagglutininu.

A:

N1	<u>AGCAAAGCAGGAGTTCAAATG</u> AAAT
N1*	<u>AGCAAAGCAGGAGTTCAAATG</u> AAATCC
N7	<u>AGCAAAGCAGGAGTGAATG</u> AAATCCAAA
N2	<u>AGCAAAGCAGGAGTAAAGATG</u> AAATCCAAA

B:

N1	TAGTTTGTTCAAAAAACTCCTTGTTCCTACT
N1	GTAGTTTGTTCAAAAAACTCCTTGTTCCTACT
N7	GCAATTTTAGAAAAAACTCCTTGTTCCTACT
N2	GCAATTTTAGAAAAAACTCCTTGTTCCTACT

Obr. 3: Konzervativní sekvence Neuraminidázy (NA)

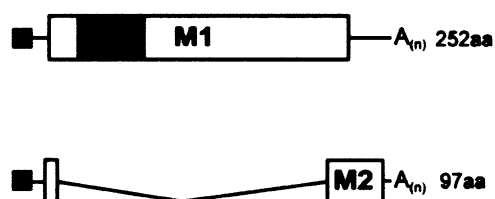
A: začátek mRNA virového segmentu 6, Neuraminidázy; B: konec mRNA virového segmentu 6, Neuraminidázy. Zvýrazněny jsou podtržením sekvence primerů U12 (začátek) a U13 (konec). V rámečku je zvýrazněn iniciační triplet ATG. N1 - [gi|58576|emb|X52226.1|AIVNEUR](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/gi|58576|emb|X52226.1|AIVNEUR) Influenza A virus (A/FPV/Rostock/34(H7N1)); N1* - [gi|324441|gb|K02252.1|FLANAKB](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/gi|324441|gb|K02252.1|FLANAKB) Influenza A/parrot/Ulster/73 (H7N1); N7 - [gi|391684|dbj|D00713.1|FLA180NA](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/gi|391684|dbj|D00713.1|FLA180NA) Influenza A virus sw/Ehime/1/80 (H1N2), gene for neuraminidase; N2 - [gi|73919135|ref|NC_007368.1|Influenza](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/gi|73919135|ref|NC_007368.1|Influenza) A virus (A/New York/392/2004(H3N2)). Zpracováno programem BioEdit ver.7.0.4.1. (Hall, 1999).

Neuraminidáza jako jeden z povrchových glykoproteinů na virovém povrchu váže hostitelsky-buněčné proteázy, které se účastní štěpení hemagglutininu. Mezi tyto proteázy patří plasminogen, jež je prekurzorem plasminu – enzymu zodpovědného za štěpení hemagglutininu. Právě ten je vázán neuraminidázou, pokud tato obsahuje na svém C-konci aminokyselinového řetězce lysin (pozice 146) (Goto et al., 1998). Neuraminidáza působí tedy jako koncentrační činitel a váže plasminogen do těsné blízkosti hemagglutininu. Z hlediska detekce patogenních subtypů jsou PCR molekulární metody vhodným nástrojem pro potvrzení určité části aminokyselinové sekvence.

3.5 Matrix gen M

Čtvrtý segment virové RNA obsažené ve virionu chřipky je přepisován díky sestřihu na 2 proteiny. Jsou jím vysoce konzervované proteiny M1 a M2. M2 protein, fungující jako iontový kanál, je zodpovědný za rozrušení pozdního endozomu a uvolnění virové RNA do cytozolu buňky (Lakadamyali et al., 2004). Dále bylo zjištěno, že tvar viru (sférický, filamentární nebo pleomorfní) je řízen

oběma proteiny (Roberta et al., 1998). RNA sekvence obou segmentů je velice konzervativní a využívá se k typizaci izolátů *Influenza A viru* i od velice odlišných hostitelů (ptáci, člověk, prasata, koně, tuleň), kde dává spolehlivé výsledky (Fouchier et al., 2000). Kromě M genu se pro typizaci může úspěšně použít i sekvence virové RNA pro NP protein (Lee et al., 2001; Marschall et al., 1995).



Obr. 4: Znázornění sestřihu matrix genu

M1 –sestřžení M1 proteinu; M2 – sestřžení M2 proteinu; červeně zvýrazněné úsek amplifikátu po nasednutí primerů FLU-MA-F-003 / FLU-MA-R-003.

3.6 Vysoce patogenní ptačí chřipkové viry – subtyp H5N1

Hodně virových glykoproteinů na povrchu virionu je štěpeno hostitelskými proteázami. U chřipkových virů je za štěpení Hemagglutininu zodpovědný plasmin, nacházející se v epiteliálních buňkách horních cest dýchacích (Klenk et al., 1994). Právě tato skutečnost určuje tropismus *Influenza A viru* u savců.

Navzdory tomu, že ptačí chřipkové viry jsou cíleny na SA a preferují vazebné spojení s galaktózou $\alpha 2,3$ (SA $\alpha 2,3$ Gal), mohou se některé subtypy replikovat i v lidských buňkách (Matrosovich et al., 1999, 2004) epitelu horních cest dýchacích. Tato schopnost změny hostitele byla pozorována při pandemii v Hong-Kongu u subtypu H5N1 (Gambaryan et al., 2004; WHO, 2005). Dalším způsobem je šíření viru z kořisti na dravce. Testováním na kočkách bylo potvrzeno systémové nakažení koček po sežrání kuřat infikovaných virem H5N1. Viry byly identifikovány jak v exkrementech, tak v dýchacím traktu (Rimmelzwaan et al., 2006).

3.7 Metody detekce

Metoda detekce chřipkových virů je velice citlivá a je schopná detekovat i viry, jejichž kapsidy a obaly jsou inaktivovány nebo denaturovány. Je možné detekovat i virové

potomstvo, které je neinfekční, například z důvodu silně mutovaného povrchového antigenu nebo jiné součásti virionu.

Sérologické důkazy chřipky spočívají v nálezů čtyřnásobného a vyššího vzestupu titru specifických protilátek ve dvojici sér vyšetřené v testu inhibice hemaglutinace (HIT), enzymatické imuno-analýzy (EIA), fixace komplementu (KFR) nebo neutralizace viru (VNT). Prvé sérum bývá odebíráno hned po propuknutí infekce, druhé po 10-14 dnech. A právě díky časové náročnosti a výsledku, který přichází velice pozdě, se hledají metody rychlejší.

Jednou z možností je použití klasické RT-PCR s vybranými vhodnými primery pro jednoho patogena nebo použití multiplex metody (Choi et al., 2002, Poddar, 2002, Stockton et al., 1998). Je možné vyšetřit i několik patogenních bakterií a virů dohromady. Ty se mohou nacházet ve stejném odběru (sputum, výtěr) nebo způsobovat stejné symptomy (soubor respiračních onemocnění) (Grondhal et al., 2004).

Další rychlý způsob detekce nabízí metoda MASS-TAG-PCR, kde je použito hned několik desítek dvojic primerů proti desítkám respiračních patogenů. Výsledné amplifikáty jsou analyzovány pomocí hmotnostního spektrometru a vyhodnoceny (Briese et al., 2005).

Velice rychlá metoda detekce nejen chřipkových virů je založena na reakci specifické fluorescenční protilátky - technika „direct immuno-fluorescent antigen“ DFA. Tato metoda nevyžaduje žádné speciální vybavení a během 15-ti minut se výsledek projeví zabarvením proužku na detekčním pásku, na který byl aplikován výtěr nebo nosní výplach (Chan et al., 2002). Pomocí FDA techniky ale není možné od sebe odlišit dva subtypy hemagglutininu nebo neuraminidázy, jako u RT-PCR (Spackman et al., 2002). Stejně tak citlivost testu je omezena a pod určitý titr nelze viry detekovat.

3.8 Porovnání metod izolace virové RNA

Izolace virové RNA je jedním z prvních kroků při detekci nejen chřipkových virů. Bylo odzkoušeno velké množství metod, které by odstranily inhibiční substance z testovaného vzorku (Hale et al., 1995). Tento krok je tedy zásadní, ať vycházíme z fekálních vzorků, faryngo-nasálních výtěrů nebo ze vzorků kloakálních výtěrů. První z těchto technik bylo vyvázání celých virových částic pomocí protilátek na pevnou fázi (Jensen et al., 1990). Tuto techniku po promytí následuje rozbití virových částic a následná RT-PCR. Následné techniky využívaly specifické vazby biotin-streptavidin, navázaný na magnetické kuličky, umožňující rychlou purifikaci RNA vzorku (Muir et al., 1993). Další metody vycházely z čištění vzorku pomocí chloroform – fenolové extrakce (Wilde et al., 1990) nebo za použití cetyltrimethylamonium-bromidu (CTAB) kationtového detergentu, který napomáhal odstranit

inhibiční látky (Jiang et al., 1992). Techniky čištění RNA pomocí specifické vazby na skleněná vlákna (či prach), popřípadě na specifickou hlinku těženou z mořského dna (původ roztavky), našly nejširší uplatnění při purifikaci RNA i DNA (Boom et al., 1989; Yamada et al., 1990) a staly se součástí komerčně dodávaných izolačních kitů (např. Qiagen, Stratagen). Poslední metodu, kterou musím zmínit je deaktivace inhibičních látek vyvázáním na metalchelátor Chelex-100 (Walsh et al., 1991). Nejedná se o klasickou izolační metodu, neboť chelátor pouze vyváže inhibiční látky na svůj povrch a následnou reverzní transkripci vlastně provádíme v původním vzorku. Tato metoda byla speciálně modifikována pro preparaci forenzních vzorků, vzorků slin a krevní plazmy.

3.9 Možnosti detekce chřipkového viru a jejich subtypů

Detekce chřipkových virů, popřípadě jejich subtypů event. mutantů, způsobujících větší patogenicitu či rezistenci, je dosahována pomocí velice přesného procesu, kterým je hybridizace molekuly oligonukleotidu a templátové DNA vzorku. Právě tato schopnost synteticky připraveného oligonukleotidu, vyhledat templát a zhybridizovat s touto molekulou DNA rozhoduje o specifitě reakce a prokázání přítomnosti sekvencí odpovídajícím „forward“ a „revers“ primeru. Druhá informace, kterou PCR reakce ukazuje, je velikost amplifikovaného primeru, obvykle srovnávaná s molekulárním standardem odpovídající velikosti a rozlišení. U odvozené techniky PCR, tzv. Real – Time PCR můžeme určit i titr viru ve vzorku.

Zkoumání variant mutantních virů H5N1 s využitím RT-PCR a sekvenace přineslo mnoho nových informací o rezistentních vůči Amantadinu. Zde dochází ke změně aminokyselinové sekvence v M2 proteinu. Gen M2 patří mezi velice konzervované a změnu 4 aminokyselin v těsné blízkosti u sebe je možné detekovat pomocí RT-PCR a vnitřního značeného primeru (próby), který odpovídá pozitivní sekvenci rezidenta (Pachucki et al., 2004; Ilyushina et al., 2005).

Další možností využití RT-PCR je rozlišení chřipkových virů subtypu H5N1 mezi vysoce patogenní a nízkopatogenní. Principem stanovení a rozlišení je amplifikace krátkého úseku hemagglutininu v oblasti, kde se vyskytuje štěpící místo. Toto místo je štěpeno proteázou a jeho sekvence rozhoduje o spektru proteáz, jež jsou schopny tuto štěpnou reakci zahájit. Konzensus sekvence pro vysoce patogenní subtypy je **–RKKR–** (**Obr.2**) u nízkopatogenních typů zcela chybí (Klenk et al., 1994). Po amplifikaci úseku okolo štěpného místa (báze 967 – 1090) se odčítá celková délka úseku, která se porovnává (pozitivní 124 bp, negativní 112 bp).

Pozitivnost nálezu vysoce patogenního typu se potvrzuje sekvenací a následným potvrzením aminokyselinového motivu (Payungporn et al., 2006)

Hemagglutininový a Matrixový gen nejsou jediné segmenty, jejichž mutace jsou zodpovědné za vyšší patogenicitu nebo rezistenci. Například neuraminidáza, jež má delecí 19-ti aminokyselin v oblasti stopky a nasedající hlavičky, je vysoce patogenní v porovnání s nedeletovanou variantou. Tuto delecí je opět velice snadné detekovat pomocí PCR s využitím vnitřní próby v oblasti deletovaného místa (Claas et al., 1998).

Kromě metod založených na PCR je možné detekovat subtypy chřipky za pomoci RFLP metod. Jedná se o subtypově specifické štěpení za pomoci restrikčních endonukleáz, které dává na výsledné elektroforéze specifický „pattern“ (Cooper et al., 2000). Tato technika byla použita pro detekci H1, H3 a H5 aviární i humánní chřipky během propuknutí epidemie (Hong-Kong 1997-1998) a jen u méně než 2% dávala neprůkazné a nejasné výsledky.

PCR techniky jsou mnohem rychlejší a se sadou vhodných primerů mohou odhalit celou řadu nepříbuzných patogenů, způsobujících onemocnění s podobnými symptomy (Elden et al., 2002) ale vyžadující odlišnou léčbu. Do této skupiny bychom mohli k chřipce zařadit *Parainfluenzavirus 1-3*, *Rhinovirus*, *Influenza virus B*, *Enterovirus*, *Haemophilus influenza*, *Streptococcus pneumoniae* a *Coronavirus*.

3.10 Klonování cDNA chřipkových segmentů do plazmidu

Možností zaklonovat virovou DNA či RNA (přepsanou cDNA) do plazmidu se zabývalo nespočet prací (Neumann, 1999, 2000, 2001). Zaklonováním úseku do plazmidu se nabízí možnost studia jednotlivých regulačních úseků, funkčních a strukturních proteinů. Spolu s vývojem metodik tkáňových kultur a možností transfekce pomocí plazmidu vznikla reverzní virová genetika. Ta umožňuje vzniknout virovému potomstvu, jež je například u chřipky produktem multičetné transfekce 12-ti plazmidů, nesoucích informaci pro transkripci vRNA a translaci několika důležitých virových proteinů (Neumann et al., 2001, Neuman et al., 1999). Současně je možné využít zvláště hemagglutininového segmentu (seg.4) pro produkci vakcíny. A to buď z odvozených tkáňových kultur nebo je možné využít velice efektivního způsobu tvorby vakcinačních proteinů v bakulovirovém expresním systému (Poompusta et al., 2003). Vakcíny vyvinuté pomocí reverzní genetiky již byly použity k ochraně ptáků (Tian et al., 2005).

4. CÍLE PRÁCE

Cílem práce bylo navrhnout a zoptimalizovat metodu izolace celkové RNA z kloakálních výtěrů, naso-faryngeálních výtěrů a fekálních sběrů ptačích vzorků a navrhnout metodu detekce pomocí RT-PCR. Dále monitorovat výskyt typů a subtypů chřipkových virů v populaci ptáků během roku a zaklonovat hemagglutinový fragment H5 do vektoru.

4.1 *Dílčí cíle a jejich splnění*

4.1.1 Metoda izolace celkové RNA

Při své práci jsem použil všechny 3 možné typy vzorků (kloakální výtěr, naso-pharyngeální výtěr a fekální vzorky) k detekci chřipkových virů u ptáků. Největší množství vzorků bylo odebráno jako kloakální výtěr. Metoda izolace pomocí Trizolu se ukázala jako nejméně vhodná. Použití RNA izolačních kolonek od Qiagenu a Chelexová metoda dávaly velmi dobré výsledky.

4.1.2 Monitoring chřipkových virů v ptačí populaci během sezóny

Z celkového množství 205 vzorků na 6 stanovištích bylo pozitivně identifikováno 8 vzorků. Ty byly odebrány během 12 měsíců v různých ročních obdobích od 10-ti druhů vodních ptáků.

4.1.3 Zaklonování hemagglutinového genu do vektoru

K zaklonování byl použit hemagglutininový gen inaktivovaného vzorku (a současně standardu) H5N1 (A/dk/Viet. TG24-01/05 238/06). Tento H5 gen byl amplifikován pomocí PCR a zaklonován do vektoru pCR[®] TOPO[®] (Invitrogen, USA).

5. MATERIÁL A METODY

5.1 Bakteriální kmeny a plazmidy

Escherichia coli TOP 10F⁺ (*F*⁻, *mcrA*, Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*), Φ 80*lacZ* Δ *M15*, Δ *lacX74*, *deoR*, *recA1*, *araD139*, Δ (*ara-leu*)7697, *galU*, *galK*, *rpsL* (*Str*^r), *endA1*, *nupG*)

Bakterie od firmy Invitrogen, které ale dávají několikrát vyšší výtěžek plazmidové DNA.

5.2 Virové standardy

Influenza A virus H5N1 (A/dk./Viet.) TG24-01/05 238/06

Chřipkový kmen, inaktivovaný β -propiolaktone, získáno od Státního zdravotního ústavu v Praze.

5.3 Primery

Seznam primerů (Invitrogen, USA), všechny v množství 50 nM.:

Primery pro typizaci chřipky (M gen)

Označení	Sekvence 5'-3'	Citace
M52C	CTTCTAACCGAGGTCGAAACG	Fouchier et al., 2000
M253R	AGGGCATTTTGGACAAAKCGTCTA	Fouchier et al., 2000
M-WSN-8	GAAGGTAGATATTGAAAGATG	(WHO manual, 2002)
M-1023R	GAAACAAGGTAGTTTTTACTC	(WHO manual, 2002)
FLU-MA-F-001	CTTCTAACCGAGGTCGAAACG	vlastní
FLU-MA-R-001	AGGGCATTTTGGACAAAKCGTCTA	vlastní

Primery pro reverzní transkripci

U13	AGTAGAAACAAGG	(WHO manual, 2002)
U12	AGCAAAAGCAGG	vlastní

Primery pro amplifikaci hemagglutininu a neuraminidázy

HF18	AGCRAAAGCAGGGGWWW	vlastní
HR20	AGTAGAAACAAGGGTGTTTT	vlastní
NF20	AGCRAAAGCAGGAGWTNAAA	vlastní
NR20	AGTAGAAACAAGGAGTTTTT	vlastní

Tab. 1.: Primery pro PCR

R = A+G; M = A+C; W = A+T; K = T+G; Y = C+T

Všechny primery byly naředěny 30 mM do DEPC vody a uchovávány při -20 °C.

Primery pro typizaci (Hemagglutinin)

Označení	Sekvence 5'-3'	Citace:
FLU-H1-F-001	GRGAAAGAAGTCAATGCYTG	vlastní
FLU-H1-R-001	TTAATCCAGTGGCACDTTYC	vlastní
FLU-H2-F-002	GAGAAARTWAAGATTCTGCC	(Lee et al, 2001)
FLU-H2-R-002	CCAAACAAYCCYCTTGAYTC	(Lee et al, 2001)
FLU-H3-F-003	CARATTGARGTGACHAATGC	(Lee et al, 2001)
FLU-H3-R-003	GGTGCATCTGAYCTCATT	(Lee et al, 2001)
FH4F	GCAGGGGAAACAATGCTATC	(Lee et al, 2001)
FH4R	CCWGGYTCTACAATWGTC	(Lee et al, 2001)
FLU-H5-F-003	ACACATGCYCARGACATACT	(Lee et al, 2001)
FLU-H5-R-003	CTYTGRTTYAGTGTGTGATG	(Lee et al, 2001)
FH6F	AGCATGAATTTTGCCAAAGG	(Lee et al, 2001)
FH6R	GGRCATTCTCCTATCCACAG	(Lee et al, 2001)
FH7F	GGGATACAAAATGAAYACTC	(Lee et al, 2001)
FH7R	CCATABARYYTRGTCTGYTC	(Lee et al, 2001)
FH9F	CTYCACACAGARCACAATGG	(Lee et al, 2001)
FH9R	GTCACACTTGTTGTTGTRTC	(Lee et al, 2001)

Primery pro typizaci H5

HA-1144	GGAATGATAGATGGNTGGTAYGG	(WHO manual, 2002)
HA-R	ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGGTGT	(WHO manual, 2002)
H5-1735R	GTGTTTTTAAAYTAMAATCTGRACTMA	(WHO manual, 2002)
H6-1480R	AATTCAAAGCAACCATTCCC	(WHO manual, 2002)
H9-1	AGCAAAAGCAGGGGAAYWWC	(WHO manual, 2002)
H9-808R	CCATACCATGGGGCAATTAG	(WHO manual, 2002)

Primery pro klonování Hemagglutininu

FL-H5-F620	CGGCAGAGCAGACAAAGCTCT	vlastní
FL-H5-R1154	CTCCCCCTGCTCATTGGCTATG	vlastní
FL-H5-F1094	GGATGGCAGGGAATGGTAGAT	vlastní
FL-H5-R1679	AGACACATAACTGGAAACAATGC	vlastní
FL-H5-F35	GTGCTTCTTCTTGCAATAG	vlastní
FL-H5-R365	CATAGTCATTGAAATCCCCTG	vlastní

Primery pro typizaci Neuraminidázy

FLU-N1-F-001	TTGCTTGGTCGGCAAGTGC	(Wright et al., 1995)
FLU-N1-R-001	CCAGTCCACCCATTTGGATCC	(Wright et al., 1995)
FLU-N2-F-001	GGAAATCGTTTCATATTAGCCCATG	
FLU-N2-R-001	AGCACACATAACTGGAAACAATGC	
FN9	AAAGCTTGTGCGACCTGCAGCRAAAGCA	vlastní
RN9	GAAGCTTGTGCGACCTGCAGTAGAAACAA	vlastní
FN7F	TTCTGCAGCGTCTCAGGGAGCRAAAGC	vlastní
FN7R	TTCTGCAGCGTCTTATATTAGTAGAAAC	vlastní

Primery použité při klonování fragmentu do plazmidu TOPO

M13 "Forward"	GTA AACGACGGCCAG	Invitrogen
M13 "Reverse"	CAGGAAACAGCTATGAC	Invitrogen
T3	ATTAACCCTCACTAAAGGGA	Invitrogen
T7	TAATACGACTCACTATAGGGG	Invitrogen

Tab.2.: Primery pro PCR

R = A+G; M = A+C; W = A+T; K = T+G; Y = C+T

Všechny primery byly naředěny 30 mM do DEPC vody a uchovávány při -20 °C.

5.4 Média, materiál pro izolaci RNA, tvorbu cDNA a elektroforézu

5.4.1 Média a další roztoky pro kultivaci bakterií:

- LB medium: 1% pepton, 0.5% kvasničný autolyzát, 0.5% NaCl, pH upraveno KOH na 6.8. Klávováno 30-45 minut, při 60 kPa. Pro nalévání ploten přidán před klávováním agar do 2% koncentrace.
- S.O.C. médium (pro přípravu kompetentních bakterií): 2% trypton, 0.5% kvasničný autolyzát, 10mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 0.2% glukosa (Invitrogen, USA). Médium se klávuje bez glukózy a ta se nakonec přidá sterilně přes filtr.
- Ampicilin byl přidáván do médií sterilně, po klávování, z 1000x koncentrovaného zásobního roztoku 100 mg.ml⁻¹ ve sterilní vodě, uchovávaného v mrazáku.

5.4.2 Média pro Chelexovou metodu

- TE pufr pro přečištění vzorku Chelexovou metodou: 10 mmol Tris-HCl, pH 7.2, 1 mmol EDTA pH 8.0
- Chelex – 100 (Bio-Rad, USA).

5.4.3 Média pro izolaci plazmidů

- roztok A - 25mM Tris, pH 8, 50 mM glukóza, 10 mM EDTA
- roztok B – 0.2M NaOH s 2% SDS, čerstvě připravený nebo skladovaný v mrazáku
- roztok C - nanášecí elfo pufr + 2M Tris pH 7, 1:1
- 9.5M octan amonný
- Qiagen Plazmid Midi Kit (Qiagen, USA).

5.4.4 Materiál na elektroforézu a izolaci DNA z gelu:

- Agaróza pro běžné použití
- 100x TAE pufr pro elfo: 4M Tris, 0.2M EDTA, pH upraveno kys. octovou na 8,0
- 10 x TBE pufr pro elfo: 20 mM Na₂EDTA, 0.89 M kyselina boritá, 0.89 M Tris-HCl, pH upraveno na 8,0
- nanášecí elfo pufr: 10mg bromfenolové modři, 10ml TAE pufru, 10ml glycerinu
- 1kb DNA (Fermentas, Canada) standard molekulových vah, upravený na konc. 250 ng.μl⁻¹
- Elektroforetická vana MiniGel

5.4.5 Materiál a media pro izolaci delších amplifikátů H5 genu

- Elongáza – enzymový mix (Invitrogen, USA)
- 5 x Pufr A (Invitrogen, USA)
- 5 x Pufr B (Invitrogen, USA)

5.5 **Materiál pro zaklonování genu do plazmidu**

- pCR[®] 4-TOPO[®] (Invitrogen, USA), koncentrace 10 ng/μl, 50% glycerol, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4 (při 25 °C), 1 mM EDTA, 2 mM DTT, 0.1% Triton X-100, 100 μg/ml BSA, 30 μM fenol.
- 10 x PCR Pufr (Invitrogen, USA), 100 mM Tris-HCl, pH 8.3 (při 42 °C), 500 mM KCl, 25 mM MgCl₂, 0.01% želatina.
- dNTP Mix (Invitrogen, USA), 12.5 mM dATP, 12.5 mM dCTP, 12.5 mM dGTP, 12.5 mM dTTP, pH 8
- Solný roztok (Invitrogen, USA), 1.2 M NaCl, 0.06 M MgCl₂
- Voda (Invitrogen, USA)
- M13 „forward“ primer (Invitrogen, USA), 0.1 μg.ml⁻¹ v pufru TE při pH 8 (sekvence viz seznam primerů)
- M13 „reverse“ primer (Invitrogen, USA), 0.1 μg.ml⁻¹ v pufru TE při pH 8 (sekvence viz seznam primerů)
- T3 „forward“ primer (Invitrogen, USA), 0.1 μg.ml⁻¹ v pufru TE při pH 8 (sekvence viz seznam primerů)
- T3 „reverse“ primer (Invitrogen, USA), 0.1 μg.ml⁻¹ v pufru TE při pH 8 (sekvence viz seznam primerů)
- Kontrolní PCR templát (Invitrogen, USA), 0.1 μg.ml⁻¹ v pufru TE při pH 8

5.6 **Izolace plazmidové DNA z bakterií**

5.6.1 Izolace plazmidů metodou *mp* ("minipreps")

Touto metodou jsem izoloval plazmidy pro většinu běžných reakcí: restrikční štěpení, ligaci, transformaci apod.

- Vybrané klony (6-12) jsem pěstoval v 5 ml LB média s antibiotikem přes noc.
- Kulturu jsem nalil do mikrozkuvek 1.5 ml, a centrifugoval při 5000 rpm 2 min., supernatant jsem vylil.

- Přidal jsem 200 μl [roztoku A] (pufr) a resuspendoval na vortex mixeru.
- Přidal jsem 400 μl [roztoku B] (louh s SDS) a okamžitě řádně promíchal převrácením. Nechal jsem stát vzorek 10 minut při pokojové teplotě.
- Přidal jsem 200 μl 9.5 M octanu amonného a opět řádně promíchal. Vzorek jsem dal do mrazáku -20°C na alespoň 30 minut.
- Stočil jsem chuchvalcovitou sraženinu SDS, proteinů, zbytků buněk a jednořetězcové DNA 3 minuty při 14000 rpm. Centrifugami jsem 1 x opakoval.
- Zcela čistý supernatant jsem slil do nových mikrozkušavek, přidal 500 μl izopropanolu a nechal stát 10 minut při pokojové teplotě.
- Vzorek jsem centrifugoval při 10000 rpm 2 minuty, supernatant slil a malou, ale viditelnou sraženinku DNA rozpustil ve 30 μl vody.

5.6.2 Izolace plazmidů metodou *pr* ("z proužků").

Velmi rychlá a levná metoda izolace, vhodná jen pro stanovení velikosti plazmidů.

- Do mikrozkušavek 1.5 ml jsem napipetoval po 50 μl [roztoku A] .
- Krátkou plastovou kličkou jsem odebral malé množství bakteriální pasty z proužku na plotně a resuspendoval v roztoku A – všechny vzorky.
- Do prvního vzorku jsem přidal 50 μl [roztoku B] a okamžitě kličkou řádně promíchal, kličku jsem nechal v mikrozkušavce a pokračoval s dalšími vzorky. Vzorek jsem nechal stát 10 minut při pokojové teplotě.
- Po 10-ti minutách jsem přidal do prvního vzorku 20 μl [roztoku C] a opět řádně promíchal, kličku jsem vyndal a pokračoval postupně s dalšími vzorky.
- Všechny vzorky jsem dal do mrazáku na alespoň 10 minut. Těsně před nanesením na elektroforézu jsem stočil slizovitou sraženinu 3 minuty při 14000 rpm. Supernatant (20 μl) jsem nanesl na gel.

5.6.3 Izolace plazmidů – Qiagen plasmid minikit

- Vybranou kolonii narostlou na Petrino misce jsem přeočkoval do LB 3 ml média a nechal třepat (200 rpm) 8 hodin při 37°C .
- Narostlou kulturu jsem centrifugoval 15 minut při 6000 rpm ($+4^{\circ}\text{C}$).
- Po odstranění supernatantu jsem přidal 0.3 ml pufru P1 a peletu jsem úplně rozpustil.

- Dále jsem přidal 0.3 ml pufru P2, směs protřepal a inkuboval 15 minut při pokojové teplotě.
- Dále jsem přidal 0.3 ml pufru P3, směs inkuboval na ledu 5 minut
- Do kolonky jsem přidal 1 ml pufru QBT a nechal protéct.
- Dále jsem zcentrifugoval mikrozkuhavku s pufrů P1 P2 a P3 z předchozího kroku a supernatant převedl do kolonky. Nechal jsem pufr volně protéct.
- Kolonku jsem následně 2 promyl pufrů QC, vždy 2 ml.
- Z kolonky jsem vymyl DNA pomocí 0.8 ml pufru QF.
- Přidal jsem 0,7 x množství izopropanolu a přesrážel. Centrifugoval jsem vzorek při 14000 rpm a supernatant opatrně odstranil.
- Získanou peletu jsem znovu rozpustil v 70% ethanolu, centrifugoval při 14000 rpm. Supernatant jsem opatrně odstranil.
- Peletu jsem mírně vysušil a rozpustil v 100 µl TE pufru.

5.7 Izolace RNA ze vzorků

5.7.1 Izolace RNA pomocí TRIZOLU

Vatové tyčinky s kloakálním výtěrem jsem zastříhнул tak, aby se vešly do 1.5 ml mikrozkuhavky a přidal jsem 500 µl destilované vody. Po 1 hodině odměčeni jsem vatové tyčinky obrátil vzhůru vatovou částí a centrifugoval (Eppendorf, Německo). K 350 µl odebrané kloakální tekutiny jsem přidal 1 ml RNazolu (Invitrogen, USA) a zvortexoval. Dále jsem přidal 120 µl chloroformu a důkladně protřepal. Směs jsem nechal na ledu 5 minut a pak 15 minut centrifugoval 12000 g (cca 15000 rpm) v chlazené (4 °C) centrifuze. Pipetou jsem opatrně odebral do nové mikrozkuhavky spodní organickou fázi, obsahující totální RNA. K takto odebrané fázi (cca 400 µl) jsem přidal stejné množství izopropanolu a nechal 15 minut stát na ledu. Výslednou směs jsem 15 minut centrifugoval při 12 000 g (4 °C). Opatrně jsem slil supernatant a přidal 800 µl 75% etanolu. Jemně jsem mikrozkuhavky zvortexoval a dále 10 minut centrifugoval při 4 °C a 8000 g. Etanol jsem odstranil a nechal vyschnout. Na dně se tvoří peleta, kterou jsem následně rozpustil v 20 µl vody. Takto izolovanou totální RNA vzorku jsem uchoval při -80 °C.

5.7.2 Izolace RNA pomocí Qiagenu

Vatové tyčinky s kloakálním výtěrem jsem zastříhnul tak, aby se vešly do 1.5 ml mikrozkušavky a přidal jsem 500 μ l destilované vody. Po 1 hodině odmáčení jsem vatové tyčinky obrátil vzhůru vatovou částí a zcentrifugoval (Eppendorf, Německo). K odebranému roztoku ze dna mikrozkušavky jsem přidal 350 μ l lyzačního pufru a 550 μ l 70% etanolu. Po 5-ti minutách stání jsem obsah mikrozkušavky podle návodu převedl do kolonky a centrifugoval při 6000 g (odpovídá 8000 rpm), 2 minuty. Odstranil jsem roztok, který protekl kolonkou a přidal 500 μ l roztoku RW a centrifugoval opět při 6000 g, 2 minuty. Roztok, který protekl kolonkou jsem odstranil a přidal do kolonky 500 μ l roztoku RPE a opět centrifugoval při 6000 g. Tuto proceduru jsem opakoval 2 krát. Dále jsem kolonku přendal do nové 1,5 ml mikrozkušavky a přidal jsem do kolonky 20 μ l DEPC vody. Roztok, který protekl kolonkou obsahoval totální RNA a byl zchlazen a uchováván při -80 °C.

5.7.3 Izolace RNA chelexovou metodou

Vatové tyčinky s kloakálním výtěrem jsem zastříhnul tak, aby se vešly do 1.5 ml mikrozkušavky a přidal jsem 500 μ l destilované vody. Po 1 hodině odmáčení jsem vatové tyčinky obrátil vzhůru vatovou částí a zcentrifugoval (Eppendorf, Německo). K 350 μ l roztoku kloakálního výtěru jsem přidal 500 μ l 5% suspenze pryskyřice Chelex-100 (Bio-Rad, USA) v TE pufru (10 mmol Tris-HCl, pH 7.2, 1 mmol EDTA pH 8.0). Vzorek jsem inkuboval přes noc při 56 °C. Po inkubaci jsem obsah mikrozkušavky 2 minuty centrifugoval při 6000 g a supernatant převedl do nové mikrozkušavky. K supernatantu jsem přidal 200 μ l 5% suspenze Chelex-100. Vzorek jsem inkuboval 1 hodinu. Dále jsem vzorek zahřál 15 minut na 95 °C, centrifugoval a zchlادil na 4°C. Odebral jsem supernatant a uchoval při -80 °C pro další použití.

5.8 **Syntéza cDNA**

5.8.1 Metoda pomocí hexanukleotidů

Mikrozkušavku s 4 μ l izolované virové RNA, 1 μ l hexanukleotidů a 6 μ l DEPC vody jsem inkuboval 5 minut při 72 °C. RT-PCR reakční mix obsahoval 6.5 μ l DEPC vody, 2 μ l 5xRT pufru, 0.5 μ l Rnasinu a 2.5 μ l 10 mmol dNTPs a 1 μ l reverzní transkriptázy M-MLV (vše kit Fermentas). Reakční mix jsem inkuboval před přidáním k templátu 5 minut při 30 °C. Do

mikrozkumavky s templátem jsem přidal 12.5 µl RT-PCR reakčního mixu a inkuboval jsem 60 minut při 42 °C. Inkubaci následovala inaktivace reverzní transkriptázy (10 minut, 80 °C).

5.8.2 Metoda pomocí specifického primeru

Stejný postup jako v metodě 5.6.2, jen místo hexanukleotidů jsem přidal 1 µl 30 mM specifického primeru UNI-12.

5.9 **PCR amplifikace**

5.9.1 Standardní

Do sterilních 0.2 ml PCR mikrozkumavek na ledu jsem převedl 1.5 µl cDNA, podle požadovaného typu amplifikátu nepipetujeme 1 µl 30 mM potřebného primeru (**Tab. 1 a 2**) a přidáme 18.5 µl PCR master mixu. Ten obsahuje: 2 µl PCR pufru s MgCl₂, 15 µl vody, 1 µl 10 mM dNTPs, 0.4 µl dNTPs (10 mM) a 0.1 µl Taq Polymerázy (vše Fermentas). Mikrozkumavky jsem vložil do termocykleru (Bio-Rad, USA) s programem pro amplifikaci: 94 °C, 2 minuty, 30 krát cyklus (94 °C, 1 minuta, 58 °C, 1 minuta, 72 °C, 3 minuty), 72 °C, 8 minut a 4 °C, až do dalšího použití nebo přendání do mrazáku (-20 °C) k uchování. Annealingová teplotu a čas jsem operativně měnil podle použití primerů a typu amplifikace.

5.9.2 Gradientová

Připravil jsem pro každý zkoumaný vzorek stejný PCR mix s templátem a primery jako při standardní PCR amplifikaci a rozpipetoval jej do 8-mi 0.2 ml PCR mikrozkumavek. Na termocykleru jsem nastavil gradientovou annealingovou teplotu zvolením mezních hodnot teplot (nejnižší 48 °C, nejvyšší 58 °C). Gradient je automaticky rozpočítán mezi všech 8 jamek v termocykleru.

5.9.3 Amplifikace delších kusů H5 genu

Na ledu byly připraveny dva mixy:

Mix 1:	1 µl dNTPs (10 mM)
(20 µl)	1 µl „forward“ primeru
	1 µl „reverse“ primeru
	2 µl cDNA
	15 µl vody

Mix 2: 5 μ l Pufr A (Invitrogen, USA)
(30 μ l) 5 μ l Pufr B (Invitrogen, USA)
1 μ l Elongáza – enzymatická směs
19 μ l voda

Dvacet μ l Mixu 1 a 30 μ l Mixu 2 bylo převedeno do PCR mikrozkumavky a amplifikováno v cykleru (Bio-Rad, USA).

5.10 Gelová elektroforéza

Připravil jsem si 1% TBE gel rozvařením agarózy v TBE pufru a po mírném zchladnutí jsem přidal Ethidium bromid do koncentrace (10 μ g/ml). K PCR produktu jsem přidal 3 μ l nanášecího pufru a napipetoval jsem 7 μ l PCR reakční směsi odděleně do jamek v agarózovém gelu. Dále jsem nanesl molekulární marker 100 bp (Fermentas, Canada). Elektroforéza probíhala při 100 V asi 40-50 minut. Gel jsem vizualizoval pomocí UV lampy (254 – 366 nm) a zdokumentoval pomocí fotoaparátu.

5.11 Sekvence amplifikátu H5

Amplifikát genu H5 byl sekvenován na přístroji 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA) za použití kitu BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA) vše podle manuálu výrobce.

5.12 Příprava vektoru H5-pCR[®] TOPO[®]

5.12.1 Příprava vektoru

Smíchal jsem při pokojové teplotě následující složky “TOPO[®] Cloning Kitu” (Invitrogen, USA):

- PCR product 1 μ l
- Solný roztok 1 μ l
- Voda 3 μ l
- TOPO[®] vector 1 μ l

Reakční směs jsem inkuboval 5 minut při pokojové teplotě (22-23 °C).

5.12.2 Transformace buněk a výsev na plotny

Z reakční směsi po inkubaci jsem odeberal 2 μl a přidal jsem do tající suspenze kompetentních bakterií TOP10[®] (Invitrogen, USA). Jemně jsem promíchal obracením mikrozkuhavky a nechal stát 10 minut na ledu. Poté jsem inkuboval 30 vteřin při 42 °C a následně jsem ihned zchladil mikrozkuhavku na ledu. Poté jsem přidal 250 μl S.O.C. média a vzorek jsem nechal třepat (200 rpm) horizontálně 60 minut. Narostlé bakterie jsem naočkoval na plotny (15 μl transformační směsi/ plotnu) s LB médiem a ampicilinem o koncentraci 100 $\mu\text{g/ml}$. Plotny jsem inkuboval 24 hodin při 37 °C.

Následující den jsem překlonoval narostlé pozitivní kolonie na nové plotny s ampicilinem (100 $\mu\text{g/ml}$) a očísloval; po 24 hodinách jsem provedl izolaci DNA z narostlých kolonií (viz. izolace plazmidů metodou “*pr*”).

5.12.3 Naklonování plazmidu v baktériích

Pozitivní kolonie jsem přeočkoval do LB media s ampicilinem (50 $\mu\text{g/ml}$) a kultivoval za extenzivního orbitálního třepání při 230 rpm a 37 °C přes noc. Z narostlé bakteriální kultury jsem izoloval plazmidy (viz. izolace plazmidů – Qiagen plasmid minikit).

6. VÝSLEDKY

6.1 Srovnání izolace vRNA chřipkového viru (3 metody)

6.1.1 Izolace RNA pomocí TRIZOLU

Metodou izolace RNA pomocí Trizolu jsem izoloval celkem 72 vzorků a u žádného z nich jsem nevyizoloval virovou RNA, která by měla být přepsána na cDNA a prokázána pomocí PCR. Na dně zkumavky jsem po přesrážení 75% etanolem, zcentrifugování a vyschnutí nenalezl žádnou peletu. Souběžná izolace virové RNA ze stejných vzorků pomocí jiných metod dala pozitivní výsledky.

6.1.2 Izolace RNA pomocí kolonek od Qiagenu

Izolace pomocí kolonek od firmy Qiagen vedla k získání totální RNA ze všech vzorků. Izolovaná RNA byla vykapána z kolonky do vody v množství 20 μ l. Z celkového množství 205 vzorků jsem identifikoval 8 pozitivních (**Tab.2**).

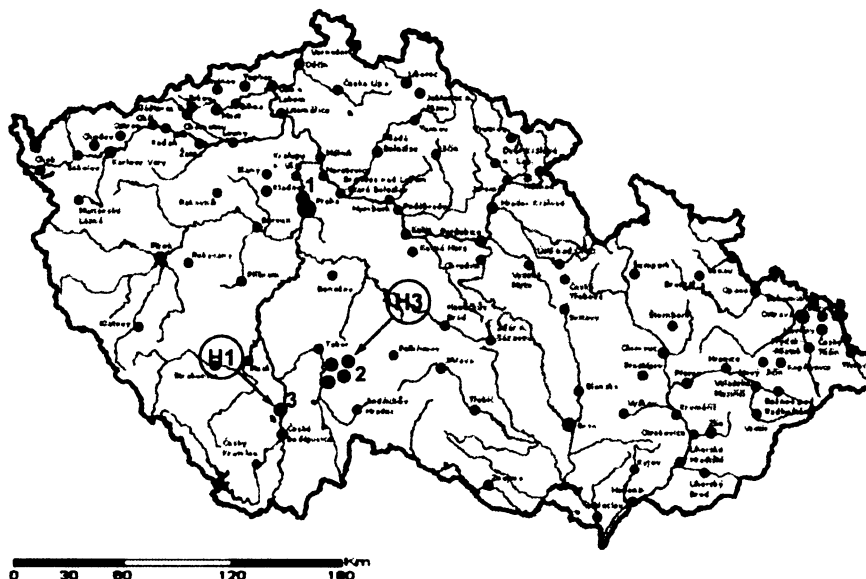
6.1.3 Blokování inhibičních látek chelexovou metodou

Při této metodě nešlo o typickou izolaci. Vzorky byly pouze vyčištěny pomocí Chelexu-100 a přímo použity pro reverzní transkripci. Z celkového množství 100 vzorků jsem u 5-ti pozitivně identifikoval chřipkový virus (**Tab.2**).

6.2 Srovnání metod tvorby cDNA

Pro přípravu cDNA byla použita metoda pomocí náhodných hexanukleotidů a metoda se specifickým primerem U12. Primer U12 nasedá na konzervativní oblast *U12* na 3' konci virové RNA každého z 8-mi segmentů *Influenza A viru*. Oproti tomu náhodné nukleotidy nasedají na veškerou vyizolovanou RNA. Konzervativní oblast je druhově specifická. Při použití náhodných hexanukleotidů a specifického primeru U12 jsem došel ke stejným výsledkům a nenašel jsem mezi metodami žádný kvalitativní rozdíl.

6.3 Diagnostika chřipkového viru v populaci kachen



Obr. 5: Mapka stanovišť sběru vzorků

červeně vyznačené body: 1 – stanoviště nábřeží Hlávkův most, Praha; 2 – stanoviště rybníky u Soběslavi, subtypizace H3, 3 – Zoologická zahrada, Hluboká nad Vltavou, subtypizace H1. U stanovišť vyznačeny identifikované pačičky subtypy hemagglutininu H1 a H3.

Monitoring chřipkových virů v ptačích populacích jsem prováděl na různých lokalitách a v různých částech roku. Celkově bylo odebráno 205 vzorků, z nichž bylo 8 pozitivních (Tab.2). Vzorky pocházely ze Zoologické zahrady v Hluboké nad Vltavou, z podzimních odstřelů kachen v okolí Soběslavi, z Prahy a z odchytu kachen na hnízdech (Obr.5).

Všechny odebírané vzorky byly přepravovány při 4 °C. Přepravování na suchém ledu, uchovávání vzorků při -20 °C nebo časté rozmrazování působí negativně na virus a snižuje jeho titer ve vzorku.

Číslo vzorku	Lokalita	Datum	Celkem ¹	Inf. ²
H-060101-H060128	Zoo, Hluboká n.Vlt.	4.8.2006	16	3
H-060301-H060356	Rybníky, Soběslav	22.9.2006	56	0
H-060401-H060433	Rybníky, Soběslav	29.9.2006	33	0
H-070101-H070168	Hlávkův most, Praha	5.2.2007	68	0
H-070201-H070120	Rybníky, Hluboká nad Vltavou	27.4.2007	20	1
H-070301-H070311	Rybníky, Soběslav	15.6.-15.7.2007	12	4
Celkem			205	8

Tab.2.: Celkový přehled stanovišť

1- celkový počet odebraných vzorků na lokalitě, 2 – počet pozitivních vzorků na *Influenza A virus*

Vzorky byly skladovány při -84 °C až do konečného zpracování. Z prvních dvou stanovišť byly vzorky zpracovány metodou pomocí Trizolu a žádná z izolací nevedla k produkci takového množství a kvality RNA, aby bylo možno potvrdit chřipkový virus. Dále jsem se již izolací Trizolem nezabýval. Dále byla RNA izolována pomocí kolonek od Qiagenu a pomocí Chelexu (Tab. 3.).

Stanoviště	Celkový počet vzorků	Pozitivních Quiagen	Pozitivních Chelex - 100	Pozitivních Trizol
Zoo, Hluboká n.Vlt.	16	3	neprováděno	0*
Rybníky, Soběslav	56	0	neprováděno	0
Rybníky, Soběslav	33	0	neprováděno	neprováděno
Hlávkův most, Praha	68	0	0	neprováděno
Rybníky, Hluboká nad Vltavou	20	1	1	neprováděno
Rybníky, Soběslav	12	4	4	neprováděno

Tab.3.: Přehled pozitivních vzorků při použití různých metod izolace RNA

* - všechny vzorky při izolaci Tritolem byly negativní; izolace pomocí Quiagenu dala pozitivivy.

6.3.1 Časové rozdělení vzorků

Vzorky byly odebírány během podzimních odstřelů (září), dále v zimě fekální vzorky (únor) a během odchytů ptáků na hnízdech (duben – srpen).

Stanoviště	Celkový počet vzorků	Pozitivních	Podíl
Výtěry hnízdicích ptáků	32	5	15.6%
Zoo, Hluboká n.Vlt.	16	3	18%
Podzimní odstřely na rybnících + zimní sběry	157	0	0 %
Celkem	205	8	3.9%

Tab.4.: Procentuelní podíl jednotlivých skupin

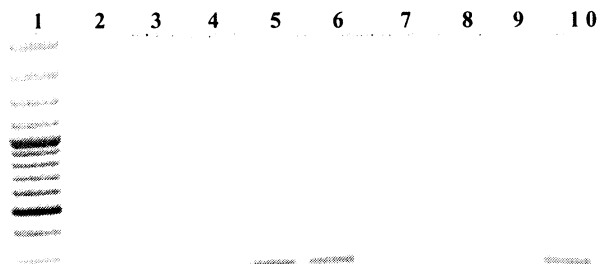
představuje skupina ptáků na hnízdech 5 pozitivně infekčních vzorků na chřipku z celkového počtu 32 vzorků, tj. 15.6%. Vzorky odebrané v říjnu v ZOO Hluboká nad Vltavou představují 18% (3 pozitivní z 16 odebraných vzorků) a během podzimních odstřelů kachen nebyl zaznamenán jediný pozitivní vzorek (Tab. 4).

vzorků z celkového počtu 205 testovaných vzorků představuje 3.9%. Srovnáme – li však odděleně kloakální výtěry vzorků ptáků na hnízdech, dále odděleně vzorky ze ZOO a vzorky odebrané při odstřelech,

6.3.2 Monitoring ZOO, Hluboká nad Vltavou

Bylo odebráno 16 kloakálních výtěrů pomocí vaty na špejly, které byly převedeny do mikrozkuřavky a zbytek špejle sestřizžen tak, aby se dala mikrozkuřavka zavřít. Ke každému vzorku bylo přidáno 150 μl stabilizačního pufru s ampicilinem ($500 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Vzorky byly

přepřavovány při $+4^\circ\text{C}$ a uchovávány až do zpracování při -84°C . Po rozmrazení bylo přidáno ke každému vzorku 1000 μl destilované vody. Po hodině stání na ledu a občasném protřepání bylo odebráno 3 x 300 μl tekutiny z kloakálního výtěru a provedena izolace totální RNA pomocí Qiagenu (Izolace pomocí Qiagenu), izolace totální RNA pomocí Trizolu (viz. Izolace RNA pomocí Trizolu). Pro účely standardizace v následujících testech



Obr. 6.: Typizace chřipky

Naneseno 5 μl amplifikátu, slot č.1 – molekulární standard 100bp (Fermentas). Slot č.2 – negativní kontrola, slot č. 5, 6 pozitivní nález., očekávaná velikost amplifikátu 244 bp, slot 10 – pozitivní kontrola, A/H5N1/Viet. Ostatní sloty, negativní.

byl použit vzorek viru A/H5N1/Viet. TG24-01/05 (238/06), ze kterého se postupně provedla izolace totální RNA všemi třemi výše uvedenými metodami. Každá analýza obsahovala negativní kontrolu, kde byla přidána namísto tekutiny kloakálního či naso-faryngeálního výtěru destilovaná voda.

1 2 3 4 5 6 7 8



Obr. 7: Subtypizace chřipky H5

Naneseno 5 µl amplifikátu, slot 8 – molekulární standard 100bp (Fermentas). Slot 6 a 7, pozitivní kontrola, očekávaná velikost amplifikátu 545 bp, slot 1- negativní kontrola. Ostatní vzorky, negativní.

s očekávaným pozitivním amplifikátem 244 bp a dvojice primerů M52C / M253R (Fouchier et al., 2000) s očekávaným pozitivním amplifikátem 221 bp. a WSN-8/1023R (WHO, 2002).

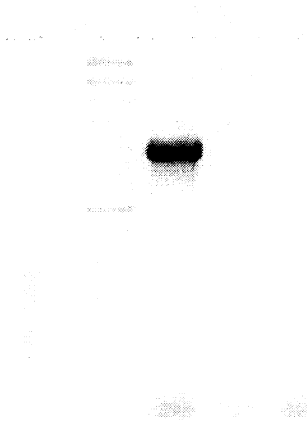
Výsledný PCR produkt byl, v množství 5 µl spolu s 4 µl nanášecího elfo pufru, nanesen do slotů. Elektroforéza probíhala při 100V zhruba 40 minut až 1 hodinu. Výsledný gel byl prosvícen na UV lampě a vyfotografován.

Subtypizace vzorků probíhala obdobným způsobem. S cDNA pozitivních vzorků byla provedena amplifikace pomocí PCR a přidány specifické primery pro detekci H5 genu FLU-H5-F-003 / FLU-H5-R-003 (Lee et al., 2001). Výsledný PCR produkt byl, v množství 5 µl spolu s 4 µl nanášecího elfo pufru, nanesen do slotů. Elektroforéza probíhala při 100V zhruba 40

minut až 1 hodinu. Výsledný gel byl prosvícen na UV lampě a vyfotografován. Podobně bylo postupováno při subtypizaci na hemagglutinin H1, H2, H3, H4, H6, H7 a H9. Ze vzorků ze ZOO v Hluboké nad Vltavou jsem pozitivně identifikoval u 3 vzorků ptáčích subtyp

Získaná totální RNA byla přepsána do cDNA metodou pomocí náhodných nukleotidů i metodou pomocí specifického primeru U12. Získaná cDNA byla použita jako templát pro PCR (viz Standardní PCR amplifikace). Při monitoringu chřipky bylo použito dvoustupňové metody detekce. V prvním kroku byly přidány primery, detekující chřipkové viry. Následně byly subtypizovány pouze pozitivní vzorky na *Influenza A virus*. Pro účel typizace chřipky byla použita dvojice primerů FLU-MA-F-001 / FLU-MA-R-001 (Lee et al., 2001)

1 2 3 4 5



Obr. 8: Subtypizace chřipky H1

Naneseno 5 µl amplifikátu, slot 2 – molekulární standard 100bp (Fermentas). Slot 3, pozitivní, očekávaná velikost amplifikátu 900 bp, slot 1- negativní kontrola. Ostatní vzorky (slot 4 a 5) negativní.

hemagglutininu H1 (**Obr. 8**). Všechny tři pozitivní vzorky H1-hemagglutininu byly odebrány od potápivé kachny *Zrzohlávka rudozobá (Netta rufina)*. Ostatní vzorky byly negativní (**Tab.6**).

Číslo	Druh	Datum	Typizace	Subtypizace
H-060101	<i>Anas crecca</i>	4.8.2006	Negativní	
H-600102	<i>Netta rufina</i>	4.8.2006	Pozitivní	H1*
H-600103	<i>Netta rufina</i>	4.8.2006	Pozitivní	H1*
H-600104	<i>Anser canagicus</i>	4.8.2006	Negativní	
H-600105	<i>Netta rufina</i>	4.8.2006	Pozitivní	H1*
H-600106	<i>Cygnus atratus</i>	4.8.2006	Negativní	
H-600107	<i>Branta ruficollis</i>	4.8.2006	Negativní	
H-600108	<i>Cygnus atratus</i>	4.8.2006	Negativní	
H-600109	<i>Branta ruficollis</i>	4.8.2006	Negativní	
H-600110	<i>Branta ruficollis</i>	4.8.2006	Negativní	
H-600111	<i>Branta ruficollis</i>	4.8.2006	Negativní	
H-600112	<i>Anser erythropus</i>	4.8.2006	Negativní	
H-600113	<i>Anas platyrhynchos</i>	4.8.2006	Negativní	
H-600114	<i>Anas platyrhynchos</i>	4.8.2006	Negativní	
H-600115	<i>Anas platyrhynchos</i>	4.8.2006	Negativní	
H-600116	<i>Anser canagicus</i>	4.8.2006	Negativní	

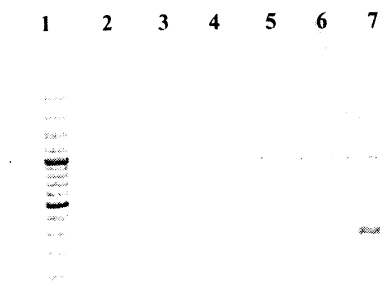
Tab. 6.: Vzorky kloakálních výtěrů odebrané v ZOO, Hluboká nad Vltavou.

* - pozitivní vzorky H1 - hemagglutininu

Testy na subtyp neuraminidázy byly prováděny stejně jako testování hemagglutininu. Žádný z testovaných primerů na neuraminidázu (N1, N2, N9, N7) neprokázal její přítomnost, navíc negativně vyšel i standard *Influenza A viru A/H5N1/dk./Viet.* na přítomnost N1-neuraminidázy.

6.3.3 Monitoring Kachny divoké (*Anas platyrhynchos*) – podzimní odstřel

Všech 89 vzorků koakálních výtěrů odebraných z odstřelů kachen v období mezi 22. – 29.9.2006 z lokality *Starý rybník* byly negativní na přítomnost chřipkového viru. Byla použita metoda izolace RNA pomocí Qiagenu a současně zopakována metoda izolace pomocí Trizolu u 56 vzorků. Přepsání do cDNA bylo provedeno pomocí náhodných hexanukleotidů i specifického primeru U12. Byla provedena negativní kontrola a současně pozitivní kontrola s vzorkem A/H5N1/dk./Viet. (**Obr. 9**)

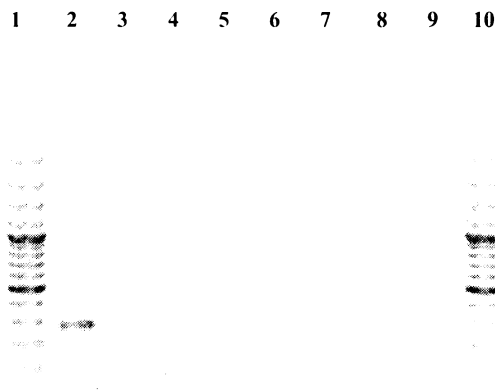


Obr. 9: Typizace chřipky

Naneseno 5 μ l amplifikátu, slot 1 – molekulární standard 100bp (Fermentas). Slot 7, pozitivní kontrola, očekávaná velikost amplifikátu 244 bp, ostatní sloty – negativní.

6.3.4 Monitoring vzorků – stanoviště Nábřeží Hlávkův most

Všech 68 fekálních vzorků sebraných v Praze v okolí Nábřeží u Hlávkova mostu bylo negativních. Pro zjednodušení procedury izolace RNA a následně i tvorby cDNA byly vzorky, po rozlyzování v lyzačním pufru (Qiagen), po 10-ti smíseny. Jeden ze směsných vzorků byl vytvořen 2x a jedna z dvojic obsahovala i příměs rozlyzovaného standardu A/H5N1/dk./Viet. Tvorba cDNA probíhala pomocí náhodných hexanukleotidů. PCR probíhala za standardních podmínek. Pozitivně vyšel pouze standard A/H5N1/dk./Viet. a vzorek, k němuž byl tento standard přimíchán jako pozitivní kontrola (**Obr. 10**).

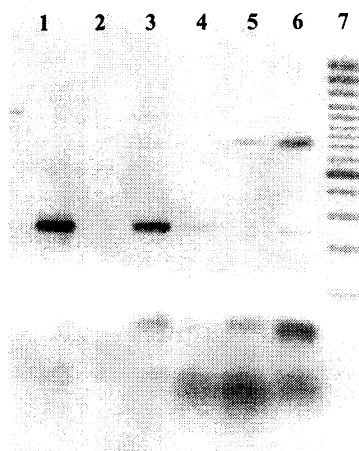


Obr. 10: Typizace chřipky – Nábřeží H.Most

Naneseno 5 μ l amplifikátu, slot 1 a 10 – molekulární standard 100bp (Fermentas). Slot 2, pozitivní kontrola standard A/H5N1/dk./Viet, očekávaná velikost amplifikátu 244 bp, slot 9 – negativní kontrola, ostatní sloty – negativní.

6.3.5 Monitoring vzorků – stanoviště rybníky Hluboká nad Vltavou

Další oblastí pro odběr vzorků bylo okolí Hluboké nad Vltavou. Zde bylo 27.4.2006 provedeno odebrání kloakálního výtěru 20-ti kachnám (*Anas platyrhynchos*), oblast - rybník *Naděje*. Jeden vzorek byl pozitivní na přítomnost *Influenza A viru* (**Obr. 11**). Další subtypizací byl potvrzen hemagglutinin H3. Byla použita metoda izolace RNA pomocí Qiagenu a přepsání do cDNA bylo provedeno pomocí náhodných hexanukleotidů. Byla provedena negativní kontrola a současně pozitivní kontrola s vzorkem A/H5N1/Viet.



Obr. 11: Subtypizace chřipky H3– Hluboká n. Vlt.

Naneseno 5 µl amplifikátu, slot 7 – molekulární standard 100bp (Fermentas). Slot 6 pozitiv – očekávaná velikost 722bp, slot 5 pozitivní vzorek – multiplex primery, pozitivní, slot 4, slot 3 typizace vzorku, matrix gen očekávaná velikost amplifikátu 244 bp, slot 2- negativní kontrola. Slot 1 – pozitivní kontrola, matrix gen A/H5N1/dk./Viet.

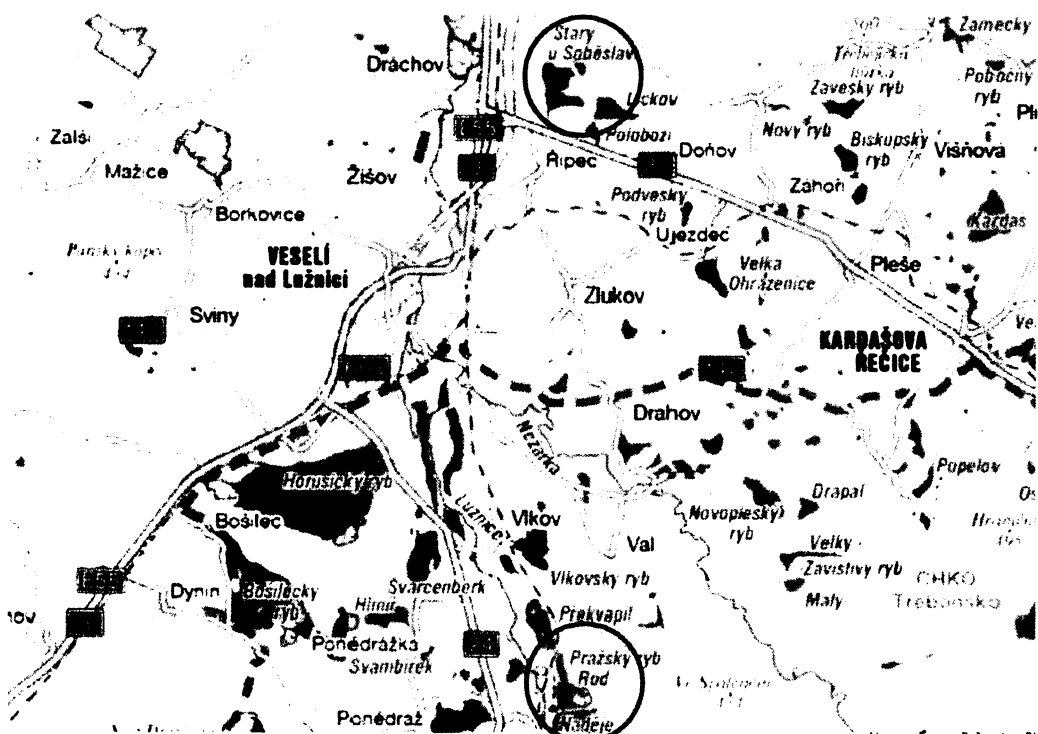
6.3.6 Monitoring vzorků – stanoviště rybníky Soběslav

V oblasti rybníků *Starý u Soběslavi*, *Volovský*, *Naděje*, *Samokoly* a *Nový u Mezné* bylo na hnízdech, mezi 16.5.2007 a 15.7.2007, odebráno 12 vzorků kloakálních a naso-faryngeálních výtěrů (**Tab. 5**).

Číslo	Druh	Datum	V ^I	Lokalita - rybník	Subtyp
H-060101	<i>Aythya ferina</i>	15.6.2006	K	Starý u Soběslavi	H3
H-600102	<i>Anas platyrhynchos</i>	17.6.2006	K	Vlkovský	-
H-600103	<i>Aythya fuligula</i>	17.6.2006	K	Vlkovský	-
H-600104	<i>Aythya ferina</i>	18.6.2006	K	Starý u Soběslavi	H3
H-600105	<i>Aythya ferina</i>	19.6.2006	K	Starý u Soběslavi	H3
H-600106	<i>Anas platyrhynchos</i>	1.7.2006	K	Naděje	H3
H-600107	<i>Anas platyrhynchos</i>	1.7.2006	N	Naděje	-
H-600108	<i>Aythya fuligula</i>	1.7.2006	K	Samokoly	-
H-600109	<i>Aythya fuligula</i>	2.7.2006	K	Starý u Soběslavi	-
H-600110	<i>Aythya fuligula</i>	2.7.2006	K	Nový u Mezné	-
H-600111	<i>Aythya fuligula</i>	8.7.2006	N	Naděje	-

Tab.5.: Vzorky kloakálních a naso-faryngeálních výtěrů odebrané v oblasti rybníku na Soběslavsku

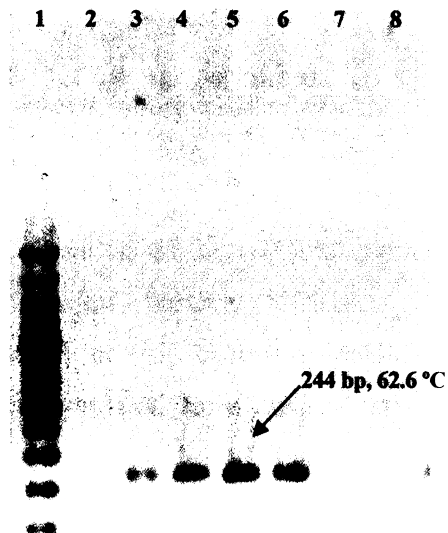
I: K – kloakální výtěr, N – naso-pharyngeální výtěr



Obr.12.: Mapa rybníků v okolí Soběslavi a Veselí nad Lužnicí s vyznačením nálezu pozitivních vzorků chřipky H3 u *Aythya ferina*.

- červeně vyznačeny rybník Naděje a rybník Starý u Soběslavi s pozitivními nálezy chřipkového viru H3

U 4 vzorků v oblasti rybníka *Naděje* a *Starý u Soběslavi* byl potvrzen chřipkový virus, subtyp H3 (Obr. 12).



Obr. 13: Gradientová PCR amplifikace
Zleva sloty: Molekulární standard 100 bp (Fermentas), sloty zleva (2-7) 70 °C, 68.6 °C, 66.2°C, 62.6 °C, 57,6 °C, 54 °C, 51.5 °C

6.4 Gradientová PCR amplifikace

Při PCR amplifikaci je zvolená annealingová teplota jeden z nejdůležitějších faktorů a odvisí od ní zda se nahybridizují zvolené primery. Z tohoto důvodu jsem vyzkoušel již pozitivní vzorky otestovat na nejvhodnější annealingovou teplotu pomocí teplotně-gradientové PCR amplifikace. Na cykleru (Biorad, USA) jsem nastavil hodnoty pro krajní teploty annealingu, a to od 50 °C do 70 °C. Cykler automaticky vypočetl teploty uvnitř rozsahu a rozdělil na 8 teplot, při kterých bude probíhat annealing při

PCR. Teploty annealingu byly 50 °C, 51.5 °C, 54 °C, 57.6 °C, 62.6 °C, 66.2 °C, 68,6 °C a 70 °C – nastavený čas 1 minuta. Ostatní teploty a časy odpovídaly standardní PCR, tedy 94 °C pro denaturaci 30 sekund, a 72 °C pro syntetickou fázi 1 minuta. Byla použita standardní PCR směs, 1 µl templátu vzorku standardu A/H5N1/dk./Viet. a primery pro typizaci chřipky M52C / M523R (Fouchier et al., 2000). Počet cyklů byl 35. Jak vyplývá z gelu, po obarvení ethidium-bromidem a prosvícení UV lampou, nejlepšího výtěžku amplifikátu bylo dosaženo při teplotě 62.6 °C (Obr. 13).

6.5 Vektor H5- pCR[®] 4-TOPO[®]

Z vytvořené cDNA jsem naamplifikoval DNA fragmenty za použití specifických primerů. Pro hemagglutinin jsem použil dvojici HF-18 a HR-20 a pro neuraminidázu dvojici NF-20 a NR-20. Primery jsem sestavil na základě porovnání dvaceti vybraných hemagglutininů, různých sérotypů a vyhledal konzensus sekvence HF-18: **AGCAAAAGCAGGGGWWW**, HR-20: **AGCAAAAGCAGGGGWWW** pro všechny typy hemagglutininu. Pro neuraminidázu jsem postupoval stejně. Vycházel jsem z konzervativní sekvence počátku a konce (U12 a U13) k níž bylo přidáno 6-8 bazí, z nichž některé byly částečně degenerované (Obr. 14).

H1	<u>AGCAAAAGCAGGGGATAATCAAATCAATCGAG</u> ATG
H3	<u>AGCAAAAGCAGGGGATATTTTCATTAATC</u> ATG
H5	<u>AGCAAAAGCAGGGGTATAATCTGTCAA</u> ATG
H7	<u>AGCAAAAGCAGGGGATACAAA</u> ATG

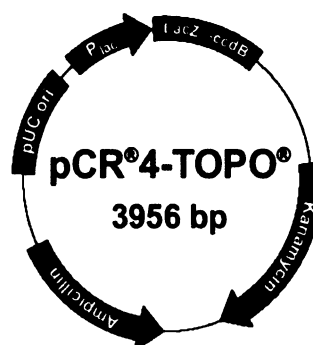
HF-18	<u>AGCAAAAGCAGGGGWWW</u>

Obr. 14: Concensus sekvence 3'UTR hemagglutininu

Čtyři náhodně vybrané sekvence, podtrženě zvýrazněná sekvence U12, v rámečku iniciační triplet ATG, „forward“ primer HF-18 pro amplifikaci Hemagglutininu s degenerovanými nukleotidy. Zpracováno programem BioEdit v.7.0.4.1. (Hall, 1999).

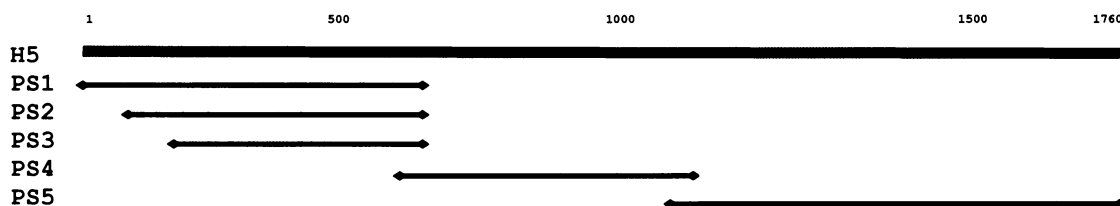
produktem H5-pCR[®] 4-TOPO[®] jsem transformoval kompetentní bakterie TOP10. Selekcí jsem prováděl na LB agarovém médiu s ampicilinem (100 mg/ml). Kolonie bakterií, které do 24 hodin narostou, jsou pozitivní klony, neboť při neuzavření plazmidu nedojde k jeho replikaci a nenavodí se tak rezistence k antibiotiku. Na Petrino misce vzniklo obvykle 5 – 30 kolonií.

PCR produkt po proběhlé amplifikaci jsem naligoval do vektoru pCR[®] 4-TOPO[®] (Obr. 15). Navázání do otevřeného vektoru probíhá za účasti terminálně připojené topoizomerázy, která spojí úsek fragmentu. Vzniklým



Obr. 15: Plazmid pCR[®] 4-TOPO[®]
- vyznačeny jsou místa rezistence, ORI, promotoru a klonovacího místa

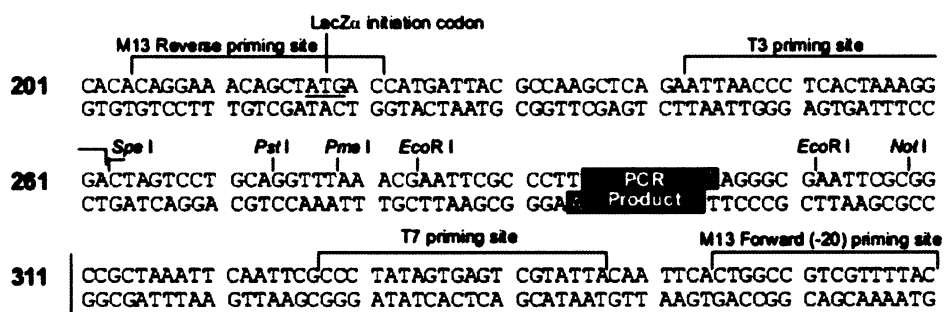
Obdobným způsobem jsem získal amplifikát neuraminidázy pomocí primeru NF-20: AGCRAAAGCAGGAGWTNAAA a NR-20: AGTAGAAACAAGGAGTTTTT. Tyto primery jsem odvodil z několika desítek sekvencí různých subtypů neuraminidázy a obecné konzervované sekvence U12 a U13 3' a 5' koncové UTR oblasti chřipkového vRNA segmentu. Sekvence jsem zpracovával programem BioEdit v.7.0.4.1. (Hall, 1999).



Obr. 16: Sekvence Hemagglutininu a vyznačení dvojic primerů a výsledných PCR produktů

- H5: Hemagglutinin H5; nahore pozice nukleotidů na sekvenci
- PS1: primer set 1 (HF18/FLU-H5-R-003) a výsledný produkt 693 bp červeně
- PS2: primer set 2 (FL-H5-F35/FLU-H5-R-003) a výsledný produkt 658 bp červeně
- PS3: primer set 3 (FLU-H5-F-003/FLU-H5-R-003) a výsledný produkt 544 bp červeně
- PS4: primer set 4 (FL-H5-F620/FL-H5-R1154) a výsledný produkt 534 bp červeně
- PS5: primer set 5 (FL-H5-F1094/HA-R) a výsledný produkt 614 bp červeně

Při zaklonování segmentu do vektoru pCR® 4-TOPO® může dojít k ligaci v orientaci čtecího rámce nebo může být fragment zaligován do vektoru v opačné orientaci. Po zaklonování bylo odebráno více kolonií od každého typu fragmentu a orientace byla určena sekvenčně. Pro sekvenaci byly využity primery M13 „forvard“ a M13 „revers“ (Obr. 17).



Obr. 17: Sekvence plazmidu pCR® 4-TOPO® s místem inkorporace PCR produktu - vyznačené jsou sekvence „forvard“ i „reverse“ primeru M13 pro následnou sekvenaci.

Celkově jsem získal 6 klonů s různě velkými fragmenty hemagglutininu (Obr. 16) a M genu. Klony nesou fragmenty různé délky, které vznikly po amplifikaci s požadovanými primery a pokrývají celý sekvenční úsek genu hemagglutininu.

Izoláty bakterií s požadovaným plazmidem jsem uchoval v konzervačním médiu (50% LB médium + 50% glycerín) při -84 °C (Tab.6).

Označení	Název klonu	Velikost fragmentu	Zdroj	Gen
5-18-693	<i>H5-pCR^(R)TOPO^(R):18-693</i>	693 bp	A/H5N1/dk./Viet.	H5
5-35-693	<i>H5-pCR^(R)TOPO^(R):35-693</i>	658 bp	A/H5N1/dk./Viet.	H5
5-149-693	<i>H5-pCR^(R)TOPO^(R):149-693</i>	544 bp	A/H5N1/dk./Viet.	H5
5-620-1154	<i>H5-pCR^(R)TOPO^(R):620-1154</i>	534 bp	A/H5N1/dk./Viet.	H5
5-1094-1708	<i>H5-pCR^(R)TOPO^(R):1094-1708</i>	614 bp	A/H5N1/dk./Viet.	H5
M-52-253	<i>M-pCR^(R)TOPO^(R):52-253</i>	201 bp	A/H5N1/dk./Viet.	M

Tab.6.: Seznam zaarchivovaných vzorků

7. DISKUZE

7.1 Srovnání izolace vRNA chřipkového viru

Ve většině starších prací bylo použito pro izolaci vRNA metodu pomocí Trizolu. Z takto vyizolované vRNA z kloakálního výtěru či fekálního vzorku byla úspěšně prokázána přítomnost nebo nepřítomnost viru. Ani u jednoho z 62 vzorků jsem nevyizoloval takové množství virové RNA, abych byl schopen (pomocí TR-PCR) prokázat virus. Důvodů může být několik:

1) přestože se v literatuře uvádí, že fekální vzorky a kloakální výtěry obsahují velké množství chřipkových virů, tak jejich titer při běžné teplotě klesá na polovinu zhruba po 4 hodinách. Na výsledném množství přítomných virů má podíl prevoz a uchovávání vzorků.

2) metoda pomocí Trizolu je velice účinná a levná, pokud izolujeme RNA například z tkání. V našem případě je však ve výtěru přítomna RNA bakteriální a v minoritním množství nepatrně virové. Pozorovat peletu při přesrážení vzorku je tudíž v tomto případě nemožné.

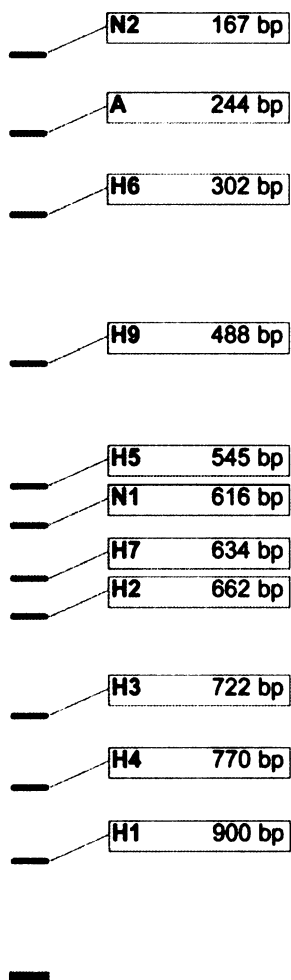
3) Trizol obsahuje fenol a procedura spočívá ve vysrážení proteinů a převedení RNA do vodné fáze. Právě díky povaze vzorku, je ve fekáliích a kloakálním výtěru velké množství aromatických látek, které snadno mohou přecházet z fenolu do vodné fáze. A právě tyto látky mohou hrát inhibiční roli při následné reverzní transkripci. Následné opakované přesrážení pomocí etanolu sice může tento problém řešit, ale každé přesrážení zase snižuje výtěžek.

Izolace vRNA pomocí Qiagenu je standardní metodika (WHO, 2002) pro izolaci RNA chřipkových virů. Metoda dávala spolehlivé výsledky i při opakovaných izolacích RNA z jednoho vzorku.

Pro několik čeledí virů byla odzkoušena metodika pomocí Chelexu-100. S touto látkou se žádná typická izolace neprovádí, pouze je přidána suspenze Chelexu k vzorku. Část (obvykle 2-5 μ l) takto ošetřeného vzorku se bere jako templát pro reverzní transkripci. Chelex vyváže inhibiční látky, které by mohly rušit při následných amplifikacích. Metodu jsem neodzkoušel na dostatečném počtu vzorků, ale zaznamenal jsem pozitivitu v souběžných izolacích pomocí kolonek od Qiagenu. Předpokládám, že by bylo možné využít Chelex -100 přímo při odběru vzorků. Odběrová špejle s vatou by se mohla ihned po kloakálním výtěru ponořit do mikrozkuhavky naplněné suspenzí Chelexu-100 v TE pufru. Při založení časových vzorků by se mohlo prokázat, zda Chelex-100 může účinně vyvázat inhibitory a RNázy a jiné látky způsobující degradaci vzorku. Zajímavé by byly i časové vzorky při různých teplotách. Právě přepravou vzorků z terénu je mnohdy velice náročné dodržet předepsanou teplotu.

7.2 Diagnostika chřipkového viru v populaci kachen

Molekulární metody detekce virové RNA za použití reversní transkripce a následné amplifikace pomocí PCR je jednoduchá a rychlá metoda, ovšem za předpokladu, že máme primery, které dobře nasedají při odpovídající annealingové teplotě a dostatek standardů pro



Obr. 18.: Hypotetické rozdělení PCR amplifikátů M, HA a NA genů pro multiplex detekci.

každý sérotyp. Ty jsou důležité pro souběžné potvrzení pozitivní kontroly. Situaci kolem detekce chřipkových virů komplikuje ještě několik dalších anomálií, jež jsou právě chřipce vlastní. Můžeme bez problémů detekovat zda jsou chřipkové viriony ve vzorku přítomny - tady využíváme celkem konzervativní sekvence Matrix genu. Horší situace je se subtypizací, kde potřebujeme hned několik desítek párů primerů, abychom pokryli celé spektrum sérotypů hemagglutininu (H1-H16) a neuraminidázy (N1-N9). Máme-li již primery pro aviární subtypy hemagglutininu a neuraminidázy, neplatí, že by je bylo možné použít pro detekci subtypů chřipky lidské, velbloudí, prasečí, koňské či delfíní. Tady si můžeme položit otázku, zda je nutné, při potvrzení chřipky (typizace na základě prokázání přítomnosti Matrix genu) detekovat dále u jednotlivých druhů jednotlivé subtypy. Určitě ano a molekulární techniky v tomto směru budou hrát nadále velice důležitou roli. Jedná se především o subtypizaci vysoce patogenních variant hemagglutininu a neuraminidázy (např. H5N1). A právě proto,

že podstatou prokázání pozitivnosti testu je hybridizace molekul syntetického primeru a templátu vzorku, který tvoří nejčastěji cDNA, je možné následnou subtypizací prokázat i

specifické sekvence, zodpovědné například za štěpení hemagglutininu nebo mutace na neuraminidáze umožňující její vyšší aktivitu.

Jelikož jsem neměl veškeré možné varianty (H1 – H16 a N1 – N9) chřipkových aviárních virů, nemohu se 100% jistotou doložit, že žádný z negativních vzorků opravdu chřipkové viry neobsahuje, neboť jsem nemohl srovnávat vzorky se standardy všech subtypů (pozitivní kontrola H5N1/dk./Viet sloužila jen na potvrzení správného průběhu RT-PCR nikoli nasednutí všech primerů).

7.3 Problémy s PCR chřipkové cDNA

Spektrum používaných primerů, navržených jako standard (WHO, 2002; Lee et al., 2001, Fouchier et al., 2000), je co do délky velice různorodé (oligonukleotidy 18 – 36 bází). Je tedy velice problematické navrhnout “one tube” metodiku, kdy je v jedné mikrozkuhavce připravena jak cDNA, tak následná PCR s všemi možnými kombinacemi primerů – a to jak pro 16 párů hemagglutininu tak pro 9 párů neuraminidázy. Zapomenout nemůžeme ani na nutnost detekovat Matrix gen. Pokud jsem přidal do reakční směsi více primerů pro hemagglutinin (3 páry), nedostal jsem již na výsledném gelu žádný pozitiv.

Podobná situace nastala při mixování více primerů pro gen Hemagglutininu a pro gen pro Matrix gen. Pokud jsem však zvolil pouze jeden pár pro Hemagglutinin a primerový pár pro gen Matrix gen (M52C/M253R) dostal jsem diskrétní proužky na gelu, ale byly znatelně slabší. Další kombinace primerů jsem nezkoušel.

Pro účely rutinního monitoringu chřipkových virů by, podle mého názoru, bylo vhodné odzkoušet primery pomocí gradientové PCR na nejvhodnější annealingovou teplotu. Jak jsem zjistil při své práci, celá řada odborných prací a metodik používá různé a stále novější primery pro typizaci a subtypizaci. Tento evoluční proces je zcela pochopitelný, neboť nové mutanty a sérotypy chřipky vznikají. Srovnáním některých popsanych teplot pro PCR a porovnáním s optimální teplotou při gradientové PCR jsem došel k rozdílům v annealingových teplotách až o 6 °C a prokazatelně různým výtěžkům amplifikátů. Metodiku jsem proto upravil.

7.4 Vektor H5-pCR® TOPO®

Zaklonování fragmentů H5, H3 a H1, podle metodiky Invitrogenu probíhá velice rychle a účinně. Z naočkovaných ploten po transformaci buněk narostlo veliké množství kolonií, z kterých bylo snadné vybrat několik desítek, abych obdržel klony fragmentů v obou orientacích. Orientaci zaklonovaných fragmentů bylo možné zjistit také asymetrickým

vyštěpením segmentu s částí plazmidu a restrikcí štěpením tohoto fragmenu. Z časových důvodů jsem raději použil sekvenční potvrzení.

8. ZÁVĚR

Srovnáním různých metod izolací jsem došel k závěru, že nejlepší výsledek dává metodika pomocí RNA izolačních kolonek od Qiagenu a blokování inhibičních látek pomocí Chelexu - 100. Chelexovou metodu bych chtěl i dále využít při sběru vzorků a využít možnosti uchovat delší dobu vzorky před rozkladem. Tato metoda může být využita pro plošné sběry vzorků v terénu.

Detekoval jsem 2 druhy hemagglutininu (H1, H3) u 10-ti druhů vodních ptáků, z nichž 2 druhy (*Netta rufina*, *Aythya ferina*) byly pozitivní na *Influenza A virus*. Z celkového počtu 205 testovaných vzorků jsem potvrdil 8 pozitivních. Žádný z pozitivních vzorků nepocházel z podzimních odstřelů, nicméně nemohu s jistotou tvrdit, že je prevalence virů v jarních a letních vzorcích vyšší než u podzimních. Důvodem je jednak malá množina nasbíraných dat a také to, že většina kachen z podzimních odstřelů pocházela z umělých chovů. Zde je pravděpodobné, že se takto uměle odchované kachny nestačí oro-fekálně nakazit.

Hemagglutinin a M gen ze standardu A/H5N1/dk./Viet jsem zaklonoval do plazmidu *pCR[®]TOPO[®]* pro další experimenty.

9. LITERATURA

- Boom R, Sol CJA, Salimans MMM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PME. 1989. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J.Clin. Microbiol.* **28**, 495-503
- Briese T, Palacios G, Kokoris M, Jabado O, Liu Z, Renwick N, Kapoor V, Casas I, Pozo F, Limberger R, Perez-Berna P, Ju J, Lipkin WI. 2005. Diagnostic System for Rapid and Sensitive Differential Detection of Pathogens – *Emerging Infectious Diseases.* **11**, 310-313
- Claas ECJ, Osterhaus ADME, Beek RV, Jong JCD, Rimmelzwaan GF, Senne DA, Krauss S, Shortridge KF, Webster RG. 1998. Human Influenza A H5N1 Virus Related to a Highly Pathogenic Avian Influenza Virus – *Lancet.* **351**, 472-477
- Cooper LA, Subbaro K. 2000. A Simple Restriction Fragment Length Polymorphism-Based Strategy That Can Distinguish the Internal Genes of Human H1N1, H3N2 and H5N1 Influenza A Viruses – *Journal of Clinical Microbiology.* **38**, 2579-2583
- Couceiro JN, Paulson JC, Baum LG. 1993. Influenza virus strain selectively recognize sialyloligosaccharides on human respiratory epithelium; the role of the host cell in selection of hemagglutinin receptor specificity - *Virus Research.* **29**, 155 - 165
- Cox NJ, Neumann G, Donis RO, Kawaoka Y. 1998. Virology: Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections. *London: Oxford University Press.* **Vol. 1**, 634-680.
- Elden LJR, Kraaij MGJ, Nijhuis M, Hendriksen KAW, Dekker AW, Rozenberg-Arska M, Loon AM. 2002. Polymerase Chain Reaction Is More Sensitive than Viral Culture and Antigen Testing for the Detection of Respiratory Viruses in Adults with Hematological Cancer and Pneumonia – *Clinical Infectious Diseases.* **34**, 177-183
- Fouchier RA, Bestebroer TM, Herfst S, Kemp LVD, Rimmelzwaan GF, Osterhaus ADME. 2000. Detection of Influenza A Viruses from Different Species by PCR Amplification of Conserved Sequences in the Matrix Gene – *Journal of Clinical Microbiology.* **38**, 4096-4101

- Fouchier RA, Munster V, Wallensten A, Bestebroer TM, Herfst S, Smith D, Rimmelzwaan GF, Olsen B, Osterhaus ADME. 2004. Characterization of Novel Influenza A Virus Hemagglutinin Subtype (H16) Obtained from Black-Headed Gulls – *Journal of Virology*. **79**, 2814-2822
- Gibbs MJ, Armstrong JS, Gibbs AJ. 2001. The haemagglutinin gene, but not the neuraminidase gene, of 'Spanish flu' was a recombinant - *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, **356**, 1845 – 1855
- Goto H, Kawaoka Y. 1998. A Novel Mechanism for the Acquisition of Virulence by a Human Influenza A Virus – *PNAS*. **95**, 10224-10228
- Grondahl B, Puppe W, Hoppe A, Kuhne I, Weigl JAI, Schmitt HJ. 2004. Rapid Identification of Nine Microorganisms Causing Acute Respiratory Tract Infections by Single-Tube Multiplex Reverse Transcription-PCR: Feasibility Study – *Journal of Clinical Microbiology* **37**, 1-7
- Hale AD, Green J, Brown DWG. 1996. Comparison of four RNA Extraction Methods for the Detection of Small Round Structured Viruses in Faecal Specimens – *Journal of Virological Methods* **57**, 195 – 201
- Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT - *Nucl. Acids. Symp. Ser.*, **41**, 95-98.
- Hatta M, Halfmann P, Wells K, Kawaoka Y. 2002. Human Influenza A Viral Genes Responsible for the Restriction of Its Replikation in Duck Intestine – *Virology*. **295**, 250-255
- Chan KH, Maldeis N, Pope W, Yup W, Ozinskas A, Gill J, Seto WH, Shortridge KF, Peiris JSM. 2002. Evaluation of the Directigen FluA+B Test for Rapid Diagnosis of Influenza Virus Type A and B – *Journal of Clinical Microbiology* **40**, 1675-1680
- Choi YK, Goyal SM, Kang SW, Farnham MW, Joo HS. 2002. Detection and subtyping of swine influenza H1N1, H1N2 and H3N2 viruses in clinical samples using two multiplex RT-PCR assays – *Journal of Virological Methods*. **102**, 53-59

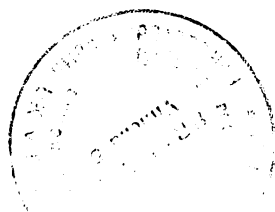
- Ilyushina NA, Govorkova EA, Webster RG. 2005. Detection of Amantadine-resistant Variants Isolated in North America and Asia – *Virology* **341**, 102-106
- Ito T, Suzuki Y, Takada A, Kawamoto A, Otsuki K, Masuda H, Yamada M, Suzuki T, Kida H, Kawaoka Y. 1997. Differences in Sialic Acid – Galactose Linkages in the Chicken Egg Amnion and Allantois Influence Human Influenza Virus Receptor Specificity and Variant Selections - *Journal of Virology*. **71**, 3357 – 3362
- Ito T, Couceiro JN, Kelm S, Baum G, Krauss S, Castrucci MR, Donatelli I, Kida H, Paulson JC, Webster RG, Kawaoka Y. 1998. Molecular Basis for the Generation in Pig of Influenza A Viruses with Pandemic Potential – *Journal of Virology*, **72**, 7367 - 7373
- Jansen RW, Siegl G, Lemon SM. 1990. Molecular epidemiology of human hepatitis A virus defined by an antigen-capture polymerase chain reaction method. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 2867 – 2871
- Jiang X, Wang M, Graham DY, Estes MK. 1992. Detection of Norwalk virus in stools by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* **30**, 2529-2534
- Klenk HD, Garten W. 1994. Host Cell Proteases Controlling Virus Pathogenicity – *Trends in Microbiology*. **2**, 39-43
- Lamb RA, Horvath CM. 1991. Diversity of Coding Strategies in Influenza Viruses – *Trends in Genetics*, **7**, 261 – 266
- Lamb RA, Krug RM. 2001. Orthomyxoviridae: the viruses and their replication, 1487-1531. In Knipe DM, Howley PM (ed.), *Fields virology*, 4th ed. Lippincott/The Williams & Wilkins Co., Philadelphia, Pa.
- Lakadamyali M, Rust MJ, Zhuang X. 2004. Endocytosis of Influenza Viruses – *Microbe and Infection* **6**, 929-936
- Lee MS, Chang PCh, Shien JH, Cheng MCh, Shieh HK. 2001. Identification and Subtyping of Avian Influenza Viruses by Reverse Transcription-PCR – *Journal of Virological Methods* **97**, 13-22

- Marschall M, Schuler A, Boswald Ch, Helten A, Hechtfisher A, Lapatschek M, Meier-Ewert H. 1995. Nucleotide-specific PCR for molecular virus typing. – *Journal of Virological Methods*. **52**, 169-174
- Matrosovich MN, Zhau N, Kawaoka Y, Webster R. 1999. The Surface Glycoproteins of H5 Influenza Viruses Isolated from Humans, Chickens and Wild Aquatic Birds Have Distinguishable Properties – *Journal of Virology*, **73**, 1146 – 1155
- Matrosovich MN, Matrosovich TY, Gray T, Roberts NA, Klenk HD. 2004. Human and Avian Influenza Viruses Target Different Cell Types in Cultures of Human Airway Epithelium – *PNAS USA*, **101**, 4620 - 4624
- Muir P, Nicholson F, Jhetam M, Neogi S, Banatvala JE. 1993. Rapid diagnosis of enterovirus infection by magnetic bead extraction and polymerase chain reaction detection of enterovirus RNA in clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* **31**, 31-38
- Munoz ET, Deem MW. 2005. Epitope Analysis for Influenza Vaccine Design – *Vaccine*, **23**, 1144 – 1148.
- Nakamura K, Compans RW. 1979. Biosynthesis of the Oligosaccharides of Influenza Virus Glycoproteins – *Virology*, **93**, 31 – 47
- Nakamura K, Compans RW. 1978. Glycopeptide Components of Influenza Viral Glycoproteins – *Virology*, **86**, 432 - 442
- Neumann G, Kawaoka Y. 2001. Reverse Genetics of Influenza Virus – *Virology*. **287**, 243 – 250
- Neumann G, Watanabe T, Ito H, Watanabe S, Goto H, Gao P, Hughes M, Perez DR, Donis R, Hoffmann E, Hobom G, Kawaoka Y. 1999. Generation of Influenza A Viruses Entirely from Cloned c-DNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**, 9345-9350
- Ng EKO, Cheng PKC, Ng AYY, Hoang TL, Lim WWL. 2005. Influenza A H5N1 Detection – *Emerging Infectious Diseases*. **11**, 1301-1305
- Pachucki CT, Khurshid MA, Nawrocki J. 2004. Utility of Reverse Transcriptase PCR for Rapid Diagnosis of Influenza A Virus Infection and Detection of Amantadin-Resistant Influenza A Virus Isolates – *Journal of Clinical Microbiology*. **42**, 2796-2798

- Paulson JC. 1985. Interaction of Animal Viruses with Cell Surface Receptors – *Virology*, **140**, 131 – 219
- Payungporn S, Chutinimikul S, Chaisingh A, Damrongwantanapokin S, Nuansrichay B, Pinyochon W, Amosin A, Donis RO, Theamboonlers A, Poovorawan Y. 2006. Discrimination between Highly Pathogenic and Low Pathogenic H5 avian Influenza A Viruses – *Emerging Infectious Diseases*. **12**, 700-701
- Poddar KP. 2002. Influenza virus types and subtypes detection by single step single tube multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and agarose gel electrophoresis – *Journal of Virological Methods*. **99**, 63-70
- Poompusta K, Kittel Ch, Egorov A, Ernst W, Grabherr R. 2003. Generation of Recombinant Influenza Virus Using Baculovirus Delivery Vector. *Journal of Virological Methods*, **110**, 111-114
- Rimmelzwaan GF, Riel Dv, Baars M, Bestebroer TM, Amerongen Gv, Fouchier RAM, Osterhaus ADME, Kuiken T. 2006. Influenza A Virus (H5N1) Infection in Cats Causes Systematic Disease with Potential Novel Routes of Virus Spread within and between Hosts – *Immunopathology and Infectious Diseases*, **168**, 176 - 183
- Roberts PC, Lamb RA, Compans RW. 1998. The M1 and M2 Proteins of Influenza A Virus Are Important Determinants in Filamentous Particle Formation – *Virology*, **240**, 127 - 137
- Rohm C, Zhou N, Suss J, Mackenzie J, Webster RG. 1996. Characterization of a Novel Influenza Hemagglutinin, H15: Criteria for Determination of Influenza A Subtypes – *Virology*. **217**, 508-516
- Rudenko N, Golovchenko J, Němec J, Volkaert J, Mallátová 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, 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

- Simonsen L, Clarke MJ, Williamson DF, Stroup N, Arden H, Schonberger LB. 1997. The Impact of Influenza Epidemics on Mortality: Introducing a Severity Index – *American Journal of Public Health*, **87**, 1944 - 1950
- Spackman E, Senne DA, Myers TJ, Bulaga LL, Garber LP, Perdue ML, Lohman K, Daum LT, Suarez DL. 2002. Development of a Real-Time Reverse Transkriptase PCR Assay for Type A Influenza Virus and the Avian H5 and H7 Hemagglutinin Subtypes – *Journal of Clinical Microbiology*. **40**, 3256-3260
- Spackman E, Stallknecht DE, Slemons RD, Winkler K, Suarez DL, Scott M, Swayne DE. 2005. Phylogenetic Analyses of Type A Influenza Genes in Natural Reservoir Species in North America Reveals Genetic Variation - *Virus Research*, **114**, 89 - 100
- Stockton J, Ellis JS, Saville M, Clewley JP, Zambon MC. 1998. Multiplex PCR for Typing and Subtyping Influenza and Respiratory Syncytial Viruses – *Journal of Clinical Microbiology*. **36**, 2990-2995
- Suarez DL, Perdue ML. 1998. Multiple Alignment Comparison of the Non-structural Genes of Influenza A viruses – *Virus Research*, **54**, 59 - 69
- Szymkowiak Ch, Kwan WS, Su Q, Toner TJ, Shaw AR, Youil R. 2003. Rapid Method for the Characterization of 3 and 5 UTRs of Influenza Viruses – *Journal of Virological Methods*. **107**, 15-20
- Tian G, Zhang S, Li Y, Bu Z, Liu P, Zhou J, Li Ch, Shi J, Yu K, Chen H. 2005. Protective Efficacy in Chickens, Geese and Duck of an H5N1-inactivated Vaccine Developed by Reverse Genetic – *Virology* **341**, 153-162
- Vines A, Wells K, Matrosovich M, Castrucci MR, Ito T, Kawaoka Y. 1998. The Role of Influenza A Virus Hemagglutinin Residues 226 and 228 in Receptor Specificity and Host Range Restriction – *Journal of Virology*. **72**, 7626-7631
- Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R. 1991. Chelex-100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *BioTechniques* **4**, 506-513
- Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Kawaoka Y. 1992. Evolution and Ecology of Influenza A Viruses – *Microbiology Review*, **56**, 152 - 179

- WHO, 2005. Evolution of H5N1 Avian Influenza Viruses in Asia - *Emerging Infectious Diseases*, **11**, 1515 - 1521
- Wilde J, Eiden J, Yolken R. 1990. Removal of inhibitory substances from human fecal specimens for detection of group A rotaviruses by reverse transcriptase and polymerase chain reaction. *J.Clin. Microbiol.* **28**, 1300-1307
- Wright PF, Webster RG. 2001. Orthomyxoviruses, 1533 – 1579. In Knipe DM, Howley PM (ed.), *Fields virology*, 4th ed. Lippincott/The Williams & Wilkins Co., Philadelphia, Pa.
- Yamada O, Matsumoto T, Nakashima M, Hagari S, Kamahora S. 1990. A new method for extracting DNA or RNA for polymerase chain reaction. *J.Virol.Meth.* **27**, 203-209
- Yuen KY, Chan PKS, Peiris M, Tsang DNC, Que TL, Shortridge KF, Cheung PT, To WK, Ho ETF, Sung R, Cheng AFB. 1998. Clinical features and rapid viral diagnosis of human disease associated with avian influenza A H5N1 virus – *Lancet.* **351**, 467-471
- Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT - *Nucl. Acids. Symp. Ser.*, **41**, 95-98



10. INTERNETOVÉ ZDROJE A POUŽITÉ PROGRAMY

WHO Manual on Animal Influenza Diagnosis and Surveillance. 2002

<http://www.wpro.who.int/NR/rdonlyres/EFD2B9A7-2265-4AD0-BC98-97937B4FA83C/0/manualonanimalaidiagnosisandsurveillance.pdf>

Health information from the National Library of Medicine

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=pubmed>

Program: BioEdit ver. 7.0.4.1.

www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html