



FUNKČNÍ VZOREK

Metoda detekce viru klíšťové encefalitidy v mléku

RNDr. Jiří Salát, Ph.D.
Bc. Michal Štefánik
Doc. RNDr. Daniel Růžek, Ph.D.

5464
2019

5464/2019

Funkční vzorek

Metoda detekce viru klíšťové encefalitidy v mléku

RNDr. Jiří Salát, Ph.D.
Bc. Michal Štefánik
Doc. RNDr. Daniel Růžek, Ph.D.

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i., Brno

2019

Funkční vzorek byl vytvořen v rámci projektu QK1920258
Národní agentury zemědělského výzkumu Ministerstva zemědělství České republiky.

ISBN 978-80-88233-76-3

OBSAH

1. Úvod	3
2. Cíl metodiky funkčního vzorku	4
3. Popis funkčního vzorku	4
3.1. Metodika funkčního vzorku	4
3.1.1. Test plakové titrace VKE v mléku	5
3.1.2. Detekce RNA VKE pomocí real-time RT-PCR	5
3.2. Výsledky	6
3.2.1. Plaková titrace – záchyt životaschopného viru	6
3.2.2. Real-time RT-PCR - detekce nukleové kyseliny VKE	7
3.2.3. Výsledky – shrnutí	7
4. Srovnání novosti postupu	8
5. Uplatnění funkčního vzorku	8
6. Ekonomické aspekty	8
7. Seznam použité související literatury	9
8. Dedikace	9

1. Úvod

Klíšťová encefalitida (KE) je závažné infekční onemocnění člověka, které poškozuje zejména centrální nervový systém (CNS). V ČR je každoročně zaznamenáváno přibližně 600 případů onemocnění.

Původcem onemocnění je virus KE (VKE), který je řazen mezi arboviry, tedy mezi viry přenášené krev sajícími členovci (Palus a Růžek, 2013). Genom viru tvoří jednovláknová RNA kódující tři strukturní proteiny (C, M, E) a sedm nestrukturních proteinů. Nukleokapsida viru je tvořena virovou nukleovou kyselinou a kapsidovým proteinem C. Toto virové jádro je obaleno lipidovou membránou obsahující proteiny M a E. Protein E je hlavním povrchovým antigenem, který umožňuje vazbu na povrchové receptory hostitelské buňky a zprostředkovává tak její infekci (Heinz, 1986).

Člověk je VKE nejčastěji infikován během infestace (přichycení a sání krve) infikovaným klíštětem. Druhým přirozeným způsobem přenosu je alimentární cesta po požití mléka nebo mléčných produktů obsahujících VKE. Hlavním přenašečem klíšťové encefalitidy v České republice je klíště obecné (*Ixodes ricinus*), výskyt KE je proto úzce svázán s rozšířením tohoto parazita a obdobím jeho aktivity během roku. Nejzávažnější forma onemocnění KE se projevuje jako encefalomyelitida (zánět mozku a míchy), která bývá spojena s nejtěžšími nebo i fatálními případy infekce (Gritsun a kol., 2003). V evropských zemích umírá na KE přibližně 1,5 % pacientů. Se vzrůstajícím věkem pacienta roste pravděpodobnost vzniku závažnějšího onemocnění a následně narůstá i četnost trvalých následků po prodělaném onemocnění i počet případů končících smrtí nemocného (Lindquist a Vapalahti, 2008).

Mimo typických hostitelů VKE, zahrnujících obratlovce jako jsou hlodavci a hmyzožravci, kteří spolu s přenašečem sehrávají hlavní úlohu v udržení ohniska KE v daném prostředí, mohou být virem infikována také domestikovaná zvířata. U přežvýkavců má KE obvykle podobu asymptomatické infekce a nepředstavuje tak zdravotní problém pro samotného nakaženého hostitele. Riziko nákazy však ohrožuje člověka konzumujícího mléko nebo mléčné produkty. Alimentární cesta nákazy KE je druhým nejčastějším způsobem infekce člověka. Oproti náhodnému výskytu KE při infekcích přenesených klíšťaty mají alimentární infekce typický rodinný výskyt související s konzumací virem kontaminované potravy. Zdrojem alimentární infekce člověka bylo identifikováno mléko koz, ovcí i krav infikovaných VKE. Přežvýkavci jsou obvykle infikováni VKE v období pastvy při sání nakaženého klíštěte. Experimentálně bylo potvrzeno, že u všech výše uvedených druhů přežvýkavců dochází po infekci KE k přechodné virémii trvající zpravidla několik dnů a následně je možné virus detekovat v mléku (Grešíková, 1999).

Virus je v mléku dlouhodobě stabilní. Ve fyziologickém roztoku přitom přežívá po 14 dnech sledování pouze minimální množství virových částic. Na základě těchto zjištění bylo predikováno, že mléko má protektivní vliv na stabilitu VKE a pokud je kontaminováno, zachovává si infekčnost pro spotřebitele po celou dobu jeho použitelnosti. Životaschopný virus se podařilo prokázat i ve všech

testovaných mléčných produktech (kyselé mléko, máslo, smetana, tvaroh a syrovátka), přičemž nejvyšší stabilita viru byla zaznamenána v másle, kde během dvou měsíců sledování nedošlo k významnému poklesu koncentrace infekčních částic. VKE je možné v mléku účinně inaktivovat pasterizací při 72°C (Grešíková a kol., 1960). Pasterizace nebo převaření mléka je doporučováno jako základní preventivní opatření ochrany spotřebitele před alimentární infekcí KE.

Alimentární infekce KE byly zaznamenány ve většině zemí, kde se infekce přirozeně vyskytuje. Nejrozsáhlejší epidemie KE způsobená konzumací nepasterizovaného koziho mléka propukla v Rožňavě v bývalém Československu v roce 1951. Mlékem kontaminovaným VKE bylo nakaženo přes 660 lidí a 271 z nich muselo být hospitalizováno kvůli závažnému průběhu onemocnění (Blaškovič, 1954). V posledních letech se v České republice objevují epidemie alimentární KE malého rozsahu. V letech 1997-2008 bylo v České republice zaznamenáno 64 případů KE alimentárního původu, což odpovídalo 0,9 % všech případů diagnostikovaných KE v uvedeném období. Onemocnění propuklo po požití tepelně neupraveného koziho mléka (56,3 %), ovčího sýra (32,8 %) nebo kravského mléka (10,9 %) (Kříž a kol., 2009). První zdokumentovaná epidemie KE pocházející z ovčího sýru byla zaznamenána na Slovensku (Grešíková a kol., 1975), další opakované výskyty alimentárního typu infekce jsou v této zemi obvykle spojované s konzumací nepasterizovaného mléka ovcí a koz (Labuda a kol., 2002). I v současnosti je značný výskyt KE alimentárního původu zaznamenáván na Slovensku. Mezi lety 2007 – 2016 bylo v této zemi zaznamenáno 26 lokálních epidemií souvisejících s konzumací nepasterizovaného mléka nebo mléčných produktů. Nejčastějším zdrojem infekcí bylo kozí (61,5 %) a ovčí mléko (26,9 %) (Kerlik a kol., 2018).

Výskyt KE u přežvýkavců v endemických oblastech je obvykle poměrně vysoký. Průzkum z posledních let zjišťující výskyt KE v chovech malých přežvýkavců v České republice odhalil 24 % séroprevalenci u koz a 39 % u ovcí. Pozitivní vzorky byly zaznamenány v 79 % chovů koz a v 97 % chovů ovcí (Salát a kol. 2018). Riziko alimentární infekce KE v České republice je z tohoto pohledu značné. Efektivní metoda průkazu VKE v mléku je důležitá zejména pro vyšetřování potenciálně rizikových vzorků nebo pro hledání zdroje případné alimentární infekce KE.

2. Cíl metodiky funkčního vzorku

Cílem funkčního vzorku bylo zavedení metody pro záchyt a stanovení množství infekčních částic VKE v mléku.

3. Popis funkčního vzorku

3.1. Metodika funkčního vzorku

Pro konstrukci a zavedení metody na stanovení infekčních částic VKE v mléku byl jako modelový systém pro vlastní testy použit český prototypový kmen VKE Hypr a ovčí mléko. Do syrového mléka byl přidán VKE do finální koncentrace 10^5 PFU/ml (PFU – „plaque forming unit“ –

plakotvorná jednotka – standardizovaný měřitelný ekvivalent infekční virové částice), což je množství viru, které se může v mléku malých přežvýkavců při infekci přirozeně vyskytovat. Následně byly připraveny alikvóty (1 ml) mléka s přidaným VKE do mikrozkušavek (1,5 ml), které byly uloženy při 4°C nebo 8°C. Jednotlivé vzorky byly následně po dobu 10 dnů v jednodenních intervalech odebírány a zamraženy na –80°C. Poté byly vzorky ze všech časových intervalů rozmraženy a mléko odstředěno. Takto připravený materiál byl následně použit pro testování přítomnosti VKE.

3.1.1. Test plakové titrace VKE v mléku

Jako základní test pro záchyt infekčních částic VKE byla použita metoda plakové titrace. Toto testování je prováděno na permanentní buněčné linii PS (původně připravené z epitelu ledvin prasete). Buňky byly kultivovány v živném médiu (L15 s 3 % bovinního fetálního séra a 1% roztoku antibiotik (Sigma)) v jamkách plastové kultivační desky (24 jamková kultivační deska (TPP)), na jejíž povrch přilnou a pokryjí celé její dno (2×10^5 buněk/jamku). Z jamek se poté odebralo médium a přidal se testovaný materiál – odstředěné mléko obsahující virus (20 μ l v 0,18 ml živného média). Jako pozitivní kontrola je v testu používán český prototypový kmen VKE Hypr. Materiál je v dalších jamkách panelu v rámci testu desítkově ředěn. Maximální ředění původního materiálu v provedeném testu bylo 1 : 10 000. Po 2 h inkubaci při 37 °C bylo do jamek přidáno 0,3 ml média a 0,4 ml 3 % roztoku karboxymethylcelulóza (naředěné 1:1 v $2 \times$ koncentrovaném médiu L15). Následné přidání karboxymethylcelulózy způsobí zvýšení viskozity média a zabrání tak volnému šíření infekce v jamce. Virus se tak může šířit pouze z infikované buňky na buňky sousední a vytvářet tak cytopatickým efektem v souvislé vrstvě buněk plaky, což jsou oblasti mrtvých buněk, které se odloučí z povrchu jamky. Po pěti dnech kultivace v termostatu při 37°C byly plaky vizualizovány barvením. Panely se nejprve promyly fyziologickým roztokem a následně se barvily roztokem naftalenové modři (1 g naftalenové černě, 60 ml ledové kyseliny octové, 13,6 g octanu sodného, doplněno do 1 l destilované vody) po dobu 45 min. Po obarvení panelů je možné vizualizované plaky spočítat a určit tak výslednou koncentraci virových částic v mléku v hodnotách PFU/ml.

3.1.2. Detekce RNA VKE pomocí real-time RT-PCR

Pro specifickou confirmaci přítomnosti VKE v mléku byla použita metoda RT-PCR (reverzně transkripční polymerázová řetězová reakce). Při této metodě je z testovaného materiálu nejprve izolována virová RNA. Izolace RNA byla provedena z 0,14 ml odstředěného mléka obsahujícího VKE pomocí izolačního kitu QIAmp Viral RNA mini kit (Qiagen). Vlastní jednokroková real time RT-PCR reakce byla provedena za použití Oasig lyophilised OneStep qRT-PCR MasterMix (Genesig) a Path-TBEV-standard (Genesig). Vlastní real-time RT-PCR reakce a její analýza byla provedena na LightCycler 480 II v 96 jamkové desce. Při této reakci dochází nejprve k přepisu RNA na DNA a následně je monitorováno množství vznikajících kopií cílového genu vlastní PCR reakcí v reálném čase. Při této reakci dochází k exponenciální replikaci cílového úseku nukleové kyseliny a za pomoci

fluorescenčně značených sond je vyhodnocena koncentrace hledané virové RNA v původním materiálu s využitím standardů o známém množství kopií cílového genu.

Program real-time RT-PCR reakce:

Reverzní transkripce: 10 min 55°C

Aktivace enzymů: 2 min 95°C

50 cyklů:

Denaturace: 10 s 95°C

Syntéza DNA a detekce signálu: 60 s 60°C

Složení reakční směsi:

OneStep qRT-PCR MasterMix: 10 µl

Oligonukleotidy a sonda (Path-TBEV): 1 µl

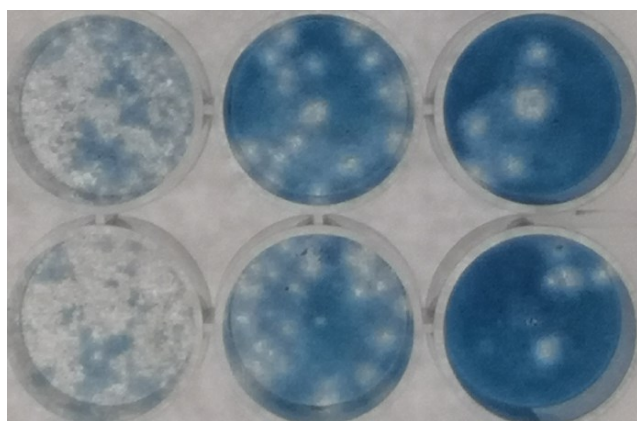
voda: 4 µl

izolovaná RNA: 5 µl

3.2. Výsledky

3.2.1. Plaková titrace – záchyt životaschopného viru

S využitím modelových experimentů se podařilo prokázat, že metoda plakové titrace je vhodným testem pro detekci infekce schopných částic VKE v mléku. Po nabarvení panelů je možné počítat vizualizované plaky (Obr. 1, Tab. 1).



Obr. 1: Metoda plakové titrace. Vizualizované plaky (bílá místa bez buněk) po nabarvení zbylých živých neinfikovaných buněk přisedlých na dně jamky titrační desky.

Tab. 1: Počet plaků v jamkách, kde byl testovaný vzorek tisícinásobně ředěn.

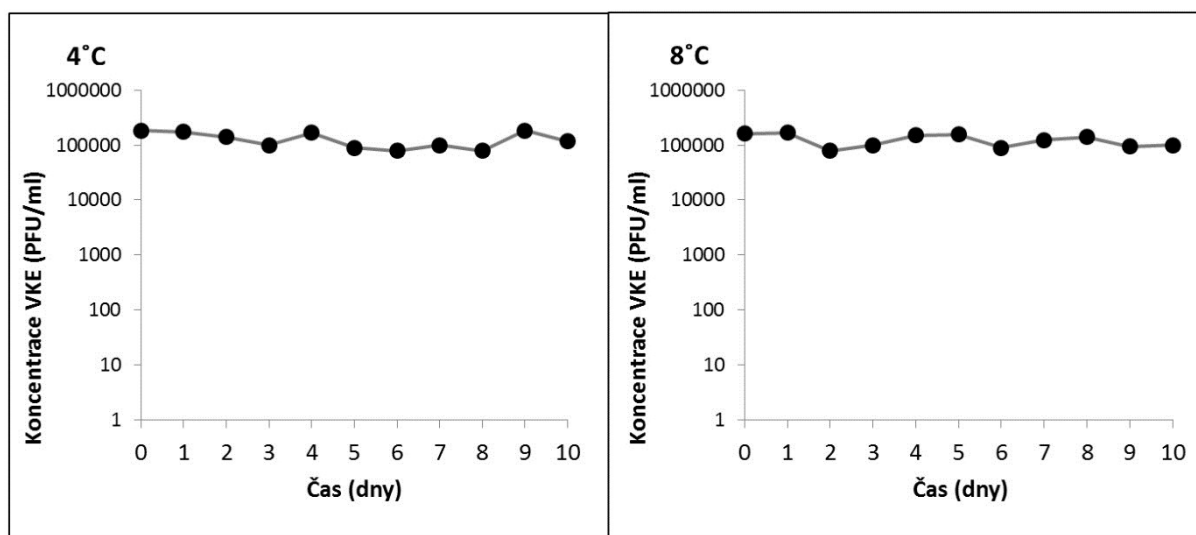
Doba inkubace (dny)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Počet plaků při 4°C	33	31	25	18	30	16	14	18	14	33	21
Počet plaků při 8°C	29	30	14	18	27	28	16	22	25	17	18

Vlastní výpočet koncentrace PFU/ml je prováděn na základě počtu plaků v příslušném ředění vzorku:

$$\text{Koncentrace viru (PFU/ml)} = (A \times R \times 1000) / 180$$

Kde A je počet plaků v jamce a R je hodnota ředění původního vzorku.

Z výsledku je zřejmé, že VKE je v mléku dlouhodobě stabilní (Obr. 2). Limit detekce VKE pro tuto metodu byl stanoven na 10^2 PFU/ml mléka při analýze 120 μ l vstupního množství testovaného materiálu. Metoda je vhodná i pro zachyt VKE v mléku uskladněném po delší dobu při chladničkové teplotě. Přítomnost VKE v mléku bylo možné prokázat po celou dobu testování (10 dnů). Ani na konci sledovaného období nebyl zaznamenán pokles koncentrace viru v mléku při 4°C nebo 8°C (Obr. 2).



Obr. 2: Stabilita VKE v mléku při 4°C a 8°C. Koncentrace VKE v hodnotách PFU/ml je v grafu zobrazena s využitím logaritmické osy.

Metodu plakové titrace je možné využívat pouze v laboratořích pracujících v režimu práce vyššího stupně biologické ochrany, protože se v průběhu testu používá biologicky rizikové agens (pozitivní kontrola VKE Hypr) spadající do této kategorie.

3.2.2. Real-time RT-PCR - detekce nukleové kyseliny VKE

Za použití metody real-time RT-PCR se podařilo potvrdit přítomnost VKE v testovaných vzorcích. Bylo ověřeno, že metoda je vhodná pro detekci VKE v mléku skladovaném při chladničkové teplotě (4°C nebo 8°C) až po dobu 10 dnů. Specifické oligonukleotidy pro syntézu konkrétního úseku nukleové kyseliny VKE a specifická fluorescenčně značená sonda, která se váže na nově syntetizovanou oblast DNA, zaručují jednoznačné určení přítomnosti RNA VKE. Přítomnost nukleové kyseliny VKE byla v mléku prokázána ve všech testovaných časových intervalech (Tab. 2).

Tab. 2: Záchyt nukleové kyseliny VKE pomocí real-time RT-PCR.

Doba inkubace (dny)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
VKE v mléku (4°C)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
VKE v mléku (8°C)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

3.2.3. Výsledky - shrnutí

Optimální pro vyhodnocení přítomnosti VKE v mléku je kombinace obou metod. Provedením metody plakové titrace lze prokázat přítomnost vlastních infekce schopných částic a testem RT-PCR je možné potvrdit přítomnost VKE na molekulární úrovni.

4. Srovnání novosti postupů

Test detekce infekce schopných částic VKE v mléku metodou plakové titrace není podle našich informací v současné době používán.

5. Uplatnění funkčního vzorku

Funkční vzorek je na pracovištích autorů zaveden a je využíván k výzkumným účelům. Potenciální komerční využití testu závisí na zájmu chovatelů malých přežvýkavců o vyhodnocení míry rizika alimentární infekce KE v daném chovu zaměřené na vyšetřování potenciálně rizikových vzorků. Metoda může být také využita pro hledání zdroje případné alimentární infekce KE.

6. Ekonomické aspekty

V současné době nelze ekonomické aspekty odhadnout. Cena jednotlivých vyšetření a míra potenciálního komerčního zisku bude závislá na množství vyšetřovaných vzorků.

7. Seznam použité literatury

- Blaškovič, D. Epidémia encefalitídy v Rožňavskom prírodnom ohnisku nákaz. SAV, Bratislava. 1954.
- Grešíková, M., Havárnek, I., Gorner, F. Vplyv pasterizácie na infektivitu vírusu kliestovej encefalitídy. Vet Cas 1960, 9:462-469.
- Grešíková, M., Sekeyova, M., Stupalova, S., Necas, S. Sheep milk-borne epidemic of tick-borne encephalitis in Slovakia. Intervirology 1975, 5:57-61.
- Grešíková, M. Kliešťová encefalitída – trvalý verejno-zdravotnícky problém. Veda, SAV, Bratislava. 1999.
- Gritsun, T.S. Lashkevich, V.A., Gould, E.A. Tick-borne encephalitis. Antiviral Res 2003, 57:129-146.
- Heinz, F.X. Epitope mapping of flavivirus glycoproteins. Adv Virus Res 1986, 31:103-168.
- Kerlik, J., Avdicova, M., Stefkovicova, M., Tarkovska, V., Pantikova-Valachova, M., Molcanyi, T., Mezencev, R. Slovakia reports highest occurrence of alimentary tick-borne encephalitis in Europe: analysis of tick-borne encephalitis outbreaks in Slovakia during 2007–2016. Travel Med Infect Dis. 2018, 26:37-42.
- Kříž, B., Beneš, Č., Daniel, M. Alimentary transmission of tick-borne encephalitis in the Czech Republic (1997-2008). Epidemiol Mikrobiol Imunol 2009, 58:98-103.
- Labuda, M., Elecková, E., Licková, M., Sabó, A. Tick-borne encephalitis virus foci in Slovakia. Int J Med Microbiol 2002, 291 Suppl 33:43-7.
- Lindquist, L., Vapalahti, O. Tick-borne encephalitis. Lancet 2008, 371:1861-1871.
- Palus, M., Růžek, D. Kliešťová encefalitída – stále více otázek než jasných odpovědí. Vakcinologie 2013, 7:158-164.
- Salát, J., Šlosárková, S., Huňady, M., Růžek, D. Vakcinace malých přežvýkavců proti kliešťové encefalitidě. Veterinářství 2018, 8:579-584.

8. Dedikace

Funkční vzorek byl vytvořen v rámci projektu QK1920258 Národní agentury zemědělského výzkumu Ministerstva zemědělství České republiky.



Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.
Hudcova 296/70
621 00 Brno
Czech Republic
Tel.: +420 5 3333 1111; www.vri.cz; e-mail: vri@vri.cz