



CERTIFIKOVANÁ METODIKA

**Detekce viru prasečí hemaglutinující
encefalomyelitidy metodou end-point reverzně
transkripční polymerázové řetězové reakce**

**RNDr. Jana Prodělalová, Ph.D.
Mgr. Romana Moutelíková, Ph.D.
prof. MVDr. Miroslav Toman, CSc.**

CERTIFIKOVANÁ METODIKA č. 91/2017

**DETEKCE VIRU PRASEČÍ HEMAGLUTINUJÍCÍ ENCEFALOMYELITIDY
METODOU END-POINT REVERZNĚ TRANSKRIPČNÍ POLYMERÁZOVÉ
ŘETĚZOVÉ REAKCE**

Autoři:

RNDr. Jana Prodělalová, Ph.D. (Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.)

Mgr. Romana Moutelíková, Ph.D. (Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.)

prof. MVDr. Miroslav Toman, CSc. (Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.)

Uvedení autoři se podíleli na vzniku metodiky s podílem práce 40/40/20%.

Metodika je výsledkem řešení výzkumného projektu č. NAZV QJ1510108

Osvědčení o uplatnění certifikované metodiky: SVS/2017/154656-G

Vydalo: Státní veterinární správa, Praha, 21.12.2017

ISBN 978-80-88233-11-4

2017

OPONENTI CERTIFIKOVANÉ METODIKY

MVDr. Petr Václavek, Ph.D.

Státní veterinární ústav Jihlava

MVDr. Petr Šatrán, Ph. D.

Státní veterinární správa Praha

I. Cíl metodiky

Metodika je zaměřena na rychlou detekci ribonukleové kyseliny (RNA) viru prasečí hemaglutinující encefalomyelitidy (PHEV) ve vzorcích výtěrů sliznic horních cest dýchacích. PHEV se stává jedním z nově detekovaných původců infekčních onemocnění prasat. Lze jej zjišťovat ve výtěrech z horních cest dýchacích u zdravých prasat a přítomnost PHEV byla touto metodikou potvrzena i v českých chovech (Moutelíková a kol. 2017). Metodika pro detekci PHEV proto představuje vhodný nástroj pro diferenciální diagnostiku při komplexní virologickém vyšetření nebo pro případ, že by došlo k výskytu klinického onemocnění způsobeného PHEV v našich chovech.

II. Vlastní popis metodiky

1. Úvod

PHEV byl poprvé izolován v roce 1962 v Kanadě z mozku sajícího selete s příznaky neurologické infekce (Greig et al. 1962), nicméně onemocnění samotné bylo popsáno již na podzim roku 1957 (Roe and Alexander 1958). V roce 1969 byl antigenně identický virus potvrzen jako příčina zvracení a chřadnutí sajících selat ve Velké Británii. V tomto případě nebyly zaznamenány příznaky encefalomyelitidy (Cartwright et al. 1969). Virus byl v Evropě poprvé izolován v roce 1972 v Belgii z tonzil prasete, u kterého příznaky onemocnění zahrnovaly zvracení a vyčerpání bez encefalomyelitidy (Pensaert 2006). Na základě sekvenčních dat lze usuzovat, že PHEV zůstává geneticky stabilní od prvního zachytu viru v roce 1962 (Dong et al. 2014). Zejména v 70. letech minulého století pak proběhlo několik epizootologických studií, které odhalily, že PHEV se v populaci prasat vyskytuje běžně a s největší pravděpodobností celosvětově. V evropských zemích byla zjištěna značná séropozitivita u výkrmových prasat v Anglii (49%), Severním Irsku (43%) a Německu (75%). Vysoké hladiny protilátek byly detekovány také v chovech v Dánsku, Francii, Belgii a Rakousku. Oproti tomu ve Finsku byla testovaná zvířata negativní (Pensaert 2006). Oproti tomu klinická onemocnění způsobená PHEV jsou popisována sporadicky, protože ve většině případů a především u starších selat onemocnění probíhá subklinicky (Chen et al. 2011). V chovech, ve kterých se PHEV vyskytuje endemicky, je většina selat chráněna kolostrálními protilátkami, které přetrvávají v průměru

deset až jedenáct týdnů. Přesto se však klinická onemocnění způsobené PHEV vyskytují. V Kanadě byla v roce 2000 popsána epidemie PHEV, během které dosáhla mortalita u sajících selat s paralýzou zadních končetin až 100% (Sasseville et al. 2001). Epidemie encefalomyelitidy postihla v roce 6000 prasnic v Argentině s mortalitou sajících selat dosahující téměř 17% (Quiroga et al. 2008). V roce 2015 byla v USA popsána atypická infekce se závažnými respiračními příznaky u výstavních prasat ve věku 6-8 měsíců (Lorbach et al. 2017). V současnosti je PHEV klasifikován jako zástupce rodu *Betacoronavirus* v rámci čeledi *Coronaviridae*. Jedná se o obalený virus s pozitivní jednořetězcovou RNA (+ssRNA) (de Groot et al. 2012). Vzhledem ke genetické stabilitě PHEV se jako optimální nabízí metoda přímého průkazu virového genomu metodou end-point reverzně transkripční polymerázové řetězové reakce.

Tato metodika vznikla jako jeden z plánovaných výsledků projektu MZe NAZV QJ1510108 ve spolupráci Výzkumného ústavu veterinárního lékařství, v.v.i., Veterinární a farmaceutické univerzity v Brně a Agrofarm a.s.

Vlastní metodické postupy pro PCR detekci RNA viru porcinní hemaglutinující encefalomyelitidy (PHEV), vybrané publikované postupy byly ověřeny na sbírkových kmenech virů a následně na souboru terénních vzorků (Moutelíková et al. 2017). Metodický postup byl testován na vzorcích výtěrů z rypáku. Přítomnost viru v krvi zvířat pozitivních na přítomnost virové RNA ve výtěrech z rypáku nebyla testována. Vzniku metodiky předcházelo zveřejnění výsledků v odborných časopisech (viz kapitola VI. Seznam publikací předcházejících metodice).

2. Detekce nukleové kyseliny viru porcinní hemaglutinující encefalomyelitidy metodou end-point reverzně transkripční polymerázové řetězové reakce

2.1 Předmět působnosti a podstata metody

Tato metodika popisuje systém sloužící k identifikaci viru hemaglutinující encefalomyelitidy prasat ve vzorcích stěrů ze sliznic horních cest dýchacích na základě detekce částí strukturních genů pro hemaglutinin-esterázu (HE) a S protein (S). Metoda je založena na end-point reverzně transkripční polymerázové řetězové reakci (RT-PCR). Uvedené oligonukleotidové primery jsou vhodné pro jednokrokový i dvoukrokový formát reakce.

2.2 Potřeby a pomůcky

2.2.1 Oligonukleotidové primery

Pro potřeby metodiky byly použity oligonukleotidové primery publikované Dong et al. (2014). Označení primerů, jejich sekvence a parametry reakce jsou uvedeny v Tabulce 1.

Tabulka 1: Sekvence primerů a parametry amplifikační reakce.

Označení	Sekvence primerů (5' – 3')	Teplota annealingu*	Délka produktu
P3	gtt tgg cct ctt ttt cct ttt g	51 °C	322 bp
P4	tca gag cta ata gat ggc aca cc		

*V závislosti na používané Taq polymeráze. . Uvedená teplota byla použita s následujícími produkty: Aptamer Hot Start Mastermix (Top-Bio, s.r.o.) – použití tohoto produktu předcházela reverzní transkripce s hexamery a oligo (dT)₂₀ pomocí Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche), HyperScript™ One-step RT-PCR Premix (Geneall Biotechnology Co., Ltd.).

2.2.2 Kontrolní kmen

Jako pozitivní kontrola pro reverzně transkripční polymerázovou řetězovou reakci byl použit sbírkový kmen CAPM V-167 (Sbírka zoopatogenních mikroorganismů, Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i., Hudcova 296/70, 621 00 Brno).

2.2.3 Ostatní potřeby a pomůcky specifické pro metodický postup

- odběrové tampony FLOQSwabs Regular sterile in dry tube Molded Break point 80 mm (Copan Flock Technologies, s.r.l)
- pufovaný fyziologický roztok (např. Dulbecco's Phosphate Buffered Saline w/o Calcium w/o Magnesium, BIOSERA)
- High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche)
- variantně (viz kapitola 2.3.3) HyperScript™ One-step RT-PCR Premix (Geneall Biotechnology Co., Ltd.) nebo Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche) a Aptamer Hot Start Mastermix (Top-Bio, s.r.o.)

2.3 Postup

2.3.1 Odběr vzorků

Pro získání výtěrů z rypáku je optimální použít odběrové tampony FLOQSwabs Regular sterile in dry tube Molded Break point 80 mm (Copan Flock Technologies, s.r.l.). Materiál odběrového tamponu umožní oproti tradičnímu vatovému tamponu efektivnější vymytí vzorku, tampon nenasákne roztok používaný pro vymytí vzorku, což se u vatových tamponů stává. Tampon s odebraným vzorkem se vymyje do 200 µl pufovaného fyziologického roztoku. Takto připravený vzorek se přímo použije k extrakci nukleových kyselin, případně jej lze uchovat při -80 °C.

2.3.2 Extrakce RNA

Pro extrakci RNA byla dle návodu výrobce použita souprava High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche) umožňující souběžnou extrakci RNA a DNA. Získaná směs nukleových kyselin byla uchována při -80 °C k dalšímu použití.

2.3.3 Provedení reverzní transkripce a polymerázové řetězové reakce

Popisovaný metodický postup poskytuje ověřené sekvence primerů testované v RT-PCR v jednokrokovém i dvoukrokovém formátu a využitím kontrolním kmenů virů (CAPM V-167 a CAPM V-316) a terénních vzorků. Pro detekci virové RNA byly použity následující soupravy dle návodu výrobce: pro jednokrokovou RT-PCR HyperScript™ One-step RT-PCR Premix (Geneall Biotechnology Co., Ltd.), pro dvoukrokovou RT-PCR Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche) a Aptamer Hot Start Mastermix (Top-Bio, s.r.o.). Složení reakčních směsí pro jednotlivé soupravy jsou uvedeny v Tabulce 2. Teplotní profily pro jednotlivé soupravy jsou uvedeny v Tabulce 3. Získaný amplifikační produkt lze v případě potřeby přímo sekvenovat s uvedenými oligonukleotidovými primery. Pro použití metody v laboratoři uživatele výsledku lze optimalizovat metodický postup s vlastními chemikáliemi používanými v dané laboratoři.

Tabulka 2: Složení reakčních směsí

HyperScript™ One-step RT-PCR Premix (Geneall Biotechnology Co., Ltd.)*		
Komponenta	Koncentrace	Množství na 1 vzorek
RT-PCR premix	1x	10 µl (baleno ve stripech 8x0,2 µl zkumavky)
primer F – P3 [10 pmol/ µl]	0,5 µM	1 µl
primer R – P4 [10 pmol/ µl]	0,75 µM	1,5 µl
voda bez nukleáz**	-	2,5 µl
RNA	max. 2 µg	5 µl
Celkový objem reakční směsi		20 µl
Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche)		
RNA premix:		
Komponenta	Množství na 1 vzorek	
oligo (dT) ₁₈	1 µl	
směs hexamerů	2 µl	
voda	5 µl	
RNA (max. 100 mg)	5 µl	
Objem reakční směsi:	13 µl	
RT premix:		
Komponenta	Množství na 1 vzorek	
reakční pufr	4 µl	
inhibitor RNáz	0,5 µl	
dNTP mix	2 µl	
Transcriptor reverzní transkriptáza	0,5 µl	
7 µl RT premixu přidat k 13 µl RNA premixu		
Celkový objem reakční směsi:	20 µl	
Aptamer Hot Start Mastermix (Top-Bio, s.r.o.)		
Komponenta	Koncentrace	Množství na 1 vzorek
master mix	1x	10 µl
voda	-	6 µl
primer F – P3 [10 pmol/ µl]	0,5 µM	1 µl
primer R – P4 [10 pmol/ µl]	0,5 µM	1 µl
cDNA		2 µl
Celkový objem reakční směsi		20 µl

*produkt je dodáván ve zkumavkách po jednotlivých reakcích pro celkový objem reakční směsi 20 µl

** např. PCR Ultra H₂O (Top-Bio, s.r.o.)

Tabulka 3: Teplotní profily amplifikačních reakcí

HyperScript™ One-step RT-PCR Premix (Geneall Biotechnology Co., Ltd.)			
reverzní transkripce	reverzní transkripce	55 °C/45 min	1 cyklus
	inaktivace/denaturace	94 °C/4 min	
polymerázová řetězová reakce	denaturace	94 °C/30 s	35 cyklů*
	nasednutí primerů	51 °C/30 s	
	syntéza	72 °C/30 s	
závěrečná syntéza		72 °C/5 min	1 cyklus
chlazení		12 °C	-
Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche)			
denaturace směsi RNA s primery (RNA premix)	65 °C/10 min		
	zkumavku se vzorkem neprodleně umístit na led		
reverzní transkripce	25 °C/10 min		
	55 °C/30 min		
	85 °C/5 min		
chlazení	zkumavku se vzorkem neprodleně umístit na led		
Aptamer Hot Start Mastermix (Top-Bio, s.r.o.)			
polymerázová řetězová reakce	počáteční denaturace	94 °C/1 min	1 cyklus
	denaturace	94 °C/15 s	35 cyklů*
	nasednutí primerů	51 °C/15 s	
	syntéza	72 °C/30 s	
	závěrečná syntéza	72 °C/7 min	1 cyklus
	chlazení	12 °C	-

*v případě negativního výsledku doporučujeme provést reamplifikaci se stejným párem primerů a soupravou Aptamer Hot Start Mastermix (Top-Bio, s.r.o.) a totožným teplotním profilem, se sníženým počtem cyklů (tj. 30 cyklů) u polymerázové řetězové reakce

III. Srovnání novosti postupů

Diagnostika PHEV není vzhledem k absenci klinického onemocnění v České republice běžně prováděna. Předložený metodický postup umožňuje přímou detekci RNA viru prasečí hemaglutinující encefalomyelitidy ve vzorku výtěru z rypáku. Použité detekční oligonukleotidové primery byly ověřeny s pozitivním výsledkem při detekci kmenů aktuálně cirkulujících v chovech prasat v České republice a metoda je proto využitelná k diagnostickým účelům.

IV. Popis uplatnění metodiky

Certifikovaná metodika je určena veterinárním diagnostickým laboratořím všech typů (Státní veterinární ústavy, soukromé veterinární laboratoře atd.) včetně pracovišť ve Výzkumném ústavu veterinárního lékařství a Veterinární a farmaceutické univerzity Brno. Předpokládáme, že chovatelé prasat a veterinární lékaři – specialisté v chovech prasat si budou zadávat vyšetření v těchto typech laboratoří (včetně VÚVeL). Metodika je řešena v úzké spolupráci se Svazem chovatelů prasat v Čechách a na Moravě, zejména její zdravotní komisí. Chovatelům se tak nabízí prohloubení diagnostiky o další významné infekční agens.

V. Ekonomické aspekty

Ekonomický přínos spočívá v možnosti prohloubení diagnostiky významných infekčních patogenů v chovech prasat. Bez správné diagnostiky, založené na důkazech nejsou možná žádná další profylaktická opatření. Odhaduje se, že správná diagnostika se podílí na ekonomickém efektu zdravotních opatření nejméně 30 %.. Hlavní přínos, ačkoliv nepřímý, spočívá v prohloubení znalostí o infekční situaci v chovech prasat a tím v lepší možnosti nastavení ozdravovacích postupů. Ty, samozřejmě, vedou ke zvýšení produkčních a reprodukčních ukazatelů a ve svém konečném důsledku k dosažení rentability chovu.

VI. Seznam použité literatury

Cartwright, S.F., Lucas, M., Cavill, J.P. et al. Vomiting and wasting disease of piglets. Vet Rec 1969, 84:175-176.

de Groot, R.J., Baker, S.C., Baric, R. et al. Family Coronaviridae. In: Virus Taxonomy, Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B., Lefkowitz, E.J. (Eds.) Elsevier, 2012, p. 806-828.

Dong, B., Lu, H., Zhao, K. et al. Identification and genetic characterization of porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus from domestic piglets in China. Arch virol 2014, 159:2329-2337.

Greig, A.S., Mitchell, D., Corner, A.H. et al. A hemagglutinating virus producing encephalomyelitis in baby pigs. Can J Comp Med 1962, 26:49-56.

Chen, K., He, W., Lu, H. et al. Development of an immunochromatographic strips for serological diagnosis of porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus. J Vet Diagn Invest 2011, 23:288-296.

Lorbach, J.N., Wang, L., Nolting, J.M et al. Porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus and respiratory disease in exhibition swine, Michigan, USA, 2015. Emerg infect Dis 2017, 23:1168-1171.

Quiroga, M.A, Cappuccio, J., Pineyro, P. et al. Hemagglutinating encephalomyelitis coronavirus infection in pigs, Argentina. Emerg Infect Dis 2008, 14:484-486.

Pensaert, M.B. Hemagglutinating encephalomyelitis virus. In: Diseases of Swine, 9TH Edition. Straw, B.E., Zimmerman, J.J., D`Allaire, S., Taylor, D.J. (Eds.) Blackwell Publishing, 2006, 353-358.

Roe, C.K. and Alexander, T.J.L. A disease of nursing pigs previously unreported in Ontario. Can J Comp Med 1958, 22:305-307.

Sasseville, A.M., Gelinas, A.M., Sawyer, N. et al. Biological and molecular characteristics of an HEV isolate associated with recent acute outbreaks of Encephalomyelitis in Quebec pig farms. Adv Exp Med Biol 2001, 494:57-62.

Seznam publikací předcházejících metodice

Moutelíková, R., Prodělalová, J., Toman, M. Detekce viru prasečí hemagglutinuující encefalomyelitidy v České republice. Veterinářství 2017, 67:733-736.

Moutelíková, R., Prodělalová, J., Toman, M. Koronaviry v chovech prasat v České republice. Veterinářství 2016, 66:764-767.



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