

Standardní operační postup Detekce specifických oblastí genomu virů chřipky A a B metodou RT-qPCR	Projekt VI04000017 - Využití monitoringu odpadních vod jako nástroje včasného varování před vznikem epidemiologické situace (COVMON) - 4.VS BV III	Verze 220718: Vašíčková
---	--	-------------------------------

Standardní operační postup

Detekce specifických oblastí genomu virů chřipky A a B metodou RT-qPCR

Autoři

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

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.

7/2022

Standardní operační postup Detekce specifických oblastí genomu virů chřipky A a B metodou RT-qPCR	Projekt VI04000017 - Využití monitoringu odpadních vod jako nástroje včasného varování před vznikem epidemiologické situace (COVMON) - 4.VS BV III	Verze 220718: Vašíčková
---	--	-------------------------------

ÚČEL POUŽITÍ

Tento standardní operační postup (SOP) je určen ke kvalitativní detekci RNA (resp. genomových ekvivalentů) viru chřipky typu A a viru chřipky typu B. Postup je založen na reverzní transkripci RNA a následné detekci a případně kvantifikaci prokázaných specifických oblastí genomu virů metodou real time PCR (tzv. RT-qPCR). 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

Chřipka (influenza) je vysoce infekční onemocnění postihující primárně dýchací cesty. Původcem jsou viry čeledi *Orthomyxoviridae*, jejichž genom je tvořen osmi (typ A a B) či sedmi (typ C) segmenty RNA s negativní polaritou. Tyto segmenty jsou uloženy v kapsidě, která je obalena lipidovou membránou. Virus má dva povrchové (druhově a subtypově specifické) antigeny (glykoproteiny): hemaglutinin (H) a neuraminidázu (N); hlavní zdroje patogenity viru. Dosud bylo identifikováno 18 subtypů hemaglutininu (H1 až H18) a 11 subtypů neuraminidázy (N1 až N11). Vzájemnou skladbou těchto antigenů (nebo jejich variant) vznikají různé (i nové) genetické mutace, jež mohou vyvolat epidemii v populaci vnímavých jedinců. Rovněž také určují nebezpečnost onemocnění (nakažlivost a průběh).

Virus chřipky A vyvolává onemocnění člověka a několika dalších živočišných druhů. Rezervoárem nových antigenních typů chřipky A jsou zejména ptáci a prasata. Viry typu A vyvolaly všechny velké epidemie a pandemie. Současné subtypy, které běžně cirkulují mezi lidmi, zahrnují: typ A (H1N1) a typ A (H3N2).

Virus chřipky typu B vyvolává onemocnění pouze u lidí, které není spojováno s pandemickým výskytem a které může probíhat i s převahou postižení gastrointestinálního traktu jako tzv. střevní chřipka.

Virus chřipky typu C vyvolává pouze sporadická onemocnění. Je patogenní jak pro člověka, tak pro zvířata, nicméně pro zvířata jen ojediněle a u člověka jsou citlivou skupinou malé děti. Průběh onemocnění je mírný, nezpůsobuje ani epidemie, ani pandemie. Nejčastěji probíhá jako tzv. nemoc z nachlazení.

Standardní operační postup Detekce specifických oblastí genomu virů chřipky A a B metodou RT-qPCR	Projekt VI04000017 - Využití monitoringu odpadních vod jako nástroje včasného varování před vznikem epidemiologické situace (COVMON) - 4.VS BV III	Verze 220718: 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
IVA_WHO_M_F **	5'– CCMAGGTCGAAACGTAYGTTCTCTCTATC –3'
IVA_WHO_M_R **	5'– TGACAGRATYGGTCTTGTCTTTAGCCAYTCCA –3'
IVA_WHO_M_P **	5'–FAM – ATYTCGGCTTTGAGGGGGCCTG –BHQ–3'
IVB_HM_F	5'– GCTTTCATGAAGCATTTGAAA –3'
IVB_HM_R	5'– ACAGAGCGTTCCTAGTTTT –3'
IVB_HM_P	5'–HEX-AGGCCATGAAAGCTCAGCGTTACTA-BHQ–3'
IAC F	5'– AGAGGACCGGGATATTCGAC –3'
IAC R	5'– AGGTAGTCCGAGGAAAACCTCTAAAC–3'
IAC P	5'–Cy5 – AGGCTCTTCTATGTTCTGACCTTGTTGGA – BHQ–3'

* dle WHO information for the molecular detection of influenza viruses

Standardní operační postup Detekce specifických oblastí genomu virů chřipky A a B metodou RT-qPCR	Projekt VI04000017 - Využití monitoringu odpadních vod jako nástroje včasného varování před vznikem epidemiologické situace (COVMON) - 4.VS BV III	Verze 220718: 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 IVA R	IVA_WHO_M_R	50	450	10
Primer IVB R	IVB_HM_R	50	450	10
Primer IAC R	IAC R	50	450	10
Primery IVA	IVA_WHO_M_F	50	400	10
	IVA_WHO_M_R	50		10
Primery IVB	IVB_HM_F	50	400	10
	IVB_HM_R	50		10
Sonda IVA	IVA_WHO_M_P	50	450	10
Sonda IVB	IVB_HM_P	50	450	10
Sonda IAC	IAC P	50	450	10

Standardní operační postup Detekce specifických oblastí genomu virů chřipky A a B metodou RT-qPCR	Projekt VI04000017 - Využití monitoringu odpadních vod jako nástroje včasného varování před vznikem epidemiologické situace (COVMON) - 4.VS BV III	Verze 220718: 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 IVA R (10 pmol/μl)	0,2	0,1 pmol/μl	20
Primer IVB 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	2,4		
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°C± 4°C po dobu nejdéle 6 měsíců)
- Přidat 5 μl RNA
- Krátce stočit
- Inkubace při 65 °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 °C± 4 °C.

Standardní operační postup Detekce specifických oblastí genomu virů chřipky A a B metodou RT-qPCR	Projekt VI04000017 - Využití monitoringu odpadních vod jako nástroje včasného varování před vznikem epidemiologické situace (COVMON) - 4.VS BV III	Verze 220718: Vašíčková
---	--	-------------------------------

Příprava reakční směsi a detekce genomu viru chřipky typu A a viru chřipky typu B 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 IVA (10 pmol/ μl)	0,7	70	0,35 pmol/ μl
Primery IVB (10 pmol/ μl)	0,7	70	0,35 pmol/ μl
Primery IAC (10 pmol/ μl)	1	100	0,5 pmol/ μl
Sonda IVA P (10 pmol/ μl)	0,2	20	0,10 pmol/ μl
Sonda IVB 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	1,6	160	
<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 virů chřipky A a B metodou RT-qPCR	Projekt VI04000017 - Využití monitoringu odpadních vod jako nástroje včasného varování před vznikem epidemiologické situace (COVMON) - 4.VS BV III	Verze 220718: Vašíčková
---	--	-------------------------------

Hodnocení qPCR reakce a interpretace výsledků

Fluorescence IVA (Kanál FAM)	Fluorescence IVB (Kanál HEX)	Fluorescence IAC (Kanál Cy5)	Celkový výsledek
Pozitivní	Pozitivní	Pozitivní	IVA pozitivní IVB pozitivní
Pozitivní	Negativní	Pozitivní	IVA pozitivní IVB negativní
Negativní	Pozitivní	Pozitivní	IVA negativní IVB pozitivní
Pozitivní	Negativní	Negativní	IVA pozitivní IVB negativní
Negativní	Pozitivní	Negativní	IVA negativní IVB pozitivní
Negativní	Negativní	Pozitivní	IVA negativní IVB negativní
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.

IVA, IVB - virus chřipky A či B; 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, resp. cDNA 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, RT- negativní kontrolu reverzní transkripce a qPCR- negativní kontrolu qPCR.

Literatura

<https://www.who.int/teams/health-product-policy-and-standards/standards-and-specifications/vaccines-quality/influenza>

Standardní operační postup Detekce specifických oblastí genomu virů chřipky A a B metodou RT-qPCR	Projekt VI04000017 - Využití monitoringu odpadních vod jako nástroje včasného varování před vznikem epidemiologické situace (COVMON) - 4.VS BV III	Verze 220718: 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.vasickova@vri.cz, tel.+420 777 786 756.