



## CERTIFIKOVANÁ METODIKA

---

**Kvalitativní detekce tasemnice *Echinococcus multilocularis* pomocí metody MOL-PCR**

**MVDr. Jiřina Marková, Ph.D.**

125  
2020

# **UPLATNĚNÁ CERTIFIKOVANÁ METODIKA**

**CM 125/2020**

## **Kvalitativní detekce tasemnice *Echinococcus multilocularis* 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.

CM 125/2020 uveřejněna ve Věstníku Ministerstva obrany, ročník 2021, Částka 3, str. 217

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

*Echinococcus multilocularis* (*Emulti*) patří do třídy Cestoda (tasemnice) je zoonotický patogen, jehož definitivním hostitelem jsou především psovitě šelmy (v Evropě hlavně liška obecná *Vulpes vulpes*), které vylučují infekční stadia – vajíčka do vnějšího prostředí (Kapel et al. 2006). Tato vajíčka vydrží infekceschopná i několik měsíců v závislosti na klimatických podmínkách (Veit et al. 1995) a mohou být zdrojem nákazy pro mnohé mezihostitele včetně člověka. Člověk může být infikován prostřednictvím přímého kontaktu s definitivním hostitelem anebo nepřímo, pozřením kontaminované potravy popř. vody s vajíčky tasemnice (Schweiger et al. 2007).

Charakter humánní nákazy tzv. alveolární echinokokózy postihující zejména játra je podobný malignímu tumoru a v pozdějších fázích infekce může metastazovat i do jiných orgánů transportem přes lymfatické či krevní řečiště (Gottstein et al. 2015). Včasnou diagnostiku komplikuje počáteční asymptomatická fáze larválního růstu v napadených orgánech, která trvá i několik let a zůstane-li bez adekvátní terapie, může vést až ke smrti (Conraths et al. 2017; Schweiger et al. 2007). V souvislosti s již poměrně častým výskytem lišek v městských oblastech a zvyšujících se prevalencí *Emulti* u těchto hostitelů v Evropě (Deplazes et al. 2017; Gloor et al. 2001; König et al. 2005), narůstá riziko kontaminace prostředí infekčními stadii parazita a zároveň tak i potenciální možnost nákazy člověka, domácích zvířat a jiných případných mezihostitelů.

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

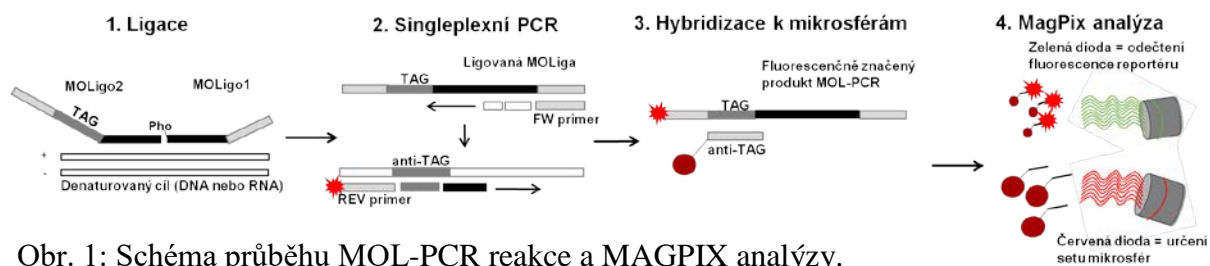
## I) CÍL METODIKY

Předkládaná metodika nabízí rychlý a standardizovaný postup detekce přítomnosti tasemnice druhu *Echinococcus multilocularis* (*Emulti*), respektive její 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 skrínigové testy na široké spektrum patogenů.

## II) VLASTNÍ POPIS METODIKY

### 1 Popis MOL-PCR systému

Průkaz přítomnosti *Emulti* je založen na detekci specifické sekvence vyskytující se v genomu tohoto druhu. 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 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 jejich vzájemné rozlišení a tak identifikaci specifického cíle vyvázaného na jejich povrchu. Samotné kvalitativní vyhodnocení probíhá prostřednictvím odečtení fluorescenčního signálu mikrosfér a 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.

## 1.1 Cíl

Na základě srovnání v současnosti dostupných sekvencí genomu *Emulti* byl jako nejvhodnější zvolen úsek mitochondriálního 12S rRNA genu, kde jsou vysoce variabilní nekódující oblasti genu oklopeny menšími konzervovanými úseky (Dinkel et al. 1998; von Nickisch-Rosenegk et al. 1999).

MOLigo sondy pro detekci *Emulti* 12S rRNA genu byly testovány na DNA izolované z dospělců a vajíček *E. multilocularis* získaných z oddělení parazitologie na Veterinární a farmaceutické univerzitě Brno a EURLP - European Reference Laboratory for Parasites, Istituto Superiore di Sanità (ISS) v Itálii.

### Sekvence MOLig:

Tučně = sekvence pro vazbu univerzálních PCR primerů; podtrženě = sekvence specifická pro *Emulti*; malá písmena = TAG sekvence MTAG-A043 umožňující specifickou vazbu k mikrosférám; PHO = fosfátová skupina.

Emulti\_12S\_M1: 5'- PHO -

TTTGTGTGTTACATTGATAGGAATATTTCTCACTTCTTACTACCGCG -3' (47)

Emulti\_12S\_M2:

5'- ACTCGTAGGGAATAAACCGTaaataagaatagagagaaagttTCTATGTGCTGC  
TTATAAGAGTT - 3' (67)

Těmito sondami je možné detekovat část 12S rRNA genu v genomu *E. multilocularis* v rozsahu 195 - 244 bp (Acc. No. MN444822.1). Délka specifické sekvence pro *Emulti* = 50 bp. Celková délka produktu ligace detekčních sond = 114 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 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, 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; podtrženě = 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'-  
ACTCGTAGGGAATAAACCGTattgtgaaagaaagagaagaattTATACACACGCAATCACCA  
C- 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 *Emulti* na základě cílové sekvence 12S rRNA genu při komplexní analýze vzorků pocházejících z klinických vzorků, tkání a trusu zvířat, z prostředí, z vody nebo surovin živočišného i rostlinného původu prostřednictvím metody MOL-PCR.

## 3 Podstata zkoušky

Multiplexní oligonukleotidová ligační polymerázová řetězová reakce (MOL-PCR) s interní kontrolou (IC). Komplexní a simultánní detekce demonstrována v multiplexu čítajícím 9 systémů (bakteriální, parazitární a virový) – *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, *Mycobacterium tuberculosis* komplex, *Mycobacterium avium* subsp. *avium*, *Mycobacterium avium* subsp. *hominisuis*, *Mycobacterium avium* komplex, *Rickettsia* spp. (2 detekční cíle), bovinní herpesvirus typu 1 (BHV-1) a *Echinococcus multilocularis*. 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  $\mu\text{l}$  (s chybou do 5%)

s rozsahem nastavitelným od 200 – 1000  $\mu\text{l}$  (s chybou do 5%)

s rozsahem nastavitelným od 20 – 200  $\mu\text{l}$  (s chybou do 5%)

s rozsahem nastavitelným od 5 – 50  $\mu\text{l}$  (s chybou do 5%)

s rozsahem nastavitelným od 0,5 – 10  $\mu\text{l}$  (s chybou do 5%)

- Špičky s filtrem k pipetám s příslušným rozsahem
- Sterilní mikrokumavky 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 pufrém 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 H<sub>2</sub>O (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 H<sub>2</sub>O (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 5.5. 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:

Složka	1 reakce	100 reakcí	Výsledná koncentrace
PCR voda	doplnit objem	100 × doplnit objem	
10X Hifi <i>Taq</i> DNA Ligase Reaction Buffer	2,5 μl	250 μl	1X
MOLigo sondy Emulti_12S_M1 a Emulti_12S_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 <sup>4</sup> /μl	0,1 μl	10,0 μl	1×10 <sup>3</sup> 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 $\mu\text{l}$	525 $\mu\text{l}$	
2X EliZyme™ HS Robust MIX	12 $\mu\text{l}$	1200 $\mu\text{l}$	1X
Primer uni FW (10 pmol/ $\mu\text{l}$ )	0,15 $\mu\text{l}$	15 $\mu\text{l}$	0,0625 $\mu\text{M}$
Primer uni REV-BODIPY (10 pmol/ $\mu\text{l}$ )	0,6 $\mu\text{l}$	60 $\mu\text{l}$	0,25 $\mu\text{M}$
Produkt ligace	6 $\mu\text{l}$	100 × 6 $\mu\text{l}$	
Celkem	24 $\mu\text{l}$	2400 $\mu\text{l}$	

### 5.7 Magnetické mikrosféry

MagPlex® Microspheres (12,5 x 10<sup>6</sup> 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  $\mu\text{m}$  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

## 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:

<b>Složka</b>	<b>1 reakce</b>	<b>100 reakcí</b>	<b>Výsledná koncentrace</b>
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 <sup>®</sup> 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:

<b>Složka</b>	<b>1 reakce</b>	<b>100 reakcí</b>
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 <sup>a</sup>	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 <sub>2</sub> O	Millipore		242,9 ml	

<sup>a</sup> = zásobní Trizma base neobsahuje Cl<sup>-</sup>, 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 dH<sub>2</sub>O, 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 měřícího prostředku před zkouškou**

Po spuštění přístroje je třeba vždy provést několik úkonů. Nejprve se sací jehla promyje a sonifikuje v destilované vodě (dH<sub>2</sub>O). 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 <sup>a</sup>	10 °C

<sup>a</sup> 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 <sup>a</sup>	10 °C

<sup>a</sup> 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 100, 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>Emulti</i>
Pozitivní (+)	Negativní (-)	Vzorek je pozitivní na přítomnost <i>Emulti</i> <sup>a</sup>
Negativní (-)	Pozitivní (+)	Vzorek je negativní na přítomnost <i>Emulti</i>
Negativní (-)	Negativní (-)	Vzorek je inhibován <sup>b</sup>

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

<sup>a</sup>Vzorek 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 NK 5× a 10× naředit, případně zopakovat izolaci NK ze zásobního duplikátu a detekční reakci zopakovat. Případné ředění templátové NK je třeba vzít v potaz v rámci vyhodnocování výsledků celého analytického postupu.

<sup>b</sup>Vzorek 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. Případné 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 specifity byla zvolena DNA dalších druhů tasemnic rodu *Echinococcus* a *Taenia*. Dále rod *Mycobacterium*, *Rickettsia* a *Cryptosporidium*, bovinní herpesvirus typu 1 (BHV-1), *Toxoplasma gondii* a *Staphylococcus aureus*.

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 specifických 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.

## 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 popsaného 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
<b>Z</b>	Neředěný	+	+	+	+
<b>5X</b>	5X ředěný	+	+	+	+
<b>10X</b>	10X ředěný	+	+	+	+
<b>SM</b>	Stopové množství	+	+	-	-
<b>Ex</b>	Negativní + 10X ředěná DNA <i>S. aureus</i>	-	-	-	-
<b>K+</b>	IC	+	+	+	+
<b>NTC</b>	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 specificita 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 *Emulti* 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 tasemnice *Echinococcus multilocularis* 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 a rostlinného původu.

## V) SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Conraths FJ, Probst C, Possenti A, Boufana B, Saulle R, La Torre G, Busani L, Casulli A (2017) Potential risk factors associated with human alveolar echinococcosis: Systematic review and meta-analysis. *Plos Neglect Trop Dis* 11(7):15 doi:10.1371/journal.pntd.0005801
- Deplazes P, Rinaldi L, Rojas CAA, Torgerson PR, Harandi MF, Romig T, Antolova D, Schurer JM, Lahmar S, Cringoli G, Magambo J, Thompson RCA, Jenkins EJ (2017) Global Distribution of Alveolar and Cystic Echinococcosis. In: Thompson RCA, DePlazes P, Lymbery AJ (eds) *Echinococcus and Echinococcosis, Pt A. Advances in Parasitology*, vol 95. Elsevier Academic Press Inc, San Diego, pp 315-493
- Dinkel A, von Nickisch-Rosenegk M, Bilger B, Merli M, Lucius R, Romig T (1998) Detection of *Echinococcus multilocularis* in the definitive host: Coprodiagnosis by PCR as an alternative to necropsy. *J Clin Microbiol* 36(7):1871-1876 doi:10.1128/jcm.36.7.1871-1876.1998
- Gloor S, Bontadina F, Hegglin D, Deplazes P, Breitenmoser U (2001) The rise of urban fox populations in Switzerland. *Mamm Biol* 66(3):155-164
- Gottstein B, Wang JH, Boubaker G, Marinova I, Spiliotis M, Muller N, Hemphill A (2015) Susceptibility versus resistance in alveolar echinococcosis (larval infection with *Echinococcus multilocularis*). *Vet Parasitol* 213(3-4):103-109 doi:10.1016/j.vetpar.2015.07.029
- Kapel CMO, Torgerson PR, Thompson RCA, Deplazes P (2006) Reproductive potential of *Echinococcus multilocularis* in experimentally infected foxes, dogs, raccoon dogs and cats. *Int J Parasit* 36(1):79-86 doi:10.1016/j.ijpara.2005.08.012
- Konig A, Romig T, Thoma D, Kellermann K (2005) Drastic increase in the prevalence in *Echinococcus multilocularis* in foxes (*Vulpes vulpes*) in southern Bavaria, Germany. *Eur J Wildl Res* 51(4):277-282 doi:10.1007/s10344-005-0100-5
- 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
- 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

- Schweiger A, Ammann RW, Candinas D, Clavien PA, Eckert J, Gottstein B, Halkic N, Muellhaupt B, Prinz BM, Reichen J, Tarr PE, Torgerson PR, Deplazes P (2007) Human alveolar echinococcosis after fox population increase, Switzerland. *Emerg Infect Dis* 13(6):878-882 doi:10.3201/eid1306.061074
- 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(7):e41253 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
- Veit P, Bilger B, Schad V, Schafer J, Frank W, Lucius R (1995) INFLUENCE OF ENVIRONMENTAL-FACTORS ON THE INFECTIVITY OF ECHINOCOCCUS-MULTILOCULARIS EGGS. *Parasitology* 110:79-86 doi:10.1017/s0031182000081075
- von Nickisch-Rosenegk M, Lucius R, Loos-Frank B (1999) Contributions to the phylogeny of the Cyclophyllidea (Cestoda) inferred from mitochondrial 12S rDNA. *J Mol Evol* 48(5):586-596 doi:10.1007/pl00006501
- 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

VÚVeL 

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.  
Hudcova 296/70  
621 00 Brno  
Czech Republic

Tel.: +420 5 3333 1111; [www.vri.cz](http://www.vri.cz); e-mail: [vri@vri.cz](mailto:vri@vri.cz)