

Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovateli. Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně ocitovat.

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Genetika, molekulární biologie a virologie



Bc. Kateřina Kunteová

Paralelní detekce virových agens v patogenezi autoimunitních onemocnění

Highly multiplexed virus detection in research of multifactorial diseases

Diplomová práce

Vedoucí práce:

prof. MUDr. Ondřej Cinek, Ph.D.

Praha, 2018

Charles University
Faculty of Science

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, dne 30. 4. 2018

Bc. Kateřina Kunteová

Poděkování

Ráda bych poděkovala prof. MUDr. Ondřeji Cinkovi, Ph.D. a Mgr. Lence Kramné, Ph.D. za čas, který mi i přes svůj nabitý program věnovali, za trpělivost, cenné rady a odborné vedení této práce. Rovněž děkuji kolektivu Laboratoře molekulární genetiky Pediatrické kliniky FN Motol za rady a přátelské prostředí při práci v laboratoři.

Abstrakt

S celkovým rozvojem metod molekulární genetiky v průběhu let vznikly i nové metody, které lze využít ve virologii. Stále více je využíváno sekvenování nové generace, které umožňuje současně paralelní sekvenaci mnoha vzorků, navíc také umožní rozlišit infekci více virovými typy ve vzorku. Cílem práce bylo vyvinout metodu, kterou by bylo možné genotypizovat všechny známé typy lidských adenovirů, lidských enterovirů, a bakteriofágů, vybraných pro jejich výskyt ve střevě. Metoda využívá sekvenování nové generace.

Prvním krokem při vývoji metody byl návrh primerů, které jsou schopny detekovat všechny známé typy zmíněných virů, pokrývající oblast, která je schopná tyto viry mezi sebou odlišit. Tato metoda byla testována na souboru 47 vzorků lidských adenovirů a 30 vzorků lidských enterovirů se známým sérotypem. Vytvořeny byly také vzorky se dvěma sérotypy v různém poměru. Po amplifikaci cílových částí genomu byly vzorky přečištěny a sekvenovány na přístroji MiSeq, Illumina. Metoda byla dále využita při typizování adenovirů, enterovirů a bakteriofágů v pre-diabetických kohortách DIPP, MIDIA a v kohortě diabetiků z afrických a asijských zemí. Výchozím vzorkem byla RNA/ DNA izolovaná ze vzorku stolice.

Prokázali jsme, že metoda dokáže zachytit všechny testované typy virů, včetně vzorků směsných infekcí dvěma různými typy a to i v případě, že je kvantita jednoho z genotypů až 1000 krát menší, než kvantita druhého. Typizace adenovirů a enterovirů probíhala na vzorcích z kohorty MIDIA: detekováno bylo celkem 7 různých adenovirových typů, nejčastější byl lidský adenovirus 2, dále jsme našli celkem 26 enterovirových typů, z nich byl nejčastější coxsackie virus 2. Dále bylo nalezeno 19 adenovirových infekcí s více než jedním typem a 14 enterovirových infekcí bylo s více než jedním typem. Bakteriofágy byly detekovány a typizovány na vzorcích z kohorty DIPP a kohorty afrických a asijských diabetiků. Nejčastější skupina střevních bakteriofágů v těchto vzorcích byl rod Sk1 virus, následovaným rodem Lambdavirus. Neproklázali jsme výskyt detekovaných rodů bakteriofágů v longitudinálně sbíraných vzorcích. Longitudinálně sledované infekce adenoviry či enteroviry byly většinou krátkodobé a bylo prokázáno střídání sérotypů v rámci jednoho pacienta. Popsaná metoda byla otestována a prokázala schopnost detekce i rozlišení mezi známými typy lidských adenovirů, enterovirů či vybraných bakteriofágů.

Klíčová slova: adenovirus, enterovirus, bakteriofágy, sekvenování nové generace, autoimunitní onemocnění

Abstract

Next generation sequencing, which allows concurrent parallel sequencing of many samples and makes it possible to distinguish the infection from multiple viral types in the sample, is well suited as a detection format for such assays described below. The aim of the thesis was to develop a method that could detect all known types of human adenoviruses, human enteroviruses, and bacteriophages selected for their presence in the intestine. Using the next-generation sequencing.

The first step was to design primers capable of detecting all known types of viruses, covering the area that is capable of distinguishing these viruses. This method was tested on a set of 47 human adenovirus samples and 30 human enterovirus samples of known serotype. Samples with two serotypes in different proportions were also created. After amplification of the target genome, the samples were purified and sequenced on MiSeq, Illumina. The method was further used in the typing of adenoviruses, enteroviruses and bacteriophages in pre-diabetic cohorts of DIPP, MIDIA, and a cohort of diabetics from African and Asian countries. The tested sample was RNA / DNA isolated from the stool specimen.

We have demonstrated that the method is capable to detect all tested virus types, including infections with two different types, even if the quantity of one of the genotype is up to 1000 times lower than the other. Then was the method tested on MIDIA cohort samples: a total of 7 different adenovirus types were detected, the most common was HAdV2. 26 enterovirus types were found, the most common was CVA2. We also found 19 adenovirus infections of more than one type in a sample and 14 enterovirus infections of more than one type. Bacteriophages were detected and method was tested on samples DIPP cohort and samples of African and Asian diabetics. The most common group of intestinal bacteriophages in these samples was the genus Sk1 virus, followed by the Lambdavirus genus.

The described method was tested and show the ability to detect and distinguish between types of human adenoviruses, enteroviruses or selected bacteriophages.

Key words: adenovirus, enterovirus, bacteriophage, new generation sequencing, autoimmune disease

Obsah

<i>Abstrakt</i>	5
<i>Abstract</i>	7
<i>Obsah</i>	8
<i>Seznam zkratek</i>	10
<i>Úvod</i>	11
<i>Cíle práce</i>	12
1. Přehled literatury	13
1.1 Molekulárně-genetické metody ve virologické praxi a využití sekvenování nové generace	13
1.2 Sekvenování nové generace	14
1.2.1 Sekvenování náhodných fragmentů virových genomů	16
1.2.2 Detekce virových fragmentů pomocí hybridizačních sond	18
1.3 Charakterizace vybraných skupin virů	19
1.3.1 Adenovirus	19
1.3.2 Enterovirus	26
1.3.3 Bakteriofágy	32
1.4 Detekce virů u autoimunitních chorob	37
1.4.1 Incidence autoimunitního diabetu a celiakie	37
1.4.2 Překryv genetického rizika T1D a celiakie	38
1.4.3 Víry a T1D	39
1.4.4 Víry a celiakie	40
1.4.5 Bakteriofágy ve střevě	41
2. Materiál a metody	42
2.1 Návaznost prací	42
2.2 Laboratorní přístroje, chemikálie a pomůcky	42
2.3 Návrh primerů k typizaci všech typů adenovirů, enterovirů a nejčastějších střevních bakteriofágů	43
2.3.1 Primery a PCR k typizaci adenoviru	44
2.3.2 Primery a PCR k typizaci enteroviru	49
2.3.3 Primery a PCR k typizaci vybraných bakteriofágů	54
2.4 Testování specifity navržených primerů a PCR	58
2.4.1 Specifikace subjektů a vzorků, jejichž virové genomy byly typizovány pomocí navržené metodiky	59
2.5 Příprava vzorků k NGS	60
2.5.1 Opatření amplikonů indexy	61
2.5.2 Kvantifikace vzorků a normalizace knihoven	63
2.5.3 Kontrola kvality knihovny	63
2.5.4 Sekvenování nové generace	64
2.6 Analýza dat	64
2.7 Fylogenetická analýza	65
3. Výsledky	66
3.1 Testování navržené metodiky pomocí vzorků se známým typem viru	67
3.2 Testování navržené metodiky na vzorcích pre-diabetických kohort MIDIA a DIPP a na vzorcích ze studie případů a kontrol z Afriky a Asie	72
3.2.1 Výsledky pro norskou pre-diabetickou kohortu MIDIA	72

3.2.2	Výsledky subjektů finské pre-diabetické kohorty DIPP a ze studie případů a kontrol z Afriky a Asie.....	81
3.3	Fylogenetické stromy nalezených adenovirů, enterovirů	84
4.	<i>Diskuze</i>	89
5.	<i>Souhm</i>	93
6.	<i>Použitá literatura</i>	94

Seznam zkratek

5'UTR - 5'untranslated region
APC – antigen presenting cell
BAVS - Bacterial and Archaeal Viruses Subcommittee
BLAST - The Basic Local Alignment Search Tool
CAR - coxsackie-adenovirus receptor
CVB – coxsackie virus B
CVA – coxsackie virus A
DSG2 - desmoglein 2
DIPP - Diabetes Prediction and Prevention (predikce a prevence diabetu)
ELISA - Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
EV – enterovirus
FRET - Försterův rezonanční přenos energie
GADA65- glutamic acid decarboxylase 65 autoantibodies (autoprotilátky proti dekarboxyláze kyseliny glutamové (65kDA isoformě)
HAdV – human adenovirus (lidský adenovirus)
HLA - human leukocyte antigen
HPeV – human parechovirus
IA-2 - insulinoma antigen 2
IAA - insulin autoantibodies
IBD - inflammatory bowel disease (zánětlivé onemocnění střev)
ICAM 1 - intercellular adhesion molecule 1
ICA - islet cell autoantibodies
ICTV - International Committee on Taxonomy of Viruses
IDF - The International Diabetes Federation (Mezinárodní federace diabetu)
MIDIA - Miljøårsaker til diabetes type 1 (environmentální spouštěče diabetu 1. typu)
NGS – Next Generation Sequencing (sekvenování nové generace)
PSGL-1 - P-Selectin Glycoprotein Ligand-1
SCARB2 - Scavenger Receptor Class B, 2
T1D – type 1. diabetes
VirCapSeq-VERT - Virome capture sequencing platform for vertebrate viruses
WHO - World Health Organization (Světová zdravotnická organizace)

Úvod

Současný rozvoj metodik paralelního sekvenování přinesl nové přístupy pro detekci virů a jejich genotypizaci. Genotypizace s použitím klasického Sangerova sekvenování přináší omezení, například v neschopnosti detekovat více virových genotypů v jednom vzorku. Metodou sekvenování nové generace lze získat až tisíce sekvencí viru z každého z testovaných vzorků. S takto velkou sekvenační hloubkou lze detekovat několik různých virových genotypů, které jsou navíc ve vzorku přítomny v různé kvantitě.

O tom, že viry mohou spouštět autoimunitní onemocnění jako například diabetes 1. typu či celiakii se hovoří už dlouho (Plot and Amital, 2009; Yeung et al., 2011). Specifická PCR (polymerázová řetězová reakce), která se obvykle používá ke stanovení přítomnosti celého virového rodu, je využívána v mnoha studiích (Yeung et al., 2011), ale nerozlišuje mezi jednotlivými genotypy. Přitom je známo, že konkrétní genotypy enteroviru mohou mít ve vztahu k diabetu 1. typu více rizikový (Laitinen et al., 2014) či naopak protektivní charakter (Tracy et al., 2002). Co se týká souvislosti bakteriofágů a spouštění autoimunitních chorob, asociace zatím nalezena není, nicméně v současné době se intenzivně studuje vliv střevního mikrobiomu, který může být bakteriofágy ovlivněn nepřímo (Muniesa and Jofre, 2014). Výskyt bakteriofágů u autoimunitních onemocnění je oblast zatím velmi málo prozkoumaná. Nevýhodou je velká rozmanitost jejich genomů a tím i jejich složitá typizovatelnost. Nesporná je však jejich funkce v ovlivňování mikrobiální ekologie, diverzity a virulence (Penadés et al., 2015).

V této práci je popsán vývoj metod pro genotypizaci typů adenovirů a enterovirů a pro detekci nejčastějších bakteriofágů lidského střeva. Metodiky mají sloužit ke genotypizaci zmíněných virů při studiu spouštěčů autoimunitních onemocnění, nicméně mohou být použity k množství dalších vědecko-výzkumných účelů.

Cíle práce

Cílem práce bylo vytvořit a optimalizovat metodiku vhodnou pro studium virových genotypů jako spouštěčů autoimunitních chorob, pomocí které by bylo možné detekovat a genotypizovat adenoviry, enteroviry a bakteriofágy ze vzorků stolic. Metoda je založená na přípravě PCR produktů pomocí vhodně navržených primerů a následné paralelní sekvenaci s využitím platformy Illumina.

1. Přehled literatury

1.1 Molekulárně-genetické metody ve virologické praxi a využití sekvenování nové generace

V rutinní virologické praxi se k přímé detekci virů používají převážně metody detekující virový genom, založené na PCR, ty jsou ceněné pro jejich sensitivitu, specificitu a rychlost, výsledek může být znám ještě tentýž den. Buněčné kultury se pro běžnou klinickou praxi nepoužívají. Kromě zdlouhavého procesu kultivace a náchylnosti ke kontaminacím je také problematické, že ne všechny viry jsou na buněčných kulturách schopné růst (hepatitida B, hepatitida C, průjmové viry) (Storch et al., 2000). Na rozdíl od klinické praxe však kultivační metody přinášejí možnost virus izolovat a následně zkoumat (Wiedbrauk and Farkas, 1995).

Detekce virového genomu probíhá v rámci klinického vyšetřování často ve formě multiplexu. Gonzalez and McElvania, 2018, ve svém článku shrnují nejnovější postupy pro klinickou diagnostiku patogenů u pediatrických pacientů. Multiplexní panely umožňují testování širokého spektra patogenů v jediném testu. Některé metody kombinují detekci virů a bakterií. Zajišťují tak rychlou a přesnou detekci patogenů, což vede ke zkrácení doby, kdy je pacientovi poskytnuta optimální léčba. Bylo vyvinuto několik protokolů pro multiplexní detekci patogenů, například: pro respirační onemocnění, gastrointestinální onemocnění či infekce nervového systému. Jedním z panelů je „bioMe´rieux FilmArray Respiratory Panel“, který současně detekuje viry a bakterie lidských respiračních onemocnění: virus chřipky, respirační syncytiální virus, virus parainfluenzy, metapneumovirus, rhinovirus, adenovirus, koronavirus a bakterie *Bordetella pertussis*, *Chlamydomphila pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*. Panel pro detekci gastrointestinálních patogenů navíc kromě virů a bakterií detekuje i některé parazitické organismy, například „Luminex xTAG Gastrointestinal Pathogen Panel“ detekuje *Cryptosporidium*, *Entamoeba histolytica*, *Giardia* a z virů a bakterií například: adenovirus 40 a 41, norovirus, rotavirus, *Campylobacter spp*, *Salmonella spp*, *E. coli* O157 (Gonzalez and McElvania, 2018).

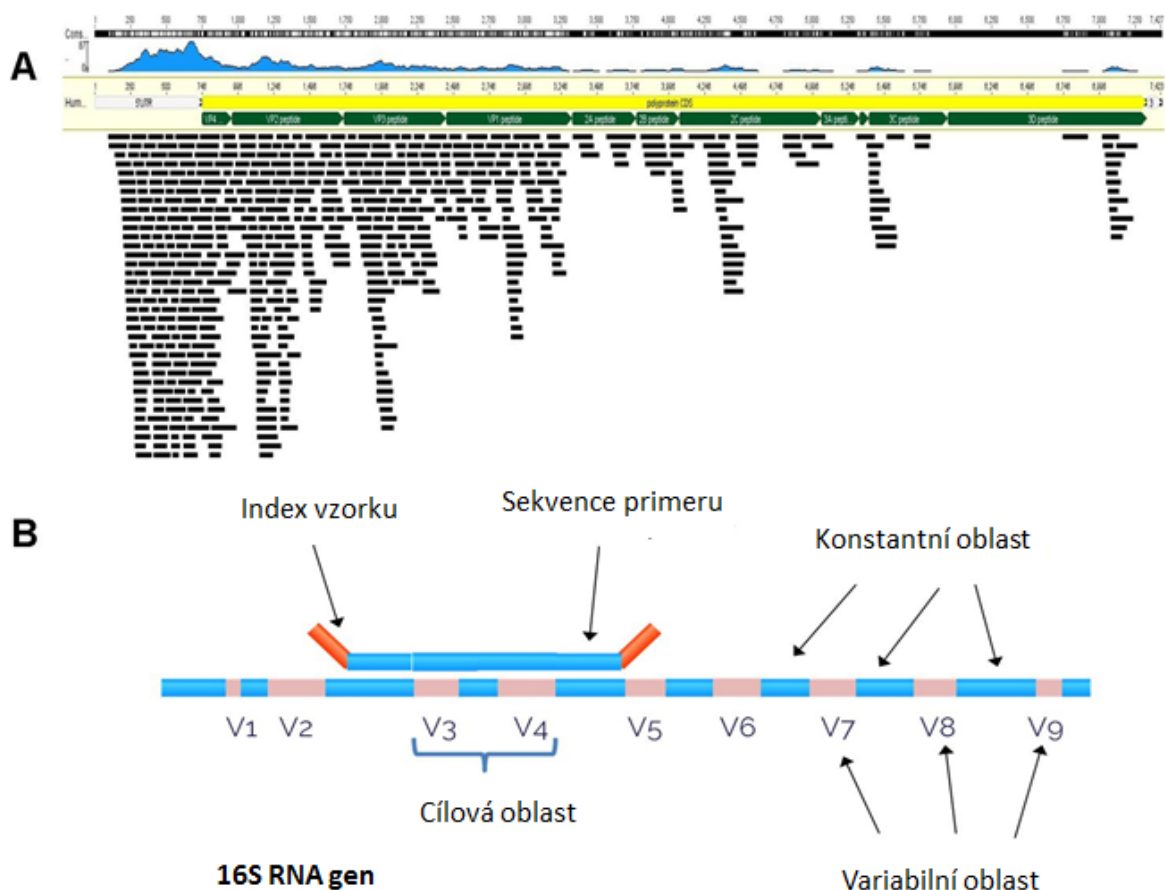
Kromě výše zmíněných metod se v klinické praxi se k bližší identifikaci virového patogenu používá Sangerovo sekvenování, které bylo zavedeno Frederickem Sangerem v roce 1977 (Sanger et al., 1977) a na základě této metody byl v roce 1987 firmou Applied Biosystems vyvinut plně automatizovaný sekvenátor ABI 370 (Prober et al., 1987). Touto metodou jsme schopni získat vždy jednu sekvenci na reakci. V současné době se do popředí zájmu dostává

metoda sekvenování nové generace (next generation sequencing, NGS), která bude blíže popsána v následujících kapitolách. Hlavní rozdíl mezi oběma sekvenčními metodami je počet sekvencí, který se pohybuje mezi tisíci až milióny čtených molekul na jeden NGS běh v závislosti na použitém sekvenátoru. NGS je pro klinickou praxi zatím téměř nepoužitelné, zejména z důvodu nejasné odolnosti k vzájemné kontaminaci mezi vzorky a k nákladům na sekvenování. Rozvoj této metodiky umožnil stanovit celé genomy virových či bakteriálních patogenů a studium jejich vlastností virulence. Kromě toho také umožňuje metagenomické přístupy, které analyzují rozsáhlá mikrobiální společenstva bez nutnosti jejich kultivace, čehož se využívá i při studiu lidského střevního mikrobiomu (Finkbeiner et al., 2008).

1.2 Sekvenování nové generace

Pojem NGS (next generation sequencing) zahrnuje množství různých sekvenačních technologií, které představují především komerční platformy Illumina (Solexa), Roche 454, SOLiD, Heliscope, Ion Torrent a další. Firma 454 Life Sciences byla první, která v roce 2005 uvedla na trh sekvenátor nové generace založený na principu pyrosekvenování (Margulies et al., 2005). Od té doby se NGS metody neustále vyvíjí, snaha je snižovat chybovost, zvyšovat délku čtení, zrychlovat proces sekvenace a snižovat cenu za sekvenování.

NGS se hojně využívá při hledání mutací jako příčin onemocnění u lidí a to sekvenováním všech exonů (exom), nebo jen kandidátních genů (panely s vybranými geny, např. panely pro detekci mutací v genech asociovaných s rakovinou prsu BRCA1, BRCA2 (Park et al., 2017)). V mikrobiologii se NGS využívá nejčastěji pro sekvenování celého genomu konkrétního bakteriálního patogenu (obrázek 1.1 A) a také ve studiích mikrobiomu pomocí genu pro malou ribozomální podjednotku (gen pro 16S rRNA, obrázek 1.1 B) (Sanschagrín and Yergeau, 2014), nebo



Obrázek 1.1 - Nejdůležitější přístupy k přípravě vzorků pro sekvenování nové generace.

A) „shot-gun sekvenování“, sekvenování náhodných fragmentů a **B)** sekvenování PCR ampliconů s různým obsahem, např. 16S sekvenování.

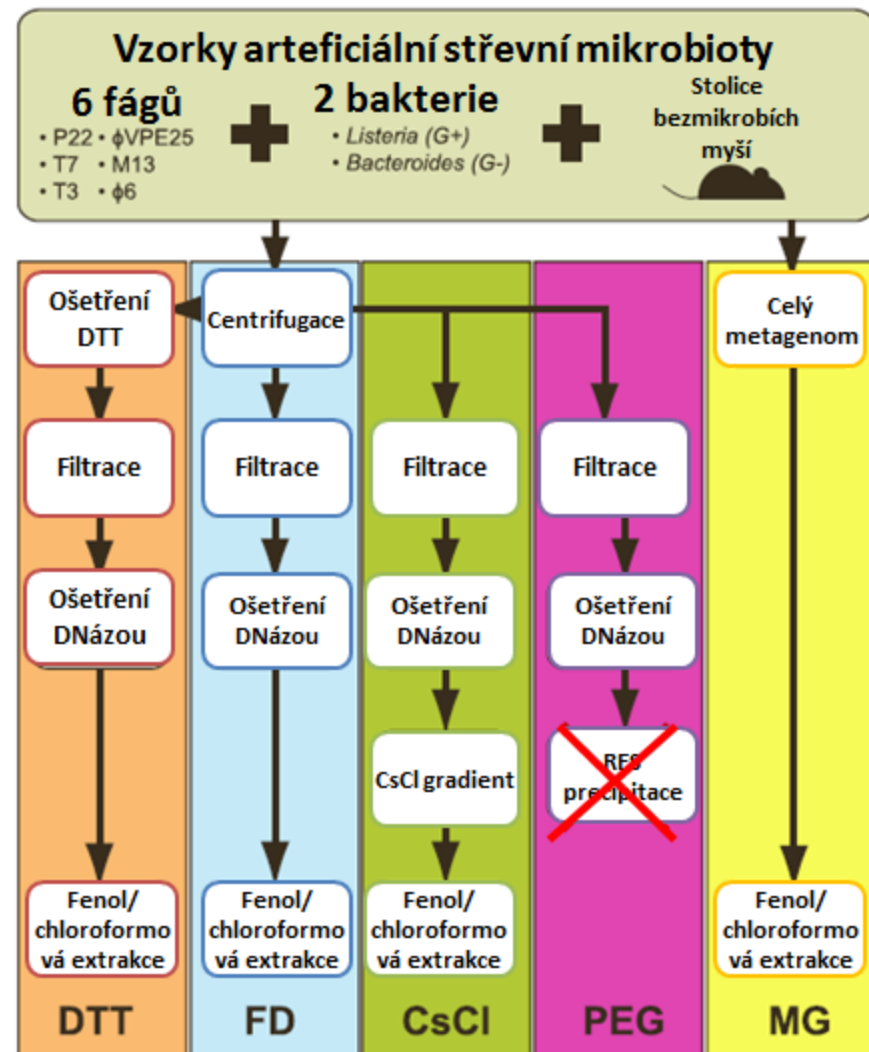
Část **A** byla získána z analýz „shotgun sekvenování“ zpracovávané v Laboratoři molekulární genetiky, 2. LF UK, a vytvořena v programu Geneious (Geneious version (8.1), <https://www.geneious.com>, Kearse et al., 2012), část **B** byla převzata z <https://www.lsciences.com/discovery/applications/genomics/16s-rna-gene-sequencing-landing/16s-gene/> a upravena.

V oblasti virologie se NGS používá nejméně často, hlavně kvůli velké variabilitě virových genomů (neexistuje oblast shodná pro všechny viry, která by se dala použít k jejich charakterizaci, jako gen pro 16S rRNA u bakterií) a poměrně složité metodice přípravy vzorků (viz kapitola č. 1.2.1, sekvenování náhodných fragmentů). Existují zatím dva metodické přístupy využívané pro charakterizaci virů ve vzorku, které budou blíže popsány v kapitolách č. 1.2.1 (sekvenování náhodných fragmentů) a č. 1.2.2 (hybridizační sondy).

1.2.1 Sekvenování náhodných fragmentů virových genomů

Tato metoda umožňuje získat kompletní sekvence virových genomů, pokud se vyskytují v dostatečné kvantitě. Je založena na přípravě náhodných fragmentů nukleových kyselin ze vzorku, jejich amplifikaci, sekvenování pomocí metody NGS a následného bioinformatického skládání sekvencí z NGS do původní sekvence viru (obrázek 1.1 A). Metoda byla použita například pro detekci virů ve vzorcích stolic dětí s akutní paralýzou (která měla jiného původce než poliovirus), nebo pro studium virů ze vzorků stolic dětí s průjemovým onemocněním (Finkbeiner et al., 2008) a studium bakteriofágů v lidském střevě založili na této metodě Oglive et al., 2013 (Ogilvie et al., 2013). Metoda je vhodná pro vzorky s vysokou virovou náloží, jako je například stolice (Victoria et al., 2009).

Klíčovým krokem je proces odseparování virových partikulí ze vzorku za současného odstranění kontaminant, jako jsou například zbytky bakteriálních buněk, přičemž velice záleží na charakteru použitého vzorku. Existují minimálně čtyři přístupy, jak získat ze vzorku co nejvyšší množství viru. Tyto metody shrnuje článek zaměřený na extrakci bakteriofágových genomů ze vzorků stolic (Kleiner et al., 2015) viz obrázek 1.2.



Obrázek 1.2 - Shrnutí různých metod separace virových partikulí ze vzorku.

Metoda „DTT“ shrnuje použití dithiothreitolu (DTT) k degradaci hlenu stolice (který jinak může interferovat s filtrací), filtraci přes 0,45/0,2 µm filtr a použití DNáz. **Metoda „FD“** pak odstranění bakteriálních buněk pomocí filtrace přes 0,45/0,2 µm filtr a následné odstranění volné DNA pomocí DNáz (virové nukleové kyseliny chrání kapsida). **Metoda „CsCl“** zahrnuje filtraci přes 0,45/0,2 µm filtr, použití DNáz, purifikaci virových částic v gradientu chloridu cesného (CsCl) (hustota CsCl při koncentraci 1,6 až 1,8 g/ml je blízká hustotě DNA, po několikahodinové centrifugaci při vysokých otáčkách a vysokém zrychlení se vytvoří koncentrační gradient, na jehož základě je možné odseparovat virové částice od jiných kontaminujících partikulí). **Metoda „PEG“** se skládá z filtrace přes 0,45/0,2 µm filtr, použití DNáz, kondenzace virových částic pomocí polyetylen glykolu (PEG) (PEG se přidává k vychytání molekul vody, čímž dojde k agregaci virů a jejich snadné precipitaci). Ve všech případech jsou nukleové kyseliny extrahovány například pomocí chloroformu. Převzato z (Kleiner et al., 2015).

Poté jsou nukleové kyseliny amplifikovány pomocí náhodných primerů (Kleiner et al., 2015) a sekvenovány. Výsledné sekvence jsou bioinformaticky složeny (obrázek 1.1 A) a identifikovány pomocí databáze NCBI (Finkbeiner et al., 2008). Metoda umožňuje odhalit přítomné viry, aniž bychom předem věděli, jaké očekávat. Předchází potenciálním omezením tradičních metod, jako omezená kultivovatelnost viru v buněčných kulturách. Nevýhodou

metody je její nízká citlivost oproti specifické PCR, není proto zatím využívána pro klinické účely, jako nástroj pro zkoumání rozmanitosti mikroorganismů má však nezastupitelnou roli (Kramná et al., 2015).

1.2.2 Detekce virových fragmentů pomocí hybridizačních sond

Hybridizační sondy jsou založené na návrhu specifických sond, které vycítávají cílové sekvence. Pokud je cílová sekvence ve vzorku přítomná a dojde k hybridizaci, vydává sonda fluorescenční signál. Výsledkem je semikvantitativní detekce, nikoliv však získání konkrétní nahybridizované sekvence.

Martínez et al., 2015, popsali spojení amplifikace pomocí náhodných primerů a „microarray“ technologie pro detekci veškerých virů ze vzorků stolice, což do té doby nebylo běžné, obvykle byly vyvíjeny „microarray“ pro detekci jednoho virového druhu nebo typizaci v rámci druhu (Chizhikov et al., 2002; Lin et al., 2004). Metoda využívá pro amplifikaci virových úseků genomů náhodné primery, zajistí sice amplifikaci širokého spektra virů, ale může snižovat senzitivitu detekce, protože amplifikací veškeré genetické informace se vyřadí pozitivní signál (Martínez et al., 2015).

Virochip, platforma obsahující 19 000 sond odvozených ze všech virových druhů v GenBank byla úspěšně využita pro detekci nových virů epidemií, jako byl SARS (Wang et al., 2003) a pro identifikaci chřipkového viru H1N1 při pandemii v roce 2009 (Greninger et al., 2010).

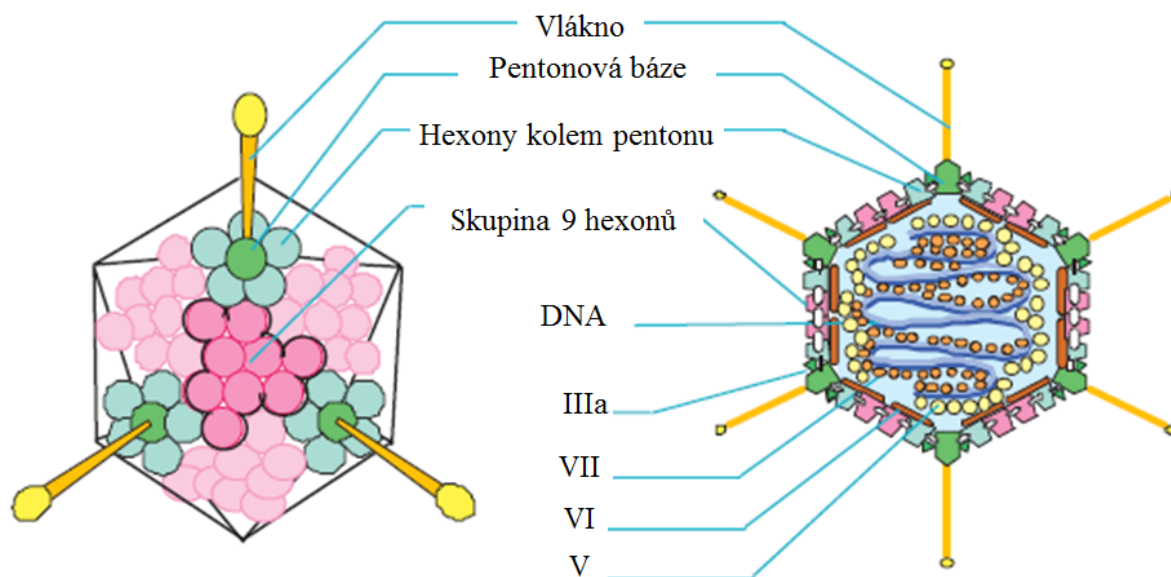
Thomas Briese et al., 2015, navrhli viromovou platformu VirCapSeq-VERT pro zachycení virů obratlovců. Jejich systém zahrnuje přes 2 milióny prób, které pokrývají genomy 207 zástupců virů schopných infikovat obratlovce (tedy i člověka). Oligonukleotidové próby (dlouhé 50-100 nukleotidů) byly vybírány tak, aby reprezentovaly všechny virové taxony obsahující alespoň jeden virus, který infikuje obratlovce. Autoři také deklarují, že VirCapSeq-VERT detekční limit je srovnatelný s detekcí antigenu pomocí RT-PCR v séru, krvi a tkáňových extraktech. Testované vzorky lze buď hybridizovat se sondami každý zvlášť nebo opatřit vzorky pomocí specifických značek a připravit tak multiplexové reakce o více vzorcích najednou. U multiplexové reakce se však projevil snížený detekční limit, pravděpodobně vlivem různých virových náloží u jednotlivých vzorků a tím nerovnoměrná kompetice o sondy (Briese et al., 2015).

1.3 Charakterizace vybraných skupin virů

1.3.1 Adenovirus

Čeď *Adenoviridae* zahrnuje rody *Siadenovirus*, *Atadenovirus*, *Aviadenovirus*, *Ichtadenovirus* a *Mastadenovirus*. V této práci bude blíže specifikován rod *Mastadenovirus*, protože jsou zde zařazeny všechny adenoviry infikující člověka (HAdV).

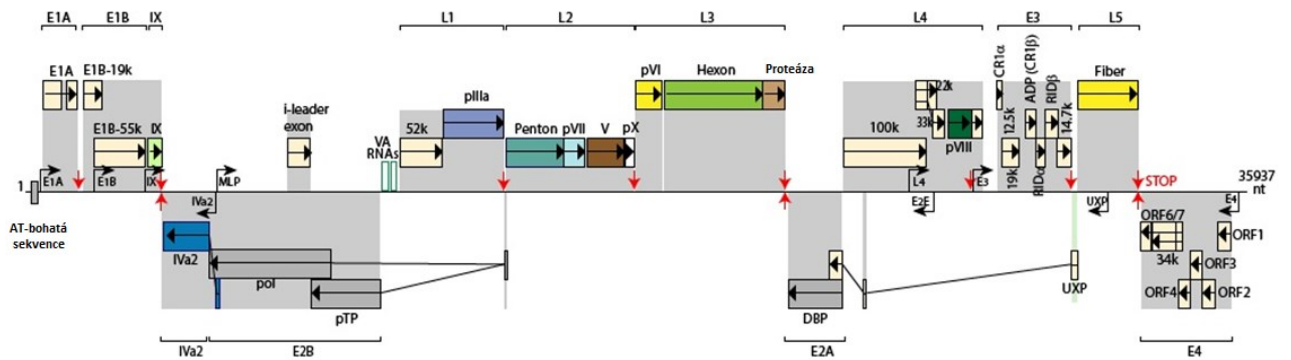
Jsou to neobalené viry o průměrné velikosti 70-90 nm. Jejich ikosahedrání kapsida je tvořena ze tří druhů proteinů – z 240 hexonů a 12 pentonových bazí s centrálním vláknitým proteinem udávající adenovirům jejich specifický vzhled (obrázek 1.3). Jádro virionu („core“) se skládá z polypeptidů a jedné lineární, dvouvláknové DNA - adenovirového genomu. Epitopy na hexonovém proteinu slouží jako cíle neutralizačních protilátek, jsou rozpoznávány cytotoxickými T-lymfocyty a jsou základem pro klasifikaci adenovirů na 51 sérotypů (Ebner et al., 2005). Nově objevené genotypy 52 až 67 byly identifikovány genomickým sekvenováním a změnilly dosavadní kritéria pro typizaci adenovirů (Lion, 2014), což bude popsáno později. Tkáňový tropismus viru je určen vláknitým proteinem („fiber“). Virus vstupuje do buňky po interakci vláknitého proteinu se specifickým buněčným receptorem, který se nachází na hostitelských buňkách. Mezi tyto receptory se řadí buněčný povrchový protein CD46, coxackie-adenovirový receptor (CAR) a buněčný protein pro adhezi desmoglein 2 (DSG2). Dohromady jsou tyto receptory přítomny téměř na všech buněčných typech (Cupelli and Stehle, 2011). Pro sekundární interakci je pak vyžadován buněčný ko-receptor (obvykle molekuly integrinů), na něhož se váže pentonová báze virové kapsidy, tento proces stimuluje vstup adenoviru do hostitelské buňky. Následuje endocytóza viru pomocí klathrinových váčků. Po uvolnění viru z endosomu je virová DNA dopravena skrz jaderné póry do jádra, kde probíhá replikace (Fields et al., 2013).



Obrázek 1.1 - Morfologie virionu.

Kapsida složená z hexonů, vnitřních kapsidových proteinů (VI), pentonovýchází a vláknitých proteinů. Uvnitř virionu jsou proteiny (V, VII) obklopující lineární dsDNA. Převzato z (Strauss and Strauss, 2008).

Velikost genomu lidských adenovirů se pohybuje okolo 36 kbp a celkově genom kóduje ~40 genů. Všechny adenoviry sdílejí podobnou organizaci genomu, ten je rozdělen na oblasti, které odpovídají replikačnímu cyklu viru: pět časných transkripčních jednotek, dvě střední a jedna pozdní (Fields et al., 2013). Transkribována jsou obě vlákna DNA, každá transkripční jednotka má vlastní promotor a kóduje různé mRNA, které vzniknou alternativním sestřihem jednoho lineárního transkriptu (obrázek 1.4). Většina adenovirových mRNA je vytvořena vystřihem jednoho nebo více intronů, obvykle umístěných v 5' nebo 3' nekódující části pre-mRNA. (Zhao et al., 2014). Všechny primární transkripty procházejí dalším sestřihem, uvádí se vznik až 50 různých transkriptů v pozdní fázi infekce (Zhao et al., 2014). Jako první se přepisuje jednotka E1A pomocí E1A promotoru. Časné transkripční jednotky upravují prostředí v buňce tak, aby bylo vhodné k replikaci viru a tlačí buňku do S fáze. Mezi středně časné transkripty patří E2B kódující virovou polymerázu. Pozdní transkripční jednotky jsou označovány jako L1 – L5 a kódují strukturální proteiny. Jednotka E3 se nazývá protein smrti („death protein“). Je exprimována v časné fázi, hojně ale také v pozdní fázi infekce. Její proteiny snižují expresi buněčných proteinů z rodiny TNF (tumor necrosis factor), zastavují apoptózu a obecně modulují buněčnou odpověď na infekci (Fields et al., 2013)



Obrázek 1.2 - Uspořádání adenovirového genomu.

Primární transkripty jsou vyznačeny v závorkách, produkty vzniklé po sestřihu pak v barevných rámečcích s šipkou udávající směr kódující sekvenční. Promotory jsou vyznačeny černou zahnutou šipkou, místa ukončující transkripci pak červenou šipkou.

Lidské adenoviry jsou asociovány s různými typy onemocnění (viz tabulku 1.1).

Tabulka 1.1 - Dosud publikované adenovirové genotypy.

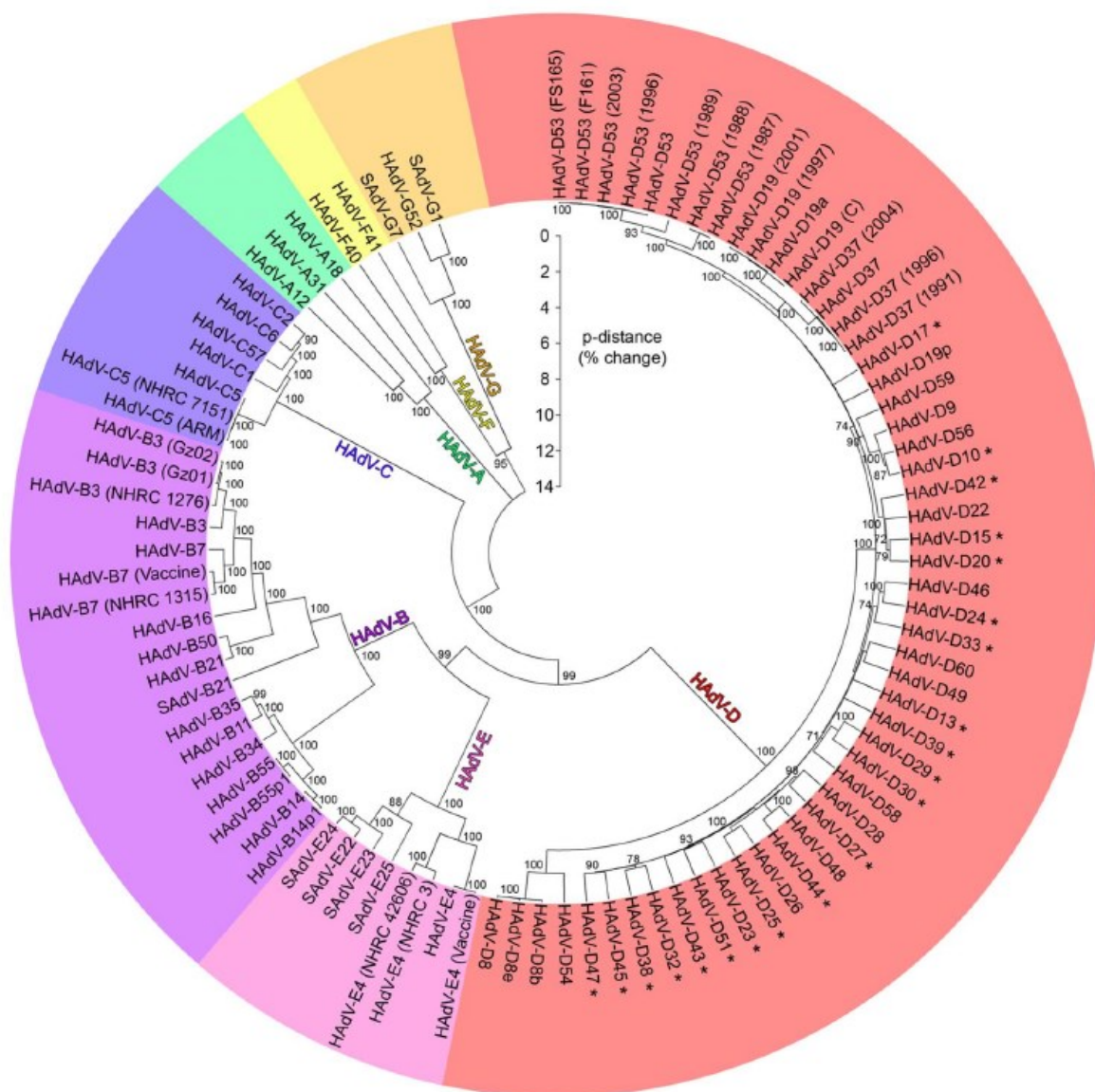
Druhy HAdV (A - G) a s nimi asociovaná klinická onemocnění. Sérotypy 1 až 51 byly identifikovány sérotypizací, genotypy 52 až 67 byly identifikovány genomickým sekvenováním, proto se používá označení genotyp. Převzato z (Lion, 2014)

Lidský adenovirus (druh)	Lidský adenovirus (typ)	Nejčastěji asociované infekce
HAdV - A	12, 18, 31, 61	gastrointestinální, respirační, močových cest
HAdV - B	3, 7, 11, 14, 16, 21, 34, 35, 50, 55, 66	keratokonjunktivitida, gastrointestinální, respirační, močových cest
HAdV - C	1, 2, 5, 6, 57	gastrointestinální, respirační, močových cest
HAdV - D	8–10, 13, 15, 17, 19, 20, 22–30, 32, 33, 36–39, 42–49, 51, 53, 54, 56, 58–60, 63–67	keratokonjunktivitida, gastrointestinální
HAdV - E	4	keratokonjunktivitida, respirační
HAdV - F	40, 41	gastrointestinální
HAdV - G	52	gastrointestinální

Přenos viru se uskutečňuje fekálně-orální cestou, inhalací aerosolů nebo přímým zanesením viru do tkáně v případě očních infekcí. Většina infekcí HAdV se vyskytuje v dětském věku, ale jsou dokumentovány epidemie jak u dětí, tak u dospělých v uzavřených kolektivech. Infekce jsou obvykle mírné a imunitní systém se s nimi ve většině případů vyrovná sám, avšak u

imunokompromitovaných jedinců mají infekce podstatně závažnější průběh (Lion, 2014). Infekce představuje problém například u dětí, které podstoupily transplantaci hematopoetických kmenových buněk, zde může docházet k reaktivaci infekce, která je spojena s vysokou mortalitou (Kosulin et al., 2016). Lion, 2014 ve svém souhrnném článku popisuje, že perzistující adenovirová infekce je detekovatelná u většiny dětí, je vázána na lymfatické buňky a s věkem klesá.

Lidské adenoviry (HAdV) se řadí do druhů HAdV A-G, které v současné době zahrnují 67 genotypů HAdV (Lion, 2014). Vymezení druhu je založeno zejména na evoluční vzdálenosti a odlišnosti ve stavbě genomu. Pro klasifikaci a rozlišení jednotlivých genotypů adenovirů jsou nejdůležitější hypervariabilní oblasti genu pro hexon. Zbývající části hexonového genu, jsou mezi genotypy relativně málo variabilní. Ačkoliv je oblast hexonu pro klasifikaci nejvíce využívána, lze pro přesnější určení zahrnout sekvenční analýzu genu vláknitého proteinu a pentonové báze, místa mezi kterými dochází k nejčastějším rekombinačním událostem (Lion, 2014). Celogenomovou analýzou zástupců HAdV-B a HAdV-D bylo zjištěno, že genomy HAdV-D se vyvíjí spíše vlivem rekombinace, zatímco genomy HAdV-B, které vykazují větší aminokyselinovou rozmanitost, se vyvíjeli spíše vlivem substitucí (Robinson et al., 2013). Fylogenetický strom a evoluční vzdálenosti zobrazuje obrázek 1.5. Většina nově vzniklých HAdV genotypů jsou homologními rekombinanty v rámci jedné skupiny, některé z nich tím získají jinou patogenitu (Singh et al., 2015).



Obrázek 1. 3 - Fylogenetický strom adenovirových genomů.

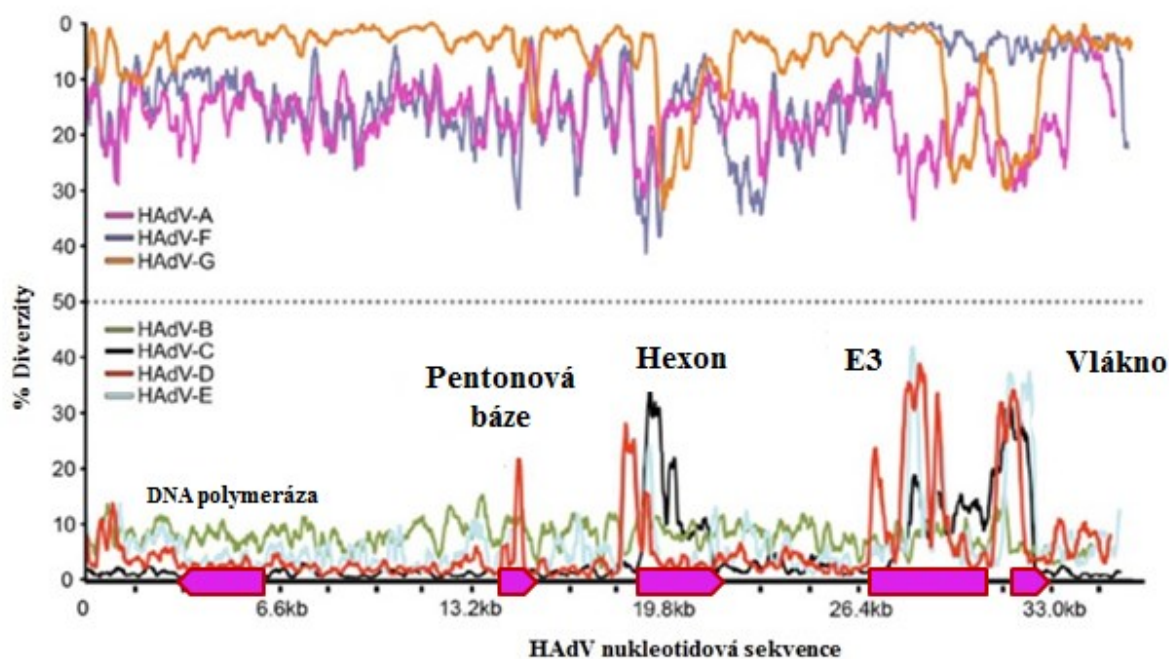
Fylogenetický strom je zobrazen i s vyznačenými fylogenetickými vzdálenostmi (p-distance), které udávají procento odlišnosti genomů. Strom byl vytvořen na základě celogenomové analýzy, převzato z (Robinson et al., 2013)

Detekce adenovirů

- **Senzitivní detekce:** pro senzitivní detekci, která určí s vysokou přesností, zda se virus ve vzorku vyskytuje, ale už nerozliší genotyp, se využívají vysoce konzervované oblasti genomu (znázorňuje obrázek 1.6). Těmito oblastmi jsou E2B (gen pro virovou polymerázu) nebo konzervativní oblasti hexonového genu. Například firma GeneProof a.s. nabízí kit pro *in vitro* diagnostiku, který umožňuje kvalitativní i kvantitativní

detekci HAdV v různých typech klinických vzorků a je založen na amplifikaci konzervované sekvence genu E2B (GeneProof Adenovirus PCR Kit). Oblast hexonového genu byla také použita pro detekci většiny genotypů, pomocí PCR v reálném čase („real-time PCR“), bez schopnosti jednotlivé genotypy odlišit (Dupuis et al., 2011; Ebner et al., 2005). Metodu pro detekci 57 genotypů, založenou na PCR v reálném čase popsali ve své studii například Buckwalter et al., 2012. Metoda je schopná detekovat a kvantifikovat HAdV v různých klinických vzorcích s vysokou senzitivitou, za použití jediného páru primerů nasedajících na oblast pentonové báze, genotypy však metoda nerozliší (Buckwalter et al., 2012).

- **Detekce s určením typu:** analýza variabilních oblastí genu pro protein hexon virové kapsidy má dnes široké využití pro genotypizaci adenoviru. Nicméně zejména u HAdV-D, u kterých často dochází ke genové rekombinaci, nemusí mít tato metoda dostatečnou rozlišovací schopnost. Je proto vhodné zavést i analýzu vláknitého proteinu, kde jsou rekombinační události lépe patrné (Liu et al., 2011; Singh et al., 2015; Thounaojam et al., 2016). Jako příklady studií, které využívaly analýzu genu pro hexon, uvádím Takeuchi et al., 1999, kteří studovali HAdV u pacientů s keratokonjunktivitidou. Jejich degenerované primery pokrývaly celou oblast hexonového genu – tedy všech 7 hypervariabilních oblastí (HVR). PCR amplikony byly použity pro následnou sekvenaci a analýzu (Takeuchi et al., 1999). Jelikož namnožení a sekvenování tak dlouhého úseku (více než 1800 bp) bylo poměrně složité na provedení, začaly se další studie zaměřovat na kratší úseky hexonového genu, které by byly využitelné pro genotypizaci. Allard et al., 2001 zvolili pro genotypizaci metodu založenou na PCR a následné digesci amplifikovaných úseků restrikčními endonukleázami a analýze restrikčních fragmentů. Navrhli primery pro PCR do oblastí hexonového genu mezi 21. a 322. pár bazí (Allard et al., 2001). Primery navržené v této studii jsou dodnes využívány pro molekulární detekci HAdV (Filho et al., 2007; Gopalkrishna et al., 2016; Liu et al., 2016; Portes et al., 2017) nebo méně často k jejich genotypizaci (Ouédraogo et al., 2016). Primery přesahující jiné hypervariabilní oblasti hexonového genomu určené ke genotypizaci byly popsány například ve studiích (LeGoff et al., 2013; Sarantis et al., 2004).



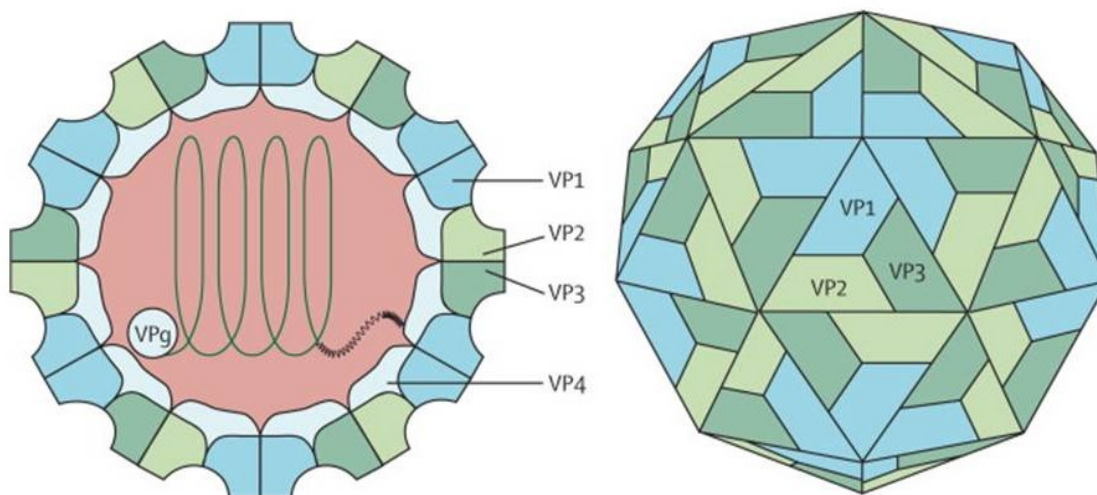
Obrázek 1.4 – Odlišnosti v genomu adenovirových druhů.

Růžové šipky označují genomovou polohu pro DNA polymerázu (E2), pentonovou bázi, hexon, E3 protein a vlákno. Zároveň je z obrázku patrná odlišnost genomu adenovirových druhů v oblasti pentonu, hexonu, E3 proteinu a vlákna, dále je patrná poměrně konzervovaná oblast virové polymerázy (E2).

Převzato a zpracováno z (Robinson et al., 2013)

1.3.2 Enterovirus

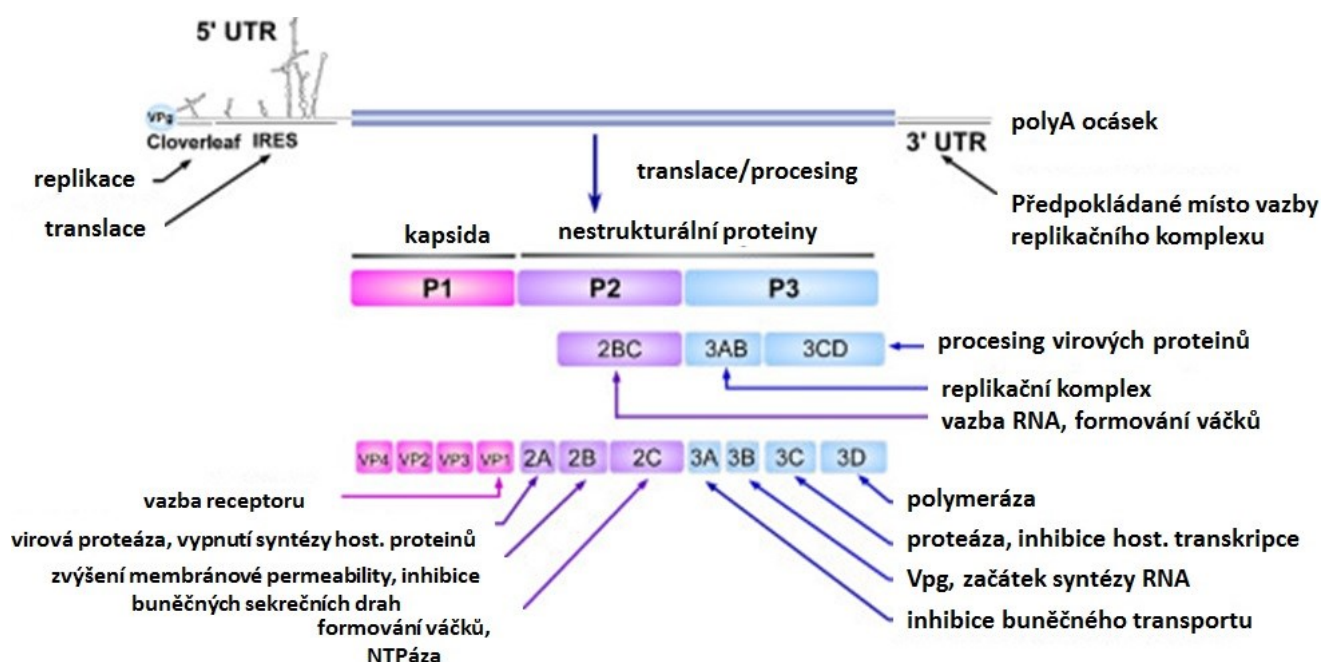
Enteroviry (EV) jsou neobalené RNA viry. Rod *Enterovirus* patří do čeledi *Picornaviridae* sdružující jedny z nejmenších virů. Virová kapsida je v průměru 30 nm velká, má ikosahedrální tvar a je složená ze 4 proteinů – VP1, VP2, VP3 a VP4 (Yates, 2014) (viz obrázek 1.7). Enteroviry vstupují do buňky pomocí několika různých receptorů v závislosti na sérotypu. Pro lidské EV-A byly identifikovány PSGL-1 (P-Selectin Glycoprotein Ligand-1) a SCARB2 (Scavenger Receptor Class B, 2) (Nishimura and Shimizu, 2012). Jiné enteroviry využívají jako vstupní receptory integrin $\alpha\beta6$, integrin $\alpha\beta3$, CD155, CAR (coxsackie-adenovirový receptor), CD55 nebo ICAM 1 (Intercellular Adhesion Molecule 1) (Liu and Rossmann, 2014).



Obrázek 1.5 - Morfologie virové kapsidy enteroviru.

Proteiny VP1, VP2, VP3 and VP4. VP4 tvořící kapsidu obklopují RNA genom. Převzato z (<https://viralzone.expasy.org/>)

Genomová RNA je jednovláknová s pozitivní polaritou řetězce. Díky pozitivní polaritě řetězce je genom sám o sobě infekční, po infekci buňky je ihned překládán na ribozomech do proteinu. Genom je velký pouze 7500 bází a obsahuje jediný otevřený čtecí rámec, který kóduje polyprotein, ten je štěpen za vzniku strukturálních a nestrukturálních proteinů (viz obrázek 1.8). Virová RNA se váže na ribozom pomocí IRES („internal ribosome entry site“, vnitřní místo pro vstup ribozomu). Původní polyprotein je štěpen protézami a vzniká prekurzor P1, jehož štěpením vznikají strukturální proteiny a dále P2 a P3, jejichž produkty štěpení slouží k replikaci, modifikaci hostitelské buňky, procesu vzniku nových virionů a následně lyzi buňky (viz obrázek 1.8).



Obrázek 1.6 - Schematické znázornění enterovirového genomu.

Na obrázku je zobrazen z virové RNA (modře) translatovaný polyprotein (P1, P2, P3), který je proteolyticky štěpen na 11 zralých polypeptidů. U každého polypeptidu jsou vypsány jeho biologické funkce.

UTR - netranslatovaná oblast; IRES – místo pro nasednutí ribozomů. Převzato z (Lin et al., 2009).

Rod *Enterovirus* řadíme do čeledi *Picornaviridae*. Rod se skládá z 15 druhů: Enterovirus A – L, (z toho lidské jsou enterovirus A - D) a rhinovirus A – C. Rod *Enterovirus* dohromady zahrnuje více než 200 typů, z toho lidských je více než 100 typů (dle informací z <http://www.picornaviridae.com/>). K zařazení rhinoviru do rodu *Enterovirus* došlo cca před 10 lety (<https://talk.ictvonline.org/>) a ačkoliv jsou si tyto viry geneticky blízké, jejich fenotypová charakteristika se zásadně odlišuje. Enterovirové infekce mohou postihovat široké spektrum buněk s různými klinickými projevy, naopak rhinovirové infekce se lokalizují hlavně do oblasti horních cest dýchacích, liší se mimo jiné i podmínky pro optimální kultivaci těchto virových druhů.(Royston and Tapparel, 2016).

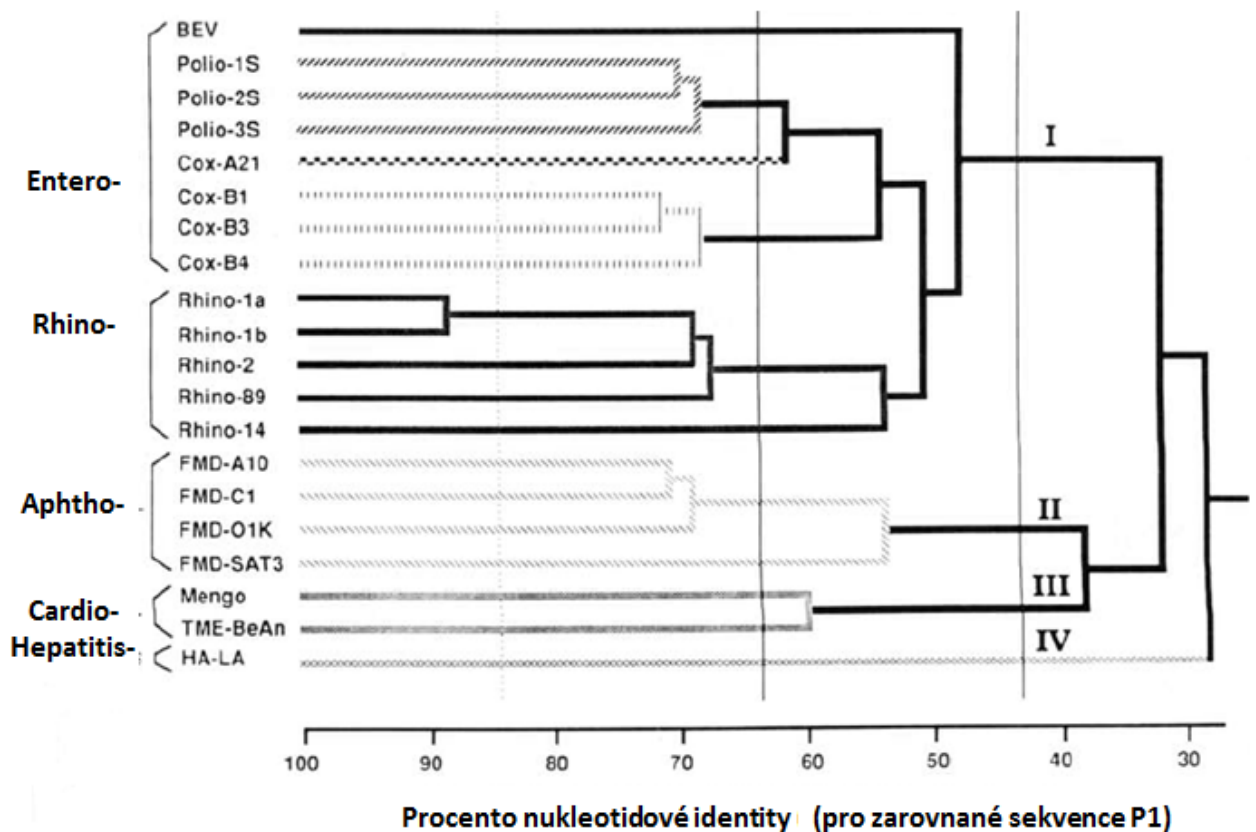
Tabulka 1.2 – Lidské enterovirové druhy a typy.

Znázornění vybraných lidských druhů (a jejich typů) rodu *Enterovirus*. Převzato a upraveno z (<http://www.picornaviridae.com/>).

Lidské enterovirové druhy	Příklady typů příslušných druhů
Enterovirus A	coxsackievirus A2 (CV-A2), CV-A3, CV-A4, CV-A5, CV-A6, CV-A7, CV-A8, CV-A10, CV-A12, CV-A14, CV-A16, enterovirus A71 (EV-A71), EV-A76, EV-A89, EV-A90, EV-A91, EV-A9
Enterovirus B	coxsackievirus B1 (CV-B1), CV-B2, CV-B3, CV-B4, CV-B5, CV-B6, CV-A9, echovirus 1 (E-1; incl. E-8), E-2, E-3, E-4, E-5, E-6, E-7, E-9, E-11, E-12, E-13, E-14, E-15, E-16, E-17, E-18, E-19, E-20, E-21, E-24, E-25, E-26, E-27, E-29, E-30, E-31, E-32, E-33, enterovirus B69 (EV-B69), EV-B73, EV-B74, EV-B75, EV-B77, EV-B78, EV-B79, EV-B80, EV-B81
Enterovirus C	poliovirus (PV) 1, PV-2, PV-3, coxsackievirus A1 (CV-A1), CV-A11, CV-A13, CV-A17, CV-A19, CV-A20, CV-A21, CV-A22, CV-A24, EV-C95, EV-C96, EV-C99, EV-C102, EV-C104, EV-C105, EV-C109, EV-C113
Enterovirus D	EV-D68, EV-D70, EV-D94, EV-D111
Rhinovirus A	A1, A2, A7, A8, A9, A10, A11, A12, A13, A15, A16, A18, A19, A20, A21, A22, A23, A24, A25, A28, A29, A30, A31, A32, A33, A34, A36, A38...
Rhinovirus B	B3, B4, B5, B6, B14, B17, B26, B27, B35, B37, B42, B48, B52, B69, B70, B72, B79, B83, B84, B86, B91, B92, B93
Rhinovirus C	C1-C56

Enteroviry jsou běžnými lidskými patogeny, které obvykle způsobují gastrointestinální infekce a infekce dýchacích cest. Pokud však není virus imunitním systémem eliminován v místě primární infekce, může nastat virémie a přenos viru k dalším orgánům, dochází pak k vážným klinickým projevům, jako sepse, meningitida, encefalitida či myokarditida. Průběh infekcí může být bezpříznakový, s mírnými příznaky, ale i se závažnými komplikacemi (těmi jsou například aseptická meningitida či myokarditida) (Yates, 2014), navíc předchozí expozice enterovirovému typu mnohdy nebrání reinfekci (Fields et al., 2013). Incidence enterovirových infekcí vykazuje určitý vzorec sezónnosti, je vyšší v létě a začátkem podzimu. Epidemiologické zprávy nejčastěji uvádí výskyt enterovirových infekcí spojených s těžkými neurologickými či respiračními onemocněními (zejména typy EV-A71 a EV-D68), které mírně narůstají, v jednotlivých zemích se vyskytují v desítkách případů a obvykle postihují děti v průměrném věku tří let (<https://ecdc.europa.eu/>). Retrospektivní průřezová studie provedená v letech 2010-2014 v severní Itálii popisuje epidemiologii enterovirů cirkulujících u dětí do 5 let. Vzorky rektálního nebo krčního stěru byly odebrány buď hospitalizovaným dětem, nebo ambulantním dětským pacientům a byly analyzovány v rámci rutinní virologické praxe. Průměrné procento pozitivních vzorků bylo 16%, z toho 80% infekcí proběhlo u dětí mladších tří let, s patrnou sezónností incidence (Bubba et al., 2017). Podle WHO je 70% nahlášených symptomatických EV infekcí u dětí do deseti let věku (de Crom et al., 2016).

Celá virová skupina vykazuje značnou genetickou variabilitu, která je způsobena jak mutacemi, tak genovou rekombinací. Preferenční rekombinační body byly popsány v nestruturních oblastech P2 a P3, kdežto rekombinace v oblastech kódující virovou kapsidu jsou neobvyklé (Santti et al., 1999). Mutace v genomech vznikají především v důsledku velké chybovosti virové RNA dependentní RNA polymerázy, která nemá „proofreadingovou“ aktivitu a vytváří 1 mutaci na 10^3 - 10^7 nukleotidů, což je cca jedna chyba na replikovaný genom. Ve srovnání s tím polymerázy s opravnou aktivitou vytváří jednu mutaci na 10^9 - 10^{10} nukleotidů (Choi, 2012). Kritérium pro zařazení viru k příslušnému genotypu je alespoň 70% nukleotidová identita v sekvenci VP1 genu (nebo více než 85% aminokyselinová identita v této sekvenci) (Fields et al., 2013), viz obrázek 1.9.



Obrázek 1.7 - Fylogenetický strom čeledi *Picornaviridae*.

V obrázku je vyznačen rod *Enterovirus* a jeho zástupci. Horizontální osa vyjadřuje procento nukleotidové identity v oblasti P1 proteinového prekurzoru (Fields and Knipe, 1991)

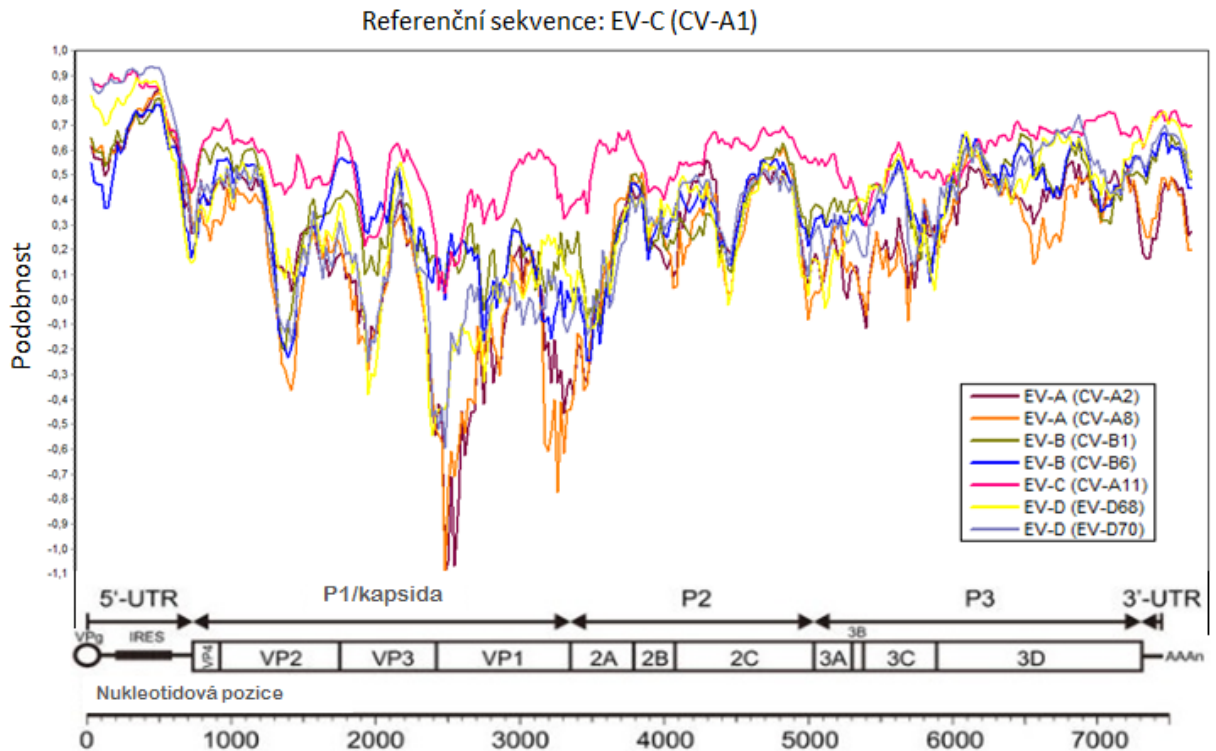
Detekce enterovirů

K detekci enterovirů je možné využít multiplexovou metodu, která detekuje i více virových skupin najednou, problém u těchto metod je však se senzitivitou, která by neměla oscilovat hlavně u vzorků s nízkou virovou náloží jako je krev nebo mozkomíšni mok (Bennett et al.,

2011). U vzorků, jako jsou vzorky stolice, kde je koncentrace kopií genomů vysoká, je nižší senzitivita akceptovatelná (Pham et al., 2010). Pham et al., 2010, vytvořili multiplexovou RT-PCR proceduru pro souběžnou detekci Aichi viru, lidských parechovirů, EV a lidského bocaviru ze vzorků stolic dětských pacientů s akutní gastroenteritidou. Autoři studie uvádí, že multiplexová RT-PCR neměla významný vliv na snížení senzitivity v porovnání s monoplexovou RT-PCR.

- **Senzitivní detekce enteroviru:** molekulárně diagnostické testy pro klinickou praxi obvykle cílí na vysoce konzervovanou 5' nepřekládanou oblast (5'UTR). Metoda umožňuje detekci většiny zástupců rodu *Enterovirus*, tyto testy však nerozliší jednotlivé genotypy, pouze ukáží, zda je vzorek EV-pozitivní či EV-negativní (Sawyer, 2002). 5'UTR lze využít i pro rozdělení enterovirů do dvou hlavních genetických klastrů, 5'UTR skupina I jsou druhy A a B, 5'UTR skupina II jsou potom druhy D a C (obrázek 1.10). Vysoká konzervovanost této oblasti je pravděpodobně dána její důležitostí při virové replikaci a translaci (Thoelen et al., 2004). Pro dosažení vysoké senzitivity detekce lidských enterovirů (A-D) a parechovirů ze vzorků mozkomíšního moku vytvořili Bennett et al., 2011, multiplexovou RT-PCR v reálném čase. Primery nasedají na 5'UTR oblast a definují 142 bp dlouhý produkt. Autoři prokázali, že multiplexová metoda popsaná v jejich studii nesnižuje senzitivitu detekce (Bennett et al., 2011).
- **Detekce s určením typu:** pro rozlišení mezi jednotlivými typy stanovenými antigenními metodami je vhodná oblast genu kapsidového proteinu VP1 (Oberste et al., 1999), což je nejvíce variabilní oblast enterovirového genomu (obrázek 1.10). Nix et al., 2006, vytvořili set specifických primerů pro amplifikaci oblasti VP1 s ohledem na to, aby primery obsahovaly co nejméně degenerovaných nukleoidů, které snižují senzitivitu reakce. Právě sníženou senzitivitu vlivem příliš degenerovaných primerů zaznamenala studie Papadakis et al., 2014, jejichž primery specifické pro VP1 rozlišovaly široké spektrum EV ze vzorků mozkomíšního moku ((Papadakis et al., 2014)). Nix et al., 2006, použili metodu seminested-PCR, pro reverzní transkripci byla využita sada dvou párů primerů a pro amplifikaci cDNA pak použili jeden pár primerů, tím vznikl produkt o délce od 350 do 400 bp (v závislosti na délce VP1 u různých typů). Amplikony byly následně sekvenovány a na základě sekvence VP1 byla stanovena příslušnost k danému typu (shoda nukleotidových sekvencí VP1 by měla být

v rámci typů alespoň 70%). Metoda prokázala schopnost detekovat veškeré známé lidské EV typy (Nix et al., 2006). Detekce EV pomocí primerů pro oblast VP1 je také WHO doporučenou metodou, při laboratorních postupech sledování enterovirových nákaz (World Health Organization (WHO)).



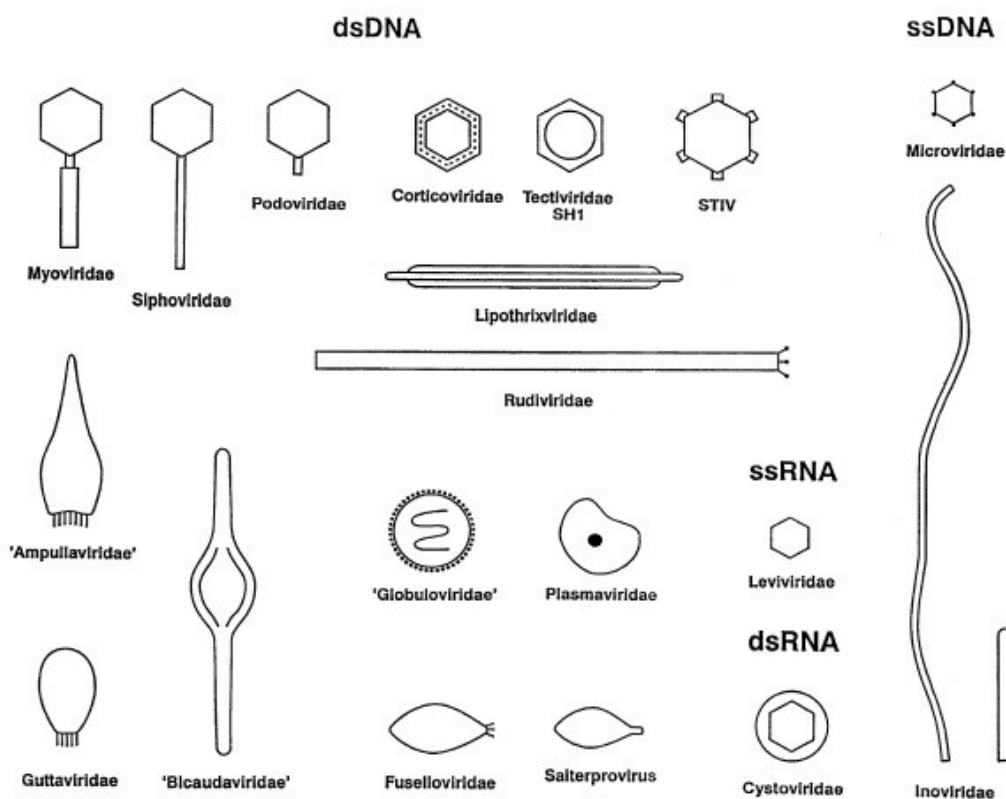
Obrázek 1.8 – Podobnost enterovirových genomů.

SimPlot analýza ukazuje na ose x- počet nuklotidů, na ose y- podobnost sekvencí. Ze SimPlot (Ray, S. C. 1998) analýzy je patrné že 5'UTR rozděluje enteroviry do dvou hlavních genetických klastrů, 5'UTR skupina I., kam patří druhy A, B a 5'UTR skupina II., kde najdeme druhy C, D (Thoelen et al., 2004). Rozlišení jednotlivých EV-genotypů ukazuje kapsidový VP1 protein (Nix et al., 2006). CV-A – coxsackie virus A, CV-B – coxsackie virus B, EV - enterovirus.

1.3.3 Bakteriofágy

Bakteriofágy, zkráceně fágy, byly poprvé popsány v roce 1915, jako infekční agens způsobující lyzi buněk v bakteriálních koloniích (Twort, 1915).

V současné době je detailně popsáno pouze velmi malé množství konkrétních fágů, takže procento neprozkoumaných druhů fágů zatím značně převyšuje druhy známé (Mann, 2005). Udávaný počet bakteriofágů na planetě se pohybuje v řádech 10^{31} (shrnuto v Comeau et al., 2008). Základní metodou určování fágů bylo pozorování v elektronovém mikroskopu. Jedinečná morfologie fágových virionů je sice odlišná od ostatních virů, ale mnoho fágů, které jsou si strukturně velmi podobné (viz obrázek 1.11) mohou mít ve skutečnosti odlišné genomy (Ackermann, 2007).



Obrázek 1.9 - Struktura bakteriofágových virionů v elektronovém mikroskopu. Převzato z (Ackermann, 2007).

Morfologie fága i dnes pomáhá k zařazení fágů do jednotlivých taxonomických skupin, ale s rozvojem sekvenčních metod je to genetická informace ve formě dsDNA, ssDNA či RNA, co se k charakterizaci využívá, ať už je to sekvenace celých genomů nebo jen konkrétních genomových oblastí (Adriaenssens and Brister, 2017).

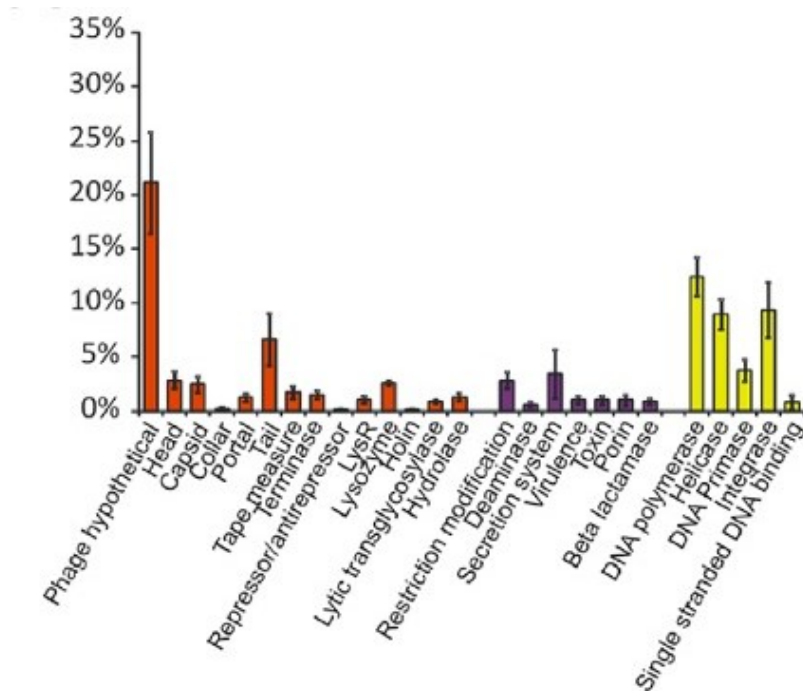
Infekce bakterií fagy může probíhat dvěma hlavními replikačními cykly, lytickým a lysogenním cyklem. Lytický cyklus je charakterizován rychlou produkcí virových částic a končí celkovou lyzí hostitelské buňky, výsledkem lysogenního cyklu je integrace virového genomu do bakteriálního chromozomu. Vznikne tak profág, který zůstane v bakteriích, dokud nedostane impuls k zahájení produkce virionů a start lytického cyklu. Během lysogenního cyklu může dojít ke změnám hostitelského metabolismu v důsledku genového přenosu mezi fagem a bakterií. Kromě lytického a lysogenního cyklu mohou fagy ustanovit chronickou infekci, kdy virus produkuje potomstvo, avšak nedochází k lyzi bakteriální buňky (shrnutí v Weinbauer, 2004).

Se stále se zlepšujícími technikami, roste množství a dostupnost dat o genomu fagů, tím se vnesla do klasifikace řada nových možností jak jednotlivé viry zařazovat. Vznikla nová schémata, která ale ne vždy odpovídala pravidlům stanoveným Mezinárodním výborem pro taxonomii virů a podvýborem pro bakteriální a archaeální viry (ICTV a BAVS), a také mnoho nově sekvenovaných genomů zůstalo nezařazeno (Rohwer and Edwards, 2002). Využití znalostí o genomu a proteomu dnes nejvíce pomáhá k pochopení vztahů mezi jednotlivými zástupci fagů, které mezi sebou porovnáváme, avšak stále je bakteriofagová taxonomie neúplná. Poslední klasifikace podle ICTV založená na sekvenci genomu a proteomu, přinesla zařazení fagů do 22 čeledí 6 podčeledí, 80 rodů a 873 druhů (Krupovic et al., 2016).

Hlavní překážkou při sekvenování a typizaci je mozaikovitá struktura genomu. Mozaikovitost fagových genomů je způsobena horizontálním přenosem genů. Přenos genů se odehrává mezi fagy, které můžeme zařadit do společného klastru, spíše než mezi dvěma odlišnými klastry fagů (Grose and Casjens, 2014). Grose and Casjens, 2014 ve své studii porovnávali bičíkaté fagy infikující bakteriální čeleď *Enterobacteriaceae*, a zařazovali je do klastrů s více jak 50% sekvenční identitou genomů. Zároveň srovnávali fagy infikující *Enterobacteriaceae* s fagy infikující jiné čeledě bakterií a potvrdili, že pro stanovování příbuzenských vztahů mezi jednotlivými fagy je nutné využít nejen sekvenci nukleotidů a aminokyselin, ale také porovnat celkové uspořádání genomu. Pokud se setkají dva fagy, může dojít ke čtyřem různým mechanismům rekombinace: 1) rekombinace homologních úseků, které se vyskytují v genomech obou fagů, 2) místně-specifická (site-specific) rekombinace, známá pouze v místě *att* genu pro integraci, 3) rekombinace míst s konzervovanou funkcí, které se však shodují jen v několika málo oligonukleotidech, 4) rekombinace v místech s nulovou sekvenční identitou (Campbell, 1994). Mechanismus rekombinace mezi fagem a bakterií bývá často popisován u

bakteriofága λ . Fág je schopný rekombinace i u hostitelů deficientních v RecA (protein potřebný pro rekombinaci), na základě tohoto zjištění byly popsány dva fágové geny zodpovědné za rekombinaci, *exo* a *bet* (Zagursky and Hays, 1983).

Ačkoliv jsou funkce mnoha genů zatím neznámé, je možné orientovat se stejně jako u lidských virů podle funkce genů, které jsou pro fága nezbytné: fágy vždy kódují geny pro replikaci či rekombinaci genomu a geny pro strukturu a sestavení virionů. U fágů se setkáváme s případy, kdy se funkční uspořádání genů mezi různými zástupci shoduje, ačkoliv na bázi nukleotidové sekvence není shoda patrná (Pedulla et al., 2003). Úsek pro sestavení hlavy virionu obvykle nese gen terminázové podjednotky, portálního proteinu, „scaffold“ proteinu a hlavní kapsidové podjednotky (Hatfull, 2008). To, že nejčastěji nalezenými geny v neznámé fágové populaci jsou homology genů pro polymerázy, helikázy, integrázy a vlákna bičků podporují také studie (Ly et al., 2014; Naidu et al., 2014). Obě skupiny zkoumaly virom v zubním plaku a slinách (viz obrázek 1.12) a velké procento kontigů sekvenovaného viromu bylo namapováno právě na tyto homology. Pro člověka jsou významné bakteriofágové geny virulence, které mohou být předány horizontálním přenosem bakteriím, pomocí těchto genů bakterie produkují toxiny, které představují významné prvky jejich patogenity (Penadés et al., 2015). Dávají tak vznik toxinům například u *Vibrio cholerae* (cholera toxin - cholera), *Clostridium botulinum* (neurotoxin - botulismus), *Escherichia coli* (shiga toxin - úplavice), *Streptococcus pyogenes* (toxin A - spála), shrnuto v (https://viralzone.expasy.org/3967?outline=all_by_species). Na rozdíl od vlivu na člověka je význam těchto genů pro bakteriofága neznámý.



Obrázek 1.10 - Graf vyjadřující průměrná procenta kontigů bakteriofágových homologů ze sekvenovaného viromu zubního plaku.

Fialové jsou homology genů virulence, žluté jsou geny pro replikaci a integraci, strukturální a hypotetické geny jsou oranžové. (Naidu et al., 2014)

Nyní se význam bakteriofágů zkoumá hlavně v souvislostech s jejich životním prostředím a roste snaha o charakterizaci genů, určující virus-hostitelské interakce, které ovlivňují životní cyklus a virulenci svých hostitelských bakterií. Neopomenutelnou stránkou výzkumu je také využití bakteriofágů pro klinické účely a jako biotechnologické nástroje (Gravitz, 2012).

Detekce bakteriofágů

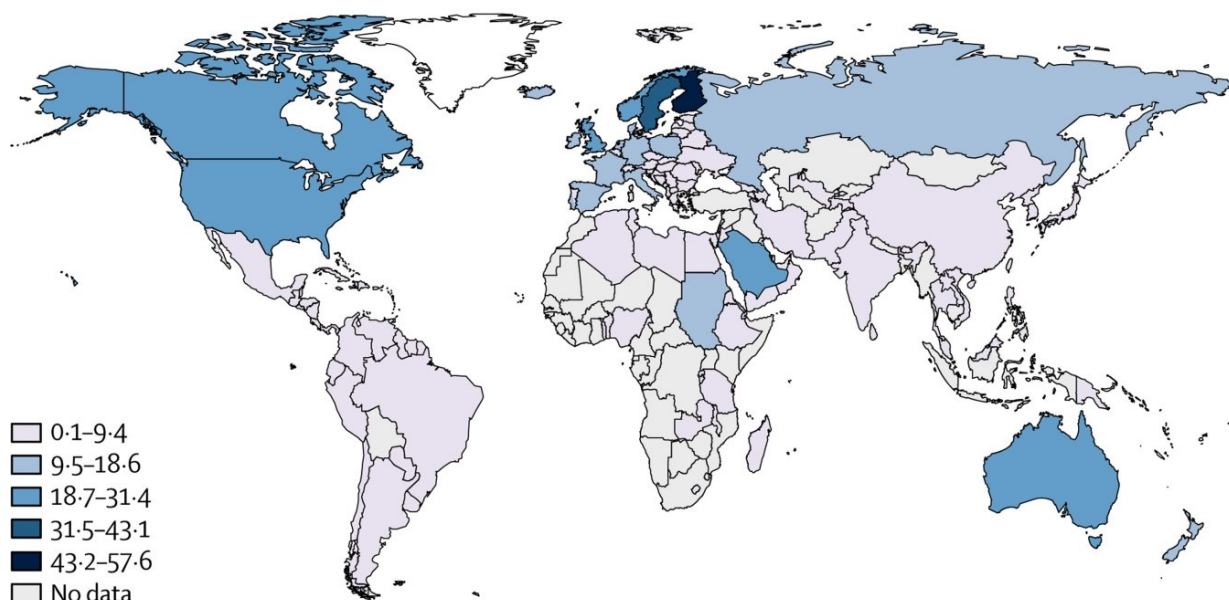
Dříve využívané metody pro detekci fágů, jako je sledování lyze bakteriálních buněk po infekci bakteriofágem, odhalí jen velmi malé procento bakteriofágů, které se ve střevě vyskytují, a nevypráví nic o jejich významu a četnosti výskytu (Twort, 1936). Metody, které se dnes dále využívají ke zjištění množství bakteriofágů ve vzorcích, jsou elektronová mikroskopie, která navíc poskytne i informace o strukturních vlastnostech fágů, také se využívá značení virových nukleových kyselin pomocí fluorescenčních barev a jejich detekce pomocí fluorescenční mikroskopie či průtokové cytometrie (shrnutí v Muniesa and Jofre, 2014).

Při studiu bakteriofágů ve střevě, se často používají metagenomické techniky, založené na sekvenaci fágových nukleových kyselin. Výzkum fágových populací znesnadňuje jejich obrovská rozmanitost a nepřítomnost shodné sekvence genu, na základě které, by se dala fágová diverzita jednoduše studovat (shrnutí v Reyes et al., 2012). Kombinace metod zahrnující purifikaci virových částic, amplifikaci nukleových kyselin pomocí náhodných primerů a NGS, přináší nejlepší výsledky při typizaci fágových populací ve střevním mikrobiomu, protože charakterizuje celou mozaiku fágového genomu, nestuduje se pouze jediný gen (Ogilvie et al., 2013).

1.4 Detekce virů u autoimunitních chorob

1.4.1 Incidence autoimunitního diabetu a celiakie

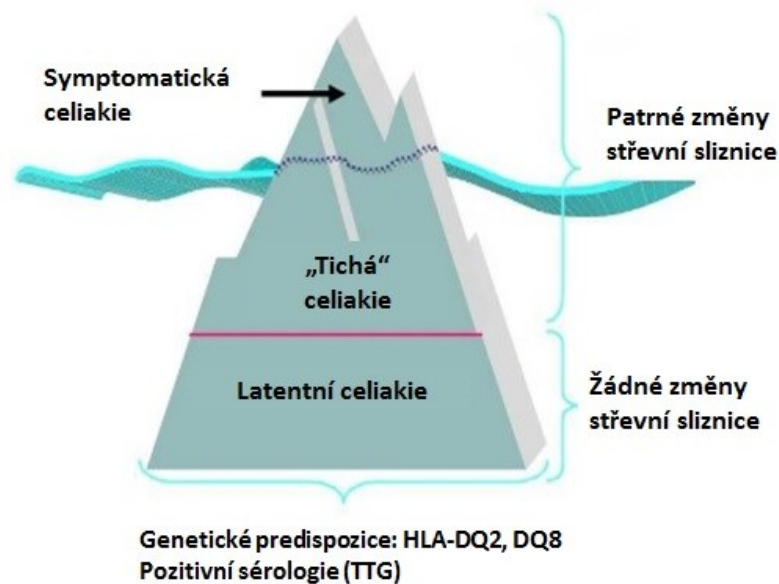
Podle Mezinárodní federace diabetu (IDF) má Evropa, ve srovnání s ostatními zahrnutými regiony (Střední východ a severní Afrika, Severní Amerika a Karibik, Jižní a Střední Amerika, Jihovýchodní Asie, Západní Pacifik) nejvyšší počet dětí a dospívajících (0-19 let) s diagnostikovaným diabetem 1. typu, což je k roku 2017 celkem 286 000 případů a každým rokem přibude 28 200 nových případů (International Diabetes Federation) V České republice byl dle průzkumu z roku 2016 stanoven celkový počet pacientů s T1D na zhruba 60 000 (www.uzis.cz). V Evropě jsou zeměmi s nejvyšším počtem nově diagnostikovaných případů Finsko, Švédsko a Sardinie (viz obrázek 1.13) (Atkinson et al., 2014). Vzhledem k narůstající incidenci se stále více zkoumají environmentální faktory, které by na vznik T1D mohly mít stejný či větší vliv než genetické pozadí. Jsou jimi výživa kojenců (Knip et al., 2010), snížený výskyt infekcí (hygienická hypotéza, Bach and Chatenoud, 2012), střevní mikrobiom (Boerner and Sarvetnick, 2011) a v neposlední řadě virové infekce (Cinek et al., 2014; Stene et al., 2010).



Obrázek 1.11 - Incidence diabetu 1. typu u dětí ve věku 0-14 let.

Rozlišení incidence podle geografického výskytu v roce 2011. Z obrázku je patrné, z Evropských zemí má například Finsko incidenci až 57 případů na 100 000 obyvatel za rok, Švédsko pak až 43 případů na 100 000 obyvatel. Převzato z (Atkinson et al., 2014).

Celiakie je co do zjišťování nových případů komplikovanější vzhledem k častým bezpříznakovým formám (obrázek 1.14). Diagnostikované případy nejsou kompletním obrazem výskytu nemoci a většina studií uvádí pouze celkový počet případů, nikoliv incidenci (Gujral et al., 2012). Studie Mustalahti et al., 2010, uvádí, že hodnoty prevalence celiakie v Evropě se pohybují kolem 0,5-1% (Mustalahti et al., 2010).



Obrázek 1.12 - Ledvcový model znázorňující variabilní projevy celiakie.

Špičku ledovce představují diagnostikované případy, u kterých se projeví klinickými příznaky, tvoří tedy jen malé procento všech případů celiakie, větší podíl případů (těch bezpříznakových) obrazně vystihuje zbytek ledovce pod hladinou.

Převzato z (<https://emedicine.medscape.com>)

1.4.2 Překryv genetického rizika T1D a celiakie

Riziko vzniku autoimunitních chorob je více či méně vázáno na geny pro HLA (human leukocyte antigen) (Gough and Simmonds, 2007). Je to genový komplex, který se nachází se na krátkém raménku 6. chromozomu a zahrnuje více než 200 genových lokusů, související s imunitní funkcí (prezentace antigenu) (Jan Škrha et al., 2009). Existuje překryv mezi rizikovými alelami pro T1D a celiakii, představují ho hlavně alely se starým serologickým označením HLA-DQ2 a HLA-DQ8 (Cohn et al., 2014).

Téměř 55% pacientů s T1D nese rizikový haplotyp HLA-DQ2, zatímco HLA-DQ8 se nachází u 70% pacientů s T1D (Cohn et al., 2014). U více než 98% pacientů trpící celiakií byly nalezeny genetické markery HLA-DQ2 nebo HLA-DQ8 (Cecilio and Bonatto, 2015). Zajímavé také je, že celiakie se u pacientů s diabetem 1. typu vyskytuje s prevalencí od 4 do 11 %,

naproti tomu je prevalence celiakie v celkové populaci jen 0,5-1% (Larsson et al., 2008). Kromě překryvu genetického rizika pro vznik obou nemocí vidíme překryv vnějších rizikových faktorů (Cohn et al., 2014). U T1D, je podle studií populací, rodin i zvířecích modelů HLA genům přisuzováno ~50% genetického rizika (Pociot and McDermott, 2002), téměř 40% riziko pro vznik celiakie, bylo podle studie sourozenců, přisuzováno HLA genům (Petronzelli et al., 1997). Podle několika dalších studií jsou s celiakií spojeny také další geny (Liu et al., 2002; Trynka et al., 2011), jejich význam však není tak velký.

1.4.3 Viry a T1D

Diabetes 1. typu je výsledkem autoimunitní reakce proti β buňkám pankreatu, zodpovědných za produkci insulinu. Virové infekce mohou na vznik diabetu působit dvěma hlavními mechanismy – mechanismus „molekulárních mimiker“, což je podobnost virových antigenů s antigeny β -buněk, infekce tak vyvolá zkříženou imunitní reakci a buňky imunitního systému začnou likvidovat vlastní tkáň (Lehuen et al., 2010) a „bystander“ poškození, kdy vlivem infekce vznikne prozánětlivé cytokinové prostředí, které vede k aktivaci složek imunitního systému. V návaznosti na poškození pankreatických buněk virovou infekcí se do prostředí uvolní autoantigeny, které zesílí autoimunitní reakci (Horwitz et al., 1998).

Hlavním kandidátem na virus zodpovědný za vznik T1D je enterovirus (Yeung et al., 2011). Jeho vliv je studován už od roku 1969, kdy Gamble et al., 1969 našli větší množství protilátek, hlavně proti Coxsackie B4, u pacientů s nedávným nástupem diabetu v porovnání s kontrolami i s pacienty s déle trvajícím diabetem (Gamble et al., 1969). Následovala je řada vědeckých skupin, které studovaly vztah mezi enterovirovou infekcí a vznikem T1D na lidských kohortách po celém světě (shrnuté v Jaïdane et al., 2010). Studie na lidských kohortách se liší použitou metodikou či designem studií a ve svých výsledcích se zatím liší: například finská studie prokázala zvýšené riziko propuknutí T1D u geneticky predisponovaných dětí, u kterých byla potvrzena přítomnost enterovirové RNA v krvi (Stene et al., 2010), studie na vzorcích krve z norské kohorty geneticky predisponovaných dětí však nepotvrdila stejné závěry, ale ukázala zvýšenou frekvenci enterovirové RNA u vzorků, které byly odebrány jako první po objevení se autoprotiátek proti ostrůvkům pankreatu (Cinek et al., 2014).

Jen málo studií se věnuje identifikaci konkrétních typů, ačkoliv jejich vliv na vznik diabetu 1. typu je různý. Studie provedená na myším modelu ukazuje indukci T1D po infekci virem

Coxsackie B4 (CVB4) (Chatterjee et al., 1988). Ve srovnání s CVB4 bylo prokázáno, že CVB3 může na rozvoj T1D protektivní vliv (Tracy et al., 2002). Studie na lidských kohortách prokázala nižší výskyt protilátek proti CVB3 a CVB6 u dětí s diabetem než u kontrol, což také naznačuje jejich protektivní charakter (Laitinen et al., 2014). Laitinen et al., 2014 jako rizikový faktor označili infekci CVB1, která ve studovaných vzorcích předcházela vzniku autoimunity. Zvýšený výskyt protilátek proti CVB1 zaznamenala i studie Oikarinen et al., 2014 (Oikarinen et al., 2014).

1.4.4 Viry a celiakie

Celiakie je imunopatologické onemocnění, kdy dochází k poškození buněk střevní sliznice následkem autoimunitní reakce proti glutenu. Jeho složka, gliadiny, jsou deamidovány tkáňovou transglutaminázou, čímž se dramaticky zvyšuje jejich potenciální imunogenita. Někteří jedinci vyvinou proti takovéto modifikované molekule buněčnou hypersenzitivitu – ta je podstatou celiakie. Zánět a střevní bakteriální nebo virové infekce mohou podněcovat zvýšení střevní propustnosti (König et al., 2016), která je u celiakie často pozorovaná a může zvyšovat vstřebávání molekul gliadinu (Koning et al., 2005). Z virů jsou s celiakií spojovány rotavirové infekce, které jsou velmi časté v dětských kolektivech (Fields et al., 2013). Nedávná studie poukazuje na vliv infekce kmeny *Orthoreovirus*, která vede ke snížení orální tolerance na antigeny přicházející z potravy a vznik Th1 buněčné imunity proti nim (Bouziat et al., 2017).

Vliv adenovirové infekce na vznik celiakie je nejvíce spojován s typem 12 (HAdV12), zřejmě z toho důvodu, že v roce 1984 skupina vědců, popsala sekvenční aminokyselinovou homologii mezi A-gliadinem a 54 kDa proteinem E1b časných genů adenoviru 12 (Kagnoff et al., 1984). Autoři také ukázali, že protilátka *in vitro* vytvořená proti virovému proteinu E1b zkříženě reaguje proti A-gliadinu a nastínil tak možný vliv adenovirové infekce na vznik celiakie (Kagnoff et al., 1984). Výsledky této studie potvrdila i následující studie Kagnoff et al., 1984, ve které byla testována přítomnost neutralizačních protilátek proti HAdV 12 u pacientů s celiakií. Ve studii Lähdeaho et al., 1993, autoři prokázali, že pacienti s celiakií mají zvýšené množství protilátek IgG proti peptidu E1b oproti kontrolní skupině (Lähdeaho et al., 1993). Zatímco, studie Howdle et al., 1989, neprokázala signifikantní zvýšení protilátek proti E1b u pacientů s celiakií (Howdle et al., 1989), vliv adenovirové infekce nepotvrdila ani studie Mahon et al., 1991. Jelikož se studie ve svých výsledcích liší, nelze zatím s jistotou vztah viru na vznik celiakie ani potvrdit ani vyvrátit.

1.4.5 Bakteriofágy ve střevě

Střevní mikroflóra hraje klíčovou roli v lidském organismu a její nerovnováha může souviset s rozvojem autoimunitních onemocnění (Brown et al., 2011). Bakteriofágy, tedy viry infikující bakterie, se zkoumají i v tomto kontextu. Metagenomické studie virů ukazují, že se v lidském střevu ustanovuje převážně lysogenní životní cyklus, na rozdíl otevřených životních prostředí (například oceány), kde převažuje spíše lytický cyklus (Reyes et al., 2010). Některé studie uvádí, že bakteriofágy mají imunomodulační účinek při imunitní odpovědi ve střevě a také ukazují, že se zvyšujícím se počtem fágů, které adherují k mukóznímu povrchu, se snižuje množství a patogenita bakterií, které střevo kolonizují (Barr et al., 2013). Ve střevním viromu převažují fágy čeledi *Siphoviridae*, následované čeledí *Podoviridae* (Kim et al., 2011; Reyes et al., 2010).

2. Materiál a metody

2.1 Návaznost prací

- 1) Návrh primerů pro typizaci adenovirů, enterovirů, bakteriofágů.
- 2) Testování primerů a podmínek PCR reakce pomocí setu vzorků s viry se známým typem.
- 3) Použití navržené metodiky na vzorky subjektů prediabetických kohort DIPP a MIDIA a na kohortě afrických dětí s diabetem a jejich kontrol.

2.2 Laboratorní přístroje, chemikálie a pomůcky

Přístroj	Výrobce	Přístroj	Výrobce
Pipety	Eppendorf; Germany	7300 Real Time PCR system	Applied Biosystems; USA
	Thermo – Finnpipette; Finland	Transiluminátor TFX-26MC	Vilber Lourmat; France
	Thermo – Matrix; USA	Fotoaparát OLYMPUS SP500uz	Olympus; Japan
Vortex MS1 Minishaker	IKA Werke GmbH & Co; Germany	Robot Biomek 3000	Beckman Coulter; USA
Centrifuga MiniSpin plus	Eppendorf; Germany	Robot Biomek 4000	Beckman Coulter; USA
Centrifuga Universal 320R	Hettich Zentrifugen; Germany	3130xl Genetic Analyzer	Applied Biosystems; USA
Centrifuga B4i	Jouan; France	AccuBlock Digital Dry Bath	Labnet International, USA
Biohazard box EF/S 6	Clean Air Techniek; Netherlands	LightCycler® 480 Instrument II	Roche, Switzerland
Zdroj elektroforézy Power Pac P25 T	Biometra; Germany	2100 Bioanalyzer Instrument	Agilent Technologies, USA
Termocycler Mastercycler pro S	Eppendorf; Germany	MiSeq sequencer	Illumina, USA
Termocycler Labcycler	Sensoquest GmbH; Germany		

Pomůcky	Výrobce	Pomůcky	Výrobce
Agencourt® SPRIPlate 96R ring magnetic plate	Beckman Coulter Genomics, USA	Hard-Shell® 384-Well PCR Plates	Biorad, USA
Plate Deepwell 96 wells 2000 µl	Eppendorf, Germany	Adhesive PCR Plate Foils	Termofisher, USA
Sealing foil, for 96-well plates	Eppendorf, Germany	LightCycler® 480 Multiwell Plates 384	Roche, Switzerland
Pipetovací špičky s filtrem (DNAase, RNAase, ATP free)	Sarstedt; Germany	LightCycler® 480 Sealing Foils	Roche, Switzerland
Mikrozkumavky 1,5 ml	Eppendorf; Germany	PCR desky, 96 jamkové	Applied Biosystems; USA

Chemikálie	Výrobce	Chemikálie	Výrobce
HotStarTaq DNA Polymerase Kit	Qiagen, Germany	Sterilní (injekční) voda	Braun, Germany
GoTaq® DNA Polymerase Kit	Promega, USA	SuperScript III Reverse Transcriptase	Invitrogen, USA
RNasin® Ribonuclease Inhibitors	Promega, USA	Nextera XT Index Kit v2 Set A (96 indexes, 384 samples)	Illumina, USA
dNTP (5 mM každý)	Qiagen, Germany	Index Kit v2 Set B (96 indexes, 384 samples)	Illumina, USA
Agencourt® AMPure® PCR Purification System	Beckman Coulter Genomics, USA	KAPA HiFi HotStart ReadyMix (2X)	KapaBiosystems by Roche, USA
Velikostní marker 2 - Log DNA	BioTech, Czech Rep.	Agilent High Sensitivity DNA Kit	Agilent Technologies, USA
0,5x TBE (Tris-Borate-EDTA)	připraveno v laboratoři	MiSeq Reagent Kit v2 500cycle	Illumina, USA
SeaKem® LE Agarose	Lonza, USA	GelRed™ Nucleic Acid Stain 10 000x in water	Biotium, USA
40 % roztok sacharózy s bromfenolovou modří	připraveno v laboratoři	75 % ethanol	připraveno v laboratoři

2.3 Návrh primerů k typizaci všech typů adenovirů, enterovirů a nejčastějších střevních bakteriofágů

Obecný princip:

- Získání referenčních sekvencí z databáze Genbank NCBI. Pro návrh **adenovirových** primerů bylo staženo asi 200 referenčních sekvencí celých genomů, nebo jen genu pro hexon, pro **enteroviry** pak cca 170 sekvencí genu VP1. Referenční sekvence nejčastějších střevních **bakteriofágů** byly převzaty z metagenomických studií střevního viromu u dětí z kohort MIDIA, DIPP a ze studie případů a kontrol z Afriky a Asie. Tyto studie střevního viromu využívající metagenomický přístup (sekvenování náhodných fragmentů) se zatím připravují k publikaci, studie viromu lidských virů u finských dětí již byla publikována (Kramná et al., 2015).
- Primery byly navrženy tak, aby byly co nejméně degenerované (nasedají na co nejvíce konzervativní část) a aby sekvence mezi nimi byly dostatečně variabilní k rozlišení všech známých genotypů. Obecné požadavky na primery pro typizaci adenovirů, enterovirů i bakteriofágů byly:
 - přítomnost G/ C na začátku primeru k zajištění silné vazby při nasedání a přítomnost A/ T na konci primeru
 - poměr A a T versus C a G asi 50%
 - teplota tání primerů mezi 60 – 65°C

- aby délka PCR produktu nebyla větší než cca 350 – 400 nukleotidů, limitováno délkou čtení použitého sekvenátoru, MiSeq, Illumina

Na konec primeru byla nasyntetizovaná 33 nukleotidů dlouhá sekvence nutná k připojení indexu a adaptéru viz kapitola 2.5.2.

2.3.1 Primery a PCR k typizaci adenoviru

Pro genotypizaci adenovirů byl navrhnout set specifických primerů, které leží na okrajích hypervariabilní oblasti 7 (HVR7) hexonového genu (viz Obrázek), konkrétně mezi 1175 a 1554 nukleotidem genu pro hexon, referenční sekvence AC_000017. Pro návrh primerů bylo nejprve provedeno seřazení homologních úseků referenčních sekvencí pod sebe „alignment“ pomocí algoritmu ClustalW programu Geneious (Geneious verze 8.1, <http://www.geneious.com>, Kearse et al., 2012) viz obrázek 2.1.



Obrázek 2.1 – Zarovnání a seřazení („alignment“) sekvencí HAdV v oblasti v části genu pro hexon.

Znárodnění polohy primerů (zelené trojúhelníky spojené linkou), které leží v konzervovaných oblastech po okrajích hypervariabilní oblasti 7 (je zobrazena mezi primery jako červená oblast identity konsenzu). Obrázek byl vygenerován programem Geneious, (Geneious verze 8.1, <http://www.geneious.com>, Kearse et al., 2012).

Bližší specifikace adenovirových primerů:

- primery byly dlouhé cca 27 nukleotidů
- maximální povolený počet nejednoznačných bazí („ambiguities“) byl 4
- maximální počet bazí, kde se primer odlišuje od referenční sekvence („mismatch“) byl 1 a byla snaha jej umístit spíše na začátek, než na konec primeru

Celkový počet „forward“ primerů: 10 (o délce 30 nt)

Celkový počet „reverse“ primerů: 6 (o délce 29 nt)

Výsledný produkt v „alignmentu“: 409 nukleotidů (výsledné produkty jednotlivých typů mají různé délky v závislosti na přítomnosti insercí a delecí), což je vhodná délka pro sekvenování.

Konkrétní sekvence primerů jsou součástí připravované publikace, proto zde uvedeny nejsou.

Před samotnou PCR bylo potřeba vytvořit směsi primerů reverse a forward.

Postup přípravy PCR produktu vhodného k následné typizaci adenovirového genotypu:

<i>Rozpis reakční směsi pro PCR</i>		
Komponenta, koncentrace, výrobce	μl na 1 vzorek	Finální koncentrace ve směsi
Sterilní voda, Braun, Germany	9,44	
Pufir 10x (obs. MgCl ₂ 15 mM), Qiagen, Germany	1,5	
MgCl ₂ (25 mM), Qiagen, Germany	0,6	2,5 mM celkem
dNTP (5 mM každý), Qiagen, Germany	0,6	200 μM každý
Směs forward primerů, celkem 40 μM	0,38	1 μM
Směs reverse primerů, celkem 40 μM	0,38	1 μM
HotStar Taq polymeráza (5 U/μl), Qiagen, Germany	0,1	0,5 U / 15 μl
DNA templát	2	
CELKOVÝ OBJEM	15	

Do 1,5 ml zkumavky byla připravena reakční směs podle protokolu.

Směs byla promíchána pomocí vortexu, krátce centrifugována (Centrifuga MiniSpin plus Eppendorf, Germany) a následně rozplněna po 13 μl do jednotlivých jamek PCR desky. Ke směsi byla přidána templátová DNA po 2 μl a směs byla promíchána pipetováním. Poté byla deska uzavřena fólií a krátce centrifugována (Centrifuga B4i, Jouan; France).

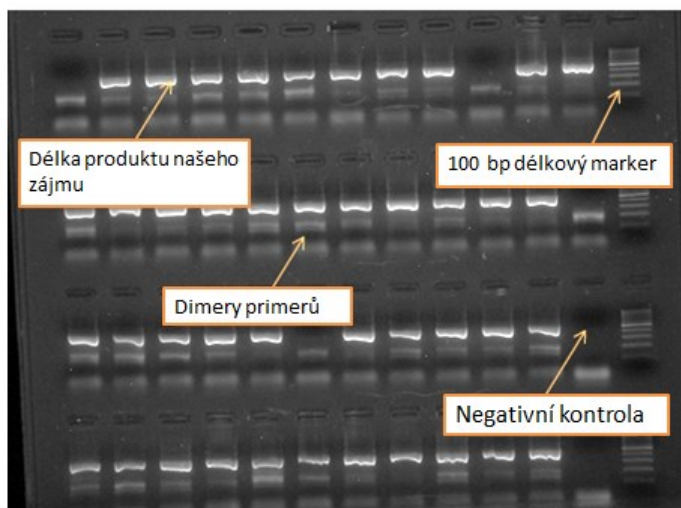
Po umístění do termocykleru, byl spuštěn příslušný program a do dalšího zpracování byly hotové reakce uchovány v lednici.

	teplota	čas
Denaturace	95 °C	15:00
Cykly 45x	94 °C	0:15
	55 °C	1:00
	68 °C	1:00
Finální syntéza	68 °C	5:00
Uchovávání v cycleru	10 °C	∞

Kontrola produktu pomocí elektroforézy:

Produkty PCR reakce byly vizualizovány na gelové elektroforéze.

- Byl připraven gel z horké 2% agarózy v 0,5 x TBE pufru a příslušného množství detekčního barviva (3 µl GelRedTM na 180 ml agarózy). Po nalití do formy a přidání hřebenu, pro vytvoření jamek, gel tuhne při pokojové teplotě.
- V mikrotitrační destičce byl PCR produkt smíchán s nanášecím barvivem (10 µl barviva a 2 µl produktu). Takto připravená směs byla nanášena multikanálovou pipetou do jamek agarózového gelu v elektroforézové vaně. Jako poslední v řadě byl přidán velikostní marker („žebříček“).
- Elektroforéza probíhala 35 minut při 6,75 V/cm. Poté byl gel umístěn na transiluminátor, pozorován při UV záření a následně fotografován.

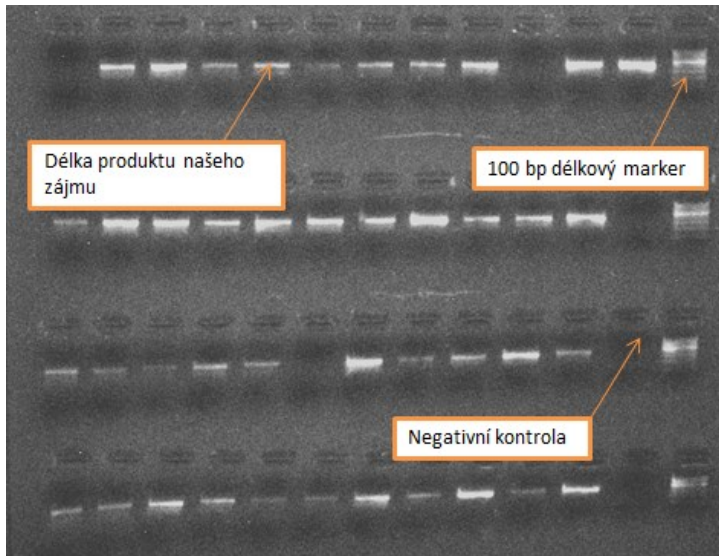


Obrázek 2.2 – Kontrolní gel - adenovirus, HVR 7 genu pro hexon.

Výřez elektroforézového gelu ukazuje délku produktů amplifikace. Nejsilněji svítící pruhy představují HVR7 hexonového genu. V posledním sloupci je umístěn délkový marker (100 bp). Gelová elektroforéza byla také použita pro určení následného poměru AMPure®: vzorek pro přečištění PCR reakce, aby byly odmyty také dimery primerů, které mají délku okolo 100 párů bází. V důsledku přítomnosti dimerů byl stanoven poměr AMPure® 0,7objem vzorku, viz další kapitola.

Přečištění produktů PCR reakce:

Principem přečištění je navázání PCR produktů na magnetické částice obalené oxidem křemičitým a odmytí ostatních komponent PCR reakce 70 % ethanolem. Zvolený poměr vzorek: magnetické částice (AMPure®) ovlivní, jak dlouhé fragmenty se odmyjí (viz obrázky 2.2 a 2.3). Vzhledem k velkému počtu vzorků bylo přečišťování provedeno na robotu Biomek 4000 (Beckman Coulter; USA), reakce běží plně automatizovaně. Příprava procedury byla provedena podle návodu stanoveného výrobcem.



Obrázek 2.3 - Kontrolní gel po přečištění.

Obrázek ukazuje produkt amplifikace HVR 7 genu hexonu (HAdV) po přečištění, kdy bylo množství AMPure[®] stanoveno na 0,7 objem vzorku. V posledním sloupci je velikostní marker.

2.3.2 Primery a PCR k typizaci enteroviru

Prvním krokem přípravy PCR produktů enteroviru určených k typizaci je přepis virové RNA do cDNA. Pro reverzní transkripci a následnou PCR amplifikaci cDNA byly zvoleny primery publikované ve studii (Nix et al., 2006) s následnými modifikacemi provedenými Laboratoří molekulární genetiky, 2. LF UK. PCR probíhá dvoukolově, kdy je na první kolo použita dvojice degenerovaných primerů (výsledný produkt je dlouhý přes ~500bp), ve druhém kole je použita směs forward a reverse primerů a výsledný produkt je dlouhý ~300bp. Adaptéry nutné pro další kroky sekvenování nové generace jsou součástí primerů určených ke druhému kolu PCR.

Primery pro druhé kolo byly také zvoleny podle článku (Nix et al., 2006) a modifikovány. Konkrétní sekvence primerů pro 2. kolo PCR jsou součástí připravované publikace, proto zde uvedeny nejsou.

Reverzní transkripce:

<i>Rozpis reakční směsi pro reverzní transkripci</i>		
Komponenta, koncentrace, výrobce	μl na 1 vzorek	Finální koncentrace ve směsi
Denaturovaná směs primerů- Nix-RT (4 x 1 μM)	1	1 pM každý
5 x First-strand buffer, Invitrogen, USA	2	1x
0,1 M DTT, Invitrogen, USA	0,5	0,005 M
dNTP (5 mM každý), Qiagen, Germany	0,5	200 μM každý
SuperScript III Reverse Transcriptase III (200 U/μl), Invitrogen, USA	0,5	100 U/r
RNAsin RNA inhibitor (40 U/μl), Promega, USA	0,5	20 U/r.
RNA templát	5	
CELKOVÝ OBJEM	10	

Nejprve byla připravena denaturovaná směs primerů: do 1,5 ml zkumavky bylo přidáno příslušné množství směsi primerů a inkubováno při 65°C po dobu 5 minut, poté uchováváno na ledu. K primerům byly postupně přidány zbylé složky reakční směsi podle protokolu, kromě RNA.

RNA byla samostatně napipetována (5 μl) do sterilní PCR desky, uzavřena fólií, krátce centrifugována a umístěna do termocykléru (65°C, 5 minut), poté prudce zchlazena ve směsi ledu s vodou.

Stále na ledu byla ke vzorkům přidána reakční směs (5 μl). Poté byla uzavřená deska přenesena do termocykléru a spuštěn příslušný program.

<i>Program pro reverzní transkripci</i>		
	teplota	čas
Nasednutí primeru	22°C	15:00
Reverzní transkripce	50°C	45:00
Inaktivace reverzní tr.	70°C	15:00
Skladování	10°C	∞

Dále byla cDNA uchovávána v -20°C nebo ihned zpracována jako templát.

PCR amplifikace, 1. kolo:

<i>Rozpis reakční směsi pro 1. kolo PCR</i>		
Komponenta, koncentrace, výrobce	μl na 1 vzorek	Finální koncentrace ve směsi
Sterilní voda , Braun, Germany	15,25	
Pufr 10x (obs. MgCl₂ 15 mM) , Qiagen, Germany	2,5	1x
MgCl₂ (25 mM) , Qiagen, Germany	1,0	2,5 mM celkem
dNTP (5 mM každý) , Qiagen, Germany	1,0	200 μM každý
Primer 224 (20 μM)	1,25	1 μM
Primer 222 (20 μM)	1,25	
HotStar polymeráza (5 U/μl) , Qiagen, Germany	2,5	1,25 U / r.
cDNA templát	2,5	
CELKOVÝ OBJEM	25	

Do 1,5 ml zkumavky byla připravena reakční směs podle protokolu. Směs byla promíchána pomocí vortexu, krátce centrifugována a následně rozplněna po 22,5 μl do jednotlivých jamek PCR desky. Ke směsi bylo přidáno 2,5 μl templátové DNA (tato DNA byla už dříve izolována ze vzorků stolic a poté uchována v -20 °C). Poté byla deska uzavřena fólií a krátce centrifugována. Po umístění do termocykleru byl spuštěn příslušný program.

<i>Program pro 1. kolo PCR</i>		
	teplota	čas
Denaturace	95°C	15:00
Cykly 40x	94°C	0:30
	42°C	0:30
	60°C	1:00
	60°C	2:00
Finální syntéza	60°C	2:00
Skladování	15°C	∞

PCR amplifikace, 2. kolo:

<i>Rozpis reakční směsi pro 2. kolo PCR</i>		
Komponenta, koncentrace, výrobce	μl na 1 vzorek	Finální koncentrace ve směsi
Sterilní voda, Braun, Germany	6,3	
Pufř 5x (Green GoTaq), Promega, USA	3,0	1x
MgCl ₂ (25 mM), Qiagen, Germany	1,5	2,5 mM celkem
dNTP (5 mM každý), Qiagen, Germany	0,6	200 μM každý
Primery E2F: směs forward primerů (20 μM)	0,75	1 μM
Primery E2R: směs reverse primerů (20 μM)	0,75	
GoTaq G2 HotStar polymeráza (5 U/μl), Promega, USA	0,1	0,5 U / r.
ředěný produkt 1. kola (1:4)	2,0	
CELKOVÝ OBJEM	15	

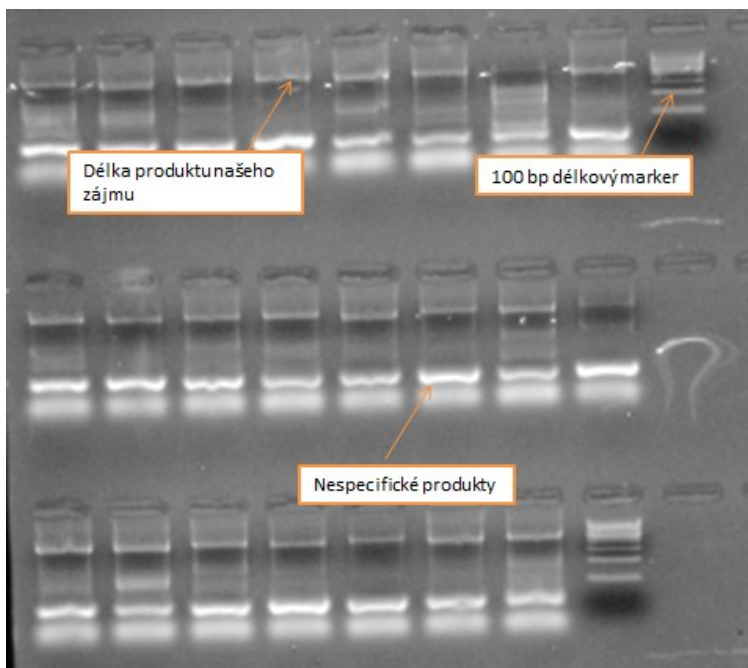
Do 1,5 ml zkumavky byla připravena reakční směs podle protokolu. Směs byla promíchána pomocí vortexu, krátce centrifugována a následně rozplněna po 13 μl do jednotlivých jamek PCR desky. Ke směsi byly přidány 2 μl produktu z prvního kola PCR (tento produkt byl předem naředěn injekční vodou v poměru 1:4). Poté byla deska uzavřena fólií a krátce centrifugována.

Po umístění do termocykleru byl spuštěn příslušný program.

<i>Program pro 2. kolo PCR</i>		
	teplota	čas
Denaturace	95°C	2:00
Cykly 35 x	95°C	0:15
	55°C	1:00
	72°C	0:45
Finální syntéza	72°C	5:00
Skladování	10°C	∞

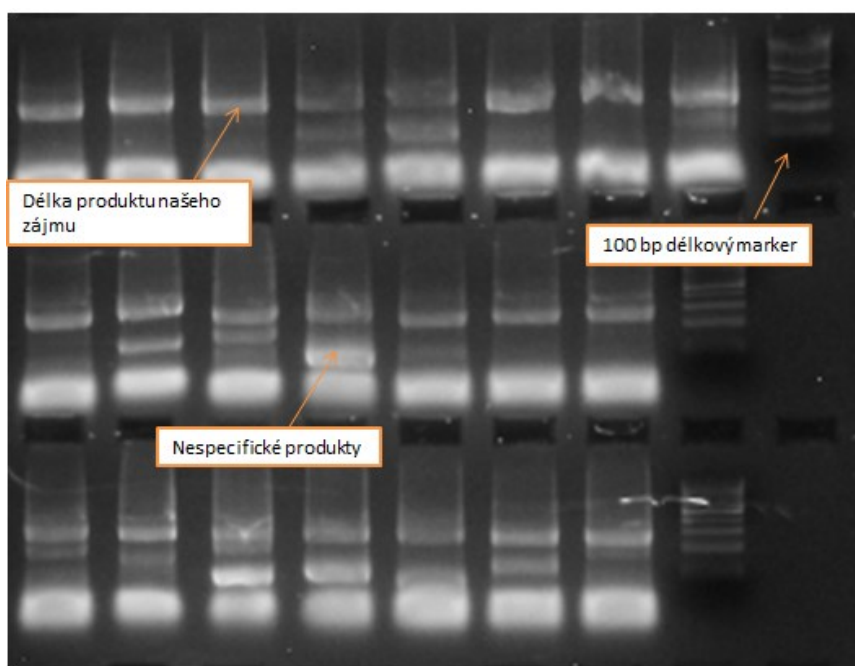
Elektroforéza:

Kontrolu produktů na elektroforetickém gelu jsme prováděli po 1. kole PCR a 2. kole PCR. Přečištění vzorků po PCR jsme provedli pouze po 2. kole PCR. Laboratorní úkony pro elektroforézu byly stejné jako v předchozí kapitole pro adenovirus.



Obrázek 2.4 – Elektroforetický gel po prvním kole PCR (EV, oblast genu pro VP1).

Amplifikované produkty bývají po prvním kole PCR pouze slabě pozitivní, jak je vidět i z obrázku. Díky druhému kole PCR dojde k zesílení signálu amplifikací cílových produktů. Mohlo se stát, že některé vzorky byly po prvním kole PCR na gelu negativní, po druhém kole PCR už byl na gelu patrný pruh o požadované délce.



Obrázek 2.5 – Elektroforetický gel po druhém kole PCR (EV, oblast genu pro VP1).

Z obrázku je nyní patrné, že po proběhnutí druhého kola PCR se signál produktů značně zesílil, oproti slabému signálu po prvním kole PCR. Došlo však také k zesílení signálu nespecifických produktů, ty jsou však v dalším kroce odmyty pomocí AMPure®. Zobrazení délky produktů na gelu umožní zvolení správného poměru AMPure® – vzorek.

Po druhém kole PCR byly vzorky přečištěny pomocí robotu Biomek 4000, množství AMPure[®] bylo stanoveno na 0,7 objem PCR produktu. Produkty byly předtím také doplněny sterilní vodou na objem 30 μ l.

2.3.3 Primery a PCR k typizaci vybraných bakteriofágů

Referenční sekvence bakteriofágů byly vybrány na základě výsledků z metagenomického sekvenování viromu, viz kapitola 2.3 („obecný princip“) a rozděleny do skupin podle jejich zařazení do rodu. Následně byly zobrazeny anotace všech genů v bakteriofágových genomech a na základě nich vytvořeny další podskupiny fágů s přibližně stejnou stavbou genomu. Příklad takového rozdělení je uveden na obrázku 2.6. Z příslušných podskupin fágových genomů byl proveden „alignment“ pomocí ClustalW implementovaného v programu Geneious (Geneious verze 8.1, <http://www.geneious.com>, Kearse et al., 2012), který zobrazil shodné a variabilní oblasti bakteriofágových genomů.



Obrázek 2.6 A - Podskupina Lambda fágů.

Pomocí srovnání shodných úseků sekvencí pod sebe („alignmentu“) bylo možné identifikovat oblast s největší shodou (zobrazená zeleně v konsensu) vhodnou k použití pro primery.

Obrázek 2.6 B - Část zarovnání sekvencí („alignmentu“) fágů infikujících laktokoky s velmi podobnou organizací genomu. Konsensus vyznačuje místa s větší shodou (khaki zelená) a místa naprosto neshodná (červeně). Šipkou je na obrázku vyznačeno místo, kde ačkoli má gen stejnou funkci u všech bakteriofágů, podobnost na úrovni nukleotidů mezi nimi je nízká.

Primery byly navrženy tak, aby nasedaly na oblasti shodné pro co nejvíce fágů v příslušné podskupině a aby překrývaly oblasti, které jsou schopné tyto fágy mezi sebou rozlišit. To se však ukázalo být problematické, protože bakteriofágy byly v jednotlivých genech buďto téměř

shodné, nebo v celé sekvenci genu rozdílné, viz obrázek 2.6 A, B. Konkrétní sekvence primerů jsou součástí připravované publikace, proto zde uvedeny nejsou.

Specifikace bakteriofágových primerů v panelu:

Tabulka 2.1 – Primery pro typizaci bakteriofágů.

Tabulka uvádí názvy primerů (případně směsi primerů), geny pro které byl primer navržen a jaké reference primery detekují (či směsi primerů, které byly společně v reakční směsi, jsou ohraničeny tučně).

název primeru	detekovaný gen	referenční sekvence
Ph_Lacto_mcp	hlavní kapsidový protein	KP793135.1, KP793119.1, KP793121.1, KP793112.1, KP793116.1, KP793114.1, KP793103.1, KP793111.1, KP793105.1, KP793123.1, KP793110.1, KP793124.1, KP793108.1, KP793109.1, KP793107.1, KP793131.1, KP793113.1, KP793118.1, KP793129.1, KP793122.1, KP793133.1, KP793128.1, KP793132.1, KP793134.1, KC182544.1, NC_021860.1, NC_021854.1, NC_021852.1, NC_021855.1, NC_001629.1, NC_001706.1, NC_031009.1, NC_031002.1, KX373692.1, NC_008370.1, NC_011046.1, NC_001909.1, NC_013155.1, NC_013152.1, FJ848884.1, NC_008363.1, GQ979703.1, KF676640.1, NC_028900.1
Ph_Lacto_lt1	velká terminázová podjednotka	
Ph_Lacto_lt2	velká terminázová podjednotka	
Ph_Lacto_tmp	„tape measure“ protein	
Ph_Lambda_1	vlákno bičíku	NC_019708.1, NC_019709.1, NC_019705.1, NC_019721.1, NC_016160.1, NC_002166.1, NC_002167.1, NC_019716.1, NC_019711.1, NC_009514.1, EU078592.1, KT232076.1, NC_001416.1, KU238068.1, NC_011357.1, NC_004813.1, NC_019717.1, NC_019704.1, NC_021190.1, NC_019720.1, NC_016158.1
Ph_Lambda_2	vlákno bičíku	
Ph_Lambda_3	vlákno bičíku	
Ph_Lambda_4	vlákno bičíku	
Ph_Lambda_5	vlákno bičíku	
Ph_K1	velká terminázová podjednotka	NC_027993.1, NC_027994.1, GU196279.1, GU196280.1, GU196281.1
Ph_P22_1	přídavný protein bičíku	NC_011976.1, NC_018275.1, NC_005344.1, CP000711.1, KR296687.1, NC_005841.1, NC_011802.1, NC_014900.1
Ph_P22_2	DNA stabilizační protein	
Ph_P22_3	gen pro rekombinaci	
Ph_Eps_podo1	adenin metyláza	NC_019445.1, NC_019442.1,
Ph_Eps_podo2	adenin metyláza	
Ph_O157typing	protein spojující kapsidu s bičíkem	KP869108.1
Ph_Ph933W	exonukleáza	NC_011356.1, FM180578.1, KP682380.1, KP682381.1, KP682392.1, NC_004913.3, AP004402.1
Ph_P1_1	trans glykosiláza	FO818745.1, AF234173.1, NC_005856.1, AF503408.1, NC_031129.1
Ph_P1_2	„Sit“ protein	
Ph_Phifel	RecT protein	GQ478082.1, GQ478083.1, NC_013643.1, GQ478085.1, NC_013648.1, GQ478087.1

Ph_Lacobac	protein bičiku	NC_028830.1
Ph_WW_1	protein F	NC_026582.1, NC_026612.1, NC_026613.1
Ph_WW_2	protein F	
Ph_WW	protein F	
Ph_EnterophiX174	hlavní kapsidový protein	HM753718.1
Ph_Ecocc_F3	vlákno bičiku	NC_017732.1, NC_013644.1
Ph_Bifido	hlavní kapsidový protein	GQ141189.1

Postup přípravy PCR produktu:

<i>Rozpis reakční směsi pro PCR</i>		
Komponenta, koncentrace, výrobce	μl na 1 vzorek	Finální koncentrace ve směsi
Sterilní voda, Braun, Germany	6,9	
Pufř 5x (Green GoTaq), Promega, USA	3,0	1x
MgCl ₂ (25 mM), Qiagen, Germany	1,5	2,5 mM celkem
dNTP (5 mM každý), Qiagen, Germany	0,6	200 μM každý
*primer forward/směs forward primerů (20μM):	0,45	0,6 μM
*primer reverse/směs reverse primerů (20μM)	0,45	0,6 μM
Promega G2 HotStart polymeráza 5U/μl, Promega, USA	0,1	0,5 U / 15 μl r.1x
Templát	2,0	
CELKOVÝ OBJEM	15,0	

* Pro každý primer nebo směs primerů detekující konkrétní řádovou podskupinu byla vytvořena reakční směs zvlášť. Na základě počtu primerů (nebo směsí primerů detekujících stejnou řádovou podskupinu) bylo vytvořeno 14 reakčních směsí, které byly použity na vybrané vzorky.

Do 1,5 ml zkumavky byla připravena reakční směs podle protokolu. Směs byla promíchána pomocí vortexu, krátce centrifugována a následně rozplněna po 13 μl do jednotlivých jamek PCR desky. Ke směsi byly přidány 2 μl templátu. Poté byla deska uzavřena fólií a krátce centrifugována. Po umístění do termocyklu byl spuštěn příslušný program.

<i>Program pro PCR</i>		
	teplota	čas
Denaturace	95°C	2:00
Cykly 35 x	95°C	0:15
	55°C	1:00
	72°C	0:45
Finální syntéza	72°C	5:00
Skladování	10°C	∞

Elektroforéza a přečištění produktů PCR reakce:

Každá PCR reakce na vybranou skupinu bakteriofágů byla kontrolována na gelové elektroforéze. Následně byly všechny PCR reakce od stejného pacienta smíchány dohromady ve stejném poměru a takto byly použity pro další postup přípravy knihovny k NGS.

Přípravu PCR produktů bakteriofágů prováděl student 2. LF UK, proto zde obrázky gelové elektroforézy neuvádím.

Pro přečištění byl AMPure® přidáván v množství 0,7 objem vzorku.

2.4 Testování specifity navržených primerů a PCR

Specifita navržených primerů byla otestována pomocí setu vzorků se známým typem.

- Pro testování specifity primerů k různým **adenovirovým typům** jsme obdrželi 47 vzorků z laboratoře Prof. E. Claase (Department of Medical Microbiology LUMC, Leiden). Vzorky byly typizovány i sérologicky. Příslušné typy včetně jejich naměřených kvantit ve vzorku jsou detailně vypsány v tabulce 3.1 v kapitole - Výsledky. Ke kvantifikaci adenovirové nálože byla použita sensitivní PCR reakce detekující konzervativní část adenovirového hexonu (Claas et al., 2005), s kalibrační křivkou se standardy o známé kvantitě.
- Pro testování specifity primerů k různým **enterovirovým typům** jsme využili sbírky Prof. S. Jeanssona (Oslo, Norsko). Z důvodu vysokých a rozdílných kvantit byla jejich kvantita měřena pomocí sensitivní PCR detekující netranslatovanou oblast enterovirového genomu podle publikované PCR se standardy o známé kvantitě (Honkanen et al., 2013) Vzorky byly dále naředěny na kvantitu 500000 kopií/ μ l RNA. Vzorky jsou popsány v kapitole - Výsledky (tabulka 3.3).

Kromě testování specifity navržených primerů, byly vytvořeny také směsné vzorky s více než jedním typem přítomným ve vzorku (v různém poměru). Směsi byly navrženy tak, aby bylo patrné, že pomocí navržené metodiky lze detekovat i dva genotypy s nestejnou kvantitou ve vzorku a také různě fylogeneticky příbuzné genotypy.

Směsných vzorků pro adenovirus bylo celkově připraveno 41, vzorky zahrnovaly 6 typů v různých poměrech (tabulka 3.2)

Enterovirové směsi byly připraveny z 6 dvojic typů, ve 3 poměrech ředění. Detailní přehled testovaných vzorků je popsán ve výsledcích (tabulka 3.4)

2.4.1 Specifikace subjektů a vzorků, jejichž virové genomy byly typizovány pomocí navržené metodiky

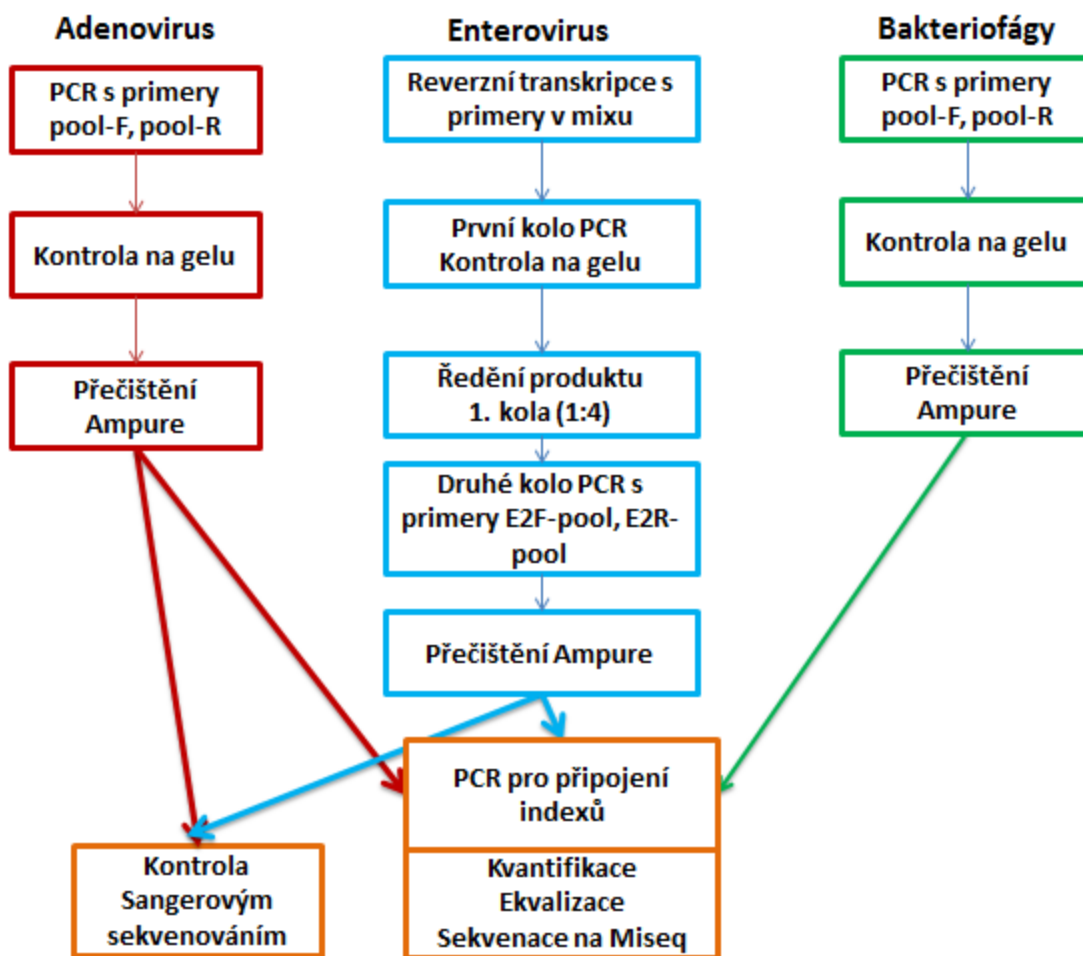
Děti byly do kohort DIPP a MIDIA zařazeny na základě genetického screeningu.

Tabulka 2.2 – Charakterizace vzorků vybraných pro tuto práci.

Tabulka zobrazuje, z jakých kohort vzorky pocházely, jak často a v jakém věku byly vzorky sbírány, kolik vzorků bylo vybráno pro naši práci a jaké viry jsme v daných vzorcích typizovali.

* Vzorky byly vybírány z adenovirus/ enterovirus pozitivních vzorků, po předchozí kvantifikaci pomocí PCR v reálném čase.

Zkratka: celý název	Země	Časové intervaly odběru vzorků	Věk dětí	Celkový počet vzorků	Počet vybraných vzorků *	Co bylo typizováno
MIDIA: „Miljøårsaker til diabetes type 1 (environmentální spouštěče diabetu 1. typu)	Norsko	vzorek stolice: 1 x měsíčně	od 0 do 36 měsíců	2 673 vzorků stolic	254 vzorků pozitivních na adenovirus 229 vzorků pozitivních na enterovirus	Ve vybraných vzorcích byl typizován adenovirus a enterovirus.
DIPP: Diabetes Prediction and Prevention	Finsko	vzorek stolice: každé 3 měsíce	vybrané subjekty nebyly starší více než 1 rok	40 vzorků s neznámým obsahem bakteriofágů	40 vzorků s neznámým obsahem bakteriofágů	Ve vybraných vzorcích byly detekovány a typizovány vybrané bakteriofágy.
Subjekty ze studie případů a kontrol z Afriky a Asie, jejich data byly sbírány za účelem studie ve spolupráci s Laboratoří molekulární genetiky, 2 LF UK	Nigérie Jordánsko Súdán Ázerbájdžán	1 vzorek odebrán 3-14 dní po diagnostikovaném T1D	od 3 do 19 let	178 vzorků s neznámým obsahem bakteriofágů	178 vzorků s neznámým obsahem bakteriofágů	Ve vybraných vzorcích byly detekovány a typizovány vybrané bakteriofágy.



Obrázek 2.7 - Schéma postupu práce pro amplifikaci a následnou sekvenaci vybraných virů. Obrázek stručně shrnuje hlavní kroky potřebné pro úspěšnou genotypizaci virů pomocí metodiky prezentované v této práci.

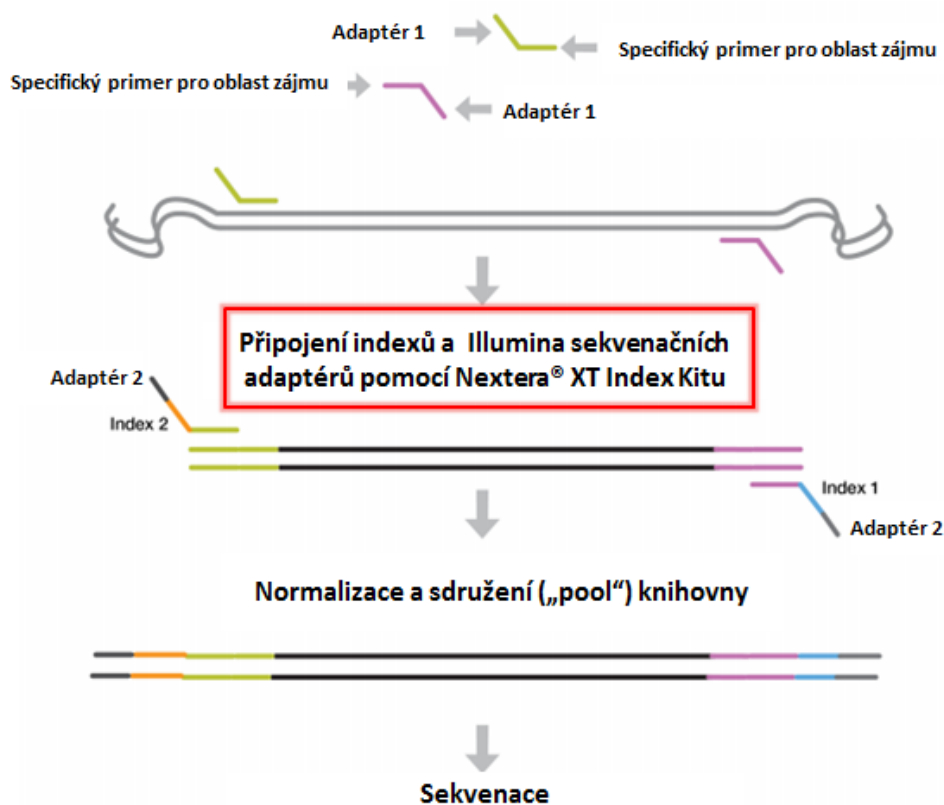
2.5 Příprava vzorků k NGS

Ze vzorků stolic byla připravena suspenze, ze které byla izolována celková RNA a DNA. Obsah enterovirové a adenovirové nálože byl zjištěn pomocí PCR v reálném čase s kvantitativní křivkou (Claas et al., 2005). Izolace nukleových kyselin a jejich kvantifikace pomocí PCR nebyla nápní mé práce, proto zde nebude uveden přesný postup. Pro identifikaci genotypu virů pomocí navržené metodiky byly vybrány jen vzorky pozitivní na adenovirus/enterovirus po PCR v reálném čase (vzorky pro genotypizaci bakteriofágů nebyly vybrány na základě kvantifikace). Vybrané vzorky blíže specifikuje tabulka 2.2, sloupec “vybrané vzorky”. Následně byly provedeny PCR reakce popsané v kapitolách 2.3.1 – 2.3.3.

Níže popsaná procedura byla shodná pro všechny produkty PCR amplifikace a zahrnovala následující kroky:

2.5.1 Opatření ampliconů indexy

Každý vzorek byl opatřen jedinečnou kombinací dvou indexů. Napojení indexů na amplicony a stručné představení celé procedury přípravy knihovny ukazuje obrázek 2.8.



Obrázek 2.8 – Postup přípravy vzorků pro NGS.

V prvním kroku je popsána PCR se specifickými primery (v našem případě primery pro genotypizaci adenovirů/ enterovirů/ vybraných bakteriofágů), které jsou na konci opatřeny sekvencí adaptéru (Adaptér 1).

Ve druhé kroku jsou na sekvence adaptéru 1 připojeny indexy (Index 1/ 2), různé z obou stran našeho produktu (produkt je identifikován právě unikátní kombinací indexů). K indexům je připojen adaptér 2 sloužící k pozdějšímu přichycení na sekvenační destičce („flowcell“).

Na konci proběhne normalizace koncentrace všech produktů a jejich smíchání dohromady („pool“), poté je knihovna denaturována a sekvenována (převzato a přepracováno z https://support.illumina.com/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf).

Postup:

Připravili jsme reakční směs podle následujícího rozpisu.

Reakční směs pro připojení indexů k produktům		
Komponenta, koncentrace, výrobce	µl na 1 vzorek	Finální koncentrace ve směsi
sterilní voda, Braun, Germany	1,5	

KAPA HiFi HotStart ReadyMix (2X) , Kapa Biosystems by Roche, USA	7,5	1x
Index i7 (Nextera® XT Index Kit) , Illumina, USA	1,5	
Index i5 (Nextera® XT Index Kit) , Illumina, USA	1,5	
Přečištěný amplifikovaný produkt	3,0	20%
CELKOVÝ OBJEM	15	

Reakční směs byla pipetována do PCR desky po 9 μ l. Ke směsi byl přidán produkt (3 μ l) určený pro připojení indexů a dále unikátní kombinace indexů (1,5 μ l každého indexu) pro každý vzorek. Indexy slouží k identifikaci vzorku při sekvenování. Příklad pro pipetování indexů je naznačen na obrázku 2.9.

	N701	N702	N703	N704	N705	N706	N707	N708	N709	N710	N711	N712
A S502	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→
B S503	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→
C S505	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→
D S506	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→
E S507	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→
F S508	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→
G S510	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→
H S511	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→

Obrázek 2.9 – Příklad použití indexů pro 96 vzorků v reakci.

Šipky znázorňují směr přidávání jednotlivých indexů ke vzorku, vznikne tak 96 unikátních kombinací indexů, které slouží k identifikaci vzorku.

Pro připojení indexů byl použit následující program.

<i>Program pro připojení indexů</i>		
	teplota	čas
Denaturace	95°C	3:00
Cykly 8 x	95°C	0:30
	55°C	1:00
	72°C	0:30
Finální syntéza	72°C	5:00
Skladování	10°C	∞

Tento postup provedeme se všemi PCR produkty adenovirů, enterovirů a bakteriofágů. Kontrolu produktů na elektroforéze neprovádíme.

PCR produkty byly přečištěny pomocí magnetických kuliček AMPure® stejným způsobem (a stejným poměrem AMPure®) jako v předchozích procedurách (popsané v kapitole 2.3.1).

2.5.2 Kvantifikace vzorků a normalizace knihoven

Pro kvantifikaci vzorků byl použit kit Illumina Library Quantification Kit (KAPA Biosystems, USA), který obsahuje primery detekující pouze fragmenty opatřené adaptory. Součástí kitu je i skupina standardů o známé kvantitě, která umožňuje přesnou kvantifikaci jednotlivých vzorků. Příprava PCR reakce a její teplotní profil probíhaly podle instrukcí výrobce (teplotní profil je popsán níže v tabulce). Kvantifikace byla provedena na přístrojích LightCycler® 480 Instrument (Roche, Switzerland) nebo CFX384 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Biorad, USA).

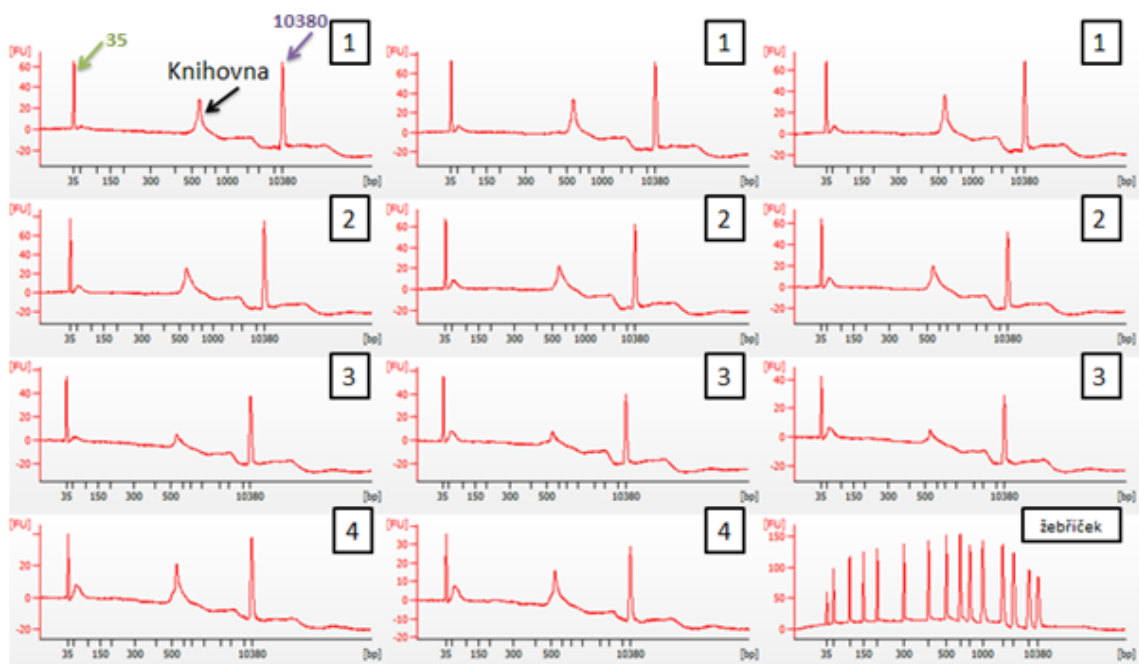
<i>Program pro kvantitativní PCR</i>		
	teplota	čas
Aktivace/ Denaturace	95°C	5:00
Cykly 35 x čtení fluorescence →	95°C	0:30
	60°C	0:45

Získané kvantity byly použity k následnému naředění vzorků na stejnou koncentraci. To zajistí přibližně stejný počet cílových sekvencí ve vzorcích, který je nutný k porovnávání výsledků jednotlivých vzorků mezi sebou. Z důvodu velkého množství vzorků byl pro ředění použit robot Biomek 3000 (Beckman Coulter, USA) s programem vyvinutým Laboratoří molekulární genetiky. Vzorky jsou ředěny na stejnou koncentraci sterilní vodou.

Zvolená finální koncentrace vzorků byla určena vzorky s nižší koncentrací a byla nastavena na 500 pM. Následně byly naředěné vzorky smíchány do výsledné směsi („pool“) ve stejných poměrech.

2.5.3 Kontrola kvality knihovny

Po smíchání vzorků byla provedena kontrola kvality směsi vzorků na automatizované vysoce citlivé elektroforéze (2100 Bioanalyzer Instrument, Agilent Technologies, USA) s použitím kitu (Agilent High Sensitivity DNA Kit, Agilent High Sensitivity DNA Reagents, Agilent Technologies, USA). Výsledky kontroly kvality připravené knihovny jsou znázorněny na obrázku 2.10.



Obrázek 2.10 – Elektroforeogram kontroly adenovirových vzorků.

Jednotlivé obrázky ukazují kvalitu směsí našich vzorků („pool“) z 96 jamkové desky. Tyto proudky se na konec smíchaly do výsledné směsi, obsahující 384 vzorků na jeden běh NGS. Čísla v rámečcích (1, 2, 3, 4) označují čtyři směsi vzorků. Obrázek vpravo dole je velikostní marker („žebříček“). Osa Y udává hodnotu intenzity fluorescence, osa X velikost produktů (v párech bází). První a poslední bod každého elektroforeogramu je marker s definovanou kvantitou i délkou, který umožňuje kvantifikaci směsi.

2.5.4 Sekvenování nové generace

Posledním krokem před samotným sekvenováním byla denaturace knihovny a její naředění na 6 pM. Denaturace probíhala chemicky přidávkem 6 μ l 0,2 M NaOH k 20 μ l knihovny o koncentraci 500 pM. Použita byla také teplotní denaturace při 90°C po dobu 2 minut. Poté byla směs doplněna vychlazeným hybridizačním pufrům (součást kitu Nextera XT DNA library prep kit) a 6 μ l 0,2 M HCl nutné k neutralizaci NaOH. Následně se knihovna naředí hybridizačním pufrům na koncentraci 6 pM. Připravená směs vzorků je pak sekvenována na přístroji Miseq (Illumina, USA) pomocí kitu (MiSeq Reagent Kit v2 500cycle).

2.6 Analýza dat

Výsledné sekvence prošly několika kroky filtrace na základě kvality a obsah sekvencí byl identifikován pomocí panelu referenčních sekvencí genotypů adenovirů, enterovirů a bakteriofágů. Tyto kroky byly provedeny dle postupů Laboratoře molekulární genetiky, 2 LF UK. Výsledky byly srovnány do tabulky a následně analyzovány.

Grafy a tabulky byly vytvořeny v programu Microsoft Excel (Jones, 2010) a v programu R (R Core Team, 2017)

2.7 Fylogenetická analýza

Pro fylogenetickou analýzu sekvencí byl nejprve proveden „alignment“ sekvencí pomocí nástroje ClustalW implementovaného v programu Geneious (Geneious version (8.1), <https://www.geneious.com>, Kearse et al., 2012). Různě dlouhé konce „alignmentu“ byly zarovnané. Výsledný „alignment“ pro fylogenetickou analýzu adenoviru činilo 271 nukleotidů, výsledný „alignment“ VP1 genu pro typizaci enteroviru byl dlouhý 257 nukleotidů.

Pro fylogenetickou analýzu byly zvoleny tyto parametry:

- „Genetic Distance Model“: Jukes-Cantor
- Metoda: „Neighbor-Joining“

Pro každý fylogenetický strom byla vybrána sekvence blízké příbuzného viru, který však již nepatří do testovaného rodu *Enterovirus* či *Mastadenovirus* a která slouží jako „outgroup“. Tyto sekvence byly NC 010810.1 (Human TMEV-like cardiocivirus) pro rod *Enterovirus* a KP144329.1 (Penguin siadenovirus A) pro adenovirové sekvence.

Bootstrapová hodnota je udávána v procentech (hodnota označuje jistotu, s jakou se sekvence zařadí do příslušné větve, když se stejná analýza různých podmnožin těchto sekvencí provede 100x, minimum, kdy je vytvořená větev považována za správnou je 70%).

Fylogenetická vzdálenost mezi jednotlivými sekvencemi je dána hodnotou délky uvedené ve spodní části fylogenetického stromu (vynásobením tohoto čísla stokrát dostaneme procentuální odlišnost mezi sekvencemi).

Analýza byla provedena pouze pro sekvence na úrovni nukleotidů.

3. Výsledky

Kapitola 3.1 zahrnuje výsledky testování navržené metodiky. Vybrané vzorky zahrnovaly 47 známých adenovirových typů a 30 známých enterovirových typů. Ze vzorků byly také připraveny směsi dvou typů, zásobní typy byly nejprve kvantifikovány (Claas et al., 2005; Honkanen et al., 2013) a na základě jejich kvantit byly vytvořeny směsné vzorky v různých poměrech.

V kapitole 3.2 jsou uvedeny výsledky získané po použití navržené metodiky na vybrané vzorky s neznámým typem: vzorky pre-diabetických kohort MIDIA (259 vzorků adenovirus-pozitivních a 230 enterovirus-pozitivních), vzorky kohorty DIPP (40 vzorků) a vzorky ze studie případů a kontrol z Afriky a Asie (178 vzorků)

Kapitola 3.3 obsahuje vytvořené fylogenetické stromy ze sekvencí genotypizovaných adenovirů a enterovirů z vybraných vzorků kohorty MIDIA.

3.1 Testování navržené metodiky pomocí vzorků se známým typem viru

Tabulka 3.1 - Výsledky testování navržené metodiky se vzorky se známým adenovirovým typem.

Přehled 47 testovaných typů adenovirů.

V prvním sloupečku je testovaný typ, jak byl identifikován odesílačím laboratoří, druhý sloupec zaznamenává naměřenou kvantitu pomocí PCR v reálném čase se standardní křivkou, třetí sloupec udává procento čtení ve vzorku, ve kterých byl identifikován příslušný genotyp a poslední sloupec udává identifikaci genotypu určeného naší metodikou.

* Vzorek byl znovu sekvenován klasickým Sangerovým sekvenováním pomocí stejných primerů, ale i pomocí primerů detekujících delší usek, s výsledkem určujícím typ 56.

** Vzorky byly identifikovány pomocí navržené metodiky jinak, než jak bylo určeno v odesílačím laboratoří, výsledek se lišil po sekvenování NGS a byl potvrzen klasickým Sangerovým sekvenováním, pomocí stejných primerů, ale i pomocí primerů detekujících delší usek.

HAdV – lidský adenovirus

NA - neidentifikováno

testovaný genotyp	kvantita (počet kopií/μl)	% čtení NGS	výsledek NGS
HAdV1	9,76	68%	HAdV1
HAdV2	99,34	28%	HAdV2
HAdV3	3,4	54%	HAdV3
HAdV4	NA	32%	HAdV4
HAdV5	30,4	53%	HAdV5
HAdV6	3,6	55%	HAdV6
HAdV7	3,8	33%	HAdV7
HAdV9	2,1	38%	HAdV9
HAdV10	5	33%	HAdV10
HAdV11	1,7	39%	HAdV11
HAdV12	25,1	53%	HAdV12
HAdV13	2	38%	HAdV13
HAdV14	1,9	42%	HAdV14
HAdV15	4,4	43%	HAdV15
HAdV16	NA	45%	HAdV16
HAdV17	21,1	46%	HAdV17
HAdV18	NA	41%	HAdV18
HAdV19	4,7	40%	HAdV19
HAdV20	0,9	36%	HAdV20
HAdV21	9,3	6%	HAdV21
HAdV23	0,2	36%	HAdV23
HAdV24	0,46	45%	HAdV24
HAdV25	0,05	44%	HAdV25
HAdV26	0,8	4%	HAdV26

testovaný genotyp	kvantita (počet kopií/μl)	% čtení NGS	výsledek NGS
HAdV27	10	38%	HAdV27
HAdV28	8,7	32%	HAdV28
HAdV29	4,3	20%	HAdV29
HAdV30 *	4,5	27%,	HAdV56
HAdV32	11,8	39%	HAdV32
HAdV33	3,8	49%	HAdV33
HAdV35	80,2	50%	HAdV35
HAdV36	1,7	45%	HAdV36
HAdV37	6,8	48%	HAdV37
HAdV38	10,5	90%	HAdV38
HAdV39	3,6	48%	HAdV39
HAdV40	NA	3%	HAdV40
HAdV41	0,83	57%	HAdV41
HAdV42	1,1	55%	HAdV42
HAdV43	1,6	54%	HAdV43
HAdV44	2,6	55%	HAdV44
HAdV45	5,8	37%	HAdV45
HAdV46	3	50%	HAdV46
HAdV47	3,8	45%	HAdV47
HAdV48	17,6	37%	HAdV48
HAdV49	7,6	45%	HAdV49
HAdV50 **	26,9	35%	HAdV51
HAdV51 **	9,6	57%	HAdV50

Tabulka 3.2 - Výsledky testování navržené metodiky na směsných vzorcích se známými adenovirovými typy

Přehled směsných vzorků dvou různých genotypů adenovirů v různých poměrech. První sloupec zaznamenává dva použité genotypy, druhý sloupec vyjadřuje poměr kvantit, třetí a čtvrtý sloupec udává procento čtení ve vzorku z našeho NGS panelu, ve kterém byl identifikován příslušný genotyp. Směsi byly navrženy tak, aby bylo patrné, že pomocí navržené metodiky lze detekovat i dva genotypy s nestejnou kvantitou ve vzorku. Z tabulky můžeme vidět, že genotyp zastoupený ve vzorku v nižším poměru byl vždy detekován, nicméně poměr ne vždy odpovídal očekávanému výsledku.

* genotypy byly vybrány pro jejich blízkou fylogenetickou příbuznost (dle fylogenetického stromu na straně 20 je procento odlišnosti mezi celými genomy zhruba 2%)

** genotypy byly vybrány pro jejich středně - blízkou fylogenetickou příbuznost (dle fylogenetického stromu na straně 20 je procento odlišnosti mezi celými genomy zhruba 12%).

*** genotypy byly vybrány pro jejich vzdálenější fylogenetickou příbuznost (dle fylogenetického stromu na straně 20 je procento odlišnosti mezi celými genomy zhruba 14%). HAdV 41 byl kvantitativní PCR hůře detekován, protože primery k tomuto genotypu nejsou dostatečně specifické. Kvantita HAdV41 byla ve skutečnosti vyšší, než naměřená a proto nevyšel poměr dle očekávání.

testované genotypy	poměr HAdV1:HAdV2	% čtení z NGS		testované genotypy	poměr HAdV3:HAdV5	% čtení z NGS		testované genotypy	poměr HAdV31:HAdV41	% čtení z NGS	
		HAdV1	HAdV2			HAdV3	HAdV5			HAdV31	HAdV41
HAdV1 HAdV2 *	1000:1	91,7%	2,3%	HAdV3 HAdV5 **	1000:1	94,2%	1,1%	HAdV31 HAdV41 ***	1:100	0	94,6%
	500:1	85,0%	8,7%		500:1	78,9%	0,5%		1:50	0	94,1%
	100:1	80,4%	14,5%		100:1	78,4%	9,1%		1:10	0,2%	93,7%
	50:1	74,5%	20,9%		50:1	72,6%	16,8%		1:5	0,1%	90,2%
	10:1	59,1%	30,9%		10:1	62,6%	29,7%		1:3	1,0%	91,7%
	5:1	55,6%	37,0%		5:1	55,2%	31,2%		1:1	12,5%	82,7%
	3:1	54,1%	38,1%		3:1	57,9%	38,2%		3:1	13,0%	81,7%
	1:1	45,5%	41,6%		1:1	51,9%	45,2%		5:1	19,9%	76,3%
	1:3	48,5%	49,5%		1:3	39,2%	48,7%		10:1	22,9%	70,5%
	1:5	46,5%	50,9%		1:5	38,7%	56,4%		50:1	34,5%	60,6%
	1:10	43,3%	54,4%		1:10	32,9%	64,3%		100:1	34,4%	54,4%
	1:50	31,4%	67,0%		1:50	19,9%	73,0%				
	1:100	22,4%	75,3%		1:100	3,7%	95,6%				
	1:500	10,5%	80,6%		1:500	1,4%	93,8%				
	1:1000	5,7%	92,9%		1:1000	1,1%	89,0%				

Tabulka 3.3 - Výsledky testování navržené metodiky na vzorcích se známým enterovirovým typem

Přehled 30 testovaných typů enterovirů. Kde to bylo možné, byly vzorky normalizovány na kvantitu 500000 kopií/ µl DNA. V prvním sloupečku je testovaný typ, jak byl identifikován odesílající laboratoří, druhý sloupec zaznamenává naměřenou kvantitu pomocí PCR v reálném čase se standartní křivkou, třetí sloupec udává procento čtení ve vzorcích, ve kterých byl identifikován příslušný genotyp a poslední sloupec udává identifikaci genotypu určeného naším pomocí navržené metodiky.

*Vzorek byl identifikován jinak, než bylo určeno odesílající laboratoří, výsledek získaný pomocí NGS potvrdilo Sangerovo sekvenování

CV – coxsackie virus

Echo – echovirus

EV - enterovirus

testovaný typ	kvantita (kopií/µl)	% čtení NGS	výsledek NGS
CV-A9	500	96%	CV-A9
CV-A9	500 000	99%	CV-A9
CV-B2	500 000	99%	CV-B2
CV-B3	500 000	99%	CV-B3
CV-B4	500 000	90%	CV-B4
CV-B5	500 000	65%	CV-B5
Echo1	500 000	5%	Echo1
Echo11	500 000	73%	Echo11
Echo13	500 000	94%	Echo13
Echo15	500 000	98%	Echo15
Echo16	500 000	90%	Echo16
Echo17	500 000	89%	Echo17
Echo18	500 000	98%	Echo18
Echo2	500 000	89%	Echo2
EV-A71	500 000	94%	EV-A71

testovaný typ	kvantita (kopií/µl)	% čtení NGS	výsledek NGS
Echo20	500 000	85%	Echo20
Echo21	500 000	89%	Echo4
Echo24	500 000	88%	Echo24
Echo25	500 000	90%	Echo25
Echo25	16 000	96%	Echo25
Echo26	500 000	90%	Echo26
Echo29	500 000	92%	Echo29
Echo30	500 000	74%	Echo30
Echo31	500 000	88%	Echo31
Echo33	500 000	96%	Echo33
Echo4	500 000	96%	Echo4
Echo5	500 000	96%	Echo5
Echo5	500 000	92%	Echo5
Echo6*	500 000	80%	Echo33
Echo7	500 000	94%	Echo7

Tabulka 3.4 - Výsledky testování navržené metodiky na směsných vzorcích se známými enterovirovými typy, přehled směsných vzorků dvou různých genotypů enterovirů v různých poměrech.

První sloupec zaznamenává dva použité genotypy, druhý sloupec vyjadřuje poměr kvantit, třetí a čtvrtý sloupec udává procento čtení ve vzorku z našeho NGS panelu, ve kterém byl identifikován příslušný genotyp. Směsi byly navrženy tak, aby bylo patrné, že pomocí navržené metodiky je možné detekovat i dva genotypy s nestejnou kvantitou ve vzorku.

* Fylogenetická příbuznost byla určena pomocí úseku referenčních sekvencí příslušných genotypů mezi našimi primery ve vybrané oblasti genu VP1 enterovirové kapsidy. Tyto úseky jsou shodné z 69%.

** Fylogenetická příbuznost byla určena pomocí úseku referenčních sekvencí příslušných genotypů mezi našimi primery ve vybrané oblasti genu VP1 enterovirové kapsidy. Tyto úseky jsou shodné z 59%.

*** Fylogenetická příbuznost byla určena pomocí úseku referenčních sekvencí příslušných genotypů mezi našimi primery ve vybrané oblasti genu VP1 enterovirové kapsidy. Tyto úseky jsou shodné ze 72%.

+ Fylogenetická příbuznost byla určena pomocí úseku referenčních sekvencí příslušných genotypů mezi našimi primery ve vybrané oblasti genu VP1 enterovirové kapsidy. Tyto úseky jsou shodné z 65%.

++ Fylogenetická příbuznost byla určena pomocí úseku referenčních sekvencí příslušných genotypů mezi našimi primery ve vybrané oblasti genu VP1 enterovirové kapsidy. Tyto úseky jsou shodné z 51%.

+++ Fylogenetická příbuznost byla určena pomocí úseku referenčních sekvencí příslušných genotypů mezi našimi primery ve vybrané oblasti genu VP1 enterovirové kapsidy. Tyto úseky jsou shodné z 65%.

testované genotypy	Poměr Echo18:Echo5	% čtení z NGS	
		Echo18	Echo5
Echo18 Echo5 *	1:1	51,10%	48,60%
	1:3	44,20%	55,60%
	1:5	40,10%	59,60%
testované genotypy	Poměr Echo30:Echo4	% čtení z NGS	
		Echo30	Echo4
Echo30 Echo4 **	1:1	45,50%	39,80%
	1:3	51,40%	45,70%
	1:5	50,50%	46,80%
testované genotypy	Poměr Echo2:Echo15	% čtení z NGS	
		Echo2	Echo15
Echo2 Echo15 ***	1:1	58,20%	41,40%
	1:3	57,70%	42,00%
	1:5	54,90%	44,70%
testované genotypy	Poměr Echo31:Echo11	% čtení z NGS	

		Echo31	Echo11
Echo31 Echo11 +	1:1	35,70%	60,80%
	1:3	26,40%	65,80%
	1:5	19,50%	71,90%
testované genotypy	Poměr Echo26:Echo31	% čtení z NGS	
		Echo26	Echo31
Echo26 Echo31 ++	1:1	57,40%	42,00%
	1:3	48,60%	51,00%
	1:5	49,90%	49,70%
testované genotypy	Poměr Echo30:Echo15	% čtení z NGS	
		Echo30	Echo15
Echo30 Echo15 +++	1:1	67,50%	29,10%
	1:3	63,20%	33,40%
	1:5	61,30%	35,60%

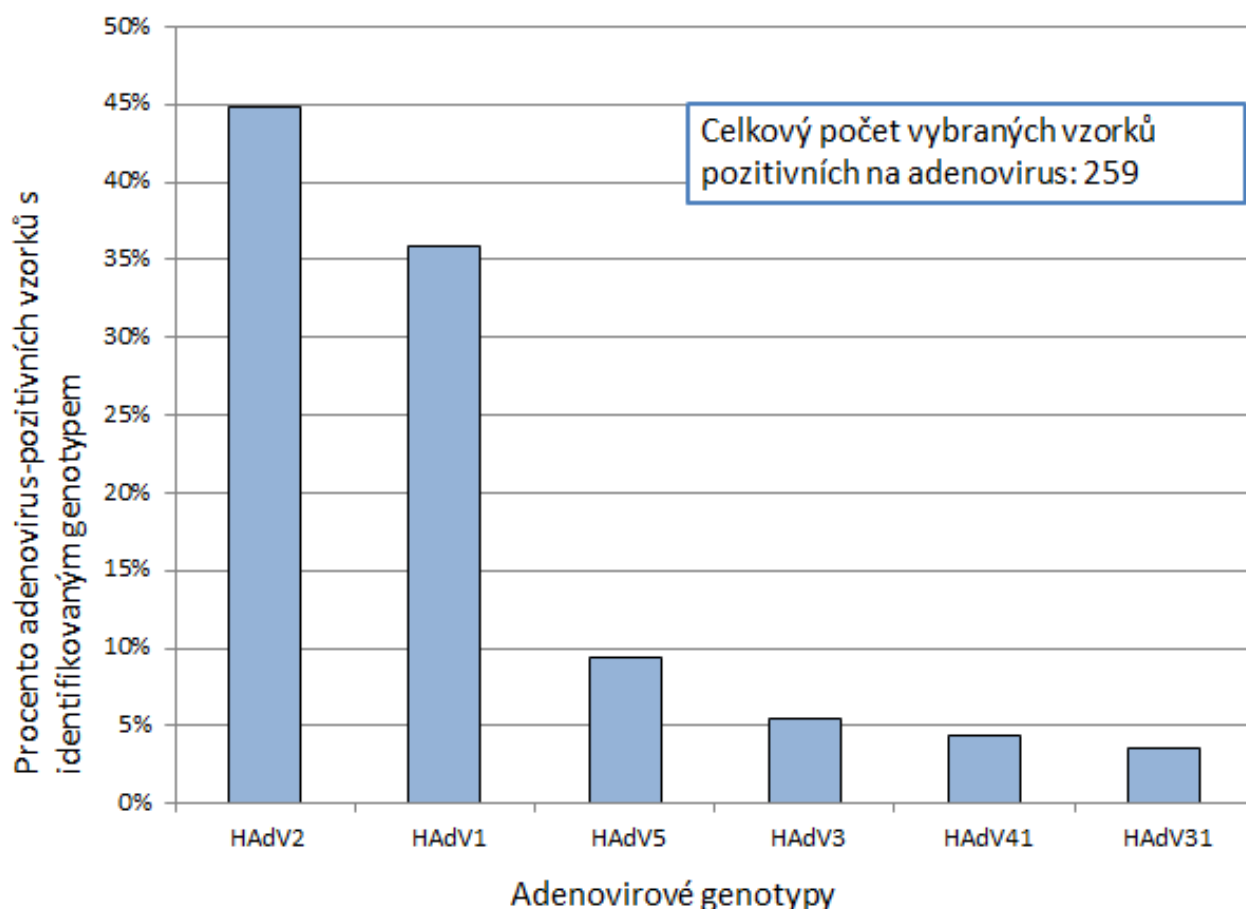
3.2 Testování navržené metodiky na vzorcích pre-diabetických kohort MIDIA a DIPP a na vzorcích ze studie případů a kontrol z Afriky a Asie

3.2.1 Výsledky pro norskou pre-diabetickou kohortu MIDIA

Ve vzorcích z příslušné kohorty byly detekovány a identifikovány genotypy adenovirů a enterovirů.

Obrázek 3.1 – Přehled nejčastějších genotypů adenovirů ve vzorcích pozitivních na adenovirus v procentech.

Graf zobrazuje nejčastěji nalezené adenovirové genotypy ve vzorcích kohorty MIDIA, seřazené od nejčastějšího k nejméně častému. Nejčastějším genotypem byl HAdV2, identifikován ve 113 vzorcích, z celkového počtu testovaných 259 vzorků stolic, vybraných k identifikaci pomocí navržené metodiky. Další genotypy byly nalezeny: HAdV1 v 90 vzorcích, HAdV5 ve 24 vzorcích, HAdV3 ve 14 vzorcích, HAdV 41 v 11 vzorcích, HAdV31 v 9 vzorcích, HAdV57 a HAdV6 byly nalezen pouze v jediném vzorku, proto nejsou v grafu vyneseny. HAdV – lidský adenovirus



Tabulka 3.5 – Charakteristika adenovirových infekcí v kohortě MIDIA měřené pomocí PCR v reálném čase.

* Infekci definujeme jako vzorek pozitivní na adenovirus, či skupinu po sobě jdoucích vzorků pozitivních na adenovirus. Za konec infekce je považován vzorek negativní na adenovirus.

Opakující se infekce od stejného subjektu jsou zde sčítány jako nové infekce.

** PCR v reálném čase nerozlišuje mezi jednotlivými genotypy.

Celkový počet subjektů v kohortě MIDIA	2430					
Celkový počet zachycených adenovirových infekcí *	618					
Charakteristika adenovirových infekcí pomocí dat z PCR v reálném čase **	Délka infekce (počet po sobě jdoucích pozitivních vzorků)			Naměřená kvantita (kopie/ μ l DNA)		
	min.	max.	průměr	min.	max.	průměr
	1	9	1,9	0,2	5365999	38601

Tabulka 3.6 – Charakteristika infekcí jednotlivými adenovirovými genotypy pomocí dat z NGS

Genotypy v tabulce jsou seřazeny podle délky infekce. Poslední tři sloupce ukazují kvantitu naměřenou pomocí kvantitativní PCR.

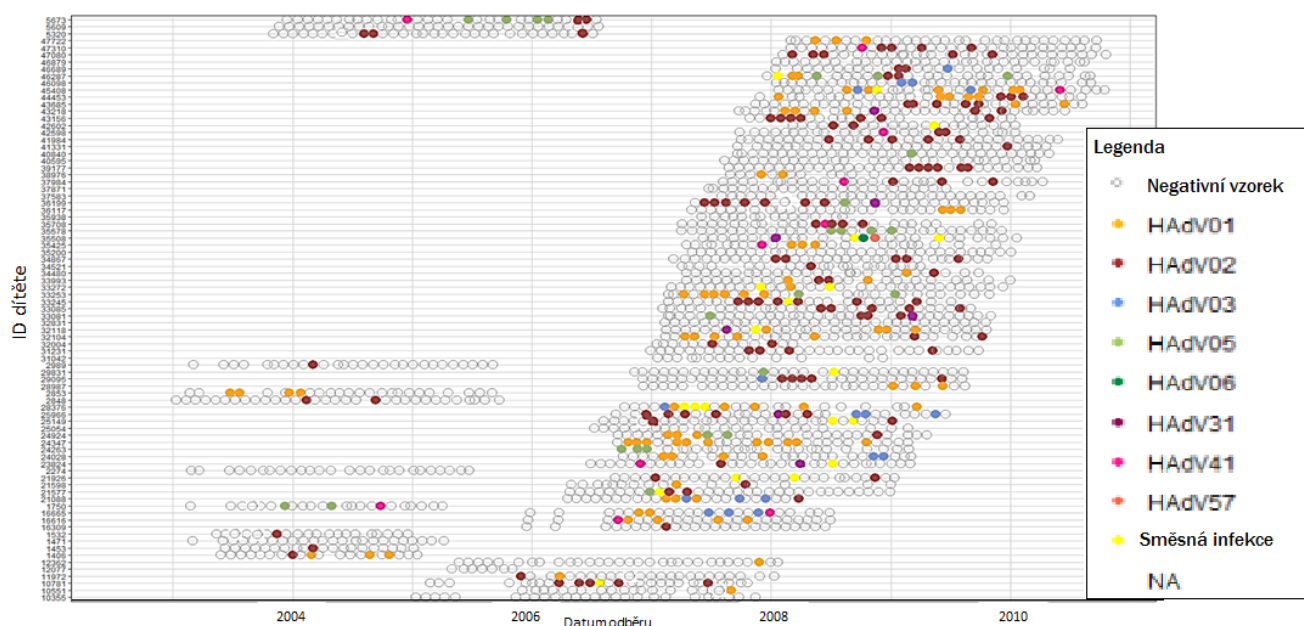
* Infekci jedním genotypem definujeme jako vzorek pozitivní na daný adenovirový genotyp, či skupinu po sobě jdoucích vzorků pozitivních na daný genotyp. Za konec infekce je považován nález jiného genotypu adenoviru, nebo vzorek negativní na adenovirus. Opakující se infekce od stejného subjektu jsou zde počítány jako nové infekce.

** metoda je schopná rozlišit mezi jednotlivými genotypy

Charakteristika adenovirových infekcí pomocí dat z NGS panelu * **	Celkový počet identifikovaných infekcí pro daný typ *	Délka infekce (počet po sobě jdoucích pozitivních vzorků)			Naměřená kvantita (kopie/ μ l DNA)		
		min.	max.	průměr	min.	max.	průměr
HAdV1	74	1	4	1,5	6	5365999	103482
HAdV2	14	1	4	1,4	5	2020663	44892
HAdV5	97	1	3	1,2	9	197471	8491
HAdV3	25	1	2	1,2	21	593717	67481
HAdV41	12	1	1	1	13	641947	58024
HAdV31	9	1	1	1	48	4331428	475971
HAdV6	1	1	1	1	8	8	8
HAdV57	1	1	1	1	81	81	81

Obrázek 3.2 – Všechny odebrané vzorky od každého subjektu a v nich nalezené adenovirové genotypy.

Adenovirové genotypy nalezené u všech subjektů v závislosti na datu odběru. Na ose y jsou ID subjektů seřazeny dle abecedy, na ose x je vyneseno datum oběru vzorků. Negativní vzorky jsou zobrazeny jako prázdná šedá kolečka, vzorky, kde byl identifikován genotyp pomocí navržené metodiky jako plná kolečka. Vzorek, kde se našlo více genotypů je označen jako „směsná infekce“. Z grafu lze pozorovat infekce dlouhé několik měsíců, ale také střídání různých genotypů v rámci jednoho subjektu. NA – nepřítomný vzorek



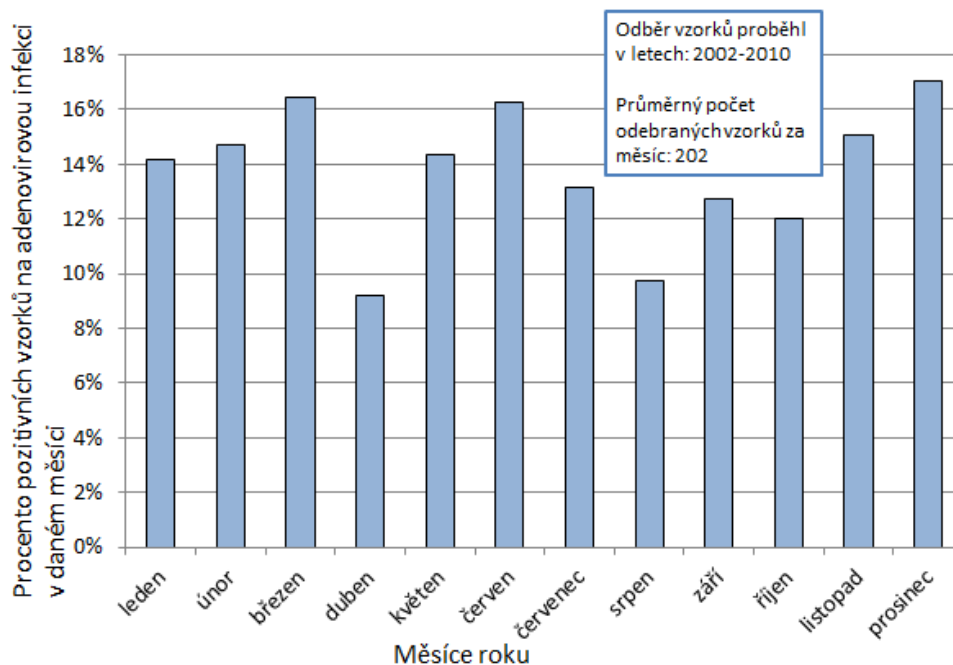
Tabulka 3.7 – Přehled infekcí dvěma adenovirovými genotypy

Genotypy v tabulce jsou seřazeny od nejčastěji nalezené infekce, po nejméně častou. Tabulka zobrazuje kombinace dvou adenovirových genotypů, které byly společně nalezeny ve vzorku jednoho pacienta. Poslední sloupce shrnují celkovou kvantitu adenoviru ve vzorku. HAdV- lidský adenovirus

Adenovirové genotypy	Počet vzorků s nalezenými genotypy	Kvantita naměřená PCR v reálném čase (počet kopií/ μl DNA)		
		min.	max.	průměr
HAdV1 HAdV2	7	29	726	274
HAdV5 HAdV2	3	20	75848	25359
HAdV5 HAdV1	3	20	194	83
HAdV31 HAdV2	3	48	379	170
HAdV1 HAdV31	1	17	17	17
HAdV3 HAdV1	1	21	21	21
HAdV41 HAdV1	1	641947	641947	641947

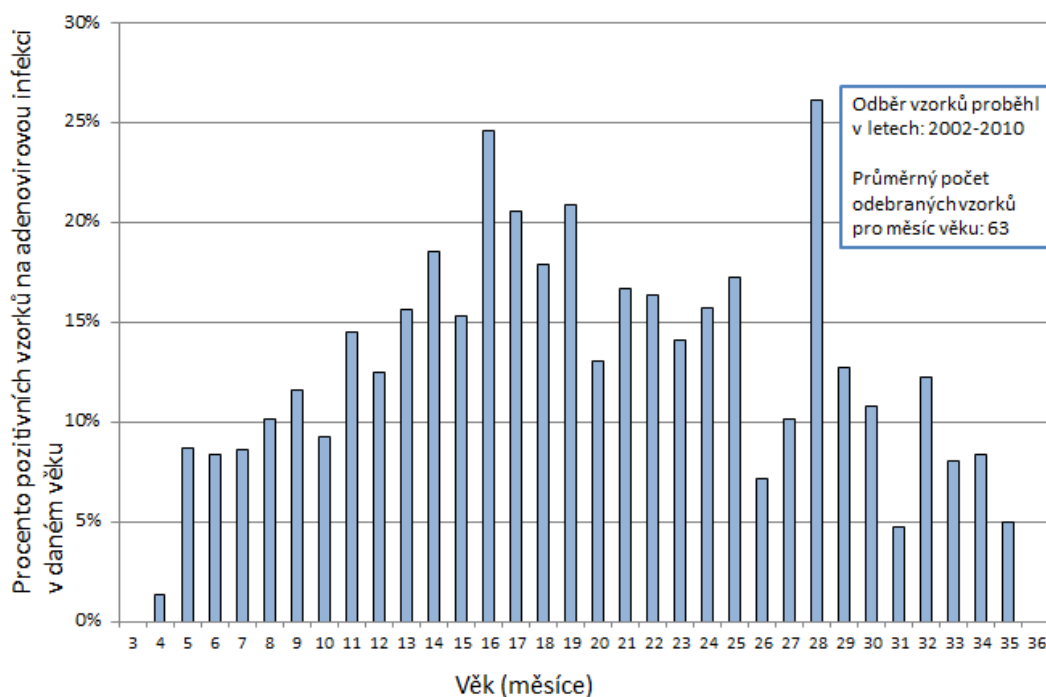
Obrázek 3.3 – Výskyt adenovirových infekcí během roku.

Graf zobrazuje procento pozitivních vzorků na adenovirovou infekci v jednotlivých měsících. Vzorky byly sbírány v letech 2002-2010. Celkové počty odebraných vzorků v jednotlivých měsících se pohybovaly v rozmezí od 186 (pro listopad) do 216 (pro srpen), celkově byl průměrný počet odebraných vzorků 202. Od září do ledna vidíme mírně stoupající tendenci infekcí. V dubnu byl zaznamenán nejnižší počet infikovaných osob, z grafu však není možné říct, že adenovirové infekce mají sezónní výskyt.



Obrázek 3.4 – Výskyt adenovirových infekcí v závislosti na věku.

Graf zobrazuje procento pozitivních vzorků na adenovirovou infekci v závislosti na věku (věk je udáván v měsících). Vzorky byly sbírány v letech 2002-2010. Celkové počty odebraných vzorků v jednotlivých měsících se pohybovaly v rozmezí od 56 do 72, v průměrný počet odebraných vzorků pro měsíc věku byl 63. Z grafu je patrný určitý nárůst infekcí v prvních 16 měsících, který následuje mírné klesání případů infekcí, což by mohlo naznačovat postupný vývoj dětské imunity.



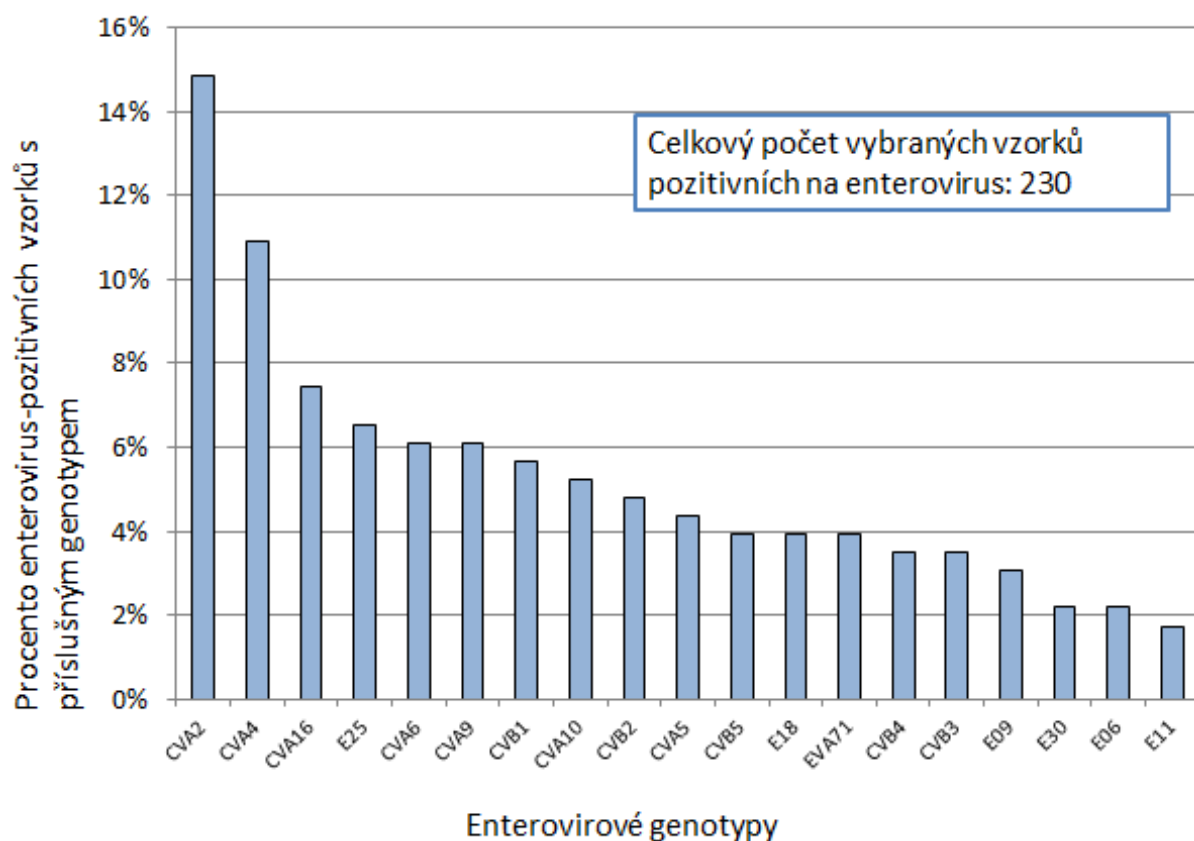
Obrázek 3.5 – Přehled 20 nejčastějších genotypů enterovirů v pozitivních vzorcích kohorty MIDIA, v procentech.

Graf zobrazuje 20 nejčastějších enterovirových genotypů identifikovaných ve vzorcích kohorty MIDIA seřazených od nejčastějšího po nejméně častý. Procenta na ose y udávají enterovirus-positivní vzorky s identifikovaným fenotypem. Celkové množství vzorků, určených k identifikaci genotypu, bylo 230. Všechny nalezené EV v pozitivních vzorcích shrnuje tabulka 3.9)

CV – coxsackie virus (CVA – coxsackie virus A, CVB – coxsackie virus B),

E – echovirus,

EV – enterovirus (EVA71 – enterovirus A 71)



Tabulka 3.8 – Přehled enterovirových infekcí v kohortě MIDIA měřené pomocí PCR v reálném čase.

* Infekci definujeme jako vzorek pozitivní na enterovirus, či skupinu po sobě jdoucích vzorků pozitivních na enterovirus. Za konec infekce je považován vzorek negativní na enterovirus. Opakující se infekce od stejného subjektu jsou zde sčítány jako nové infekce.

** PCR v reálném čase nerozlišuje mezi jednotlivými genotypy.

Celkový počet subjektů v kohortě MIDIA	2430					
Celkový počet zachycených enterovirových infekcí *	488					
Charakteristika enterovirových infekcí pomocí dat z PCR v reálném čase **	Délka infekce (počet po sobě jdoucích pozitivních vzorků)			Naměřená kvantita (kopie/ μ l DNA)		
	min.	max.	průměr	min.	max.	průměr
	1	5	1,6	2	7308500	108541

Tabulka 3.9 – Přehled infekcí je dnotlivými e nterovirovými genotypy z dat NGS panelu.

Genotypy v tabulce jsou zde seřazeny podle délky infekce. Poslední sloupce udávají kvantitu měřenou pomocí kvantitativní PCR.

* Infekci jedním genotypem definujeme jako vzorek pozitivní na daný enterovirový genotyp, či skupinu po sobě jdoucích vzorků pozitivních na daný genotyp. Za konec infekce je považován nález jiného genotypu enteroviru, nebo vzorek negativní na enterovirus. Opakující se infekce od stejného subjektu jsou zde počítány jako nové infekce.

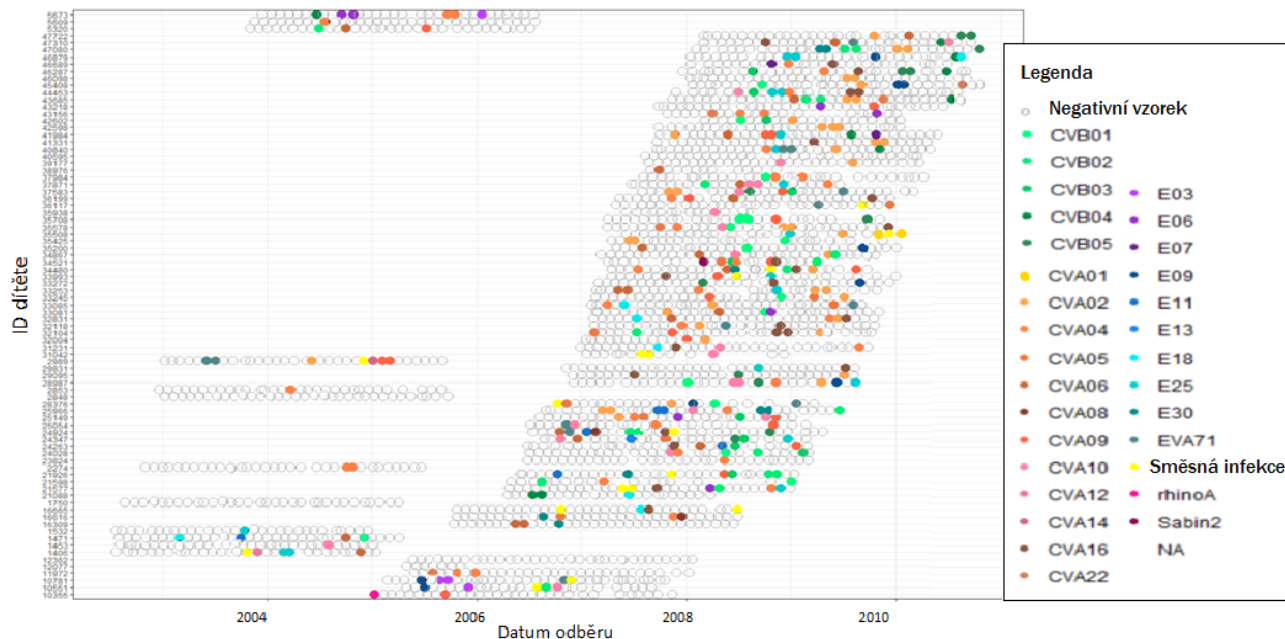
** metoda je schopná rozlišit mezi jednotlivými genotypy

Charakteristi EV-infekcí pomocí dat z NGS panelu * **	Celkový počet identifikovaných infekcí pro daný typ *	Délka infekce (počet po sobě jdoucích pozitivních vzorků)			Naměřená kvantita (kopie/ μ l DNA)		
		min.	max.	průměr	min.	max.	průměr
CVA2	32	1	3	1,3	104	1456700	76528
CVA4	34	1	2	1,1	67	883750	84765
CVA10	22	1	2	1,1	224	2064398	171686
CVA16	21	1	2	1,1	68	322926	39601
CVA9	20	1	2	1,1	83	461346	45245
CVB2	19	1	2	1,2	99	3452462	261051
CVA6	18	1	2	1,1	38	1276235	140371
E25	17	1	2	1,2	121	1392497	104439
CVB1	14	1	2	1,1	89	59952	8288
CVB5	13	1	2	1,2	60	60	60
EVA71	12	1	2	1,3	43	400101	45697,69
CVB4	9	1	2	1,1	149	7308500	741179

E18	8	1	2	1,1	173	351336	71673,75
E11	7	1	2	1,4	257	596761	90714,78
E9	7	1	2	1,1	193	285833	39658,13
E30	6	1	2	1,3	423	110667	35674,63
E6	6	1	2	1,2	706	149520	161325
E3	4	1	2	1,3	143	12265	1801,333
CVA5	15	1	1	1,0	72	4813508	456229
CVB3	9	1	1	1,0	140	172832	86486
E7	2	1	1	1,0	5309	5711	5510
CVA12	1	1	1	1,0	22	22	22
CVA14	1	1	1	1,0	323	323	323
CVA8	1	1	1	1,0	1915918	4364716	3140317
E13	1	1	1	1,0	895	895	895
CVA22	1	1	1	1,0	1211	1211	1211

Obrázek 3.6 – Všechny odebrané vzorky od každého subjektu a v nich nalezené enterovirové genotypy.

Enterovirové genotypy nalezené u všech subjektů v závislosti na datu odběru. Na ose y jsou seřazeny ID subjektů dle abecedy, na ose x je vyneseno datum odběru vzorku. Vzorky byly odebírány v intervalu 1 měsíc. Negativní vzorky jsou zobrazeny jako prázdná šedá kolečka, vzorky, kde byl identifikován genotyp pomocí navržené metodiky jako plná kolečka. Vzorek, kde se našlo více genotypů je označen jako „směsná infekce“. Z grafu lze pozorovat, že enterovirové infekce jsou spíše krátké, ale v rámci jednoho subjektu dochází často k novým infekcím různými genotypy. NA-nepřítomnost vzorku



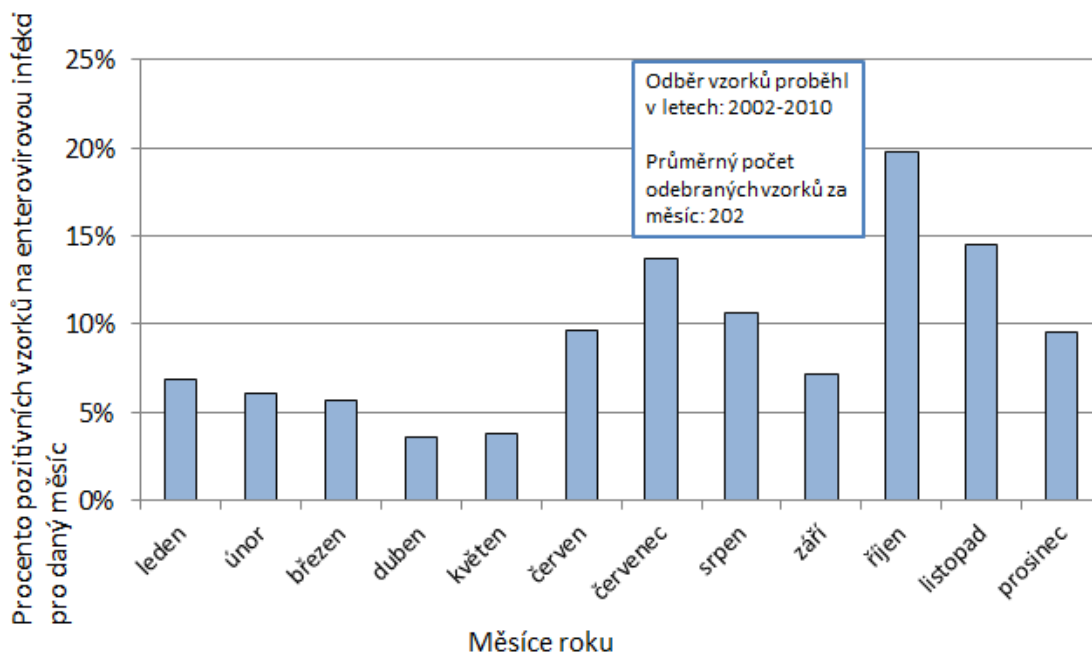
Tabulka 3.10 – Přehled infekcí dvěma a více enterovirovými genotypy.

Genotypy v tabulce jsou seřazeny od nejčastěji nalezené infekce, po neméně častou. Tabulka zobrazuje kombinace dvou či tří enterovirových genotypů, které byly společně nalezeny ve vzorku jednoho pacienta. Tím je komplikováno určení kvantity jednotlivých genotypů, protože PCR v reálném čase mezi nimi nerozlišuje.

Enterovirové genotypy			Počet vzorků s nalezenými genotypy	Počet vzorků s nalezenými genotypy		
				min	max	průměr
Echo11	Echo18		2	2363	6614	4488,5
CVA4	CVA6		1	504	504	504
CVA5	CVA2		1	1749111	1749111	1749111
CVA5	CVB3		1	303227	303227	303227
CVA6	CVA1		1	909	909	909
CVA10	CVB3		1	227	227	227
CVA10	CVB5	CVB1	1	8054	8054	8054
CVB4	EVA71		1	80950	80950	80950
CVB5	CVB2		1	820	820	820
Echo9	CVA16		1	50215	50215	50215
Echo11	CVA6		1	596761	596761	596761
Echo11	CVA9		1	758	758	758
Echo25	CVA2		1	20598	20598	20598
Echo25	CVA6		1	125	125	125

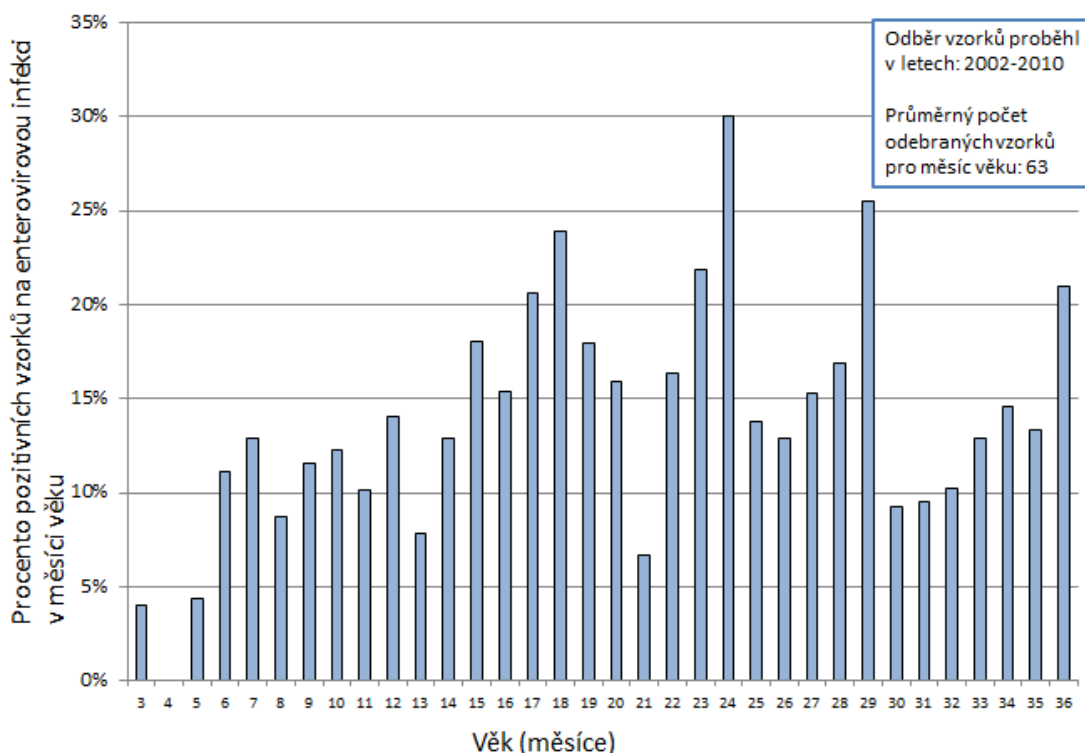
Obrázek 3.7 – Výskyt enterovirových infekcí během roku.

Graf zobrazuje procento pozitivních vzorků na enterovirovou infekci v jednotlivých měsících. Vzorky byly sbírány v letech 2002-2010. Celkové počty odebraných vzorků v jednotlivých měsících se pohybovaly v rozmezí od 186 do 216, v průměrný počet odebraných vzorků byl 202. Z grafu vidíme stoupající tendenci infekcí koncem léta a začátkem podzimu, poté se počty případů opět snižují.



Obrázek 3.8 – Výskyt enterovirových infekcí v závislosti na věku.

Graf zobrazuje procento pozitivních vzorků na enterovirovou infekci v závislosti na věku (věk je udáván v měsících). Vzorky byly sbírány v letech 2002-2010. Celkové počty odebraných vzorků v jednotlivých měsících se pohybovaly v rozmezí od 56 do 72, v průměrný počet odebraných vzorků pro měsíc věku byl 63.

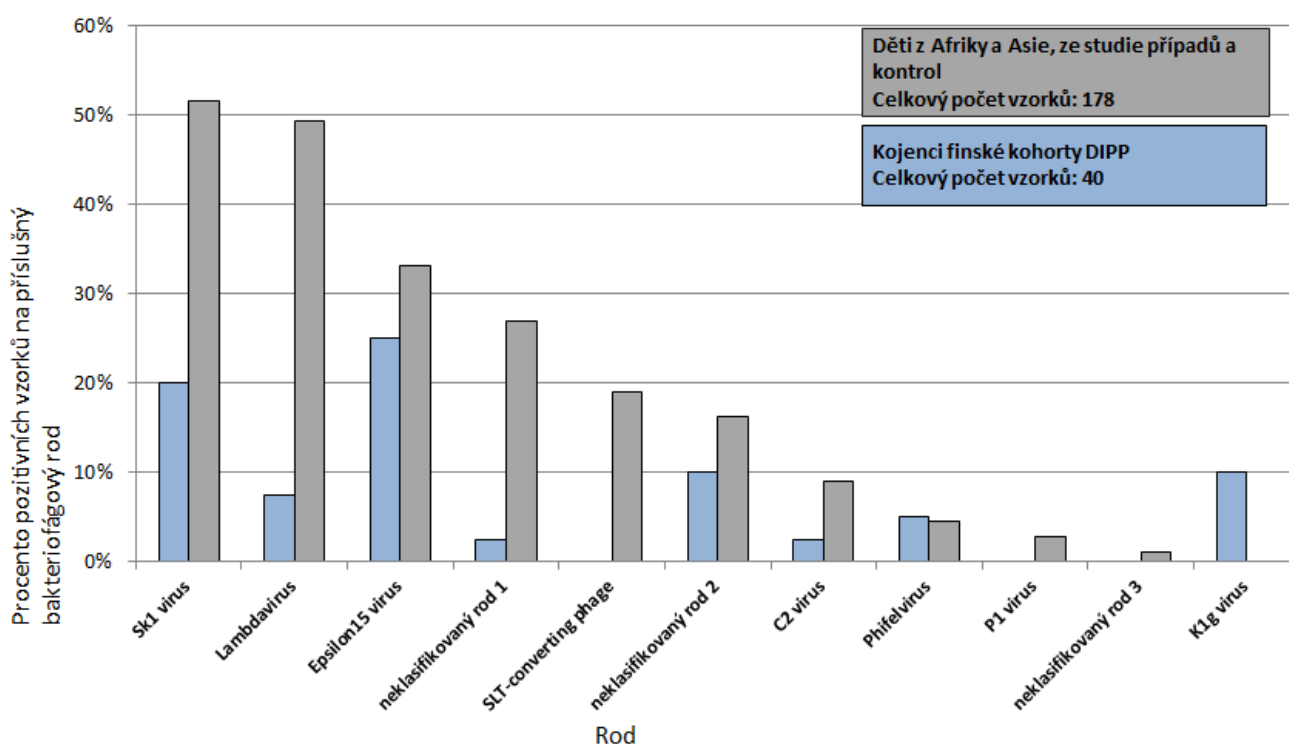


3.2.2 Výsledky subjektů finské pre-diabetické kohorty DIPP a ze studie případů a kontrol z Afriky a Asie

Vzorky těchto subjektů byly testovány na přítomnost vybraných skupin bakteriofágů.

Obrázek 3.9 – Přehled nalezených rodů bakteriofágů ve vzorcích.

Graf zobrazuje procento každého z bakteriofágových rodů v obou kohortách: ve vzorcích finské prediabetické kohorty DIPP a kohorty afrických dětských diabetických pacientů. Niže uvedená tabulka 3.11 popisuje bakteriofágy identifikované pro tyto rody.



Tabulka 3.11 – Zařazení bakteriofágů do vyšších taxonomických skupin.

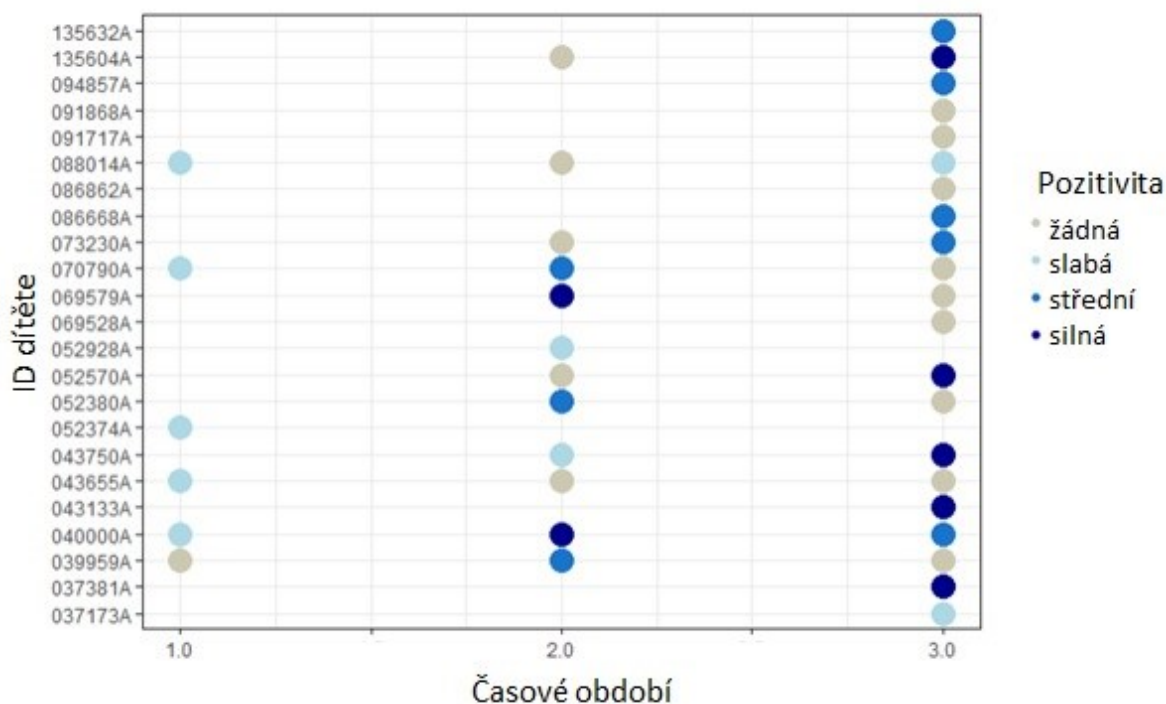
Ve vzorcích finské prediabetické kohorty DIPP a kohorty afrických dětských diabetických pacientů byly identifikovány následující bakteriofágy. Jednotlivé rody shrnuje obrázek 3.9, z důvodu neustálené klasifikace jsou zde přehledně seřazeny jednotliví zástupci rodu, které jsme identifikovali podle příslušných referenčních sekvencí.

Čeď	Rod	„Accession number“: Název
<i>Inoviridae</i>	Neklasifikovaný rod 1	NC_026582: Uncultured phage WW-nAnB
		NC_026612: Uncultured phage WW-nAnB strain 2
		NC_026613: Uncultured phage WW-nAnB strain 3
<i>Myoviridae</i>	P1 virus	AF234173: Enterobacteria phage P1
		AF503408: Enterobacteria phage P7
		NC_005856: Enterobacteria phage P1
		NC_031129: Salmonella phage SJ46

<i>Podoviridae</i>	Epsilon15 virus	NC_019442: Escherichia phage TL-2011c NC_019445: Escherichia phage TL-2011b
<i>Podoviridae</i>	Neklasifikovaný rod 2	1508672: Escherichia coli O157 typing phage 10
<i>Podoviridae</i>	SLT-converting phage	AP004402: Stx2 converting phage I DNA FM180578: Enterobacteria phage 2851 KP682380: Escherichia phage PA27 KP682381: Escherichia phage PA28 KP682392: Escherichia phage PA52 NC_004913: Stx1 converting phage DNA NC_011356: Enterobacteria phage YYZ-2008
<i>Siphoviridae</i>	C2 virus	KX373692: Lactococcus phage M6654 NC_001629: Lactococcus phage bIL67 NC_001706: Lactococcus phage c2 NC_031002: Lactococcus phage M6162 NC_031009: Lactococcus phage D4412 36343: Lactococcus phage bIL67
<i>Siphoviridae</i>	K1g virus	GU196281: Escherichia phage K1ind3 NC_027994: Escherichia phage K1H
<i>Siphoviridae</i>	Lambdavirus	EU078592: Enterobacteria phage DE3 KT232076: Enterobacteria phage lambda KU238068: Stx converting phage vB_EcoS_P32 NC_001416: Enterobacteria phage lambda NC_002166: Bacteriophage HK022 NC_002167: Enterobacteria phage HK97 NC_009514: Phage cdtI DNA NC_011357: Stx2-converting phage 1717 NC_016160: Escherichia phage HK75 NC_019704: Enterobacteria phage mEp237 NC_019705: Enterobacteria phage mEpX2 NC_019708: Enterobacteria phage mEp235 NC_019711: Enterobacteria phage HK629 NC_019716: Enterobacteria phage mEp460 NC_019721: Enterobacterial phage mEp390
<i>Siphoviridae</i>	Phifelvirus	GQ478082: Enterococcus phage phiFL1B GQ478083: Enterococcus phage phiFL1C GQ478085: Enterococcus phage phiFL2B GQ478087: Enterococcus phage phiFL3B NC_013643: Enterococcus phage phiFL2A NC_013648: Enterococcus phage phiFL3A
<i>Siphoviridae</i>	Sk1 virus	FJ848884: Lactococcus phage CB19 GQ979703: Lactococcus lactis phage p2 KC182544: Lactococcus phage 936 KF676640: Lactococcus phage SK1833

		KP793119: Lactococcus phage 936 group phage Phi10.5
		KP793123: Lactococcus phage 936 group phage Phi4.2
		NC_001909: Lactococcus phage bIL170
		NC_008371: Lactococcus phage jj50
		NC_011046: Lactococcus phage bIBB29
		NC_013152: Lactococcus phage CB14
		NC_013155: Lactococcus phage CB13
		NC_021855: Lactococcus phage phi7
		NC_028900: Lactococcus phage SL4
Neklasifikovaná čeleď	Neklasifikovaný rod 3	743964: Bifidobacterium phage Bbif-1

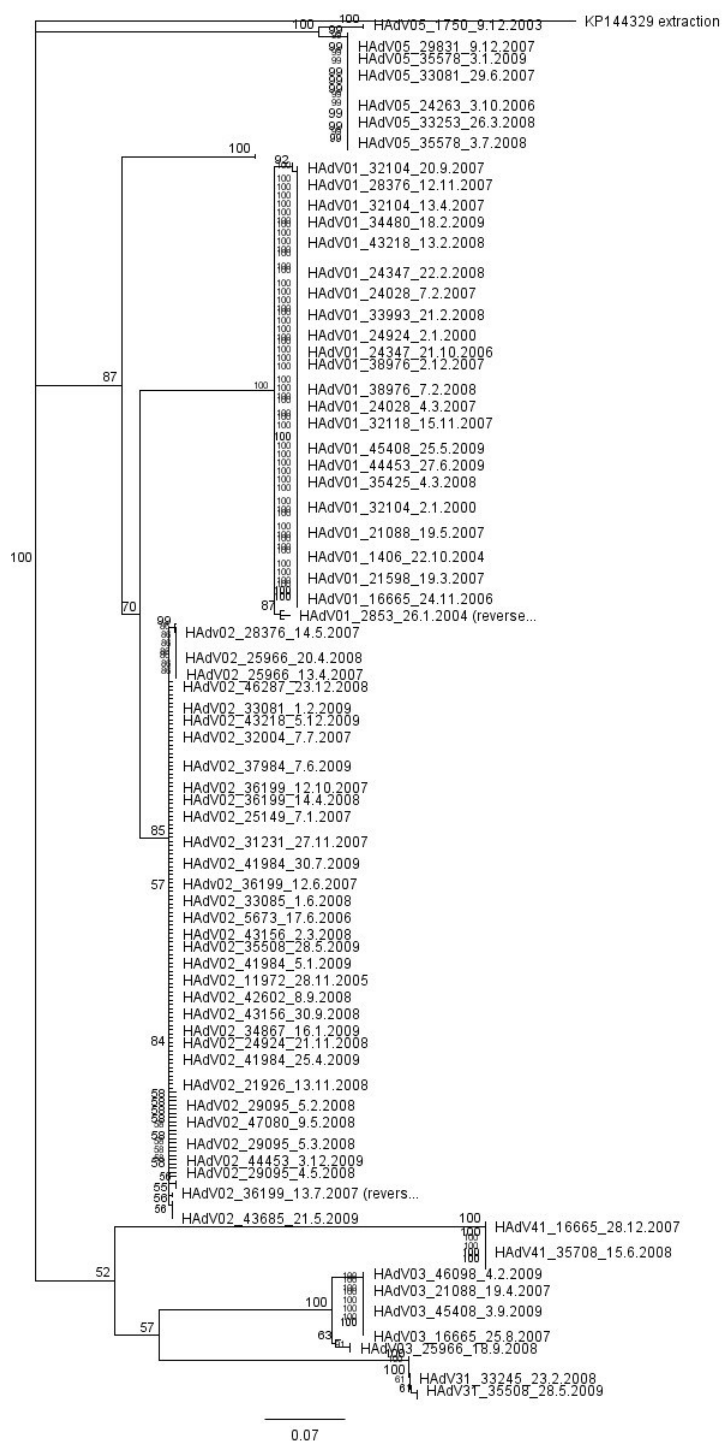
Obrázek 3.10 – Výskyt bakteriofágů v longitudinálně odebraných vzorcích finské kohorty DIPP. Graf zobrazuje longitudinálně odebrané vzorky od každého subjektu a v nich detekovaného fága (bez taxonomického zařazení). Kulička představuje odebraný vzorek stolice, barva určuje, zda byl bakteriofág pomocí navržené metodiky detekován a přibližně v jaké kvantitě. Časový odstup mezi vzorky je 3 měsíce. Některé subjekty neposkytly všechny tři požadované vzorky. Detekce bakteriofágů pomocí navržené metodiky nevykazuje žádný dlouhodobý trend, v množství vzorků se bakteriofágy nepodařilo vůbec zachytit.



3.3 Fylogenetické stromy nalezených adenovirů, enterovirů

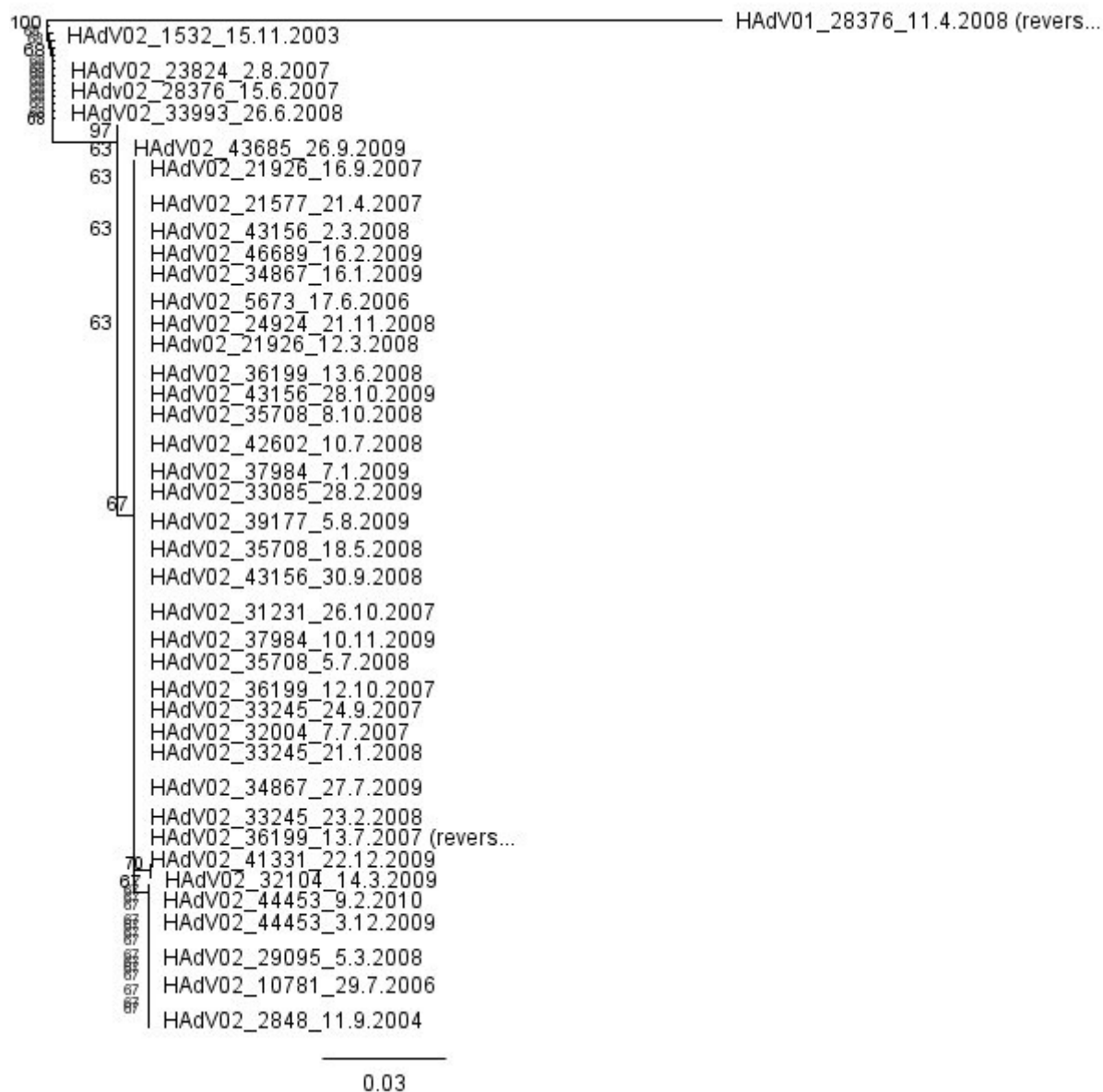
Obrázek 3.11 – Fylogenetická analýza všech adenovirových genotypů.

Do analýzy byly zahrnuty veškeré sekvence z NGS, ale z důvodu lepší čitelnosti jsou zobrazeny názvy jen některých sekvencí. Označení sekvence se skládá z názvu genotypu, ID dítěte a datumu odběru vzorku. Analýza ukázala klastrování sekvencí daného genotypu do společných větví. Strom obsahuje větve odlišující sekvence skupin HAdV1, HAdV2, HAdV3, HAdV5, HAdV31, HAdV41. Jako „outgroup“ zde byla použita sekvence siadenoviru tučňáků, „accession number“ KP144329.



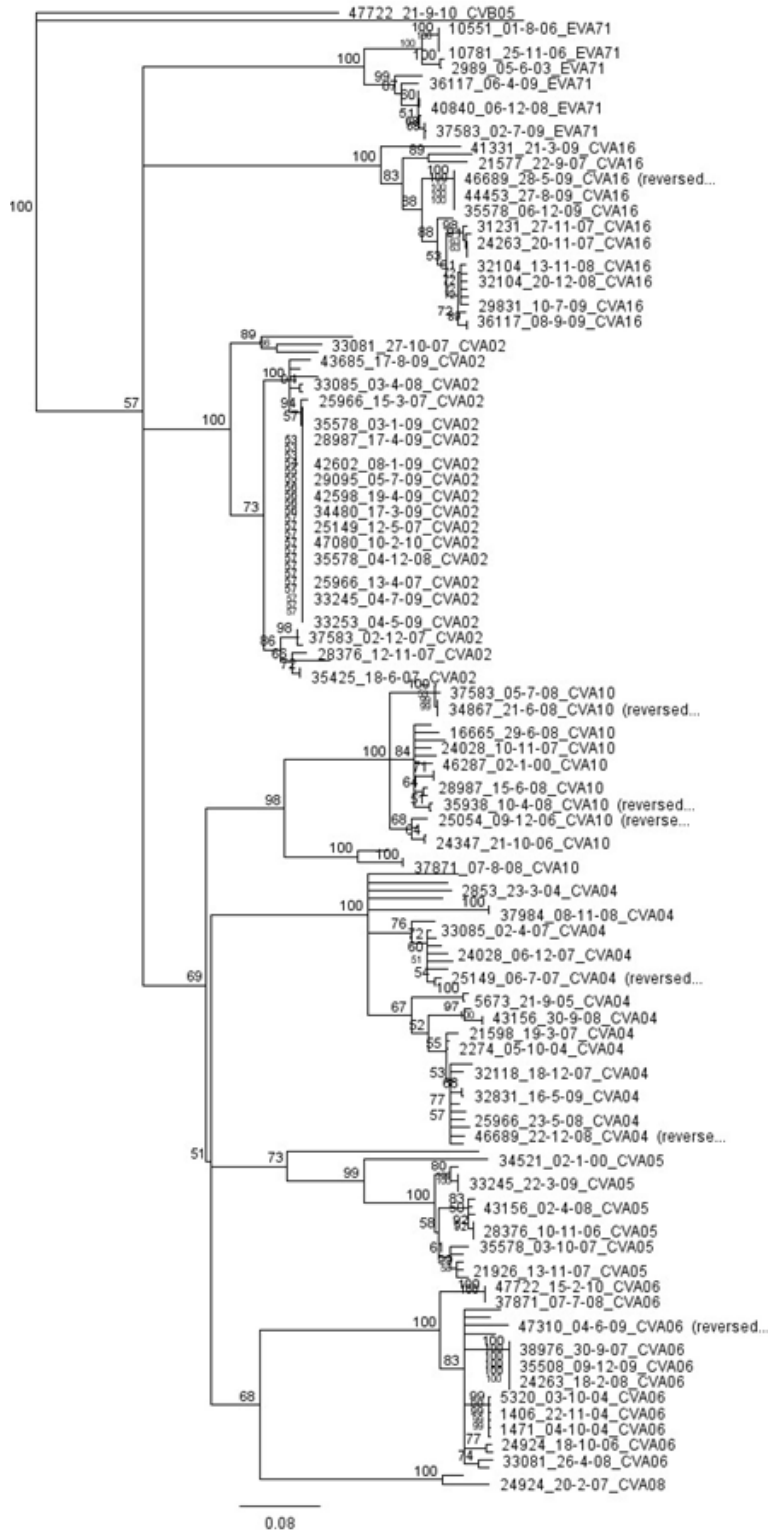
Obrázek 3.12 - Fylogenetická analýza všech nalezených sekvencí HAdV2.

Pro detailní analýzu byly vybrány sekvence nejčastějšího nalezeného genotypu adenoviru (HAdV2). Jako „outgroup“ zde byla zvolena sekvence HAdV1. Název sekvence se skládá z názvu genotypu, ID dítěte a datumu odběru vzorku. To umožňuje sledovat, zda dochází k určitému vývoji viru v čase, či zda dochází ke klastrování sekvencí stejného dítěte. V případě tohoto genotypu však žádný z těchto jevů nebyl fylogenetickou analýzou prokázán.



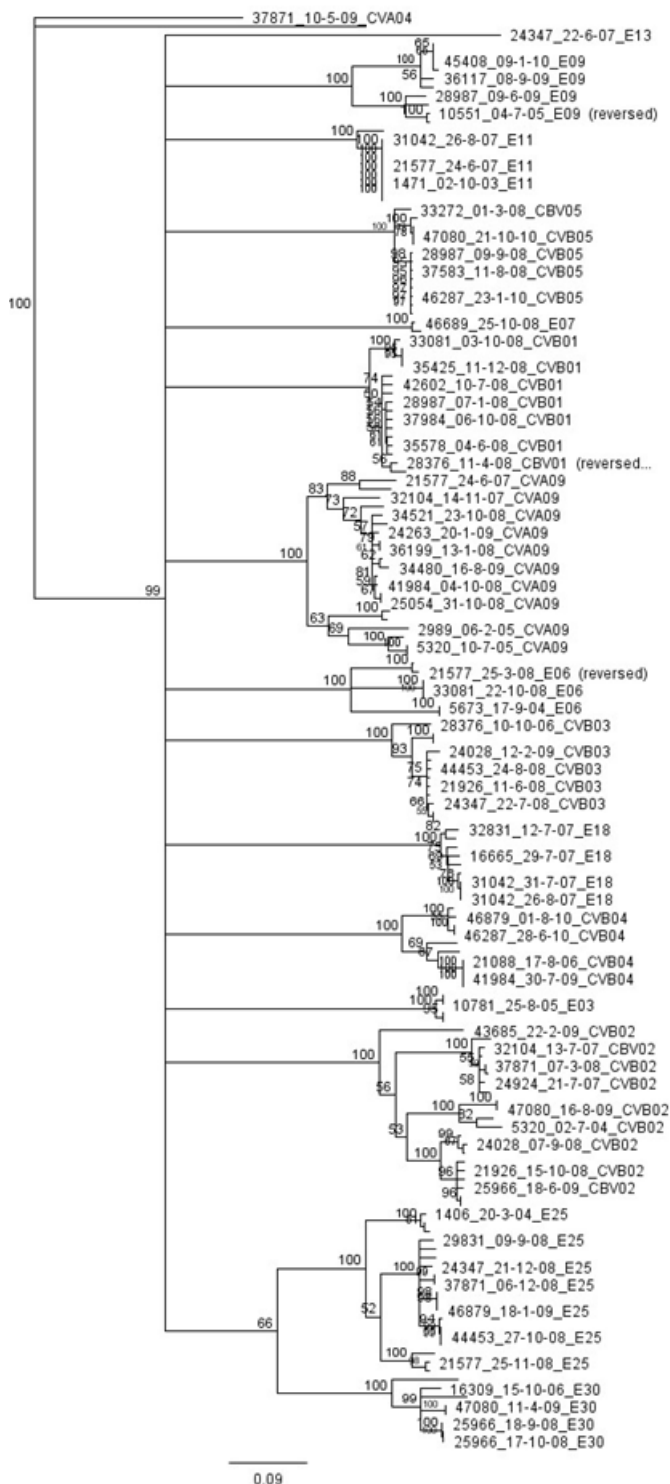
Obrázek 3.13 - Fylogenetická analýza sekvencí enteroviru A.

Z důvodu velkého množství sekvencí byl strom rozdělen na sekvence patřící k druhům enteroviru A a B. Jako „outgroup“ zde byla použita sekvence CVB5. Analyzovány byly všechny sekvence, ale z důvodu lepší čitelnosti jsou zobrazeny jen některé názvy sekvencí. Název sekvence se skládá z ID dítěte, datumu odběru vzorku a názvu genotypu. Analýza ukázala klastrování sekvencí daného genotypu k sobě. Jsou patrné větve odlišující sekvence CVA2, CVA4–08, CVA10, CVA16 a EVA71. Lepšího klastrování bylo dosaženo přítomností ještě jedné sekvence ze skupiny enteroviru B, která se v obrázku vyskytuje jako dlouhá čára pod „outgroup“ sekvencí.



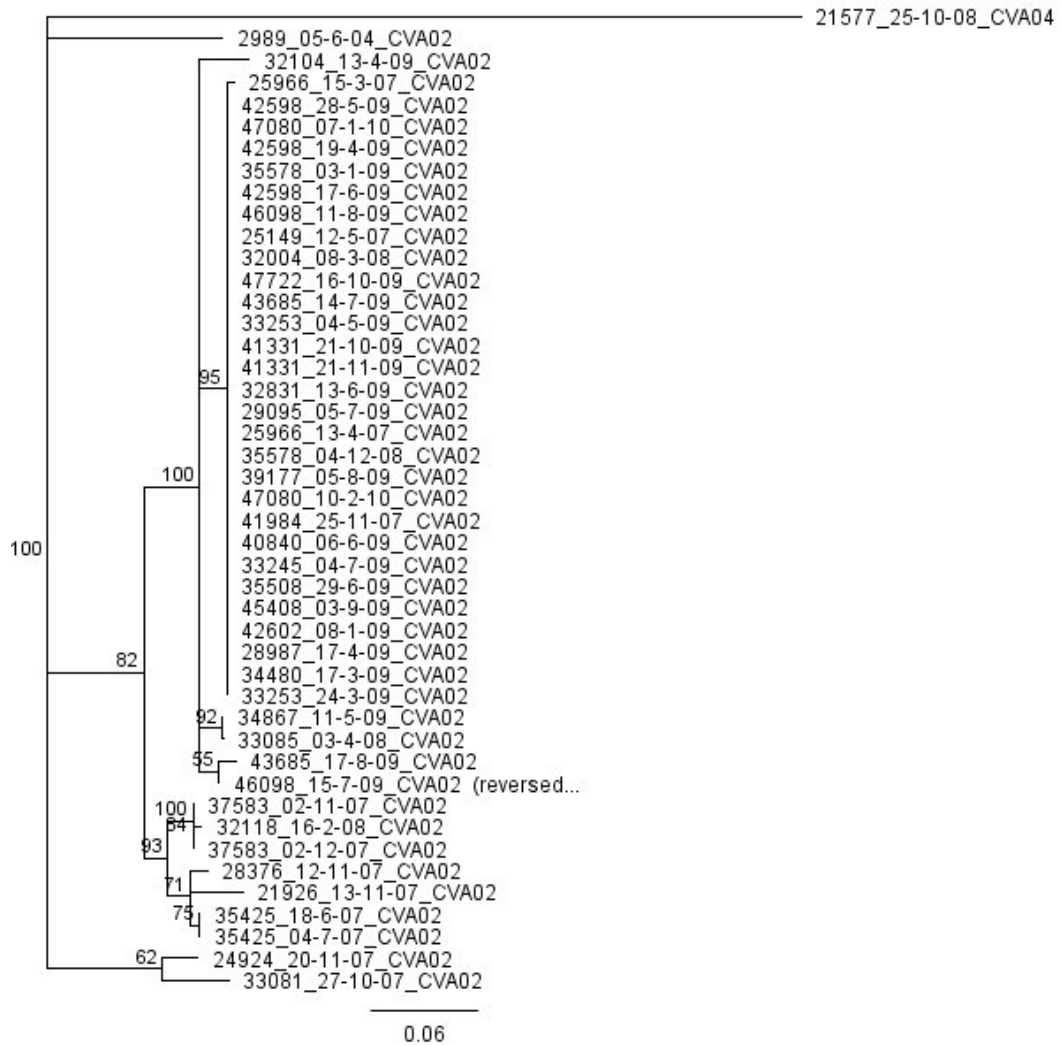
Obrázek 3.14 - Fylogenetická analýza sekvencí Enteroviru B.

Z důvodu velkého množství sekvencí byl strom rozdělen na sekvence patřící do enteroviru A a B. Jako „outgroup“ zde byla použita sekvence CVA4. Analyzovány byly všechny sekvence, z důvodu lepší čitelnosti jsou zobrazeny pouze některé názvy sekvencí. Název sekvence se skládá z názvu genotypu, ID dítěte, datumu odběru vzorku. Analýza ukázala klastrování sekvencí daného genotypu k sobě. Jsou patrné větve odlišující sekvence genotypy E3, 06, 09, 11, 13, 25, 30, dále pak CVB1 – 05, 07 a také CVA9, který patří do enteroviru B. Lepšího klastrování bylo dosaženo přítomností ještě jedné sekvence ze skupiny enteroviru A, která se v obrázku vyskytuje jako čára pod „outgroup“ sekvencí.



Obrázek 3.15 - Fylogenetická analýza všech nalezených sekvencí CVA2.

Pro detailní analýzu byly vybrány sekvence nejčastějšího nalezeného genotypu enteroviru. Jako „outgroup“ zde byla zvolena sekvence CVA4. Název sekvence se skládá z názvu genotypu, ID dítěte, datumu odběru vzorku. To umožňuje sledovat, zda dochází k určitému vývoji viru v čase, či zda dochází ke klastrování sekvencí vzorků stejného dítěte. Ze stromu je patrné mírné klastrování mezi sekvencemi odebranými v roce 2008 a 2009, což by mohlo naznačovat na určitý vývoj viru v čase, ale kvůli výskytu několika výjimek se to nedá říci s jistotou.



4. Diskuze

Tato práce shrnuje výsledky testování metody umožňující detekci a typizaci všech známých typů lidských adenovirů a enterovirů, ale i vybraných bakteriofágů. Tyto skupiny virů byly vybrány pro jejich častý výskyt ve střevě. Bakteriofágy byly vybrány na základě metagenomických studií střevního viromu (Kramná et al., 2015). Viry ve střevě jsou studovány pro možnost způsobovat či urychlovat vznik autoimunitních onemocnění, například diabetes 1. typu (Yeung et al., 2011) či celiakie (König et al., 2016). Námí připravená metoda byla vytvořena právě za tímto účelem, nezabývá se však studiem vlivu těchto virů na rozvoj diabetu 1. typu či celiakie.

Při vývoji metody byl kladen důraz na schopnost detekovat všechny genotypy vybraných virů, v různých kvantitách a ve velkém počtu vzorků najednou. Existuje mnoho studií, ve kterých se můžeme setkat s metodami, umožňující tyto viry pouze detekovat, nikoliv však genotypizovat (například detekce HAdV ve studii Dupuis et al., 2011, nebo detekce EV ve studii Sawyer et al., 2002). Dále se můžeme setkat s přístupem, který umožní genotypizovat jen malý počet konkrétních typů (Kim et al., 2003). Zapojení sekvenování nové generace do této typizace umožnila rychlejší detekci většího množství vzorků najednou, což přináší výhodu oproti studiím využívajícím k získání cílové sekvence Sangerovo sekvenování (Takeuchi et al., 1999). Splnění požadavků na genotypizaci co největšího počtu adenovirů a enterovirů, v nestejných kvantitách a ve velkém počtu vzorků současně, je možné především s využitím NGS.

Pro studium fágových populací v lidském organismu byly doposud využívány převážně metodiky zaměřené na sekvenování náhodných fragmentů virových genomů a jejich následná analýza. Přístup využívající specifických primerů pro detekci a typizaci vybraných skupin bakteriofágů, se zdá být zatím ojedinělý. Obecně jsou fágová společenstva v lidském organismu málo prozkoumána a z klinického hlediska zatím nebylo nezbytně nutné vyvíjet metody jejich detekce, protože jsou patogeny bakterií, nikoliv člověka. S narůstajícím počtem studií, které informují o důležitosti střevního mikrobiomu při rozvoji autoimunitních chorob, však může být zajímavé zjišťovat jaký vztah má přítomnost určitých fágů na vlastnosti a změny mikrobiomu lidského střeva.

Výsledky detekce a typizace virů ve vzorcích se známým typem ukázaly, že až na výjimky je metoda optimalizovaná pro všechny testované genotypy. Sensitivita, s jakou je každý typ

detekován, však testována nebyla. I když se z tabulky 3.1 zdá, že primery pro typizaci adenoviru fungují velmi sensitivně, výsledky měření kvantity mohou být ovlivněny nespecificitou primerů kvantitativní PCR vůči těmto adenovirovým typům (Claas et al., 2005). Vzhledem k tomu, že metoda byla primárně vyvinuta na vzorky stolice, kde je virová nálož v době probíhající infekce vysoká, je takto otestovaná metoda zatím dostatečná. Pro další využití, například pro vzorky krve, kde je virová nálož v porovnání se stolicí nízká, je otázku sensitivity potřeba podrobněji otestovat.

Použití metody pro identifikaci genotypů adenovirů a enterovirů bylo dále testováno na vybraných vzorcích kohorty MIDIA, které byly pomocí kvantitativní PCR označeny jako pozitivní na adenovirus či enterovirus (menší část vzorků byla pozitivní jak na adenovirus, tak na enterovirus). U dětí ze studované kohorty MIDIA se vyskytovaly infekce jedním, ale i dvěma a více adenovirovými či enterovirovými typy.

Infekce dvěma adenovirovými genotypy byla nalezena celkem u 0,07% vzorků, nejčastěji byla nalezena společná infekce genotypy HAdV1 a HAdV2 (celkem u 7 vzorků). Vícenásobné adenovirové infekce uvádí také například studie Kroes et al., 2007, v této studii byla infekce určena pomocí sérotypizace ze vzorků stolic dětí po transplantaci kmenových buněk (v univerzitní nemocnici v Leidenu), konkrétní kombinace typů však autoři neuvádí. Autoři studie Kroes et al., 2007 také uvádí jako nejčastěji nalezené adenoviry ve vzorcích: HAdV2, HAdV1 a HAdV5 (Kroes et al., 2007), shodně s našimi výsledky. Ve studii Echavarría et al., 2006 byly pomocí PCR detekovány adenovirové druhy, z jejich výsledků tedy není možné určit konkrétní genotyp, ale nalezení infekce dvěma adenovirovými druhy v několika vzorcích, se také shodují výsledky naší práce - ve vzorcích kohorty MIDIA byly nalezeny v jednom vzorku zároveň HAdV31 (řazen k druhu HAdV-D) a HAdV2 (řazen k druhu HAdV-B). Vzorky studie Echavarría et al., 2006, pocházely ze stěrů nosních sliznic dětí s akutními respiračními infekcemi z Argentiny (Echavarría et al., 2006).

Enterovirové infekce, ve kterých bylo identifikováno více než jeden enterovirový typ se v testovaných vzorcích vyskytovaly v 0,06%. Na rozdíl od adenoviru, se až na dvojici E11 a E18 (nalezeno ve dvou vzorcích), nevyskytovala žádná kombinace enterovirových typů vícekrát. V literatuře však nejsou směsné enterovirové infekce významně diskutovány. Také pokud porovnáme počet různých adenovirových a enterovirových typů, byla patrná menší diverzita v detekovaných HAdV typech (celkově bylo detekováno 7 různých typů), na rozdíl od EV typů (celkově bylo nalezeno 24 různých typů). To však odpovídá i celkovému počtu

typů HAdV, kterých je celkem 67 (Lion, 2014) a typů EV je více než 100 (www.picornaviridae.com).

Protože vzorky kohorty MIDIA byly odebírány v intervalu jeden měsíc, po dobu několika let, bylo možné na základě získaných dat zhodnotit sezónní výskyt adenovirových a enterovirových infekcí. Ve vzorcích kohorty MIDIA nebyl prokázán vzorec sezónnosti výskytu adenovirových infekcí. Lion, 2014 ve svém přehledném článku popisuje, že výskyt infekcí se lišil u imunokompetentních a imunokompromitovaných pacientů, a není jednoznačné, že by adenovirové infekce měly sezónní výskyt. Toto zjištění potvrzují i výsledky studie, kde byly identifikovány adenovirové infekce ze vzorků stolic pediatrických pacientů s průjmovým onemocněním a dětí bez příznaků onemocnění, z Tanzánie (Moyo et al., 2014). Ani výše zmiňovaná studie Li et al., 2015 nezaznamenala sezónnost infekcí adenovirem (Severní Čína).

Vůbec nejčastějším enterovirovým typem nalezeným ve vzorcích MIDIA kohorty byl CVA2 (vyskytoval se v 15% z celkového počtu 230 vzorků), dále byly u více než 6% vzorků nalezeny typy CVA4, CVA16 a E25. Enterovirové infekce se v našich vzorcích vyskytovaly s patrnou sezónností, kdy se zvyšující se trend počtu enterovirových infekcí, začal objevovat začátkem léta a pokračoval až do konce podzimu. V souladu s tímto zjištěním jsou také výsledky studie, kde byly testovány vzorky pocházející z Německa (Simonen-Tikka et al., 2011). Výsledky holandské studie také ukazují jistou sezónnost EV infekcí (Benschop et al., 2016). Nejčastěji se vyskytující enterovirové typy se však příliš neshodují s našimi výsledky, Benschop et al., 2016, uvádí jako jedny z nejčastějších typů například: E25, CVA6 či CVA9, tyto typy zaujímají 4. až 6. místo v žebříčku nejčastějších enterovirových typů nalezených ve vzorcích kohorty MIDIA. Ve vzorcích krví z finské studie Laitinen et al., 2014, byly popsány jako nejčastější typy CVB1, CVB2 a CVB6.

Na vzorcích kohorty MIDIA byl také studován průběh infekcí adenoviry a enteroviry. Vzorky každého subjektu byly odebírány v pravidelných měsíčních intervalech. U adenovirových infekcí je patrné střídání obvykle 2 adenovirových typů v průběhu let. Adenovirové infekce jedním typem také častěji probíhají v intervalech několika měsíců, nejdelší trvání infekce bylo pozorováno u HAdV1 a HAdV2, kde infekce byla zaznamenána ve 4 po sobě následujících vzorcích. V tomto směru vidíme odlišnost od průběhu infekcí enteroviry. Enterovirové infekce trvaly kratší dobu, ale v průběhu let bylo patrné časté střídání několika různých typů

ve vzorcích jednoho subjektu, výjimkou nebylo střídání více než 3 sérotypů ve vzorcích jednoho subjektu.

Pomocí navržené metodiky pro detekci bakteriofágů bylo možné identifikovat vybrané bakteriofágové skupiny. Detekce bakteriofágů v longitudinálně odebíraných vzorcích finské kohorty DIPP nevykazuje žádný dlouhodobý trend. To bylo překvapující, protože např. studie Reyes at al., 2010 popsala velmi stabilní populaci ve střevě v průběhu času, což se v našich výsledcích téměř neprojevovalo. Zásadní může být v tomto ohledu použitá metodika, kdy studie Reyes at al., 2010 používá k identifikaci bakteriofágů náhodné fragmenty celého genomu, zatímco detekce bakteriofágů naší metodou byla založena na detekci vybraných genů. Pokud však dojde rekombinačními událostmi ke ztrátě tohoto genu, není bakteriofág detekován. Kvůli neustálené klasifikaci studie často uvádí výskyty fágových čeledí. Udává se, že nejčastější čeledí nalezenou v mikrobiomu lidského střeva jsou fágy čeledi *Siphoviridae*, následované čeledí *Podoviridae* (Kim et al., 2011). Ve shodě s těmito závěry jsou i námi získané výsledky.

5. Souhrn

Byla vytvořena metodika založená na NGS, určená pro detekci a genotypizaci adenovirů, enterovirů a pro genotypizaci vybraných fágů. Metoda je vytvořena pro hledání vztahu mezi viry a jejich vlivem na vznik autoimunitních chorob. Metodu je však možné využít i pro jiné vědecko-výzkumné účely.

Metoda byla úspěšně testovaná na vzorcích se známým adenovirovým a enterovirovým typem.

Bylo prokázáno, že pomocí navržené metody lze detekovat dva virové typy s nestejnou kvantitou v jednom vzorku.

Pomocí navržené metodiky bylo testováno 259 adenovirus-pozitivních vzorků pro genotypizaci adenoviru a 230 enterovirus-pozitivních vzorků pro genotypizaci enteroviru (vzorky pre-diabetické kohorty MIDIA) a podařilo se tyto viry genotypizovat.

Typizace bakteriofágů byla provedena s vybranými vzorky z pre-diabetické kohorty DIPP a se vzorky ze studie případů a kontrol z Afriky a Asie.

6. Použitá literatura

- Ackermann, H.-W. (2007). 5500 Phages examined in the electron microscope. *Arch. Virol.* *152*, 227–243.
- Adriaenssens, E.M., and Brister, J.R. (2017). How to Name and Classify Your Phage: An Informal Guide. *Viruses* *9*.
- Allard, A., Albinsson, B., and Wadell, G. (2001). Rapid Typing of Human Adenoviruses by a General PCR Combined with Restriction Endonuclease Analysis. *J. Clin. Microbiol.* *39*, 498–505.
- Atkinson, M.A., Eisenbarth, G.S., and Michels, A.W. (2014). Type 1 diabetes. *The Lancet* *383*, 69–82.
- Bach, J.-F., and Chatenoud, L. (2012). The Hygiene Hypothesis: An Explanation for the Increased Frequency of Insulin-Dependent Diabetes. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* *2*, a007799.
- Barr, J.J., Auro, R., Furlan, M., Whiteson, K.L., Erb, M.L., Pogliano, J., Stotland, A., Wolkowicz, R., Cutting, A.S., Doran, K.S., et al. (2013). Bacteriophage adhering to mucus provide a non-host-derived immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 10771–10776.
- Bennett, S., Harvala, H., Witteveldt, J., Leitch, E.C.M., McLeish, N., Templeton, K., Gunson, R., Carman, W.F., and Simmonds, P. (2011). Rapid Simultaneous Detection of Enterovirus and Parechovirus RNAs in Clinical Samples by One-Step Real-Time Reverse Transcription-PCR Assay. *J. Clin. Microbiol.* *49*, 2620–2624.
- Benschop, K.S.M., Rahamat-Langendoen, J.C., van der Avoort, H.G.A.M., Claas, E.C.J., Pas, S.D., Schuurman, R., Verweij, J.J., Wolthers, K.C., Niesters, H.G.M., and Koopmans, M.P.G. (2016). VIRO-TypeNed, systematic molecular surveillance of enteroviruses in the Netherlands between 2010 and 2014. *Eurosurveillance* *21*.
- Boerner, B.P., and Sarvetnick, N.E. (2011). Type 1 diabetes: role of intestinal microbiome in humans and mice. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1243*, 103–118.
- Bouziat, R., Hinterleitner, R., Brown, J.J., Stencel-Baerenwald, J.E., Ikizler, M., Mayassi, T., Meisel, M., Kim, S.M., Discepolo, V., Pruijssers, A.J., et al. (2017). Reovirus infection triggers inflammatory responses to dietary antigens and development of celiac disease. *Science* *356*, 44–50.
- Briese, T., Kapoor, A., Mishra, N., Jain, K., Kumar, A., Jabado, O.J., and Lipkin, W.I. (2015). Virome Capture Sequencing Enables Sensitive Viral Diagnosis and Comprehensive Virome Analysis. *MBio* *6*, e01491-15.
- Brown, C.T., Davis-Richardson, A.G., Giongo, A., Gano, K.A., Crabb, D.B., Mukherjee, N., Casella, G., Drew, J.C., Ilonen, J., Knip, M., et al. (2011). Gut Microbiome Metagenomics Analysis Suggests a Functional Model for the Development of Autoimmunity for Type 1 Diabetes. *PLOS ONE* *6*, e25792.
- Bubba, L., Martinelli, M., Pellegrinelli, L., Primache, V., Tanzi, E., Pariani, E., and Binda, S. (2017). A 4-year Study on Epidemiologic and Molecular Characteristics of Human Parechoviruses and Enteroviruses Circulating in Children Younger Than 5 Years in Northern Italy. *Pediatr. Infect. Dis. J.* *36*, 13.
- Buckwalter, S.P., Teo, R., Espy, M.J., Sloan, L.M., Smith, T.F., and Pritt, B.S. (2012). Real-Time Qualitative PCR for 57 Human Adenovirus Types from Multiple Specimen Sources. *J. Clin. Microbiol.* *50*, 766–771.

- Campbell, A. (1994). Comparative molecular biology of lambdoid phages. *Annu. Rev. Microbiol.* *48*, 193–222.
- Cecilio, L.A., and Bonatto, M.W. (2015). The prevalence of HLA DQ2 and HLA DQ8 in patients with celiac disease, in family and in general population. *Arq. Bras. Cir. Dig. ABCD Braz. Arch. Dig. Surg.* *28*, 183–185.
- Chatterjee, N.K., Nejman, C., and Gerling, I. (1988). Purification and characterization of a strain of coxsackievirus B4 of human origin that induces diabetes in mice. *J. Med. Virol.* *26*, 57–69.
- Choi, K.H. (2012). Viral Polymerases. *Adv. Exp. Med. Biol.* *726*, 267–304.
- Cinek, O., Stene, L.C., Kramna, L., Tapia, G., Oikarinen, S., Witsø, E., Rasmussen, T., Torjesen, P.A., Hyöty, H., and Rønningen, K.S. (2014). Enterovirus RNA in longitudinal blood samples and risk of islet autoimmunity in children with a high genetic risk of type 1 diabetes: the MIDIA study. *Diabetologia* *57*, 2193–2200.
- Claas, E.C.J., Schilham, M.W., de Brouwer, C.S., Hubacek, P., Echavarria, M., Lankester, A.C., van Tol, M.J.D., and Kroes, A.C.M. (2005). Internally Controlled Real-Time PCR Monitoring of Adenovirus DNA Load in Serum or Plasma of Transplant Recipients. *J. Clin. Microbiol.* *43*, 1738–1744.
- Cohn, A., Sofia, M.A., and Kupfer, S.S. (2014). Type 1 Diabetes and Celiac Disease: Clinical Overlap and New Insights into Disease Pathogenesis. *Curr. Diab. Rep.* *14*, 517.
- Comeau, A.M., Hatfull, G.F., Krisch, H.M., Lindell, D., Mann, N.H., and Prangishvili, D. (2008). Exploring the prokaryotic virosphere. *Res. Microbiol.* *159*, 306–313.
- de Crom, S.C.M., Rossen, J.W.A., van Furth, A.M., and Obihara, C.C. (2016). Enterovirus and parechovirus infection in children: a brief overview. *Eur. J. Pediatr.* *175*, 1023–1029.
- Cupelli, K., and Stehle, T. (2011). Viral attachment strategies: the many faces of adenoviruses. *Curr. Opin. Virol.* *1*, 84–91.
- Dupuis, M., Hull, R., Wang, H., Nattanmai, S., Glasheen, B., Fusco, H., Dzigua, L., Markey, K., and Tavakoli, N.P. (2011). Molecular detection of viral causes of encephalitis and meningitis in New York State. *J. Med. Virol.* *83*, 2172–2181.
- Ebner, K., Pinsker, W., and Lion, T. (2005). Comparative Sequence Analysis of the Hexon Gene in the Entire Spectrum of Human Adenovirus Serotypes: Phylogenetic, Taxonomic, and Clinical Implications. *J. Virol.* *79*, 12635–12642.
- Fields, B.N., and Knipe, D.M. (1991). *Fundamental Virology* (Raven Press).
- Fields, B.N., Knipe, D.M., and Howley, P.M. (2013). *Fields virology* (Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins).
- Filho, E.P., da Costa Faria, N.R., Fialho, A.M., de Assis, R.S., Almeida, M.M.S., Rocha, M., Galvao, M., dos Santos, F.B., Barreto, M.L., and Leite, J.P.G. (2007). Adenoviruses associated with acute gastroenteritis in hospitalized and community children up to 5 years old in Rio de Janeiro and Salvador, Brazil. *J. Med. Microbiol.* *56*, 313–319.
- Finkbeiner, S.R., Allred, A.F., Tarr, P.I., Klein, E.J., Kirkwood, C.D., and Wang, D. (2008). Metagenomic Analysis of Human Diarrhea: Viral Detection and Discovery. *PLoS Pathog.* *4*.

Gamble, D.R., Kinsley, M.L., FitzGerald, M.G., Bolton, R., and Taylor, K.W. (1969). Viral Antibodies in Diabetes Mellitus. *Br. Med. J.* 3, 627–630.

GeneProof Adenovirus PCR Kit GeneProof Adenovirus PCR Kit.

Gopalkrishna, V., Ganorkar, N.N., and Patil, P.R. (2016). Identification and molecular characterization of adenovirus types (HAdV-8, HAdV-37, HAdV-4, HAdV-3) in an epidemic of keratoconjunctivitis occurred in Pune, Maharashtra, Western India. *J. Med. Virol.* 88, 2100–2105.

Gough, S.C., and Simmonds, M. (2007). The HLA Region and Autoimmune Disease: Associations and Mechanisms of Action. *Curr. Genomics* 8, 453–465.

Gravitz, L. (2012). Turning a new phage. *Nat. Med.* 18, 1318–1320.

Greco, L., Babron, M.C., Corazza, G.R., Percopo, S., Sica, R., Clot, F., Fulchignoni-Lataud, M.C., Zavattari, P., Momigliano-Richiardi, P., Casari, G., et al. (2001). Existence of a genetic risk factor on chromosome 5q in Italian coeliac disease families. *Ann. Hum. Genet.* 65, 35–41.

Greninger, A.L., Chen, E.C., Sittler, T., Scheinerman, A., Roubinian, N., Yu, G., Kim, E., Pillai, D.R., Guyard, C., Mazzulli, T., et al. (2010). A Metagenomic Analysis of Pandemic Influenza A (2009 H1N1) Infection in Patients from North America. *PLOS ONE* 5, e13381.

Grose, J.H., and Casjens, S.R. (2014). Understanding the enormous diversity of bacteriophages: The tailed phages that infect the bacterial family Enterobacteriaceae. *Virology* 468–470, 421–443.

Gujral, N., Freeman, H.J., and Thomson, A.B. (2012). Celiac disease: Prevalence, diagnosis, pathogenesis and treatment. *World J. Gastroenterol.* WJG 18, 6036–6059.

Hatfull, G.F. (2008). Bacteriophage Genomics. *Curr. Opin. Microbiol.* 11, 447–453.

Honkanen, H., Oikarinen, S., Pakkanen, O., Ruokoranta, T., Pulkki, M.M., Laitinen, O.H., Tauriainen, S., Korpela, S., Lappalainen, M., Vuorinen, T., et al. (2013). Human enterovirus 71 strains in the background population and in hospital patients in Finland. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* 56, 348–353.

Horwitz, M.S., Bradley, L.M., Harbertson, J., Krahl, T., Lee, J., and Sarvennick, N. (1998). Diabetes induced by Coxsackie virus: Initiation by bystander damage and not molecular mimicry. *Nat. Med.* 4, 781–785.

Howdle, P.D., Blair Zajdel, M.E., Smart, C.J., Trejdosiewicz, L.K., Blair, G.E., and Losowky, M.S. (1989). Lack of a serologic response to an E1B protein of adenovirus 12 in coeliac disease. *Scand. J. Gastroenterol.* 24, 282–286.

International Diabetes Federation, 2017 (2017). *IDF Diabetes Atlas, 8th edn.* Brussels, Belgium.

Jäidane, H., Sauter, P., Sane, F., Goffard, A., Gharbi, J., and Hober, D. (2010). Enteroviruses and type 1 diabetes: towards a better understanding of the relationship. *Rev. Med. Virol.* 20, 265–280.

Jan Škrha et al. (2009). *Diabetologie (Galén).*

Kagnoff, M.F., Austin, R.K., Hubert, J.J., Bernardin, J.E., and Kasarda, D.D. (1984). Possible role for a human adenovirus in the pathogenesis of celiac disease. *J. Exp. Med.* 160, 1544–1557.

- Kim, M.-S., Park, E.-J., Roh, S.W., and Bae, J.-W. (2011). Diversity and abundance of single-stranded DNA viruses in human feces. *Appl. Environ. Microbiol.* *77*, 8062–8070.
- Kleiner, M., Hooper, L.V., and Duerkop, B.A. (2015). Evaluation of methods to purify virus-like particles for metagenomic sequencing of intestinal viromes. *BMC Genomics* *16*, 7.
- Knip, M., Virtanen, S.M., and Akerblom, H.K. (2010). Infant feeding and the risk of type 1 diabetes. *Am. J. Clin. Nutr.* *91*, 1506S-1513S.
- König, J., Wells, J., Cani, P.D., García-Ródenas, C.L., MacDonald, T., Mercenier, A., Whyte, J., Troost, F., and Brummer, R.-J. (2016). Human Intestinal Barrier Function in Health and Disease. *Clin. Transl. Gastroenterol.* *7*, e196.
- Koning, F., Schuppan, D., Cerf-Bensussan, N., and Sollid, L.M. (2005). Pathomechanisms in celiac disease. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* *19*, 373–387.
- Kosulin, K., Geiger, E., Vécsei, A., Huber, W.-D., Rauch, M., Brenner, E., Wrba, F., Hammer, K., Innerhofer, A., Pötschger, U., et al. (2016). Persistence and reactivation of human adenoviruses in the gastrointestinal tract. *Clin. Microbiol. Infect.* *22*, 381.e1-381.e8.
- Kramná, L., Kolářová, K., Oikarinen, S., Pursiheimo, J.-P., Ilonen, J., Simell, O., Knip, M., Veijola, R., Hyöty, H., and Cinek, O. (2015). Gut Virome Sequencing in Children With Early Islet Autoimmunity. *Diabetes Care* *38*, 930–933.
- Krupovic, M., Dutilh, B.E., Adriaenssens, E.M., Wittmann, J., Vogensen, F.K., Sullivan, M.B., Rumnieks, J., Prangishvili, D., Lavigne, R., Kropinski, A.M., et al. (2016). Taxonomy of prokaryotic viruses: update from the ICTV bacterial and archaeal viruses subcommittee. *Arch. Virol.* *161*, 1095–1099.
- Lähdeaho, M.-L., Lehtinen, M., Rissa, H.-R., Hyöty, H., Reunala, T., and Mäki, M. (1993). Antipeptide Antibodies to Adenovirus E1b Protein Indicate Enhanced Risk of Celiac Disease and Dermatitis herpetiformis. *Int. Arch. Allergy Immunol.* *101*, 272–276.
- Laitinen, O.H., Honkanen, H., Pakkanen, O., Oikarinen, S., Hankaniemi, M.M., Huhtala, H., Ruokoranta, T., Lecouturier, V., André, P., Harju, R., et al. (2014). Coxsackievirus B1 Is Associated With Induction of β -Cell Autoimmunity That Portends Type 1 Diabetes. *Diabetes* *63*, 446–455.
- Larsson, K., Carlsson, A., Cederwall, E., Jönsson, B., Neiderud, J., Jonsson, B., Lernmark, A., Ivarsson, S.A., and Skåne Study Group (2008). Annual screening detects celiac disease in children with type 1 diabetes. *Pediatr. Diabetes* *9*, 354–359.
- LeGoff, J., Feghoul, L., Mercier-Delarue, S., Dalle, J.-H., Scieux, C., Chérot, J., de Fontbrune, F.S., Baruchel, A., Socié, G., and Simon, F. (2013). Broad-Range PCR-Electrospray Ionization Mass Spectrometry for Detection and Typing of Adenovirus and Other Opportunistic Viruses in Stem Cell Transplant Patients. *J. Clin. Microbiol.* *51*, 4186–4192.
- Lehuen, A., Diana, J., Zacccone, P., and Cooke, A. (2010). Immune cell crosstalk in type 1 diabetes. *Nat. Rev. Immunol.* *10*, 501–513.
- Li, Y., Zhou, W., Zhao, Y., Wang, Y., Xie, Z., Lou, Y., and Tan, W. (2015). Molecular Typing and Epidemiology Profiles of Human Adenovirus Infection among Paediatric Patients with Severe Acute Respiratory Infection in China. *PLoS ONE* *10*.

- Lin, J.-Y., Chen, T.-C., Weng, K.-F., Chang, S.-C., Chen, L.-L., and Shih, S.-R. (2009). Viral and host proteins involved in picornavirus life cycle. *J. Biomed. Sci.* *16*, 103.
- Lion, T. (2014). Adenovirus Infections in Immunocompetent and Immunocompromised Patients. *Clin. Microbiol. Rev.* *27*, 441–462.
- Liu, Y., and Rossmann, M.G. (2014). The cellular receptor for enterovirus 71. *Protein Cell* *5*, 655–657.
- Liu, E.B., Ferreyra, L., Fischer, S.L., Pavan, J.V., Nates, S.V., Hudson, N.R., Tirado, D., Dyer, D.W., Chodosh, J., Seto, D., et al. (2011). Genetic Analysis of a Novel Human Adenovirus with a Serologically Unique Hexon and a Recombinant Fiber Gene. *PLOS ONE* *6*, e24491.
- Liu, J., Juo, S.-H., Holopainen, P., Terwilliger, J., Tong, X., Grunn, A., Brito, M., Green, P., Mustalahti, K., Mäki, M., et al. (2002). Genomewide linkage analysis of celiac disease in Finnish families. *Am. J. Hum. Genet.* *70*, 51–59.
- Liu, L., Qian, Y., Zhang, Y., Zhao, L., Jia, L., and Dong, H. (2016). Epidemiological aspects of rotavirus and adenovirus in hospitalized children with diarrhea: a 5-year survey in Beijing. *BMC Infect. Dis.* *16*.
- Ly, M., Abeles, S.R., Boehm, T.K., Robles-Sikisaka, R., Naidu, M., Santiago-Rodriguez, T., and Pride, D.T. (2014). Altered Oral Viral Ecology in Association with Periodontal Disease. *MBio* *5*, e01133-14.
- Mahon, J., Blair, G.E., Wood, G.M., Scott, B.B., Losowsky, M.S., and Howdle, P.D. (1991). Is persistent adenovirus 12 infection involved in coeliac disease? A search for viral DNA using the polymerase chain reaction. *Gut* *32*, 1114–1116.
- Mann, N.H. (2005). The Third Age of Phage. *PLOS Biol.* *3*, e182.
- Margulies, M., Egholm, M., E Altman, W., Attiya, S., Bader, J., A Bemben, L., Berka, J., Braverman, M., Chen, Y.-J., Chen, Z., et al. (2005). Genome Sequencing in Microfabricated High-Density Picolitre Reactors. *Nature* *437*, 376–380.
- Martínez, M.A., Río, M. de los D.S., Gutiérrez, R.M., Chiu, C.Y., Greninger, A.L., Contreras, J.F., López, S., Arias, C.F., and Isa, P. (2015). DNA Microarray for Detection of Gastrointestinal Viruses. *J. Clin. Microbiol.* *53*, 136–145.
- Moyo, S.J., Hanevik, K., Blomberg, B., Kommedal, O., Nordbø, S.A., Maselle, S., and Langeland, N. (2014). Prevalence and molecular characterisation of human adenovirus in diarrhoeic children in Tanzania; a case control study. *BMC Infect. Dis.* *14*, 666.
- Muniesa, M., and Jofre, J. (2014). Identifying and analyzing bacteriophages in human fecal samples: what could we discover? *Future Microbiol.* *9*, 879–886.
- Mustalahti, K., Catassi, C., Reunanen, A., Fabiani, E., Heier, M., McMillan, S., Murray, L., Metzger, M.-H., Gasparin, M., Bravi, E., et al. (2010). The prevalence of celiac disease in Europe: results of a centralized, international mass screening project. *Ann. Med.* *42*, 587–595.
- Naidu, M., Robles-Sikisaka, R., Abeles, S.R., Boehm, T.K., and Pride, D.T. (2014). Characterization of bacteriophage communities and CRISPR profiles from dental plaque. *BMC Microbiol.* *14*, 175.
- Nishimura, Y., and Shimizu, H. (2012). Cellular Receptors for Human Enterovirus Species A. *Front. Microbiol.* *3*.

- Nix, W.A., Oberste, M.S., and Pallansch, M.A. (2006). Sensitive, seminested PCR amplification of VP1 sequences for direct identification of all enterovirus serotypes from original clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* *44*, 2698–2704.
- Oberste, M.S., Maher, K., Kilpatrick, D.R., and Pallansch, M.A. (1999). Molecular Evolution of the Human Enteroviruses: Correlation of Serotype with VP1 Sequence and Application to Picornavirus Classification. *J. Virol.* *73*, 1941–1948.
- Ogilvie, L.A., Bowler, L.D., Caplin, J., Dedi, C., Diston, D., Cheek, E., Taylor, H., Ebdon, J.E., and Jones, B.V. (2013). Genome signature-based dissection of human gut metagenomes to extract subliminal viral sequences. *Nat. Commun.* *4*, 2420.
- Oikarinen, S., Tauriainen, S., Hober, D., Lucas, B., Vazeou, A., Sioofy-Khojine, A., Bozas, E., Muir, P., Honkanen, H., Ilonen, J., et al. (2014). Virus antibody survey in different European populations indicates risk association between coxsackievirus B1 and type 1 diabetes. *Diabetes* *63*, 655–662.
- Ouédraogo, N., Kaplon, J., Bonkougou, I.J.O., Traoré, A.S., Pothier, P., Barro, N., and Ambert-Balay, K. (2016). Prevalence and Genetic Diversity of Enteric Viruses in Children with Diarrhea in Ouagadougou, Burkina Faso. *PLoS ONE* *11*.
- Papadakis, G., Chibo, Doris, Druce, Julian, Catton, Michael, and Birch, Chris (2014). Detection and genotyping of enteroviruses in cerebrospinal fluid in patients in Victoria, Australia, 2007–2013. *J. Med. Virol.* *86*, 1609–1613.
- Park, H.S., Park, S.-J., Kim, J.Y., Kim, S., Ryu, J., Sohn, J., Park, S., Kim, G.M., Hwang, I.S., Choi, J.-R., et al. (2017). Next-generation sequencing of BRCA1/2 in breast cancer patients: potential effects on clinical decision-making using rapid, high-accuracy genetic results. *Ann. Surg. Treat. Res.* *92*, 331–339.
- Pedulla, M.L., Ford, M.E., Houtz, J.M., Karthikeyan, T., Wadsworth, C., Lewis, J.A., Jacobs-Sera, D., Falbo, J., Gross, J., Pannunzio, N.R., et al. (2003). Origins of Highly Mosaic Mycobacteriophage Genomes. *Cell* *113*, 171–182.
- Penadés, J.R., Chen, J., Quiles-Puchalt, N., Carpena, N., and Novick, R.P. (2015). Bacteriophage-mediated spread of bacterial virulence genes. *Curr. Opin. Microbiol.* *23*, 171–178.
- Petronzelli, F., Bonamico, M., Ferrante, P., Grillo, R., Mora, B., Mariani, P., Apollonio, I., Gemme, G., and Mazzilli, M.C. (1997). Genetic contribution of the HLA region to the familial clustering of coeliac disease. *Ann. Hum. Genet.* *61*, 307–317.
- Pham, N.T.K., Trinh, Q.D., Chan-It, W., Khamrin, P., Shimizu, H., Okitsu, S., Mizuguchi, M., and Ushijima, H. (2010). A novel RT-multiplex PCR for detection of Aichi virus, human parechovirus, enteroviruses, and human bocavirus among infants and children with acute gastroenteritis. *J. Virol. Methods* *169*, 193–197.
- Plot, L., and Amital, H. (2009). Infectious associations of Celiac disease. *Autoimmun. Rev.* *8*, 316–319.
- Pociot, F., and McDermott, M.F. (2002). Genetics of type 1 diabetes mellitus. *Genes Immun.* *3*, 235–249.
- Portes, S.A.R., Carvalho-Costa, F.A., Rocha, M.S., Fumian, T.M., Maranhão, A.G., Assis, R.M. de, Xavier, M. da P.T.P., Rocha, M.S., Miagostovich, M.P., Leite, J.P.G., et al. (2017). Enteric viruses in HIV-1 seropositive and HIV-1 seronegative children with diarrheal diseases in Brazil. *PLoS ONE* *12*.

- Prober, J.M., Trainor, G.L., Dam, R.J., Hobbs, F.W., Robertson, C.W., Zagursky, R.J., Cocuzza, A.J., Jensen, M.A., and Baumeister, K. (1987). A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain-terminating dideoxynucleotides. *Science* 238, 336–341.
- Rautava, S. (2016). Early microbial contact, the breast milk microbiome and child health. *J. Dev. Orig. Health Dis.* 7, 5–14.
- Reyes, A., Haynes, M., Hanson, N., Angly, F.E., Heath, A.C., Rohwer, F., and Gordon, J.I. (2010). Viruses in the fecal microbiota of monozygotic twins and their mothers. *Nature* 466, 334–338.
- Reyes, A., Semenkovich, N.P., Whiteson, K., Rohwer, F., and Gordon, J.I. (2012). Going viral: next-generation sequencing applied to phage populations in the human gut. *Nat. Rev. Microbiol.* 10, 607–617.
- Robinson, C.M., Singh, G., Lee, J.Y., Dehghan, S., Rajaiya, J., Liu, E.B., Yousuf, M.A., Betensky, R.A., Jones, M.S., Dyer, D.W., et al. (2013). Molecular evolution of human adenoviruses. *Sci. Rep.* 3, 1812.
- Rohwer, F., and Edwards, R. (2002). The Phage Proteomic Tree: a Genome -Based Taxonomy for Phage. *J. Bacteriol.* 184, 4529–4535.
- Royston, L., and Tapparel, C. (2016). Rhinoviruses and Respiratory Enteroviruses: Not as Simple as ABC. *Viruses* 8.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74, 5463–5467.
- Sanschagrin, S., and Yergeau, E. (2014). Next-generation sequencing of 16S ribosomal RNA gene amplicons. *J. Vis. Exp. JoVE.*
- Santti, J., Hyypiä, T., Kinnunen, L., and Salminen, M. (1999). Evidence of Recombination among Enteroviruses. *J. Virol.* 73, 8741–8749.
- Sarantis, H., Johnson, G., Brown, M., Petric, M., and Tellier, R. (2004). Comprehensive Detection and Serotyping of Human Adenoviruses by PCR and Sequencing. *J. Clin. Microbiol.* 42, 3963–3969.
- Sawyer, M.H. (2002). Enterovirus infections: Diagnosis and treatment. *Semin. Pediatr. Infect. Dis.* 13, 40–47.
- Simonen-Tikka, M.-L., Pflueger, M., Klemola, P., Savolainen-Kopra, C., Smura, T., Hummel, S., Kaijalainen, S., Nuutila, K., Natri, O., Roivainen, M., et al. (2011). Human enterovirus infections in children at increased risk for type 1 diabetes: the Babydiet study. *Diabetologia* 54, 2995–3002.
- Singh, G., Zhou, X., Lee, J.Y., Yousuf, M.A., Ramke, M., Ismail, A.M., Lee, J.S., Robinson, C.M., Seto, D., Dyer, D.W., et al. (2015). Recombination of the epsilon determinant and corneal tropism: Human adenovirus species D types 15, 29, 56, and 69. *Virology* 485, 452–459.
- Stene, L.C., Sami Oikarinen, Hyöty, H., Barriga, K.J., Norris, J.M., Klingensmith, G., Hutton, J.C., Erlich, H.A., Eisenbarth, G.S., and Rewers, M. (2010). Enterovirus infection and progression from islet autoimmunity to type 1 diabetes: the Diabetes and Autoimmunity Study in the Young (DAISY). *Diabetes* 59, 3174–3180.
- Storch, G.A., Reller, L.B., and Weinstein, M.P. (2000). Diagnostic Virology. *Clin. Infect. Dis.* 31, 739–751.

- Strauss, J.H., and Strauss, E.G. (2008). {Chapter} 2 - The Structure of Viruses. In *Viruses and Human Disease (Second Edition)*, J.H. Strauss, and E.G. Strauss, eds. (London: Academic Press), pp. 35–62.
- Takeuchi, S., Itoh, N., Uchio, E., Aoki, K., and Ohno, S. (1999). Serotyping of Adenoviruses on Conjunctival Scrapings by PCR and Sequence Analysis. *J. Clin. Microbiol.* *37*, 1839–1845.
- Tanaka, M., and Nakayama, J. (2017). Development of the gut microbiota in infancy and its impact on health in later life. *Allergol. Int.* *66*, 515–522.
- Thoelen, I., Moës, E., Lemey, P., Mostmans, S., Wollants, E., Lindberg, A.M., Vandamme, A.-M., and Ranst, M.V. (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*, 963–971.
- Thounaojam, A.D., Balakrishnan, A., and Mun, A.B. (2016). Detection and Molecular Typing of Human Adenoviruses Associated with Respiratory Illnesses in Kerala. *Jpn. J. Infect. Dis.* *69*, 500–504.
- Tracy, S., Drescher, K.M., Chapman, N.M., Kim, K.-S., Carson, S.D., Pirruccello, S., Lane, P.H., Romero, J.R., and Leser, J.S. (2002). Toward Testing the Hypothesis that Group B Coxsackieviruses (CVB) Trigger Insulin-Dependent Diabetes: Inoculating Nonobese Diabetic Mice with CVB Markedly Lowers Diabetes Incidence. *J. Virol.* *76*, 12097–12111.
- Trynka, G., Hunt, K.A., Bockett, N.A., Romanos, J., Mistry, V., Szperl, A., Bakker, S.F., Bardella, M.T., Bhaw-Rosun, L., Castillejo, G., et al. (2011). Dense genotyping identifies and localizes multiple common and rare variant association signals in celiac disease. *Nat. Genet.* *43*, 1193–1201.
- Twort, F.W. (1915). AN INVESTIGATION ON THE NATURE OF ULTRA-MICROSCOPIC VIRUSES. *The Lancet* *186*, 1241–1243.
- Twort, F.W. (1936). Further Investigations on the Nature of Ultra-Microscopic Viruses and their Cultivation. *J. Hyg. (Lond.)* *36*, 204–235.
- Victoria, J.G., Kapoor, A., Li, L., Blinkova, O., Slikas, B., Wang, C., Naeem, A., Zaidi, S., and Delwart, E. (2009). Metagenomic Analyses of Viruses in Stool Samples from Children with Acute Flaccid Paralysis. *J. Virol.* *83*, 4642–4651.
- Wang, D., Urisman, A., Liu, Y.-T., Springer, M., Ksiazek, T.G., Erdman, D.D., Mardis, E.R., Hickenbotham, M., Magrini, V., Eldred, J., et al. (2003). Viral discovery and sequence recovery using DNA microarrays. *PLoS Biol.* *1*, E2.
- Wiedbrauk, D.L., and Farkas, D.H. (1995). *Molecular Methods for Virus Detection* (Elsevier).
- World Health Organization (WHO) World Health Organization (WHO) Regional Office for Europe. Enterovirus surveillance guidelines: Guidelines for enterovirus surveillance in support of the Polio Eradication Initiative. Copenhagen: WHO; 2015. Available from: http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0020/272810/EnterovirusSurveillanceGuidelines.pdf.
- Yates, M.V. (2014). Chapter Twenty-Five - Enterovirus. In *Microbiology of Waterborne Diseases (Second Edition)*, (London: Academic Press), pp. 493–504.
- Yeung, W.-C.G., Rawlinson, W.D., and Craig, M.E. (2011). Enterovirus infection and type 1 diabetes mellitus: systematic review and meta-analysis of observational molecular studies. *BMJ* *342*, d35.

Zagursky, R.J., and Hays, J.B. (1983). Expression of the phage λ recombination genes *exo* and *bet* under *lacPO* control on a multi-copy plasmid. *Gene* 23, 277–292.

Zhao, H., Chen, M., and Pettersson, U. (2014). A new look at adenovirus splicing. *Virology* 456–457, 329–341.