



FUNKČNÍ VZOREK

Metodický postup analýzy vzorků zeminy na přítomnost DNA viru afrického moru prasat

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

**5703
2019**

Funkční vzorek 5703/2019

Metodický postup analýzy vzorků zeminy na přítomnost DNA viru afrického moru prasat

Autoři

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

Funkční vzorek byl vytvořen v rámci projektu Ministerstva zemědělství QK1920187

2019

ISBN 978-80-88233-82-4

Obsah

1. Úvod.....	3
2. Předmět funkčního vzorku.....	4
3. Popis funkčního vzorku	4
3.1. Metodika funkčního vzorku.....	4
3.1.1. Příprava vzorků zeminy a izolace DNA	4
3.1.2. Detekce a kvantifikace kmene CAPM V-402.....	4
3.1.3. Detekce a kvantifikace genomu ASFV	5
3.1.4. Kvantifikace izolované DNA kmene CAPM V-402 a ASFV, stanovení účinnosti a limitu detekce metodiky	6
3.2. Výsledky.....	6
3.2.1. Izolace DNA kmene CAPM V-402 a ASFV ze vzorků zeminy.....	6
3.2.2. Limit detekce vybrané metody izolace DNA ze vzorků zeminy	7
3.2.3. Vyjádření výsledku stanovení možné přítomnosti DNA ASFV v daném vzorku ...	8
4. Srovnání „novostí postupů“	8
5. Uplatnění funkčního vzorku	9
6. Ekonomické aspekty	9
7. Seznam použité literatury	9

1. Úvod

Africký mor prasat patří mezi významné virové onemocnění čeledi *Suidae*. U infikovaných prasat domácích i divokých (*Sus scrofa f. domestica*, *Sus scrofa*) je pozorováno vysoké procento úmrtnosti. Původcem je obalený virus, jehož genom je tvořen dvěma vlákny DNA a který je řazen do rodiny *Asfarviridae* (Dixon et al. 2005). V evropských zemích dochází k přenosu onemocnění zejména přímým kontaktem zdravých zvířat s infikovanými či nepřímou cestou – kontaminovaným krmivem, prostředím (oblečení, boty, nástroje nebo transportní vozidla), kadávery uhynulých jedinců či masem a masnými výrobky. Další způsob přenosu (tzv. sylvatický) je pozorován zejména na území Afriky a jsou do něj zapojeni klíšťáci rodu *Ornithodoros* (Penrith and Vosloo, 2009; Guinat et al., 2016). Virus není přenosný na člověka.

Virus afrického moru prasat (ASFV) patří mezi odolné viry, které jsou schopné dlouhou dobu perzistovat v prostředí mimo hostitelský organismus; při 0 °C až 4 °C po dobu několika měsíců. Virus je schopen zůstat v infekčním stavu při opakované zamražení a rozmražení, při teplotě 56 °C je stabilní až jednu hodinu (Mazur-Panasiuk et al., 2019). Zároveň infekční virové částice odolávají pH v rozmezí 4 až 13 (Plowright and Parker, 1967). Přítomnost tohoto viru byla prokázána v půdě, kam se dostal z krve či exkrementů infikovaného jedince nebo z kadáveru (Nurmoja et al. 2018). Kowalenko et al. (1972) prokázal infekční AFSV po dobu 81 dní v zahradní i v lesní zemině.

Proti onemocnění doposud neexistuje účinná léčba a není dostupná vakcína. O to větší je jeho socio-ekonomický náklad na chovy prasat domácích (Tulman and Rock, 2001). Identifikace potenciálního zdroje nákazy je proto klíčová.

2. Předmět funkčního vzorku

Cílem funkčního vzorku bylo zavedení účinné metody použitelné k rychlé analýze vzorků zeminy na přítomnost genomu ASFV.

3. Popis funkčního vzorku

3.1. Metodika funkčního vzorku

Analýzy a jejich optimalizace spojené s infekčním ASFV je nutno provádět v laboratořích se stupněm zabezpečení 3 (BL3), což může působit určitá časová i metodická omezení. Z tohoto důvodu byl při optimalizaci a zavedení metody analýzy půdy zvolen postup běžně využívaný při experimentech s viry, které jsou problematicky kultivovatelné na buněčných liniích. Byl vybrán tzv. náhradní virus, jehož vlastnosti (např. genom a přítomnost obalu) jsou podobné ASFV, s nímž je možno pracovat v laboratořích se stupněm zabezpečení 2 a lze ho bez problémů kultivovat na buněčných liniích. K tomuto účelu byl proto vybrán bovinní herpes virus 1 (BHV 1; kmen CAPM V-402).

3.1.1. Příprava vzorků zeminy a izolace DNA

Dle literatury byly vybrány čtyři možné přístupy k izolaci virové DNA ze vzorků zeminy. Navážka pěti gramů či 250 mg zeminy byla uměle kontaminována definovaným množstvím kmene CAPM V-402 (4×10^5 genomových ekvivalentů; kvantifikace dle qPCR). Na základě výsledků byla vybrána nejhodnější metoda analýzy; při výběru bylo přihlédnuto k navážce analyzovaného vzorku, časové náročnosti, účinnosti a proveditelnosti metody v BL3 (tabulka 1). Každá z uvedených metod byla ověřena ve třech opakováních. U vybrané metody byly následně provedeny modifikace, které vedly ke snížení výskytu inhibicí reakce qPCR, byl u ní stanoven limit detekce a byla ověřena na genomu ASFV (tabulka 2).

3.1.2. Detekce a kvantifikace kmene CAPM V-402

Za účelem kvantifikace kmene CAPM V-402 byla zavedena a optimalizována polymerázová řetězová reakce v reálném čase (qPCR). K průkazu specifické oblasti genomu BHV 1 byly vybrány specifické oligonukleotidy (primery a sonda) dle publikace Chandranaik et al. (2013). K systému byla k rozlišení falešně negativních (inhibovaných) a skutečně negativních vzorků ve formě palzmidové DNA přidána interní amplifikační kontrola (IAC) dle Slana et al. (2008).

Amplifikace a detekce fluorescence byla provedena na přístroji LightCycler 480 Instrument (Roche Molecular Diagnostics) a následující analýza s použitím "Fitpoint analysis" programu Light Cycler 480 Software release 1.5.0 (verze 1.5.0.39). Množství CAPM V-402 bylo stanoveno na základě kvantifikačního standardu (plazmidové DNA; koncentrace 1×10^6 , 1×10^5 , 1×10^4 , 1×10^3 , 1×10^2 a 1×10^1 kopií/ μ l).

Plazmidová DNA byla připravena naklonováním PCR produktů získaných pomocí primerů specifických pro BHV 1 a IAC do pDrive Cloning Vector (Qiagen), který byl transformován do chemokompetentních buněk *Escherichia coli*. Po selekci pozitivních kolonií a pomnožení byly plazmidové inzerty ověřeny sekvenováním a základě změřených koncentrací byly naředěny na požadované koncentrace.

3.1.3. Detekce a kvantifikace genomu ASFV

K průkazu a možné kvantifikaci genomu ASFV byla zavedena a optimalizována qPCR, která vycházela ze standardního operačního postupu Evropské referenční laboratoře pro africký mor prasat (Gallardo and Nieto, 2018). K systému byla přidána IAC dle Slana et al. (2008). qPCR byla provedena v celkovém objemu 20 μ l: 10 μ l of LightCycler 480 Probes Master (Roche Molecular Diagnostics), 10 pmol primerů King-s, King-a, IAC F a IAC F, 4 pmol sondy King-probe, 2 pmol sondy IAC P, 0,2 U Uracil DNA Glycosylase (Roche), 10^3 IAC a 5 μ l templátové DNA. Amplifikace a detekce fluorescence byla provedena na přístroji LightCycler 480 Instrument (Roche Molecular Diagnostics) za následujících podmínek: denaturace při 95 °C/4 min s následující amplifikací při 95 °C/10 s a 58 °C/30 s, 45 cyklů. Množství dekovaného ASFV (genomových ekvivalentů) bylo stanoveno na základě kvantifikačního gradientu (plazmidová DNA; koncentrace 1×10^6 , 1×10^5 , 1×10^4 , 1×10^3 , 1×10^2 a 1×10^1 kopií/ μ l) a programu Light Cycler 480 Software release 1.5.0 (Fitpoint analysis, verze 1.5.0.39).

Plazmidová DNA byla připravena naklonováním PCR produktů získaných pomocí primerů specifických pro ASFV a IAC do pDrive Cloning Vector (Qiagen), který byl transformován do chemokompetentních buněk *Escherichia coli*. Po selekci pozitivních kolonií a pomnožení byly plazmidové inzerty ověřeny sekvenováním. Na základě změřených koncentrací byly naředěny na požadované koncentrace.

K zavedení a optimalizaci qPCR byl použit kmen Ba71V ASFV, systém byl následně ověřen na terénních vzorcích, které pocházely z výskytu afrického moru prasat v okrese Zlín.

3.1.4. Kvantifikace izolované DNA kmene CAPM V-402 a ASFV, stanovení účinnosti a limitu detekce metodiky

Ke každému qPCR experimentu byl přidán kvantifikační gradient (koncentrace 1×10^6 , 1×10^5 , 1×10^4 , 1×10^3 , 1×10^2 a 1×10^1 kopií plazmidové DNA/ μ l). Podle příslušné kalibrační křivky byla provedena absolutní kvantifikace cílové DNA pro každý analyzovaný vzorek. Množství prokázaných cílů ve vzorku bylo stanoveno dle vzorce:

$$N_{\text{kopií DNA}}^* = (N_{\text{kopií DNA ve stanovovaném vzorku}}^{**}/5) \times y$$

* - celkový počet kopií DNA (genomových ekvivalentů) BHV1/ASFV v celkové izolované DNA

x - počet kopií cíle v reakci (qPCR)

y – množství, do kterého je eluována izolovaná nukleová kyselina (udáváno v μ l, v popsané metodě 100 μ l)

Stanovení účinnosti vybrané metody bylo provedeno dle vzorce:

$$\text{účinnost izolace (\%)} = N_{\text{kopií DNA}}^*/z \times 100$$

* - počet kopií DNA pro BHV1/ASFV v celkové izolované DNA

z – množství genomových ekvivalentů BHV1/ASFV, kterým byl vzorek uměle kontaminován

Limit detekce vybrané metody byl stanoven na základě umělé kontaminace 5 g zeminy množstvím viru definovaným na základě qPCR. Následně byla provedena izolace DNA, qPCR a výpočty dle výše uvedených vzorců. Vzorek byl považován za pozitivní, pokud byl zachycen fluorescenční signál alespoň v jednom z duplikátů qPCR reakce.

3.2. Výsledky

3.2.1. Izolace DNA kmene CAPM V-402 a ASFV ze vzorků zeminy

Ačkoli nejvyšší účinnost izolace DNA ze vzorků zeminy byla zjištěna u metody č.4, vzhledem k malé navážce vzorku (250 mg) byl ze čtyř navržených postupů vybrán postup č. 3 (tabulka 1). V rámci vybrané metody izolace DNA byly následně provedeny modifikace, které omezily výskyt inhibicí qPCR (falešně negativních vzorků). Vybraná metoda byla provedena dle následujícího popisu. K 5 g zeminy (uměle kontaminované) bylo přidáno 45 ml glycinového pufru (glycín 0,25M pH 9,5). Následně byly vzorky inkubovány za stálého třepání při pokojové teplotě po dobu 40 min a podrobeny centrifugaci při $1\ 800 \times g/15 \text{ min}/4 \text{ }^\circ\text{C}$. K odebranému supernatantu byly přidány cca 2 díly roztoku PEG 6000 (30%), NaCl (1,6 M), následovala opět

inkubace za stálého třepání po dobu 2 hod při teplotě 4 °C a centrifugace při 11 000×g/20 min/4 °C. Vzniklá peleta byla resuspendována ve 200 µl injekční vody.

Vlastní izolace virové DNA byla provedena komerčně dostupnou soupravou Quick-DNA™ Fecal/Soil Microbe Microprep (Zymo research). K peletě resuspendované ve 200 µl injekční vody bylo přidáno 750 µl Bashing bead pufru a vzorek byl homogenizován (vortex, 2 × 30 s). Následoval postup přečištění DNA dle návodu výrobce. Vzorek byl eluován do celkového objemu 100 µl.

Vzorky izolované DNA byly ihned po izolaci podrobeny qPCR (podmínky reakce popsané výše). Každý vzorek byl v qPCR analyzován v duplikátu.

Tabulka 1: Použité metody k izolaci DNA ze vzorků zeminy a jejich průměrné účinnosti

Metoda	Účinnost (%)	Citace
Metoda 1	14,27	Töwe et al. 2011
Metoda 2	14,12	Fatima et al. 2014
Metoda 3	60,26	Martín-Díaz and Lucena 2018
Metoda 4*	89,39	Quick-DNA™ Fecal/Soil Microbe Microprep

* použita navážka vzorku pouze 250 mg

3.2.2. Limit detekce vybrané metody izolace DNA ze vzorků zeminy

Za účelem stanovení limitu detekce vybrané metody byly vzorky uměle kontaminovány definovaným množstvím cílových agens (kvantifikace dle qPCR; 4×10^5 , 4×10^4 , 4×10^3 , 4×10^2 a 4×10^1 genomových ekvivalentů/vzorek). Stejným množstvím bylo vždy uměle kontaminováno osm vzorků. Limit detekce byl specifikován jako nejnižší množství stanovených agens se 100% pravděpodobností (tabulka 2). Dle těchto parametrů byl limit detekce výše uvedené metody stanoven na 400 genomových ekvivalentů DNA cílových agens.

Tabulka 2: Stanovení limitu detekce vybrané metody

Umělá kontaminace	Získané množství		Celkový počet vzorků/počet pozitivních vzorků	Průměrná účinnost (%)
	Průměr	SO		
400 000	65 448	43 755	8/8	35,1
40 000	7 654	8 904	8/8	
4 000	1 709	682	8/8	
400	324	165	8/8	
40	214	241	8/5	

3.2.3. Vyjádření výsledku stanovení možné přítomnosti DNA ASFV v daném vzorku

Hodnocení experimentu probíhá v prostředí softwaru LightCycler software (version LCS480 1.2.0.169) pomocí „Fit point“ analýzy (kanál FAM DNA ASFV) a druhého derivačního maxima (kanál Cy5 DNA IAC). Přepočet množství DNA ASFV ve vzorku je nutno vždy provádět podle kvantifikačního gradientu v daném experimentu. Kvalitativní hodnocení lze provádět dle tabulky 3.

Tabulka 3: Kvalitativní hodnocení výsledků qPCR

Fluorescence DNA ASFV (Kanál FAM)	Fluorescence IAC (Kanál Cy5)	Celkový výsledek
<i>Pozitivní</i>	<i>Pozitivní</i>	<i>DNA ASFV pozitivní</i>
<i>Pozitivní</i>	Negativní	<i>DNA ASFV pozitivní</i>
Negativní	<i>Pozitivní</i>	DNA ASFV negativní
Negativní	Negativní	Inhibice qPCR*

* vzorek je nutno 10 × a 100 × naředit a podrobit qPCR, pokud i v tomto případě je reakce inhibována, je nutno opakovat izolaci nukleové kyseliny ze zásobního vzorku.

4. Srovnání „novostí postupů“

V současné době je dostupné pouze limitované množství publikací, které se zabývají izolací virových nukleových kyselin ze vzorků půdy. Schopnost perzistence ASFV v půdě byla prokázána již v roce 1972. Dosud však nejsou dostupné novější publikace nebo metody, které by se zabývaly izolací a detekcí ASFV právě ve vzorcích zeminy.

5. Uplatnění funkčního vzorku

Dle současných opatření, pokud je v chovu prasat domácích prokázána přítomnost afrického moru prasat, je nařízena okamžitá, radikální likvidace celého chovu. V případě prasat divokých je řízen jejich zvýšený odstřel. Obzvláště u prasat divokých hrozí šíření nákazy prostřednictvím kadáverů a jimi kontaminovaným prostředím. Námi předložený metodický postup nabízí citlivou a rychlou metodu analýzy vzorků zeminy na přítomnost DNA ASFV.

6. Ekonomické aspekty

V současném době nelze ekonomické aspekty odhadnout. Cena analýzy jednoho vzorku vychází přibližně 744 Kč bez DPH. Tato částka se samozřejmě bude odvíjet od množství analyzovaných vzorků.

Dedikace

Funkční vzorek byl vytvořen v rámci projektu Ministerstva zemědělství QK1920187.

7. Seznam použité literatury

Dixon, L.K., Escribano, K.J.M., Martins, C., Rock, D.L., Salas M.L., Wilkinson P.J. 2005. Asfarviridae. In: Fauquet, C.M., M.A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger, and L.A. Ball (eds), *Virus Taxonomz. VIII. Report of the ICTV*, pp. 135-143. Elsevier, Academic Press London.

Gallardo, C.; Nieto, R.: European Union Reference Laboratory for ASF, (EURL-ASF). *CISA-INIA, Valdeolmos 28130, Madrid, Spain.*, 1 (2018).

Faria F., Pathak N., Verma S.R., 2014. An improved method for soil DNA extraction to study the microbial assortment within rhizospheric region. *Molecular Biology International*, 2014,6 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/518960>

Guinat, C., Gogin, A., Blome, S., Keil, G., Pollin, R., Pfeiffer, D.U., Dixon, L., 2016. Transmission routes of African swine fever virus to domestic pigs: Current knowledge and future research directions. *Veterinary Records*. 178, 262–267.

<https://doi.org/10.1136/vr.103593>

- Chandranaiik, B.M., Rathnamma, D., Patil, S.S., Kovi, R.C, Dhawan, J., Ranganatha, S., Isloor, S., Renukaprasad, C., Prabhudas, K. 2013. Development of a probe based real time PCR assay for detection of bovine herpes virus-1 in semen and other clinical samples. *Indian Journal of Virology* 24(1),16–26. DOI 10.1007/s13337-012-0112-1
- Kowalenko Y., Sidorov M., Burba L., 1972 Survival of African swine fever in environment. *Vestnik Selsk. Nauki* pp.62
- Martín-Díaz J., Lucena F., 2018. Extraction and RT-qPCR detection of enteroviruses from solid environmental matrixes: MMethod decision tree for different sample types and viral concentrations. *Journal of Virological Methods*, 251 145-150
DOI:10.1016/j.viromet.2017.10.004
- Mazur-Panasiuk N, Zmudzki J., Wozniakowski G., 2019. African swine fever virus – persistence in different environmental conditions and the possibility of its indirect transmission. *Journal of Veterinary Research* 63, 303-310
- Nurmoja I., Motus K., Kristian M., Niine T., Schulz K., Depner K., Viltrop A., 2018. Epidemiological analysis of the 2015-2017 African swine fever outbreaks in Estonia. *Preventive Veterinary Medicine* <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2018.10.001>
- Penrith, M.-L., Vosloo, W., 2009. Review of African swine fever : transmission, spread and control : review article. *Journal of the South African Veterinary Association* 80, 58–62.
- Plowright W., Parker J., 1967. The stability of African swine fever virus with particular reference to heat and pH inactivation. *Arch Gesamte Virusforsch* 21, 383-402
- Slana, I., Kralik, P., Kralova, A., Pavlik, I. 2008. On-farm spread of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in raw milk studied by IS900 and F57 competitive real time quantitative PCR and culture examination. *International Journal of Food Microbiology*, 128, 250-7.
- Töwe S., Wallish S., Bannert A., Fisher D., Hai B., Haesler F., Kleineidam K., Schloter M., 2011. Improved protocol for the simultaneous extraction and column-based separation of DNA and RNA from different soils. *Journal of Microbiological Methods*, 84 406-412,
DOI:10.1016/j.mimet.2010.12.028
- Tulman, E.R. and Rock, D.L., 2001. Novel virulence and host range genes of African swine fever virus. *Current Opinion in Microbiology*. 4: 456–461. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(00\)00235-6](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(00)00235-6)

VU^{Ve}L 

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.
Hudcova 296/70
621 00 Brno
Czech Republic
Tel.: +420 5 3333 1111; www.vri.cz; e-mail: vri@vri.cz