

Vytvořil:  
SÚJCHBO, v.v.i.

Certifikovaná metodika

Označení metodiky:  
B2/MOLB/062

**Průkaz přítomnosti genetického materiálu viru Seoul pro potřeby kontroly  
zákazu biologických zbraní pomocí real time PCR s „UPL sondou“**

**Mgr. Kateřina Rosenbergová, Ph.D.**  
**prom. biol. Oldřich Kubíček, CSc.**

Realizační výstup projektu MV ČR „Výzkum moderních metod detekce a identifikace nebezpečných CBRN látek a materiálů, metod snížení jejich nebezpečnosti a dekontaminace; výzkum moderních prostředků ochrany osob a prvků kritické infrastruktury“ číslo VF20112015013“.

Oponenti: doc. RNDr. Daniel Růžek, Ph.D.  
RNDr. Hana Kubátová, Ph.D.

říjen 2015

## Obsah

1. CÍL METODIKY .....	3
2. VLASTNÍ POPIS METODIKY .....	3
2.1 Charakteristika viru Seoul .....	3
2.2 Laboratorní diagnostika viru Seoul .....	4
2.3 Vlastní metoda.....	4
2.3.1 Referenční vzorek .....	5
2.3.2 Extrakce RNA z testovaného materiálu .....	5
2.3.3 Polymerázová řetězová reakce .....	5
2.3.4 Pracovní postup a opatření pro manipulaci s materiálem a kitem.....	6
2.3.5 Vyhodnocení analýzy .....	8
2.3.6 Kontrola specificity .....	9
2.3.7 Validace reakce .....	11
3. INOVAČNÍ ASPEKTY, NOVOST POSTUPŮ.....	12
4. POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY.....	12
5. POUŽITÁ LITERATURA .....	13

## 1. CÍL METODIKY

Cílem metodiky je poskytnout inspektorům Státního úřadu pro jadernou bezpečnost (SÚJB) vhodnou metodu pro průkaz přítomnosti genetického materiálu viru Seoul ve vzorcích získaných při kontrole dodržování zákazu biologických zbraní.

Metodika se cíleně zaměřuje na:

- možnost detekce a identifikace viru Seoul v neznámých terénních vzorcích;
- použitelnost pro široký rozsah terénních vzorků;
- nezávislost detekce na kultivaci cílového organismu;
- rychlou analýzu s jasnou interpretací výsledků pro zaškolený personál;
- možnost ověření pozitivivity reakce sekvenací amplifikačních produktů (v případě nejasných výsledků reakce).

## 2. VLASTNÍ POPIS METODIKY

### 2.1 Charakteristika viru Seoul

Virus Seoul je taxonomicky zařazen do čeledi Bunyviridae, rodu Hantavirus. Jedná se o obalený virus obsahující negativní jednořetězcovou RNA. Genom viru je tvořen třemi segmenty: L segment, kódující virovou RNA-dependentní RNA polymerázu (RdRp), M segment, kódující glykoprotein prekurzor (GPC), štěpící se na povrchové proteiny G1 a G2 a S segment, kódující nukleokapsidový (N) protein (Chandy *et al.*, 2008; Yao *et al.*, 2012).

Virus Seoul je přenášen především hlodavci prostřednictvím aerosolu, tvořícím se z jejich exkrementů (Heyman *et al.*, 2004; Verner-Carlsson *et al.*, 2015). Člověk se nakazí nejčastěji jeho vdechnutím, příp. požitím kontaminované potravy. Inkubační doba se pohybuje kolem dvou týdnů. Přenos viru z člověka na člověka nebyl prozatím popsán. Virus je původcem hemoragické horečky s ledvinovými příznaky (*haemorrhagic fever with renal syndrome – HFRS*) (Kaukinen *et al.*, 2005). HFRS je na počátku prezentováno horečkou a příznaky onemocnění chřipkou. Manifestace hemoragie se projevuje zarudnutím kůže na obličeji, spojivky či sliznic (Krüger *et al.*, 2001). Následně prochází onemocnění fázemi horečky, hypotenze a oligurie (McCaughey and Hart, 2000).

## 2.2 Laboratorní diagnostika viru Seoul

Včasná diagnostika onemocnění je ztížena počátečními nespecifickými příznaky. Nejdůležitější diagnostickými metodami jsou sérologické testy pro průkaz virově-specifických protilátek ve fázi virémie (Papa *et al.*, 1998). Detekce virového antigenu (N antigen) je prováděna pomocí ELISA testu (Zoller *et al.*, 1993), virově specifický IgM je prokazován pomocí  $\mu$ -capture ELISA testu (Krüger *et al.*, 2001). Primární výsledky sérologických testů jsou zpravidla ověřovány metodami molekulární biologie založených na reverzně transkripčních RT-PCR (McCaughey and Hart, 2000). Izolace viru se provádí kultivací na tkáňových kulturách (Vero E6) (African green monkey kidney virus cell line), většinou bez tvorby cytopatického efektu. Přítomnost živého viru se následně detekuje pomocí nepřímé fluorescence (IFA). Kultivaci viru je nutno provádět v biologických laboratořích úrovně 3 (BSL 3).

## 2.3 Vlastní metoda

Metoda pro detekci RNA viru Seoul je založena na průkazu specifické sekvence genu kódujícího nukleokapsidový (N) protein (S segment).

Vlastní detekce přítomnosti RNA viru Seoul je prováděna pomocí metody real-time PCR využívající systém Universal Probe Library (dále jen UPL) fy Roche (Roche Diagnostic, Německo). Pomocí reverzní transkripce je nejprve proveden přepis virové RNA do struktury komplementární DNA (dále jen cDNA z ang. complementary DNA). Pro specifickou detekci přítomnosti virové RNA jsou následně využity specifické primery v kombinaci s UPL sondou. Současně je v reakční směsi i nespecifické interkalační barvivo druhé generace SYTO 61 (Invitrogen, USA). Při reakci je amplifikován fragment o velikosti 105 bp, který obsahuje hybridizační místo pro UPL sondu. Bezprostředně po amplifikační reakci následuje analýza teploty tání PCR produktu, prováděná prostřednictvím SYTO 61. V reakční směsi je přítomna i interní kontrola (dále jen IC) pro vyloučení možné inhibice PCR reakce. Detekce IC je prováděna současně s amplifikací cílového produktu. Metoda je popsána v souladu s minimálními požadavky pro publikace experimentů založených na kvantitativní real-time PCR (Bustin *et al.*, 2009).

### 2.3.1 Referenční vzorek

Jako referenční vzorek sloužil následující kmen:

- **NCPV R22** Porton Down, Salisbury, UK

### 2.3.2 Extrakce RNA z testovaného materiálu

K izolaci virové RNA ze vzorku lze použít komerčně dostupné izolační kity. Metodika byla ověřena s použitím izolačního kitu RTP DNA/RNA Virus Mini Kit (STRATEC Biomedical AG, Německo). Při izolaci DNA postupujeme vždy podle návodu od výrobce. Izolovaná RNA je poté bezprostředně použita do PCR reakce, příp. je uchována při teplotě -80°C.

### 2.3.3 Polymerázová řetězová reakce

Primery a UPL sonda jsou vybrány v sekvenci genu pro nukleokapsidový (N) protein (S segment) (sekvence č. KP645198.1) s využitím genové databáze NCBI a počítačového programu Vector NTI Suite 5,5.

Primery jsou syntetizovány komerčně (např. fy Generi Biotech, East Port, aj.). Sekvence primerů a UPL sondy jsou uvedeny v Tab. I.

Tab. I: Sekvence primerů a UPL sondy pro detekci viru Seoul.

Název primeru/sondy	Cílové sekvence primerů	Velikost cílové sekvence
Seo F	5' - TGGAGCCAAAGGAATTTCAAG -3'	105 bp
Seo R	5' - CCCCAGCAAACACCCATATT -3'	
Sonda UPL # 159	5' [FAM] GATGCTGG [Tamra]3'	

Pro amplifikační reakci je využita komerční souprava *SuperScript® III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq High Fidelity DNA Polymerase* (Invitrogen, USA). Reakční směs obsahuje všechny potřebné komponenty (reversní transkriptázu, Taq DNA polymerázu, pufr s MgCl<sub>2</sub>, dNTP, aditiva) ve vhodných koncentracích, je nutno dodat pouze primery, sondu a templátovou RNA. Mix se dlouhodobě skladuje při -20 °C. Real-time PCR reakce je prováděna v termocykléru Rotor-Gene RG - 3000 (Corbett Research, Australia).

### 2.3.4 Pracovní postup a opatření pro manipulaci s materiálem a kitem

Při pracovních operacích vždy používat ochranné rukavice. Provádět veškeré operace při přípravě PCR mixu ve speciálním (PCR) boxu. Pro každé vyšetření využívat systému pozitivních kontrol (cílová RNA), negativních kontrol tj. jiná než cílová RNA/DNA a NTC (z angl. No Template Control) tj. vzorek bez nukleových kyselin.

- a) Přemístit potřebné roztoky, případně vzorek RNA z mrazicího boxu (cca 10-15 min. před započítím práce) do lednice (pozdvolné rozmražení v temnu), vyhnout se opakovanému rozmrazování, které může vést ke snížené senzitivitě.
- b) Připravit pro detekci potřebné množství PCR mixu (násobky objemu) ve složení ze zásobních roztoků dle Tab. II a vložit roztoky do chladicího stojánku. Zásobní roztoky vrátit zpět do mrazicího boxu nebo lednice.

Tab. II: Složky reakční směsi pro real-time PCR.

Složky reakční směsi	Množství (μl)
PCR voda	1,1
2x Reaction Mix	10
SuperScript® III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq High Fidelity Enzyme Mix	0,4
primer Sn 10 pmol/μl	0,5
primer Asn 10 pmol/μl	0,5
UPL sonda 10 pmol/μl	0,5
SYTO 61	1
UCO Assay HEX	2
UCO Standard (1E4)	1
Vzorek nebo +/- kontrola nebo NTC	3
celkový objem	20

- c) PCR mix promíchat pipetováním. Následně rozpipetovat mix po 17 μl do potřebného množství zkumavek.
- d) Do zkumavek s PCR mixem označených „studovaný vzorek“ přidat 3 μl zkoumané RNA.
- e) Do zkumavky s PCR mixem označené „pozitivní kontrola“ přidat 3 μl RNA referenčního vzorku.
- f) Do zkumavky s PCR mixem označené „negativní kontrola“ přidat 3 μl jiného vzorku (jiného agens než virus Seoul).
- g) Do zkumavky s PCR mixem označené „NTC“ přidat 3 μl PCR vody.

- h) Zkumavky uzavřít víčky (pracovat sterilně) a vložit do přístroje a spustit program uvedený v Tab. III.
- i) Výsledky uložit a zálohovat do patřičného adresáře. Název souboru a cestu k souboru zapsat do protokolu.
- j) Použité laboratorní pomůcky (pipety) ponechat v pracovním boxu pro následnou dekontaminaci, použitý spotřební materiál odložit do plastového boxu a následně likvidovat odpovídajícím způsobem (spalovna).

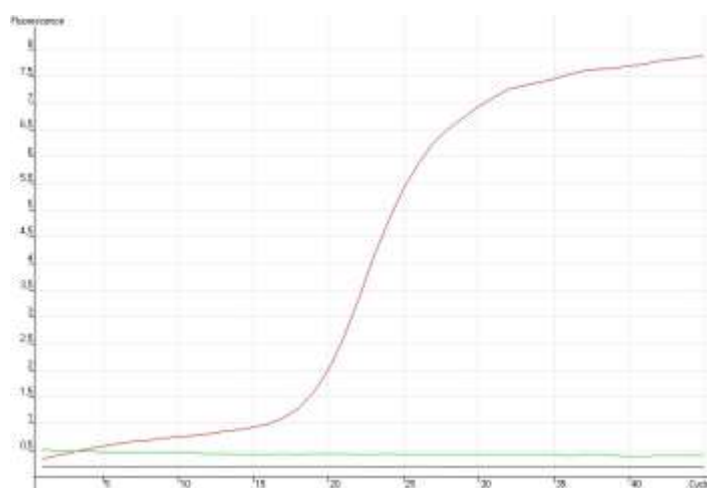
Tab. III: Reakční podmínky pro real-time PCR.

Program		Teplota	Čas	Počet cyklů	Měření fluorescence
reverzní transkripce		50 °C	30 min.	1	
denaturace		95 °C	30 s	1	
amplifikace	denaturace	95 °C	5 s	45	
	annealing	59 °C	30 s		
	extenze	72 °C	35 s		FAM/ Cy5/JOE *
melting křivka (T <sub>m</sub> )		po 0,2 °C	1s	65-95 °C	kontinuálně (Cy5)
chlazení		40 °C	1 min.		

\* nastavení fluorescenčních kanálů: FAM – analýza vzorku, Cy5 – stanovení T<sub>m</sub>, JOE – analýza IC

### 2.3.5 Vyhodnocení analýzy

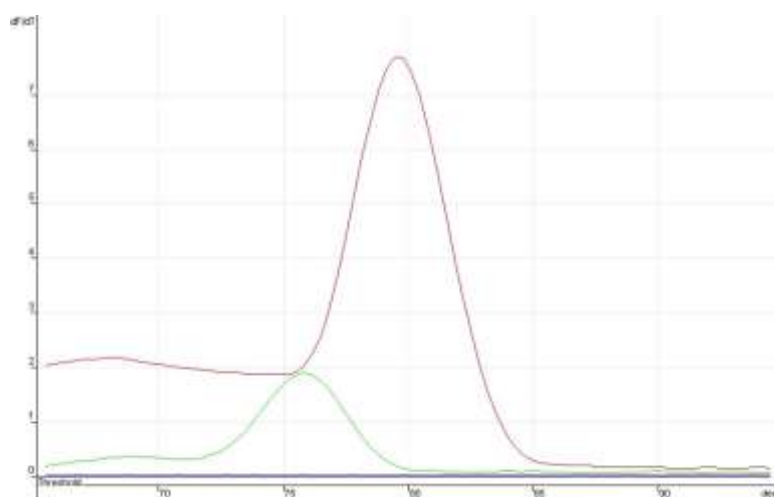
Za průkaz přítomnosti cDNA viru Seoul ve vzorku je považován prokazatelný nárůst fluorescenčního signálu ve fluorescenčním kanálu FAM max. do 30. cyklu amplifikační reakce (Obr. 1),



■ pozitivní kontrola (virus Seoul), resp. pozitivní terénní vzorek  
■ negativní kontrola (ostatní patogeny), resp. negativní terénní vzorek ■ negativní kontrola (voda)

Obr. 1: Nárůst fluorescence při průkazu specifické sekvence N proteinu viru Seoul.

dále pak stanovení  $T_m$  (melting teploty) ve fluorescenčním kanálu Cy5 (Obr. 2). Specifická  $T_m$  pro amplifikovaný fragment je  $79,5 \pm 0,1^\circ\text{C}$ .



■ pozitivní kontrola (virus Seoul), resp. pozitivní terénní vzorek  
■ negativní kontrola (ostatní patogeny), resp. negativní terénní vzorek ■ negativní kontrola (voda)

Obr. 2: Stanovení  $T_m$  amplifikačních produktů (SYTO 61).



Inhibice reakce je vyloučena prokazatelným nárůstem fluorescenčního signálu interní kontroly ve fluorescenčním kanálu JOE, především u negativních vzorků, včetně negativní kontroly. U pozitivních vzorků, resp. pozitivní kontroly nemusí být nárůst fluorescenčního signálu vždy zaznamenán.

### 2.3.6 Kontrola specificity

Specifita výše popsané metody byla ověřována na pozitivní kontrole (virus Seoul), na negativních kontrolách příbuzných virů (Tab. IV) a dále na vybraných nepříbuzných RA a VRA agens (vyjmenovaných ve vyhlášce č. 474/2002 Sb.<sup>1)</sup> (Tab. V). U pozitivní kontroly byla zaznamenána odpovídající nárůst fluorescenčního signálu. Při cross-species ověřování neodhalily testy amplifikaci jiného druhu nebo rodu.

Tab. IV: Seznam virů čeledi *Bunyviridae* testovaných v rámci ověřování specificity metody

\* tučně vyznačena pozitivní kontrola

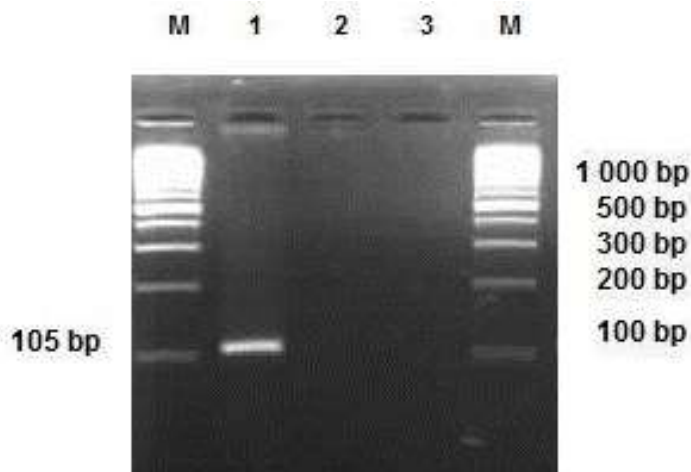
Patogen	Kmen
<b>VRA</b>	
Sin Nombre virus (hantavirus)	NCPV HN107
Rift Valley fever virus (phlebovirus)	NCPV H13/96
Virus Hantaan (hantavirus)	NCPV 76/118
Crimean-Congo virus (nairovirus)	BNI Afg09-2990
Puumala virus (hantavirus)	NCPV 705
<b>RA</b>	
Dobrava - Belgrade virus (hantavirus)	NCPV H119/99
<b>Seoul virus (hantavirus) *</b>	NCPV R22
<b>Ostatní</b>	
Hazara virus (nairovirus)	NCPV 530
Pappataci virus (phlebovirus)	M47
Bhanja virus (phlebovirus)	M22

Tab. V: Seznam nepříbuzných RA a VRA patogenů testovaných v rámci ověřování specifity metody

Patogen	Kmen	Patogen	Kmen
Bovinní adenovirus	V-294	<i>Bacillus anthracis</i>	NCTC 10340T
Virus klíšťové encefalidity	521	<i>Brucella melitensis abortus</i>	CAMP 5520
Virus Chikungunya	NCPV 636	<i>Brucella melitensis (biovar canis)</i>	CNCTC 1/74T
Virus kravských neštovic	Hallauer	<i>Burkholderia mallei</i>	NCTC 10248
Virus newcastleské choroby drůbeže	Komarov	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	NCTC 10274
Virus Powassan	M5	<i>Clostridium botulinum</i>	CAMP 5950T
Virus influenzy drůbeže	Chicken-scot/59	<i>Clostridium tetani</i>	CNCTC 18/50
Virus západní nilské horečky	31124	<i>Coxiella burnetii</i>	SU001
Parvovirus prasat	V-196	<i>Enterobacter cloacae</i>	CCM 1903
Bovinní respirační syncytiální virus	Antanovo 448/82	<i>Escherichia coli</i>	CCM 3954
Virus australské encefalidity	NCPV 506	<i>Francisella tularensis</i>	CAMP 5540T
Virus boviní parainfluenzy 3	R2-V	<i>Kytococcus sedentarius</i>	CCM 2699
Virus Dengue typ 1	NCPV TC 861	<i>Legionella pneumophila</i>	1030
Virus žluté zimnice	NCPV FNT	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CCM 1960T
Virus žluté zimnice	17D	<i>Rickettsia canadensis</i>	VR-610
Virus Hazara	NCPV 530	<i>Rickettsia conori</i>	VR-613
Virus Sindbis	SU014	<i>Rickettsia rickettsii</i>	SU001
Virus Vaccinia	SU016	<i>Salmonella enterica subsp. enterica, ser. typhimurium)</i>	CCM 3808
Virus horečky Kyasanurského lesa	SU028	<i>Salmonella typhi</i>	CNCTC 115/39
Camelpox virus	NCPV 538	<i>Shigella dysenteriae I.</i>	CNCTC 13/41
Virus venezuelské koňské encefalomyelidity	NCPV 690	<i>Shigella sonnei</i>	CCM 4421
Virus encefalidity St.Louis	NCPV 607	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	CCM 2737T
Virus vrtivky	NCPV 212	<i>Vibrio cholerae</i>	CNCTC 71/89
		<i>Xanthomonas campestris</i>	CCM 1069
		<i>Yersinia enterocolitica</i>	CCM 5671
		<i>Yersinia pestis</i>	NCTC 5923T
		<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	CAMP 5666

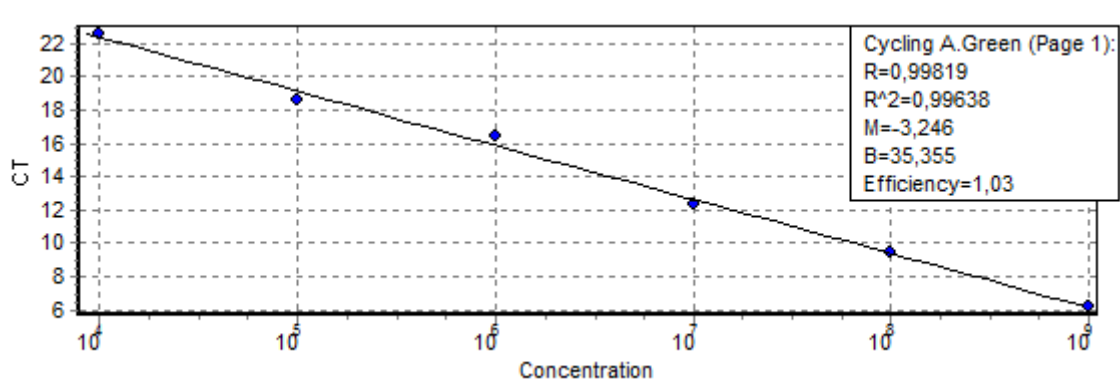
### 2.3.7 Validace reakce

Ověření výsledků (určení specifity amplifikačních produktů) bylo provedeno na gelové elektroforéze, odečtením délky specifického PCR produktu (105 bp) dle molekulového hmotnostního standardu 100 bp DNA Ladder (GeneRuler™ DNA Ladder Mix, Fermentas) (Obr. 3).



Obr. 3: Vyhodnocení specifity amplifikačních produktů pomocí gelové elektroforézy  
Dráhy: 1, pozitivní kontrola (virus Seoul), resp. pozitivní terénní vzorek; 2, negativní kontrola (ostatní patogeny), resp. negativní terénní vzorek; 3, negativní kontrola (dd H<sub>2</sub>O); M, molekulový hmotnostní standard (GeneRuler™ DNA Ladder Mix, Fermentas).

Citlivost reakce byla zjištěna komparací koncentrace vzorku syntetické kontroly analyzovaného genu s izolátem RNA viru Seoul o spektrometricky změřené koncentraci na základě standardní křivky, sestavené z dekadického ředění syntetické kontroly. Citlivost reakce byla zjištěna v koncentračním rozpětí  $1 \times 10^9$  až  $1 \times 10^0$  kopií genu v reakci, koeficient korelace byl větší než 0,99 (Obr. 4).



Obr. 4: Standardní křivka RT-qPCR.

### 3. INOVAČNÍ ASPEKTY, NOVOST POSTUPŮ

Do doby zavedení této metodiky detekce a identifikace sledovaného biologického agens nebyla v Laboratoři biologického monitorování a ochrany (dále jen LBMO) Státního ústavu jaderné, chemické a biologické ochrany, v.v.i. (dále jen SÚJCHBO, v.v.i.) využívána žádná metoda pro detekci viru Seoul. Vzhledem k tomu, že pro detekci tohoto viru, nejsou dostupné komerční sady, bylo rozhodnuto o vývoji a zavedení vlastní metodiky detekce a identifikace viru Seoul do laboratorní praxe LBMO SÚJCHBO, v.v.i.

Pro detekci byly navrženy, optimalizovány a ověřeny dosud nepublikované sekvence primerů, které byly vybírány se snahou zabránit případným falešně pozitivním a negativním výsledkům. Pro zajištění správnosti výsledků byla pro hodnocení reakce zahrnuta kombinace jak specifických primerů, tak fluorescenčně značené UPL sondy. Reakční podmínky pro diagnostický proces jsou navrženy tak, aby bylo možné provádět detekci většího počtu biologických agens uvedených na seznamech příloh vyhlášky č. 474/2002 Sb.<sup>2</sup> současně a tím výrazně zkrátit čas potřebný pro detekci těchto agens.

V porovnání s komerčními soupravami lze u této metody detekce a identifikace viru Seoul provést dodatečnou kontrolu výsledků amplifikace sekvenací amplifikovaných produktů a tím dodatečně ověřit jejich správnost.

### 4. POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY

Metodika byla vyvinuta jako hlavní analytický postup metodicko-odborné podpory laboratoře LBMO SÚJCHBO, v.v.i při plnění úkolů státního dozoru SÚJB v oblasti zákazu biologických zbraní pro zmíněné agens.

Metodika bude využívána pro potřeby dozoru nad dodržováním zákona č. 281/2002 Sb.<sup>1</sup>, konkrétně bude sloužit k průkazu přítomnosti genetického materiálu viru Seoul ve vzorcích získaných při dozorové činnosti pracovníků SÚJB. Lze předpokládat, že by metodika mohla být rovněž využita k detekci a identifikaci viru Seoul pro potřeby integrovaného záchranného systému v případech, kdy existuje podezření na přítomnost uvedeného agens v neznámých vzorcích (biologické tkáně, stěry, tzv. bílé prášky neznámého původu apod.).

---

<sup>1</sup> Zákon o některých opatřeních souvisejících se zákazem bakteriologických (biologických) a toxinových zbraní a o změně živnostenského zákona.

<sup>2</sup> Vyhláška, kterou se provádí zákon č. 281/2002 Sb., o některých opatřeních souvisejících se zákazem bakteriologických (biologických) a toxinových zbraní a o změně živnostenského zákona.

## 5. POUŽITÁ LITERATURA

Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT.(2009): The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem.* 55(4): 611-22.

Heyman P, Plyusnina A, Berny P, Cochez C, Artois M, Zizi M, Pirnay JP, Plyusnin A. (2004): Seoul hantavirus in Europe: first demonstration of the virus genome in wild *Rattus norvegicus* captured in France. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 23(9): 711-7.

Chandy S., Abraham S., Sridharan G. (2008): Hantaviruses: an emerging public health threat in India? *A review. J Biosci.* 33(4): 495-504. Review.

Kaukinen P., Vaheri A., Plyusnin A. (2005): Hantavirus nucleocapsid protein: a multifunctional molecule with both housekeeping and ambassadorial duties. *Arch Virol.* 150(9): 1693-1713 Review.

Krüger D.H., Ulrich R., Lundkvist A. A. (2001): Hantavirus infections and their prevention. *Microbes Infect.* 3(13): 1129-1144. Review.

Macneil A., Nichol ST., Spiropoulou CF. (2011): Hantavirus pulmonary syndrome. *Virus Res.* 162(1-2): 138-147. Review.

McCaughey C., Hart C.A. (2000): Hantaviruses. *J Med Microbiol.* 49(7): 587-599.

Papa A., Johnson A.M., Stockton P.C., Bowen M.D., Spiropoulou C.F., Alexiou-Daniel S., Ksiazek TG, Nichol ST, Antoniadis A. (1998): Retrospective serological and genetic study of the distribution of hantaviruses in Greece. *J Med Virol* 55(4): 321-327.

Verner-Carlsson J, Löhmus M, Sundström K, Strand TM, Verkerk M, Reusken C, Yoshimatsu K, Arikawa J, van de Goot F, Lundkvist Å (2015): First evidence of Seoul hantavirus in the wild rat population in the Netherlands. *Infect Ecol Epidemiol.* 6;5: 27215.

Yao LS, Qin CF, Pu Y, Zhang XL, Liu YX, Liu Y, Cao XM, Deng YQ, Wang J, Hu KX, Xu BL. (2012): Complete genome sequence of Seoul virus isolated from *Rattus norvegicus* in the Democratic People's Republic of Korea. *J Virol.* 86(24): 13853

Zöller L., Yang S., Gött P., Bautz E.K., Darai G. (1993): Use of recombinant nucleocapsid proteins of the Hantaan and nephropathia epidemica serotypes of Hantaviruses as immunodiagnostic antigens. *J Med Virol.* 39(3): 200-207.