



CERTIFIKOVANÁ METODIKA

Kvalitativní detekce viru Prasečí chřipky pomocí metody MOL-PCR

Mgr. Magdaléna Krásna
Mgr. Jakub Hrdý
Mgr. Hana Malenovská

UPLATNĚNÁ CERTIFIKOVANÁ METODIKA

č. 135/2020

Kvalitativní detekce viru Prasečí chřipky pomocí metody MOL-PCR

Autoři

Mgr. Magdaléna Krásna, Mgr. Jakub Hrdý, Mgr. Hana Malenovská

Uvedená certifikovaná metodika je výstupem projektu Bezpečnostního výzkumu MV ČR VI20152020044 a projektu MŠMT LD15056. Zveřejňování této metodiky či jejích částí podléhá omezením vyplývajících z požadavků MV a MO ČR.

ISBN 978-80-88233-97-8

Oponenti certifikované metodiky:

Mgr. Pavla Holočová, Ph.D

Joint CBRN Defence Centre of Excellence

Prof. RNDr. Aleš Knoll, Ph.D.

Mendelova univerzita v Brně

Předmluva

Prasečí chřipka (SIV) patří mezi respirační nemoci postihující prasata domácí (*Sus scrofa domestica*). Původcem onemocnění je chřipkový virus typu A (*Influenza A virus*, FLUAV-A). První zmínka o SIV pochází z roku 1918-1919, tedy z období probíhající pandemie Španělské chřipky. Původce byl poprvé izolován a identifikován v roce 1930 (Shope et al. 1931). Typickými symptomy prasečí chřipky jsou kašel, kýchaní, rýma, teplota, únava, respirační problémy, pokles apetitu.

SIV je obalený RNA virus z čeledi, *Orthomyxoviridae* (Palese et al., 2007) přičemž genom je kódován jednovláknitou RNA s negativní polaritou, která je rozdělená na osm RNA segmentů, které kódují okolo 10 – 17 virových proteinů. Každý jeden segment utváří virový ribonukleotidový komplex, který obsahuje nukleoprotein (NP) a 3 polymerázové proteiny (PB2, PB1 a PA). Ve virovém obale jsou lokalizovány 2 hlavní glykoproteiny, hemmaglutinín (HA) a neuroimidáza (NA) (Gamblin et al. 2010).

Samotný virus influenzy A může být vzájemně přenesen z prasat na lidi nebo ptáky a naopak. FLUAV-A se na základě kombinací HA a NA dělí na subtypy, přičemž jednotlivých HA je 18 (H1-H18) a NA je 11 (N1-N11). Jednotlivé subtypy vznikají při přenosu mezi jednotlivými druhy hostitelů (Gamblin et al. 2010; Tong et al., 2012; Tong et al., 2013) výměnou RNA segmentů, k ní může docházet při infekci buněk hostitele více typy viru zároveň (genetický shift) nebo bodovými mutacemi (genetický drift) (Kuntz et al., 2009; Van Reeth et al., 2012; Zell et al., 2013; Cheung et al., 2007; Vincent et al. 2014). Právě prasečí chřipka hraje významnou roli v ekologii chřipkového viru A. Nejčastějšími subtypy SIV jsou H1N1, H1N2 a H3N2 (Van Reeth et al., 2012). Dalšími proteiny jsou membránový (M1) a matrixový (M2) protein. M1 protein zabezpečuje zabalení viru do kapsidového obalu a M2 umožňuje jeho odbalení po vstupu do hostitelské buňky (Furuse et al. 2009).

Molekulární diagnostika FLUAV-A využívá reverzně transkripční qPCR, přičemž je zaměřená na matrixový protein M2 a HA. Identifikace NA následně umožňuje určení subtypu (Bonin et al. 2018).

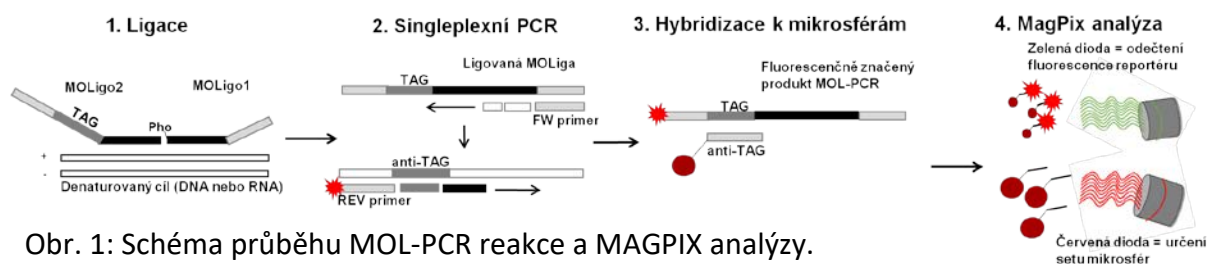
I) Cíl Metodiky

Předkládaná metodika nabízí rychlý a standardizovaný postup detekce přítomnosti viru prasečí chřipky, respektive jeho nukleové kyseliny (RNA), ve vzorku. Tato metodika může být součástí komplexní multiplexní detekce patogenů, která umožňuje detekovat v jedné reakci až několik desítek různých patogenů, přičemž jako templátová DNA/RNA může být použita izolovaná nukleová kyselina (NK) různého původu, např. z tkání a krve zvířat, z prostředí, vody nebo surovin a masných výrobků určených pro lidskou spotřebu, případně krmné směsi pro zvířata. Metodika je využitelná jako vhodný komplexní nástroj pro skríninkové testy na široké spektrum patogenů.

II) Vlastní popis metodiky

1 Popis MOL-PCR systému s předcházejícím krokem RT

Průkaz přítomnosti SIV je založen na detekci specifické sekvence vyskytující se v genomu tohoto viru. Prvním krokem analýzy je provedení reverzní transkripce (RT) za využití specifického primeru. Poté následuje multiplexní MOL-PCR systém (Reslova et al. 2019), kde detekce probíhá prostřednictvím hybridizace dvou specifických modulárních detekčních sond neboli MOLig bezprostředně vedle sebe k cílové sekvenci a jejich následné ligace v jednu komplexní sekvenci; ta je amplifikována a specificky vychytána na povrch magnetických mikrosfér prostřednictvím hybridizace TAG/anti-TAG sekvencí (syntetické sekvence obsahující pouze báze T, A a G, specifické pouze pro daný typ mikrosfér). Modularita MOLig (Obr. 1) spočívá v tom, že kromě cílově specifické sekvence nesou také sekvenci pro vazbu univerzálních PCR primerů a TAG sekvenci pro vazbu k anti-TAGu na povrchu magnetických mikrosfér. Jednotlivé sety mikrosfér (dostupných 50 setů) se odlišují koncentrací dvou vnitřních fluoroforů, což umožňuje přesnou identifikaci jednotlivých setů mikrosfér a tak i identifikaci specifického cíle vyvázaného na jejich povrchu. Samotné kvalitativní vyhodnocení probíhá prostřednictvím odečtení fluorescenčního signálu mikrosfér, které je přímo úměrné množství na jejich povrchu přichycených fluorescenčně značených produktů MOL-PCR.



Obr. 1: Schéma průběhu MOL-PCR reakce a MAGPIX analýzy.

Pho = fosfátová skupina umožňující ligaci; černě = sekvence specifická pro zachycovaný cíl; šedě = vazebná sekvence pro univerzální PCR primery; TAG = sekvence komplementární k anti-TAGu na mikrosférách; červeně = fluorescenční reportér.

Do každé reakce je přidána interní kontrola, která upozorní na falešně negativní výsledek v důsledku přítomnosti inhibitorů ovlivňujících průběh reakce.

Cíl – M2_SIV

Protein M2 (matrixový protein) patří mezi minoritní obalové proteiny. Utváří protonový kanál, který je potřebný pro odbalení viru z kapsidy po vstupu do hostitelské buňky.

Sekvence primeru pro reverzní transkripci

Sekvence primeru pro reverzní transkripci byla navržena dle analýzy oblasti kódující protein M2 SIV. Byl zvolen konzervativní úsek předcházející části genomu, na kterou jsou navrženy specifické modulární detekční sondy.

R_SIV_M: 5'- TTGTATATGAGGCCCATRCAACTGGC - 3' (26)

Sekvence MOLig:

Tučně = sekvence pro vazbu univerzálních PCR primerů; podtrženě = sekvence specifická pro SIV; malá písmena = TAG sekvence MTAG-A045 umožňující specifickou vazbu k mikrosférám (set A045); PHO = fosfátová skupina.

SIV_A_M01_M1:

5' - PHO -CCTWAACGGRAAYGGKGACCCTCTCACTTCTTACTACCGCG – 3' (41)

SIV_A_M01_M2:

5' - ACTCGTAGGGAATAAACCGTgtagttatgatgaatattgtgtaRCGTAGACGCTTTGTYCA
AAATGC – 3' (68)

1.1 Interní kontrola

Interní kontrola (IC) je přidávána do každé reakce. Slouží nejen k odhalení falešně negativních výsledků v důsledku inhibice MOL-PCR reakce, ale také jako pozitivní kontrola. IC byla navržena tak, aby pro všechny MOL-PCR systémy mohl být použit stejný pár IC MOLig a stejná sada univerzálních PCR primerů; jedná se tedy o univerzální IC. Při přípravě IC byla použita nekompetitivní syntetická sekvence založená na DNA sekvencích dvou vyhynulých

druhů; konkrétně se jedná o mitochondriální DNA vakovlka tasmánského (*Thylacinus cynocephalus*, Acc. No. FJ515781.1) a ptáka moa (*Dinornis struthoides*, Acc. No. AY326187.1). Tato kontrolní syntetická sekvence o délce 150 bp byla převzata z Mikel et al. (2016), syntetizována *de novo* a klonována do plazmidu. Takto připravený konstrukt je zcela arteficiální a podobná sekvence se nevyskytuje v žádném známém živočišném, rostlinném, bakteriálním či virovém druhu. IC je tedy možné použít pro jakýkoliv templát či matici. IC je skladována při teplotě $-20\text{ °C} \pm 4\text{ °C}$ ve 2 ml zkumavkách se šroubovacím víčkem do vypotřebování.

Sekvence MOLig:

Tučně = sekvence pro vazbu univerzálních PCR primerů; podtržené = sekvence specifická pro IC; malá písmena = TAG sekvence MTAG-A014 umožňující specifickou vazbu k mikrosférám; PHO = fosfátová skupina.

IC_2_M1

5'-PHO- ATTAGCACAATGAATAATCATCGTCTCACTTCTTACTACCGCG- 3' (43)

IC_2_M2

5'-ACTCGTAGGGAATAAACCGTtattgtgaaagaaagagaagaattTATACACACGCAATCA
CCAC- 3' (64)

Tyto sondy jsou komplementární k úseku kontrolní syntetické sekvence o délce 43 bp. Celková délka produktu ligace detekčních sond, a tím i amplikonu = 107 bp.

Sekvence univerzálních primerů:

Univerzální primery byly převzaty z publikace Thierry et al. (2013). Reverzní primer je značen fluoroforem BODIPY-TMRX, který v reakci slouží jako reportérová molekula značící výsledný produkt.

uni FW: 5'-CGCGGTAGTAAGAAGTGAGA - 3' (20)

uni REV: 5'-BODIPY-TMRX - ACTCGTAGGGAATAAACCGT - 3' (20)

Tato sada univerzálních primerů amplifikuje produkty ligace o výsledné délce 106 bp.

2 Předmět a působnost

Tato metodika slouží ke kvalitativní detekci SIV pomocí konzervovaného cílového genu M2 při komplexní analýze vzorků pocházejících z prostředí, trusu či potravin živočišného původu prostřednictvím MOL-PCR.

3 Podstata zkoušky

Základem je multiplexní oligonukleotidová ligační polymerázová řetězová reakce (MOL-PCR) s interní kontrolou (IC). Komplexní a simultánní detekce demonstrována v multiplexu čítajícím 4 virové systémy – virus reprodukčního a respiračního syndromu prasat 1 a 2 (PRRSV1 a PRRSV2), prasečí chřipky, SARS-CoV-2. Kvalitativní detekce probíhá prostřednictvím odečtení fluorescenčního signálu vzorku oproti negativní kontrole.

4 Přístroje a pomůcky

- DNA Engine Dyad Peltier Thermal Cycler (Bio-Rad, USA)
- Bio-Plex MAGPIX Multiplex Reader (Bio-Rad, USA)
- xPONENT 4.2. ® SOFTWARE (Luminex, USA)
- Ultrasonic Cleaning Bath (BioTech, Česká republika)
- Sada pipet:
 - s rozsahem nastavitelným od 1000 – 5000 µl (s chybou do 5%)
 - s rozsahem nastavitelným od 200 – 1000 µl (s chybou do 5%)
 - s rozsahem nastavitelným od 20 – 200 µl (s chybou do 5%)
 - s rozsahem nastavitelným od 5 – 50 µl (s chybou do 5%)
 - s rozsahem nastavitelným od 0,5 – 10 µl (s chybou do 5%)
- Špičky s filtrem k pipetám s příslušným rozsahem
- Sterilní mikrozskumavky o objemu 0,2 ml x 96 se separátními víčky (Bioplastics, Nizozemsko)
- PCR deska s jamkami na objem 0,2 ml (Bioplastics, Nizozemsko)
- Chladnička (do 5 °C)
- Mrazicí box (-20 °C)
- Centrifuga MiniSpin
- Vortex V-1 Plus

5 Referenční kmeny

System byl testován na referenčním kmenu Influenza A virus (CAPM V-1, kmen: A/sw/Měrotín/57), který byl získán ze Sbírký zoopatogenních mikroorganismů (CAPM), Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i..

6 Chemikálie a roztoky

6.1 Reverzní transkriptáza, inhibitor RNáz, dNTP

PrimerScript Reverse Transcriptase a 5X PrimeScript buffer (Moloney Murine Leukemia Virus; 200 U/μl; Takara), katalogové číslo 2680A. RNase Inhibitor (40 U/μl; New England Biolabs), katalogové číslo M0307L. dNTP PCR Mix (solution 10 mM, Serva), katalogové číslo 3971202. Reverzní transkriptázu, inhibitor RNáz a dNTP mix je nutné skladovat při teplotě -20 °C. Za normálních podmínek jsou stabilní do data expirace.

6.2 Ligáza

Hifi *Taq* DNA Ligase a 10X Hifi *Taq* DNA Ligase Reaction Buffer (New England BioLabs, USA), katalogové číslo M0647 S. Ligázu s pufrem je nutné skladovat při teplotě -20 °C. Za normálních podmínek je stabilní do data expirace.

6.3 Master Mix

2X EliZyme™ HS Robust MIX (Elisabeth Pharmacon, Česká republika), katalogové číslo EZ6060. Master Mix je doporučeno skladovat při teplotě -20 °C a neměl by být dlouhodobě vystavován světlu. V případě skladování Master Mixu při teplotě 4 °C je stabilita deklarována po dobu jednoho měsíce. Při dodržení zmíněných podmínek je Master Mix stabilní do data expirace.

6.4 Voda pro RT a MOL-PCR

Pro ředění všech komponent MOL-PCR reakce se používá voda PCR H₂O (Top-Bio, Česká republika), katalogové číslo P242. Pro složky RT se používá RNase-free voda - PCR Ultra H₂O (Top-Bio, Česká republika), katalogové číslo P240. Skladuje se při pokojové teplotě.

6.5 Ředění MOLig a primerů

Specifická MOLiga, univerzální PCR primery a primery pro reverzní transkripci se dodávají v lyofilizovaném stavu od firmy Generi-Biotech (Česká republika). Podle návodu uvedeného výrobcem jsou na pracovišti rozpuštěny v PCR H₂O či PCR Ultra H₂O (Top-Bio, Česká republika) tak, aby výsledná zásobní koncentrace byla 100 pmol/μl. Sondy i primery jsou evidovány a uloženy v mrazničce při teplotě cca -20 °C ± 4 °C. Při přípravě ligačního premixu se používá pracovní roztok o koncentraci MOLig 1 pmol/μl, jak je uvedeno v odstavci 5.7. Při přípravě prvního premixu pro RT a PCR premixu se používá pracovní roztok o koncentraci univerzálních a reverzních primerů 10 pmol/μl, jak je uvedeno v odstavci 5.6.1 a 5.8.

6.6 Příprava RT premixu

Pro reprodukovatelnou kvantitativní detekci pomocí MOL-PCR s předcházejícím krokem RT je doporučeno připravit si alikvoty premixů pro 100 reakcí. Pro reverzní transkripci je zapotřebí dvou směsí. První směs se skládá z reverzních primerů pro detekované cíle a interní kontrolu, dNTP a RNA interní kontroly. Tento premix je možné připravit předem a uchovávat v alikvotech pro jednu reakci při cca -70 °C ± 4 °C. Před použitím se k 5 μl tohoto premixu přidá 5 μl templátové izolované RNA.

6.6.1 První RT mix

Jednotlivé složky je doporučeno přidávat podle uvedeného pořadí:

Objem RNase-free vody je nutno nejprve dopočítat v závislosti na množství použitých reverzních primerů v reakci.

Složka	1 reakce	100 reakcí	Výsledná koncentrace
RNase-free voda	dopočítaný objem do 10μl	100 × dopočítaný objem do 10μl	
dNTP mix (10 nmol/μl)	1 μl	100 μl	0,5 nmol/μl
R_SIV_M_primer (10 pmol/μl) pro cíl	0,2 μl	20 μl	0,1 pmol/μl
IC_RT_primer (10 pmol/ μl) pro IC	0,2 μl	20 μl	0,1 pmol/μl
Směs reverzních primerů (10 pmol/ μl)	x × 0,2 μl	x × 20 μl	0,1 pmol/μl
IC RNA (1 fg/ μl)	1 μl	100 μl	50 ag/ μl
Templátová RNA	5 μl	100 × 5 μl	
Celkem	10 μl	1000 μl	

x = počet dalších reverzních primerů v multiplexní reakci

Po provedení denaturačního kroku se směsí templátové RNA a prvního RT mixu se ke vzorku přidá 10 µl druhého RT mixu, který je nutné připravit předem těsně před použitím na daný počet vzorků.

6.6.2 Druhý RT mix

Jednotlivé složky je doporučeno přidávat podle uvedeného pořadí:

Složka	1 reakce	Výsledná koncentrace
RNase-free voda	5 µl	
Primescript reaction buffer	4 µl	1X
PrimeScript enzyme (200 U/µl)	0,5 µl	5 U/µl
RNase Inhibitor (40 U/µl)	0,5 µl	1 U/µl
Celkem	10 µl	

6.7 Příprava ligačního premixu

Pro reprodukovatelnou kvantitativní detekci pomocí MOL-PCR je doporučeno připravit si alikvoty premixů pro 100 reakcí. Pokud není ligační premix použit okamžitě, je zapotřebí jej uchovávat rozdělen na dvě části, jedna obsahuje pouze MOLiga 1 (M1) a druhá pouze MOLiga 2 (M2). Obě tyto směsi obsahují kromě MOLig i příslušné množství vody a ligačního pufru. Před použitím se tyto dvě směsi smíchají dohromady a k výslednému roztoku se přidá pouze dané množství ligázy a templátové DNA, respektive cDNA. Premixy se skladují při cca -20 °C ± 4 °C. Alikvoty premixů lze opakovaně zamrazovat a rozmrazovat, maximálně však 5×.

Jednotlivé složky je doporučeno přidávat podle uvedeného pořadí:

Objem RNase-free vody je nutno nejprve dopočítat v závislosti na množství použitých MOLig v reakci.

Složka	1 reakce	100 reakcí	Výsledná koncentrace
PCR voda	dopočítaný objem do 25µl	100 × dopočítaný objem do 2500µl	
10X Hifi <i>Taq</i> DNA Ligase Reaction Buffer	2,5 µl	250 µl	1X
MOLigo sondy SIV_A_M01_M1 a SIV_A_M01_M2 pro cíl (1 pmol/µl každá)	2 × 0,125 µl	2 × 12,5 µl	5 nM každá
MOLigo sondy IC_2_M1 a IC_2_M2 pro IC (1 pmol/µl každá)	2 × 0,125 µl	2 × 12,5 µl	5 nM každá

Směs MOLig (1 pmol/μl každá)	$x_1 \times 0,125 \mu\text{l}$	$x_1 \times 12,5 \mu\text{l}$	5 nM každá
Hifi <i>Taq</i> DNA Ligase	0,5 μl	50 μl	
Templátová DNA/cDNA	2,5 μl	$100 \times 2,5 \mu\text{l}$	
Celkem	25 μl	2500 μl	

x_1 = počet dalších MOLigo sond v multiplexní reakci

6.8 Příprava PCR premixu

Pro reprodukovatelnou kvalitativní detekci pomocí MOL-PCR je doporučeno připravit si alikvoty premixů pro 100 reakcí skládající se ze všech komponent kromě produktů ligace, které je vždy nutno využít čerstvé. Premixy se skladují při cca $-20 \text{ }^\circ\text{C} \pm 4 \text{ }^\circ\text{C}$. Alikvoty premixů lze opakovaně zamrazovat a rozmrazovat, maximálně však 5×.

Jednotlivé složky je doporučeno přidávat podle uvedeného pořadí:

Složka	1 reakce	100 reakcí	Výsledná koncentrace
PCR voda	5,25 μl	525 μl	
2X EliZyme™ HS Robust MIX	12 μl	1200 μl	1×
Primer uni FW (10 pmol/μl)	0,15 μl	15 μl	0,0625 μM
Primer uni REV-BODIPY (10 pmol/μl)	0,6 μl	60 μl	0,25 μM
Produkt ligace	6 μl	$100 \times 6 \mu\text{l}$	
Celkem	24 μl	2400 μl	

6.9 Magnetické mikrosféry

MagPlex® Microspheres ($12,5 \times 10^6$ mikrosfér/ml; Luminex Corp., USA), katalogové číslo MC100XX-01 (XX = 12-78, dle seznamu dostupných setů od firmy Luminex Corp.). Potažené mikrosféry v 1X TE pufru je nutno skladovat v chladničce při teplotě $4 \text{ }^\circ\text{C}$ a chránit před světlem. Za normálních podmínek jsou stabilní déle než 1 rok. Před každým použitím je nutno mikrosféry řádně vortexovat a sonifikovat asi 30 s.

6.10 Roztoky pro hybridizaci

Roztoky, které jsou součástí kuličkového mixu (odstavec 5.11) se připravují za použití ultračisté vody. Výsledné roztoky je třeba přefiltrovat 0,22 μm filtrem a rozalikvotovat do

zkumavek o objemu 50 ml. Z důvodu předcházení kontaminací je pak vhodné používané roztoky měnit každé 3 měsíce.

Příprava hybridizačních roztoků a jejich skladování:

Složka	Katalog. č.	Výsledná koncentrace	Množství/250 ml	pH	Skladování
MES	Sigma-Aldrich M2933 (USA)	0,1 M	4,88 g	4,5	4 °C
NaCl	Carl-ROTH 3957 (Německo)	5 M	73,05 g		pokojová teplota
100X TE pufr	SERVA 39799.02 (Německo)	1X	2,5 ml	8,0	pokojová teplota

6.11 Příprava kuličkového mixu

Kuličkový mix se připravuje čerstvý pro konkrétní počet vzorků a ihned upotřebí k hybridizaci MOL-PCR produktů k povrchu magnetických mikrosfér; kuličkový mix se nepřipravuje a neuchovává ve formě premixu. Podle počtu MOLig v reakci (očekávaných cílů) se přidává příslušný počet specifických setů mikrosfér.

Jednotlivé složky je doporučeno přidávat podle uvedeného pořadí:

Složka	1 reakce	100 reakcí	Výsledná koncentrace
0,1 M MES	2,5 µl	250 µl	0,05 M
5 M NaCl	0,8 µl	80 µl	0,8 M
Směs potažených MagPlex [®] Microspheres	1 250 mikrosfér/set	125 000 mikrosfér/set	
1X TE pufr	doplnit objem	100 × doplnit objem	
Celkem	5 µl	500 µl	

6.12 Příprava hybridizační reakce

Hybridizační reakce se připravuje čerstvá pro konkrétní počet vzorků v reakci a ihned probíhá specifická hybridizace MOL-PCR produktů k povrchu mikrosfér; hybridizační reakce se nepřipravuje a neuchovává ve formě premixu.

Jednotlivé složky je doporučeno přidávat podle uvedeného pořadí:

Složka	1 reakce	100 reakcí
Kuličkový mix	5 µl	500 µl
MOL-PCR produkt	10 µl	100 × 10 µl
Celkem	15 µl	1500 µl

6.13 Analyzační pufr

Roztok se připravuje za použití ultračisté vody. Výsledný roztok analyzačního pufru je třeba přefiltrovat 0,22 µm filtrem a rozalíkvotovat do zkumavek o objemu 5 ml, které slouží na jedno použití. Nutno skladovat v chladničce při teplotě 4 °C.

Složení a příprava analyzačního pufru:

Složka	Katalog. č.	Výsledná koncentrace	Množství/250 ml	pH
1 M Tris-Cl	Sigma T1503 ^a	10 mM	2,5 ml	8,0
0,5 M EDTA	Amresco E522	0,1 mM	50 µl	
5 M NaCl	Carl ROTH 3957	90 mM	4,5 ml	
100% Tween 20	Alpha Diagnostic Intl Inc TW-100100	0,02 %	50 µl	
ultračistá H ₂ O	Millipore		242,9 ml	

^a = zásobní Trizma base neobsahuje Cl⁻, ten je doplněn během úpravy pH pomocí HCl kyseliny

6.14 Kalibrační a verifikační kity pro MAGPIX

Kalibrační kit MAGPIX® Calibrator Kit, RUO, 25 Uses (Luminex Corp., USA), katalogové číslo MPX-CAL-K25 a verifikační kit MAGPIX® Performance Verification Kit, RUO, 25 Uses (Luminex Corp., USA), katalogové číslo MPX-PVER-K25. Oba kity je doporučeno skladovat při teplotě 4 °C a chránit před světlem. Za normálních podmínek jsou kity stabilní do data expirace. Před každým použitím je nutno všechny složky kitů řádně vortexovat a sonifikovat asi 30 s. xPONENT 4.2. ® SOFTWARE sám naznačí, kdy je třeba provést kalibraci a verifikaci přístroje; kalibrace a verifikace se provádí dle individuálního nastavení (standardně každých 60 dní).

6.15 Drive fluid

MAGPIX® Drive Fluid (Luminex Corp., USA), katalogové číslo MPXDF-4PK. Drive fluid je doporučeno skladovat při pokojové teplotě. Za normálních podmínek je stabilní do data expirace.

6.16 Roztoky pro údržbu přístroje MAGPIX

Údržbové rutiny přístroje i samotná analýza vyžadují doplnění dH₂O, 70% isopropanolu, 0,1 N NaOH. Roztoky se připravují za použití ultračisté vody. Výsledné roztoky se skladují při pokojové teplotě a užívají se až do úplné spotřeby.

Složka	Katalog. č.	Výsledná koncentrace	Množství/250 ml	Skladování
100% isopropanol	PENTA 17510-20005 (Česká republika)	70%	180 ml	pokojová teplota
NaOH	PENTA 15760-31000 (Česká republika)	0,1 M	0,1 g	pokojová teplota

7 Postup zkoušky

7.1 Bezpečnostní opatření

Provedení metody nevyžaduje žádné zvláštní bezpečnostní opatření.

7.2 Okolní podmínky zkoušky

Provedení metody nevyžaduje kontrolu žádných limitních podmínek.

7.3 Množství vzorku

Do každé jamky je napipetováno 5 μ l prvního premixu pro RT a přidá se 5 μ l templátové RNA. Po provedení denaturace se ke vzorku přidá 10 μ l druhého premixu pro RT. Po RT je 2,5 μ l templátové DNA, respektive cDNA, přeneseno do 22,5 μ l ligačního premixu. Po ligaci se 6 μ l produktu přenesou k 18 μ l PCR premixu. Dále je 10 μ l výsledného MOL-PCR produktu přidáno k 5 μ l kuličkového mixu pro hybridizaci a před samotnou analýzou je celý objem reakce navýšen o 45 μ l analyzačního pufru na výsledných 60 μ l.

7.4 Slepý pokus

7.4.1 Negativní kontrola

Jako negativní kontrola (no template control, NTC) je do RT přidána PCR Ultra H₂O (Top-Bio, Česká republika) v ekvivalentním množství k templátové RNA, tedy 5 μ l. Negativní kontrola musí být použita v každém experimentu.

7.4.2 Pozitivní kontrola

Jako pozitivní kontrola slouží IC. RNA i MOLiga pro IC se přidávají do každého vzorku a musí být použity v každém experimentu.

7.5 Replikáty

Každý vzorek se analyzuje nejméně v duplikátu a připravují se alespoň dvě NTC na jeden multiplexní ligační mix.

7.6 Kalibrace měřícího prostředku před zkouškou

Po spuštění přístroje je třeba vždy provést několik úkonů. Nejprve se sací jehla promyje a sonifikuje v destilované vodě (dH₂O). Zkontroluje se naplnění kontejnerů pro Drive fluid a odpad (waste container). V programu xPONENT 4.2. ® SOFTWARE se postupně navolí údržbové rutiny: Calibration and Verification, Verification a Prime aj. (dle potřeby). Po skončení analýz se před vypnutím přístroje vždy provádí rutina Shut Down.

7.7 Provedení zkoušky

7.7.1 Protokol reverzní transkripce

Přístroj: DNA Engine Dyad Peltier Thermal Cycler (Bio-Rad, California, USA)

1 cyklus	Denaturace	95 °C (3 min)
		65 °C (5 min)
	Chlazení	led (5 min)

1 cyklus	Reverzní transkripce	42 °C (60 min)
		70 °C (15 min)
	Hold ^a	10 °C

^a uchování do dalšího zpracování; doporučeno zpracovat během jednoho dne

7.7.2 Ligační protokol

Přístroj: DNA Engine Dyad Peltier Thermal Cycler (Bio-Rad, California, USA)

1 cyklus	Úvodní denaturace	95 °C (10 min)
20 cyklů	Denaturace	95 °C (30 s)
	Ligace	59 °C (1 min)
	Hold ^a	10 °C

^a uchování do dalšího zpracování; nutno zpracovat během jednoho dne

7.7.3 PCR protokol

Přístroj: DNA Engine Dyad Peltier Thermal Cycler (Bio-Rad, California, USA)

1 cyklus	Úvodní denaturace	95 °C (2 min)
40 cyklů	Denaturace	95 °C (15 s)
	Annealing/ Elongace	60 °C (15 s)
		72 °C (15 s)
	Hold ^a	10 °C

^a uchování do dalšího zpracování

7.7.4 Hybridizační protokol

Přístroj: DNA Engine Dyad Peltier Thermal Cycler (Bio-Rad, California, USA)

1 cyklus	Úvodní denaturace	96 °C (90 s)
1 cyklus	Hybridizace	37 °C (30 min)

Pozn.: doporučeno okamžité zpracování

7.7.5 Analýza

Přístroj: Bio-Plex MAGPIX Multiplex Reader (Bio-Rad, California, USA). Analýza probíhá při pokojové teplotě a měření 96-ti jamkové desky trvá asi 45 minut. Naměřené hodnoty jsou zobrazeny v xPONENT 4.2. ® SOFTWARE (Luminex, USA), odkud jsou hrubá data exportována do Excelu, kde jsou jednoduchým výpočtem vyhodnocena.

8 Výpočet a vyjádření výsledku

8.1 Hodnocení výstupu

Od naměřených hodnot mediánu intenzity fluorescence (MFI) se odečte hodnota MFI příslušné negativní kontroly NTC pro daný region mikrosfér. **Je-li výsledná hodnota (P) vyšší než 100, vzorek je vyhodnocen jako pozitivní.**

$$P_{\text{vzorku}} = \text{MFI}_{\text{vzorku}} - \text{MFI}_{\text{NTC}}$$

8.1.1 Kvalitativní hodnocení

Kvalitativní hodnocení se provádí podle následující tabulky:

Cíl	IC	Celkový výsledek
Pozitivní (+)	Pozitivní (+)	Vzorek je pozitivní na přítomnost SIV
Pozitivní (+)	Negativní (-)	Vzorek je pozitivní na přítomnost SIV ^a
Negativní (-)	Pozitivní (+)	Vzorek je negativní na přítomnost SIV
Negativní (-)	Negativní (-)	Vzorek je inhibován ^b

Vzorek je považován za pozitivní, pokud je pozitivní alespoň v jednom opakování.

^aVzorek je pozitivní na přítomnost detekovaného cíle, nicméně je negativní v případě interní kontroly. V tomto případě neproběhla reakce ideálním způsobem a je nutné izolovanou NK 5× a 10× naředit, případně zopakovat izolaci NK ze zásobního duplikátu, a detekční reakci

zopakovat. Ředění je třeba vzít v potaz v rámci vyhodnocování výsledků celého analytického postupu.

^bVzorek je negativní v případě interní kontroly. V tomto případě neproběhla reakce ideálním způsobem a je nutné izolovanou NK 5× a 10× naředit, případně zopakovat izolaci NK ze zásobního duplikátu, a detekční reakci zopakovat. Ředění je třeba vzít v potaz v rámci vyhodnocování výsledků celého analytického postupu.

9 Validace

9.1 Specificita

Navržené sekvence MOLig byly porovnány pomocí algoritmu BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Sekvence specifické pro cílové geny byly 100% identické s referenčními sekvencemi zastoupenými v databázi a současně nevykazovaly identitu s jinými organismy. Specificita převzatých univerzálních primerů byla ověřena na 13-ti genotypch *Bacillus anthracis* v případě Thierry et al. (2013), ale mimo jiné také na 11-ti sérotypech *Escherichia coli* (STEC) v publikaci Woods et al. (2016).

9.2 Optimalizace reakčních podmínek

Koncentrace jednotlivých MOLig byla optimalizována tak, aby nedocházelo k nespecifickým reakcím s jinými MOLigy v multiplexní ligaci a zároveň vznikalo co nejvíce ligačních produktů. Koncentrace univerzálních primerů byla optimalizována tak, aby nedocházelo k amplifikaci jednoho cíle na úkor druhého a aby zároveň vznikal fluorescenčně značený produkt ve zvýšené míře. IC byla optimalizována tak, aby byly přednostně amplifikovány a detekovány cílové sekvence. Tvorba primer-dimerů a nespecifických produktů byla zkontrolována pomocí meltingové analýzy.

Funkčnost optimalizovaných reakčních podmínek byla ověřena v monoplexních i multiplexních formátech reakce, přičemž nejvyšší testovaná úroveň multiplexu čítala 8 systémů.

9.3 Kruhový test

Vzorky pro kruhový test byly připraveny na VÚVeL v podobě koncentračního gradientu izolované NK s ohledem na empiricky stanovenou citlivost multiplexní MOL-PCR reakce 1 – 0,1 ng templátové NK pro daný cíl (Stucki et al. 2012; Thierry et al. 2013).

MOL-PCR s předcházejícím krokem RT i analýza byly provedeny a vyhodnoceny podle postupu popsaného v této certifikované metodice. Hodnota SM (stopové množství) představuje koncentraci cílové NK na hranici limitu detekce.

Vzorek	Vzorek po izolaci a reverzní transkripci (cDNA)	Kvalitativní detekce SIV			
		VÚVeL	VVeTÚ Hlučín	VFU Brno	CBO Těchonín
Z	Neředěný	+	+	+	+
5X	5X ředěný	+	+	+	+
10X	10X ředěný	+	+	+	+
SM	stopové množství	+	+	+	-
Ex	Negativní + 10X ředěná DNA <i>S. aureus</i>	-	-	-	-
K+	IC	+	+	+	+
NTC	Negativní	-	-	-	-

Výsledky kruhového testu potvrdily použitelnost metodiky v rutinní laboratorní praxi.

10 Operativní řízení jakosti

Je řešeno:

- 1) pomocí negativní kontroly
- 2) interní kontrolou (IC)

III) SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

Představená metodika je oproti dříve publikovaným postupům inovativní svým vysokým stupněm multiplexu, schopného kombinovat detekci několika nezávislých cílů a interní kontroly. Tato kombinace tak umožňuje rychlý skrínink vyšetřovaného vzorku na předpokládané spektrum patogenů, jejichž výskyt je vázaný na danou matici a současně umožňuje vyloučit falešně negativní výsledek v důsledku přítomnosti inhibitorů. Zároveň jsou pro tuto metodiku stanoveny parametry limitu detekce. Na základě rychlé a spolehlivé kvalitativní detekce je pak možno vybrané vzorky vykazující pozitivitu podrobit kvantifikační analýze pomocí RT-qPCR, a determinovat tak infekční dávku.

Předložená metodika byla vyvinuta s ohledem na její budoucí diagnostické uplatnění. Proto u ní byla provedena kompletní optimalizace, otestována specifita a citlivost,

propracován systém kontrol a hodnocení. Funkčnost byla ověřena pro monoplexní i vysoce multiplexní účely. Předložený MOL-PCR systém s předcházejícím krokem RT umožňuje komplexní přístup k detekci SIV a je použitelný pro široké využití ve veterinární i humánní oblasti.

IV) POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY

Metodika je určena k rychlému skríninku a monitoringu výskytu původce Prasečí chřipky v různých typech vzorků (klinické vzorky, veterinární vzorky, vzorky prostředí). Uživatel využije výsledků metodiky k posouzení nutnosti zavedení preventivních a kontrolních opatření. Uživatelem metodiky/výsledků získaných jejím uplatněním budou laboratoře zabývající se diagnostikou onemocnění zvířat, případně lidí, případně další laboratoře zabývající se vyšetřováním surovin a potravin živočišného původu.

V) SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Bonin E., Quéguiner S., Woudstra C., Gorin S., Barbier N., Harder T.C., Fach P., Hervé S. and Simon G., 2018, Molecular subtyping of European swine influenza viruses and scaling to high-throughput analysis *Viro. J.* 15:7 DOI 10.1186/s12985-018-0920-z
- Furuse Y., Suzuki A., Kamigaki T. and Oshitani H. (2009) Evolution of the M gene of influenza A virus in different host species: large-scale sequence analysis. *Virology Journal* 6: 67 <https://doi.org/10.1186/1743-422X-6-67>
- Gamblin SJ, Skehel JJ. Influenza hemagglutinin and neuraminidase membrane glycoproteins. *J Biol Chem.* (2010) 285:28403–9. doi: 10.1074/jbc.R110.129809
- Cheung TK, Poon LL (2007) Biology of influenza A virus. *Ann N Y Acad Sci* 1102: 1–25.
- Kuntz-Simon G, Madec F (2009) Genetic and Antigenic Evolution of Swine Influenza Viruses in Europe and Evaluation of Their Zoonotic Potential. *Zoonoses and Public Health* 56: 310–325.
- Mikel P, Vasickova P, Tesarik R, Malenovska H, Kulich P, Vesely T, Kralik P (2016) Preparation of MS2 Phage-Like Particles and Their Use As Potential Process Control Viruses for Detection and Quantification of Enteric RNA Viruses in Different Matrices. *Frontiers in Microbiology* 7 doi:10.3389/fmicb.2016.01911
- Palese P, Shaw M. Orthomyxoviridae: the viruses and their replication. In: Knipe DM and Howley PM, editors. *Fields Virology*. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins (2007). p. 1647–90.
- Reslova N, Huvarova V, Hrdy J, Kasny M, Kralik P (2019) A novel perspective on MOL-PCR optimization and MAGPIX analysis of in-house multiplex foodborne pathogens detection assay. *Sci Rep* 9(1):2719 doi:10.1038/s41598-019-40035-5
- Shope R.E (1931) Swine Influenza: III. Filtration Experiments and Etiology. *Journal of Experimental Medicine* 3: 373-385
- Stucki, D., Malla, B., Hostettler, S., Huna, T., Feldmann, J., Yeboah-Manu, D., Borrell, S., Fenner, L., Comas, I., Coscolla, M., Gagneux, S. 2012. Two New Rapid SNP-Typing Methods for Classifying Mycobacterium tuberculosis Complex into the Main Phylogenetic Lineages. *Plos One* 7, doi:10.1371/journal.pone.0041253.
- Thierry S, Hamidjaja RA, Girault G, Lofstrom C, Ruuls R, Sylviane D (2013) A multiplex bead-based suspension array assay for interrogation of phylogenetically informative single nucleotide polymorphisms for Bacillus anthracis. *J Microbiol Methods* 95(3):357-65 doi:10.1016/j.mimet.2013.10.004
- Tong S, Li Y, Rivaller P, Conrardy C, Castillo DA, Chen LM, et al. A distinct lineage of influenza A virus from bats. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2012) 109:4269–74. doi: 10.1073/pnas.1116200109

- Tong S, Zhu X, Li Y, Shi M, Zhang J, Bourgeois M, et al. New world bats harbor diverse influenza A viruses. *PLoS Pathog.* (2013) 9:e1003657. doi: 10.1371/journal.ppat.1003657
- Van Reeth K, Brown IH, Olsen CW (2012) Swine influenza. In: Zimmerman J, Karriker L, Ramirez A, Schwarz KJ, Stevenson G, editors. *Diseases of Swine*. 10th edition ed. Hoboken NJ: Wiley-Blackwell Publishing Company pp. 557–571.
- Vincent A, Awada L, Brown I, Chen H, Claes F, et al. (2014) Review of influenza A virus in swine worldwide: a call for increased surveillance and research. *Zoonoses Public Health* 61: 4–17.
- Woods TA, Mendez HM, Ortega S, Shi X, Marx D, Bai J, Moxley RA, Nagaraja TG, Graves SW, Deshpande A (2016) Development of 11-Plex MOL-PCR Assay for the Rapid Screening of Samples for Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. *Front Cell Infect Microbiol* 6:92 doi:10.3389/fcimb.2016.00092
- Zell R, Scholtissek C, Ludwig S (2013) Genetics, evolution, and the zoonotic capacity of European Swine influenza viruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 370: 29–55.

VÚVeL 

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