



FUNKČNÍ VZOREK

**Systém pro detekci Rotaviru A
a Rotaviru C ve vzorcích stolice
metodou reverzně-transkripční PCR
v reálném čase (RT-qPCR)**

Mgr. Romana Moutelíková, Ph.D.

RNDr. Jana Prodělalová, Ph.D.

Mgr. Monika Dvořáková Heroldová, Ph.D.

Ing. Veronika Holá, Ph.D.

Mgr. Pavel Sauer, Ph.D.

**5561
2019**

Funkční vzorek

5561/2019

**Systém pro detekci Rotaviru A a Rotaviru C
ve vzorcích stolice metodou reverzně-transkripční PCR
v reálném čase (RT-qPCR)**

Mgr. Romana Moutelíková, Ph.D.

RNDr. Jana Prodělalová, Ph.D.

Mgr. Monika Dvořáková Heroldová, Ph.D.

Ing. Veronika Holá, Ph.D.

Mgr. Pavel Sauer, Ph.D.

2019

ISBN 978-80-88233-77-0

Funkční vzorek

Systém pro detekci Rotaviru A a Rotaviru C ve vzorcích stolice metodou reverzně-transkripční PCR v reálném čase (RT-qPCR)

Mgr. Romana Moutelíková, Ph.D.^a

RNDr. Jana Prodělalová, Ph.D.^a

Mgr. Monika Dvořáková Heroldová, Ph.D.^b

Ing. Veronika Holá, Ph.D.^b

Mgr. Pavel Sauer, Ph.D.^c

^aVýzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i., Brno

^bMikrobiologický ústav Lékařské fakulty Masarykovy univerzity a
Fakultní nemocnice u sv. Anny, Brno

^cÚstav mikrobiologie Fakultní nemocnice Olomouc a Lékařské fakulty
Univerzity Palackého, Olomouc

Funkční vzorek byl vytvořen v rámci projektu Agentury pro zdravotnický výzkum České republiky, číslo projektu 16-29937A Komplexní analýza humánních rotavirových infekcí v České republice včetně atypických a emergentních kmenů směřující k vývoji nových detekčních metod.

OBSAH

1. Úvod	3
2. Cíl metodiky funkčního vzorku	4
3. Vlastní popis funkčního vzorku	4
3.1. Příprava suspenze stolice a izolace RNA	4
3.2. Postup provedení RT-qPCR	4
3.2.1. Kontroly reakce	6
3.2.2. Vyhodnocení funkčnosti systému	6
3.3. Seznam použité literatury	7
4. Srovnání novosti postupů	8
5. Popis uplatnění funkčního vzorku	9
6. Ekonomické aspekty	10
7. Dedikace	10

1. ÚVOD

Akutní průjemová onemocnění patří mezi nejčastější příčinu úmrtí u malých dětí a kojenců na celém světě. Kromě bakteriálních původců gastroenteritid jsou závažné průjmy způsobovány virovými agens, z nichž k nejvýznamnějším patří především rotaviry.

Rod *Rotavirus* z čeledi *Reoviridae* je členěn na druhy (také nazývány skupiny) *Rotavirus A* až *Rotavirus I* (RVA-RVI). Skupiny rotavirů A, B, C a H mohou nakazit jak člověka, tak zvířata, zatímco skupiny D, E, F, G a I byly nalezeny pouze u zvířat. Nejvýznamnější skupinou infikující člověka jsou RVA, které způsobují ročně více než 215 000 úmrtí u dětí mladších 5 let, což představuje více než 33 % úmrtí následkem průjemového onemocnění [1]. V České republice jsou RVA v současnosti podle oficiálních údajů z databáze Epidat třetím nejčastějším původcem gastroenteritid - 11,2 % průjemových onemocnění celkem (u dětí do 5 let 23,0 %). Skutečný výskyt je však pravděpodobně několikanásobně vyšší, neboť většina nálezů je hlášena na základě laboratorního vyšetření hospitalizovaných pacientů a při objasňování epidemických výskytů [2].

Rotaviry skupiny B (RVB) se u lidí doposud vyskytly pouze v asijských zemích. Poprvé byly popsány v souvislosti s rozsáhlou epidemií gastroenteritidy v roce 1982 v Číně [3] a v nedávné době byl RVB popsán jako původce průjemových onemocnění u dospělých i u dětí v Bangladéši a v Barmě [4,5].

Rotavirus C (RVC) byl naproti tomu prokázán v mnoha zemích Evropy, Asie, Ameriky i v Austrálii. Podle dostupných studií se RVC podílí na všech gastroenterálních onemocněních 0,4 % v Maďarsku, 4,4 % ve Španělsku, 10,2 % v Japonsku a až 16,1 % v USA [6-9]. Soustavné sledování výskytu RVC u lidí není prováděno, údaje o podílu RVC na případech onemocnění GIT se liší v závislosti na použité metodice a výchozím souboru vzorků (děti, dospělí). Obecně se předpokládá, že RVC způsobuje méně než 10% všech případů gastrointestinálních infekcí, což je srovnatelné s počtem infekcí způsobených astroviry či adenoviry.

Rotavirus H (RVH) prozatím zahrnuje virus NADRV, který byl popsán jako původce epidemie gastroenteritidy dospělých v Číně roku 1997 a dále kmen B219, který byl izolován při výskytu průjemového onemocnění v Bangladéši v roce 2002 [10,11].

Rutiní laboratorní diagnostika je prováděna pomocí průkazu virového antigenu ve stolici metodou ELISA či imunochromatografickými a latexaglutinačními rychlými testy. Tyto diagnostické testy jsou zaměřeny na virový strukturální protein VP6, který je specifický pro

jednotlivé skupiny (druhy) rotavirů. Proto také běžně používanými diagnostickými kity není možné odhalit infekci jiným druhem rotavirů, než je RVA. Oproti tomu reverzně transkripční polymerázová řetězová reakce (RT-PCR), ať už v klasickém formátu nebo v reálném čase (RT-qPCR), je vysoce specifická a citlivá metoda, kterou je možné využít k současné detekci různých druhů enterálních patogenů.

2. CÍL METODIKY FUNKČNÍHO VZORKU

Cílem metodiky bylo zavést a ověřit metodu založenou na RT-qPCR pro detekci genomové RNA rotavirů skupin A a C (RVA a RVC) ve vzorcích lidské stolice.

3. VLASTNÍ POPIS FUNKČNÍHO VZORKU

3.1. Příprava suspenze stolice a izolace RNA

Vzorky stolice pro účely virologického vyšetření byly odebírány na klinických pracovištích pomocí komerčně dostupných odběrových nádobek bez použití transportního média. Vzorek stolice byl uchováván při -70 °C až do doby zpracování. Pro přípravu 10% suspenze bylo použito 100 mg (nebo 100 µl) odebrané stolice a 900 µl PBS (Biosera, Francie). Ke směsi byly přidány dvě sterilní skleněné kuličky (průměr 1 mm) a vše bylo umístěno na třepačku (10 min/2100 rpm), poté centrifugováno 1 min/12000 rpm. Supernatant byl dále použit k extrakci virové RNA pomocí TRI Reagent (Sigma Aldrich, USA) podle návodu výrobce. Izolovaná RNA byla rozpuštěna ve 100 µl sterilní vody bez RNáz a skladována při teplotě ≤ -70 °C.

3.2. Postup provedení RT-qPCR

Pro provedení jednokrokové reverzně-transkripční PCR v reálném čase (RT-qPCR) ke specifické detekci částí virového genomu rotavirů byla použita souprava Luna Universal Probe One-Step RT-qPCR Kit (New England Biolabs, USA) dle návodu výrobce. Pro detekci RVA byly vybrány dva cíle zaměřené na vysoce konzervované oblasti nestrukturního proteinu

NSP3, které byly již dříve publikovány [12,13]. Pro účely naší studie byly primery i sondy mírně modifikovány a použity v systému duplexní reakce. Při využití dvou cílů pro detekci jednoho organismu se pravděpodobnost úspěšné detekce výrazně zvyšuje. Pro detekci RVC byly pomocí veřejně dostupného programu Primer3web, verze 4.1.0 (dostupný na <http://primer3.ut.ee>) navrženy primery detekující konzervovanou oblast strukturního virového proteinu VP6 spolu se sondou značenou BHQ1-HEX. Sekvence použitých primerů a TaqMan sond jsou uvedeny v Tabulce 1.

Tabulka 1. Sekvence primerů a sond použitých pro detekci RVA a RVC pomocí RT-qPCR a jejich umístění v oblasti genomu (RVA – segment NSP3, přístupový kód GenBank LC477619, RVC – segment VP6, přístupový kód X59843).

Primery a proby	Sekvence nukleotidů (5' → 3')	Umístění
RVA-JVK-Fd	CAGTKGTTGMTGCTCAAGATG	13-33
RVA-JVK-Rd	TCATTGTAATCATAYTGAATWCCCA	143-119
RVA-JVK-P (FAM-BHQ1)	ACAACTGCAGCTTCAAAAGAAGWGT	92-68
huRVA-qF	ACCATCTWCACRTRACCCTC	984 - 1003
huRVA-qR	CACATAACGCCCCYATAGCC	1067 - 1048
huRVA-qP (HEX-BHQ1))	ATGAGCACAATAGTTAAAAGCTAACACTGTCAA	1005 - 1037
RVC-VP6-qF	CYGTGAAGAGAATGGTRWTGTAGA	1188-1211
RVC-VP6-qR	CCCTAYGCAAGCRTGGACTA	1297-1278
RVC-VP6-qP (BHQ1-FAM)	CATGTAGCATGAATCACGACTGGGTT	1252-1277

Jednokroková RT-qPCR pro detekci RVA je prováděna ve formátu duplex, kdy jsou oba cíle detekovány současně. Složení reakční směsi je uvedeno v Tabulce 2.

Tabulka 2. Složení reakční směsi pro detekci RVA pomocí RT-qPCR

Složka	Objem pro 1 reakci (20 µl)	Výsledná koncentrace
H ₂ O bez nukleáz	0,4 µl	
Luna Universal Probe One-Step Reaction Mix (2x)	10 µl	1x
Luna WarmStart RT Enzyme Mix (20x)	1 µl	1x
RVA-JVK-Fd (10 µM)	0,8 µl	0,4 µM
RVA-JVK-Rd (10 µM)	0,8 µl	0,4 µM
RVA-JVK-P (10 µM)	0,4 µl	0,2 µM
huRVA-qF (10 µM)	0,8 µl	0,4 µM
huRVA-qR (10 µM)	0,8 µl	0,4 µM
huRVA-qP (10 µM)	0,4 µl	0,2 µM
Templát – celková RNA	5 µl	

Rotaviry C je možné detekovat v reakci formátu duplex, kdy je místo první sady primerů pro RVA (RVA-JVK-Fd+RVA-JVK-Rd) a sondy s FAM fluoroforem (RVA-JVK-P) přidána sada primerů pro RVC (RVC-VP6-qF+RVC-VP6-qR) a sonda (RVC-VP6-qP) ve stejných objemech.

Nebo je možné detekovat RVC v samostatné reakci RT-qPCR, potom je složení reakční směsi následující:

Tabulka 3. Složení reakční směsi pro detekci RVC.

Složka	Objem pro 1 reakci (20 µl)	Výsledná koncentrace
H ₂ O bez nukleáz	2 µl	
Luna Universal Probe One-Step Reaction Mix (2x)	10 µl	1x
Luna WarmStart RT Enzyme Mix (20x)	1 µl	1x
RVC-VP6-qF (10 µM)	0,8 µl	0,4 µM
RVC-VP6-qR (10 µM)	0,8 µl	0,4 µM
RVC-VP6-qP (10 µM)	0,4 µl	0,2 µM
Templát – celková RNA	5 µl	

Po smíchání všech složek podle počtu analyzovaných vzorků + potřebné množství kontrol je reakční směs důkladně promíchána (vortex) a krátce stočena na stolní centrifuze. Reakční směs (15 µl/1 jamka) je poté přenesena na 96-jamkovou destičku pro qPCR (Roche, Německo), je přidána extrahovaná RNA vzorku (5 µl/1 jamka), negativní a pozitivní kontroly (viz níže) a destička je překryta fólií. Po centrifugaci (2 min/2000 rpm) je destička vložena do cykleru. Teplotní profil amplifikační reakce je uveden v Tabulce 3.

Tabulka 4. Teplotní profil reakce v přístroji LightCycler® 480.

Krok	Teplota	Čas	Počet cyklů
Reverzní transkripce	55 °C	10 minut	1
Úvodní denaturace	95 °C	1 minuta	1
Denaturace	95 °C	10 sekund	45
Extenze	60 °C	30 sekund (+ odečet fluorescence)	
Chlazení	40 °C	15 sekund	1

3.2.1. Kontroly reakce

Jako negativní kontrola reakce bez templátu je použita H₂O bez nukleáz (5 µl).

Jako pozitivní kontrola reakce byla použita RNA obsahující cílovou sekvenci reakce připravená reverzně genetickou metodou. V případě RVA byl použit PCR produkt z pozitivního vzorku připravený s primery pro RT-qPCR, který byl dle návodu výrobce zaklonován do plazmidu (TOPO TA Cloning® Kit, Invitrogen, USA) a pomocí T7 polymerázy přepsán do RNA (MEGAscript® RNAi Kit, Ambion, USA). Koncentrace výsledného RNA transkriptu byla změřena fluorometricky (AccuBlue® Broad Range RNA Quantitation Kit, Biotium, USA) na přístroji DeNovix DS-11FX+ (DeNovix, USA) a následně byla přepočítána na počet kopií genomu v 1 µl. Byla připravena řada desetinných ředění RNA transkriptu, které byly použity v RT-qPCR reakci pro sestavení kalibrační křivky a následně pro určení koncentrace cílové sekvence ve vzorku.

Pro přípravu RNA transkriptu RVC nebylo možné použít pozitivní vzorek (nebyl k dispozici), proto byl připraven oligonukleotid (Generi-Biotech, ČR) o délce 110 bp podle sekvence typového kmene lidského RVC (kmen Bristol, přístupový kód GenBank X59843). Další postup přípravy transkriptu byl shodný jako u RVA.

3.2.2. Vyhodnocení funkčnosti systému

Funkčnost připravených primerů a sondy pro detekci RVA byla vyhodnocena na souboru klinických vzorků souběžně testovaných komerčně dostupnou soupravou (Primerdesign™ Genesig® Kit, Primerdesign Ltd., UK). Obě metody RT-qPCR vykazaly velmi dobrou shodu [14]. Systém primerů a sondy pro detekci RVC byl schopen detekovat cílovou sekvenci ve vzorcích odpadních vod, které byly odebírány opakovaně v období 11/2017 až 11/2018 na dvou městských čističkách odpadních vod. Tyto vzorky byly podrobně charakterizovány pomocí sekvenování příští generace (NGS) (SEQme, ČR), které prokázalo sekvence specifické pro lidský RVC.

3.3. Seznam použité literatury

1. Tate JE, Burton AH, Boschi-Pinto C et al. Global, Regional, and National Estimates of Rotavirus Mortality in Children < 5 Years of Age, 2000-2013. *Clin Infect Dis*, 2016;62(S2): S96-105.
2. Pazdiora P, Current rotavirus infections, options of prevention through vaccination. *Postgraduální medicína*, 2011;9:964-7.

3. Saif LJ, Jiang B. Nongroup A rotaviruses of humans and animals. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1994;185:339-71.
4. Ahmed MU, Kobayashi N, Wakuda M et al. Genetic analysis of group B human rotaviruses detected in Bangladesh in 2000 and 2001. *J Med Virol*, 2004;72:149-55.
5. Aung TS, Kobayashi N, Nagashima S et al. Detection of group B rotavirus in an adult with acute gastroenteritis in Yangon, Myanmar. *J Med Virol*, 2009;81:1968-74.
6. Bányai K, Jiang B, Bogdán Á et al. Prevalence and molecular characterization of human group C rotaviruses in Hungary. *J Clin Virol*, 2006;37:317-22.
7. Sánchez-Fauquier A, Roman E, Colomina J et al. First detection of group C rotavirus in children with acute diarrhea in Spain. *Arch Virol*, 2003;148:399-404.
8. Esona MD, Humphrey CD, Dennehy PH et al. Prevalence of group C rotavirus among children in Rhode Island, United States. *J Clin Microbiol*, 2008;42:221-4.
9. Phan TG, Nishimura S, Okame M et al. Virus diversity and an outbreak of group C rotavirus among infants and children with diarrhea in Maizuro City, Japan, during 2002-2003. *J Med Virol*, 2004;74:173-9.
10. Yang H, Makeyev EV, Kang Z et al. Cloning and sequence analysis of dsRNA segments 5, 6 and 7 of a novel non-group A, B, C adult rotavirus that caused an outbreak of gastroenteritis in China. *Virus Res*, 2004;106:15-26.
11. Nagashima S, Kobayashi N, Ishino M et al. Whole genomic characterization of a human rotavirus strain B219 belonging to a novel group of the genus *Rotavirus*. *J Med Virol*, 2008;80:2023-33.
12. Pang XL, Lee B, Boroumand N et al. Increased detection of rotavirus using a real time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) assay in stool specimens from children with diarrhea. *J Med Virol*, 2004;72:496-501.
13. Jothikumar N, Kang G, Hill VR. Broadly reactive TaqMan® assay for real-time RT-PCR detection of rotavirus in clinical and environmental samples. *J Virol Methods*, 2009;155:126-131.
14. Moutelíková R, Dvořáková Heroldová M, Holá V et al. Diagnostic performance comparison of enzymatic immunoassay and rapid chromatographic test with quantitative RT-PCR in rotavirus A detection. *Epidemiol Mikrobiol Imunol*, 2018;67:110-113.
15. Rahman M, Banik S, Faruque ASG et al. Detection and characterization of human group C rotaviruses in Bangladesh. *J Clin Microbiol*, 2005;43:4460-4465.

16. Kuzuya M, Hamano M, Nishijima R et al. An outbreak of acute gastroenteritis caused by human group C rotavirus in a welfare institution in Okayama prefecture. *Jpn J Infect Dis*, 2005;58:255-257.

4. SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

Systém pro detekci RVA a RVC ve vzorcích stolice metodou RT-qPCR poskytuje nástroj pro citlivou detekci významných enterálních patogenů lidí. RVA je sice v klinických laboratořích běžně detekovaným patogenem, nicméně citlivost používaných metod může být limitujícím faktorem jejich úspěšného použití. Obzvláště v případech zjišťování nosokomiálních infekcí na jednotkách intenzivní péče či v domovech pro seniory, kde rotavirová gastroenteritida může mít fatální následky, je vysoká citlivost RT-qPCR velkou výhodou.

RVC není v klinických laboratořích běžně zjišťován, testy na principu imunoenzymatických či imunochromatografických metod nejsou pro detekci RVC k dispozici. Přítomnost RVC v lidské populaci v České republice byla však prokázána opakovaně detekcí RVC v odpadní vodě na vstupu do dvou různých městských čistících stanic. RVC většinou způsobuje ojedinělé případy gastroenteritidy, může však vyvolat i lokální epidemie [15,16].

Vývoj nového systému pro detekci RVA a RVC ve vzorcích stolice reaguje na aktuální trendy použití molekulárně-biologických metod v diagnostice infekčních nemocí a přináší nový diagnostický nástroj, který může v současnosti dostupným podobným výrobkům konkurovat vysokou citlivostí, specifičností a současně nižšími náklady, než vyžaduje použití komerčních diagnostických RT-qPCR kitů.

5. POPIS UPLATNĚNÍ FUNKČNÍHO VZORKU

Funkční vzorek je na pracovištích autorů zaveden a je využíván pro výzkumné účely. Možné širší využití detekčního systému závisí na zájmu diagnostických pracovišť o tento typ analýzy.

6. EKONOMICKÉ ASPEKTY

V současné době není možné přesně určit ekonomické aspekty funkčního vzorku. Je nicméně možné srovnat náklady na 1 reakci za použití komerčně dostupného kitu pro detekci RVA nebo RVC, které se pohybují okolo 100,- Kč za stanovení 1 vzorku. Stejnou částku je při analýze vzorků pacientů nutné přičíst za stanovení všech negativních a pozitivních kontrol. Při využití systému funkčního vzorku a souběžné detekci RVA a RVC v jedné reakci činí náklady na použité chemikálie přibližně 35,- Kč za vyšetření 1 vzorku, což je téměř 3x méně, než při použití komerční sady.

7. DEDIKACE

Funkční vzorek byl vytvořen v rámci projektu Agentury pro zdravotnický výzkum České republiky, číslo projektu 16-29937A.



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