

**Statusrapport til Kartofelafgiftsfonden for projektet:**

**Afprøvning af PCR teknik til test for virus i knolde – opfølgning på prøveforberedelsesdelen**

Mogens Nicolaisen  
Danmarks JordbrugsForskning  
Afd. f. Plantebeskyttelse

Forskningscenter Flakkebjerg 14. august 2003

## **Indledning**

Gennem projektet ' Afprøvning af PCR-teknik til test for virus i knolde' (i det følgende omtalt som 'projekt 1') blev det klart, at 'flaskehalsen' i den nye 'TaqMan' metode er at udtage og findele et repræsentativt stykke af en kartoffelknold og forberede prøven til PCR-analysen. I nærværende opfølgingsprojekt blev mulighederne for en optimeret og mere arbejds effektiv metode til prøveforberedelse undersøgt ved at besøge Central Science Laboratory (CSL), UK der har stor erfaring netop indenfor dette område.

Problemerne der er knyttet til prøveforberedelse kan deles i to:

- 1) For at være sikker på at detektere virus skal prøven udtages det rette sted og den efterfølgende virus RNA ekstraktion skal være effektiv således at der ekstraheres mest muligt virus RNA. I projekt 1 var der nogen uoverensstemmelse mellem resultater opnået ved ELISA og TaqMan, hovedsageligt bestående i, at enkelte knolde der var positive ved ELISA, var negative ved TaqMan. Da TaqMan metoden er meget følsom, mener vi, at uoverensstemmelsen kan tilskrives prøveudtagning (virus kan være ujævnt fordelt i knolden) eller den efterfølgende prøveforberedelse (virus RNA ekstraktion).
- 2) prøveforberedelsen er meget arbejdskrævende medmindre der indføres automation af de forskellige trin.

Med baggrund i de to problemer besøgte Mogens Nicolaisen CSL februar 2003. De forskellige trin i processen blev diskuteret med Dr. Rick Mumford, der har det overordnede ansvar for udførelsen af test af knolde ved CSL. Efterfølgende demonstrerede Dr. Thomas Fisher de enkelte trin i processen.

## **Kort beskrivelse af arbejdsgangen ved CSL**

CSLs metode til test af virus direkte i knolde er endnu ikke fuldt automatiseret/ opskaleret til massetestning.

- 1) Der udtages en 'prop' af knolden fra både navle- og krone-enden (for at modvirke effekten af ujævn fordeling af virus i knolden). Dette gøres manuelt med en slags propbor, som CSL selv har konstrueret. Propboret rengøres i natrium hydroxid og vand mellem hver udtagning for at forhindre forurening af de enkelte prøver.

- 2) Knoldprøver fra 4 knolde slås sammen til en prøve, og disse kommes i et metalrør med en stålkugle og 6 ml ekstraktionsvæske. Røret lukkes herefter og rystes kraftigt på et specielt apparat (CSL benytter et apparat fra KLECO). Kapaciteten er 6 rør ad gangen, og proceduren har en varighed af ca. 3 min. Knolden og væsken udgør nu en homogen 'suppe'.
- 3) En del af denne 'suppe' overføres nu til en robot til ekstraktion af virus RNA. CSL benytter et system 'King Fisher' der har en kapacitet på 15 prøver ad gangen i CSLs opstilling. Ekstraktionen tager ca 30 min. Systemet bygger på, at RNA binder til silica gel under bestemte forhold (kemisk buffer). Man kan således binde RNA til silica, mens urenheder, der ikke binder til silica, vaskes bort. Efterfølgende kan man få RNA til at slippe silica gelen således at man har rent RNA i f.eks. vand. Dette princip benyttes af de fleste systemer til isolering af RNA på markedet.
- 4) Herefter overføres det isolerede virus RNA til en pipetteringsrobot (CSL benytter en robot fra Hamilton) sammen med reagenser til TaqMan analysen. De forskellige reagenser afpipetteres nu automatisk til de enkelte 'brønde' i en bakke med plads til 384 prøver. Analysen for PVY og PLRV udføres hver for sig. Samtidig analyseres for et stykke plante RNA som altid findes i kartoffelknolde – dette bruges som en kontrol for, at testen har virket for den enkelte knold. Pipetteringsproceduren tager ca. 30 min.
- 5) Herefter analyseres prøverne i TaqMan apparat. Dette tager godt 2 timer. Efterfølgende kan resultaterne vurderes og infektionsgraden beregnes.

CSL har kun planer om at bruge TaqMan som et alternativ til ELISA på spirer når f.eks. der er brug for et hurtigt svar (CSL lover et svar indenfor 5 dage). CSL vil således ikke fuldt erstatte ELISA med TaqMan.

### **Gennemgang af de enkelte trin i proceduren**

- 1) Udtagning af kartoffelvæv: CSL opnår god overensstemmelse mellem ELISA og TaqMan og deres prøveudtagningsprodedure må derfor være velegnet til TaqMan analyser. Hvorvidt denne proces kan effektiviseres er ikke fuldt undersøgt, men det er dog ikke sandsynligt at prøveudtagning kan automatiseres hvis prøven skal udtages på bestemte steder (navle- og kroneenden).
- 2) Findeling af prøven: CSL slår som nævnt 4 prøver sammen. Det var Rick Mumfords vurdering, at det vil være muligt at slå 10 prøver sammen. Dette er i modstrid med

konklusioner opnået i 'Projekt 1' hvor det ikke vurderedes muligt at slå prøver sammen, da svagt inficerede knolde dermed ikke ville blive bedømt positive. Denne uoverensstemmelse skyldes sandsynligvis, at CSL bruger en mere optimal prøveforberedelsesmetode end den der blev benyttet i projekt 1. Hvorvidt det kan komme på tale at poole prøver må bero på en statistisk analyse (hvis der f.eks. forventes en høj procentuel infektionsgrad kan det næppe betale sig at poole, da man så efterfølgende skal tilbage og analysere prøverne enkeltvis). CSL anvender et system til findeling af prøver hvor der kun kan køres 6 prøver ad gangen. Dette er ikke hensigtsmæssigt ved analyse af mange prøver. Der findes imidlertid systemer på markedet der kan håndtere 96 prøver ad gangen (Qiagen, KLECO). Disse systemer fungerer ligeledes ved at en kugle under rystning findeler kartoffelvævet.

- 3) Virus RNA ekstraktion: CSL benytter et virus RNA ekstraktionssystem King Fisher med et tilhørende robotsystem til håndtering af 15 prøver. Dette er i underkanten af det optimale antal prøver der bør kunne håndteres. Der findes systemer på markedet til håndtering af 96 prøver ad gangen (f.eks. fra Applied Biosystems). Udover at øge kapaciteten vil det ligeledes være en fordel, hvis antallet af prøver (96) der kan håndteres er det samme gennem hele arbejdsgangen (undtagen selve TaqMan analysen, der kan tage 384 prøver).
- 4) Afpipettering/ opsætning af analyse: CSL benytter et Hamilton afpipetteringssystem til prøveforberedelse. Det må konstateres at være en nødvendighed med automatiseret pipettering ved anvendelse af 384-prøve bakker. Det er simpelthen ikke muligt for et menneske at holde rede på 384 prøver. CSL har dårlige erfaringer med at teste for PLRV og PVY i samme prøve/arbejdsgang, mens 'Projekt 1' viste det modsatte. Rationaliserings gevinsten ved at analysere de to virus i samme arbejdsgang ligger i selve TaqMan analysen, mens der under alle omstændigheder kun skal foretages en prøveforberedelse for de 2 virus.
- 5) TaqMan analyse: Denne er beskrevet i rapporten for 'Projekt 1'. I korte træk findes der to TaqMan maskiner: en der kan køre 96 og en der kan køre 384 prøver ad gangen. Til 384 maskinen kan der tilsluttes en 'karrusel' der automatisk fylder plader i maskinen efterhånden som de bliver færdige. Dette vil sige at maskinen kan køre i døgndrift og således analysere 10 plader eller næsten 4000 prøver i døgnet.
- 6) Dataanalyse: Der skal oprettes klare definitioner af, hvornår en prøve skal opfattes som inficeret hhv. sund. I de fleste tilfælde er det nemt at skelne inficeret fra sund, men der kan være tvivlsspørgsmål.

De enkelte instrumenter kræver indkøring før de tages i anvendelse i testlaboratoriet:

Vævsudtagning. Kræver kun begrænset indkøring, det bør testes at der ikke kan ske krydskontaminering af prøver.

Findeling af væv. Der kræves en optimering af graden af findeling af prøven. Dette kræver dog kun enkelte forsøg.

VirusRNA ekstraktion. Der bruges beskrevne metoder til virus RNA ekstraktion, dog skal disse afprøves før en egentlig iværksættelse af testning.

Afpipettering. En afpipetteringsrobot er et meget fintfølede instrument der kræver indkøring til hvert specifikke formål. Dette arbejde kan sikkert udføres af det sælgende firma.

TaqMan apparatet vil relativt nemt kunne sættes op til at fungere, apparatet skal testes på prøver med et indhold af virus samt på sunde prøver.

Indkøringen af de enkelte apparaturer vil sandsynligvis i stor udstrækning kunne aftales udført af de sælgende firmaer.

### **Prisniveau**

I rapporten for Projekt 1 er der allerede givet en priskalkulation for selve TaqMan analysen. Det er ikke muligt at give en nøjagtig priskalkule for de øvrige trin i proceduren da det naturligvis afhænger af hvilke systemer der vælges.

Et groft prisoverslag viser, at prisen for en enkelt prøve vil være ca 20 Kr.

Der er ikke indhentet tilbud på udstyr.

### **Behov for arbejdskraft**

I perioden hvor testningen foregår vil de mest arbejdskrævende trin være udtagning af knoldprøver, overførsel af prøver mellem de enkelte trin, samt vurdering af resultater.

### **Generelle betragtninger.**

Håndtering af store mængder prøver kræver en høj grad af systematisering samt en protokol for hvordan ombytningsfejl undgås. Dette gælder selvfølgelig både ved ELISA og ved TaqMan analyse. Der skal udarbejdes procedurer for overgangen mellem de enkelte procedurer således at f.eks. det findelte væv overføres til virus RNA ekstraktionen på en rationel måde.

CSL bruger som nævnt ovenfor et stykke RNA som kontrol på at testen har virket (hvis resultatet kommer ud negativt har man strengt taget ingen garanti for, om der ikke er virus i prøven eller om noget er gået galt f.eks. under ekstraktionen, med mindre man har en kontrol som den CSL benytter). Denne forholdsregel er fornuftig, men den betyder samtidig også at der skal køres en ekstra test for hver enkelt prøve. Det kan overvejes at køre en sådan test som en slags stikprøve for at reducere omfanget.

### **Konklusion**

Det vil være muligt at analysere et stort antal prøver vha. TaqMan teknik. Dette vil dog kræve indkøb af apparatur til automatisering af de enkelte arbejdsgange. Derudover vil det kræve personale der er trænet i brugen af apparaturet. Det er forbundet med en del omkostninger til materialer at analysere vha. TaqMan systemet, men disse omkostninger kan sandsynligvis nedbringes ved at slå prøver sammen (op til 10) samt ved rabataftaler.

**Findelingsmaskine til væv (Qiagen)**



**Virus RNA ekstraktionsmaskine (Applied Biosystems)**



**Afpipetteringsrobot (Hamilton)**



**TaqMan 7900 system med karrusel (Applied Biosystems)**

