

Standardní operační postup Detekce specifických oblastí genomu viru hepatitidy A metodou RT-qPCR	Projekt VI04000017 - Využití monitoringu odpadních vod jako nástroje včasného varování před vznikem epidemiologické situace (COVMON) - 4.VS BV III	Verze 220606: Vašíčková
--	--	-------------------------------

Standardní operační postup

Detekce specifických oblastí genomu viru hepatitidy A metodou RT-qPCR

Autoři

Mgr. Petra Vašíčková, Ph.D., Mgr. Magdaléna Krásna

Standardní operační postup je výstupem projektu Ministerstva vnitra VI04000017 (Využití monitoringu odpadních vod jako nástroje včasného varování před vznikem epidemiologické situace). Zveřejňování tohoto postupu či jeho částí podléhá omezením vyplývajícím z požadavků MV ČR a MZ ČR.

6/2022

Standardní operační postup Detekce specifických oblastí genomu viru hepatitidy A metodou RT-qPCR	Projekt VI04000017 - Využití monitoringu odpadních vod jako nástroje včasného varování před vznikem epidemiologické situace (COVMON) - 4.VS BV III	Verze 220606: Vašíčková
--	--	-------------------------------

ÚČEL POUŽITÍ

Tento standardní operační postup (SOP) je určen ke kvalitativní detekci RNA (resp. genomových ekvivalentů) viru hepatitidy A (HAV). Postup je založen na reverzní transkripci RNA a následné detekci a případně kvantifikaci prokázaných dvou specifických oblastí genomu virů metodou real time PCR (tzv. RT-qPCR), čímž je zvýšena pravděpodobnost záchytu viru. Specifické oligonukleotidy (primery a sondy) cílené na první konzervativní oblast genomu HAV jsou použity dle ISO 15216-1:2017. Druhou cílovou oblastí genomu HAV je konzervativní oblast v rozmezí 346 až 481 nt; primery a sonda byly navrženy dle publikace Jothikumar et al. 2005 s drobnými modifikacemi. SOP zahrnuje interní amplifikační kontrolu (IAC) jako jednu z kontrol řádného průběhu RT-qPCR a k odhalení falešně negativních výsledků v důsledku inhibice reakce.

PŘEDMLUVA

Virus hepatitidy A (HAV) je původcem celosvětově rozšířeného onemocnění, virové hepatitidy A. Výskyt infekce vyvolané HAV se mezi zeměmi značně liší, přičemž zvýšená incidence onemocnění je zaznamenána v rozvojových zemích zejména v souvislosti s nedostatečnými hygienickými podmínkami. Dle Evropského úřadu pro bezpečnost potravin (EFSA) je tento virus řazen mezi patogeny způsobující alimentární infekce. Jedná se o neobalený virus, jehož genom je tvořen jedním řetězcem RNA o pozitivní polaritě. Hlavní způsob přenosu HAV je fekálně-orální přenos. Ačkoli k nejčastějšímu šíření infekčních virových částic dochází přímým kontaktem infikovaných osob (klinicky nemocných či asymptomatických přenašečů), kontaminované povrchy různých zařízení (např. kliky, splachovadla toalet, povrchy potravinářských zařízení a nástrojů), potraviny a voda hrají velmi významnou roli v přenosu HAV. Zdrojem kontaminací/infekcí jsou lidé již v inkubační době onemocnění (15 – 50 dní). HAV je přítomen ve stolici už dva týdny před prvními klinickými příznaky a ve stolici může být vylučován více jak týden po ukončení onemocnění. Virus byl také prokázán ve slinách, sekretu z nosohltanu a krvi infikovaných osob, což z těchto tělních tekutin činí také možný zdroj kontaminací (Newell et al., 2010).

Standardní operační postup Detekce specifických oblastí genomu viru hepatitidy A metodou RT-qPCR	Projekt VI04000017 - Využití monitoringu odpadních vod jako nástroje včasného varování před vznikem epidemiologické situace (COVMON) - 4.VS BV III	Verze 220606: Vašíčková
--	--	-------------------------------

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 H₂O, např. TopBio)
- LightCycler 480 Probes Master 2× (Roche)
- Uracil-DNA Glycosylase (UNG, 1 U/μl; Roche)
- Pozitivní kontrola/kvantifikační standard (1×10⁶ až 1×10¹ kopií/μl) ve formě umělého RNA konstruktů (*in vitro* transkript specifické oblasti genomu viru chřipky A a viru chřipky B)*
- Interní amplifikační kontrola ve formě umělého RNA konstruktů (*in vitro* transkript)*
- Specifické oligonukleotidy (primery a sondy; Genery biotech, Eurofins):

Oligo	Sekvence
HAV68	5'– TCACCGCCGTTTGCCTAG –3'
HAV240	5'– GGAGAGCCCTGGAAGAAAG –3'
HAV150(-)	5'-FAM- CCTGAACCTGCAGGAATTAA -MGB-NFQ-3
HAV-JVF	5'– GGTAGGCTACGGGTGAAAC –3'
HAV-JVR	5'– AYCAACTACCAATATCCGC –3'
HAV-JVP	5'–FAM- CTTARGCTARTACTTCTATGAAGAGATGC -BHQ–3'
IAC F	5'– AGAGGACCGGGATATTCGAC –3'
IAC R	5'– AGGTAGTCCGAGGAAAACCTAAAC–3'
IAC P	5'–Cy5 – AGGCTCTTCTATGTTCTGACCTTGTGGA – BHQ–3'

Standardní operační postup Detekce specifických oblastí genomu viru hepatitidy A metodou RT-qPCR	Projekt VI04000017 - Využití monitoringu odpadních vod jako nástroje včasného varování před vznikem epidemiologické situace (COVMON) - 4.VS BV III	Verze 220606: Vašíčková
--	--	-------------------------------

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 HAV R	HAV240	50	400	10
	HAV-JVR	50		10
Primer IAC R	IAC R	50	450	10
Primery HAV	HAV68	50	300	10
	HAV240	50		10
	HAV-JVF	50		10
	HAV-JVR	50		10
Sonda HAV	HAV150(-)	50	400	10
	HAV-JVP	50		10
Sonda IAC	IAC P	50	450	10

Standardní operační postup Detekce specifických oblastí genomu viru hepatitidy A metodou RT-qPCR	Projekt VI04000017 - Využití monitoringu odpadních vod jako nástroje včasného varování před vznikem epidemiologické situace (COVMON) - 4.VS BV III	Verze 220606: Vašíčková
--	--	-------------------------------

Příprava reakčních směsí a provedení reverzní transkripce (přepisu RNA 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
Primer HAV 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 °C/60 min
 - 75 °C/15 min
 - 10 °C/forever
- Připravenou cDNA následně použít jako templát do qPCR, jinak možno skladovat při $-20^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$.

Standardní operační postup Detekce specifických oblastí genomu viru hepatitidy A metodou RT-qPCR	Projekt VI04000017 - Využití monitoringu odpadních vod jako nástroje včasného varování před vznikem epidemiologické situace (COVMON) - 4.VS BV III	Verze 220606: Vašíčková
--	--	-------------------------------

Příprava reakční směsi a detekce genomu viru hepatitidy A 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 5x.

Složka	1 reakce (μl)	100 reakcí (μl)	Konečná koncentrace
LightCycler 480 Probes Master 2x	10	1000	1x
Primery HAV (10 pmol/ μl)	1	100	0,5 pmol/ μl
Primery IAC (10 pmol/ μl)	0,5	50	0,25 pmol/ μl
Sonda HAV (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	
<hr/>			
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 $^{\circ}\text{C}/10$ min	4,4 $^{\circ}\text{C}/\text{s}$	
Denaturace	45 cyklů	95 $^{\circ}\text{C}/10$ s	Single
Annealing		55 $^{\circ}\text{C}/30$ s	
Extenze		72 $^{\circ}\text{C}/10$ s	
Chlazení	40 $^{\circ}\text{C}/10$ s	2,2 $^{\circ}\text{C}/\text{s}$	

Analysis mode: Quantification

Detection format: 3 Color Hydrolysis Probe

Standardní operační postup Detekce specifických oblastí genomu viru hepatitidy A metodou RT-qPCR	Projekt VI04000017 - Využití monitoringu odpadních vod jako nástroje včasného varování před vznikem epidemiologické situace (COVMON) - 4.VS BV III	Verze 220606: Vašíčková
--	--	-------------------------------

Hodnocení qPCR reakce a interpretace výsledků

Fluorescence (Kanál FAM)	Fluorescence IAC (Kanál Cy5)	Celkový výsledek
Pozitivní	Pozitivní	HAV pozitivní
Negativní	Pozitivní	HAV negativní
Negativní	Negativní	Inhibice RT-qPCR

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.

HAV - virus hepatitidy A; 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	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. 5×10^6 – 5×10^1 kopií RNA kvantifikačního gradientu, resp. cDNA 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, RT- negativní kontrolu reverzní transkripce a qPCR- negativní kontrolu qPCR.

Literatura

Newell, D.G., Koopmans, M., Verhoef, L., Duizer, E., Aidara-Kane, A., Sprong, H., Opsteegh, M., Langelaar, M., Threlfall, J., Scheutz, F., van der Giessen, J., Kruse, H. Food-borne diseases - the challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. Int J Food Microbiol 2010;139: S3-15.

Jothikumar, N., Cromeans, T. L., Sobsey, M. D., Robertson, B. H. Development and evaluation of a broadly reactive TaqMan assay for rapid detection of hepatitis A virus. Appl Environ Microbiol 2005, 71: 3359- 3363

ISO 15216-1:2017. Microbiology of the food chain — Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus using real-time RT-PCR — Part 1: Method for quantification

Standardní operační postup Detekce specifických oblastí genomu viru hepatitidy A metodou RT-qPCR	Projekt VI04000017 - Využití monitoringu odpadních vod jako nástroje včasného varování před vznikem epidemiologické situace (COVMON) - 4.VS BV III	Verze 220606: Vašíčková
--	--	-------------------------------

* Umělé konstrukty (in vitro transkripty) použitelné jako pozitivní kontrola (kvantifikační standard) 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.vasiczkova@vri.cz, tel.+420 777 786 756.