



CERTIFIKOVANÁ METODIKA

Kvalitativní detekce viru hepatitidy A pomocí metody MOL-PCR

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

UPLATNĚNÁ CERTIFIKOVANÁ METODIKA

č. 112/2019

Kvalitativní detekce viru hepatitidy A 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 978-80-88233-61-9

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

Virus hepatitidy A (HAV) se řadí do čeledi *Picornaviridae*, konkrétně do rodu *Hepatitisvirus*. Jedná se o virus, jehož genom je v podobě jednořetězcové nesegmentované RNA s pozitivní polaritou. Velikost genomu se pohybuje okolo 7,5 kb. Tato RNA je uzavřena v ikosahedrální proteinové kapsidě o průměru v rozsahu od 27 do 32 nm. V současnosti je v rámci tohoto rodu rozeznáváno 7 odlišných genotypů a 1 sérotyp (Lin et al. 2017).

HAV je původcem zánětlivých onemocnění jater s často poměrně dlouhou inkubační dobou (v rádech týdnů). Onemocnění postihuje hlavně starší děti a dospělé, je ale běžné i u mladších dětí, u nichž však většinou probíhá bezpříznakově. K přenosu onemocnění nejčastěji dochází prostřednictvím mezilidského kontaktu, nicméně, význam má i přenos prostřednictvím kontaminovaných potravin či vodních zdrojů (Boxman et al. 2007; Lee et al. 2012). HAV je vysoce infekční agens, z toho důvodu je jeho spolehlivá detekce i v malých koncentracích velmi důležitá. Ročně je celosvětově postiženo asi 10 miliónů lidí, u zhruba poloviny těchto případů zůstává zdroj infekce neznámý (Fiore et al. 2006; Lee et al. 2012). Z důvodu navyšování hygienických standardů dochází častěji k prvnímu kontaktu u starších jedinců, kteří již nejsou pod ochranou mateřských protilátek. Onemocnění tak může mít závažnější průběh, v některých případech i fatální - imunokompromitovaní a starší jedinci (Carter 2005; Koopmans and Duizer 2004).

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.

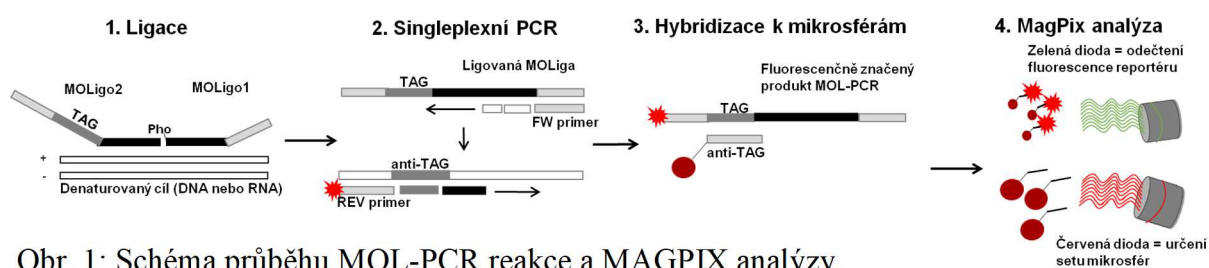
I) CÍL METODIKY

Předkládaná metodika nabízí rychlý a standardizovaný postup detekce přítomnosti HAV, respektive jeho nukleové kyseliny (RNA), 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, z 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 s předcházejícím krokem RT

Průkaz přítomnosti HAV je založen na detekci specifické sekvence vyskytující se v genomu tohoto viru. Prvním krokem analýzy je provedení reverzní transkripce (RT) za využití specifického primeru. Poté následuje 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 vychytána na povrch magnetických mikrosfér prostřednictvím hybridizace TAG/anti-TAG sekvencí (syntetické sekvence obsahující pouze báze T, A a G, specifické pouze pro daný typ mikrosfér). Modularita MOLig (Obr. 1) spočívá v tom, že kromě cílově specifické sekvence nesou také sekvenci pro vazbu univerzálních PCR primerů a TAG sekvenci pro vazbu k anti-TAGu na povrchu magnetických mikrosfér. Jednotlivé sety mikrosfér (dostupných 50 setů) se odlišují koncentrací dvou vnitřních fluoroforů, což umožňuje jejich vzájemné rozlišení a tak identifikaci specifického cíle vyvážaného 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 celého genomu HAV byl jako nejvhodnější zvolen konzervativní úsek ležící v nepřekládané oblasti 5'- konce (5'UTR). Tato oblast obsahuje řadu regulačních prvků (iniciace translace), díky čemuž musí být zachován její konzervativní ráz (Wu et al. 2014).

Sekvence primeru pro reverzní transkripci

Sekvence reverzního primeru byla navržena dle analýzy celého genomu HAV. Byl zvolen konzervativní úsek předcházející části genomu, na kterou jsou navrženy specifické modulární detekční sondy.

HAV_RT_primer: 5'- GTCCCAATTAGACTCCTACAGCT - 3' (25)

Sekvence MOLig:

Tučně = sekvence pro vazbu univerzálních PCR primerů; podtrženě = sekvence specifická pro HAV; malá písmena = TAG sekvence MTAG-A033 umožňující specifickou vazbu k mikrosférám; PHO = fosfátová skupina.

HAV_M1: 5'- PHO-ATGGAGCTGTAGGAGTCTAATCTCACTTCTTACTACCGCG
-3' (40)

HAV_M2:

5'- ACTCGTAGGGAATAAACCGTtattagagtttgagaataagtagtGGGTCAACTCCAT
GATTAGC - 3' (64)

Délka specifické sekvence modulárních sond pro genom HAV = 40 bp. Celková délka produktu ligace detekčních sond = 104 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 byla převzata z Mikel et al. (2016), syntetizována *de novo* a klonována do plazmidu. Následně byl připraven *in vitro* transkript (RNA). Takto připravená kontrola je zcela arteficiální a podobná sekvence se nevyskytuje v žádném známém živočišném, rostlinném, či bakteriálním druhu. IC je tedy možné použít pro jakýkoliv templát či matici. IC v podobě RNA je skladována v alikvotech pro jedno použití při teplotě $-70^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$ do vypotřebování.

Sekvence primeru pro reverzní transkripci

Sekvence reverzního primeru pro IC je navržena pro úsek předcházející úseku sekvence interní kontroly, na který jsou navrženy specifické modulární detekční sondy.

IC_RT_primer: 5'-GGTTTAGAATGTTTTCTCCCGT-3' (22)

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'-
ACTCGTAGGGAATAAACCGTattgtgaaagaaagagaagaattTATACACACGCAATCACCA
C-3' (64)

Tyto sondy jsou komplementární k úseku kontrolní syntetické sekvence o délce 43 bp. Celková délka produktu ligace detekčních sond, a tím i amplikonu je 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 HAV 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 s předcházejícím krokem RT.

3 Podstata zkoušky

Multiplexní oligonukleotidová ligační polymerázová řetězová reakce (MOL-PCR), které předchází RT, 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 (sérotypy 40 a 41) a 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 mikrokumavky o objemu 0,2 ml x 96 se separátními víčky (Bioplastics, Nizozemsko)
- PCR deska s jamkami na objem 0,2 ml (Bioplastics, Nizozemsko)
- Chladnička (do 5 °C)
- Mrazicí box (-20 °C)
- Centrifuga MiniSpin
- Vortex V-1 Plus

5 Chemikálie a roztoky

5.1 Reverzní transkriptáza, inhibitor RNáz, dNTP

PrimerScript Reverse Transcriptase a 5X PrimeScript buffer (Moloney Murine Leukemia Virus; 200 U/µl; Takara), katalogové číslo 2680A. RNase Inhibitor (40 U/µl; New England Biolabs), katalogové číslo M0307L. dNTP PCR Mix (solution 10 mM, Serva), katalogové číslo 3971202. Reverzní transkriptázu, inhibitor RNáz a dNTP mix je nutné skladovat při teplotě -20 °C. Za normálních podmínek stabilní do data expirace.

5.2 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.

5.3 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.

5.4 Voda pro RT a MOL-PCR

Pro ředění všech komponent MOL-PCR reakce se používá voda PCR H₂O (Top-Bio, Česká republika), katalogové číslo P242. Pro složky RT se používá RNase-free voda - PCR Ultra H₂O (Top-Bio, Česká republika), katalogové číslo P240. Skladovat při pokojové teplotě.

5.5 Ředění MOLig a primerů

Specifická MOLiga, univerzální PCR primery a primery pro reverzní transkripci se dodávají v lyofilizovaném stavu od firmy Generi-Biotech (Česká republika). Podle návodu uvedeného výrobcem jsou na pracovišti rozpuštěny v PCR H₂O či PCR Ultra H₂O (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 5.7. Při přípravě prvního premixu pro RT a PCR premixu se používá pracovní roztok o koncentraci univerzálních a reverzních primerů 10 pmol/μl, jak je uvedeno v odstavci 5.6.1 a 5.8.

5.6 Příprava RT premixu

Pro reprodukovatelnou kvantitativní detekci pomocí MOL-PCR s předcházejícím krokem RT je doporučeno připravit si alikvoty premixů pro 100 reakcí. Pro reverzní transkripci je zapotřebí dvou směsí. První směs se skládá z reverzních primerů pro detekované cíle a interní kontrolu, dNTP a RNA interní kontroly. Tento premix je možné připravit předem a uchovávat v alikvotech pro jednu reakci při cca -70°C ± 4°C. Před použitím se k 5 μl tohoto premixu přidá 5 μl templátové izolované RNA.

5.6.1 První RT mix

Jednotlivé složky je doporučeno přidávat podle uvedeného pořadí:

Složka	1 reakce	100 reakcí	Výsledná koncentrace
RNase-free voda	doplnit objem	100 × doplnit objem	
dNTP mix (10 nmol/μl)	1 μl	100 μl	0,5 nmol/μl
HAV_RT_primer (10 pmol/μl) pro cíl	0,2 μl	20 μl	0,1 pmol/μl
IC_RT_primer (10 pmol/ μl) pro IC	0,2 μl	20 μl	0,1 pmol/μl
Směs reverzních primerů (10 pmol/ μl)	x × 0,2 μl	x × 20 μl	0,1 pmol/μl
IC RNA (1 fg/ μl)	1 μl	100 μl	50 ag/ μl
Templátová RNA	5 μl	100 × 5 μl	
Celkem	10 μl	1000 μl	

x = počet dalších reverzních primerů v multiplexní reakci

Po provedení denaturačního kroku se směsí templátové RNA a prvního RT mixu se ke vzorku přidá 10 μl druhého RT mixu, který je nutné připravit předem těsně před použitím na daný počet vzorků.

5.6.2 Druhý RT mix

Jednotlivé složky je doporučeno přidávat podle uvedeného pořadí:

Složka	1 reakce	Výsledná koncentrace
RNase-free voda	5 μl	
Primescript reaction buffer	4 μl	1X
PrimeScript enzyme (200 U/μl)	0,5 μl	5 U/μl
RNase Inhibitor (40 U/μl)	0,5 μl	1 U/μl
Celkem	10 μl	

5.7 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 MOLiga i příslušné množství vody, ligačního pufru. Před použitím se tyto dvě směsi smíchají dohromady a k výslednému roztoku se přidá pouze dané množství ligázy a templátové DNA, respektive cDNA. 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 HAV_M1 a HAV_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
Hifi <i>Taq</i> DNA Ligase	0,5 µl	50 µl	
Templátová DNA/cDNA	2,5 µl	100 × 2,5 µl	
Celkem	25 µl	2500 µl	

x_1 = počet dalších MOLigo sond v multiplexní reakci

5.8 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	

5.9 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.

5.10 Roztoky pro hybridizaci

Roztoky, které jsou součástí kuličkového mixu (odstavec 5.11) 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

5.11 Příprava kuličkového mixu

Kuličkový mix se připravuje čerstvý pro konkrétní počet vzorků 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	

5.12 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

5.13 Analyzační pufr

Roztok se připravuje za použití ultračisté vody. Výsledný roztok analyzačního pufru je třeba přefiltrovat 0,22 µm filtrem a rozaliquotovat 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

5.14 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).

5.15 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.

5.16 Roztoky pro údržbu přístroje MAGPIX

Údržbové rutiny přístroje i samotná analýza vyžadují doplnění dH₂O, 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 5 μ l prvního premixu pro RT a přidá se 5 μ l templátové RNA. Po provedení denaturace se ke vzorku přidá 10 μ l druhého premixu pro RT. Po RT je 2,5 μ l templátové DNA, respektive cDNA, přeneseno do 22,5 μ l ligačního premixu. Po ligaci se 6 μ l produktu přenesou k 18 μ l PCR premixu. Dále je 10 μ l výsledného MOL-PCR produktu přidáno k 5 μ l kuličkového mixu pro hybridizaci a před samotnou analýzou je celý objem reakce navýšen 45 μ l analyzačního pufru na výsledných 60 μ l.

6.4 Slepý pokus

6.4.1 Negativní kontrola

Jako negativní kontrola (no template control, NTC) je do RT přidána PCR Ultra H₂O (Top-Bio, Česká republika) v ekvivalentním množství k templátové RNA, tedy 5 μ l. Negativní kontrola musí být použita v každém experimentu.

6.4.2 Pozitivní kontrola

Jako pozitivní kontrola slouží IC. RNA i MOLiga pro IC se přidávají do každého vzorku 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 (dH₂O). 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 Protokol reverzní transkripce

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

1 cyklus	Denaturace	95 °C (3 min)
		65 °C (5 min)
	Chlazení	led (5 min)

1 cyklus	Reverzní transkripce	42 °C (60 min)
		70 °C (15 min)
	Hold ^a	10 °C

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

6.7.2 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

6.7.3 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

6.7.4 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

6.7.5 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 HAV
Pozitivní (+)	Negativní (-)	Vzorek je pozitivní na přítomnost HAV ^a
Negativní (-)	Pozitivní (+)	Vzorek je negativní na přítomnost HAV
Negativní (-)	Negativní (-)	Vzorek je inhibován ^b

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

^aVzorek je pozitivní na přítomnost detekovaného cíle, nicméně je negativní v případě interní kontroly. V tomto případě neproběhla reakce ideálním způsobem. 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.

^bVzorek 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 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).

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 NK s ohledem na empiricky stanovenou citlivost multiplexní MOL-PCR reakce 1 – 0,1 ng templátové NK pro daný cíl (Stucki et al. 2012; Thierry et al. 2013).

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

Vzorek	Vzorek po izolaci a reverzní transkripci (cDNA)	Kvalitativní detekce HAV			
		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 specifita a citlivost, propracován systém kontrol a hodnocení. Funkčnost byla ověřena pro monoplexní i vysoce multiplexní účely. Předložený MOL-PCR systém s předcházejícím krokem RT umožňuje komplexní přístup k detekci HAV 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 původce virové hepatitidy typu A 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

Boxman ILA, Tilburg J, Loeke N, Vennema H, de Boer E, Koopmans M (2007) An efficient and rapid method for recovery of norovirus from food associated with outbreaks of gastroenteritis. *Journal of Food Protection* 70(2):504-508

Carter MJ (2005) Enterically infecting viruses: pathogenicity, transmission and significance for food and waterborne infection. *Journal of Applied Microbiology* 98(6):1354-1380 doi:10.1111/j.1365-2672.2005.02635.x

Fiore AE, Wasley A, Bell BP (2006) Prevention of hepatitis A through active or passive immunization: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep* 55(Rr-7):1-23

Koopmans M, Duizer E (2004) Foodborne viruses: an emerging problem. *International Journal of Food Microbiology* 90(1):23-41 doi:10.1016/s0168-1605(03)00169-7

Lee KB, Lee H, Ha S-D, Cheon D-S, Choi C (2012) Comparative Analysis of Viral Concentration Methods for Detecting the HAV Genome Using Real-Time RT-PCR Amplification. *Food and Environmental Virology* 4(2):68-72 doi:10.1007/s12560-012-9077-x

Lin KY, Chen GJ, Lee YL, Huang YC, Cheng A, Sun HY, Chang SY, Liu CE, Hung CC (2017) Hepatitis A virus infection and hepatitis A vaccination in human immunodeficiency virus-positive patients: A review. *World J Gastroenterol* 23(20):3589-3606 doi:10.3748/wjg.v23.i20.3589

Mikel P, Vasickova P, Tesarik R, Malenovska H, Kulich P, Vesely T, Kralik P (2016) Preparation of MS2 Phage-Like Particles and Their Use As Potential Process Control Viruses for Detection and Quantification of Enteric RNA Viruses in Different Matrices. *Frontiers in Microbiology* 7 doi:10.3389/fmicb.2016.01911

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

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

Wu S, Nakamoto S, Kanda T, Jiang X, Nakamura M, Miyamura T, Shirasawa H, Sugiura N, Takahashi-Nakaguchi A, Gono T, Yokosuka O (2014) Ultra-deep sequencing analysis of the hepatitis A virus 5'-untranslated region among cases of the same outbreak from a single source. Int J Med Sci 11(1):60-4 doi:10.7150/ijms.7728

VÚVeL 

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

Tel.: +420 5 3333 1111; www.vri.cz; e-mail: vri@vri.cz