



CERTIFIKOVANÁ METODIKA

**Kvalitativní detekce patogenní
Yersinia enterocolitica
pomocí metody MOL-PCR**

**Mgr. Nikol Reslová
Mgr. Veronika Huvarová
Mgr. Petr Králík, Ph.D.**

UPLATNĚNÁ CERTIFIKOVANÁ METODIKA

č. 104/2018

Kvalitativní detekce patogenní *Yersinia enterocolitica* pomocí metody MOL-PCR

Autoři

Mgr. Nikol Reslová, Mgr. Veronika Huvarová, Mgr. Petr Králík, 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.

Osvědčení o uplatnění certifikované metodiky: Příloha č. 45 k čj. MO 332470/2018-684808

Vydalo: Agentura vojenského zdravotnictví AČR VÚ 6848, 500 02 Hradec Králové, 2018

ISBN 978-80-88233-46-6

Oponenti certifikované metodiky:

Mgr. Martina Grochová

Státní ústav jaderné, chemické a biologické ochrany, v.v.i.

Prof. RNDr. Aleš Knoll, Ph.D.

Mendelova univerzita v Brně

PŘEDMLUVA

Yersinia enterocolitica (YE) je zoonotický patogen, který způsobuje akutní gastroenteritidu a příležitostně závažnější onemocnění u lidí (Bari et al., 2011). Vzhledem k tomu, že může růst a množit se při teplotě 4°C, je to také významný potravinový patogen. Při alimentární infekci pronikají bakterie z tenkého střeva do buněk okolní tkáně a může docházet ke tvorbě nekróz a vředů. Infekce YE se může projevovat různými příznaky v závislosti na věku infikované osoby. Nejčastěji se vyskytuje yersinióza u malých dětí (mladších 5 let), přičemž převládajícími příznaky jsou horečka, bolest břicha a průjem, který je často krvavý.

Předpokládá se, že hlavním rezervoárem patogenní YE jsou prasata, ale také jiná domácí zvířata, jako jsou psi, kočky, krávy, ovce a koně a několik zvířat divokých, jako jsou opice nebo jeleni. YE bývá často izolována také z půdy, vody a různých druhů potravin. Kmeny YE se dělí do šesti biotypů, které byly biochemickými testy rozděleny na 1A, 1B, 2, 3, 4 a 5 a více než 50 sérotypů (Bottone, 1997). Geografické rozložení sérotypů YE je rozmanité a jen málo z nich je patogenních. Sérotyp O: 3 je nejčastěji izolovaný typ u lidí v Evropě, O: 8 je primárně izolován v USA následovaný sérotypy O: 3, O: 5,27, O: 13a, 13b, O: 20 nebo O: 9. Diagnostika patogenní YE je založena převážně na kultivačním pomnožení ze vzorku a následné detekci faktorů virulence u izolovaných kmenů (Thoerner et al., 2003).

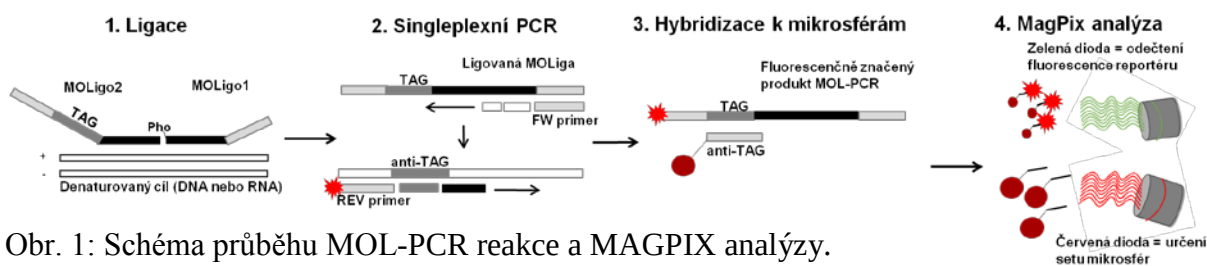
I) CÍL METODIKY

Předkládaná metodika nabízí rychlý a standardizovaný postup detekce přítomnosti patogenní bakterie *Yersinia enterocolitica*, respektive její nukleové kyseliny (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 patogenní *YE* je založen na detekci specifické sekvence faktoru virulence, vyskytujícího se pouze v genomu patogenních kmenů této bakterie. Jedná se o multiplexní MOL-PCR systém (Reslová et al. 2018), 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 sady 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 – gen *ail*

Gen *ail* je chromozomální faktor virulence přítomný pouze v patogenních kmenech *Y. enterocolitica*, který kóduje vnější membránový protein podílející se na přichycení a invazi do hostitelských buněk (Bottone, 1997; Thoerner et al., 2003). MOLigo sondy pro detekci genu *ail* byly testovány na ověřeném kmenu ze sbírky zoopatogenních mikroorganismů Výzkumného ústavu veterinárního lékařství v Brně: *Yersinia enterocolitica* CAPM 6154 (sérovar O2,3; biovar 3).

Sekvence MOLig:

Tučně = sekvence pro vazbu univerzálních PCR primerů; podtržené = sekvence specifická pro patogenní *YE*; malá písmena = TAG sekvence MTAG-A019 umožňující specifickou vazbu k mikrosférám; PHO = fosfátová skupina.

YE_M1: 5'- PHO-GGAGTAATAGGTTTCGTTTGTCTCACTTCTTACTACCGCG - 3' (39)

YE_M2: 5' - ACTCGTAGGGAATAAACCGTgtgtgttatttgtttgtaaagtatGAACTCGATGATAACTGG - 3' (62)

Těmito sondami je možné detekovat část 697-bp dlouhého genu *ail* v rozsahu 2007896 - 2007932 bp (Acc. No. AM286415.1), délka zachycené sekvence specifické pro patogenní *YE* = 37 bp. Celková délka produktu ligace detekčních sond = 101 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 tasvánského (*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 $-20^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$ ve 2 ml zkumavkách se šroubovacím víčkem do vypotřebování.

Sekvence MOLig:

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

IC_2_M1 5'-

PHO- ATTAGCACAATGAATAATCATCGTCTCACTTCTTACTACCGCG- 3' (43)

IC_2_M2 5'-

ACTCGTAGGGAATAAACCGTtattgtgaaagaaagagaagaaattTATACACACGCAATCACCA
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 *YE* na základě detekce genu pro virulenci při komplexní analýze vzorků pocházejících ze tkání a trusu zvířat, prostředí a potravin 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 5 bakteriálních a 5 parazitárních systémů - *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli* (EHEC), *Taenia saginata*, *Trichinella spiralis*, *Toxoplasma gondii* a *Giardia intestinalis*.. Kvalitativní detekce probíhá prostřednictvím odečtení fluorescenčního signálu vzorku oproti negativní kontrole.

4 Přístroje a pomůcky

- DNA Engine Dyad Peltier Thermal Cyclor (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 mikrozskumavky o objemu 0,2 ml x 96 se separátními víčky (Bioplastics, Nizozemsko)

- PCR deska s jamkami na objem 0,2 ml (Bioplastics, Nizozemsko)
- Chladnička (do 5 °C)
- Mrazicí box (-20 °C)
- Centrifuga MiniSpin
- Vortex V-1 Plus

5 **Chemikálie a roztoky**

5.1 **Ligáza**

Hifi *Taq* DNA Ligase a 10X Hifi *Taq* DNA Ligase Reaction Buffer (New England BioLabs, USA), katalogové číslo M0647 S. Ligázu s 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 kvantitativní detekci pomocí MOL-PCR je doporučeno připravit si alikvoty premixů pro 100 reakcí skládající se ze všech komponent kromě ligázy a templátové

DNA. 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 YE_M1a YE_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 a sonifikovat asi 30 s.

5.8 Roztoky pro hybridizaci

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

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	2 500 mikrosfér/set	250 000 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 rozalikvotovat do zkumavek o objemu 5 ml, které slouží na jedno použití. Nutno skladovat v chladničce při teplotě 4 °C.

Složení a příprava analyzačního pufru:

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

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

5.12 Kalibrační a verifikační kity pro MAGPIX

Kalibrační kit MAGPIX® Calibrator Kit, RUO, 25 Uses (Luminex Corp., USA), katalogové číslo MPX-CAL-K25 a verifikační kit MAGPIX® Performance Verification Kit, RUO, 25 Uses (Luminex Corp., USA), katalogové číslo MPX-PVER-K25. Oba kity je doporučeno skladovat při teplotě 4 °C a chránit před světlem. Za normálních podmínek jsou kity stabilní do data expirace. Před každým použitím je nutno všechny složky kitů řádně vortexovat a sonifikovat asi 30 s. Bio-Plex Manager™ MP software sám naznačí, kdy je třeba

provést kalibraci a verifikaci přístroje; kalibrace se provádí asi jednou týdně, verifikace po každém spuštění přístroje před analýzou vzorků.

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 a 15% sava 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
Savo Original	Unilever SAVO (Nizozemsko)	15%	37 ml	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 přenesse 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 Bio-Plex Manager™ MP softwaru se postupně navolí údržbové rutiny: Calibration and Verification (dle potřeby), Verification a Prime. Po skončení analýz se před vypnutím přístroje vždy provádí rutina Shut Down.

6.7 Provedení zkoušky

6.7.1 Ligační protokol

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

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

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

6.7.2 PCR protokol

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

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

^a uchování do dalšího zpracování

6.7.3 Hybridizační protokol

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

1 cyklus	Úvodní denaturace	94 °C (1 min)	
	Pomalé ochlazování	94 °C - > 25 °C	rychlost 0,1 °C/s
	Hold ^a	10 °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 Bio-Plex Manager™ 6.1 softwaru (Bio-Rad, 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 blanku 30 MFI (empiricky stanovená hodnota). Jednotlivé MFI hodnoty vzorků se podělí MFI hodnotou negativní kontroly NTC. Je-li výsledný **poměr (P) vyšší než 3 a hodnota MFI daného vzorku vyšší než 50**, vzorek je 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 patogenní YE
Pozitivní (+)	Negativní (-)	Vzorek je pozitivní na patogenní YE
Negativní (-)	Pozitivní (+)	Vzorek je negativní na patogenní YE
Negativní (-)	Negativní (-)	Vzorek je inhibován

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

8 Validace

8.1 Specificita

Navržené sekvence MOLig byly porovnány pomocí algoritmu BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Sekvence specifická pro cílový úsek byla 100% identická s referenčními sekvencemi zastoupenými v databázi a současně nevykazovala identitu s jinými organismy. Specificita MOLig byla testována na různých sbírkových kmenech (viz. tabulka níže) a byla také ověřena v Reslová et al. (2018) na celé řadě dalších bakteriálních i parazitárních patogenů, konkrétně u *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* (EHEC), *Toxoplasma gondii*, *Taenia saginata*, *Trichinella spiralis* a *Giardia intestinalis*. Specificita převzatých univerzálních primerů byla ověřena na 13-ti genotypch *Bacillus anthracis* v případě Thierry et al. (2013), ale mimo jiné také na 11-ti sérotypech *Escherichia coli* (STEC) v publikaci Woods et al. (2016).

Výsledky testování detekčního systému pro YE na různých sbírkových kmenech:

Sbírkové kmeny	<i>Y. enterocolitica</i>	<i>C. jejuni</i>	<i>E. coli</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. enterica</i>
<i>Salmonella enterica</i> CAPM 5439	Negativní	Negativní	Negativní	Negativní	Pozitivní
<i>Salmonella enterica</i> CAPM 5445	Negativní	Negativní	Negativní	Negativní	Pozitivní
<i>Salmonella enterica</i> CAPM 5456	Negativní	Negativní	Negativní	Negativní	Pozitivní
<i>Salmonella enterica</i> CAPM 6324	Negativní	Negativní	Negativní	Negativní	Pozitivní
<i>Campylobacter jejuni</i> CAPM 6313	Negativní	Pozitivní	Negativní	Negativní	Negativní
<i>Campylobacter jejuni</i> CAPM 6316	Negativní	Pozitivní	Negativní	Negativní	Negativní
<i>Campylobacter jejuni</i> CAPM 6341	Negativní	Pozitivní	Negativní	Negativní	Negativní
<i>Campylobacter jejuni</i> CAPM 6352	Negativní	Pozitivní	Negativní	Negativní	Negativní
<i>Escherichia coli</i> CAPM 6009	Negativní	Negativní	Negativní	Negativní	Negativní
<i>Escherichia coli</i> CAPM 6120	Negativní	Negativní	Negativní	Negativní	Negativní
<i>Escherichia coli</i> CAPM 6130	Negativní	Negativní	Negativní	Negativní	Negativní
<i>Escherichia coli</i> CAPM 5905	Negativní	Negativní	Negativní	Negativní	Negativní
<i>Escherichia coli</i> CAPM 5928	Negativní	Negativní	Negativní	Negativní	Negativní
<i>Escherichia coli</i> CAPM 6556	Negativní	Negativní	Negativní	Negativní	Negativní
<i>Escherichia coli</i> CAPM 5969	Negativní	Negativní	Negativní	Negativní	Negativní
<i>Escherichia coli</i> CAPM 5933	Negativní	Negativní	Negativní	Negativní	Negativní
<i>Escherichia coli</i> CAPM 5224	Negativní	Negativní	Negativní	Negativní	Negativní
<i>Escherichia coli</i> CAPM 5357	Negativní	Negativní	Negativní	Negativní	Negativní
<i>Escherichia coli</i> CAPM 5358	Negativní	Negativní	Pozitivní	Negativní	Negativní
<i>Escherichia coli</i> CAPM 5399	Negativní	Negativní	Pozitivní	Negativní	Negativní
<i>Escherichia coli</i> CAPM 6113	Negativní	Negativní	Pozitivní	Negativní	Negativní
<i>Yersinia enterocolitica</i> CAPM 6154	Pozitivní	Negativní	Negativní	Negativní	Negativní
<i>Yersinia enterocolitica</i> CAPM 5671	Pozitivní	Negativní	Negativní	Negativní	Negativní
<i>Yersinia enterocolitica</i> CAPM 5908	Pozitivní	Negativní	Negativní	Negativní	Negativní
<i>Yersinia enterocolitica</i> CAPM 6458	Pozitivní	Negativní	Negativní	Negativní	Negativní
<i>Yersinia enterocolitica</i> CAPM 6459	Pozitivní	Negativní	Negativní	Negativní	Negativní
<i>Listeria monocytogenes</i> CAPM 5576	Negativní	Negativní	Negativní	Pozitivní	Negativní
<i>Listeria monocytogenes</i> CAPM 5577	Negativní	Negativní	Negativní	Pozitivní	Negativní
<i>Listeria monocytogenes</i> CAPM 5879	Negativní	Negativní	Negativní	Pozitivní	Negativní
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> CAPM 5763	Pozitivní	Negativní	Negativní	Negativní	Negativní
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> CAPM 6495	Pozitivní	Negativní	Negativní	Negativní	Negativní
<i>Yersinia ruckeri</i> CAPM 6095	Negativní	Negativní	Negativní	Negativní	Negativní
<i>Listeria grayi</i> CAPM 5887	Negativní	Negativní	Negativní	Negativní	Negativní
<i>Listeria ivanovii</i> CAPM 5884	Negativní	Negativní	Negativní	Negativní	Negativní
<i>Listeria seeligeri</i> CAPM 5885	Negativní	Negativní	Negativní	Negativní	Negativní
<i>Streptococcus agalactiae</i> CAPM 5668	Negativní	Negativní	Negativní	Negativní	Negativní
<i>Streptococcus pneumoniae</i> CAPM 5361	Negativní	Negativní	Negativní	Negativní	Negativní
<i>Klebsiella pneumoniae</i> CAPM 6241	Negativní	Negativní	Negativní	Negativní	Negativní
<i>Enterococcus faecalis</i> CAPM 5613	Negativní	Negativní	Negativní	Negativní	Negativní
<i>Enterobacter aerogenes</i> CAPM 5634	Negativní	Negativní	Negativní	Negativní	Negativní
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CAPM 5717	Negativní	Negativní	Negativní	Negativní	Negativní
<i>Arcanobacterium haemolyticum</i> CAPM 5948	Negativní	Negativní	Negativní	Negativní	Negativní
<i>Corynebacterium kutscheri</i> CAPM 6492	Negativní	Negativní	Negativní	Negativní	Negativní
<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> CAPM 6558	Negativní	Negativní	Negativní	Negativní	Negativní
<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i> CAPM 5014	Negativní	Negativní	Negativní	Negativní	Negativní
<i>Dermatophilus congolensis</i> CAPM 6439	Negativní	Negativní	Negativní	Negativní	Negativní
<i>Staphylococcus epidermidis</i> CAPM 5657	Negativní	Negativní	Negativní	Negativní	Negativní
<i>Staphylococcus hyicus</i> CAPM 6346	Negativní	Negativní	Negativní	Negativní	Negativní
<i>Staphylococcus aureus</i> CAPM 6566	Negativní	Negativní	Negativní	Negativní	Negativní
<i>Staphylococcus saccharolyticus</i> CAPM 6146	Negativní	Negativní	Negativní	Negativní	Negativní

8.2 Citlivost/limit detekce (LOD)

LOD je určena jako koncentrace, kterou je pomocí daného testu možné detekovat s 95% mírou pravděpodobnosti. Pokud bereme v úvahu Poissonovu distribuci, nejnižší teoreticky možný LOD pro MOL-PCR je 1 ng templátové DNA pro cíl. Tento limit detekce byl stanoven experimentálně v multiplexním formátu, kdy byla izolovaná DNA naředěna na koncentraci od 4 ng/μl do 4 pg/μl. Vstupní množství DNA do reakce je 2,5 μl, do každé reakce tak byla přidávána DNA v koncentraci od 10 ng do 0,01 ng/μl.

8.3 Optimalizace reakčních podmínek

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

Funkčnost optimalizovaných reakčních podmínek byla ověřena v monoplexních i multiplexních formátech reakce, přičemž nejvyšší testovaná úroveň multiplexu čítala 11 systémů (Reslová et al., 2018).

8.4 Kruhový test

Vzorky pro kruhový test byly připraveny na VÚVeL v podobě koncentračního gradientu izolované DNA s ohledem na stanovenou citlivost multiplexní MOL-PCR reakce 1 ng templátové DNA pro daný cíl.

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

Vzorek	Vzorek po izolaci DNA	Kvalitativní detekce patogenní <i>YE</i>			
		VÚVeL	VVetÚ Hlučín	VFU Brno	ÚVN Praha
Z	Neředěný	+	+	+	+
5X	5X ředěný	+	+	+	+
10X	10X ředěný	+	+	+	+

S	100X ředěný	+	–	+	+
Ex	Negativní + 10X ředěná DNA <i>S. aureus</i>	–	–	–	–
K+	IC (1 ng/μl)	+	+	+	+
NTC	Negativní	–	–	–	–

Výsledky kruhového testu potvrdily použitelnost metodiky v rutinní laboratorní praxi.

9 Operativní řízení jakosti

Je řešeno:

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

III) SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

Vzhledem k tomu, že nejsou k dispozici jednotné a srovnatelné metodické přístupy získávání dat o prevalenci patogenní bakterie *Y. enterocolitica* 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. Zároveň jsou pro tuto metodiku stanoveny parametry limitu detekce. Na základě rychlé a spolehlivé kvalitativní detekce je pak možno vybrané vzorky vykazující pozitivitu podrobit kvantifikační analýze pomocí real time PCR a determinovat tak infekční dávku.

Předložená metodika byla vyvinuta s ohledem na její budoucí diagnostické uplatnění. Proto u ní byla provedena kompletní optimalizace, otestována specifita a citlivost, propracován systém kontrol a hodnocení. Funkčnost byla ověřena pro monoplexní i vysoce multiplexní účely. Předložený MOL-PCR systém umožňuje komplexní přístup k detekci patogenních kmenů bakterie *Yersinia enterocolitica* 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 patogenního původce yersinióz. Navržený postup je vhodný pro kontrolu různých typů chovů prasat domácích a dalších hospodářských zvířat, ale také pro vyšetření rizikových potravin distribuovaných tržní sítí a určených ke konzumaci člověkem.

V) SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Bari, M., Hossain, M. A., Isshiki, K., & Ukuku, D. 2011. Behavior of *Yersinia enterocolitica* in Foods. *Journal of pathogens*, 2011.

Bottone, E. J. 1997. *Yersinia enterocolitica*: the charisma continues. *Clinical microbiology reviews*, 10(2), 257-276.

Deshpande, A., Gans, J., Graves, S.W., Green, L., Taylor, L., Kim, H.B., Kunde, Y.A., Leonard, P.M., Li, P., Mark, J., Song, J., Vuyisich, M., White, P.S. 2010. A rapid multiplex assay for nucleic acid-based diagnostics. *Journal of Microbiological Methods* 80, 155-163, doi:10.1016/j.mimet.2009.12.001.

EFSA, 2017. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. *EFSA Journal* 15, 228.

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.

Reslová, N., Huvarová, V., Hrdý, J., Kašný, M., Králík, P. 2018. A novel perspective on MOL-PCR optimization and MAGPIX analysis of in-house multiplex foodborne pathogens detection assay. *Scientific Reports*.

Thierry, S., Hamidjaja, R.A., Girault, G., Löfström, C., Ruuls, R., Sylviane, D. 2013. A multiplex bead-based suspension array assay for interrogation of phylogenetically informative single nucleotide polymorphisms for *Bacillus anthracis*. *Journal of Microbiological Methods* 95: 357-365. doi:10.1016/j.mimet.2013.10.004.

Thoerner, P., Kingombe, C. B., Bögli-Stuber, K., Bissig-Choisat, B., Wassenaar, T. M., Frey, J., & Jemmi, T. 2003. PCR detection of virulence genes in *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* and investigation of virulence gene distribution. *Applied and environmental microbiology*, 69(3), 1810-1816.

Woods, T. A., Mendez, H.M., Ortega, S., Shi, X., Marx, D., Bai, J., Moxley, B.A., Nagaraja, T.G., Graves, S. W., Deshpande, A. 2016. Development of 11-Plex MOL-PCR Assay for the Rapid Screening of Samples for Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 6, doi:10.3389/fcimb.2016.00092.



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