



PROTOTYP/FUNKČNÍ VZOREK

**xMAP panel pro detekci vybraných bakteriálních
patogenů v rostlinné matrici**

**Mgr. Iva Slaná Ph.D.
Ing. Michaela Nesvadbová, Ph.D.
Mgr. Radka Hulánková, Ph.D.**

**1775
2021**

Prototyp 1775/2021

**xMAP panel pro detekci vybraných bakteriálních patogenů v
rostlinné matrici**

**Iva Slaná
Michaela Nesvadbová
Radka Hulánková**

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i.

ISBN 978-80-7672-008-4

Obsah

1. Úvod	3
2. Oblast techniky.....	7
3. Aktuální stav techniky (diagnostiky)	7
4. Popis technického řešení a nároků na ochranu.....	8
5. Nároky na ochranu	10
6. Vysvětlení nároků na ochranu	11
7. Seznam materiálu obsaženém v diagnostické soupravě.....	13
Literatura	16

Vývoj prototypu diagnostického prostředku – detekční soupravy probíhal v rámci řešení projektu Ministerstva Zemědělství QK1810212.

1. Úvod

Již několik desítek let jsou oblastí zájmu bezpečnosti potravin bakteriální původci onemocnění, zejména druhy s potenciálem způsobovat epidemické výskyty onemocnění s často vysoce závažnými klinickými projevy – tedy patogeny, které mají značný dopad na veřejné zdraví. Do popředí zájmu se ale v posledních letech dostávají i jiná agens, pro která nejsou v legislativě konkrétní limity, např. *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni* či *Yersinia enterocolitica* (EFSA 2016; Dziedzinská a kol., 2018). Přestože většina infekčních onemocnění přenášných potravinami je odbornou i laickou veřejností spojována zejména s produkty živočišného původu, množí se případy hromadných onemocnění s vehikulem rostlinného původu – zejména se jedná o zeleninu (zvláště listovou) a ovoce, zeleninové a ovocné šťávy a naklíčená semena (Berger a kol., 2010). K mikrobiální kontaminaci vegetabilíí může docházet prakticky v kterémkoli kroku výroby, a to v důsledku nedodržování správné výrobní, hygienické či zemědělské praxe. Jako možné zdroje kontaminace se uvádí závlahová voda, voda používaná k oplachu plodin, půda, hnůj (využívající se jako hnojivo), divoce žijící zvířata a hmyz i lidský faktor (Alegbeleye a kol., 2018; Berger a kol., 2010; Dixon 2016; Tefera 2018).

Největší riziko pro konzumenta z hlediska možné nákazy představuje kontaminace potravin určených k přímé spotřebě (v odborné literatuře také označovány jako ready-to-eat, RTE potraviny). Z legislativního pohledu jsou jako RTE potraviny označovány výrobky, které jsou určeny k přímé lidské spotřebě, aniž by bylo nutné je tepelně upravovat či jinak zpracovávat za účelem účinného odstranění či snížení dotčených mikroorganismů na přijatelnou úroveň (Nařízení 2073/2005). Spadají sem tedy potraviny tepelně opracované během výroby i potraviny konzumované syrové a nezpracované. Zejména v poslední letech roste obliba tzv. raw stravy a s ní i konzumace tepelně neošetřených potravin rostlinného původu. Mikrobiologická kritéria jsou pro tento typ výrobků definována nařízením Komise ES č. 2073/2005. Mezi legislativně sledované patogeny u vybraných potravin rostlinného původu patří *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* a shiga toxin produkující *Escherichia coli* (STEC); dále musí výrobci u některých druhů potravin pravidelně sledovat jako indikátor fekálního znečištění i nepatogenní *Escherichia coli*.

Pro prototyp detekčního panelu byly na základě literární rešerše vybrány následující patogeny, které se mohou vyskytovat v rostlinné matrici: *Bacillus cereus*, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Shigella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia enterocolitica*, *Clostridium botulinum* a *Salmonella enterica*.

Bacillus cereus je grampozitivní, fakultativně anaerobní bakterie, která se běžně vyskytuje v půdě a potravinách. Tato bakterie roste při širokém rozmezí teplot od 4 °C do 48 °C, i když většina kmenů se pomnožuje až při teplotách nad 10 °C. Většina případů onemocnění způsobených *B. cereus* vzniká v důsledku nesprávně tepelně upraveného nebo ještě častěji nesprávně skladovaného jídla, včetně mléčných výrobků a masa, vařené rýže, brambor a těstovin, kdy pasterační teploty aktivují klíčení spor s následným pomnožením bakterie v nedostatečně rychle zchlazeném pokrmu (Blackburn and McClure, 2009). Častým zdrojem této bakterie je ale také čerstvá zelenina (Park a kol., 2018; Yu a kol., 2019). Otravy způsobené *B. cereus* lze rozdělit na dva typy podle příznaků a podílejících se toxinů – rychleji nastupující emetický syndrom objevující se po požití potravy s emetickým toxinem a průjemový syndrom vyvolaný enterotoxiny produkovanými ve střevě (Blackburn and McClure, 2009).

Rod *Campylobacter* je skupina spirálovitých bakterií, která zahrnuje více než 20 druhů. Většina humánních kampylobakterií je způsobena druhem *Campylobacter jejuni*. Tato gramnegativní termotolerantní bakterie je označována jako nejčastější původce střevních onemocnění v Evropě. K příznakům onemocnění patří zvracení, průjem, nevolnost nebo zvýšená teplota. Za hlavní rezervoár je považován zažívací trakt, a to zejména drůbeže, ptáků a hlodavců, u kterých nákaza probíhá většinou asymptomaticky (Blackburn and McClure, 2009). Odtud se pak často dostává *Campylobacter* jako kontaminant do prostředí jako je např. povrchová voda a půda. Ve většině případů jsou bakterie přenášeny potravou (zejména syrovou drůbeží a syrovými mléčnými výrobky), ale také zeleninou, a to především saláty, je považována za druhý nejčastější rizikový faktor infekce kampylobakterií (Heaton and Jones, 2007).

Patogenní *Escherichia coli* způsobuje různá onemocnění, jako je průjem, hemoragická kolitida a potenciálně fatální hemolyticko-uremický syndrom, který se vyvíjí u 5-10 % případů onemocnění vyvolaných shigatoxigenními kmeny (Blackburn and McClure, 2009). Tato gramnegativní fakultativně anaerobní tyčinkovitá bakterie se vyskytuje jako součást běžné mikroflóry tlustého střeva. Většina kmenů je nepatogenních, existují však sérotypy, které jsou vysoce patogenní. K nim patří enterohemoragická *Escherichia coli* O157:H7, která se nejčastěji přenáší prostřednictvím nedostatečně tepelně upraveného mletého masa, nepasterovaného nebo nedostatečně pasterovaného mléka, klíčků a zeleniny (Heaton and Jones, 2007).

Listeria monocytogenes způsobuje listeriózu, infekci s úmrtností až 20 %. Listeriíza se přenáší prostřednictvím kontaminovaných potravin, jako jsou mléčné výrobky z nepasterovaného

mléka, lahůdky, maso a uzeniny, měkké sýry a ryby uzené za studena. Tato grampozitivní tyčinkovitá bakterie se vyskytuje v půdě, vodě i potravinách. Je schopna růstu i při chladírenských teplotách a má schopnost perzistovat ve formě biofilmu na površích v prostředí potravinářských provozoven, odkud může kontaminovat RTE potraviny, např. při krájení. U zdravých lidí, stejně jako u domácích zvířat, zůstává toto onemocnění neodhaleno, většinou totiž probíhá bezpříznakově (asymptomatictí nosiči), eventuálně se projevuje pouze mírnými příznaky (nevolnost, zvracení, průjem), vyvolanými *Listeria monocytogenes* množícími se v buňkách střevní sliznice, ale nepronikajícími dále do organismu. Je-li však organismus oslabený, může docházet k šíření bakterií lymfatickými a krevními cévami do tkání a k rozvoji značných zdravotních komplikací, jako je meningitida. U listeriózy může také dojít k transplacentálnímu přenosu (Khan a kol., 2016). Mezi rizikové potraviny rostlinného původu patří zejména listová zelenina (špenát) a krájená mražená zelenina (EFSA, 2016).

Bakterie rodu *Shigella* jsou původci akutních, vysoce nakažlivých průjemových onemocnění s typickou příměsí hlenu a krve ve stolici. Závažnost onemocnění je ovlivněna věkem, výživou pacienta a velikostí infekční dávky. Alimentární přenos nákazy se děje kontaminovanou potravinou, mlékem a často vodou. Tyto gramnegativní aerobní bakterie ve tvaru tyček jsou velmi citlivé na vlivy vnějšího prostředí (včetně běžně dostupných desinfekčních prostředků). Stejně jako STEC tyto bakterie tvoří toxiny, které jsou přímo zodpovědné za vysokou patogenitu.

Staphylococcus aureus je velmi rozšířeným oportunním patogenem vyskytujícím se běžně u zvířat i lidí. Tato grampozitivní fakultativně anaerobní bakterie způsobuje různé infekce od mírných zánětů kůže a tkání až po život ohrožující septické stavy a nekrotizující pneumonie. Z hlediska alimentárního onemocnění má význam schopnost produkce termostabilních enterotoxinů v potravinách. Intoxikace se projevuje rychlým nástupem příznaků, jako je nevolnost, zvracení a průjem (bez horečky). Tento patogen je schopný se množit při širokém rozmezí pH a je značně odolný vůči vysušení. Z hlediska RTE potravin rostlinného původu jsou rizikové např. minimálně zpracovaná zelenina a klíčky.

Vibrio cholerae je gramnegativní fakultativně anaerobní bakterie ve tvaru zakřivené tyčky vyvolávající onemocnění zažívacího traktu. Jedná se o neinvazivní bakterii, která adhezuje na epitel střeva a produkuje zde choleratoxin. Ten vyvolává silné vodnaté průjmy. Přirozeně se vyskytuje ve sladké i mořské vodě, mezi nejčastější potravinové zdroje patří plody moře. K

přenosu dochází také kontaminovanou vodou, a to přímo nebo po jejím použití k zavlažování nebo oplachování ovoce a zeleniny.

Yersinia je rod gramnegativních bakterií ve tvaru tyčinky. *Yersinia enterocolitica* je zoonotickým patogenem způsobujícím akutní gastroenteritidu. Nejčastěji se vyskytuje yersinióza u dětí mladších 5 let, přičemž převládajícími příznaky jsou horečka, bolest břicha a průjem, který může být i krvavý. Největším rizikovým faktorem je konzumace vepřových produktů (prase je považováno za hlavní rezervoár), jako je mleté vepřové maso, vepřový jazyk nebo maso z hlav. Byly však zaznamenány i epidemie yersiniózy, kde vehikulem byla zelenina. Vzhledem k faktu, že může růst a množit se při teplotě 4° C i méně, jedná se také o významný potravinový patogen.

Clostridium botulinum je řazeno mezi grampozitivní obligátně anaerobní tyčinkovitá bakterie produkující vysoce toxický neurotoxin, který způsobuje botulismus (otrava nervového systému). V rámci tohoto bakteriálního druhu rozlišujeme několik antigenních sérovarů (označeny A - G), které se vyskytují v půdě, hnoji zvířat, zelenině i mořském sedimentu. Pro konzumenty jsou nebezpečné zejména kompotované potraviny a po domácímu vyrobené konzervy (rybí výrobky, masné výrobky, ovoce, zelenina a houby).

Salmonella enterica je gramnegativní, fakultativně anaerobní bakterie způsobující průjemové onemocnění zvířat i lidí. Jako salmonelóza je označováno onemocnění projevující se typicky jako gastroenteritida. K nákaze člověka dochází nejčastěji prostřednictvím kontaminovaných potravin – společně s rodem *Campylobacter* je salmonela nejrozšířenějším alimentárním patogenem v Evropě. V současné době je tento druh rozdělován na jednotlivé poddruhy a ty jsou dále rozdělovány na sérotypy (sérovary), kterých je v současné době více než 2500. Tyto bakterie se vyskytují v syrovém mase, drůbeží a vejcích, v syrové zelenině, nepasterovaných mléčných výrobcích, mohou se však nacházet i v jiných druzích potravin, jako je krájené ovoce, nepasterované zeleninové a ovocné šťávy nebo naklíčená semena.

Zejména kvůli citlivosti, specifitě a možnosti kvantifikace je v současné době nejvíce používanou metodou průkazu výše uvedených agens polymerázová řetězová reakce v reálném čase (real time PCR, qPCR). Pomocí qPCR lze multiplexovat v závislosti na přístrojovém vybavení obvykle až 6 nezávislých cílů (patogenů). Avšak i tento počet nemusí být v některých případech dostačující. Výhody testování jednoho vzorku na více potenciálně možných cílů

pomocí jediného testu jsou zřejmé a zahrnují zkrácení doby testování, možnosti identifikovat koinfekce a v neposlední řadě i značná finanční úspora (Freeman a kol., 2017). Takovou metodou je xMAP technologie, která se v oblasti bezpečnosti potravin stále více inkorporuje do diagnostických laboratoří. Jedná se o technologii využívající již řadu let známé metody molekulární biologie, jako jsou ligace, hybridizace, magnetická separace a PCR. Díky těmto jednotlivým metodám spojenými dohromady ve sledu jednotlivých kroků lze pomocí přístroje Luminex MAGPIX® System současně detekovat širokou škálu cílů v samotném testovaném vzorku. Kapacita přístroje je omezena na 50 testovaných cílů v jedné reakci bez možnosti určení přesného množství (kvantifikace). Díky možnosti skládání (multiplexování) různých detekčních cílů dle požadavků na různé patogeny či různé matrice lze v krátkém čase vyšetřit relativně značné množství vzorků.

Na základě uvedených výhod byl vyvinut diagnostický prostředek, který umožňuje *in vitro* detekci *Bacillus cereus*, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Shigella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia enterocolitica*, *Clostridium botulinum* a *Salmonella enterica* v různých typech rostlinné matrice (smoothie, naklíčená semena, krájené zeleninové saláty, čerstvá zelenina nebo ovoce aj) v jedné reakci. Každý patogen je identifikován pomocí minimálně dvou nezávislých cílových sekvencí, díky čemuž je výrazně zvýšená spolehlivost, průkaznost a specifita získaných výsledků. Tento prostředek, označený jako „xMAP panel pro detekci vybraných bakteriálních patogenů v rostlinné matrici“, je unikátní svým složením a jednoduchostí použití. Souprava zahrnuje i interní kontrolu (IC), která umožňuje kontrolu analýzy každého analyzovaného vzorku.

2. Oblast techniky

Produkt je zaměřen na diagnostiku v oblasti bezpečnosti potravin a humánní medicíny.

3. Aktuální stav techniky (diagnostiky)

Přestože se jedná o bakteriální patogeny, které jsou více či méně dobře kultivovatelné, pro jejich detekci je třeba několik různých specifických médií. Kultivace navíc probíhají v několika návazných krocích a kultivační stanovení tak celkově trvají řadu dní. Navíc výsledek kultivace musí být podpořen dalšími metodami pro určení konkrétního druhu, případně dalšími analýzami určujícími patogenitu izolovaného kmene. Proto je v současnosti identifikace

patogenů stále více zaměřena na metody molekulární biologie využívají pro jejich detekci či případnou charakterizaci specifické úseky genomu. Na současném trhu existuje řada komerčních produktů sloužících k molekulární diagnostice (tzn. k průkazu *Bacillus cereus*, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Shigella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia enterocolitica*, *Clostridium botulinum* a *Salmonella enterica*). Nicméně tyto produkty v rámci jedné reakce umožňují detekovat pouze jeden patogen, a tak identifikace většího počtu druhů patogenů v analyzovaném vzorku může mít velmi vysokou finanční i časovou náročnost.

Pro vybrané bakteriální agens lze najít komerčně dodávané diagnostické soupravy pro detekci buď pomocí kultivačního vyšetření nebo i pomocí qPCR. Jedná se o několik málo firem, které mají ve svém portfoliu soupravy pro tzv. potravinové patogeny. Například německé firmy BIOTECON Diagnostics a Qiagen nebo americká firma Norgen Biotek corporation (např. foodproof® *E. coli* O157 Detection Kit, foodproof SL *Staphylococcus aureus* Detection Kit). Cena individuálních detekčních (případně i typizačních) diagnostických souprav se pohybuje okolo 420 € za 24 reakcí (např. mericon S. aureus Kit) a 1297 € za 96 reakcí (např. mericon *Campylobacter* spp Kit). Nicméně ani jedna firma nenabízí komplexní řešení a pro diagnostiku několika patogenů v rámci jedné reakce je nezbytné si zakoupit více diagnostických souprav, což značně zvyšuje finanční i časovou náročnost na analýzy.

Náklady na provedení analýzy jednoho vzorku při využití výše zmíněného multiplexního detekčního xMAP panelu na průkaz přítomnosti *Bacillus cereus*, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Shigella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia enterocolitica*, *Clostridium botulinum* a *Salmonella enterica* se pohybují okolo 550 Kč bez DPH (cena je bez započítání izolace deoxyribonukleových kyselin a negativních kontrol). Oproti v současnosti dostupným komerčním soupravám tak toto řešení představuje výrazně méně finančně náročnou variantu.

4. Popis technického řešení a nároků na ochranu

Technické řešení diagnostického prostředku, který umožňuje *in vitro* detekci *Bacillus cereus*, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Shigella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia enterocolitica*, *Clostridium botulinum* a *Salmonella enterica* v různých typech rostlinné matrice (smoothie, naklíčená semena, krájené zeleninové saláty, čerstvá zelenina nebo ovoce aj). Toto diagnostické řešení využívá kombinaci

xMAP technologie (Luminex corporation, USA, Texas), multiplexní oligonukleotidové ligační reakce a polymerázové řetězové reakce. Spojení těchto technologií umožňuje v jedné reakci identifikovat přítomnost specifických cílových sekvencí významných výše uvedených potravinových patogenů. Každý druh je identifikován pomocí minimálně dvou nezávislých cílových sekvencí.

Součástí diagnostického prostředku je interní kontrola (IC). Tato kontrola je trvale součástí všech analýz a umožňuje odhalení falešně negativního výsledku v důsledku inhibice analyzovaného vzorku. Interní kontrola vznikla spojením sekvencí dvou vyhynulých druhů a přirozeně se tedy v reálných vzorcích nevyskytuje. *De novo* připravená sekvence byla naklonována do komerčně dostupného plasmidu, ten byl transformován do komerčně dostupných buněk (vše firma Qiagen) a je uchovávána ve formě hluboce zamražené bakteriální suspenze. Použití xMAP technologie ve spojení s IC zaručuje kontrolu analytického postupu. Takto sestavená metoda, jejíž použití je univerzální (veterinární i humánní medicína) je unikátní v následujících položkách:

Kontrola postupu analýzy vzorku (IC)

- Kontrola analýzy vzorků (IC) na přítomnost *Bacillus cereus*, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Shigella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia enterocolitica*, *Clostridium botulinum* a *Salmonella enterica* je složena ze specifických sekvencí dvou vyhynulých živočišných druhů; vakovlka tasvánskeho (*Thylacinus cynocephalus*) a ptáka moa (*Dinornis struthoides*). Připravený konstrukt (připraven pomocí klonování komerčně dostupným kitem od firmy Qiagen) je zcela unikátní a jeho použití je univerzální pro typ vzorku a druh patogenů.
- Pro účely zajištění sensitivity a specificity procesu detekce kontroly byly navrženy a testovány specifické unikátní sekvence nukleových kyselin (viz v Seznam materiálu tzv. oligonukleotidy, které jsou součástí reakčních směsí).
- Kontrola je stabilní až jeden rok při teplotě -20 ± 4 °C.

Složení diagnostického produktu „xMAP panel pro detekci vybraných bakteriálních patogenů v rostlinné matrici“ a jeho uživatelské vlastnosti

- Ligační směsi (označeny Lig 1 a Lig 2) obsahují veškeré složky pro průběh ligace: ligázu, pufr a specifické oligonukleotidy v definovaných koncentracích. Směs

specifických oligonukleotidů zajistí detekci specifických částí genomu *Bacillus cereus*, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Shigella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia enterocolitica*, *Clostridium botulinum*, *Salmonella enterica* a interní kontroly.

- Reakční směs (označena PCR) v jedné zkumavce obsahuje veškeré reakční složky nezbytné pro průběh konvenční PCR. Tyto složky jsou: ultračistá voda, enzym polymeráza, deoxyribonukleotidy (dATP, dCTP, dGTP, dUTP), reakční pufr s optimalizovaným množstvím iontů hořčíku (Mg^{2+}), směs všech potřebných oligonukleotidů.
- Mix specifických mikrosfér (označen M1), jejichž fluorescenční signál umožní stanovit přítomnost specifických úseků genomu *Bacillus cereus*, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Shigella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia enterocolitica*, *Clostridium botulinum*, *Salmonella enterica* a interní kontroly.
- Produkt kromě výše popsanych reakčních směsí obsahuje zkumavku označenou „PC“, která slouží jako pozitivní kontrola reakcí. Obsahuje také příbalovou informaci o použití diagnostické soupravy (včetně návodu k interpretaci získaných výsledků).
- Práce s produktem u uživatele spočívá pouze v odebrání potřebného předepsaného množství „reakční směsi“ a přidání analyzovaného vzorku nebo „PC“.
- Tento produkt je v popsáném složení stabilní maximálně po dobu jednoho roku (při teplotě -20 ± 4 °C).

5. Nároky na ochranu

- 1) Sekvence oligonukleotidů cílových úseků interní kontroly analytického postupu nebo jejich části, použité jako oligonukleotidy (rozpoznávací sekvence ligaci) 5' - 3':
 - a. PHO-ATTAGCACAATGAATAATCATCGTCTCACTTCTTACTACCGCG
 - b. ACTCGTAGGGAATAAACCGTATTGTGAAAGAAAGAGAAGAAATTT
ATACACACGCAATCACCAC.
- 2) Sekvence oligonukleotidů specifických k cílovým úsekům genomu *Bacillus cereus*, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Shigella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia enterocolitica*, *Clostridium botulinum* a *Salmonella enterica*. Rozpoznávací sekvence pro ligaci ve směru 5' - 3':

- a. PHO TTCTAAGTTTGCAAATGGAAATTCCC a TTCTTGAGAACATGTTGTACGAGTTAC
- b. PHO GGCTGAGTTCCTTCAATAATAAGTGG a GTTGTCGTAGTTAATTGTCCACCC
- c. PHO TCCTACTTTGTAACTACTCACGCT a CTCCTTCCTTGTCGCTTAATTCTTC
- d. PHO GGGTGGAATTGAAGTGGCTAAAT a GTCCAACGGCGCATTATTCTAT
- e. PHO GATCATCCAGTGTTGTACGAAATCC a TCATTACATAAGAACGCCCACTGA
- f. PHO CTGGCGTTAATGGAGTTCAGTG a TCGTCACTCACTGGTTTCATCATAT
- g. PHO CCGCAATCTTTCCTGATTTCTG a CGTAATTGTTCTTCCTTACTGTTTCG
- h. PHO GGAATGGTGGAGAACGGTAATT a CAAAGAATGCACTGGTTTAGCTTG
- i. PHO TAACGGAACCTTTGCTAGTCCAA a AGTAGTACCACCAACAACGATTAGTAA
- j. PHO GTTGAGCGAATTCCTTGTCTG a GGGACGGATGAAGCTAGTCTG
- k. PHO CTGTCTCCCGACTTAAAGAATGTCT a CGGTGAAGAGCGTGATGAGG
- l. PHO TCTACGGTTGTTTGGCTAATAGATAAATG a TTCGTCTAATAGAAGTTGATATGCATGC
- m. PHO GCGACCTATTTCCCTAATGCAGC a TGTATGAACCCTATGTCCGATTATTTTC
- n. PHO CGCCAAGAAATGCCCAAAGA a AGAGAATACGGAGCAACAGTTTC
- o. PHO GACAAGCTTGCGATATTCAATCTTTAAG a GCAGTTATGGCCGTTTACATATATG
- p. PHO GTGGTGTCTGTGCAATGGAG a ATTGTGGATGAAGGTGTTAGCG
- q. PHO GCACAGAGATAATTTCCGGGTCA a TCCAGTCAACGGCAACCAC
- r. PHO TGTTGACGGACTATGGCAAGG a GTGAGTATTGCTGCTGTTGTGG
- s. PHO CTATGCTAGAGGTTTGTATATGTTGAATCC a CCTAGAAATATTGATGCAGCACCTAG
- t. PHO AGGATGTGCTTGGTGTGAGG a GAGTGTATAGAGTGTGAAGTTGCAAC
- u. PHO CAGATAGGTAGGTAATGGAATGACGA a TCAGTGCGATCAGGAAATCAA
- v. PHO GTTAAGATTTATGCCTGCCCTGA a GGATCAGCAAAGCCCAGATC

- 3) Složení reakčních směsí, tzv. Lig 1, Lig 2, PCR, M1, které obsahují tyto reakční složky nezbytné pro průběh reakce: enzymy ligáza a polymeráza, deoxyribonukleotidy (dATP, dCTP, dGTP, dUTP), reakční pufr, směs všech potřebných oligonukleotidů, mix specifických mikrosfér.

6. Vysvětlení nároků na ochranu

Ad 1 a 2) Jedná se o unikátní sekvence, které dosud nebyly použity, byly originálně navrženy a testovány v laboratořích Veterinární a farmaceutické univerzity a Výzkumného ústavu veterinárního lékařství, v.v.i.. S jejich pomocí je možné xMAP technologií provést validní analýzu vzorků a identifikovat přítomnost (nebo naopak) vybraných úseků genomu bakterií *Bacillus cereus*, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria*

monocytogenes, *Shigella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia enterocolitica*, *Clostridium botulinum* a *Salmonella enterica*. Také sekvence IC analytického postupu je naprosto jedinečná. Tento metodický produkt je možné použít při diagnostice jakékoli matrice (potravina, prostředí, klinické vzorky) pro diagnostiku v rámci humánní i veterinární medicíny či bezpečnosti potravin. Přesné určení sekvencí genomu výše uvedených bakteriálních agens a kontroly je podmínkou správné a přesné hybridizace nukleových kyselin ve vyšetřovaném vzorku s navrženými krátkými sekvencemi DNA (oligonukleotidy); tyto specifické oligonukleotidy se tak váží výhradně na nukleovou kyselinu výše uvedených bakterií a kontroly. Předmětem ochrany tedy mají být právě uvedené sekvence oligonukleotidů, které jsou použity v tomto diagnostickém prostředku (směr 5' - 3'):

- a. PHO TTCTAAGTTTGCAAATGGAAATTCCC a TTCTTGAGAACATGTTGTACGAGTTAC
- b. PHO GGCTGAGTTCCTTCAATAATAAGTGG a GTTGTCGTAGTTAATTGTCCACCC
- c. PHO TCCTACTTTGTAATCACTCACGCT a CTCCTTCCTTGTCGCTTAATTCTTC
- d. PHO GGGTGGAATTGAAGTGGCTAAAT a GTCCAACGGCGCATTATTCTAT
- e. PHO GATCATCCAGTGTTGTACGAAATCC a TCATTACATAAGAACGCCCACTGA
- f. PHO CTGGCGTTAATGGAGTTCAGTG a TCGTCACTCACTGGTTTCATCATAT
- g. PHO CCGCAATCTTTCCTGATTTCTG a CGTAATTGTTTCCTTCCTTACTGTTCG
- h. PHO GGAATGGTGGAGAACGGTAATT a CAAAGAATGCACTGGTTTAGCTTG
- i. PHO TAACGGAACCTTTGCTAGTCCAA a AGTAGTACCACCAACAACGATTAGTAA
- j. PHO GTTGAGCGAATTCCTTGTCTG a GGGACGGATGAAGCTAGTCTG
- k. PHO CTGTCTCCCGACTTAAAGAATGTCT a CGGTGAAGAGCGTGATGAGG
- l. PHO TCTACGGTTGTTTGGCTAATAGATAAATG a TTCGTCTAATAGAAGTTGATATGCATGC
- m. PHO GCGACCTATTTCTTAATGCAGC a TGTATGAACCCTATGTCCGATTATTTTC
- n. PHO CGCCAAGAAATGCCCAAAGA a AGAGAATACGGAGCAACAGTTTC
- o. PHO GACAAGCTTGCGATATTCAATCTTTAAG a GCAGTTATGGCCGTTACATATATG
- p. PHO GTGGTGTCTGTGCAATGGAG a ATGTGTGGATGAAGGTGTAGCG
- q. PHO GCACAGAGATAATTTCCGGGTCA a TCCAGTCAACGGCAACCAC
- r. PHO TGTTGACGGACTATGGCAAGG a GTGAGTATTGCTGCTGTTGTGG
- s. PHO CTATGCTAGAGGTTTGTATATGTTGAATCC a CCTAGAAATATTGATGCAGCACCTAG
- t. PHO AGGATGTGCTTGGTGTGAGG a GAGTGTATAGAGTGTGAAGTTGCAAC
- u. PHO CAGATAGGTAGGTAATGGAATGACGA a TCAGTGCGATCAGGAAATCAA
- v. PHO GTTAAGATTTATGCCTGCCCTGA a GGATCAGCAAAGCCCAGATC

Specifickým znakem nároku na ochranu je: kterákoliv z uvedených sekvencí nukleové kyseliny, pokud je obsažena v diagnostickém prostředku pro *in vitro* diagnostiku.

Ad 3) Složení reakčních směsí je pro část navržené metody typické a obecně známé. V navrženém nároku na ochranu je však požadována ochrana reakčních směsí, které obsahují všechny uvedené složky najednou: Lig 1 a Lig 2 (voda, pufr, specifické oligonukleotidy 1 a 2), Lig 3 (ligáza), PCR (enzym polymeráza, dATP, dCTP, dGTP, dUTP, reakční pufr, směs všech potřebných oligonukleotidů), IC (interní kontrola) a M1 (mix specifických mikrosfér). Součástí diagnostického prostředku jsou také zkumavky s reakční směsí PC, DDW, M 2, M 3 a AP. Výhodou pro zákazníka je jednoduché použití, kdy k provedení detekce postačí do zkumavky odebrat daný objem reakční směsi a přidat izolovanou nukleovou kyselinu z analyzovaného vzorku. Dalším benefitem je možnost kontroly analýzy vzorku na přítomnost *Bacillus cereus*, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Shigella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia enterocolitica*, *Clostridium botulinum*, *Salmonella enterica* pomocí kontroly (IC), a to vše v rámci jedné reakce.

Specifickým znakem nároku na ochranu jsou čtyři zkumavky, které obsahují minimálně shora uvedené reakční složky, pokud jsou obsaženy v diagnostickém prostředku pro *in vitro* diagnostiku.

7. Seznam materiálu obsaženém v diagnostické soupravě

IC	obsahuje kontrolu analytického postupu
PC	obsahuje DNA patogenů <i>Bacillus cereus</i> , <i>Campylobacter jejuni</i> , <i>Escherichia coli</i> O157:H7, <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Shigella</i> spp., <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Vibrio cholerae</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i> , <i>Clostridium botulinum</i> , <i>Salmonella enterica</i>
DDW	obsahuje ultračistou vodu v PCR kvalitě
Lig směsi	Lig 1 obsahuje: ultračistou vodu, pufr, specifické oligonukleotidy 1 Lig 2 obsahuje: ultračistou vodu, pufr, specifické oligonukleotidy 2 Lig 3 obsahuje: ligázu Poznámka: složení Lig 3 není předmětem nároku na ochranu
PCR	obsahuje vodu, deoxyribonukleotidy, pufr, polymerázu, specifické oligonukleotidy, ale neobsahuje nukleové kyseliny Poznámka: složení PCR není předmětem nároku na ochranu

M směsi	M 1 obsahuje směs specifických mikrosfér M 2 obsahuje roztok NaCl M 3 obsahuje roztok MES Poznámka: složení M2, M3 není předmětem nároku na ochranu.
AP	obsahuje analyzační pufr Poznámka: složení AP není předmětem nároku na ochranu

Sekvence oligonukleotidů specifických pro *Bacillus cereus*, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Shigella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia enterocolitica*, *Clostridium botulinum*, *Salmonella enterica* a IC:

Oligo název	Sekvence (5' - 3')	Délka (nt)
BC_1_M1	PHO TTCTAAGTTTGCAAATGGAAATTCCTGAGGTAGTAAGAGGTGAGG	46
BC_1_M2	CACGATGAGTCCTGAGTAACCTTTGTGTGTTATTGTAATTGAGATTTCTTGAG AACATGTTGTACGAGTTAC	71
BC_2_M3	PHO GGCTGAGTTCCTTCAATAATAAGTGGTGAAGGTAGTAAGAGGTGAGG	46
BC_2_M4	CACGATGAGTCCTGAGTAACCTTTGTTAGAATGAGAAGATTTATGGTTGTCGT AGTTAATTGTCCACCC	68
CJ_1_M1	PHO TCCTACTTTGTAATCACTCACGCTTGAGGTAGTAAGAGGTGAGG	44
CJ_1_M2	CACGATGAGTCCTGAGTAACGTTATGATATAGTGAGTTGTTATTCTCCTT CCTTGTCGCTTAATTCTTC	69
CJ_2_M3	PHO GGGTGGAATTGAAGTGGCTAAATTGAGGTAGTAAGAGGTGAGG	43
CJ_2_M4	CACGATGAGTCCTGAGTAACAATGTAAAGTAAAGAAAGTGATGAGTCC AACGGCGCATTATTCTAT	66
EC_1_M1	PHO GATCATCCAGTGTTGTACGAAATCCTGAGGTAGTAAGAGGTGAGG	45
EC_1_M2	CACGATGAGTCCTGAGTAACATTAAGTAAGAATTGAGAGTTTGATCATT CATAAGAACGCCCACTGA	68
EC_2_M3	PHO CTGGCGTTAATGGAGTTCAGTGTGAGGTAGTAAGAGGTGAGG	42
EC_2_M4	CACGATGAGTCCTGAGTAACGTATATGTTAATGAGATGTTGTATCGT CACTCACTGGTTTCATCATAT	69
EC_3_M5	PHO CCGCAATCTTCCCTGATTTCTGTGAGGTAGTAAGAGGTGAGG	43
EC_3_M6	CACGATGAGTCCTGAGTAACAAAGAATTAGTATGATAGATGAGACGT AATTGTTCTTCCTTACTGTTTCG	70

LM_1_M1	PHO GGAATGGTGGAGAACGGTAATTTGAGGTAGTAAGAGGTGAGG	42
LM_1_M2	CACGATGAGTCCTGAGTAACGTAAGAGTATTGAAATTAGTAAGACAAA GAATGCACTGGTTTAGCTTG	68
LM_2_M3	PHO TAACGGAACCTTTGCTAGTCCAATGAGGTAGTAAGAGGTGAGG	43
LM_2_M4	CACGATGAGTCCTGAGTAACGTAATTGAATTGAAAGATAAGTGTAGTAG TACCACCAACAACGATTAGTAA	71
LM_3_M5	PHO GTTGAGCGAATTCCTTGTCTGTGAGGTAGTAAGAGGTGAGG	42
LM_3_M6	CACGATGAGTCCTGAGTAACGTATAGTGTGATTAGATTTGTAAAGG GACGGATGAAGCTAGTCTG	65
SF_1_M1	PHO CTGTCTCCCGACTTAAAGAATGTCTTGAGGTAGTAAGAGGTGAGG	45
SF_2_M2	CACGATGAGTCCTGAGTAACAAATAAGAATAGAGAGAGAAAGTTCGGTG AAGAGCGTGATGAGG	64
SA_1_M1	PHO TCTACGGTTGTTTGGCTAATAGATAAATGTGAGGTAGTAAGAGGTGAGG	49
SA_1_M2	ACGATGAGTCCTGAGTAACGTTGTAAATTGTAGTAAAGAAGTATTCGTCTAAT AGAAGTTGATATGCATGC	71
SA_2_M3	PHO GCGACCTATTTCTAATGCAGCTGAGGTAGTAAGAGGTGAGG	42
SA_2_M4	CACGATGAGTCCTGAGTAACGTTGAGAATTAGAATTTGATAAAGTGTAT GAACCCTATGTCCGATTATTTT	71
SA_3_M5	PHO CGCCAAGAAATGCCCAAAGATGAGGTAGTAAGAGGTGAGG	40
SA_3_M6	CACGATGAGTCCTGAGTAACGATTGATATTTGAATGTTTGTGTTGAGAG AATACGGAGCAACAGTTTC	71
VCH_1_M1	PHO GACAAGCTTGCGATATTCAATCTTTAAGTGAGGTAGTAAGAGGTGAGG	48
VCH_1_M2	ACGATGAGTCCTGAGTAACTATGAATGTTATTGTGTGTTGATTGCAGTTATGG CCGTTACATATATG	68
VCH_2_M3	PHO GTGGTGTCTGTGCAATGGAGTGAGGTAGTAAGAGGTGAGG	40
VCH_2_M4	CACGATGAGTCCTGAGTAACAAGATGATAGTTAAGTGTAAGTTAATT GTGGATGAAGGTGTTAGCG	66
YE_1_M1	PHO GCACAGAGATAATTTCCGGGTCATGAGGTAGTAAGAGGTGAGG	43
YE_1_M2	CACGATGAGTCCTGAGTAACTAGAGAAAGAGAGAATTGTATTAATCCA GTCAACGGCAACCAC	63
YE_2_M3	PHO TGTTGACGGACTATGGCAAGGTGAGGTAGTAAGAGGTGAGG	41
YE_2_M4	CACGATGAGTCCTGAGTAACAATTAGAAGTAAGTAGAGTTTAAGGTGA GTATTGCTGCTGTTGTGG	66
CB_1_M1	PHO CTATGCTAGAGGTTTGTATATGTTGAATCCTGAGGTAGTAAGAGGTGAGG	50
CB_1_M2	CACGATGAGTCCTGAGTAACGTGTGTTATTTGTTTGTAAAGTATCCTAGAAATAT TGATGCAGCACCTAG	70
CB_2_M3	PHO AGGATGTGCTTGGTGTGAGGTGAGGTAGTAAGAGGTGAGG	40
CB_2_M4	CACGATGAGTCCTGAGTAACTTTGATTTAAGAGTGTTGAATGTAGAGTGATAGA GTGTGAAGTTGCAAC	70

SE_1_M1	PHO CAGATAGGTAGGTAATGGAATGACGATGAGGTAGTAAGAGGTGAGG	46
SE_1_M2	ACGATGAGTCCTGAGTAACGTTAGTTATGATGAATATTGTGTATCAGTGCGATCAG GAAATCAAC	65
SE_2_M3	PHO GTTAAGATTTATGCCTGCCCTGATGAGGTAGTAAGAGGTGAGG	43
SE_2_M4	CACGATGAGTCCTGAGTAACTTTAAGTGAGTTATAGAAGTAGTAGGATCAGCAAA GCCCAGATC	64

Vývoj prototypu diagnostického prostředku – detekční soupravy probíhal v rámci řešení projektu Ministerstva Zemědělství ČR QK1810212.

Literatura

- Alegbeleye, O. O., Singleton, I., & Sant'Ana, A. S. 2018. Sources and contamination routes of microbial pathogens to fresh produce during field cultivation: a review. *Food Microbiology*, 73, 177-208.
- Berger, C. N., Sodha, S. V., Shaw, R. K., Griffin, P. M., Pink, D., Hand, P., Frankel, G. 2010. Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. *Environmental Microbiology*, 12: 2385-2397.
- Blackburn, C.W., McClure, P.J. 2009. *Foodborne Pathogens: Hazards, Risk Analysis and Control*. Woodhead Publishing, 2nd Ed., ISBN 978-1-84569-362-6
- Dixon, B. R. 2016. Parasitic illnesses associated with the consumption of fresh produce - an emerging issue in developed countries. *Current Opinion in Food Science*, 8: 104-109.
- Dziedzinská, R., Morávková, M., Hrdý, J., Slaná, I., Vlková, H., Kunstovná, H., Vašíčková, P. 2018. Čerstvé džusy a smoothies – sledování výskytu legislativou neregulovaných významných patogenů bakteriálního, virového a parazitárního původu. *Výživa a potraviny*, 5: 136-140.
- EFSA (European Food Safety Authority) & ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). 2016. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. *EFSA Journal*, 15(12): 5077, 228.
- Freeman, K., Mistry, H., Tsertsvadze, A., Royle, P., McCarthy, N., Taylor-Phillips, S., Manuel, R., Mason, J. 2017. Multiplex tests to identify gastrointestinal bacteria, viruses and parasites in people with suspected infectious gastroenteritis: a systematic review and economic analysis. *Health Technol Assess*, 21(23): 1-188.
- Heaton, J. C., & Jones, K. (2008). Microbial contamination of fruit and vegetables and the behaviour of enteropathogens in the phyllosphere: a review. *Journal of Applied Microbiology*, 104(3), 613-626.

- Khan I., Khan J., Miskeen S., CN T., YS P., DH O. 2016. Prevalence and control of *Listeria monocytogenes* in the food industry – a review. Czech J. Food Sci., 34: 469-487.
- Park, K. M., Jeong, M., Park, K. J., & Koo, M. (2018). Prevalence, enterotoxin genes, and antibiotic resistance of *Bacillus cereus* isolated from raw vegetables in Korea. Journal of Food Protection, 81(10), 1590-1597.
- Tefera T., T. K. R., Utaaker K. S., Robertson L. J. 2018. Parasite contamination of berries: Risk, occurrence, and approaches for mitigation. Food and Waterborne Parasitology, 10: 16.
- Yu, P., Yu, S., Wang, J., Guo, H., Zhang, Y., Liao, X., ... & Zeng, H. (2019). *Bacillus cereus* isolated from vegetables in China: incidence, genetic diversity, virulence genes, and antimicrobial resistance. Frontiers in Microbiology, 10, 948.

xMAP panel pro detekci vybraných bakteriálních patogenů v rostlinné matrici

Popis

Diagnostický prostředek umožňující *in vitro* detekci vybraných závažných patogenů bakteriálního původu, které se mohou vyskytovat v rostlinné matrici (ovoce, zelenina, bylinky, naklíčená semena). Technické řešení k průkazu uvedených patogenů využívá kombinaci xMAP technologií (Luminex corporation, USA, Texas) zahrnující specifické multiplexní oligonukleotidové ligační reakce a jejich amplifikaci pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR). Spojení těchto molekulárních metod umožňuje v jedné reakci provést analýzu vzorku a detekovat tak širokou škálu vybraných úseků deoxyribonukleových kyselin (DNA). Jako interní kontrola analýzy u každého vzorku je použit uměle vytvořený konstrukt, který poskytuje informaci o možné falešné negativitě analyzovaného vzorku. Tato detekční souprava je unikátní svým složením a možností simultánní detekce deseti patogenních agens a interní kontroly v jedné reakci. xMAP panel je navržen pro detekci vybraných zoonotických patogenů, které je možné detekovat v rostlinné matrici.

Složky detekční soupravy

Tato souprava obsahuje složky, které jsou nezbytné k analýze 20/50 vzorků.

	Označení víčka	Název	Objem 20/50 reakcí	Složky
1		IC	20/50 µl	Interní kontrola
2		PC	100/250 µl	DNA patogenů <i>Bacillus cereus</i> , <i>Campylobacter jejuni</i> , <i>Escherichia coli</i> O157:H7, <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Shigella</i> spp., <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Vibrio cholerae</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i> , <i>Clostridium botulinum</i> , <i>Salmonella enterica</i>
3		DDW	1/2×1,5 ml	voda v PCR kvalitě
4		Lig 1	220/550 µl	voda, pufr, specifické oligonukleotidy 1
5		Lig 2	220/550 µl	voda, pufr, specifické oligonukleotidy 2
6		Lig 3	10/25 µl	ligáza
7		PCR	360/900 µl	voda, deoxyribonukleotidy, pufr, polymeráza, specifické oligonukleotidy
8		M 1	34/85 µl	mix specifických mikrosfér
9		M 2	16/40 µl	roztok NaCl
10		M 3	50/125 µl	roztok MES
11		AP	900/2 250 µl	analyzační pufr

Skladování

Složky soupravy 1 - 8 skladujte při -20 ± 4 °C po dobu max. jednoho roku. Složky soupravy 9 - 11 skladujte při 4–8 °C po dobu max. jednoho roku. Reagencie chraňte před světlem. Nevhodné podmínky skladování mohou negativně ovlivnit výsledky analýz.

Návod na použití

Ligace

- každý běh musí zahrnovat analyzovaný vzorek (vzorky) a dále pozitivní kontrolu (PC), negativní kontrolu izolace (NIC) a negativní kontrolu ligace s ultračistou vodou (NCL) – tedy minimálně 4 separátní reakce
- rozmrazit, náležitě vortexovat a krátce centrifugovat roztoky Lig 1, Lig 2 a Lig 3
- k analýze jednoho vzorku smíchat v 0,2 ml zkumavce 11 µl Lig 1, 11 µl Lig 2 a 0,5 µl Lig 3 (celkový objem 22,5 µl); stejným postupem připravit i reakce pro PC, NIC a NCL
- ke 22,5 µl ligační směsi přidat 2,5 µl DNA do zkumavek v následujícím pořadí:
 - (1) DNA analyzovaného vzorku
 - (2) pozitivní kontrola (PC)
 - (3) negativní kontrola izolace (NIC)
 - (4) negativní kontrola ligace (NCL)
- krátce vortexovat a centrifugovat, po vložení do termocycleru spustit protokol ligační reakce:

Úvodní denaturace		95 °C/ 10 min
Denaturace	20 cyklů	95 °C/ 30 s
Ligace		59 °C/ 60 s
Chlazení		10 °C/ ∞

Konvenční PCR

- rozmrazit a náležitě vortexovat a krátce centrifugovat roztok PCR
- do každé 0,2 ml PCR zkumavky pipetovat 18 µl PCR roztoku
- k 18 µl směsi přidat 6 µl produktu ligační reakce v následujícím pořadí:
 - (1) analyzovaný vzorek
 - (2) pozitivní kontrola (PC)
 - (3) negativní kontrola izolace (NIC)
 - (4) negativní kontrola ligace (NCL)
 - (5) negativní kontrola PCR (NCP) – ultračistá voda

- krátce vortexovat a centrifugovat, po vložení do termocycleru spustit protokol konvenční PCR:

Úvodní denaturace		95 °C/ 2 min
Denaturace	40 cyklů	95 °C/ 15 s
Annealing		60 °C/ 15 s
Extenze		72 °C/ 15 s
Chlazení		10 °C/ ∞

Hybridizace

- roztoky M 1, M 2 a M 3 krátce promíchat v ultrazvukové lázni
- pro analýzu jednoho vzorku smíchat 1,7 µl roztoku M 1, 0,8 µl roztoku M 2 a 2,5 µl roztoku M 3 (celkový objem 5,0 µl); množství úměrně navýšit počtu analyzovaných vzorků a kontrolních vzorků (celkem tedy min. 5 pro každý běh)
- rozdělit vytvořený mix po 5 µl do 0,2 ml PCR zkumavek
- k 5 µl směsi přidat 10 µl produktu konvenční PCR v následujícím pořadí:
 - (1) analyzovaný vzorek
 - (2) pozitivní kontrola (PC)
 - (3) negativní kontrola izolace (NIC)
 - (4) negativní kontrola ligace (NCL)
 - (5) negativní kontrola PCR (NCP)
 - (6) negativní kontrola xMAP analýzy (NCX) – ultračistá voda
- krátce centrifugovat a provést hybridizaci v termocycleru dle protokolu hybridizace:

Úvodní denaturace	96 °C/ 90 s
Hybridizace	37 °C/ 30 min

Hodnocení výsledků

Po provedení hybridizace jsou vzorky analyzovány na přístroji Luminex MAGPIX® System (Luminex corporation, USA, Texas).

- po provedení hybridizace vzorky krátce centrifugovat a ihned ke každému vzorku přidat 45 µl roztoku AP vytemperovaného na laboratorní teplotu;
- krátce centrifugovat a provést analýzu na přístroji Luminex MAGPIX® System (Luminex corporation, USA, Texas).

Je-li fluorescenční signál daného vzorku v příslušném regionu mikrosfér po odečtení hodnoty fluorescence negativní kontroly vyšší jak 50 (medián intenzity fluorescence; MFI), je vzorek vyhodnocen jako pozitivní.

	Označení detekčního cíle	Patogen	Region mikrosfér
1	BC_1	<i>Bacillus cereus</i>	67
2	BC_2	<i>Bacillus cereus</i>	75
3	CJ_1	<i>Campylobacter jejuni</i>	77
4	CJ_2	<i>Campylobacter jejuni</i>	44
5	EC_1	<i>Escherichia coli</i> O157:H7 Shiga toxin 1	21
6	EC_2	<i>Escherichia coli</i> O157:H7 Shiga toxin 2	37
7	EC_3	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	76
8	LM_1	<i>Listeria monocytogenes</i>	66
9	LM_2	<i>Listeria monocytogenes</i>	18
10	LM_3	<i>Listeria monocytogenes</i>	78
11	Sh_1	<i>Shigella</i> spp.	43
12	SA_1	<i>Staphylococcus aureus</i>	15
13	SA_2	<i>Staphylococcus aureus</i>	73
14	SA_3	<i>Staphylococcus aureus</i>	22
15	VCh_1	<i>Vibrio cholerae</i>	48
16	VCh_2	<i>Vibrio cholerae</i>	27
17	YE_1	<i>Yersinia enterocolitica</i>	54
18	YE_2	<i>Yersinia enterocolitica</i>	56
19	CB_1	<i>Clostridium botulinum</i>	19
20	CB_2	<i>Clostridium botulinum</i>	26
21	SE_1	<i>Salmonella enterica</i>	54
22	SE_2	<i>Salmonella enterica</i>	56
23	IC	Interní kontrola	14

Pozn.:

Pokud je výsledek v případě regionu pro interní kontrolu vyhodnocen jako negativní, může se jednat o inhibici reakce nebo nedokonalé provedení izolace NK. V tomto případě je nutné izolovanou NK 5× a 10× naředit, případně zopakovat izolaci NK.



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