



CERTIFIKOVANÁ METODIKA

**Kvalitativní detekce *Cryptosporidium* spp.
pomocí metody MOL-PCR**

MVDr. Jiřina Marková, Ph.D.

UPLATNĚNÁ CERTIFIKOVANÁ METODIKA

č. 133/2020

Kvalitativní detekce *Cryptosporidium* spp. pomocí metody MOL-PCR

Autoři

MVDr. Jiřina Marková, Ph.D.

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

ISBN 978-80-88233-95-4

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

Protozoární parazité hrají často důležitou roli při infekcích gastrointestinálního traktu lidí i zvířat, přičemž řada onemocnění jimi způsobených má zoonotický potenciál. Mezi takové patogeny patří i celosvětově rozšířené kokcidie rodu *Cryptosporidium* s širokým spektrem hostitelů včetně všech skupin obratlovců (Slapeta, 2013). Životní cyklus zástupců tohoto rodu je přímý a zahrnuje infekční stadium – oocystu, která zajišťuje přežití parazita ve vnějším prostředí, infekčnost, šíření a je využívána i pro jeho detekci a identifikaci (Fayer et al., 2000, Thompson and Ash, 2016). Oocysty jsou spolu s výkaly hostitele vylučovány do prostředí již plně infekční a k nákaze dochází fekálně-orální cestou nejčastěji prostřednictvím požití kontaminované vody a potravy, případně přímým kontaktem s pozitivními zvířaty nebo jejich výkaly (Efstratiou et al., 2017, Fletcher et al., 2012, Chalmers and Davies, 2010, Morris et al., 2019). Akutní kryptosporidióza je u lidí doprovázena bolestmi břicha, horečkou, zvracením a průjmem. Chronická forma může vést k malabsorpci, úbytku hmotnosti či růstovým deficitům (Checkley et al., 2015). Ačkoliv většina případů humánní kryptosporidiózy probíhá jako self-limitní onemocnění trávicího traktu, následky mohou být fatální především u imunosuprimovaných jedinců anebo u dětí v rozvojových zemích a znevýhodněných komunitách (Leav et al., 2003, Morris et al., 2019). Dlouhotrvající účinky infekce spolu se socioekonomickým dopadem a riziky onemocnění především u dětských pacientů vyústil v zařazení rodu *Cryptosporidium* Světovou zdravotnickou organizací (WHO) mezi tzv. zanedbávané patogeny (Savioli et al., 2006, FAO, 2014), aby se tak zvýšilo povědomí o potřebě investic do prevence a kontroly humánní kryptosporidiozy. Kontaminované jídlo, krmivo, voda nebo prostředí jsou tedy zahrnuty v procesu přenosu infekce a měly by být za tímto účelem vyšetřovány, aby byla umožněna efektivní kontrola zdrojů onemocnění a zajištěna prevence vypuknutí kryptosporidióvé nákazy.

Předkládaná metodika nabízí standardizovaný postup detekce přítomnosti nukleové kyseliny protozoí rodu *Cryptosporidium* v klinických vzorcích, ve tkáních a trusu zvířat, ve vzorcích z prostředí a vodě popř. na potravinách rostlinného a živočišného původu.

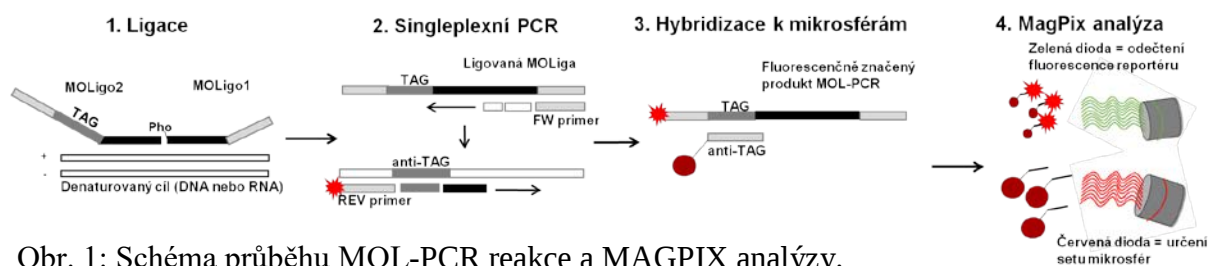
I) CÍL METODIKY

Předkládaná metodika nabízí rychlý a standardizovaný postup detekce přítomnosti protozoí rodu *Cryptosporidium* (*Crypto*), respektive jejich nukleové kyseliny (DNA), ve vzorku. Tato metodika může být součástí komplexní multiplexní detekce až několika desítek různých patogenů v jedné reakci, přičemž jako templátová DNA může být použita izolovaná DNA různého původu, např. z tkání a trusu zvířat, z prostředí, vody nebo surovin a potravin živočišného i rostlinného původu určených pro lidskou spotřebu. Metodika je využitelná jako vhodný komplexní nástroj pro skriningové testy na široké spektrum patogenů.

II) VLASTNÍ POPIS METODIKY

1 Popis MOL-PCR systému

Průkaz přítomnosti *Crypto* je založen na detekci specifické sekvence vyskytující se v genomu zástupců tohoto rodu. První krok analýzy představuje multiplexní MOL-PCR systém (Reslova et al. 2019), kde detekce probíhá prostřednictvím hybridizace dvou specifických modulárních detekčních sond tzv. MOLig bezprostředně vedle sebe k cílové sekvenci a jejich následné ligace v jednu komplexní sekvenci. Ta je poté amplifikována a specificky vychytána na povrch magnetických mikrosfér prostřednictvím hybridizace tzv. TAG/anti-TAG sekvencí (syntetické sekvence obsahující pouze báze T, A a G specifické jen 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 příslušnému anti-TAGu na povrchu magnetických mikrosfér. Každý set mikrosfér (dostupných 50 setů) nese unikátní kombinaci dvou vnitřních fluoroforů. Ve třetím fluorescenčním kanále lze pak pro každý set mikrosfér kvantifikovat množství specifického MOL-PCR produktu, který je navázán na jejich povrchu.



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.

1.1 Cíl

Na základě srovnání v současnosti dostupných sekvencí genomu *Crypto* byl jako nejvhodnější zvolen úsek 18S rRNA genu, který umožňuje amplifikaci DNA a je shodný u všech druhů rodu včetně těch, které doposud nebyly izolovány z lidských infekcí (Xiao et al., 1999).

MOLigo sondy pro detekci *Crypto* 18S rRNA genu byly testovány na komerčně dostupné genomické DNA *C. parvum* (ATCC, Virginie, USA) a na DNA izolované z oocyst *Cryptosporidium* spp. získaných z oddělení parazitologie na Veterinární a farmaceutické univerzitě Brno a z Parazitologického ústavu Biologického centra Akademie věd České republiky v Českých Budějovicích.

Sekvence MOLig:

Tučně = sekvence pro vazbu univerzálních PCR primerů; podtržené = sekvence specifická pro *Crypto*; malá písmena = TAG sekvence MTAG-A039 umožňující specifickou vazbu k mikrosférám; PHO = fosfátová skupina.

Crypto_18S_M1:

5'- PHO CGGTAGGGTATTGGCCTACTCTCACTTCTTACTACCGCG -3' (39)

Crypto_18S_M2:

5'- ACTCGTAGGGAATAAACCGTttgtgatagtagtagatatgtCAAGTTTCTGACCTATCA
GCTTTAGA - 3' (70)

Uvedenými sondami je možné detekovat část 18S rRNA genu v genomu rodu *Cryptosporidium*. Jako referenční sekvence byla zvolena sekvence pro *C. parvum* (Acc. No. L25642.1). Délka tohoto úseku specifického pro *Crypto* = 45 bp a nachází se v rozsahu 257 - 301 bp. Tato sekvence specifická pro cílový gen je identická a vyskytuje se ve všech referenčních sekvencích zástupců rodu *Cryptosporidium* uložených v nukleotidové databázi GenBank. Celková délka produktu ligace detekčních sond = 109 bp.

1.2 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 vakovlky tasvánské (*Thylacynus 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, či bakteriálním druhu. IC je tedy možné použít pro jakýkoliv templát či matrici. IC je skladována při teplotě $-20^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$ 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'-ACTCGTAGGGAATAAACCGT*tattgtgaaagaaagagaagaaatt*TATACACACGCAATCA
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.

1.3 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 všechny produkty ligace. Výsledná délka ampliconu odpovídá délce jednotlivých produktů ligace (~ 110 bp).

2 Předmět a působnost

Tato metodika slouží ke kvalitativní detekci *Crypto* prostřednictvím metody MOL-PCR na základě cílové sekvence 18S rRNA genu při komplexní analýze vzorků pocházejících z klinických vzorků, trusu zvířat, z prostředí, z vody nebo kontaminovaných surovin živočišného i rostlinného původu.

3 Podstata zkoušky

Multiplexní oligonukleotidová ligační polymerázová řetězová reakce (MOL-PCR) s interní kontrolou (IC). Komplexní a simultánní detekce demonstrována v multiplexu čítajícím 5 systémů bakteriálních a jeden cílový parazitární systém reprezentovaný patogenem *Cryptosporidium parvum*. Kvalitativní detekce probíhá prostřednictvím odečtení fluorescenčního signálu vzorku oproti negativní kontrole.

4 Přístroje a pomůcky

- DNA Engine Dyad Peltier Thermal Cyclers (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 μ l (s chybou do 5%)

s rozsahem nastavitelným od 5 – 50 μ l (s chybou do 5%)

s rozsahem nastavitelným od 0,5 – 10 μ l (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 Chemikálie a roztoky

5.1 Ligáza

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

5.2 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. Za normálních podmínek je Master Mix stabilní do data expirace.

5.3 Voda pro MOL-PCR

Pro ředění všech komponent MOL-PCR reakce se používá voda PCR H₂O (Top-Bio, Česká republika), katalogové číslo P242. Skladovat při pokojové teplotě.

5.4 Ředění MOLig a PCR primerů

Specifická MOLiga a univerzální PCR primery se dodávají v lyofilizovaném stavu od firmy Generi-Biotech (Česká republika). Podle návodu uvedeného výrobcem jsou na pracovišti rozpuštěny v PCR H₂O (Top-Bio, Česká republika) tak, aby výsledná zásobní koncentrace byla 100 pmol/ μ l. Sonden i primery jsou evidovány a uloženy v mrazničce při teplotě cca -20°C $\pm$ 4°C. Při přípravě ligačního premixu se používá pracovní roztok o koncentraci MOLig 1

pmol/μl, jak je uvedeno v odstavci 5.5. Při přípravě PCR premixu se používá pracovní roztok o koncentraci univerzálních primerů 10 pmol/μl, jak je uvedeno v odstavci 5.6.

5.5 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, ligačního pufru a interní kontroly. Před použitím se tyto dvě směsi smíchají dohromady a k výslednému roztoku se přidá pouze dané množství ligázy a templátové DNA. 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 PCR 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 25μl	
10X Hifi <i>Taq</i> DNA Ligase Reaction Buffer	2,5 μl	250 μl	1X
MOLigo sondy Crypto_18S_M1 a Crypto_18S_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
IC plazmid 10 ⁴ /μl	0,1 μl	10,0 μl	1×10 ³ kopií
Hifi <i>Taq</i> DNA Ligase	0,5 μl	50 μl	
Templátová DNA	2,5 μl	100 × 2,5 μl	
Celkem	25 μl	2500 μl	

x_1 = počet dalších MOLigo sond v multiplexní reakci

5.6 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 $-20^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$. 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	1X
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 × 6 μl	
Celkem	24 μl	2400 μl	

5.7 Magnetické mikrosféry

MagPlex® Microspheres (12,5 × 10⁶ 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 °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.

5.8 Roztoky pro hybridizaci

Roztoky, které jsou součástí kuličkového mixu (odstavec 5.9) se připravují za použití ultračisté vody. Výsledné roztoky je třeba přefiltrovat 0,22 μm filtrem a rozaliquotovat 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

5.9 Příprava kuličkového mixu

Kuličkový mix se připravuje čerstvý pro konkrétní počet vzorků v reakci 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	

5.10 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

5.11 Analyzační pufr

Roztok se připravuje za použití ultračisté vody. Výsledný roztok analyzačního pufru je třeba přefiltrovat 0,22 µm filtrem a rozalikvotovat 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

5.12 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).

5.13 Drive fluid

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

5.14 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 N	0,1 g	pokojová teplota

6 Postup zkoušky

6.1 Bezpečnostní opatření

Provedení metody nevyžaduje žádné zvláštní bezpečnostní opatření.

6.2 Okolní podmínky zkoušky

Provedení metody nevyžaduje kontrolu žádných limitních podmínek.

6.3 Množství vzorku

Do každé jamky je napipetováno 22,5 µl ligačního premixu a 2,5 µl templátové DNA. Po ligaci se 6 µl produktu přenesou k 18 µl PCR premixu. Dále je 10 µl výsledného MOL-PCR produktu přidáno k 5 µl kuličkového mixu pro hybridizaci a před samotnou analýzou je celý objem reakce navýšen 45 µl analyzačního pufru na výsledných 60 µl.

6.4 Slepý pokus

6.4.1 Negativní kontrola

Jako negativní kontrola (no template control, NTC) je do MOL-PCR reakce přidána PCR voda v ekvivalentním množství k templátové DNA, tedy 2,5 µl. Negativní kontrola musí být použita v každém experimentu.

6.4.2 Pozitivní kontrola

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

6.5 Replikáty

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

6.6 Kalibrace měřicího 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.

6.7 Provedení zkoušky

6.7.1 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

6.7.2 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

6.7.3 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

6.7.4 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.

7 Výpočet a vyjádření výsledku

7.1 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 50, vzorek je vyhodnocen jako pozitivní.**

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

7.1.1 Kvalitativní hodnocení

Kvalitativní hodnocení se provádí podle následující tabulky:

Cíl	IC	Celkový výsledek
Pozitivní (+)	Pozitivní (+)	Vzorek je pozitivní na přítomnost <i>Crypto</i>
Pozitivní (+)	Negativní (–)	Vzorek je pozitivní na přítomnost <i>Crypto</i> ^a
Negativní (–)	Pozitivní (+)	Vzorek je negativní na přítomnost <i>Crypto</i>
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 může se jednat o částečnou inhibici. Je nutné izolovanou nukleovou kyselinu (NK) 5× a 10× naředit, případně zopakovat izolaci NK ze zásobního duplikátu a detekční reakci zopakovat. Ředění templátové NK je třeba vzít v potaz v rámci vyhodnocování výsledků celého analytického postupu.

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

8 Validace

8.1 Specificita

Navržené sekvence MOLig byly porovnány pomocí algoritmu BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Sekvence specifické pro cílový gen byly 100% identické s referenčními sekvencemi zastoupenými v databázi a současně nevykazovaly identitu s jinými organismy. Pro test specificity byla zvolena DNA dalších druhů rodu *Cryptosporidium* a dále protozoární DNA *Toxoplasma gondii* a *Giardia duodenalis*.

Specificita převzatých univerzálních primerů byla ověřena na 13-ti genotypech *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).

8.2 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 v maximální možné 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.

8.3 Kruhový test

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

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

Vzorek	Vzorek po izolaci DNA	Kvalitativní detekce <i>Emulti</i>			
		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.

9 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 real time PCR 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 umožňuje komplexní přístup k detekci *Crypto* 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 protozoí rodu *Cryptosporidium* v různých typech vzorků (klinické vzorky, veterinární vzorky, vzorky prostředí, vody nebo surovin rostlinného a živočišného původu). 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 a lidí, případně další laboratoře zabývající se vyšetřováním surovin živočišného a rostlinného původu.

V) SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- EFSTRATIOU, A., ONGERTH, J. E. & KARANIS, P. 2017. Waterborne transmission of protozoan parasites: Review of worldwide outbreaks - An update 2011-2016. *Water Research*, 114, 14-22.
- FAO 2014. Multicriteria-based ranking for risk management of food-borne parasites. Microbiological Risk Assessment Series 23, Food Safety and Codex Unit. *Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy*.
- FAYER, R., MORGAN, U. & UPTON, S. J. 2000. Epidemiology of Cryptosporidium: transmission, detection and identification. *International Journal for Parasitology*, 30, 1305-1322.
- FLETCHER, S. M., STARK, D., HARKNESS, J. & ELLISA, J. 2012. Enteric Protozoa in the Developed World: a Public Health Perspective. *Clinical Microbiology Reviews*, 25, 420-449.
- CHALMERS, R. M. & DAVIES, A. P. 2010. Minireview: Clinical cryptosporidiosis. *Experimental Parasitology*, 124, 138-146.
- CHECKLEY, W., WHITE, A. C., JAGANATH, D., ARROWOOD, M. J., CHALMERS, R. M., CHEN, X. M., FAYER, R., GRIFFITHS, J. K., GUERRANT, R. L., HEDSTROM, L., HUSTON, C. D., KOTLOFF, K. L., KANG, G., MEAD, J. R., MILLER, M., PETRI, W. A., PRIEST, J. W., ROOS, D. S., STRIEPEN, B., THOMPSON, R. C. A., WARD, H. D., VAN VOORHIS, W. A., XIAO, L. H., ZHU, G. & HOUP, E. R. 2015. A review of the global burden, novel diagnostics, therapeutics, and vaccine targets for cryptosporidium. *Lancet Infectious Diseases*, 15, 85-94.
- LEAV, B. A., MACKAY, M. & WARD, H. D. 2003. Cryptosporidium species: New insights and old challenges. *Clinical Infectious Diseases*, 36, 903-908.
- MIKEL, P., VASICKOVA, P., TESARIK, R., MALENOVSKA, H., KULICH, P., VESELY, T. & KRÁLIK, 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.
- MORRIS, A., ROBINSON, G., SWAIN, M. T. & CHALMERS, R. M. 2019. Direct Sequencing of Cryptosporidium in Stool Samples for Public Health. *Frontiers in Public Health*, 7, 16.
- RESLOVA, N., HUVAROVA, V., HRDY, J., KASNY, M. & KRÁLIK, P. 2019. A novel perspective on MOL-PCR optimization and MAGPIX analysis of in-house multiplex foodborne pathogens detection assay. *Sci Rep*, 9, 2719.
- SAVIOLI, L., SMITH, H. & THOMPSON, A. 2006. Giardia and Cryptosporidium join the 'Neglected Diseases Initiative'. *Trends in Parasitology*, 22, 203-208.
- SLAPETA, J. 2013. Cryptosporidiosis and Cryptosporidium species in animals and humans: A thirty colour rainbow? *International Journal for Parasitology*, 43, 957-970.
- 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, e41253.

- THIERRY, S., HAMIDJAJA, R. A., 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, 357-65.
- THOMPSON, R. C. A. & ASH, A. 2016. Molecular epidemiology of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections. *Infection Genetics and Evolution*, 40, 315-323.
- WOODS, T. A., MENDEZ, H. M., ORTEGA, S., SHI, X., MARX, D., BAI, J., MOXLEY, R. A., NAGARAJA, T. G., GRAVES, S. W. & 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.
- XIAO, L. H., ESCALANTE, L., YANG, C. F., SULAIMAN, I., ESCALANTE, A. A., MONTALI, R. J., FAYER, R. & LAL, A. A. 1999. Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small-subunit rRNA gene locus. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 1578-1583.



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