



CERTIFIKOVANÁ METODIKA

**Kvalitativní detekce *Mycobacterium avium* subsp.
paratuberculosis pomocí metody MOL-PCR**

**Ing. Pavlína Jelínková, Ph.D.
Mgr. Iva Slaná, Ph.D.
MVDr. Jiří Volf, Ph.D.**

UPLATNĚNÁ CERTIFIKOVANÁ METODIKA

CM 129/2020

Kvalitativní detekce *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* pomocí metody MOL-PCR

Autoři

Ing. Pavlína Jelínková, Ph.D., Mgr. Iva Slaná, Ph.D., MVDr. Jiří Volf, 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 129/2020 je uveřejněna ve Věstníku Ministerstva obrany, ročník 2021, Částka 3, str. 219

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

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* (MAP) je patogen, který způsobuje chronickou granulomatózní enteritidu známou jako paratuberkulóza nebo Johneova choroba. Jeho primárními hostiteli jsou domácí a volně žijící přežvýkavci, ale popsána byla i u jiných zvířat (např. divokých králíků). Trávicí soustava je považována za nejčastější vstupní cestu MAP do organismu (Slana, Paolicchi et al. 2008). Klinickými příznaky jsou přerušovaný průjem, ztráta hmotnosti, snížená produkce mléka a nakonec smrt infikovaného zvířete. Podobné příznaky jako u paratuberkulózy u přežvýkavců jsou charakteristické pro Crohnovu chorobu u lidí. To vedlo k hypotéze, že MAP by se mohl podílet na vývoji této choroby (Behr and Kapur 2008). Několik studií prokázalo, že MAP je přítomen v surovém mléce, které může být zdrojem tohoto organismu pro možnou veřejnou expozici (Bosshard, Stephan et al. 2006). Několik autorů ukázalo, že MAP může přežít proces pasterizace (Grant, Hitchings et al. 2002, Ayele, Svastova et al. 2005). Pro rutinní přímou detekci životaschopného MAP je metoda kultivace považována za „zlatý standard“ (Slana, Kralik et al. 2008). Hlavní nevýhodou této metody je dlouhá inkubační doba potřebná pro růst MAP (nejméně 12 týdnů u stolice a 18 až 52 týdnů u mléka). S cílem zkrátit čas potřebný pro detekci MAP byly a stále jsou zaváděny molekulární metody založené na polymerázové řetězové reakci (PCR). Pro přímou detekci MAP pomocí PCR bylo hodnoceno několik specifických lokusů; nejběžnějším cílem je vícenásobná kopie inzertní sekvence IS900 (Green, Tizard et al. 1989). Cíl IS900 je přítomen v genomu MAP ve 12 až 18 kopiích (Pavlik, Horvathova et al. 1999).

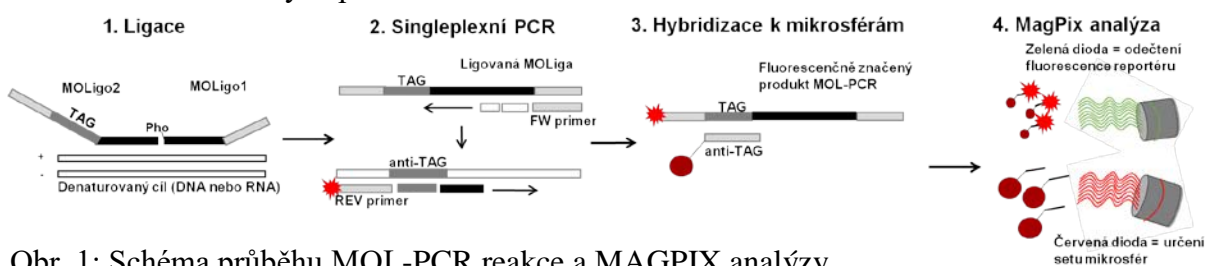
I) CÍL METODIKY

Předkládaná metodika nabízí rychlý a standardizovaný postup detekce přítomnosti MAP, respektive vybraných nukleových kyselin (DNA), 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 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 skríninkové testy na široké spektrum patogenů.

II) VLASTNÍ POPIS METODIKY

1 Popis MOL-PCR systému

Průkaz přítomnosti MAP je založen na detekci specifické sekvence vyskytující se v genomu tohoto komplexu. Jedná se o multiplexní MOL-PCR systém (Reslova, Huvarova et al. 2019), kde detekce probíhá prostřednictvím hybridizace dvou specifických modulárních detekčních sond, neboli MOLig, bezprostředně vedle sebe k cílové sekvenci a jejich následné ligaci 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 – IS900

Jako detekovaný cíl pro stanovení *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* byla zvolena inzertní sekvence IS900, která je specifická pouze pro *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) a vyskytuje se v jejích genomu. Za tímto účelem byla použita následující sada sond pro stanovení genu IS900 (Slana, Kralik et al. 2008).

MOLigo sondy pro detekci genu IS900 byly testovány na ověřeném kmenu ze Sbírký zoopatogenních mikroorganismů Výzkumného ústavu veterinárního lékařství v Brně: *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* CAPM 6381.

Sekvence MOLig:

Tučně = sekvence pro vazbu univerzálních PCR primerů; podtrženě = sekvence specifická pro MAP; malá písmena = TAG sekvence MTAG-A035 umožňující specifickou vazbu k mikrosférám; PHO = fosfátová skupina.

MAP_IS900_M1: 5'- PHO-
CGAAGGAAAACGCCACACCCTCTCACTTCTTACTACCGCG – 3' (40)

MAP_IS900_M2: 5'-
ACTCGTAGGGAATAAACCGTaataagagaattgatgaagatgCACCTACTACGACCGAAAA
CGCAC – 3' (68)

Těmito sondami je možné detekovat část genu IS900 v genomu *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* v rozsahu 2028 - 2071 (Genbank reference AJ250015.1), délka sekvence specifické pro MAP = 44 bp. Celková délka produktu ligace detekčních sond = 108 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 (Vasickova, Slany et al. 2011), 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 matici. IC je skladována při teplotě $-20^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$ ve 2 ml zkumavkách se šroubovacím víčkem 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'-
ACTCGTAGGGAATAAACCGTattgtgaaagaaagagaagaaattTATACACACGCAATCACCA
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, Hamidjaja 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 ampikonu odpovídá délce jednotlivých produktů ligace (~ 110 bp).

2 Předmět a působnost

Tato metodika slouží ke kvalitativní detekci *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* na základě inzertní sekvence při komplexní analýze vzorků pocházejících z prostředí, trusu či potravin rostlinného původu prostřednictvím 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 bakteriálních, parazitárních a virových systémů – *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, *Mycobacterium tuberculosis* komplex, *Mycobacterium avium* subsp. *avium*, *Mycobacterium avium* subsp. *hominisuis*, *Mycobacterium avium* komplex, *Rickettsia* spp., bovinní herpesvirus typu 1 (BHV-1), *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)
- Bio-Plex Manager™ MP software (Bio-Rad, USA)
- Bio-Plex Manager™ 6.1 software (Bio-Rad, 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 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 pufrem je nutné skladovat při teplotě -20 °C. Za normálních podmínek stabilní do data expirace.

5.2 Master Mix

2X EliZymeTM 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 vodě 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 kvalitativní detekci pomocí MOL-PCR je doporučeno připravit si alikvoty premixů pro 100 reakcí skládající se ze všech komponent kromě ligázy a templátové DNA. Je vhodné vytvořit si 2 Premixy odděleně s MOLigo sondami 1 a 2, aby nedocházelo ke vzájemným interakcím. 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 (96 + 4 rezerva)	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 MAP_IS900_M1 a MAP_IS900_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 $10^4/\mu\text{l}$	0,1 μl	10,0 μl	1×10^3 kopií
Hifi <i>Taq</i> DNA Ligase	0,5 μl	50 μl	
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 (96 + 4 rezerva)	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 x 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 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 (96 + 4 rezerva)	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 (96 + 4 rezerva)
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 rozaliquetovat 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. Bio-Plex Manager™ MP software sám naznačí, kdy je třeba provést kalibraci a verifikaci přístroje.

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 do kolonek v přístroji. 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 a před samotnou analýzou je celý objem reakce navýšen 45 µl analyzačního pufru na 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 použita 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 (dH₂O). Zkontroluje se naplnění kontejnerů pro Drive fluid a odpad (waste container). V Luminex xPONENT softwaru se postupně navolí údržbové rutiny: Calibration and Verification (dle potřeby), Daily Fluidics Prep (Luminex). Po skončení analýz se před vypnutím přístroje vždy provádí rutina Daily Shut Down (Luminex).

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 (1,5 min)
	Hybridizace	37 °C (30 min)
	Hold ^a	37 °C

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

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 softwaru (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 MAP
Pozitivní (+)	Negativní (-)	Vzorek je pozitivní MAP ^a
Negativní (-)	Pozitivní (+)	Vzorek je negativní na MAP
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 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.

^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. 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 cílové geny byly 100% identické s referenčními sekvencemi zastoupenými v databázi a současně nevykazovaly identitu s jinými organismy. Specificita MOLig byla na celé řadě bakteriálních, parazitárních a virových patogenů, konkrétně u *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium* subsp. *avium*, *Mycobacterium avium* subsp. *hominisuis*, *Rickettsia parkeri*, *Rickettsia typhi*., *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia conori*, bovinní herpesvirus typu 1 (BHV-1), *Echinococcus multilocularis*, *Staphylococcus aureus*. Specificita převzatých

univerzálních primerů byla ověřena na 13-ti genotypch *Bacillus anthracis* v případě (Thierry, Hamidjaja et al. 2013), ale mimo jiné také na 11-ti sérotypech *Escherichia coli* (STEC) v publikaci (Woods, Mendez 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, Malla et al. 2012, Thierry, Hamidjaja et al. 2013).

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

Vzorek	Vzorek po izolaci DNA	Kvalitativní detekce MAP			
		VÚVeL	VVeTÚ Hlučín	VFU Brno	CBO Těchonín
Z	Neředěný	+	+	+	+
5X	5X ředěný	+	+	+	+
10X	10X ředěný	+	+	+	+
S	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.

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

Vzhledem k tomu, že nejsou k dispozici jednotné a srovnatelné metodické přístupy získávání dat o prevalenci MAP a použití různých analytických metod neumožňuje získání srovnatelných údajů (EFSA, 2017), je vypracování a využití další validované metody pro detekci tohoto patogenu účelné.

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. 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 požadavky armády ČR na její budoucí diagnostické uplatnění, tedy rychlou detekci nebezpečných patogenů potenciálně zneužitelných jako biologické zbraně. 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 *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* a je použitelný pro široké využití ve veterinární i humánní oblasti. Metodika je současně dostatečně spolehlivá, aby na základě výsledku bylo možné rozhodnout o míře rizika.

IV) POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY

Metodika je určena k rychlému skríninku a monitoringu výskytu komplexu *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* a byla vyvinuta pro potřeby ozbrojených složek ČR.

V) SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Ayele, W. Y., P. Svastova, P. Roubal, M. Bartos and I. Pavlik (2005). "Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis cultured from locally and commercially pasteurized cow's milk in the Czech Republic." Appl. Environ. Microbiol. **71**(3): 1210-1214.
- Behr, M. A. and V. Kapur (2008). "The evidence for Mycobacterium paratuberculosis in Crohn's disease." Current opinion in gastroenterology **24**(1): 17-21.
- Bosshard, C., R. Stephan and T. Tasara (2006). "Application of an F57 sequence-based real-time PCR assay for Mycobacterium paratuberculosis detection in bulk tank raw milk and slaughtered healthy dairy cows." Journal of food protection **69**(7): 1662-1667.
- Grant, I. R., E. I. Hitchings, A. McCartney, F. Ferguson and M. T. Rowe (2002). "Effect of commercial-scale high-temperature, short-time pasteurization on the viability of Mycobacterium paratuberculosis in naturally infected cows' milk." Appl. Environ. Microbiol. **68**(2): 602-607.
- Green, E., M. Tizard, M. Moss, J. Thompson, D. Winterbourne, J. McFadden and J. Hermon-Taylor (1989). "Sequence and characteristics of IS 900, an insertion element identified in a human Crohn's disease isolate of Mycobacterium paratuberculosis." Nucleic acids research **17**(22): 9063-9073.
- Pavlik, I., A. Horvathova, L. Dvorska, J. Bartl, P. Svastova, R. du Maine and I. Rychlik (1999). "Standardisation of restriction fragment length polymorphism analysis for Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis." Journal of microbiological methods **38**(1-2): 155-167.
- Reslova, N., V. Huvarova, J. Hrdy, M. Kasny and P. Kralik (2019). "A novel perspective on MOL-PCR optimization and MAGPIX analysis of in-house multiplex foodborne pathogens detection assay." Scientific reports **9**(1): 2719.
- Slana, I., P. Kralik, A. Kralova and I. Pavlik (2008). "On-farm spread of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in raw milk studied by IS900 and F57 competitive real time quantitative PCR and culture examination." International Journal of Food Microbiology **128**(2): 250-257.
- Slana, I., F. Paolicchi, B. Janstova, P. Navratilova and I. Pavlik (2008). "Detection methods for Mycobacterium avium subsp paratuberculosis in milk and milk products: a review." VETERINARNI MEDICINA-PRAHA- **53**(6): 283.
- Stucki, D., B. Malla, S. Hostettler, T. Huna, J. Feldmann, D. Yeboah-Manu, S. Borrell, L. Fenner, I. Comas and M. Coscollà (2012). "Two new rapid SNP-typing methods for classifying Mycobacterium tuberculosis complex into the main phylogenetic lineages." PloS one **7**(7): e41253.
- Thierry, S., R. A. Hamidjaja, G. Girault, C. Löfström, R. Ruuls and D. Sylviane (2013). "A multiplex bead-based suspension array assay for interrogation of phylogenetically informative single nucleotide polymorphisms for Bacillus anthracis." Journal of microbiological methods **95**(3): 357-365.
- Vasickova, P., M. Slany, P. Chalupa, M. Holub, R. Svoboda and I. Pavlik (2011). "Detection and phylogenetic characterization of human hepatitis E virus strains, Czech Republic." Emerging infectious diseases **17**(5): 917.
- Woods, T. A., H. M. Mendez, S. Ortega, X. Shi, D. Marx, J. Bai, R. A. Moxley, T. G. Nagaraja, S. W. Graves and A. Deshpande (2016). "Development of 11-Plex MOL-PCR assay for the rapid screening of samples for Shiga toxin-producing Escherichia coli." Frontiers in cellular and infection microbiology **6**: 92.

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