



CERTIFIKOVANÁ METODIKA

**Metoda PCR-RFLP pro rozlišení sérotypu 1/2
Streptococcus suis od sérotypu 2
a sérotypu 1 od sérotypu 14.**

MVDr. Matiašovic Ján, Ph.D.

MVDr. Zouharová Monika, Ph.D.

MVDr. Nedbalcová Kateřina, Ph.D.

Mgr. Králová Natálie

MVDr. Matiašková Katarína, Ph.D

Mgr. Šimek Bronislav

MVDr. Kucharovičová Ivana

Metoda PCR-RFLP pro rozlišení sérotypu 1/2 *Streptococcus suis* od sérotypu 2 a sérotypu 1 od sérotypu 14.

Autoři:

Matiašovic Ján ¹

Zouharová Monika ¹

Nedbalcová Kateřina ¹

Králová Natálie ^{1,2}

Matiašková Katarína ¹

Šimek Bronislav ³

Kucharovičová Ivana ³

¹ Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i., Brno

² Ústav experimentální biologie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Brno

³ Státní veterinární ústav Jihlava, Jihlava

Metodika je výsledkem řešení výzkumného projektu č. NAZV QK1810193

Osvědčení o uplatnění certifikované metodiky:

Vydal: Státní zdravotní ústav, Šrobárova 49/48, Praha 100 00

ISBN 978-80-88233-87-9

OPONENTI CERTIFIKOVANÉ METODIKY

MUDr. Jana Kozáková, Státní zdravotní ústav

Prof. MVDr. Alois Čížek, CSc., Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

I. Cíl metodiky

Cílem uplatnění metodiky je rozlišení sérotypu 1/2 *Streptococcus suis* od sérotypu 2 a sérotypu 1 od sérotypu 14.

II. Vlastní popis metodiky

1. Úvod

Streptococcus suis je původcem významných chorob člověka i hospodářských zvířat, zejména prasat. Klinické projevy infekce lidí nebývají příliš časté, ale bývají závažné. Nejčastěji se jedná o purulentní meningitidu často spojenou se ztrátou sluchu a vestibulární dysfunkcí. Další klinické projevy mohou představovat septikémii, artritidu, endokarditidu a pneumonii. Ve vážných případech mohou klinické komplikace končit smrtí pacienta (Dutkiewicz et al. 2017).

Izoláty *Streptococcus suis* nejsou uniformní. Na základě odlišnosti kapsulárních polysacharidů v současné době rozlišujeme 29 různých sérotypů *Streptococcus suis* (Okura et al. 2014; Okura et al. 2016). Za zoonotické kmeny přenosné ze zvířat na člověka jsou považovány sérotypy 2 a 14 (Dutkiewicz et al. 2017).

Současné metody sérotypizace *S. suis* jsou založeny na dvou různých metodických přístupech. Prvním je klasická aglutinační reakce se séry obsahujícími protilátky specifické k jednotlivým sérotypům. Tato metoda umožňuje rozlišení sérotypů 1/2 vs. 2 a 1 vs. 14, ale výsledky mohou být nejednoznačné (Roy et al. 2017). Druhým metodickým přístupem je detekce genů specifických pro lokus syntézy kapsulárního polysacharidu jednotlivých sérotypů pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) (Liu et al. 2013; Kerdsin et al. 2014, Okura et al. 2014). Nevýhodou tohoto přístupu je nemožnost vzájemně odlišit sérotyp 1/2 od sérotypu 2 a stejně tak i sérotyp 1 od sérotypu 14 a to z důvodu vysoké podobnosti genů lokusu pro syntézu polysacharidu. Přitom právě rozlišení těchto sérotypů je velmi důležité, protože sérotypy 2 a 14 jsou považovány za zoonotické, zatímco sérotypy 1/2 a 1 ne (Gottschalk a Segura 2007; Dutkiewicz et al. 2017). Podrobnou analýzou sekvencí genů pro syntézu polysacharidů těchto sérotypů bylo zjištěno, že se sérotyp 1/2 liší od sérotypu 2 v jednonukleotidové substituci genu cpsK. Stejně tak se sérotyp 1 liší od sérotypu 14 ve stejné jednonukleotidové substituci genu cpsK (Athey et al. 2016). Analýzou substituce genu cpsK tak lze určit, zda izolát identifikovaný pomocí PCR jako sérotyp 1/2 nebo 2 je sérotypu 2 nebo 1/2. Podobně izolát identifikovaný pomocí PCR jako 1 nebo 14 lze analýzou substituce v genu cpsK rozlišit dále na sérotyp 1 nebo 14.

Bylo zjištěno (Athey et al. 2016), že přítomnost guaninu v nukleotidové pozici 483 genu cpsK je typická pro sérotyp 2 a 14, zatímco sérotypy 1/2 a 1 mají v této pozici jiný nukleotid. Přítomnost guaninu v pozici 483 genu cpsK lze detekovat pomocí restriční endonukleázy BstNI. V případě přítomnosti guaninu v pozici 483 je PCR produkt genu cpsK BstNI naštěpen, v případě jiného

nukleotidu v této pozici BstNI PCR produkt nenaštepí. Přítomnost naštěpených nebo nenaštěpených fragmentů PCR produktu lze detekovat gelovou elektroforézou.

2. Detekce substituce genu *cpsK* metodou end-point polymerázové řetězové reakce a štěpení PCR produktu restrikční endonukleázou BstNI

2.1 Předmět působnosti a podstata metody

Tato metodika popisuje postup použitelný k odlišení sérotypu 1/2 od sérotypu 2 a sérotypu 1 od sérotypu 14 *Streptococcus suis*. Předpokládá předchozí identifikaci nerozlišených sérotypů 1/2, 2 a 1, 14 od ostatních sérotypů *Streptococcus suis* například multiplexní PCR reakcí (Liu et al. 2013; Kerdsin et al. 2014, Okura et al. 2014) nebo aglutinační reakcí.

Metoda je založena na end-point polymerázové řetězové reakci, následném štěpení PCR produktu restrikční endonukleázou BstNI (PCR-RFLP) a vizualizaci produktů štěpení v agarózovém gelu.

2.2 Potřeby a pomůcky

2.2.1 Oligonukleotidové primery

Metodika používá primer cpsK-F 5'-GTTGCTGGTTATGATAGGGTAG-3' do genu cpsK podle publikace Athey et al. 2016, druhý primer cpsK-R2 5'-AAGCTTCTTTTGCTGTTTGCTC-3' do genu cpsK je navržen autory metodiky.

PCR produkt amplifikovaný primery cpsK-F + cpsK-R2 je dlouhý 486 bp. Štěpení PCR produktu na fragmenty 139bp a 347bp detekuje přítomnost 483 nt G v místě pro restrikční endonukleázu BstNI. To je spojeno se sérotypem 2 nebo 14. Pokud se PCR produkt neštepí, jde o sérotyp 1/2 nebo 1.

2.2.2 Referenční kmeny

Pro ověření správnosti postupu identifikace sérotypů byly použity referenční sérotypové kmeny 1/2, 1, 2 a 14 (Perch et al. 1983, Gottschalk et al. 1989) a další kmen sérotypu 1/2, jehož substituce v genu cpsK je jiná, než u referenčního sérotypového kmenu 1/2 (Tabulka 1). Identita sérotypu všech použitých kmenů byla ověřena celogenomovým sekvenováním.

Tabulka 1. Sekvence genu *cpsK* referenčních kmenů okolo místa substituce 483 bp.

sérotyp	vzorek	<i>cpsK</i>	TAGAGGCGGATGGTCATCGCTTTGTGGTGGCCTG G AATAAACTCTATAAAAAAG
S2	A3		
S14	B3		
S1/2 C	D12		C
S1/2 T	A1		T
S1	A2		T

Cílové místo restriční endonukleázy je podtrženo, nukleotid 483 genu *cpsK* je kurzívou a je tučně zvýrazněn. Tečky představují shodu nukleotidové sekvence vůči referenční sekvenci KX870076.1 genu *cpsK*.

2.2.3 Ostatní reagenty

Pro PCR byl použit Plain PP Master Mix, katalogové číslo P201, firmy TopBio (Česká republika).

Restriční endonukleáza BstNI, katalogové číslo R0168S, byla zakoupena od firmy New England Biolabs, (USA).

Pro elektroforézu produktů štěpení BstNI byla použita agroza, katalogové číslo P045, firmy TopBio (Česká republika).

Pro vizualizaci DNA v agarózovém gelu byla použita interkalační barva SimplySafe, katalogové číslo E4600-01, firmy EURx Sp. z o.o. (Polsko).

Jako DNA marker byl použit DNA marker 200-1500, katalogové číslo D110, firmy TopBio (Česká republika).

TBE pufr pro elektroforézu.

2.2.4 Přístroje a pomůcky

Automatické pipety 0,5-10 µl, 20-200 µl.

Stolní centrifuga pro zkumavky typu Eppendorf 1,5 ml s adaptéry pro PCR zkumavky 200 µl.

Termocyklér.

Zdroj pro elektroforézu a elektroforetická vana, vanička pro agarózový gel, transiluminátor.

2.3 Pracovní postup

2.3.1 Izolace DNA

DNA pro potřeby PCR byla připravena povařením bakteriální kultury. Část bakteriální kolonie narostlé na pevném médiu byla seškrábnuta sterilní kličkou a resuspendována ve 100 µl sterilní vody. Zkumavka se suspenzí byla zahřívána 5 minut při teplotě 95 °C, poté byla zkumavka

centrifugována 5 minut při 10 000 g. Supernatant byl použit jako templát pro PCR.

2.3.2 Příprava směsi pro PCR a PCR reakce

Do 200 μ l PCR zkumavek umístěných v chlazeném stojánku byla smíchána směs pro PCR. Na jednu reakci byly použity následující objemy reagensů:

Plain PP	5,0 μ l
cpsK-F	1,0 μ l (koncentrace zásobního roztoku primeru 10 pmol/ μ l)
cpsK-R2	1,0 μ l (koncentrace zásobního roztoku primeru 10 pmol/ μ l)
H ₂ O	2,0 μ l
DNA	1,0 μ l

PCR program:

1. 95 °C 5 min
2. 94 °C 15 sec.
3. 53 °C 30 sec.
4. 72 °C 30 sec
5. GOTO 2 29x
6. 72 °C 10 min.
7. 4 °C

2.3.3 Štěpení PCR produktu

Do PCR zkumavky byla pro každý vzorek PCR produktu namíchána následující směs:

PCR produkt	10,0 μ l
NEBbuffer 3.1	2,0 μ l
BstNI (10U)	1,0 μ l
H ₂ O	7,0 μ l

Směs byla inkubována 30 minut při 60 °C.

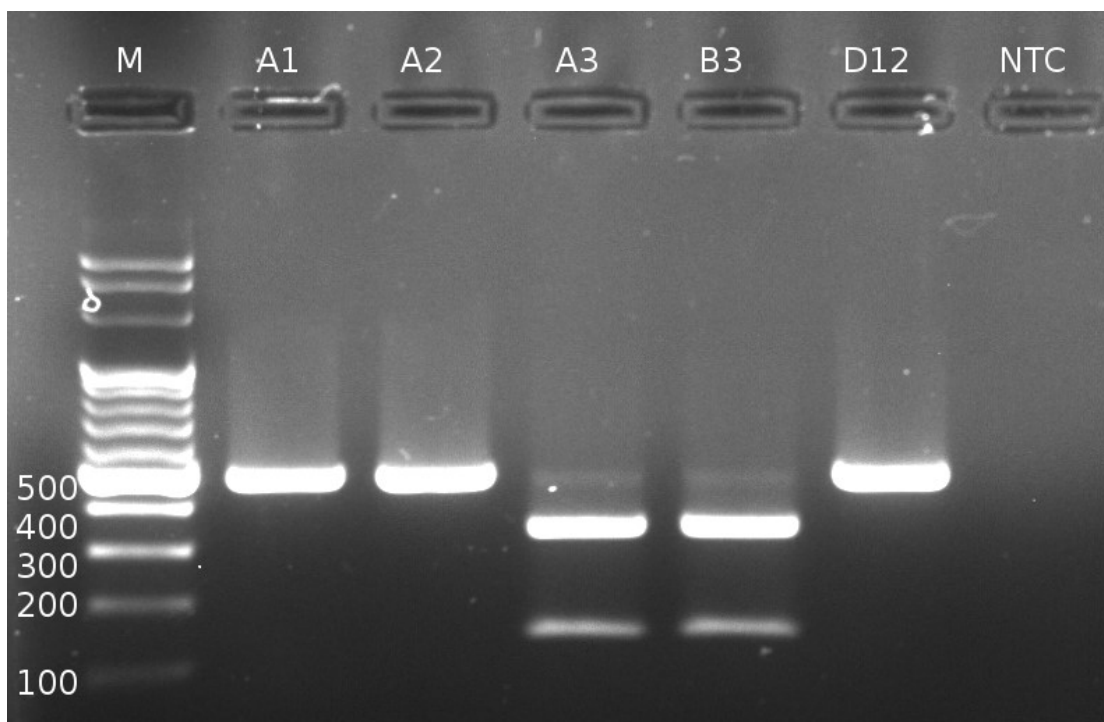
2.3.4 Elektroforéza produktů štěpení

Celý objem reakce štěpení BstNI byl vložen na 2% agarózový gel barvený SimplySafe podle doporučení výrobce. Fragmenty DNA byly děleny při 100V 30 minut.

3. Výsledky

Štěpení PCR produktu na fragmenty 139bp a 347bp detekuje přítomnost 483 nt G v místě pro restriční endonukleázu BstNI. To je spojeno se sérotypem 2 nebo 14. Pokud se PCR produkt neštěpí, jde o sérotyp 1/2 nebo 1 (Obrázek 1).

Obrázek 1. PCR-RFLP genu cpsK



M = DNA marker, čísla ukazují délku fragmentů v bp; vzorky A1 = sérotyp 1/2 T, A2 = sérotyp 1, A3 = sérotyp 2, B3 = sérotyp 14, D12 = sérotyp 1/2 C, NTC = kontrola PCR bez templátu.

III. Srovnání novosti postupu

Podobná metodika rozlišení sérotypů 1/2 vs. 2 a 1 vs. 14 *Streptococcus suis* pomocí PCR-RFLP nebyla dosud v literatuře popsána.

IV. Popis uplatnění metodiky

Certifikovaná metodika je určena diagnostickým laboratorům humánní i veterinární medicíny.

V. Ekonomické aspekty

Náklady na zavedení metodiky v laboratoři vybavené pro provádění PCR a gelové elektroforézy spočívají pouze v nákupu specifických reagentů, tj. primerů a restriční endonukleázy, celkem přibližně 4000 Kč. Přímý ekonomický přínos spočívá v rozšíření služeb sérotypizace *Streptococcus*

suis uživatelem metodiky. Nepřímý přínos spočívá v identifikaci sérotypů *Streptococcus suis* se zoonotickým potenciálem od ostatních sérotypů *Streptococcus suis* a možnosti uplatnění opatření k zabránění infekcí lidí.

VI. Seznam použité literatury

Athey TB, Teatero S, Lacouture S, Takamatsu D, Gottschalk M, Fittipaldi N. 2016. Determining *Streptococcus suis* serotype from short-read whole-genome sequencing data. *BMC Microbiol* 16:162.

Dutkiewicz J, Sroka J, Zając V, Wasiński B, Cisak E, Sawczyn A, Kloc A, Wójcik-Fatla A. 2017. *Streptococcus suis*: a re-emerging pathogen associated with occupational exposure to pigs or pork products. Part I – Epidemiology. *Ann Agric Environ Med* 24:683-695.

Gottschalk M, Segura M, Xu J. 2007. *Streptococcus suis* infections in humans: the Chinese experience and the situation in North America. *Anim Health Res Rev* 8:29–45.

Kerdsin A, Akeda Y, Hatrongjit R, Detchawna U, Sekizaki T, Hamada S, Gottschalk M, Oishi K. 2014. *Streptococcus suis* serotyping by a new multiplex PCR. *J Med Microbiol* 63:824–830.

Liu Z, Zheng H, Gottschalk M, Bai X, Lan R, Ji S, Liu H, Xu J. 2013. Development of multiplex PCR assays for the identification of the 33 serotypes of *Streptococcus suis*. *PLoS One* 8:e72070.

Mittal KR, Higgins R, Lariviere S. 1983. Identification and serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae* by coagglutination test. *J Clin Microbiol* 18:1351-1353.

Okura M, Lachance C, Osaki M, Sekizaki T, Maruyama F, Nozawa T, Nakagawa I, Hamada S, Rossignol C, Gottschalk M, Takamatsu D. 2014. Development of a two-step multiplex PCR assay for typing of capsular polysaccharide synthesis gene clusters of *Streptococcus suis*. *J Clin Microbiol* 52:1714-9.

Okura M, Osaki M, Nomoto R, Arai S, Osawa R, Sekizaki T, Takamatsu D. 2016. Current Taxonomical Situation of *Streptococcus suis*. *Pathogens* 5:45.

Roy D, Athey TBT, Auger JP, Goyette-Desjardins G, Van Calsteren MR, Takamatsu D, Okura M, Teatero S, Alcorlo M, Hermoso JA, Segura M, Gottschalk M, Fittipaldi N. 2017. A single amino

acid polymorphism in the glycosyltransferase CpsK defines four *Streptococcus suis* serotypes. *Sci Rep* 7:4066.

VII. Seznam publikací, které předcházely metodice

Matiasovic J, Zouharova M, Nedbalcova K, Kralova N, Matiaskova K, Simek B, Kucharovicova I, Gottschalk M. 2020. Resolution of *Streptococcus suis* serotypes 1/2 versus 2 and 1 versus 14 by PCR-restriction fragment length polymorphism method. *J ClinMicrobiol* 58:e00480-20. <https://doi.org/10.1128/JCM.00480-20>

VIII. Dedikace

Certifikovaná metodika „Metoda PCR-RFLP pro rozlišení sérotypu 1/2 *Streptococcus suis* od sérotypu 2 a sérotypu 1 od sérotypu 14“ vznikla při řešení projektu NAZV QK1810193 a podpory MZE na rozvoj výzkumné organizace č. RO0518.



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