

SIMULACE TERÉNNÍCH VZORKŮ A JEJICH VLIV NA ROBUSTNOST DETEKCE POMOCÍ RT-qPCR

FIELD SAMPLE SIMULATIONS AND THEIR IMPACT ON ROBUSTNESS OF RT-qPCR DETECTION

Martina Grochová^{a*}, Karel Bílek^a

^a Státní ústav jaderné, chemické a biologické ochrany, v. v. i., Kamenná 71, 262 31 Milín, Česká republika

*Korespondující autor; e-mail: matonohova@sujchbo.cz, tel.: +420 318 600 245

Abstrakt

Při detekci a identifikaci zneužitelných biologických agens platí PCR za jednu z nejvyužívanější a nejcitlivější metod. Nicméně enzymatický charakter reakce, může být ovlivněn změnou optimálního prostředí a tak ovlivnit výsledek. Cílem této práce bylo simulovat terénní vzorky a tak zjistit vliv matric na analýzu PCR detekce. Pro ověření robustnosti byla vybrána citlivá, ale komplikovaná metodika, která má za cíl detekovat několik druhů flavivirů v jedné reakci. I přes dostatečnou robustnost metodiky bylo možné u některých vzorků pozorovat inhibiční vliv matric na PCR detekci. Skupina vzorků, resp. matric, jež prokazatelně inhibuje PCR reakci, bude dále studována za účelem eliminace jejich vlivů. Stejně tak budou sledovány i další kontaminanty, které by mohly negativně ovlivnit výsledky analýz Laboratoře biologického monitorování a ochrany SÚJCHBO, v. v. i.

Klíčová slova: RT-qPCR, detekce, identifikace, virus

Abstract

In the detection and identification of biological warfare agents, PCR is one of the most used and the most sensitive methods. However, the character of enzymatic reaction may be affected by changing optimal reaction mix and thus influence the outcome. The aim of this study was to simulate field samples and thus determine the impact matrices for analysis of PCR detection. To check the robustness of the selected sensitive, but complicated method, which aims to detect several species of flaviviruses in one reaction. Despite sufficient robustness methodology it was possible in some samples, observed an inhibitory effect of matrix on PCR detection. A group of samples, respectively, matrix which demonstrably inhibits the PCR reaction will be further investigated in order to eliminate their effects. Likewise they will be monitored and other contaminants that could inhibit the results of analyzes Laboratory of biological monitoring and protection SÚJCHBO, v. v. i.

Key words: RT-qPCR, detection, identification, virus

1 ÚVOD

Včasná detekce a identifikace patogenních B-agens je zásadní záležitostí v případě zneužití B-agens. Hlavními důvody jsou včasná reakce na možná vyvolaná onemocnění a jejich léčbu, popř. zajištění informací pro forenzní účely a v neposlední řadě poskytnutí informací pro účinné provedení dekontaminace. Detekce a identifikace zneužitelných B-agens je v ČR prováděna pro dodržení zákona č. 281/2002 Sb., resp. vyhlášky č. 474/2002 Sb. [1,2]. Detekce B-agens lze provádět pomocí standardních mikrobiologických popř. virologických postupů. Nicméně nevýhodou těchto postupů je často časová náročnost, která může

v některých případech dosáhnout až několika dní nebo týdnů. Taková časová prodleva může zásadním způsobem zkomplikovat nebo znemožnit léčbu onemocnění atd.

Mezi dostupné a zejména mezi nejrychlejší detekční metody v oblasti detekce B-agens patří polymerázová řetězová reakce (dále jen PCR). V průběhu let se PCR a její aplikace staly z nejpoužívanějších analýz k detekci a identifikaci mikroorganismů a virů. Využití této metody je rutinně používáno k detekci patogenních B-agens v laboratoři nebo i v polních podmínkách [3,4,5,6,**Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**7]. PCR je molekulárně-biologická metoda, která využívá vlastnosti enzymu zvaného polymeráza, který dokáže amplifikovat určitý úsek genomu B-agens. Přítomnost nebo naopak nepřítomnost takového specifického úseku tak potvrdí, resp. vyvrátí výskyt daného B-agens ve vzorku.

Jako i v případě jiných vysoce specifických přístupů, i metoda PCR vyžaduje jistou přípravu vzorku. Tato příprava zahrnuje minimálně krok izolace nukleových kyselin ze vzorku. Při izolaci vzorku může dojít k eluci kromě nukleových kyselin B-agens i dalších látek, které jsou obsaženy ve vzorku. V případě analýzy environmentálních vzorků je situace o to obtížnější, že je velice obtížné identifikovat složení matrice a získat tak dostatečně čistou nukleovou kyselinu. Na výsledky izolace mohou mít vliv izolační kity, popř. použití jiného nebo nějakým způsobem nevhodného kitu apod. [9,10,10,11]. Nicméně problematika čistoty vzorku zahrnuje i možnost obsahu inhibitorů PCR reakce. Vzhledem ke skutečnosti, že PCR je enzymatická reakce, je nezbytné zajistit specifické složení reakční směsi. V případě obsahu nevhodných látek v izolovaném vzorku může dojít k ovlivnění výsledku nebo i k úplné inhibici reakce. Kontrolou izolovaného vzorku lze zjistit určité parametry izolátu, jako např. koncentraci vzorku, obsah proteinů a polysacharidů, ale na zjištění inhibitorů reakce nejsou obvykle laboratoře vybaveny. Navíc odhalit takové látky ve vzorku reakci prodražuje a prodlužuje čas dosažení výsledku.

Cílem této studie bylo vytvořit skupinu přírodních a jiných simulovaných kontaminací, za účelem zjištění jejich vlivu na reakci. Efekt reakce byl vyhodnocen srovnáním výsledných hodnot jednotlivých simulantů. Se vzorkem tedy bylo po celou dobu procesu nakládáno tak, jako by byl procesován standardně v laboratoři při detekci a/nebo identifikaci B-agens.

2 MATERIÁL A METODIKA

V případě simulace kontaminace byly použity následující matrice: sušené mléko (1), mouka (2), prášek do pečiva (3), moučkový cukr (4), prací prášek (5), křída (6), prach (7), písek (8), krev (9) a homogenizáty komárů (10) u virů přenášených komáry, tj. virus encefalitidy Saint Louis (SLEV), virus žluté zimnice (YFV) a virus dengue sérotyp 1 (DENV-1).

Pro ověření vlivu simulantů na PCR reakci byla vybrána citlivá a komplikovaná metodika, která má za cíl detekovat 11 různých druhů flavivirů v jedné reakci, nicméně pro tuto analýzu byly vybrány z čeledi *Flaviviridae* tyto viry: SLEV, YFV, DENV-1, virus horečky Kyasanurského lesa (KFDV), virus klíšťové encefalitidy (TBEV), virus Omské hemoragické horečky (OHFV) a virus Powasan (POWV).

Postup zahrnoval v první fázi přípravu vlastního kontaminovaného vzorku. Pro každý virus bylo testováno devět, respektive deset kontaminantů, dle typu vektora. Jednotlivé sypké kontaminanty byly naváženy na hmotnost 10 mg a doplněny 200 μ l PCR vody. V případě tekutých kontaminantů (krev, homogenizáty komárů) bylo odebráno 10 μ l kontaminantu a přidáno bylo opět 200 μ l PCR vody.

Ampule s každým vybraným virem byla před izolací rozmrazena a ředěna 100-1000x. Z naředěného vzorku viru bylo odebráno 200 μ l a přidáno do zkumavky se směsí PCR vody

a daného kontaminantu. Obsah zkumavky byl řádně promíchán na vortexu, stočen na centrifuze a pro izolaci byl odebrán jen supernatant, který byl umístěn do extrakční zkumavky. Vlastní izolace virové nukleové kyseliny probíhala dále teplotní inkubací dle protokolu izolačního kitu RTP DNA/RNA Virus Mini Kit (STRATEC Molecular, SRN). Izolovaná virová RNA byla umístěna před dalšími postupy do $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pro každý virus a kontaminant byly provedeny dvě nezávislé izolace.

Následným krokem byla inkubace izolovaného vzorku s DNázou I pro odstranění případné DNA přítomné v izolátu, jelikož všechny studované viry obsahují ve svém genomu jen RNA. Pro tento cíl byly použity reagenty kitu AMPD1 (SIGMA-ALDRICH, USA). Směs RNA, reakčního pufru a DNázy I byla nejprve inkubována 15 min při laboratorní teplotě. Následně po přidání EDTA byla celá směs denaturována při $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 min a poté prudce ochlazena.

V dalším kroku byla RNA převedena do cDNA, která již sloužila jako vstupní materiál pro samotnou qPCR. Pro reverzní transkripci byl použit kit Protoscript II First Strand cDNA Synthesis Kit (New England Biolabs, UK) a reakce probíhala dle protokolu s jednotlivými inkubačními kroky: $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 min, $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 hod a $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 min. Vzorky takto získané cDNA byly skladovány při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

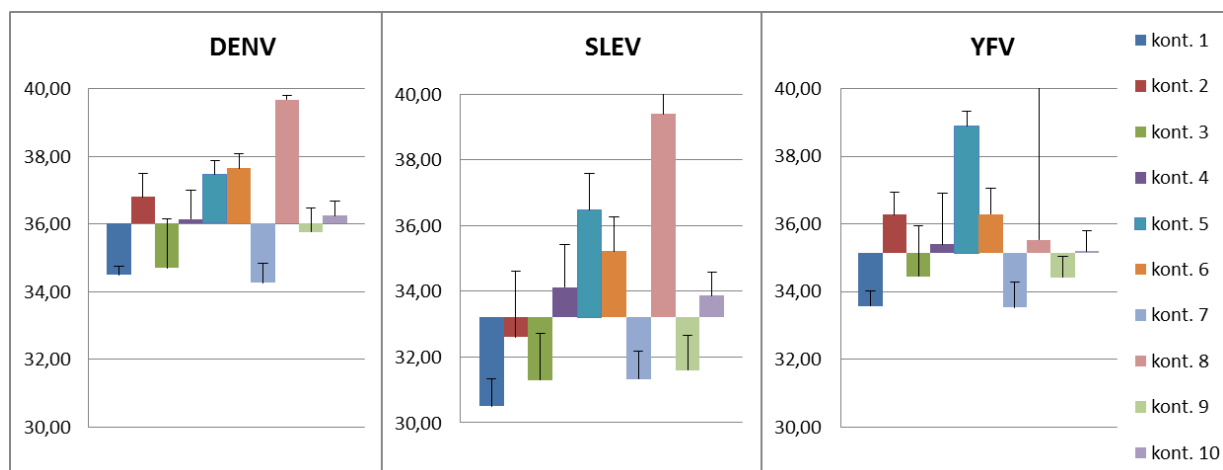
Pro qPCR byl dle metodiky využit Master mix qPCR 2x SYTO-9 (Top-Bio, ČR). Jedná se o kompletní mix reagentů nutných pro PCR. Mix obsahuje interkalační fluorescenční barvivo SYTO-9, které umožňuje sledovat průběh reakce v reálném čase a navíc je vhodné i pro tavení amplikonu a stanovení jeho teploty tání. Pro specifickou detekci genu kódujícího virový protein NS5 byly použity degenerované primery s následujícími sekvencemi: F: 5'-AARGGHAGYMGDGGCHATHTGGT-3', R: 5'-GTGTCCCAGCCGGCGGTRTCRTCNGC-3' (GENERI BIOTECH, ČR).

Průběh qPCR probíhal na přístroji CFX96 Touch (Bio-Rad Laboratories, Inc.) dle programu uvedeného v metodice, tj. úvodní denaturace při $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 min a dále 40 cyklů $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 20 s, $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 25 s a $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s. Výsledek byl zajištěn ve formě tzv. Cq hodnot. Cq hodnota je hodnota fluorescence vzorku v určitém cyklu PCR reakce, kdy došlo k protnutí hladiny významnosti, resp. významného vzrůstu fluorescence od signálu pozadí reakce. Následovala analýza křivek tání, jejímž výsledkem jsou píky se specifickou teplotou pro každý testovaný virus. Vzorky byly analyzovány v dubletech a ve dvou nezávislých opakováních.

3 VÝSLEDKY

Získané Cq hodnoty z obou opakování byly sloučeny a vyneseny do sloupcových grafů. Každý graf reprezentuje všechny testované kontaminanty pro daný virus. Čím je hodnota Cq menší (vztaženo k hodnotě na ose y), tím větší výtěžek reakce byl získán. A naopak, čím je hodnota Cq vyšší, tím více se projevil negativní vliv testovaného kontaminantu.

Graf 1 představuje soubor naměřených Cq hodnot pro viry přenášené komáry tzn. pro DENV, SLEV a YFV viz níže nadpis grafů.



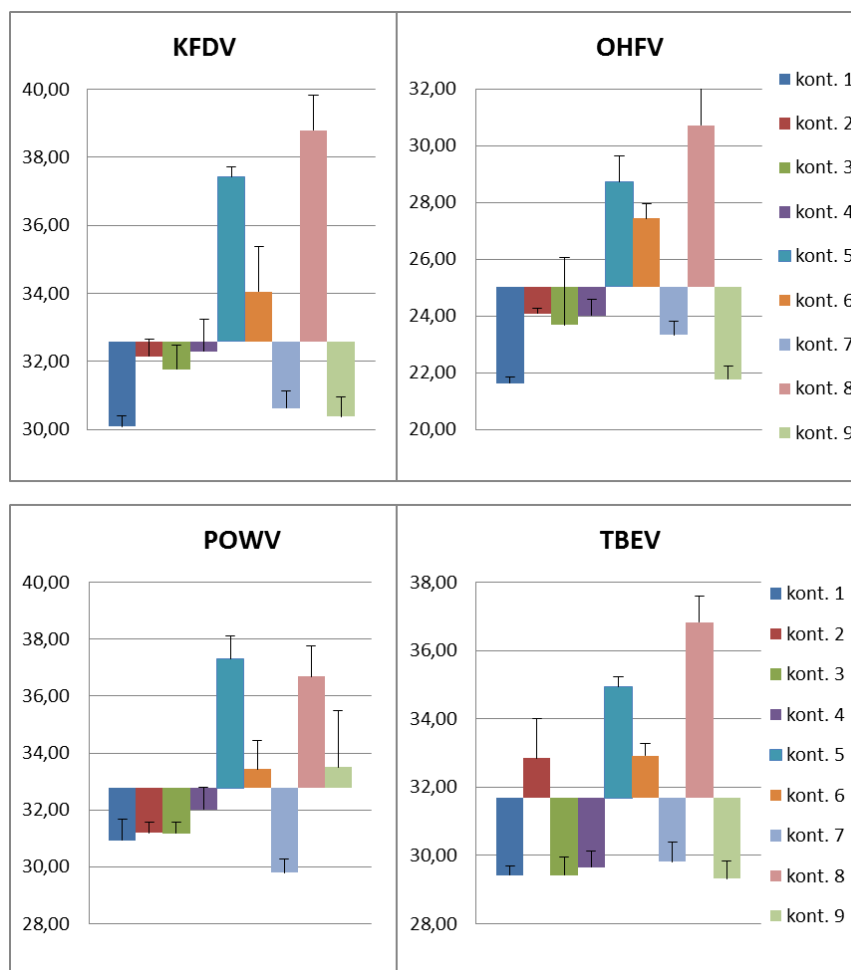
Graf 1 Vliv kontaminantů na výtěžnost reakce u virů DENV, SLEV a YFV.

Výsledné hodnoty pro jednotlivé kontaminanty jsou značně rozdílné od průměru Cq (představuje střední mezní hodnotu na ose y). V případě viru DENV z grafu 1 se jedná o průměrnou hodnotu Cq 36,03 viz výše. Z grafu je patrný účinek inhibice nebo znečištění u vzorků pracího prášku a písku. Podobně, i když s nižší intenzitou vzorek obsahující mouku a křidu (pouze u DENV a YFV). Naopak vzorky obsahující sušené mléko a prach mají nejvyšší hodnotu Cq, což značí standardní průběh reakce bez vlivu kontaminantu. Překvapivě podobnou hodnotu pod úroveň průměru (do kterého jsou započítány i inhibované hodnoty Cq) vykazovaly vzorky obsahující prášek do pečiva a krev.

Graf 2 zahrnuje soubor virů KFDV, OHFV, POWV a TBEV. Shodně jako u předchozí skupiny virů jsou zde inhibované reakce se vzorky s obsahem písku, resp. pracího prášku. Mezi negativně ovlivněné vzorky se řadí i vzorek s křidou, shodně jako u předchozí skupiny virů. Na rozdíl od grafu 1, mají pozitivní bilanci vzorky obsahující mouku a moučkový cukr (s výjimkou TBEV). Podobně nízkou Cq hodnotu mají i vzorky s obsahem prachu a krve (s výjimkou POWV).

Cílem práce bylo zjistit vliv skupiny matric simulovaných vzorků. Porovnáním dosažených Cq hodnot byl u některých matric potvrzen negativní vliv na výsledek reakce. Nicméně reakce vždy proběhla a bylo možné ji analyzovat, i když v některých případech se značným posunem Cq hodnot. Díky této skutečnosti bylo vždy možné výsledek reakce analyzovat tzn. výsledek nebyl prohlášen za falešně negativní. Díky těmto zjištěním byla ověřena robustnost reakce, která i přes svou komplikovanost, vykazuje výborné parametry robustnosti analýzy.

Skupina problematických matric bude dále studována a bude vytvářen postup pro eliminaci jejich negativních vlivů na výsledek PCR reakce. Dále bude přistoupeno i k zahrnutí dalších materiálů, které se mohou vyskytovat ve vzorcích doručovaných do Laboratoře biologického monitorování a ochrany SÚJCHBO, v. v. i.



Graf 2 Vliv kontaminantů na výtěžnost reakce u virů KFDV, OHFV, POWV a TBEV.

Poděkování

Tato práce byla realizována díky finanční podpoře z projektu Ministerstva vnitra ČR, č. VF20112015013.

Použitá literatura

1. *Zákon č. 281/2002 Sb. o některých opatřeních souvisejících se zákazem bakteriologických (biologických) a toxinových zbraní a o změně živnostenského zákona.* Praha: Sbírka zákonů České republiky, 2002.
2. *Vyhláška č. 474/2002 Sb. kterou se provádí zákon č. 281/2002 Sb., o některých opatřeních souvisejících se zákazem bakteriologických (biologických) a toxinových zbraní a o změně živnostenského zákona, ve znění vyhlášky č. 74/2013 Sb.* Praha: Sbírka zákonů České republiky, 2013.
3. FAJFR, M., NEUBAUEROVÁ, V., PAJER, P., KUBÍČKOVÁ, P., RŮŽEK, D. *Detection panel for identification of twelve hemorrhagic viruses using real-time RT-PCR.* *EpidemiolMikrobiolImunol.* 2014 Sep; 63(3):238-44.
4. <http://www.biomerieux-usa.com/industry/gene-up>

5. NIE, S., ROTH, R.B., STILES, J., MIKHLINA, A., LU X TANG, Y.W., BABADY, N.E. *Evaluation of Alere i Influenza A&B for rapid detection of influenza viruses A and B.* J ClinMicrobiol. 2014 Sep; 52(9):3339-44.
6. ARIF, M., AGUILAR-MORENO, G.S., WAYADANDE, A., FLETCHER, J., OCHOA-CORONA, F.M. *Primer modification improves rapid and sensitive in vitro and field-deployable assays for detection of high plains virus variants.* ApplEnvironMicrobiol. 2014 Jan; 80(1):320-7.
7. PORITZ, M.A., BLASCHKE, A.J., BYINGTON, C.L. *et al. FilmArray, an Automated Nested Multiplex PCR System for Multi-Pathogen Detection: Development and Application to Respiratory Tract Infection.* PLoSOne. 2011; 6(10): e26047.
8. IBRAHIM, S.M., AITICHOU, M., HARDICK, J., BLOW, J., O'GUINN, M.L., SCHMALJOHN, C. *Detection of Crimean-Congo hemorrhagic fever, Hanta, and sand fly fever viruses by real-time RT-PCR.* Methods Mol Biol. 2011; 665:357-68.
9. RODRÍGUEZ, R.A., PEPPER, I.L., GERBA, C.P. *Application of PCR-based methods to assess the infectivity of enteric viruses in environmental samples.* ApplEnvironMicrobiol. 2009 Jan; 75(2):297-307.
10. RODRÍGUEZ, R.A., THIE, L., GIBBONS, C.D., SOBSEY, M.D. *Reducing the effects of environmental inhibition in quantitative real-time PCR detection of adenovirus and norovirus in recreational seawaters.* J VirolMethods. 2012 Apr; 181(1):43-50.
11. TROMBLEY, HALL, A., MCKAY, ZOVANYI, A., CHRISTENSEN, D.R., KOEHLER, J.W., MINOGUE, D. T. *Evaluation of inhibitor-resistant real-time PCR methods for diagnostics in clinical and environmental samples.* PLoSOne. 2013 Sep 9;8(9):e73845.
12. VAN DOORN, R., KLERKS, M.M., VAN GENT-PELZER, M.P., SPEKSNIJDER, A.G., KOWALCHUK, G.A., SCHOEN, C.D. *Accurate quantification of microorganisms in PCR-inhibiting environmental DNA extracts by a novel internal amplification control approach using Biotrove Open Arrays.* ApplEnvironMicrobiol. 2009 Nov; 75(22):7253-60.