

### **Příloha č. 3 – Detekce a kvantifikace externí kontroly procesu analýzy vzorků odpadních vod metodou RT-qPCR s následujícím stanovením účinnosti celého procesu**

Virus transmisivní gastroenteritidy prasat (TGEV) je společně se SARS-CoV-2 klasifikován do čeledi *Caliciviridae*. Tyto viry jsou řazeny mezi sférické, obalené viry, jejichž velikost se pohybuje okolo 120 nm. Genom kalicivirů je tvořen jedním řetězcem RNA s pozitivní polaritou. Velikost jejich genomu v rozmezí 27-32 kb z nich činí viry s nejdelším genomem, který je tvořen RNA. TGEV napadá především prasata domácí i divoká, u kterých způsobuje průjmy. V 80. letech se chovy začal šířit jeho mutantní kmen, který však nezpůsobuje závažné průjmy, ale lehčí onemocnění dýchacích cest. Promořením chovů došlo k jakési přirozené vakcinaci a v dnešní době se transmisivní gastroenteritida prasat považuje za ojedinělé onemocnění prasat s mírnějším průběhem. S ohledem na bezpečnost laboratorních postupů a dle předpokladu podobných strukturálních vlastností TGEV a SARS-CoV-2 byl tento virus zvolen jako externí kontrola celého procesu analýzy odpadních vod na přítomnost specifických oblastí genomu SARS-CoV-2. Detekční systém (RT-qPCR) byl s drobnými modifikacemi převzat z publikace Vemulapalli et al., 2009.

#### **Složky reakce:**

- Ribonuclease Inhibitor (RNase Inhibitor, 10 000U; New England BioLabs)
- PrimeScript Reverse Transcriptase (Moloney Murine Leukemia Virus; 200 U/μl; Takara)
- dNTP PCR Mix (solution 10 mM, Serva)
- Carrier RNA (1 μg/μl, Ambion)
- RNase-free voda (Ultra pure PCR H<sub>2</sub>O, např. TopBio)
- 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 (1×10<sup>6</sup> až 1×10<sup>1</sup> kopií/μl) ve formě umělého RNA konstruktu (*in vitro* transkript specifické oblasti genomu TGEV)\*
- Interní amplifikační kontrola ve formě umělého RNA konstruktu (*in vitro* transkript)\*

Oligo	Sekvence
TGEV F	5'– TCTGCTGAAGGTGCTATTATATGC –3'
TGEV R	5'– CCACAATTTGCCTCTGAATTAGAAG –3'
TGEV P	5'–FAM – YAAGGGCTCACCACCTACTACCACCA –BHQ–3'
IAC F	5'– AGAGGACCGGGATATTCGAC –3'
IAC R	5'– AGGTAGTCCGAGGAAAACCTCTAAAC–3'
IAC P	5'–Cy5 – AGGCTCTTCTATGTTCTGACCTTGTTGGA – 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)
Primer TGEV R	TGEV R	50	450	10
Primer IAC R	IAC R	50	450	10
Sonda TGEV	TGEV P	50	450	10
Sonda IAC	IAC P	50	450	10
Primery TGEV	TGEV F	50	400	10
	TGEV R	50		10
Primery IAC	IAC F	50	400	10
	IAC R	50		10

## Příprava reakčních směsí a provedení reverzní transkripce (přepisu RNA TGEV do cDNA)

- Na chlazeném stojánku připravit reakční směs I o následujícím složení

Složka	1x (μl)	Konečná koncentrace (20 μl rce)	100 rcí (μl)
dNTP mix (10 nmol/μl)	1,0	0,5 nmol/μl	100
TGEV R (10 pmol/μl)	0,2	0,1 pmol/μl	20
IAC R (10 pmol/μl)	0,2	0,1 pmol/μl	20
IAC RNA (1 fg/μl)	1,0	50 ag/μl	100
RNase-free voda	2,6		
Celkový objem	5		

- Reakční směs I promíchat
- Rozplnit po 5 μl do stripů či jiných vhodných zkumavek (v této fázi je možno zkumavky popsat a zamrazit na  $-70^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$  po dobu nejdéle 6 měsíců)
- Přidat 5 μl RNA
- Krátce stočit
- Inkubace při  $65^{\circ}\text{C}/5$  min (cycler)
- Zkumavky ochladit na ledu (cca 5 min)
- Krátce stočit
- Přidat 10 μl reakční směsi II (konečný objem reakce 20 μl):

Složka	1 x (μl)	Konečná koncentrace	x reakcí (μl)
RNase-free voda	5		
Primescript reaction buffer	4,0		
PrimeScript enzyme (200 U/μl)	0,5	5 U/μl	
RNase Inhibitor (40 U/μl)	0,5	1 U/μl	
Konečný objem reakční směsi	10		

- Jemně promíchat
- Krátce stočit
- Protokol reakce (cycler):  $50^{\circ}\text{C}/60$  min  
 $75^{\circ}\text{C}/15$  min  
 $10^{\circ}\text{C}/\text{forever}$
- Připravenou cDNA následně použít jako templát do qPCR, jinak možno skladovat při  $-20^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$ .

## Příprava reakční směsi a detekce genomu TGEV použitím qPCR

- Reakční směs lze připravit ve větším objemu dle následující tabulky, její poměrné vzorky lze uskladnit při  $-20^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$  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 TGEV (10 pmol/μl)	1	100	0,50 pmol/μl
Primery IAC (10 pmol/μl)	0,5	50	0,25 pmol/μl
Sonda TGEV P (10 pmol/μl)	0,2	20	0,10 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
PCR voda	2,7	270	
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 cDNA podle následujícího v pořadí: 1) analyzované vzorky (vždy analyzovat v duplikátu), 2) kvantifikační standard, 3) negativní kontrola izolace nukleových kyselin, 4) negativní kontrola RT, 5) negativní kontrola qPCR
- Přelepít 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/10 min	4,4 °C/s	
Denaturace	95 °C/10 s	4,4 °C/s	
Annealing	55 °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 TGEV (Kanál FAM)	Fluorescence IAC (Kanál Cy5)	Celkový výsledek
<b>Pozitivní</b>	<b>Pozitivní</b>	<b>RNA TGEV pozitivní</b>
<b>Pozitivní</b>	<b>Negativní</b>	<b>RNA TGEV pozitivní</b>
<b>Negativní</b>	<b>Pozitivní</b>	<b>RNA TGEV negativní</b>
<b>Negativní</b>	<b>Negativní</b>	<b>Inhibice RT-qPCR</b>

Pokud je vzorek inhibován, je nutné izolovanou RNA 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.

TGEV - virus transmisivní gastroenteritidy prasat; IAC – interní amplifikační kontrola.

### Kvantifikace TGEV (resp. genomových ekvivalentů) v analyzovaném vzorku a stanovení účinnosti procesu analýzy

Experimentálně bylo stanoveno nejvhodnější množství TGEV částic ( $5 \times 10^6$ ), kterým je uměle kontaminován každý vzorek. Kvantifikace RNA TGEV probíhá podle kalibrační křivky desetinasobných ředění koncentračního gradientu RNA TGEV (in vitro transkriptu specifické oblasti genomu TGEV) v prostředí programu příslušného k danému cycleru metodou absolutní kvantifikace (kanál FAM). V případě inhibice RT-qPCR a následujícího ředění RNA, je toto ředění nutno zohlednit při přepočtech. Určení množství TGEV (resp. genomových ekvivalentů) ve vyšetřovaných vzorcích se provádí podle následujícího vzorce:

$$\text{TGEV} = ((x / 5) \times y) \times 14,29$$

x - počet kopií cíle v reakci (stanoveno RT-qPCR)

y – množství, do kterého je eluována izolovaná nukleová kyselina (udáváno v  $\mu\text{l}$ ), v popsané metodice je tato hodnota 100

Stanovení účinnosti celého (kompletního) postupu analýzy každého jednoho vzorku se provádí přepočtem podle následujícího vzorce:

$$\text{účinnost procesu (\%)} = (\text{stanovené množství TGEV ve vzorku} / 5 \times 10^6) \times 100$$

$5 \times 10^6$  - množství TGEV, které bylo uměle dodáno ke každému jednomu vzorku

Tato účinnost je zohledněna při stanovení množství SARS-CoV-2 (resp. genomových ekvivalentů) v každém jednom vzorku.

## 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	RT-
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	qPCR-

Vzorky označené C6 – C1 představují kvantifikační gradient v rozsahu  $10^6 - 10^1$  kopií/μl (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, lýže značí přidání připraveného roztoku TGEV přímo do RT reakce, NIC značí negativní kontrolu izolace nukleových kyselin, RT- negativní kontrolu reverzní transkripce a qPCR- negativní kontrolu qPCR.

## Literatura

Vemulapalli, R.; Gulani, J.; Santrich, C. A real-time TaqMan RT-PCR assay with an internal amplification control for rapid detection of transmissible gastroenteritis virus in swine fecal samples. *J Virol Methods*. 2009, 162(1-2):231–235, doi:10.1016/j.jviromet.2009.08.016.

\* Umělé konstrukty (in vitro transkripty) 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.