



FUNKČNÍ VZOREK

**Analýza přítomnosti DNA viru afrického moru prasat
za využití elektrochemických metod**

**Ondřej Rychlý
Ing. et Ing. Božena Hosnedlová, Ph.D.
Prof. Ing. René Kizek, Ph.D., DrSc., MBA.
Ing. Miroslava Krzyžánková, Dr.rer.nat.**

**4478
2021**

Funkční vzorek 4478/2021

Analýza přítomnosti DNA viru afrického moru prasat za využití elektrochemických metod

Ondřej Rychlý

Ing. *et* Ing. Božena Hosnedlová, Ph.D.

Prof. Ing. René Kizek, Ph.D., DrSc., MBA.

Ing. Miroslava Krzyžánková, Dr.rer.nat.

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i., Brno

Funkční vzorek byl vytvořen v rámci projektu Národní agentury pro zemědělský výzkum, číslo projektu QK1920113, název projektu Virus afrického moru prasat v mase a masných výrobcích – metody detekce a studium perzistence.

2021

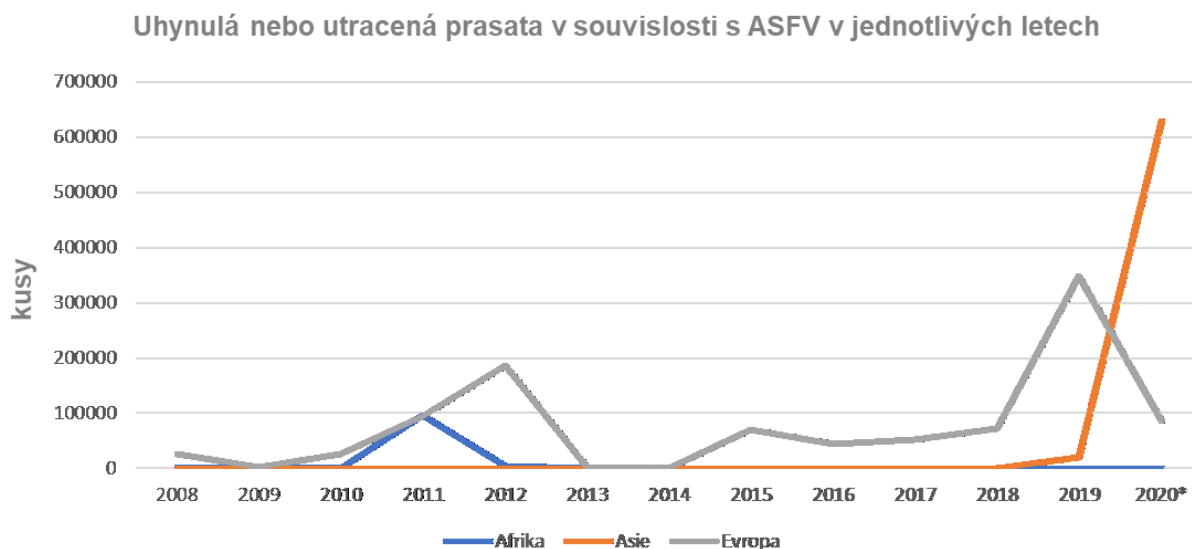
ISBN 978-80-7672-015-2

Obsah

1. Úvod	3
2. Cíl funkčního vzorku	4
3. Popis funkčního vzorku	5
3.1 Metodika funkčního vzorku	5
3.1.1 Příprava vzorků a zachycení DNA	5
3.1.2 Detekce a kvantifikace	6
3.1.3 Detekce a kvantifikace DNA ASFV	6
3.2 Výsledky	6
3.2.1 Izolace virové DNA	8
3.2.2 Zachycení DNA na povrch nanočástic	8
3.2.3 Limit detekce vybrané metody izolace DNA ze vzorků	9
3.2.4 Přítomnosti DNA ASFV ve vzorku	9
4. Srovnání novosti postupů	10
5. Uplatnění funkčního vzorku	10
6. Ekonomické aspekty	11
Poděkování	11
7. Použitá literatura	11

1. Úvod

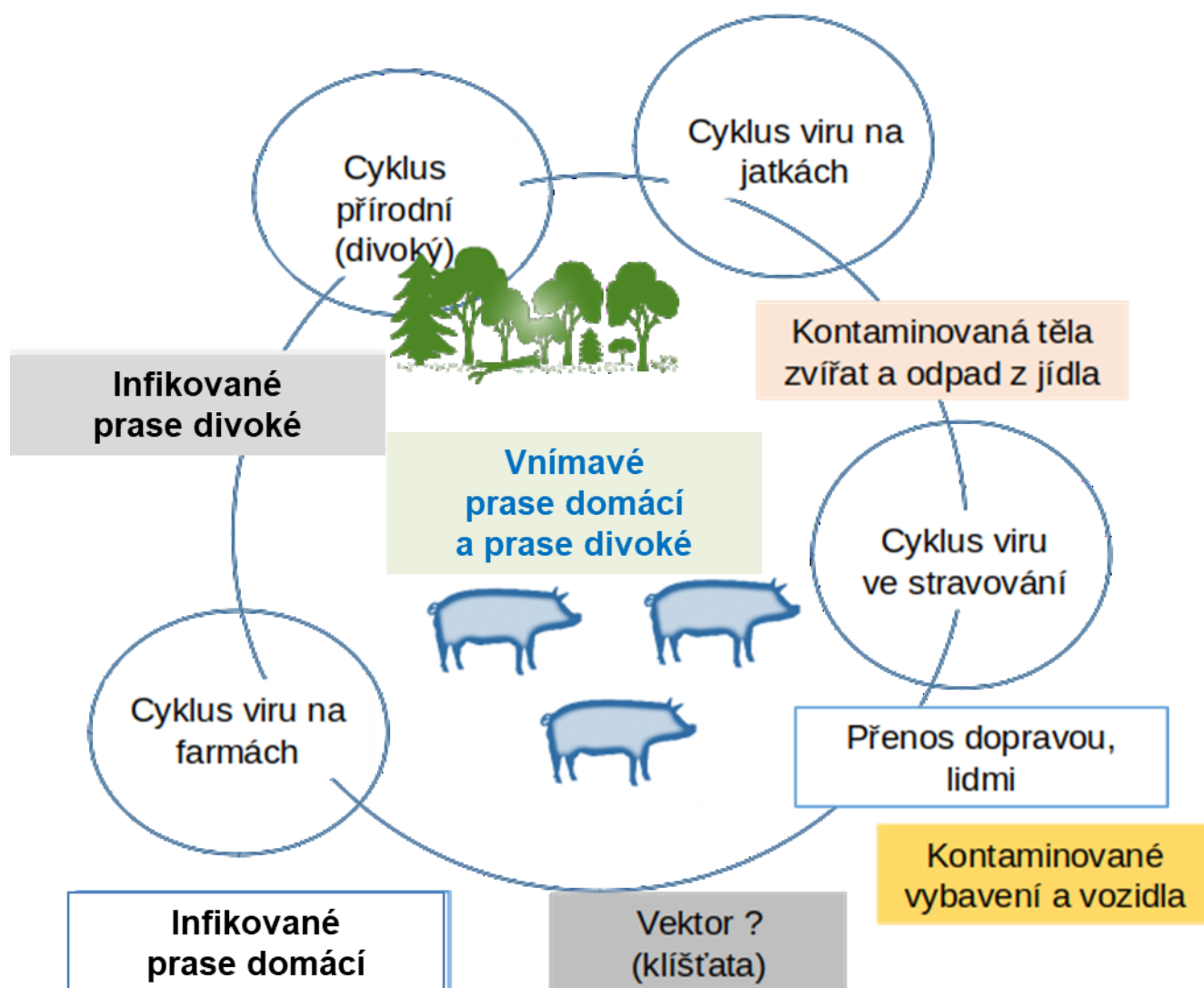
Viry jakožto původce nebezpečných onemocnění představují hrozbu pro člověka i další živočišné druhy [1, 2]. Základní podmínkou pro úspěšné zastavení virové epidemie/epizootie je identifikace nakažených jedinců a jejich následná izolace. Z tohoto důvodu je nutné hledat snadné a rychlé způsoby, jak stanovit možnou přítomnost nebezpečných agens v dostupném biologickém materiálu. Africký mor prasat (ASF; African swine fever) se vyznačuje vysokou letalitou dosahující až 100 % u vnímavých jedinců. Onemocnění se projevuje hemoragickou horečkou, cyanotickými skvrnami na kůži a krvácením na sliznicích a orgánech. Původcem onemocnění je virus afrického moru prasat (ASFV; African swine fever virus), obalený virus z čeledi *Asfarviridae* [3, 4]. Jeho nukleoproteinové jádro má průměr 70–100 nm a vnější obal jeho virionu 175–215 nm. Genom viru ASF se skládá z jedné molekuly dvouvláknové DNA a obsahuje 170–194 tisíc párů bází, které kódují více než 150 proteinů [4]. Dokáže přežít dlouhou dobu na materiálech biologického původu. Častým zdrojem nákazy proto bývají kadávery či nedostatečně tepelně upravené potraviny obsahující vepřové maso. Virus dobře odolává chladu. V chlazeném mase přežívá až několik týdnů, za vyšší teploty (při 60 °C) je inaktivován za 20 min [5].



Obr. 1 Graf zobrazující roční počet prasat domácích i divokých nakažených africkým morem prasat ve sledovaných kontinentech. Data převzata od FAO

V Evropě za celou dobu výskytu ASF (do 18. 6. 2020) na nákazu uhynulo nebo bylo utraceno celkem 1 383 372 prasat divokých i domácích [6] (Obr. 1). V Asii je naopak situace výrazně odlišná, neboť ASF se zde vyskytuje především v chovech prasat domácích. Za celou dobu výskytu (do 18. 6. 2020) ASF zde v souvislosti s nákazou uhynulo nebo bylo utraceno 6 733 791 kusů [7]. Proti ASF v současné době neexistuje vakcína. Výskyty ohnisek ASF mají tedy velké socioekonomické dopady. V ohniscích výskytu se často musí přistupovat k likvidaci chovů. Z tohoto důvodu je zapotřebí najít na ASF snadnou a rychlou metodu detekce, která bude použitelná pro práci v terénu, tj. přímo na farmách [8].

K tomu mohou být vhodné elektrochemické metody, které vykazují potenciálně dostatečnou citlivost k průkazu ASFV i bez amplifikace virové DNA [9-11]. V současné době již existují tištěné elektrody, které jsou ve formě detektorů, testů apod. používány mimo laboratorní prostředí [9, 11, 12]. Pravděpodobný cyklus přenosu viru afrického moru prasat je zobrazen na Obr. 2.



Obr. 2 Pravděpodobný cyklus přenosu viru afrického moru prasat. S přirozeným cyklem cirkulace viru v populaci prasete divokého, na jatkách, ve stravovacím systému a farmách.

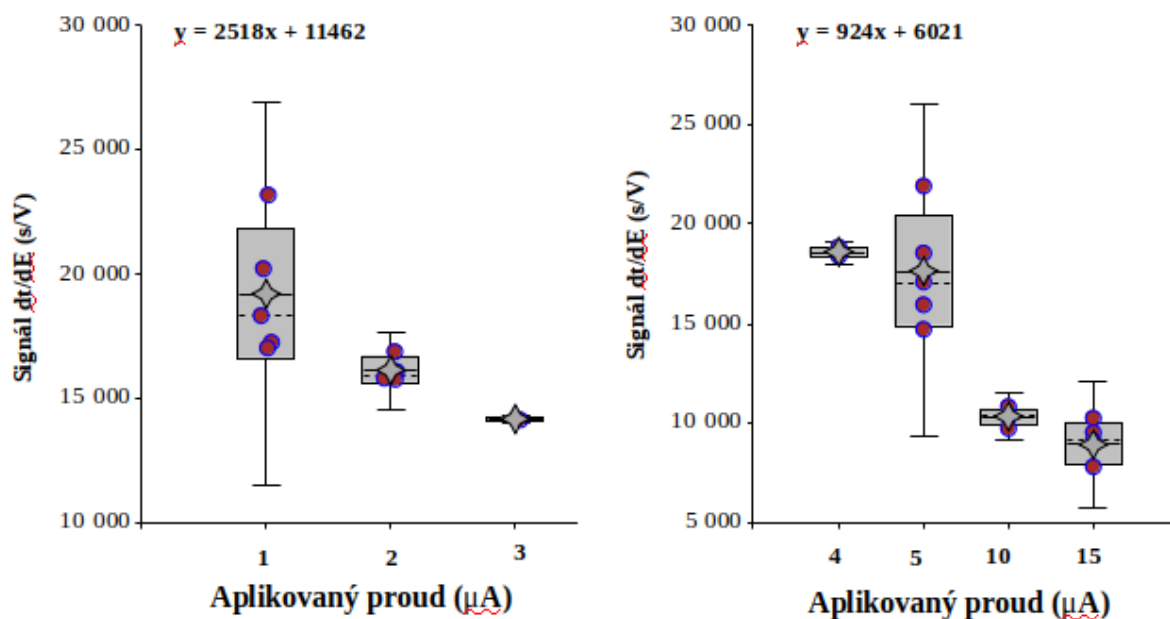
2. Cíl funkčního vzorku

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

3. Popis funkčního vzorku

3.1 Metodika funkčního vzorku

Detekční metoda je založena na základě oxidačních vlastností nukleových bází DNA. Díky nim jsme schopni pomocí chronopotenciometrické analýzy (CPSA, při vhodném aplikovaném proudu) její přítomnost detekovat i ve velice malém množství (řádově 10^6 až 10^9 genomových ekvivalentů; GE)/ μl izolované NK), Obr. 3.



Obr. 3 Změna signálu piku H v závislosti na čase měření pro vzorky DNA o koncentracích 5 $\mu\text{g/ml}$ (A) a 10 $\mu\text{g/ml}$ (B)

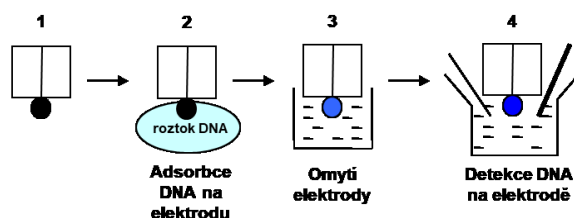
Modelové vzorky byly připraveny rozpuštěním DNA ve vodě v koncentracích (0,1–10 $\mu\text{g/ml}$). Pro izolaci DNA ze vzorků a její oddělení od případných nežádoucích látek, které by mohly být obsaženy v biologických vzorcích, byla použita technika adsorptivního přenosu. DNA byla selektivně zachycena na povrch zlatem modifikovaných superparamagnetických nanočástic oxidu železitého (Au-SPION) [12].

3.1.1 Příprava vzorků a zachycení DNA

Byly vytvořeny modelové vzorky rozředěním koncentrovaného roztoku DNA v deionizované vodě s rezistivitou $18,2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ (voda). Vzorky byly zředěny na koncentrace 10, 1 a 0,1 $\mu\text{g/ml}$, vytvořeny byly i kontrolní vzorky o koncentraci 0 $\mu\text{g/ml}$ DNA. Jako povrch pro izolaci DNA byly připraveny Au-SPION. 5 mg Au-SPION bylo v prostředí fosfátového pufru (NaH_2PO_4 ; NaCl; pH 7; 0,15 M) ponořeno do ultrazvukové lázně (45 kHz; 25 $^\circ\text{C}$) na dobu 20 min. Tím došlo k modifikaci Au-SPION Na^+ kationty. Díky tomu na ně může být navázána DNA.

3.1.2 Detekce a kvantifikace

K detekci byla použita chronopotenciometrická rozpouštěcí analýza (CPSA) probíhající v prostředí McIlvainova pufru (kyselina citronová; Na_2HPO_4 ; pH 5,9; 0,2 M) na přístroji AUTOLAB 101 v kombinaci s VA Stand 663. Analýza probíhala v tříelektrodovém zapojení, pracovní elektroda – visící rtuťová kapková elektroda (hanging mercury drop electrode, HMDE) s povrchem $0,4 \text{ mm}^2$, referenční elektroda – Ag/AgCl/3 M KCl a pomocná elektroda – grafit. Při CPSA dochází za přítomnosti DNA ke vzniku katalytického signálu píku H a to i při velice nízkých koncentracích DNA v analytu. Za účelem zvýšení citlivosti metody byla při měření vzorků použita technika adsorpčního přenosu (Obr. 4). Při měření technikou adsorpčního přenosu je vzorek nanesen na parafilm. Pracovní elektroda je ponořena přímo do vzorku a je ponechán určitý čas (čas akumulace), aby se DNA ze vzorku adsorbovala přímo na povrch pracovní elektrody. Následně je modifikovaná elektroda opláchnuta, aby se odmyly nenavázané nízkomolekulární látky. Následné měření probíhá již jako při běžné voltametrii. Výhodou techniky adsorpčního přenosu je možnost použití výrazně nižšího množství vzorku (pouze 5 μl) [13, 14].



Obr. 4 Schéma adsorbčního přenosu DNA. Podrobnosti jsou uvedeny v práci Paleček et al.[15]

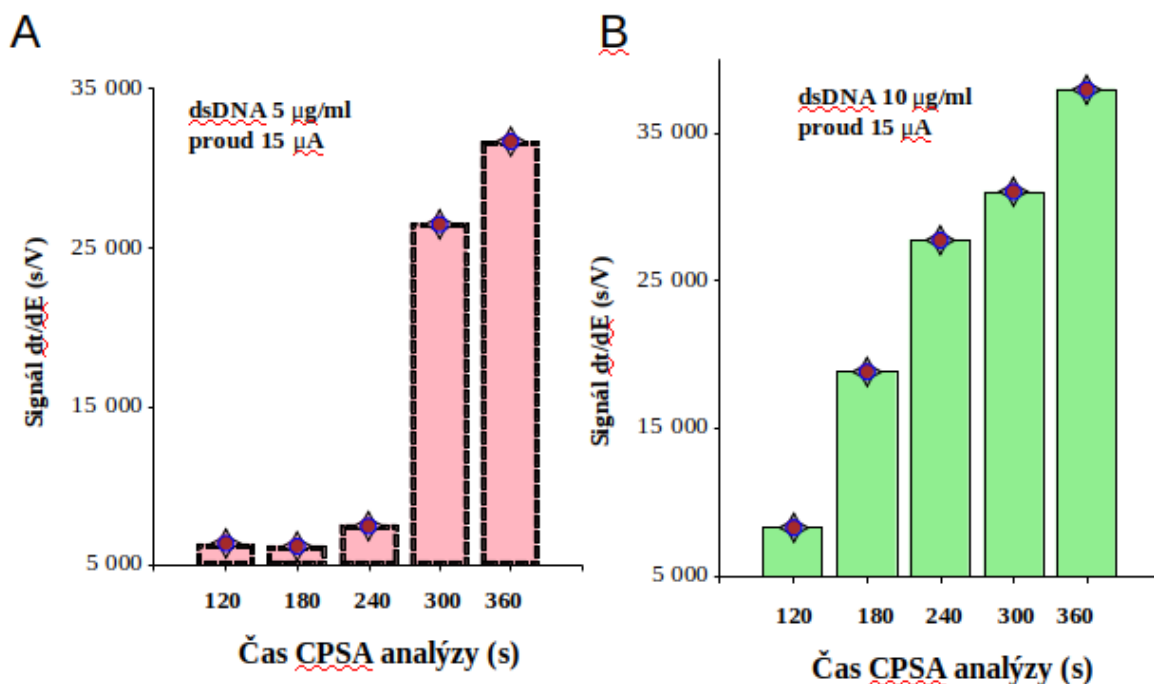
3.1.3 Detekce a kvantifikace DNA ASFV

Měření vzorků s genomovou DNA ASFV probíhala stejně jako u modelových vzorků DNA. Tato měření však již probíhala jen s optimalizovanými parametry (140 s, 5 μl , 10 μA). Detekce DNA ASFV probíhala celkem na 30 vzorcích, z toho 6 kontrolních vzorků s nulovou koncentrací DNA. Jednalo se o modelové vzorky připravené rozpuštěním DNA ASFV ve vodě. Kvantifikace izolované DNA, stanovení účinnosti a limitu detekce metodiky. Za účelem stanovení účinnosti této metodiky bylo připraveno 60 vzorků o různých koncentracích (10, 1, 0,1 a 0 $\mu\text{g/ml}$), ty byly pak měřeny a rozdělovány do skupin, do kterých podle naměřených hodnot náležely. Na základě správnosti tohoto rozřazení byla stanovena účinnost. Dále byl zjišťován limit detekce (LOD), ten se rovná trojnásobku šumu, tedy hodnotě při nulové koncentraci.

3.2 Výsledky

Za účelem zvýšení senzitivity metody byla CPSA použitá při detekci DNA optimalizována. Provedli jsme řadu experimentálních měření, abychom zjistili, jaké parametry CPSA ovlivňují detekci DNA [16]. Zjistili jsme, že výška píku H a to, zda pík vůbec vznikne, je ovlivněno třemi faktory: 1) velikost proudu použitého pro analýzu, 2) délka trvání analýzy a 3) koncentrace DNA.

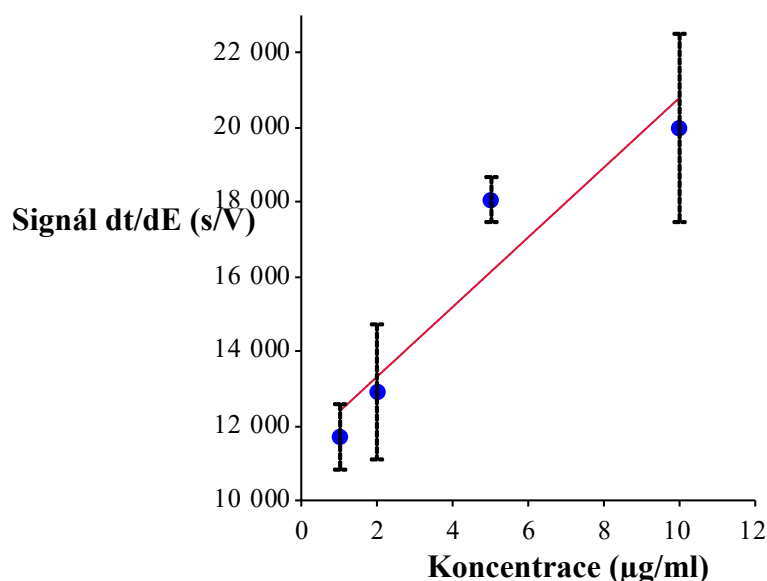
ad 1) Byly změřeny různé koncentrace DNA při rozdílných aplikovaných prouděch. Byla měřena závislost výšky signálu na velikosti aplikovaného proudu. Byly použity vzorky DNA o koncentraci 1 $\mu\text{g/ml}$ při čase trvání analýzy 360 s pro vzorky měřené s proudem 1, 2 a 3 μA . V případě aplikace proudu 4, 5, 10 a 15 μA byl čas analýzy 180 s (Obr. 3). Zjistili jsme, že u různých koncentrací DNA, je vhodný proud pro získání signálu píku H kritický. Při použití vyššího aplikovaného proudu byla pozorována nižší citlivost detekce DNA. Zejména u nižších koncentrací DNA pík H (u příliš vysokých proudů vůbec nevznikal). Zjistili jsme, že pro koncentrace $< 10 \mu\text{g/ml}$ DNA je vhodný proud kolem 10 μA . Tyto koncentrace DNA očekáváme ve vzorcích zvířat, proto jsme dále měřili s proudem 10 μA .



Obr. 5 Změny signálu píku H při různých aplikovaných prouděch při časech měření 360 s (A) a 180 s (B)

ad 2) Druhým faktorem ovlivňujícím výsledný signál byla délka trvání analýzy. Při příliš krátkém čase měření byla změna potenciálu v čase tak malá, že po následné derivaci signálu nebyl získán pík. Vytvořili jsme závislost výšky signálu píku H na době trvání analýzy. Měření probíhala při 15 μA na vzorcích o koncentraci 5 a 10 $\mu\text{g/ml}$ DNA (Obr. 5). Měření probíhala při trvání analýzy 120, 180, 240, 300 a 360 s. Zjistili jsme, že minimální čas pro vyhodnotitelný signál katalytické reakce, tedy řádné vykreslení píku, je 180 s či 240 s. Při prodlužování času analýzy se sice dále zvyšoval signál DNA, nicméně jsme již nepozorovali žádné zlepšení v citlivosti. Navíc docházelo k prodloužení doby nutné ke změření jednoho vzorku.

ad 3) Třetím faktorem ovlivňujícím výsledek je koncentrace DNA. Obecně platí, že zachováme-li pro všechna měření stejný proud a čas. Pro pochopení chování signálu píku H byla provedena analýza signálů píku H DNA ($I = 10 \mu\text{A}$, $t = 180 \text{ s}$). Vzorky (pro koncentrace 1–10 $\mu\text{g/ml}$ DNA) byly měřeny v prostředí McIlvaina pufru (2 ml). Závislost výšky signálu na koncentraci se byla lineární ($y = 139,01x + 2085,49$).



Obr. 6 Závislost výšky signálu piku H na koncentraci DNA v analytu

Zjistili jsme, že CPSA se ukázala být vhodnou metodou pro prokázání přítomnosti DNA v elektrolytu, neboť reakce vytvářející pík H začíná i při velice nízkých koncentracích DNA v analytu ($1,5 \times 10^6$ GE ASFV/µl izolované nukleové kyseliny). Při použití techniky adsorpčního přenosu v kombinaci s CPSA jsme byli schopni dosáhnout detekčního limitu 20 fmol v 10 µl vzorku (Obr. 6).

3.2.1 Izolace virové DNA

Před vlastním měřením je nutné provést izolaci virové DNA z analyzovaných vzorků. K tomuto účelu lze využít standardní operační postupy (SOP), které jsou uvedeny na webových stránkách evropské referenční laboratoře pro africký mor prasat (<https://asf-referencelab.info/asf/en/procedures-diagnosis/sops>). Pro vzorky masa a masných výrobků lze využít metodu izolace DNA ASFV v maticích masa a masných výrobků [17], k analýze zeminy metodického postupu analýzy vzorků zeminy na přítomnost DNA ASFV [18].

3.2.2 Zachycení DNA na povrch nanočástic

Byla zkoumána úspěšnost vazby při různých podmínkách. Za účelem urychlení modifikace jsme se zabývali dobou nutnou pro modifikaci částic. Byly sledovány různé doby interakce (30, 60, 120, 180, 300 s) při relativně vysoké koncentraci 10 µg/ml. Signál DNA byl patrný již při době modifikace elektrody 60 s. Pro zvýšení citlivosti i při řádově nižších koncentracích byla metoda optimalizována při delších časech interakce DNA s částicemi (5, 15, 30 a 60 min). Uvolnění DNA z promytých částic do 50 µl McIlvainnova pufru (kyselina citronová; Na₂HPO₄; pH 5,9; 0,2 M) probíhalo pomocí tepla za teploty 100 °C. Byly zkoumány různé parametry: délka třepání (5, 15, 30 a 60 min) a otáčky (350 rpm a 1000 rpm). Pro izolaci DNA byl na základě optimalizačních měření stanoven tento postup: podle standardního operačního postupu byly připraveny Au-SPIONs jako povrch pro izolaci DNA. 5 mg Au-SPIONs bylo v prostředí

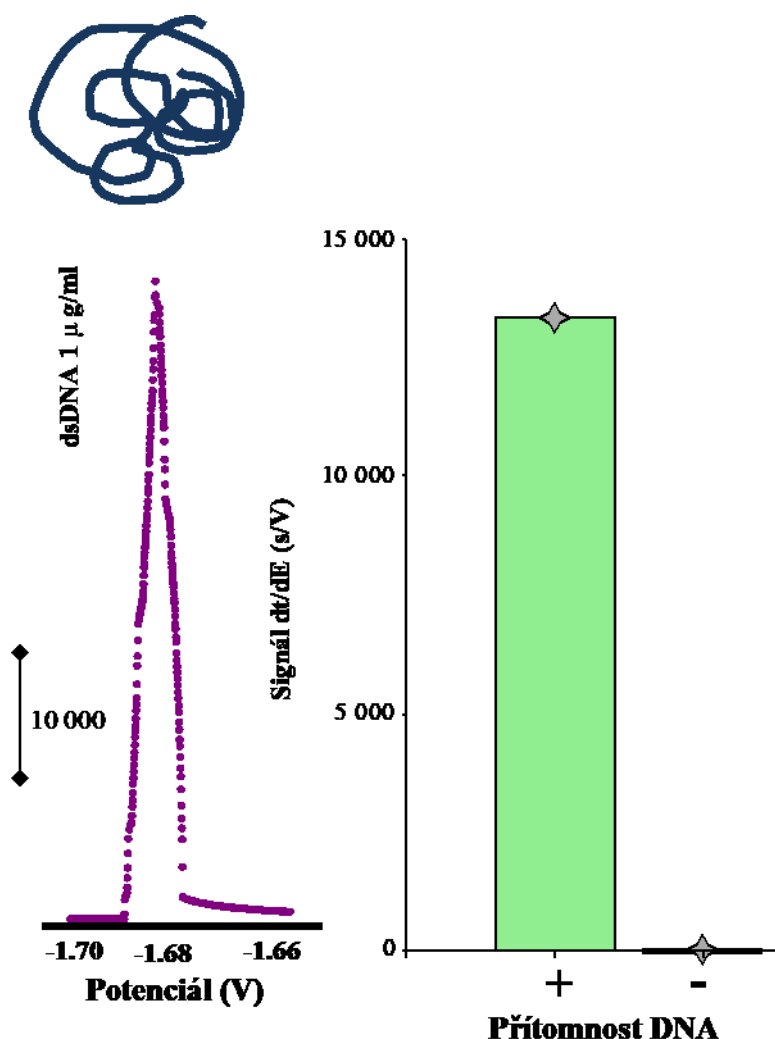
fosfátového pufru (NaH_2PO_4 ; NaCl ; pH 7; 0,15 M) ponořeno do ultrazvukové lázně (45 kHz; 25 °C) na dobu 20 min. Tím došlo k modifikaci Au-SPIONs Na^+ kationty. Díky tomu na ně mohla být navázána DNA. K vazbě DNA docházelo při stálém míchání 0,5 mg Au-SPION v 500 μl vzorku po dobu 30 minut při laboratorní teplotě. Po navázání DNA byly vzorky 3x promyty fosfátovým pufrům – směs částic a pufru byla umístěna na třepačku (300 rpm, 90 s, 25 °C), následně byly částice zachyceny pomocí magnetu a pufr s případnými nečistotami se odsál. DNA z promytých částic byla tepelně uvolněna, při teplotě 100 °C byly vzorky třepány při 350 rpm po dobu 15 min. Při navýšení otáček nedocházelo k urychlení uvolňování.

3.2.3 Limit detekce vybrané metody izolace DNA ze vzorků

Pro určení LOD (limit of detection; limit detekce) a LOQ (limit of quantification; limit kvantifikace) virové DNA byla připravena řada koncentrací ($n = 10$). Každý vzorek byl měřen v opakováních ($n = 5$) při proudech 15, 10 a 5 μA v čase měření 180 s. Vzorek byl vždy akumulován z 5 μl . Statistická analýza výpočtu LOD byla provedena metodou ISO. Při optimalizovaných parametrech CPSA – trvání analýzy 140 s a proudu 10 μA jsme dosahovali LOD ($1,5 \times 10^6$ GE ASFV/ μl izolované nukleové kyseliny).

3.2.4 Přítomnosti DNA ASFV ve vzorku

Spolehlivě (tj. ve 100 % případech) bylo možné odlišit kontrolní (negativní a pozitivní) vzorky. Pro stanovení přítomnosti DNA ASFV ve vzorku se tedy tato metoda jeví jako spolehlivá. Metoda nepracuje s amplifikací nukleové kyseliny, která vyžaduje vybavenou laboratoř. Dále díky využití elektrochemické detekce je při dalším vývoji možno použít tištěných elektrod, čímž by vznikl senzor. Díky eliminaci amplifikace nukleové kyseliny výrazně zkrátí výsledný čas nutný pro detekci (Obr. 7).



Obr. 7 Typický CPSA signál (pík H) dsDNA (1 µg/ml), základní elektrolyt (černá čára) při čase měření 120 s. Byl testován CPSA pík H v přítomnosti a nepřítomnosti dsDNA ($n = 10$).

4. Srovnání novosti postupů

V současnosti se k detekci přítomnosti virové nukleové kyseliny používá zejména PCR detekce. Kromě toho existují i jiné testy (lateral flow assay), které jsou výrazně rychlejší a méně náročné na zázemí, dosahují však horších detekčních limitů.

5. Uplatnění funkčního vzorku

Dle současných protiepidemických opatření, pokud je v chovu prasat domácích prokázána přítomnost ASFV, je nařízena okamžitá, radikální likvidace celého chovu. V případě prasete divokého je řízen jejich zvýšený odstřel. Obzvláště u prasete divokého hrozí šíření nákazy prostřednictvím kadáverů a jimi kontaminovaným prostředím. Námi předložený metodický postup nabízí citlivou a rychlou metodu analýzy vzorků na přítomnost DNA ASFV. Časová náročnost provedení námi navrženého postupu analýzy DNA je v řádu několika minut.

6. Ekonomické aspekty

Ekonomické aspekty nelze u současné podoby navržené metodiky přesně odhadnout. Při jejím správném použití představuje značný přínos pro hodnocení epidemiologické situace u divoce žijících zvířat. Cena analýzy při kalkulaci provedeného výzkumu a vývoje metody by se pohybovala pro analýzu jednoho vzorku kolem 250 CZK. Samozřejmě tato kalkulovaná částka se odvíjí od počtu provedených analýz a od procesu další automatizace a robotizace případné analýzy. Do nákladů nejsou zahrnuty hardware a lidské zdroje.

Poděkování

Funkční vzorek byl vytvořen v rámci řešení projektu Ministerstva zemědělství QK1920113 v rámci Programu aplikovaného výzkumu MZe na období 2017–2025 ZEMĚ.

7. Použitá literatura

1. Banas D, Aksu DA, Noguera MV, Pay M, Hosnedlova B, Kizek R: **Electrochemical Study of Quantum Dots-Labeled Oligonucleotide Probes for Detecting Nucleic Acid of African Swine Fever Virus**. *Chemicke Listy* 2020, **114**(11):778-783.
2. Blome S, Gabriel C, Beer M: **Pathogenesis of African swine fever in domestic pigs and European wild boar**. *Virus Research* 2013, **173**(1):122-130.
3. Gallardo C, Sanchez EG, Perez-Nunez D, Nogal M, de Leon P, Carrascosa AL, Nieto R, Soler A, Arias ML, Revilla Y: **African swine fever virus (ASFV) protection mediated by NH/P68 and NH/P68 recombinant live-attenuated viruses**. *Vaccine* 2018, **36**(19):2694-2704.
4. Alonso C, Borca M, Dixon L, Revilla Y, Rodriguez F, Escribano JM, Consortium IR: **ICTV Virus Taxonomy Profile: Asfarviridae**. *Journal of General Virology* 2018, **99**(5):613-614.
5. Krzyzankova M, Krasna M, Bena M, Vasickova P: **Virus afrického moru prasat a možnosti jeho šíření masem a masnými výrobky**. *Maso* 2020(1):32-38.
6. Anonymous: **African Swine Fever (ASF) Report N°47: 2016 – 2020** *World Organisation for Animal Health* 2020:<https://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/information-on-aquatic-and-terrestrial-animal-diseases/african-swine-fever/reports-on-asf/>.
7. Anonymous: **Fakta o AMP - Africký mor prasat** 2020: <http://www.africkymorprasat.cz/fakta-o-amp>.
8. Rychly O: **Detekce viru afrického moru prasat pomocí supermagnetických nanočástic** *SOČ* 2021, <https://socv2.nidv.cz/archiv43/getWork/hash/7766ca09-51c6-11eb-acaf-005056bd6e49:1-45>.
9. Banas D, Rychly O, Salmistrato S, Kryzankova M, Kizek R: **AdTSV DPV Derermination of Interaction Between CdTe Quantum Dots and Oligonucleotides Specific for the African Swine Fever Virus**. *XX Workshop of Biophysical Chemists and Electrochemists* 2020:41-41.
10. Rychly O, Hosnedlova B, Svorc L, Kizek R: **Elektrochemická studie nukleových kyselin pro detekci viru afrického moru prasat pomocí potenciometrické rozpouštěcí analýzy**. *22 celoslovenská študentská vedecká konferencia 2020 - Chémia a technológia pre život* 2020:369-370.

11. Rychly O, Banas D, Salmistrato S, Kryzankova M, Hosnedlova B, Novotna A, Nedecky-Ruttkey B, Kralik P, Kizek R: **Zelenou syntézou připravené superparamagnetické nanočástice pro detekci viru Afrického moru prasat.** *XXIX konference mladých mikrobiologů Tomáškovy dny 2020* 2020:49-49.
12. Rychly O, Hosnedlova B, Parikesit AA, Hoai NG, Kepinska M, Kizek R: **Gold Magnetic Nanoparticles for Nucleic Acid Capture and Their Applications for the Detection of the African Swine Fever Virus.** *PortASAP Meeting – Book of Abstracts 2021, 10-11 February 2021*:41-42.
13. Palecek E: **NEW TRENDS IN ELECTROCHEMICAL ANALYSIS OF NUCLEIC-ACIDS.** *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 1988, **20**(1-3):179-194.
14. Palecek E, Fojta M, Jelen F, Vetterl V: **Electrochemical Analysis of NucleicAcids** *Encyclopedia of Electrochemistry* 2007:365-427.
15. Palecek E, Postbieglova I: **ADSORPTIVE STRIPPING VOLTAMMETRY OF BIOMACROMOLECULES WITH TRANSFER OF THE ADSORBED LAYER.** *Journal of Electroanalytical Chemistry* 1986, **214**(1-2):359-371.
16. Rychly O, Hosnedlova B, Parikesit AA, Hoai NG, Kepinska M, Ruttkey-Nedecky B, Jakubek M, Kizek R: **African Swine Fever Virus Detection Using Supermagnetic Nanoparticles.** *Pracovní setkání biofyzikálních chemiků a elektrochemiků 2021*, **XX**:45-45.
17. Krzyzankova M, Vasickova P: **Metoda izolace a detekce DNA viru afrického moru prasat v matricích masa a masných výrobků.** *Funkcni vzorek 2019*, **5704/2019**:1-13.
18. Krásna M, Vašíčková P: **Metodický postup analýzy vzorků zeminy na přítomnost DNA viru afrického moru prasat.** *Funkční vzorek 2019*, **5703/2019**:1-10.



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