

PROTOTYP

Diagnostický prostředek pro detekci
viru hepatitidy A metodou RT-qPCR
s použitím externí kontroly analýzy

MVDr. Petra Vašíčková, Ph.D.
MVDr. Pavel Mikel

4396
2015

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i. Hudcova 70 62100 BRNO	Druh dokumentace: Popis technického řešení prototypu	Verze: 01 Strana: 1/10 Počet příloh: 0		
Výtisk č.1		Účinnost od: 1. 12. 2015		
Název dokumentace: Diagnostický prostředek pro detekci viru hepatitidy A metodou RT-qPCR s použitím externí kontroly analýzy Popis technického řešení prototypu				
Evidence o převzaté dokumentaci				
Číslo výtisku	Funkce	Jméno	Datum	Podpis
1	vedoucí oddělení	Petr Králík	1.12.2015	
2				
3				
4				
5				
Evidence o seznámení s dokumentací				
	Funkce	Jméno	Datum	Podpis
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
Rozsah působnosti: Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i.	Zpracoval: Petra Vašíčková Pavel Mikel	Vydal: Petra Vašíčková	Schválil: Petr Králík	

Obsah

1. Úvod.....	3
2. Oblast techniky	4
3. Aktuální stav techniky (diagnostiky)	4
4. Popis technického řešení a nároků na ochranu	5
5. Nároky na ochranu	7
6. Vysvětlení nároků na ochranu	7
7. Seznam materiálů.....	8

1. Úvod

Virus hepatitidy A (HAV) je původcem celosvětově rozšířeného onemocnění, virové hepatitidy A. Výskyt infekce vyvolané HAV se mezi zeměmi značně liší, přičemž zvýšená incidence onemocnění je zaznamenána v rozvojových zemích zejména v souvislosti s nedostatečnými hygienickými podmínkami. Dle Evropského úřadu pro bezpečnost potravin (EFSA) je tento virus řazen mezi patogeny způsobující alimentární infekce. Jedná se o neobalený virus, jehož genom je tvořen jedním řetězcem RNA o pozitivní polaritě. Hlavní způsob přenosu HAV je fekálně-orální přenos. Ačkoli k nejčastějšímu šíření infekčních virových částic dochází přímým kontaktem infikovaných osob (klinicky nemocných či asymptomatických přenašečů), kontaminované povrchy různých zařízení (např. kliky, splachovadla toalet, povrchy potravinářských zařízení a nástrojů), potraviny a voda hrají velmi významnou roli v přenosu HAV. Zdrojem kontaminací/infekcí jsou lidé již v inkubační době onemocnění (15 – 50 dní). HAV je přítomen ve stolici už dva týdny před prvními klinickými příznaky a ve stolici může být vylučován více jak týden po ukončení onemocnění. Virus byl také prokázán ve slinách, sekretu z nosohltanu a krvi infikovaných osob, což z těchto tělních tekutin činí také možný zdroj kontaminací.^{1,2}

V současné době je nejvhodnější metodou průkazu HAV reverzně transkripční polymerázová řetězová reakce v reálném čase (RT-qPCR), zejména kvůli její citlivosti, specifitě a možnosti kvantifikace. Proto byl vyvinut diagnostický prostředek, který umožňuje *in vitro* detekci HAV v různých typech matric (voda, potraviny a stěry z prostředí či rukou osob, klinický materiál) a současnou kontrolu celého analytického postupu každého jednoho vyšetřeného vzorku. Tento prostředek, označen jako „HAV triplex RT-qPCR kit“, je unikátní svým složením a jednoduchostí jeho použití. Kit je navržen v souladu s aktuálně platnou legislativou ČR a EU.^{3, 4}

Literatura:

1. Newell, D.G., Koopmans, M., Verhoef, L., Duizer, E., Aidara-Kane, A., Sprong, H., Opsteegh, M., Langelaar, M., Threlfall, J., Scheutz, F., van der Giessen, J., Kruse, H. Food-borne diseases - the challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. *Int J Food Microbiol* 2010;139: S3-15.

2. Koopmans, M., Duizer, E. Foodborne viruses: an emerging problem. *Int J Food Microbiol* 2004; 90: 23-41.
3. ISO/TS 1526-1, 2013, Microbiology of food and animal feed - Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time RT-PCR part 1: Method for quantification. First edition, corrected version 2013-05-01.
4. ISO/TS 1526-2, 2013, Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time RT-PCR part 2: Method for qualitative detection. First edition, corrected version 2013-05-01.

2. Oblast techniky

Produkt je zaměřen na diagnostiku v oblasti bezpečnosti potravin a humánní medicíny.

3. Aktuální stav techniky (diagnostiky)

Vzhledem k tomu, že HAV je problematicky kultivovatelný na buněčných kulturách, průkaz tohoto viru je založen na molekulárně genetických (tzn. na přímé detekci genomu viru) nebo ELISA metodách. Na současném trhu existuje řada komerčních produktů sloužících právě v zdravotnické diagnostice (tzn. k průkazu HAV v klinickém materiálu). Průkaz virů v potravinách či prostředí je oproti klinickým vzorkům časově i metodicky náročnější. Vzhledem ke stálému metodickému zlepšování existuje celá řada postupů sloužících k analýze vzorků potravin či prostředí; v několika případech mají různá pracoviště zavedeny vlastní diagnostické metody (tzv. „home-made“). Účinnost těchto metod může být různá a výsledky tak nesrovnatelné. Proto Evropská komise uveřejnila standardizované laboratorní metody k průkazu a případně kvantifikaci HAV v potravinách (drobné ovoce, zelenina a balená pitná voda) a stěrech z prostředí (ISO /TS 15216-1 a ISO /TS 15216-2). Dle této metodiky k průkazu HAV je vhodné použít metodu RT-qPCR, v rámci které jsou využity specifické oligonukleotidy (primery a sonda) cílené pouze na jednu konzervativní oblast genomu HAV (5' nekódující oblast (NCR; v rozsahu 68 až 260 nt izolátu HAV HM174), čímž může být snížena pravděpodobnost průkazu rozdílných kmenů HAV. Zároveň tato ISO metodika požaduje použití kontroly celého analytického postupu (tzv. externí kontrolu analýzy) v případě sledování potravin či prostředí, u klinických vzorků je tato kontrola pouze doporučena.

V současné době žádná ze společností nabízející komerčně dostupné soupravy k průkazu HAV nenabízí komplexní a zároveň vhodné řešení pro řádnou analýzu potravinových matric a vzorků prostředí, s výjimkou firmy CEERAM S.A.S. (Francie, do ČR dodávané firmou Life Technologies Česká republika s.r.o.). Tato firma nabízí soupravu pro průkaz HAV, přičemž primery a sonda použité v rámci této soupravy jsou cíleny pouze na jednu konzervativní oblast genomu HAV. Cena soupravy pro průkaz HAV je 18 630 Kč bez DPH/48 reakcí. Kontrola celého analytického postupu (zejména izolace nukleových kyselin) je zajišťována další soupravou Kit mengovirus@ceeramTools™, tato souprava sloužící ke kontrole izolace nukleových kyselin je prodávána za 19 410 Kč bez DPH/50 reakcí. Tzn. analýza jednoho vzorku na přítomnost HAV a současná kontrola izolace nukleových kyselin je ceněna na 2 328 Kč bez DPH (analýza je dle požadavků ISO metod prováděna v duplikátu s neřaděným a 10× nařaděnou nukleovou kyselinou, cena je bez započítání izolace nukleových kyselin a negativních kontrol). Firma CEERAM S.A.S. nabízí také kvantifikační standardy pro HAV v ceně 6 740 Kč, čímž je (v případě potřeby kvantifikace) cena analýzy jednoho vzorku ještě navýšena.

4. Popis technického řešení a nároků na ochranu

Technické řešení k průkazu HAV využívá metodu RT-qPCR, která v jedné reakci umožní analýzu vzorku na přítomnost RNA HAV (detekce dvou rozdílných oblastí genomu HAV, čímž je zvýšena pravděpodobnost záchytu viru) a zároveň kontrolu celého analytického postupu. Jedná se tedy o triplex RT-qPCR. Specifické oligonukleotidy (primery a sondy) cílené na první konzervativní oblast genomu HAV jsou použity dle ISO/TS 1526-1, 2013 a ISO/TS 1526-2, 2013. Druhou cílovou oblastí genomu HAV je konzervativní oblast v rozmezí 346 až 481 nt; primery a sonda byly navrženy dle publikace Jothikumar et al. 2005 s drobnými modifikacemi. Jako externí kontrola jednotlivých kroků analýzy u každého vzorku je použit defektní bakteriofág MS2. Tento přístup, tzn. použití přesně definovaného množství externí kontroly ve spojení s RT-qPCR, umožňuje nejen kontrolu analytického postupu, ale také přesnější kvantifikaci virové nálože v každém jenom analyzovaném vzorku. Metoda je specifikována jedinečnými parametry, které umožňují její použití v oblasti bezpečnosti potravin i humánní medicíny. Zvolené řešení je unikátní v následujících položkách:

Průkazu dvou rozdílných oblastí genomu HAV v rámci jedné reakce

- Průkaz dvou rozdílných oblastí genomu HAV zvyšuje pravděpodobnost zachytu různých kmenů HAV.
- První cílová oblast genomu HAV: 5' nekódující oblast (NCR; v rozsahu 68 až 260 nt izolátu HAV HM174; ISO /TS 15216-1 a ISO /TS 15216-2).
- Druhá cílová oblast genomu HAV: 5' nekódující oblast (NCR; v rozsahu 346 až 481 nt izolátu HAV HM174; s drobnými modifikacemi dle Jothikumar et al. 2005).

Externí kontrola postupu analýzy vzorku

- Externí kontrola celého postupu analýzy vzorků na přítomnost HAV je složena ze specifických sekvencí dvou vyhynulých živočišných druhů; vakovlka tasvánského (*Thylacinus cynocephalus*) a ptáka moa (*Dinornis struthoides*). Specifická sekvence je začleněna do genomu bakteriofága MS2 a obalena jeho proteiny. Připravený konstrukt je zcela arteficiální, proto defektní částice MS2 je možné použít k umělé kontaminaci každého typu vzorku.
- Pro účely zajištění sensitivity a specifcity procesu detekce externí kontroly byly navrženy a testovány specifické unikátní sekvence nukleových kyselin (viz Seznam materiálu; tzv. Primery a Sondy, které jsou součástí reakčních směsí)
- Externí kontrola je stabilní až 12 měsíců při teplotě -20°C.

Složení diagnostického produktu „HAV RT-qPCR kit“ a jeho uživatelské vlastnosti

- Reakčních směsí pro reverzní transkripci (tzv. RT1, RT2 a RT3) obsahují veškeré reakční složky nezbytné pro průběh reverzní transkripce: enzym reverzní transkriptázu, RNase inhibitor, deoxyribonukleotidy (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), reakční pufr a směs potřebných oligonukleotidů (úseků nukleové kyseliny - tzv. primerů). Směs specifických oligonukleotidů zajistí analýzu vzorku na přítomnost RNA HAV a zároveň kontrolu celého analytického postupu v rámci jedné RT-qPCR reakce.
- Reakční směs (tzv. qPCR) v jedné zkumavce obsahuje veškeré reakční složky nezbytné pro průběh PCR. Tyto složky jsou: enzym polymeráza, deoxyribonukleotidy (dATP, dCTP, dGTP, dUTP), reakční pufr s optimalizovaným množstvím iontů hořčíku (Mg^{2+}), enzym Uracil-DNA Glycosylase, směs všech potřebných oligonukleotidů (úseků nukleové kyseliny - tzv. primerů a fluorescenčních sond). Směs

specifických oligonukleotidů zajistí analýzu vzorku na přítomnost RNA HAV a zároveň kontrolu celého analytického postupu v rámci jedné RT-qPCR reakce.

- Produkt dále kromě shora popsaných reakčních směsí obsahuje zkumavku "pozitivní kontrola", kterou je možno použít jako pozitivní kontrolu reakcí a v případě potřeby kvantifikace HAV jako koncentrační gradient. Produkt zahrnuje také příbalovou informaci o použití diagnostické soupravy (včetně návodu k výpočtu virové nálože ve vzorku).
- Práce s produktem u uživatele spočívá pouze v odebrání potřebného předepsaného množství „reakční směsi“ a přidání vzorku nebo „pozitivní kontroly/kvantifikačního standardu“.
- Produkt je v popsaném složení stabilní až 12 měsíců při teplotě -20°C.

5. Nároky na ochranu

- 1) Sekvence nukleotidů cílových úseků externí kontroly analytického postupu nebo jejich části, použité jako primery (rozpoznávací sekvence pro metodu RT-qPCR) anebo jako sonda (sekvence nukleových kyselin zajišťující specifitu detekce) uvedené ve směru 5'-3': CGC TTC CGT CAA ACC CCT AA, GGT TTA GAA TGT TTT CTC CCG T, TGC TAA TGT GGT GAT TGC GTG TG.
- 2) Složení reakčních směsí, tzv. RT1 a qPCR, které obsahují minimálně tyto reakční složky nezbytné pro průběh RT-qPCR: enzymy reverzní transkriptáza a polymeráza, deoxyribonukleotidy (dATP, dTTP, dCTP, dGTP, dUTP), reakční pufr, enzym Uracil-DNA Glycosylase, RNase inhibitor, směs specifických oligonukleotidů (úseků nukleové kyseliny - tzv. primerů a fluorescenčních sond).

6. Vysvětlení nároků na ochranu

Ad1) Jedná se o unikátní sekvence, které dosud nebyly použity, byly originálně navrženy a testovány v laboratořích Výzkumného ústavu veterinárního lékařství, v. v. i.. S jejich pomocí je možné metodou RT-qPCR a s použitím externí kontroly zjistit zda analýza každého jednoho vzorku proběhla řádně. Použití přesně definovaného množství externí kontroly ve spojení s RT-qPCR umožňuje přesnější stanovení množství (kvantifikaci) virových částic

(resp. jejich genomů) v každém jednom analyzovaném vzorku. Sekvence externí kontroly analytického postupu je naprosto jedinečná, proto připravený konstrukt (defektní bakteriofág MS2) je možné použít k umělé kontaminaci jakéhokoli matrice (potravina, prostředí, klinický materiál). Tzn. metodika je použitelná pro diagnostiku v rámci bezpečnosti potravin i humánní medicíny. Přesné určení sekvencí externí kontroly je podmínkou správné a přesné hybridizace nukleových kyselin ve vyšetřovaném vzorku s navrženými krátkými sekvencemi DNA (primery, sonda); tyto specifické oligonukleotidy se tak váží výhradně na nukleovou kyselinu externí kontroly. Předmětem ochrany tedy mají být právě uvedené sekvence nukleotidů, které jsou použity v tomto diagnostickém prostředku: CGC TTC CGT CAA ACC CCT AA, GGT TTA GAA TGT TTT CTC CCG T, TGC TAA TGT GGT GAT TGC GTG TG.

Specifickým znakem nároku na ochranu je: kterákoliv z uvedených sekvencí nukleové kyseliny, pokud je obsažena v diagnostickém prostředku pro *in vitro* diagnostiku.

Ad2) Složení reakční směsi je pro metodu RT-qPCR typické a obecně známé. V navrženém nároku na ochranu je požadována ochrana reakčních směsí, které obsahují všechny uvedené složky najednou: RT1 (dATP, dTTP, dCTP, dGTP, specifické oligonukleotidy), qPCR (enzym polymeráza, dATP, dCTP, dGTP, dUTP, reakční pufr, enzym Uracil-DNA Glycosylase, směs specifických oligonukleotidů tzv. primerů a fluorescenčních sond). Součástí diagnostického prostředku jsou také zkumavky s reakční směsí RT2 a RT3, zkumavka s pozitivní kontrolou a externí kontrolou. Výhodou pro zákazníka je jednoduché použití, kdy k provedení detekce postačí do zkumavky odebrat daný objem reakční směsi a přidat izolát nukleové kyseliny ze vzorku. Další z výhod je možnost analýzy vzorku na přítomnost HAV a současně ověřit řádnost celého analytického postupu v rámci jedné RT-qPCR reakce.

Specifickým znakem nároku na ochranu je: dvě zkumavky obsahující minimálně shora uvedené reakční složky, pokud je obsažena v diagnostickém prostředku pro *in vitro* diagnostiku.

7. Seznam materiálu obsaženém v diagnostické soupravě

HAV PK	defektní částice bakteriofága MS2 se začleněným úsekem genomu HAV (pozitivní kontrola, případně kvantifikační gradient)
ExK	externí kontrola analytického postupu, defektní bakteriofág MS2 se artificiální sekvencí (vakovlk tasnímský, pták moa), která je začleněna do jeho genomu (v případě kvantifikace slouží jako kalibrační kontrola)
DDW	RNase-free water

RT reakční směsi (RT1 obsahuje: voda, deoxyribonukleotidy, specifické oligonukleotidy; RT2 obsahuje: enzym reverzní transkriptáza, RNase inhibitor; RT3 obsahuje: pufr, voda).
Poznámka: složení RT2 a RT3 není předmětem nároku na ochranu.

qPCR reakční směs (obsahuje: voda, deoxyribonukleotidy, pufr, polymerázu, specifické oligonukleotidy, ale neobsahuje nukleové kyseliny).

Primery a sondy (krátké úseky nukleové kyseliny, vyznačující se unikátní sekvencí za sebou řazených nukleotidů; zajišťují sensitivitu a specifitu detekce):

Sekvence primerů a sond specifických pro externí kontrolu analytického postupu

Oligo	Sekvence	Délka
Primer Vako-moaF	5'- CGC TTC CGT CAA ACC CCT AA-3'	20 nt
Primer Vako-moaR	5'- GGT TTA GAA TGT TTT CTC CCG T-3'	22 nt
Sonda Vako-moa P2	5'- Cy5- TGC TAA TGT GGT GAT TGC GTG TG-BHQ1-3'	23 nt

Sekvence primerů a sond specifických pro HAV (dle ISO/TS 1526-1, 2013 a s drobnými modifikacemi dle Jothikumar et al., 2005)

Oligo	Sekvence	Délka
HAV68	5'-TCA CCG CCG TTT GCC TAG-3'	18 nt
HAV240	5'-GGA GAG CCC TGG AAG AAA G-3'	19 nt
HAV150(-)	5'-FAM-CCT GAA CCT GCA GGA ATT AA-MGB-NFQ-3'	20 nt
HAV-JVF	5'-GGT AGG CTA CGG GTG AAA C-3'	19 nt
HAV-JVR	5'-AYC AAC TCA CCA ATA TCC GC-3'	20 nt
HAV-JVP	5'-HEX-CTT ARG CTA RTA CTT CTA TGA AGA GAT GC-3'	29 nt

Vývoj prototypu detekční soupravy probíhal v rámci řešení projektu Ministerstva zemědělství QJ1210113 a projektu Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy NPU LO1218



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