

Wykorzystanie RT-PCR i Real-Time PCR jako metod uzupełniających rutynową diagnostykę wścieklizny

Barbara Mucha, Anna Rymer-Zamecka

z Zakładu Higieny Weterynaryjnej Wojewódzkiego Inspektoratu Weterynarii w Katowicach

W Polsce wirus wścieklizny występuje w dwóch, jak do tej pory wykazano, genotypach: genotypu 1, wywołującego chorobę u ssaków lądowych, oraz genotypu 5, występującego u nietoperzy (European bat *Lyssavirus* 1 - EBLV-1). W rutynowej diagnostyce wścieklizny zalecany i stosowany jest test immunofluorescencji bezpośredniej oraz izolacja wirusa wścieklizny na myszach lub w hodowli komórek nerwiaka mysiego (neuroblastomy; 1,2,3). Metody te mają jednak ograniczoną czułość, wynikającą z możliwości rozkładu gnilnego tkanek w próbce lub przesyłania do badania niekompletnej tkanki mózgowej. Celem podjętych badań było opracowanie oraz próba zastosowania najtańszej i możliwie najczulszej metody PCR, która mogłaby uzupełnić rutynową diagnostykę wścieklizny.

Material i metody

Do badań użyto niestosowany dotychczas w diagnostyce zakażeń wirusem wścieklizny zestaw odczynników składający się z zestawu do izolacji RNA – Total RNA produkcji A&A Biotechnology, Gdynia; do odwrotnej transkrypcji i pierwszej reakcji PCR – Transcriptor One-Step RT-PCR Kit, produkcji firmy Roche Diagnostics GmbH; i do reakcji real time PCR – Real Time 2xPCR Master Mix SYBR[®], produkcji A&A Biotechnology, Gdynia.

Przy opracowywaniu i optymalizacji metody użyto 100 próbek tkanki mózgowej zwierząt nadesłanych do rutynowego badania w związku z pokąsaniem ludzi, homogenizaty tkanki mózgowej otrzymane z Zakładu Wirusologii Państwowego Instytutu Weterynaryjnego w Puławach do badań międzylaboratoryjnych testu immunofluorescencji bezpośredniej z lat 2007–2008 oraz 10 próbek archiwalnych pochodzących od różnych gatunków zwierząt, w których w teście immunofluorescencji bezpośredniej wykazano obecność wirusa wścieklizny, w tym próbkę od nietoperza zakażonego genotypem 5 wirusa wścieklizny.

Do walidacji metody wykorzystano próbki homogenizatów tkanki mózgowej otrzymane z Zakładu Wirusologii Państwowego Instytutu Weterynaryjnego

w Puławach do badań międzylaboratoryjnych testu immunofluorescencji bezpośredniej w latach 2008–2009 i próbkę archiwalną od nietoperza zakażonego genotypem 5 wirusa wścieklizny wykazującą wynik dodatni w teście immunofluorescencji bezpośredniej oraz 5 próbek nadesłanych ostatnio do rutynowej diagnostyki.

Izolacja RNA wirusa

Przed wykonaniem preparatów do testu immunofluorescencji bezpośredniej pobierano próbki tkanki, które każdorazowo ważono, tak żeby zgodnie z wymaganiami zestawu Total RNA ich masa mieściła się w granicach 20–50 mg. Następnie uzyskiwano 10% zawiesinę homogenizatu próbek, którą używano do izolacji RNA. Homogenizację wykonywano ręcznie przy użyciu jednorazowych strzykawk do podawania insuliny. Po wykonaniu testu immunofluorescencji bezpośredniej i odczycie w mikroskopie fluorescencyjnym Nikon Eclipse 50i, dokonywano izolacji RNA z badanych próbek według protokołu producenta zestawu Total RNA, opartego na zmodyfikowanej metodzie Chomczyńskiego.

Zgodnie z protokołem producenta w pierwszym etapie komórki poddawane są lizie, a endogenne RNAzy inaktywowane są przez działanie odczynnika o nazwie Fenozol – mieszaniny soli chaotropowych i fenolu. W następnym etapie dodawany jest chloroform i całość zostaje odwirowana. RNA pozostaje w fazie górnej, podczas, gdy DNA i białka przechodzą do

The use of RT-PCR and Real-Time PCR to complement routine rabies diagnostic methods

Mucha B., Rymer-Zamecka A., Veterinary Hygiene Institute, Voivodship Veterinary Inspectorate, Katowice

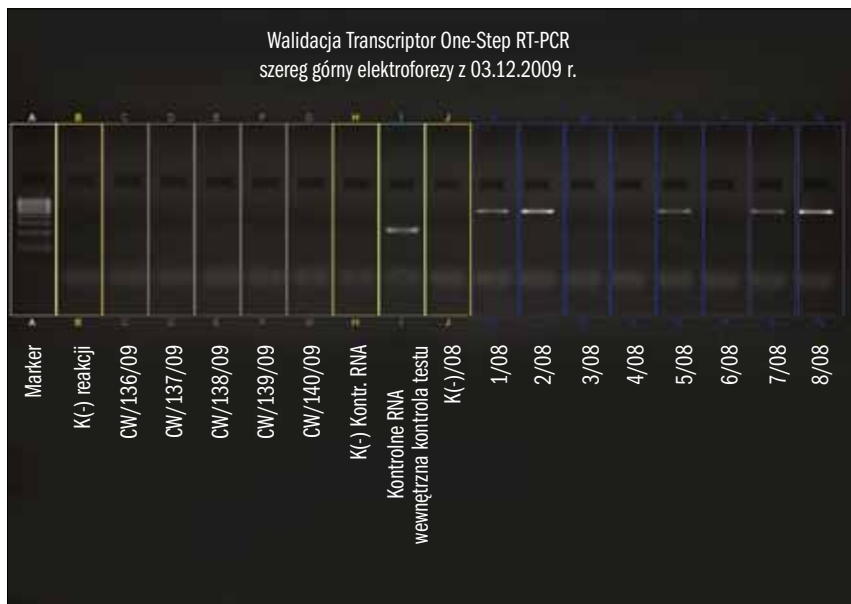
The aim of this paper was to present new methods, namely RT-PCR and Real-Time PCR, for rabies virus detection in animal brain tissues. Both methods were prepared and applied for detection of two Polish isolates: classical rabies virus (genotype 1) and European bat *Lyssavirus* type 1 (EBLV-1), defined as genotype 5. In RT-PCR the method contains only one RT-PCR reaction, using kit designed for reduced primer-dimer formation; this kit is designed for fast, sensitive and specific end-point RT-PCR analysis using gene-specific primers to detect both rabies virus genotypes. Real-Time PCR reaction with SYBR Green giving unambiguous results was used only for samples negative in electrophoresis to detect genotype 5. Preparation and optimization of the method was done with the use of 100 samples from routine diagnostic research, 24 samples supplied for inter-laboratory fluorescent antibody test, from years 2007–2008, given by Department of Virology, National Veterinary Research Institute in Puławy and 10 rabies-positive, archival samples (more than 10 years old), from different animals species. Validation was performed with the use of 25 samples from inter-laboratory fluorescent antibody test from years 2008–2009, the archival rabies-positive sample (genotype 5 from bat brain), and 5 samples from the last routine examinations. The conformity between the results obtained by the methods RT-PCR, Real-Time PCR and fluorescent antibody test was 100%. These very sensitive and also very cheap techniques should complement routine diagnostic methods of rabies in Poland.

Keywords: rabies virus, diagnostics, Real-Time PCR, RT-PCR.

interfazy i fazy dolnej. Fazę z RNA zbiera się i po dodaniu izopropanolu nanosi na minikolumnę ze złożem krzemionkowym. Złoże to nie przepuszcza zanieczyszczeń, a osadzone i oczyszczone RNA wymywa się wodą wolną od RNAz.

Tabela 1. Program temperaturowy reakcji RT-PCR

Reakcja	Temperatura (°C)	Czas	Liczba cykli
Odwrotna transkrypcja	50	30 min	1
Denaturacja wstępna	94	7 min	1
Denaturacja	94	10 s	
Przylączenie	55	30 s	10
Wydłużanie	68	60 s	
Denaturacja	94	10 s	
Przylączenie	49	30 s	25
Wydłużanie	72	60 s	
Ostateczne wydłużanie	72	7 min	1



Ryc. 1. Górny szereg elektroforezy.

Jeżeli badana tkanka mózgowa jest zakażona wirusem wścieklizny – jest to widoczne w postaci świecącego prążka.

Jeżeli w badanej tkance mózgowej nie ma wirusa wścieklizny – prążek nie występuje.

Do pierwszego dołka dodano 9 µl Marker DNA 100 – 1000, a do kolejnych dołków dodano po 9 µl DNA – produktów reakcji:

K(-) reakcji – do mieszaniny reakcyjnej, zamiast RNA, dodawano wodę wolną od RNAz i DNAz

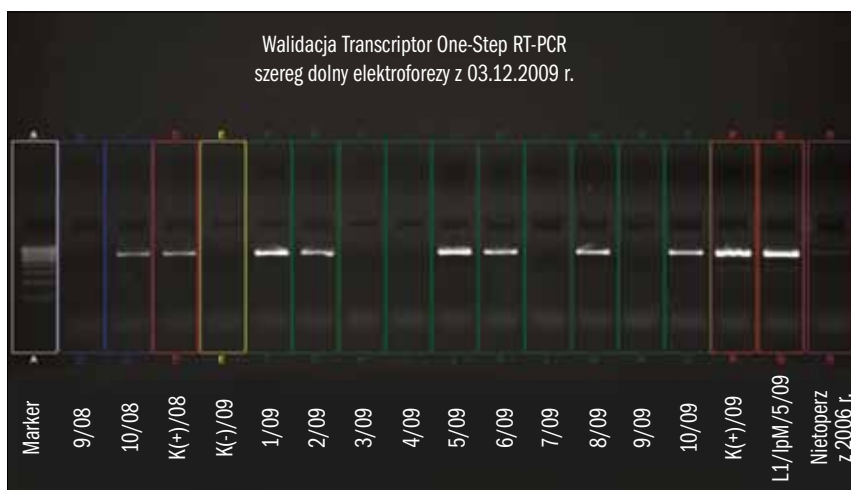
Próby z badań rutynowych oznaczone numerami: CW/136/09, CW/137/09, CW/138/09, CW/139/09, CW/140/09.

K(-) kontr. RNA – kontrola mieszaniny reakcyjnej dla kontrolnego RNA

Kontrolne RNA wirusa zapalenia wątroby typu A

K(-)/08 próbka z badań międzylaboratoryjnych – kontrola ujemna

1/08 – 8/08 – próbki z badań międzylaboratoryjnych



Ryc. 2. Dolny szereg elektroforezy.

Jeżeli badana tkanka mózgowa jest zakażona wirusem wścieklizny – jest to widoczne w postaci świecącego prążka.

Jeżeli w badanej tkance mózgowej nie ma wirusa wścieklizny – prążek nie występuje.

Do pierwszego dołka dodano 9 µl Marker DNA 100 – 1000, a do kolejnych dołków dodano po 9 µl DNA – produktów reakcji:

9/08 – 10/08 – próbki z badań międzylaboratoryjnych z 2008 r.

K(+)/08 – próbka z badań międzylaboratoryjnych – kontrola dodatnia

K(-) – próbka z badań międzylaboratoryjnych z 2009 r. – kontrola ujemna 1/09-10/09 próbki z badań międzylaboratoryjnych z 2009 r.

K(+)- próbka z badań międzylaboratoryjnych z 2009 r.

L1/lpM/5/09 - standard genotypu 1 wścieklizny – homogenizat tkanki mózgowej myszy zakażonych wirusem wścieklizny z 19 listopada 2009 r.

Nietoperz z 2006 r. – próbka z badań rutynowych użyta jako standard dla genotypu 5 wirusa wścieklizny

Tak otrzymane RNA umieszczano na lodzie do dalszego etapu badania, po czym po rozlaniu na mniejsze porcje poddano głębokiemu zamrożeniu w temp. –80°C.

Optymalizacja reakcji odwrotnej transkrypcji

Optymalizacja reakcji odwrotnej transkrypcji polegała na:

- 1) ustaleniu optymalnej ilości RNA,
- 2) ustaleniu optymalnego stężenia starterów w mieszaninie reakcyjnej,
- 3) określeniu najlepszego, uniwersalnego programu temperaturowego reakcji PCR.

Do ustalenia optymalnej ilości RNA wykonywano pomiary w spektrofotometrze przy długości fal 260 nm i 320 nm oraz wyliczenia wg następującego wzoru:

$$\begin{aligned} & (\text{wartość absorbancji przy 260 nm} - \\ & \text{wartość absorbancji przy 320 nm}) \\ & \quad \times 40 \times 10 / 1000 = \\ & = \text{stężenie całkowitego RNA w } \mu\text{mol}. \end{aligned}$$

Wyniki mieściły się w granicach wymogów protokołu Transcriptor One-Step RT-PCR, tj. stężenia końcowego RNA w mieszaninie reakcyjnej w granicach 1 fg – 100 ng. Im starsza lub gorszej jakości była tkanka, tym stężenie RNA było niższe.

Zestaw Transcriptor One-Step RT-PCR zawiera gotową mieszaninę enzymów, bufor reakcyjny, wodę oraz kontrolę wewnętrzną w postaci zestawu składającego się z RNA pochodzącego z namnożonego *in vitro* wirusa zapalenia wątroby typu A oraz mieszaniny starterów.

Innowacyjny hot-start bufor zwiększa czułość i redukuje powstawanie kompleksów primer-dimer.

Do jednej reakcji sporządzano dwie mieszaniny reakcyjne, jedną dla kontrolnego RNA, a drugą dla RNA wirusa wścieklizny, w której stosowano następujące startery o stężeniu 10 µmol:

JW. 12 (5' ATG TAA CAC CYC TAC AAT G 3') (gdzie Y – C lub T) – pozycja nukleotydów 55-73.

JW. 6 (5' CAA TTC GCA CAC ATT TTG TG 3') z publikacji (1) – pozycja nukleotydów 660-641.

W celu ustalenia optymalnego stężenia starterów i RNA w granicach wymaganych protokołem Transcriptor One-Step RT-PCR 4 µMole/50 µl mieszaniny wykorzystano ze wzoru:

$$V_{\text{początkowe}} = (c_{\text{końcowe}} / c_{\text{początkowe}}) \times V_{\text{końcowe}}$$

$V_{\text{początkowe}}$ – objętość RNA lub startera jaką należy dodać do mieszaniny reakcyjnej,

$c_{\text{końcowe}}$ – stężenie RNA lub startera w mieszaninie reakcyjnej,

$C_{\text{początkowe}}$ – stężenie dodawanego RNA lub startera,
 $V_{\text{końcowe}}$ – objętość mieszaniny reakcyjnej.

Reakcję przeprowadzano w całkowitej objętości 25 μl po dodaniu 1 μl RNA i po 1 μl każdego ze starterów, co dawało stężenie końcowe w mieszaninie 0,4 μmol starterów i około 0,4 nmol RNA.

Mieszaninę reakcyjną dla kontrolnego RNA przygotowywano zgodnie z zaleceniem producenta.

Zestaw Transcriptor One-Step RT-PCR umożliwia reakcje w dwóch programach: krótszym i standardowym – dłuższym – zalecanym w identyfikacji wymagającej wysokiej czułości i ten właśnie program poddano optymalizacji, w której uwzględniono temperatury topnienia starterów JW12 i JW6 oraz mieszaniny starterów dla kontrolnego RNA. Reakcje przeprowadzano w termocyklerze Mastercycler[®]ep realplex, firmy Eppendorf. W wyniku licznych prób przyjęto program temperaturowy reakcji przedstawiony w tabeli 1.

Rozdział elektroforetyczny otrzymanych produktów dokonywano przez 30 minut przy stałym napięciu prądu elektrycznego 90 V w aparacie do elektroforezy poziomej SUBDNA, po naniesieniu na 2% żel agarozowy. Żel sporządzano przez rozpuszczenie 2 g agarozy w 100 ml roboczego roztworu buforu TAE, otrzymywanego w wyniku zmieszania 15 ml koncentratu buforu TAE(50x) z 735 ml wody destylowanej. Do żelu dodawano 1 kroplę bromku etydyny. Analizę elektroforegramów przeprowadzano w aparacie systemu dokumentacji żeli BioDoc-It Imaging System UVP. W elektroforezie użyto Markera DNA M100-1000 produkcji A&A Biotechnology i barwnika do nanoszenia próbek firmy Sigma-Aldrich.

Walidacja reakcji RT-PCR przy użyciu zestawu Transcriptor One-Step RT-PCR

Walidacja to sprawdzenie przydatności metody przez zbadanie i przedstawienie obiektywnego dowodu, że zostały spełnione wszystkie wymagania, oraz że umożliwia ona niezawodnie i w sposób odtwarzalny realizację czynności, jakie ma na celu. Wyniki walidacji zastosowanej metody są przedstawione na rycinach 1 i 2.

Uzyskane wyniki były w 100% zgodne z wynikami wszystkich próbek w teście immunofluorescencji bezpośredniej. Ze względu na to, że prążek DNA genotypu 5 ma mniejszą intensywność świecenia (być może dlatego, że tkanka mózgowa nietoperza pochodziła sprzed ponad 3 lat), każdorazowo po wykonaniu odczytu elektroforezy wykonywano reakcję Real Time PCR próbek, które w elektroforezie dawały wynik ujemny, dla upewnienia się, czy

Tabela 2. Program temperaturowy reakcji real time PCR

Reakcja	Temperatura (°C)	Czas	Liczba cykli
Denaturacja wstępna	95	2 min	1
Denaturacja	94	5 s	30
Przyłączanie	49	5 s	
Wydużanie	72	20 s	

badane próbki nie były zakażone genotypem 5 wirusa wścieklizny.

Optymalizacja reakcji real time PCR

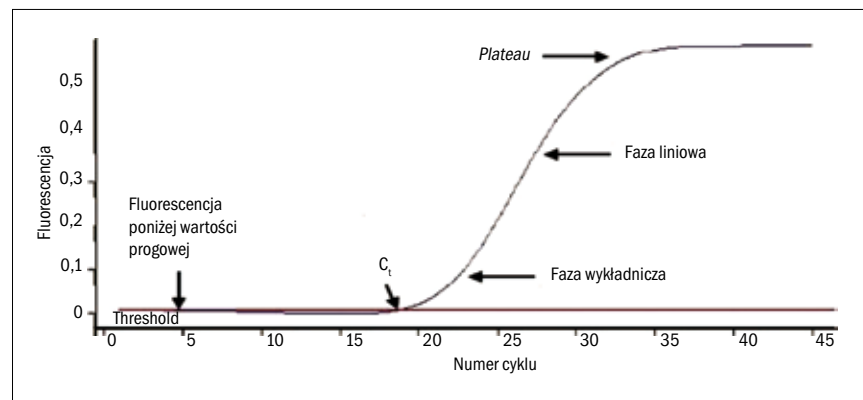
Optymalizacja reakcji real time PCR polegała na:

- 1) ustaleniu optymalnej ilości DNA,
- 2) ustaleniu optymalnego stężenia starterów w mieszaninie reakcyjnej,
- 3) opracowanie najlepszego, uniwersalnego programu temperaturowego reakcji.

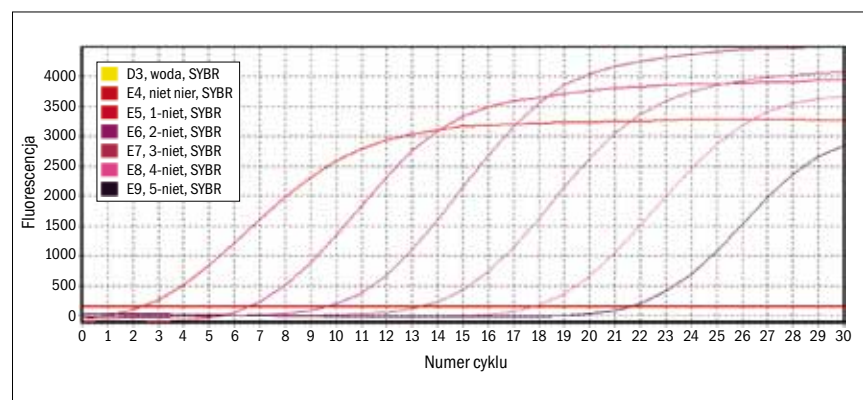
Dla ustalenia optymalnej ilości DNA wykonywano pomiary w spektrofotometrze, przy długości fal 260 nm i 320 nm, oraz wyliczenia według następującego wzoru:

$$\frac{\text{wartość absorbancji przy 260 nm} - \text{wartość absorbancji przy 320 nm}}{\times 50 \times 10 / 1000} = \text{stężenie całkowitego DNA w } \mu\text{mol}.$$

Wyniki mieściły się w granicach wymogów protokołu Real Time 2xPCR



Ryc. 3. Przykładowy wykres reakcji real time PCR



Ryc. 4. Wykresy reakcji real time PCR kolejnych rozcieńczeń DNA – wynik reakcji odwrotnej transkrypcji RNA wirusa wścieklizny. Na osi odciętych liczba cykli, na osi rzędnych poziom fluorescencji.

Od lewej, najpierw nierozcieńczone, potem kolejno rozcieńczenia 10 do 1, do 2, do 3 do 4 i do 5.

Rozcieńczenie ma na celu, oprócz ustalenia granic wykrywalności, sprawdzenie czy wszystkie parametry reakcji zostały dobrane prawidłowo.

Krzywe przecinają linię bazową w równych odstępach. Punkt przecięcia określane jest jako wartość C_t , służąca do dalszych obliczeń w metodach ilościowych.

D3 – kontrola czystości, do mieszaniny reakcyjnej dodano wodę zamiast RNA

E4 – do mieszaniny reakcyjnej dodano nierozcieńczone DNA genotypu 5 wirusa wścieklizny o stężeniu 21,8 nMol

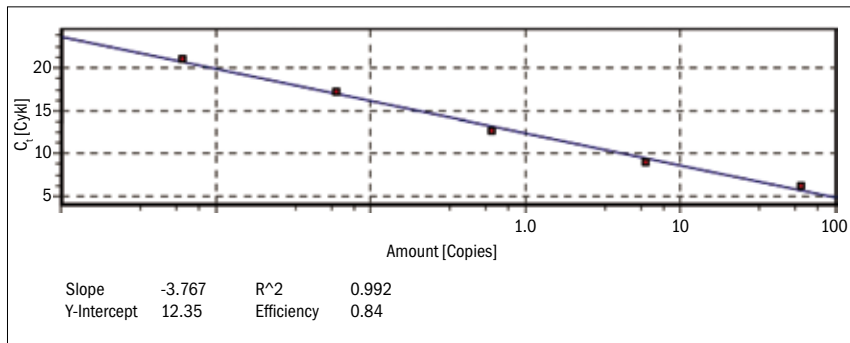
E5 rozcieńczenie 10 do 1 – 10 razy

E6 rozcieńczenie 10 do 2 – 100 razy

E7 rozcieńczenie 10 do 3 – 1000 razy

E8 rozcieńczenie 10 do 4 – 10 000 razy

E9 rozcieńczenie 10 do 5 – 100 000 razy



Ryc. 5. Krzywa standardowa genotypu 5 wirusa wścieklizny, którego RNA wyizolowano z mózgowia nietoperza, nadesłanego w 2006 r. do rutynowego badania w kierunku wścieklizny

Na osi rzędnych wartości C_t – numer cyklu, w którym krzywa przecięła linię bazową,

Na osi odciętych liczba kopii

Slope – współczynnik nachylenia krzywej standardowej, idealny = -3,32, wtedy wydajność reakcji jest równa 100%

R^2 – współczynnik korelacji określający jak blisko krzywej standardowej znajdują się punkty będące odwziedleniem przecięcia wykresów kolejnych rozcieńczeń standardu z linią bazową

Idealna wartość = 1

Efficiency – wydajność reakcji – tutaj 84%

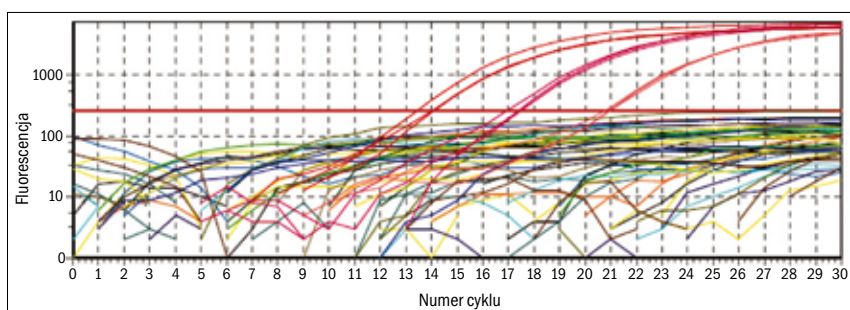
Y – Intercept – średnia wartość przecięcia krzywych z osią rzędnych

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A					Woda	Woda	Woda					
B		CW/13...	CW/13...	CW/13...	CW/13...	CW/13...	CW/13...	CW/13...	CW/13...	CW/13...		
C		CW/13...	CW/13...	CW/13...	CW/14...	CW/14...	CW/14...	K(-)/08	K(-)/08	K(-)/08		
D		3/08	3/08	3/08	4/08	4/08	4/08	6/08	6/08	6/08		
E		3/08	3/08	3/08	K(-)/09	K(-)/09	K(-)/09	3/09	3/09	3/09		
F		4/09	4/09	4/09	7/09	7/09	7/09	9/09	9/09	9/09		
G		1 rozcz. g... 1:2.18	1 rozcz. g... 1:2.18	1 rozcz. g... 1:2.18	2 rozcz. g... 1:0.218	2 rozcz. g... 1:0.218	2 rozcz. g... 1:0.218	3 rozcz. g... 1:2.18E	3 rozcz. g... 1:2.18E	3 rozcz. g... 1:2.18E		

Ryc. 6. Rozkład próbek w termocyklerze, po 3 powtórzenia każdej próbki

Objaśnienia:

A 5,6,7 – kontrola reakcji: do mieszaniny dodano wodę, zamiast DNA, i dalej kolejno od 2B po 3 powtórzenia próbek z badań rutynowych: CW/136/09, CW/137/09, CW/138/09, CW/139/09, CW/140/09, próbek ujemnych w elektroforezie z badań międzylaboratoryjnych 2008 K(-), 3, 4, 6, 9, a z 2009 K(-), 3, 4, 7, 9 oraz trzy powtórzenia trzech rozcieńczeń DNA genotypu 5 wirusa wścieklizny nietoperza z 2006 r. – 10, 100 i 1000 razy



Ryc. 7. Wykresy reakcji w skali logarytmicznej – lepiej jest widoczne, jak żadna z badanych prób nie daje wykresu przecinającego linię bazową.

Linię bazową przecinają tylko 3 rozcieńczenia DNA genotypu 5 wirusa wścieklizny wyizolowanego z tkanki mózgowej nietoperza

Master Mix SYBR® stężenia końcowego DNA w mieszaninie reakcyjnej w granicach 10 pg–1 µg.

Zestaw Real Time 2×PCR Master Mix SYBR® zawiera mieszaninę Taq DNA polimerazy, buforu reakcyjnego, chlorku magnezu, dNTP, SYBR Green i stabilizatorów oraz wody wolnej od nukleaz.

W celu ustalenia optymalnej objętości starterów i DNA dla uzyskania stężenia końcowego, wymaganego protokołem Real Time 2×PCR Master Mix SYBR®, 10 pg – 1 µg w mieszaninie reakcyjnej mieszaniny korzystać ze wzoru użytego w przypadku Transcriptor One step RT-PCR.

W reakcji użyto następujące startery o stężeniu 10 µmol (2):

- gt5L (5' GAT CCC GAT TTG AAA ACA GC 3'),
- gt5P (5' AGA CCA TGG CTC CAG CTA AA 3').

Po dodaniu po 0,5 µl każdego ze starterów i 1 µl DNA objętość mieszaniny reakcyjnej wynosiła 20 µl, co w dawało stężenie końcowe w mieszaninie 0,25 µmole starterów i około 1 nmol DNA.

W wyniku optymalizacji reakcji opracowano program PCR przedstawiony w **tabeli 2**, w ostatnim etapie każdorazowo programując krzywą topnienia (**ryc. 3**). Jeżeli tkanka jest zakażona wirusem jest to widoczne jako krzywa logarytmiczna z fazą wykładniczą, liniową oraz plateau. Jeżeli w badanej tkance mózgowej nie ma wirusa wścieklizny, jest to widoczne jako brak w wykresie fazy wykładniczej i liniowej świadczących o namnożeniu DNA.

Ostatecznym sprawdzianem poprawności optymalizacji reakcji była krzywa standardowa z użyciem jako standardu próbki pochodzącej z mózgowia nietoperza zakażonego genotypem 5 wirusa wścieklizny (**ryc. 4, 5, 6**).

Walidacja reakcji real time PCR przy użyciu Real Time 2×PCR Master Mix SYBR®

W walidacji przeprowadzono reakcję z trzema powtórzeniami DNA wszystkich próbek ujemnych w elektroforezie i DNA nietoperza zakażonego genotypem 5 wirusa wścieklizny, jako kontroli dodatniej w trzech rozcieńczeniach oraz kontroli reakcji, w której do mieszaniny reakcyjnej dodano wodę wolną od RNAz i DNAz. Wyniki badań przedstawiono na **ryc. 7, 8, 9 i 10**.

Omówienie wyników

Wszystkie próbki były badane testem immunofluorescencji bezpośredniej. Optymalizację przeprowadzono na 100 ujemnych próbkach z badań rutynowych i 24 z międzylaboratoryjnych testów immunofluorescencji bezpośredniej z 2007 i 2008 r. oraz 10 dodatknych próbkach archiwalnych,

z czego najstarsza pochodziła sprzed 10 lat. Walidację reakcji odwrotnej transkrypcji wykonano z użyciem 25 próbek (15 dodatnich i 10 ujemnych) z badań międzylaboratoryjnych testu immunofluorescencji bezpośredniej 2008 i 2009 r., jednej pozytywnej archiwalnej – genotyp 5 wirusa wścieklizny z mózgowia nietoperza oraz 5 próbek pobranych z tkanek mózgowych nadesłanych tuż przed walidacją do rutynowego badania w związku z ekspozycją człowieka na wirus wścieklizny. Stężenie wyizolowanego z tych próbek RNA każdorazowo było w granicach wymaganych protokołem testu do reakcji odwrotnej transkrypcji.

W walidacji reakcji real time PCR wykonano 3 powtórzenia 15 próbek, które w elektroforezie dały wynik ujemny oraz trzech rozcieńczeń próbki dodatniej – DNA genotypu 5 wirusa wścieklizny. Stężenie DNA każdorazowo było w granicach wymaganych protokołem testu real time PCR.

W oparciu o PN-EN ISO/IEC 17025:2005+Apl/2007+AC/2007 do prawidłowego przeprowadzenia walidacji wybrano następujące parametry charakterystyki działania metody: czułość, swoistość, powtarzalność i odtwarzalność. Zostały one spełnione w 100%.

W każdym przypadku uzyskano 100% zgodność obu metod i testu immunofluorescencji bezpośredniej. Transcriptor One-Step RT-PCR Kit nie wymaga powtórnego namnożenia, co skraca czas badania. Innowacyjny hot-start bufor zwiększa czułość i redukuje powstawanie kompleksów primer-dimer, co ułatwia optymalizację reakcji real time PCR.

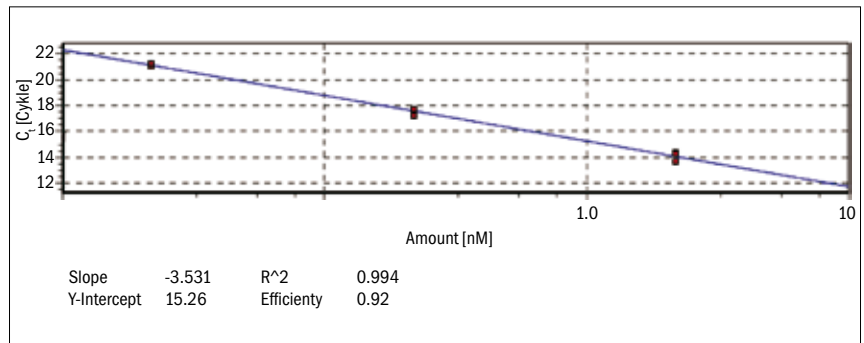
Reakcja real time PCR dla genotypu 5 wirusa wścieklizny jest dodatkowym sprawdzianem czułości i specyficzności metody. Poprawnie zoptymalizowana reakcja Real Time z SYBR Green daje jednoznaczne wyniki i jest wystarczająca do jakościowego badania jakim jest określenie obecności lub braku wirusa wścieklizny w badanej tkance mózgowej, bez względu na jej stan.

Ważną zaletą używanych zestawów odczynników, jest również obniżenie kosztów badania, poniżej kosztów izolacji na myszach i w hodowli komórek nerwiaka mysiego.

Piśmiennictwo

- Smreczak M., Orłowska A., Trębas P., Żmudziński J.F.: Wykrywanie metody hemi-nested RT-PCR do różnicowania zakażeń wywołanych klasycznym wirusem wścieklizny i EBLV 1 u zwierząt lądowych. *Medycyna Wet.* 2008, **64**, 314-317.
- Orłowska A., Smreczak M., Trębas P., Żmudziński J.F.: Comparison of Real Time PCR and hemi-nested RT-PCR methods in the detection of rabies virus infection in bats, and terrestrial animals. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 2008, **52**, 313-318.
- Woldehiwet Z.: Review clinical laboratory advances in the detection of rabies virus. *Clin. Chim. Acta* 2005, **351**, 49-63.

Lekarz wet. Barbara Mucha, Zakład Higieny Weterynaryjnej, ul. Brynowska 25a, 40-585 Katowice



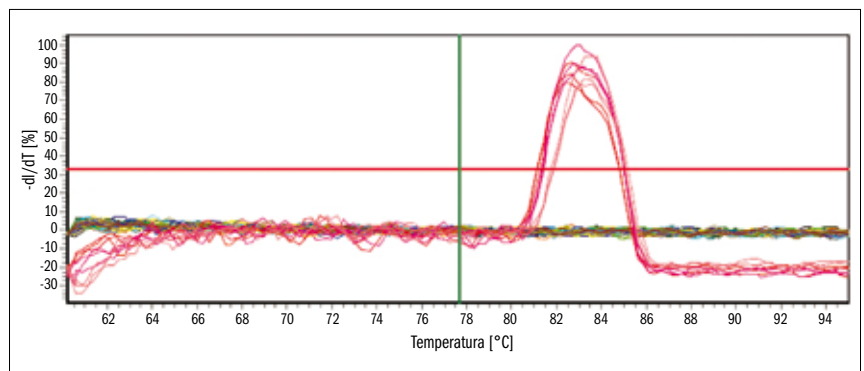
Ryc. 8. Krzywa standardowa genotypu 5 wirusa wścieklizny – z trzech powtórzeń trzech rozcieńczeń. Na osi rzędnych wartości C_t – numer cyklu, w którym krzywa przecięła linię bazową, na osi odciętych liczba kopii. Slope – współczynnik nachylenia krzywej standardowej – idealny = -3,32, wtedy wydajność reakcji jest równa 100%

R^2 – współczynnik korelacji określający jak blisko krzywej standardowej znajdują się punkty będące odzwierciedleniem przecięcia wykresów kolejnych rozcieńczeń standardu z linią bazową.

Idealna wartość = 1

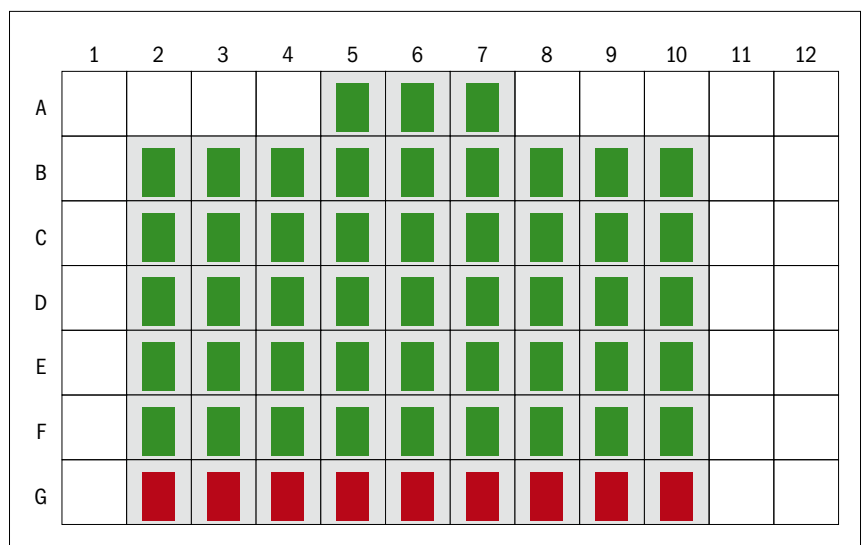
Efficiency – wydajność reakcji (tutaj 92%)

Y – Intercept – średnia wartość przecięcia krzywych z osią rzędnych



Ryc. 9. Krzywa topnienia produktów reakcji real time PCR

Żeby upewnić się, czy nie występują niespecyficzne wiązania pomiędzy starterami, określane jako kompleksy primery-dimer, można przeprowadzić analizę krzywej topnienia. Polega ona na stopniowym podnoszeniu temperatury mieszaniny aż do momentu denaturacji DNA i pomiarze fluorescencji co 0,5°C. W momencie osiągnięcia temperatury topnienia produktu następuje bardzo gwałtowna denaturacja i ostry spadek fluorescencji. Na krzywej topnienia można to zaobserwować w postaci pik. Jeżeli produkt jest specyficzny, to uzyskamy jeden pik, ponieważ każdy dwuniciowy odcinek DNA ma charakterystyczną dla siebie temperaturę topnienia. Na rycinie wyraźnie widać, że nie ma produktów niespecyficznych, piki dają tylko produkty namnażania DNA genotypu 5 wirusa wścieklizny wyizolowanego z mózgowia nietoperza



Ryc. 10. Wizualizacja wyników. Kolor zielony oznacza ujemny wynik reakcji. Kolor czerwony oznacza dodatni wynik reakcji. Wynik dodatni dały tylko rozcieńczenia DNA genotypu 5 wirusa wścieklizny wyizolowanego od nietoperza