



## CERTIFIKOVANÁ METODIKA

---

### Kvalitativní detekce adenovirů (sérotypy 40 a 41) pomocí metody MOL-PCR

**Mgr. Jakub Hrdý**  
**Mgr. Petr Králík, Ph.D.**

# UPLATNĚNÁ CERTIFIKOVANÁ METODIKA

č. 111/2019

## Kvalitativní detekce adenovirů (sérotypy 40 a 41) pomocí metody MOL-PCR

### Autoři

Mgr. Jakub Hrdý, Mgr. Petr Králík, Ph.D.

č. osvědčení **MO 332555/2019-684808**

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

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

ISBN 978-80-88233-60-2

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

Adenoviry (AdV) jsou řazeny do čeledi *Adenoviridae*. Jedná se o středně velké neobalené ikosahedrální virové částice s genomem v podobě lineární nesegmentované dvouřetězcové DNA o velikosti od 26 do 45 kb. Velikost virové kapsidy se pohybuje v rozsahu od 65 do 80 nm. AdV způsobují infekce jak u lidí, tak i u řady vnímavých zvířat. Lidské adenoviry se třídí do 7 skupin (A-G) a dále do 67 odlišných typů. Gastroenteritidy se pojí s viry ze skupin F a G, konkrétně nejčastěji sérotypy 40 a 41 (Barnadas et al. 2018; Buckwalter et al. 2012; Davison et al. 2003; Ghebremedhin 2014).

I díky svému širokému rozšíření jsou AdV často považovány jako indikátor fekálního znečištění (Wyn-Jones et al. 2011). Střevní onemocnění adenoviry nemá ve většině případů závažnější průběh, výjimku tvoří jen malé děti a imunokompromitovaní jedinci (Gonzales-Gustavson et al. 2019).

Předkládaná metodika nabízí standardizovaný postup detekce přítomnosti viru, respektive jeho nukleové kyseliny, v klinických vzorcích, v tkáních či trusu zvířat, ve vzorcích z prostředí, v pitné vodě nebo v potravinách rostlinného a živočišného původu.

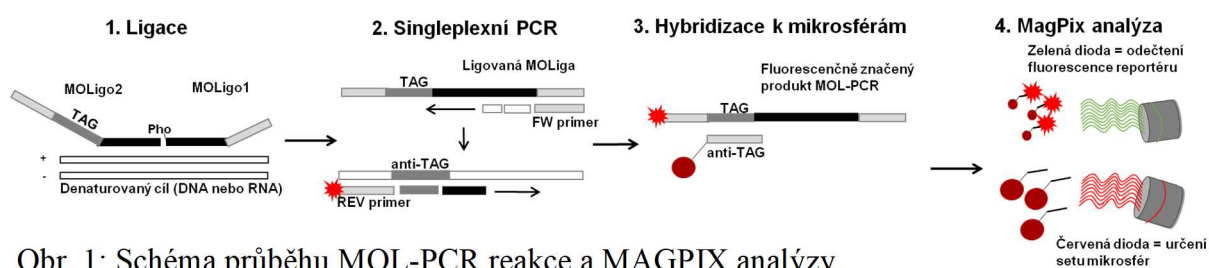
## I) CÍL METODIKY

Předkládaná metodika nabízí rychlý a standardizovaný postup detekce přítomnosti AdV (sérotypy 40 a 41), respektive jejich 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/RNA může být použita izolovaná nukleová kyselina různého původu, např. z klinických vzorků, tkání a trusu zvířat, z prostředí, z pitné vody nebo surovin a potravin živočišného i rostlinného původu. 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 AdV (sérotypy 40 a 41) je založen na detekci specifické sekvence vyskytující se v genomu tohoto viru. První krok analýzy představuje multiplexní MOL-PCR systém (Reslova et al. 2019), kde detekce probíhá prostřednictvím hybridizace dvou specifických modulárních detekčních sond neboli MOLig bezprostředně vedle sebe k cílové sekvenci a jejich následné ligace v jednu komplexní sekvenci; ta je amplifikována a specificky vycíhávána na povrch magnetických mikrosfér prostřednictvím hybridizace TAG/anti-TAG sekvencí (syntetické sekvence obsahující pouze báze T, A a G specifické pouze pro daný typ mikrosfér). Modularita MOLig (Obr. 1) spočívá v tom, že kromě cílově specifické sekvence nesou také sekvenci pro vazbu univerzálních PCR primerů a TAG sekvenci pro vazbu k anti-TAGu na povrchu magnetických mikrosfér. Jednotlivé sety mikrosfér (dostupných 50 setů) se odlišují koncentrací dvou vnitřních fluoroforů, což umožňuje jejich vzájemné rozlišení a tak identifikaci specifického cíle vyvázaného na jejich povrchu. Samotné kvalitativní vyhodnocení probíhá prostřednictvím odečtení fluorescenčního signálu mikrosfér a na jejich povrchu přichycených fluorescenčně značených produktů MOL-PCR.



Obr. 1: Schéma průběhu MOL-PCR reakce a MAGPIX analýzy.

Pho = fosfátová skupina umožňující ligaci; černě = sekvence specifická pro zachycovaný cíl; šedě = vazebná sekvence pro univerzální PCR primery; TAG = sekvence komplementární k anti-TAGu na mikrosférách; červeně = fluorescenční reportér.

Do každé reakce je přidána interní kontrola, která upozorní na falešně negativní výsledek v důsledku přítomnosti inhibitorů ovlivňujících průběh reakce.

## 1.1 Cíl

Na základě srovnání v současnosti dostupných sekvencí celých genomů AdV (sérotypy 40 a 41) byl jako nejvhodnější zvolen konzervativní úsek ležící v oblasti pro hlavní kapsidový protein hexon (Olive et al. 2002).

### Sekvence MOLig:

Tučně = sekvence pro vazbu univerzálních PCR primerů; podtržené = sekvence specifická pro AdV (sérotypy 40 a 41); malá písmena = TAG sekvence MTAG-A043 umožňující specifickou vazbu k mikrosférám; PHO = fosfátová skupina.

AdV\_M1: 5'- PHO-GCCAGCACBTWCTTTGACATTCTCACTTCTTACTACCGCG  
-3' (40)

AdV\_M2:

5'- ACTCGTAGGGAATAAACCGTaaataagaatagagagaaagttGACAACMGRGT  
GYTRGAYATG - 3' (65)

Délka specifické sekvence modulárních sond pro genomy AdV (sérotypy 40 a 41) = 41 bp.  
Celková délka produktu ligace detekčních sond = 105 bp.

## 1.2 Interní kontrola

Interní kontrola (IC) je přidávána do každé reakce. Slouží nejen k odhalení falešně negativních výsledků v důsledku inhibice MOL-PCR reakce, ale také jako pozitivní kontrola. IC byla navržena tak, aby pro všechny MOL-PCR systémy mohl být použit stejný pár IC MOLig a stejná sada univerzálních PCR primerů; jedná se tedy o univerzální IC. Při přípravě IC byla použita nekompetitivní syntetická sekvence založená na DNA sekvencích dvou vyhynulých druhů; konkrétně se jedná o mitochondriální DNA vakovlka tasmánského (*Thylacinus cynocephalus*, Acc. No. FJ515781.1) a ptáka moa (*Dinornis struthoides*, Acc. No.

AY326187.1). Tato kontrolní syntetická sekvence o délce 150 bp byla převzata z Mikel et al. (2016), syntetizována *de novo* a klonována do plazmidu. Takto připravený konstrukt je zcela arteficiální a podobná sekvence se nevyskytuje v žádném známém živočišném, rostlinném, či bakteriálním druhu. IC je tedy možné použít pro jakýkoliv templát či matrici. IC je skladována při teplotě  $-20^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$  do vypotřebování.

### **Sekvence MOLig:**

Tučně = sekvence pro vazbu univerzálních PCR primerů; 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'-  
ACTCGTAGGGAATAAACCGTtattgtgaaagaaagagaagaattTATACACACGCAATCACCA  
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 amplikonu odpovídá délce jednotlivých produktů ligace (~ 110 bp).

## **2 Předmět a působnost**

Tato metodika slouží ke kvalitativní detekci AdV (sérotypy 40 a 41) na základě cílové konzervativní sekvence při komplexní analýze vzorků pocházejících z klinických vzorků, tkání a trusu zvířat, z prostředí, z pitné vody nebo surovin a potravin živočišného i rostlinného původu prostřednictvím metody MOL-PCR.

### **3 Podstata zkoušky**

Multiplexní oligonukleotidová ligační polymerázová řetězová reakce (MOL-PCR) s interní kontrolou (IC). Komplexní a simultánní detekce demonstrována v multiplexu čítajícím 7 virových systémů a systém interní kontroly (8-plex) – virus hepatitidy A, virus hepatitidy E (jeden cíl pro genotyp 1 a jeden cíl pro genotyp 3), norovirus (jeden cíl pro genogroups I a jeden cíl pro genogroups II), adenoviry (40 a 41), rotavirus (rotavirus A). Kvalitativní detekce probíhá prostřednictvím odečtení fluorescenčního signálu vzorku oproti negativní kontrole.

### **4 Přístroje a pomůcky**

- DNA Engine Dyad Peltier Thermal Cycler (Bio-Rad, USA)
- Bio-Plex MAGPIX Multiplex Reader (Bio-Rad, USA)
- xPONENT 4.2. ® SOFTWARE (Luminex, USA)
- Ultrasonic Cleaning Bath (BioTech, Česká republika)
- Sada pipet:
  - s rozsahem nastavitelným od 1000 – 5000 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 mikrozkmavky 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 EliZyme™ HS Robust MIX (Elisabeth Pharmacon, Česká republika), katalogové číslo EZ6060. Master Mix je doporučeno skladovat při teplotě -20 °C a neměl by být dlouhodobě vystavován světlu. V případě skladování Master Mixu při teplotě 4 °C je stabilita deklarována po dobu jednoho měsíce. Za normálních podmínek je Master Mix stabilní do data expirace.

### **5.3 Voda pro MOL-PCR**

Pro ředění všech komponent MOL-PCR reakce se používá voda PCR H<sub>2</sub>O (Top-Bio, Česká republika), katalogové číslo P242. Skladovat při pokojové teplotě.

### **5.4 Ředění MOLig a PCR primerů**

Specifická MOLiga a univerzální PCR primery se dodávají v lyofilizovaném stavu od firmy Generi-Biotech (Česká republika). Podle návodu uvedeného výrobcem jsou na pracovišti rozpuštěny v PCR H<sub>2</sub>O (Top-Bio, Česká republika) tak, aby výsledná zásobní koncentrace byla 100 pmol/μl. Sondy i primery jsou evidovány a uloženy v mrazničce při teplotě cca -20°C ± 4°C. Při přípravě ligačního premixu se používá pracovní roztok o koncentraci MOLig 1 pmol/μl, jak je uvedeno v odstavci 5.5. Při přípravě PCR premixu se používá pracovní roztok o koncentraci univerzálních primerů 10 pmol/μl, jak je uvedeno v odstavci 5.6.

### **5.5 Příprava ligačního premixu**

Pro reprodukovatelnou kvantitativní detekci pomocí MOL-PCR je doporučeno připravit si alikvoty premixů pro 100 reakcí. Pokud není ligační premix použit okamžitě, je zapotřebí jej uchovávat rozdělen na dvě části, jedna obsahuje pouze MOLiga 1 (M1) a druhá pouze MOLiga 2 (M2). Obě tyto směsi obsahují kromě MOLig i příslušné množství vody, ligačního pufru a interní kontroly. Před použitím se tyto dvě směsi smíchají dohromady a k výslednému roztoku se přidá pouze dané množství ligázy a templátové DNA. Premixy se skladují při cca -20°C ± 4°C. Alikvoty premixů lze opakovaně zamrazovat a rozmrazovat, maximálně však 5x.

Jednotlivé složky je doporučeno přidávat podle uvedeného pořadí:

Složka	1 reakce	100 reakcí	Výsledná koncentrace
PCR voda	doplnit objem	100 × doplnit objem	
10X Hifi <i>Taq</i> DNA Ligase Reaction Buffer	2,5 µl	250 µl	1X
MOLigo sondy AdV_M1 a AdV_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	$1 \times 10^3$ kopií
Hifi <i>Taq</i> DNA Ligase	0,5 µl	50 µl	
Templátová DNA	2,5 µl	100 × 2,5 µl	
Celkem	25 µl	2500 µl	

$x_1$  = počet dalších MOLigo sond v multiplexní reakci

## 5.6 Příprava PCR premixu

Pro reprodukovatelnou kvalitativní detekci pomocí MOL-PCR je doporučeno připravit si alikvoty premixů pro 100 reakcí skládající se ze všech komponent kromě produktů ligace, které je vždy nutno využít čerstvé. Premixy se skladují při cca  $-20^\circ\text{C} \pm 4^\circ\text{C}$ . Alikvoty premixů lze opakovaně zamrazovat a rozmrazovat maximálně však 5×.

Jednotlivé složky je doporučeno přidávat podle uvedeného pořadí:

Složka	1 reakce	100 reakcí	Výsledná koncentrace
PCR voda	5,25 µl	525 µl	
2X EliZyme™ HS Robust MIX	12 µl	1200 µl	1X
Primer uni FW (10 pmol/µl)	0,15 µl	15 µl	0,0625 µM
Primer uni REV-BODIPY (10 pmol/µl)	0,6 µl	60 µl	0,25 µM
Produkt ligace	6 µl	100 × 6 µl	
Celkem	24 µl	2400 µl	

## 5.7 Magnetické mikrosféry

MagPlex<sup>®</sup> Microspheres (12,5 x 10<sup>6</sup> mikrosfér/ml; Luminex Corp., USA), katalogové číslo MC100XX-01 (XX = 12-78, dle seznamu dostupných setů od firmy Luminex Corp.). Potažené mikrosféry v 1X TE pufru je nutno skladovat v chladničce při teplotě 4 °C a chránit před světlem. Za normálních podmínek jsou stabilní déle než 1 rok. Před každým použitím je nutno mikrosféry řádně vortexovat a sonifikovat asi 30 s.

## 5.8 Roztoky pro hybridizaci

Roztoky, které jsou součástí kuličkového mixu (odstavec 5.9) se připravují za použití ultračisté vody. Výsledné roztoky je třeba přefiltrovat 0,22 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	Výsledná koncentrace
--------	----------	------------	----------------------

0,1 M MES	2,5 µl	250 µl	0,05 M
5 M NaCl	0,8 µl	80 µl	0,8 M
Směs potažených MagPlex® Microspheres	1 250 mikrosfér/set	125 000 mikrosfér/set	
1X TE pufr	doplnit objem	100 × doplnit objem	
Celkem	5 µl	500 µl	

### 5.10 Příprava hybridizační reakce

Hybridizační reakce se připravuje čerstvá pro konkrétní počet vzorků v reakci a ihned probíhá specifická hybridizace MOL-PCR produktů k povrchu mikrosfér; hybridizační reakce se nepřipravuje a neuchovává ve formě premixu.

Jednotlivé složky je doporučeno přidávat podle uvedeného pořadí:

Složka	1 reakce	100 reakcí
Kuličkový mix	5 µl	500 µl
MOL-PCR produkt	10 µl	100 × 10 µl
celkem	15 µl	1500 µl

### 5.11 Analyzační pufr

Roztok se připravuje za použití ultračisté vody. Výsledný roztok analyzačního pufru je třeba přefiltrovat 0,22 µm filtrem a rozalíkvotovat do zkumavek o objemu 5 ml, které slouží na jedno použití. Nutno skladovat v chladničce při teplotě 4 °C.

Složení a příprava analyzačního pufru:

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

<sup>a</sup> = zásobní Trizma base neobsahuje Cl<sup>-</sup>, ten je doplněn během úpravy pH pomocí HCl kyseliny

### 5.12 Kalibrační a verifikační kity pro MAGPIX

Kalibrační kit MAGPIX® Calibrator Kit, RUO, 25 Uses (Luminex Corp., USA), katalogové číslo MPX-CAL-K25 a verifikační kit MAGPIX® Performance Verification Kit, RUO, 25 Uses (Luminex Corp., USA), katalogové číslo MPX-PVER-K25. Oba kity je

doporučeno skladovat při teplotě 4 °C a chránit před světlem. Za normálních podmínek jsou kity stabilní do data expirace. Před každým použitím je nutno všechny složky kitů řádně vortexovat a sonifikovat asi 30 s. xPONENT 4.2. ® SOFTWARE sám naznačí, kdy je třeba provést kalibraci a verifikaci přístroje; kalibrace a verifikace se provádí dle individuálního nastavení (standardně každých 60 dní).

### 5.13 Drive fluid

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

### 5.14 Roztoky pro údržbu přístroje MAGPIX

Údržbové rutiny přístroje i samotná analýza vyžadují doplnění dH<sub>2</sub>O, 70% isopropanolu, 0,1 N NaOH. Roztoky se připravují za použití ultračisté vody. Výsledné roztoky se skladují při pokojové teplotě a užívají se až do úplné spotřeby.

Složka	Katalog. č.	Výsledná koncentrace	Množství/250 ml	Skladování
100% isopropanol	PENTA 17510-20005 (Česká republika)	70%	180 ml	pokojová teplota
NaOH	PENTA 15760-31000 (Česká republika)	0,1 N	0,1 g	pokojová teplota

## 6 Postup zkoušky

### 6.1 Bezpečnostní opatření

Provedení metody nevyžaduje žádné zvláštní bezpečnostní opatření.

### 6.2 Okolní podmínky zkoušky

Provedení metody nevyžaduje kontrolu žádných limitních podmínek.

### 6.3 Množství vzorku

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

## **6.4 Slepý pokus**

### **6.4.1 Negativní kontrola**

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

### **6.4.2 Pozitivní kontrola**

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

## **6.5 Replikáty**

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

## **6.6 Kalibrace měřícího prostředku před zkouškou**

Po spuštění přístroje je třeba vždy provést několik úkonů. Nejprve se sací jehla promyje a sonifikuje v destilované vodě (dH<sub>2</sub>O). Zkontroluje se naplnění kontejnerů pro Drive fluid a odpad (waste container). V programu xPONENT 4.2. ® SOFTWARE se postupně navolí údržbové rutiny: Calibration and Verification, Verification a Prime aj. (dle potřeby). Po skončení analýz se před vypnutím přístroje vždy provádí rutina Shut Down.

## 6.7 Provedení zkoušky

### 6.7.1 Ligační protokol

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

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

<sup>a</sup> uchování do dalšího zpracování; nutno zpracovat během jednoho dne

### 6.7.2 PCR protokol

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

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

<sup>a</sup> uchování do dalšího zpracování

### 6.7.3 Hybridizační protokol

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

1 cyklus	Úvodní denaturace	96 °C (90 s)
1 cyklus	Hybridizace	37 °C (30 min)

*Pozn.:* doporučeno okamžité zpracování

### 6.7.4 Analýza

Přístroj: Bio-Plex MAGPIX Multiplex Reader (Bio-Rad, California, USA). Analýza probíhá při pokojové teplotě a měření 96-ti jamkové desky trvá asi 45 minut. Naměřené hodnoty jsou zobrazeny v xPONENT 4.2. ® SOFTWARE (Luminex, USA), odkud jsou hrubá data exportována do Excelu, kde jsou jednoduchým výpočtem vyhodnocena.

## 7 Výpočet a vyjádření výsledku

### 7.1 Hodnocení výstupu

Od naměřených hodnot mediánu intenzity fluorescence (MFI) se odečte hodnota MFI příslušné negativní kontroly NTC pro daný region mikrosfér. **Je-li výsledná hodnota (P) vyšší než 100, vzorek je vyhodnocen jako pozitivní.**

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

### 7.1.1 Kvalitativní hodnocení

Kvalitativní hodnocení se provádí podle následující tabulky:

Cíl	IC	Celkový výsledek
Pozitivní (+)	Pozitivní (+)	Vzorek je pozitivní na přítomnost AdV (sérotypy 40 a 41)
Pozitivní (+)	Negativní (-)	Vzorek je pozitivní na přítomnost AdV (sérotypy 40 a 41) <sup>a</sup>
Negativní (-)	Pozitivní (+)	Vzorek je negativní na přítomnost AdV (sérotypy 40 a 41)
Negativní (-)	Negativní (-)	Vzorek je inhibován <sup>b</sup>

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

<sup>a</sup>Vzorek je pozitivní na přítomnost detekovaného cíle, nicméně je negativní v případě interní kontroly. V tomto případě neproběhla reakce ideálním způsobem. Může se jednat o inhibici reakce nebo nedokonalé provedení izolace nukleové kyseliny (NK). V tomto případě je nutné izolovanou NK 5× a 10× naředit, případně zopakovat izolaci NK ze zásobního duplikátu. Ředění je třeba vzít v potaz v rámci vyhodnocování výsledků celého analytického postupu.

<sup>b</sup>Vzorek je negativní v případě interní kontroly. V tomto případě neproběhla reakce ideálním způsobem. 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 ze zásobního duplikátu. Ředění 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 převzatých univerzálních primerů byla ověřena na 13-ti genotypech *Bacillus anthracis* v případě Thierry et al. (2013), ale mimo jiné také na 11-ti sérotypech *Escherichia coli* (STEC) v publikaci Woods et al. (2016).



## 8.2 Optimalizace reakčních podmínek

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

Funkčnost optimalizovaných reakčních podmínek byla ověřena v monoplexních i multiplexních formátech reakce, přičemž nejvyšší testovaná úroveň multiplexu čítala 8 systémů.

## 8.3 Kruhový test

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

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

Vzorek	Vzorek po izolaci DNA	Kvalitativní detekce AdV (sérotypy 40 a 41)			
		VÚVeL	VVeTÚ Hlučín	VFU Brno	CBO Těchonín
Z	Neředěný	+	+	+	+
5X	5X ředěný	+	+	+	+
10X	10X ředěný	+	+	+	+
SM	Stopové množství	+	+	+	+
Ex	Negativní + 10X ředěná DNA <i>S. aureus</i>	-	-	-	-
K+	IC	+	+	+	+
NTC	Negativní	-	-	-	-

Výsledky kruhového testu potvrdily použitelnost metodiky v rutinní laboratorní praxi.

## **9 Operativní řízení jakosti**

Je řešeno:

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

### **III) SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ**

Představená metodika je oproti dříve publikovaným postupům inovativní svým vysokým stupněm multiplexu, schopného kombinovat detekci několika nezávislých cílů a interní kontroly. Tato kombinace tak umožňuje rychlý skrínink vyšetřovaného vzorku na předpokládané spektrum patogenů, jejichž výskyt je vázaný na danou matici a současně umožňuje vyloučit falešně negativní výsledek v důsledku přítomnosti inhibitorů. Zároveň jsou pro tuto metodiku stanoveny parametry limitu detekce. Na základě rychlé a spolehlivé kvalitativní detekce je pak možno vybrané vzorky vykazující pozitivitu podrobit kvantifikační analýze pomocí real time PCR a determinovat tak infekční dávku.

Předložená metodika byla vyvinuta s ohledem na její budoucí diagnostické uplatnění. Proto u ní byla provedena kompletní optimalizace, otestována 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 AdV (sérotypy 40 a 41) 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 adenovirů (sérotyp 40 a 41) v různých typech vzorků (klinické vzorky, veterinární vzorky, vzorky prostředí). Uživatel využije výsledků metodiky k posouzení nutnosti zavedení preventivních a kontrolních opatření. Uživatelem metodiky/výsledků získaných jejím uplatněním budou laboratoře zabývající se diagnostikou onemocnění zvířat, případně lidí, případně další laboratoře zabývající se vyšetřováním surovin a potravin živočišného a rostlinného původu.

### **V) SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

Barnadas C, Schmidt DJ, Fischer TK, Fonager J (2018) Molecular epidemiology of human adenovirus infections in Denmark, 2011-2016. *J Clin Virol* 104:16-22 doi:10.1016/j.jcv.2018.04.012

Buckwalter SP, Teo R, Espy MJ, Sloan LM, Smith TF, Pritt BS (2012) Real-time qualitative PCR for 57 human adenovirus types from multiple specimen sources. *J Clin Microbiol* 50(3):766-71 doi:10.1128/JCM.05629-11

Davison AJ, Benko M, Harrach B (2003) Genetic content and evolution of adenoviruses. *J Gen Virol* 84(Pt 11):2895-908 doi:10.1099/vir.0.19497-0

Ghebremedhin B (2014) Human adenovirus: Viral pathogen with increasing importance. *Eur J Microbiol Immunol (Bp)* 4(1):26-33 doi:10.1556/EuJMI.4.2014.1.2

Gonzales-Gustavson E, Rusinol M, Medema G, Calvo M, Girones R (2019) Quantitative risk assessment of norovirus and adenovirus for the use of reclaimed water to irrigate lettuce in Catalonia. *Water Res* 153:91-99 doi:10.1016/j.watres.2018.12.070

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

Olive M, Eisenlohr L, Flomenberg N, Hsu S, Flomenberg P (2002) The adenovirus capsid protein hexon contains a highly conserved human CD4+ T-cell epitope. *Hum Gene Ther* 13(10):1167-78 doi:10.1089/104303402320138952

Reslova N, Huvarova V, Hrdy J, Kasny M, Kralik P (2019) A novel perspective on MOL-PCR optimization and MAGPIX analysis of in-house multiplex foodborne pathogens detection assay. *Sci Rep* 9(1):2719 doi:10.1038/s41598-019-40035-5

Stucki D, Malla B, Hostettler S, Huna T, Feldmann J, Yeboah-Manu D, Borrell S, Fenner L, Comas I, Coscolla M, Gagneux S (2012) Two new rapid SNP-typing methods for classifying *Mycobacterium tuberculosis* complex into the main phylogenetic lineages. *PLoS One* 7(7):e41253 doi:10.1371/journal.pone.0041253

Thierry S, Hamidjaja RA, Girault G, Lofstrom C, Ruuls R, Sylviane D (2013) A multiplex bead-based suspension array assay for interrogation of phylogenetically informative single nucleotide polymorphisms for *Bacillus anthracis*. *J Microbiol Methods* 95(3):357-65 doi:10.1016/j.mimet.2013.10.004

Woods TA, Mendez HM, Ortega S, Shi X, Marx D, Bai J, Moxley RA, Nagaraja TG, Graves SW, Deshpande A (2016) Development of 11-Plex MOL-PCR Assay for the Rapid Screening of Samples for Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. *Front Cell Infect Microbiol* 6:92 doi:10.3389/fcimb.2016.00092

Wyn-Jones AP, Carducci A, Cook N, D'Agostino M, Divizia M, Fleischer J, Gantzer C, Gawler A, Girones R, Holler C, Husman AMD, Kay D, Kozyra I, Lopez-Pila J, Muscillo M, Nascimento MS, Papageorgiou G, Rutjes S, Sellwood J, Szewzyk R, Wyer M (2011) Surveillance of adenoviruses and noroviruses in European recreational waters. *Water Research* 45(3):1025-1038 doi:10.1016/j.watres.2010.10.015

VÚVeL 

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

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