

## Příloha č. 2 – Detekce indikátorů fekálního znečištění – humánních adenovirů metodou qPCR

Adenoviry se řadí mezi středně velké (90 nm - 100 nm), neobalené viry, jejichž genom adenovirů je nesegmentovaný a je tvořen jedinou lineární, dvouřetězcovou molekulou DNA o velikosti pohybující se v rozmezí 35-36 kb. Tyto viry jsou široce rozšířené nejenom u člověka, ale také u ostatních druhů vnímavých zvířat, a jsou původci různých druhů onemocnění, mezi které se řadí zejména respiračními infekce, keratokonjunktividy a gastroenteritidy. V současné době se rozlišuje celkem 51 rozdílných sérotypů humánních adenovirů, které jsou na základě imunologických vlastností řazeny do celkem šesti podskupin označovaných jako séroskupiny A-F. Vzhledem k jejich častému výskytu v lidské populaci jsou řazeny mezi viry, jejichž průkaz ve sledovaných vzorcích lze spojit s indikací výskytu fekálního znečištění a tak přítomností dalších pro člověka patogenních virů (Farkas et al., 2020). Specifické oligonukleotidy (primery a sondy) byly převzaty z publikace Wong et al. (2008).

### Složky reakce:

- LightCycler 480 Probes Master 2× (Roche)
- Uracil-DNA Glycosylase (UNG, 1 U/μl; Roche)
- Specifické oligonukleotidy (primery a sondy; Genery biotech, Eurofins)
- Pozitivní kontrola/kvantifikační standard ( $1 \times 10^6$  až  $1 \times 10^1$  kopií/μl) ve formě umělého DNA konstruktů (plazmidová DNA)\*
- Interní amplifikační kontrola ve formě umělého DNA konstruktů (plazmidová DNA)\*
- PCR voda

Oligo	Sekvence
hex2 F	5'– CCAGGACGCCTCGGAGTA –3'
hex2 R	5'– AAACCTTGTTATTCAGGCTGAAGTACGT –3'
hex3 F	5'– GGACAGGACGCTTCGGAGTA –3'
hex3 R	5'– CTTGTTCCCCAGACTGAAGTAGGT –3'
hex2 P	5'– FAM – AGTTTGCCCGCGCCACCG – BHQ–3')
hex3 P	5'– FAM – CAGTTCGCCCCGYGCMACAG –BHQ–3'
IAC F	5'– AGAGGACCGGGATATTCGAC –3'
IAC R	5'– AGGTAGTCCGAGGAAAACCTCTAAAC –3'
IAC P	5'– Cy5 – AGGCTCTTCTATGTTCTGACCTTGTGGA – BHQ–3'

### Příprava pracovních roztoků specifických oligonukleotidů

- Primery a sondy jsou dodávány v lyofilizovaném stavu. Podle návodu uvedeného výrobcem jsou na pracovišti rozpuštěny v PCR vodě tak, aby výsledná zásobní koncentrace byla 100 pmol/μl. K omezení možností kontaminací jsou tyto zásobní roztoky použity k přípravě tzv. pracovních roztoků, které slouží k jednodušší přípravě reakčních směsí.

Popis zkumavky	Složka	Zásobní roztok (μl)	Voda (μl)	Koncentrace (pmol/μl)
<b>Sondy Hex</b>	Sonda hex2 P	50	400	10
	Sonda hex3 P	50		10
<b>Sonda IAC</b>	IAC P	50	450	10
	Primer Fib R	50		10
<b>Primery Hex</b>	Primer hex 2 F	50	300	10
	Primer hex 2 R	50		10
	Primer hex 3 F	50		10
	Primer hex 3 R	50		10
<b>Primery IAC</b>	IAC F	50	400	10
	IAC R	50		10

### Příprava reakční směsi k průkazu genomu humánních adenovirů

- Reakční směs lze připravit ve větším objemu dle následující tabulky, její poměrné vzorky lze uskladnit při  $-20\text{ °C} \pm 4\text{ °C}$  po dobu nejdéle 6 měsíců a opakovaně rozmrazovat a zamrazovat, max. však 5×.

Složka	1 reakce (μl)	100 reakcí (μl)	Konečná koncentrace
LightCycler 480 Probes Master 2×	10	1000	1×
Primery Hex (10 pmol/μl)	1	100	0,50 pmol/μl
Primery IAC (10 pmol/μl)	1	100	0,50 pmol/μl
Sondy Hex (10 pmol/μl)	0,1	10	0,05 pmol/μl
Sonda IAC (10 pmol/μl)	0,4	40	0,20 pmol/μl
UNG (1 U/μl)	0,2	20	0,01 U/μl
IAC plazmid ( $1 \times 10^4$ kopií/μl)	0,1	10	50 kopií/μl
PCR voda	2,2	220	
Celkový objem	15		

## Postup přípravy qPCR reakce

- Poměrný vzorek reakční směsi nechat samovolně rozpustit a promíchat
- Rozplnit 15 µl reakční směsi do 96-jamkové destičky či jiných, patřičných zkumavek
- Přidat 5 µl DNA podle následujícího v pořadí: 1) analyzované vzorky (vždy analyzovat v duplikátu), 2) kvantifikační standard, 3) negativní kontrola izolace nukleových kyselin, 4) negativní kontrola qPCR
- Přelepit 96-jamkové destičku speciální krycí fólií či zavřít patřičné zkumavky
- Odstředit při cca 2 000 g/2 min
- Vložit 96-jamkovou destičku/zkumavky do přístroje (např. LightCycler 480) a spustit program dle následujícího protokolu qPCR

## Protokol qPCR (nastavení pro LightCycler 480, Roche)

Krok qPCR	Teplota/čas	Ramp Rate	Aquisition mode	
Úvodní denaturace	95 °C/7 min	4,4 °C/s		
Denaturace	45 cyklů	95 °C/10 s	4,4 °C/s	
Annealing		60 °C/30 s	2,2 °C/s	Single
Extenze		72 °C/10 s		
Chlazení	40 °C/10 s	2,2 °C/s		

Analysis mode: Quantification

Detection format: 3 Color Hydrolysis Probe

## Hodnocení qPCR reakce a interpretace výsledků

Fluorescence DNA hAdV (Kanál FAM)	Fluorescence IAC (Kanál Cy5)	Celkový výsledek
<b>Pozitivní</b>	<b>Pozitivní</b>	<b>DNA hAdV pozitivní</b>
<b>Pozitivní</b>	<b>Negativní</b>	<b>DNA hAdV pozitivní</b>
<b>Negativní</b>	<b>Pozitivní</b>	<b>DNA hAdV negativní</b>
<b>Negativní</b>	<b>Negativní</b>	<b>Inhibice qPCR</b>

Pokud je vzorek inhibován, je nutné izolovanou DNA 5× a 10× naředit, případně zopakovat izolaci nukleových kyselin z uskladněného poměrného vzorku.

Vzorek je považován za pozitivní, pokud je pozitivní alespoň v jednom opakování.

hAdV – humánní adenoviry; IAC – interní amplifikační kontrola.

## Doporučené schéma rozmístění vzorků na 96 jamkové destičce

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C6	vz.1	D.vz.1	vz.9	D.vz.9	vz.17	D.vz.17	vz.25	D.vz.25	vz.33	D.vz.33	NIC1
B	C5	vz.2	D.vz.2	vz.10	D.vz.10	vz.18	D.vz.18	vz.26	D.vz.26	vz.34	D.vz.34	NIC2
C	C4	vz.3	D.vz.3	vz.11	D.vz.11	vz.19	D.vz.19	vz.27	D.vz.27	vz.35	D.vz.35	NIC3
D	C3	vz.4	D.vz.4	vz.12	D.vz.12	vz.20	D.vz.20	vz.28	D.vz.28	vz.36	D.vz.36	NIC4
E	C2	vz.5	D.vz.5	vz.13	D.vz.13	vz.21	D.vz.21	vz.29	D.vz.29	vz.37	D.vz.37	NIC5-
F	C1	vz.6	D.vz.6	vz.14	D.vz.14	vz.22	D.vz.22	vz.30	D.vz.30	vz.38	D.vz.38	
G		vz.7	D.vz.7	vz.15	D.vz.15	vz.23	D.vz.23	vz.31	D.vz.31	vz.39	D.vz.39	K-
H		vz.8	D.vz.8	vz.16	D.vz.16	vz.24	D.vz.24	vz.32	D.vz.32	vz.40	D.vz.40	K-

Vzorky označené C6 – C1 představují kvantifikační gradient v rozsahu  $10^6 - 10^1$  kopií/ $\mu$ l (tzn.  $5 \times 10^6 - 5 \times 10^1$  kopií DNA kvantifikačního gradientu na qPCR reakci). Vzorky označené jako vz.1 – 40 představují analyzované vzorky; označení D značí duplikát analyzovaného vzorku, NIC značí negativní kontrolu izolace nukleových kyselin a K- negativní kontrolu qPCR.

### Literatura

Farkas K. et al. Viral indicators for tracking domestic wastewater contamination in the aquatic environment. *Water Research*, 2020, 181, 115926.

Wong S. et al. Detection of a Broad Range of Human Adenoviruses in Respiratory Tract Samples Using a Sensitive Multiplex Real-Time PCR Assay. *Journal of Medical Virology*, 2008, 80, 856-865.

\* Umělé konstrukty (plazmidová DNA) použitelné jako kvantifikační standard/pozitivní kontrola a interní amplifikační kontrola jsou na vyžádání k dispozici u Mgr. Petry Vašíčkové, Ph.D., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i., Hudcova 70, Brno, 621 00, e-mail: [petra.vasickova@vri.cz](mailto:petra.vasickova@vri.cz), tel.+420 777 786 756.