



CERTIFIKOVANÁ METODIKA

Kvalitativní detekce Afrického moru prasat pomocí metody MOL-PCR

**Mgr. Magdaléna Krásna
Mgr. Petr Králík, Ph.D.**

120
2019

UPLATNĚNÁ CERTIFIKOVANÁ METODIKA

č. 120/2019

Kvalitativní detekce Afrického moru prasat pomocí metody MOL-PCR

Autoři

Mgr. Magdaléna Krásna, 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 a projektu MŠMT LD15056. Zveřejňování této metodiky či jejích částí podléhá omezením vyplývajících z požadavků MV a MO ČR.

ISBN 978-80-88233-69-5

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

Africký mor prasat (AMP) patří mezi významné virové onemocnění domácích i divokých prasat (*Sus scrofa domestica*, *Sus scrofa*). Původcem onemocnění je dvouvláknový DNA virus řazený do rodiny *Asfarviridae* (Dixon et al., 2003), který je její jediným členem. Virus je přenosný na obratlovce, ale není přenosný na člověka. Přenos onemocnění je možný přímou cestou - kontaktem zdravých zvířat s nakaženými. AMP je virus schopný perzistovat i po smrti nakaženého zvířete v jeho krvi a tkáních. Tímto se otevírá možnost přenosu viru prostřednictvím krmných směsí obsahujících podíl tepelně neupraveného vepřového masa (Wilkinson 1989). Přenos je také možný sylvatickou (lesní) cestou - prostřednictvím klíšťat z rodu *Ornithodors* (Guinat et al., 2016).

AMP způsobuje vysoké procento úmrtnosti u nakažených zvířat. Na onemocnění doposud neexistuje účinná léčba ani očkování. O to větší je socio-ekonomický dopad nákazy na chov prasat (Tulman E.R., et al., 2001; EFSA).

Doposud bylo identifikováno 24 genotypů, které je možné nalézt v subsaharské Africe, avšak jenom genotyp I a II najdeme i na ostatních kontinentech (Lubisi et al., 2005). Genotyp I se dostal na Pyrenejský poloostrov v roce 1957 a 1960, později byl detekován i v jiných částech Evropy, v Karibiku, v Brazílii, přičemž je stále přítomný na Sardinii. V roce 2007 se genotyp II dostal z východní Afriky na Kavkaz a šíří se velmi rychle do ostatních zemí (Rusko, Ukrajina, Bělorusko, Litva, Polsko, Estonsko, Lotyšsko, Maďarsko).

Prvním cílem, na který byly navrženy specifické modulární detekční sondy v metodě Mol-PCR byla oblast genu p72. Při návrhu diagnostických metod založených na molekulární biologii se využívá právě vysoká konzervovanost oblasti tohoto genu (Yu et al. 1996). Diagnostika je založena na konvenční PCR a real-time PCR (Aguero M. et al., 2003; King D.P. et al., 2003; Zsak L. et al., 2005), obě metodiky jsou doporučeny v rámci Světové organizace pro zdraví zvířat. PCR test je schopen identifikovat AMP izoláty z 22 genotypů – na základě porovnání sekvencí kódujících p72.

Druhým cílem, na který je zaměřena diagnostika MOL-PCR je Centrální variabilní region, CVR, oblast genu B602L je hypervariabilní genetický marker, který je důležitý při identifikaci

resp. porovnání vícero genotypů – detekuje konkrétní rozdíl mezi genotypy, které mají identické oblasti p72 a p54 (Bastos et al., 2003).

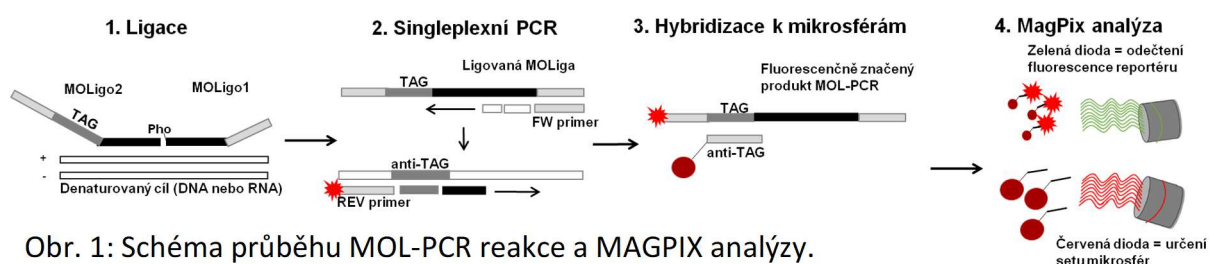
I) CÍL METODIKY

Předkládaná metodika nabízí rychlý a standardizovaný postup detekce přítomnosti viru Afrického moru prasat, respektive jeho nukleové kyseliny (DNA), ve vzorku. Tato metodika může být součástí 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 krve zvířat, z prostředí, z vody nebo ze surovin a masných výrobků určených pro lidskou spotřebu nebo pro krmné směsi zvířat. Metodika je využitelná jako vhodný komplexní nástroj pro skrínigové testy na široké spektrum patogenů.

II) VLASTNÍ POPIS METODIKY

1 Popis MOL-PCR systému

Průkaz přítomnosti AMP je založen na detekci specifické sekvence vyskytující se v genomu tohoto druhu. 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 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.



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 č.1 – VP72

Gen p72 kóduje hlavní strukturální protein AMP, který je důležitou součástí při formování virového kapsidu. Oblast tohoto genu je vysoce konzervovaná a je ji možné najít ve všech 24 genotypech. C koncová oblast p72 se používá na rozlišení genotypů.

Sekvence MOLig:

Tučně = sekvence pro vazbu univerzálních PCR primerů; podtrženě = sekvence specifická pro AMP; malá písmena = TAG sekvence MTAG-A064 umožňující specifickou vazbu k mikrosférám; PHO = fosfátová skupina.

p72_01_M1: 5' - PHO -

TTAAAAACATTTCCGTAACTGCTTCTCACTTCTTACTACCGCG – 3' (43)

p72_01_M2: 5'-

ACTCGTAGGGAATAAACCGTatgatgtgtttgattgaattgaaCGTATCCGATCACATTACCTATTA – 3' (68)

1.2 Cíl č. 2 – B602L (CVR)

B602L (Centrální variabilní region, CVR) je hypervariabilní genetický marker, který se ukázal jako klíčový při identifikaci konkrétních genotypů (Bastos et al., 2003).

Sekvence MOLig:

Tučně = sekvence pro vazbu univerzálních PCR primerů; podtrženě = sekvence specifická pro AMP; malá písmena = TAG sekvence MTAG-A067 umožňující specifickou vazbu k mikrosférám; PHO = fosfátová skupina.

pCVR_04_M1: 5'- PHO –

ATGTGTGCAGATACCAATGTAGATTCTCACTTCTTACTACCGCG - 3' (45)

pCVR_04_M2: 5'

ACTCGTAGGGAATAAACCGttttgtgtgtattgtaattgagatTGTAGACACCTGTGCAAGC – 3'
(63)

1.3 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 $-20^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$ ve 2 ml zkumavkách se šroubovacím víčkem do vypotřebování.

Sekvence MOLig:

Tučně = sekvence pro vazbu univerzálních PCR primerů; podtrženě = sekvence specifická pro AMP; 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.

1.4 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 AMP na základě cílových genů (zastupujících vysoko konzervovanou oblast p72 genu a hypervariabilní genetický marker (CVR) při komplexní analýze vzorků pocházejících z prostředí, trusu či potravin rostlinného původu prostřednictvím MOL-PCR.

3 Podstata zkoušky

Multiplexní oligonukleotidová ligační polymerázová řetězová reakce (MOL-PCR) s interní kontrolou (IC). Komplexní a simultánní detekce demonstrována v multiplexu čítajícím 2 virové systémy – Africký mor prasat, *Suid herpesvirus 1*. 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 μ l (s chybou do 5%)

s rozsahem nastavitelným od 0,5 – 10 μ l (s chybou do 5%)

- Špičky s filtrem k pipetám s příslušným rozsahem
- Sterilní mikrokumavky o objemu 0,2 ml x 96 se separátními víčky (Bioplastics, Nizozemsko)
- PCR deska s jamkami na objem 0,2 ml (Bioplastics, Nizozemsko)
- Chladnička (do 5 °C)
- Mrazicí box (-20 °C)
- Centrifuga MiniSpin
- Vortex V-1 Plus

5 Chemikálie a roztoky

5.1 Ligáza

Hifi *Taq* DNA Ligase a 10X Hifi *Taq* DNA Ligase Reaction Buffer (New England BioLabs, USA), katalogové číslo M0647 S. Ligázu s pufrem je nutné skladovat při teplotě -20 °C. Za normálních podmínek stabilní do data expirace.

5.2 Master Mix

2X 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 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/ μ l. Sondy i primery jsou evidovány a uloženy v mrazničce při teplotě cca -20°C \pm 4°C. Při přípravě ligačního premixu se používá pracovní roztok o koncentraci MOLig 1 pmol/ μ l, 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°C ± 4°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 p72_01_M1 a p72_01_M2 pro cíl (1 pmol/μl každá) | 2 × 0,125 μl | 2 × 12,5 μl | 5 nM každá |
| MOLigo sondy CVR_04_M1 a CVR_04_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 × 0,125 μl | x ₁ × 12,5 μl | 5 nM každá |
| IC plazmid 10 ⁴ /μl | 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 | |

x₁ = 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°C ± 4°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 rozalíknotovat 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. xPONENT 4.2.® SOFTWARE sám naznačí, kdy je třeba provést kalibraci a verifikaci přístroje; kalibrace 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 dH₂O, 70% isopropanolu a 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 přeneso 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 Příprava měřícího přístroje před zkouškou

Po spuštění přístroje je třeba vždy provést několik úkonů. 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 ^a | 10 °C |

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

6.7.2 PCR protokol

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

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

^a uchování do dalšího zpracování

6.7.3 Hybridizační protokol

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

| | | |
|----------|-------------------|----------------|
| 1 cyklus | Úvodní denaturace | 96 °C (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 softwaru 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 č. 1 | Cíl č. 2 | IC | Celkový výsledek |
|---------------|---------------|---------------|--|
| Pozitivní (+) | Pozitivní (+) | Pozitivní (+) | Vzorek je pozitivní na AMP a obsahuje oblasti p72 a CVR |
| Pozitivní (+) | Negativní (-) | Pozitivní (+) | Vzorek je pozitivní na AMP, ale neobsahuje oblast CVR |
| Negativní (-) | Pozitivní (+) | Pozitivní (+) | Vzorek je pozitivní na AMP, ale neobsahuje oblast p72 |
| Negativní (-) | Pozitivní (+) | Negativní (-) | Vzorek je pozitivní na AMP a obsahuje CVR* |
| Pozitivní (+) | Pozitivní (+) | Negativní (-) | Vzorek je pozitivní na AMP a obsahuje oblasti p72 a CVR* |
| Negativní (-) | Negativní (-) | Pozitivní (+) | Vzorek je negativní na AMP |
| Negativní (-) | Negativní (-) | Negativní (-) | Vzorek je inhibován** |

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

*Vzorek je pozitivní na přítomnost detekovaného cíle. V případě interní amplifikační kontroly je vzorek negativní. Znamená to, že reakce neproběhla 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.

** Když je vzorek negativní v případě interní kontroly, reakce neproběhla 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 2 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 popsaného v této certifikované metodice. Hodnota S (stopové množství) představuje koncentraci cílové DNA na hranici limitu detekce.

| Vzorek | Vzorek po izolaci DNA | Kvalitativní detekce AMP oblast p72 | | | |
|--------|-----------------------|-------------------------------------|-----------------|-------------|-----------------|
| | | VÚVeL | VVetÚ Hlučín | VFU Brno | CBO Těchonín |
| Z | Neředěný | + | + | + | + |
| 5X | 5X ředěný | + | + | + | + |

| | | | | | |
|------------|--|---|---|---|---|
| 10X | 10X ředěný | + | + | + | + |
| 10X | 10X ředěný | + | + | + | + |
| S | 40X 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.

| Vzorek | Vzorek po izolaci DNA | Kvalitativní detekce AMP oblast CVR | | | |
|------------|--|-------------------------------------|--------------|----------|-----------------|
| | | VÚVeL | VVeTÚ Hlučín | VFU Brno | CBO Těchonín |
| Z | Neředěný | + | + | + | + |
| 5X | 5X ředěný | + | + | + | + |
| 10X | 10X ředěný | + | + | - | + |
| 10X | 10X ředěný | + | + | - | + |
| S | 40 X ředěný | + | + | - | + |
| 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 AMP a je použitelný pro široké využití ve veterinární oblasti.

IV) POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY

Metodika je určena k rychlému skríninku a monitoringu výskytu afrického moru prasat v různých typech vzorků (klinických vzorcích, masních výrobcích, vzorcích tkáně, prostředí). Uživatel využije výsledků metodiky k posouzení nutnosti zavedení preventivních a kontrolních opatření laboratoře zabývající se diagnostikou onemocnění zvířat, případně lidí, případně další laboratoře zabývající se vyšetřováním surovin a potravin živočišného původu.

V) SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Aguero M., Fernandez J., Romero L., Sanchez Mascaraque C., Arias M. and Sanchez Vizcaino J.M. 2003. Highly Sensitive PCR Assay for Routine Diagnosis of African Swine Fever Virus in Clinical Samples. *Journal of Clinical Microbiology*. 41: 4431-4434, DOI: 10.1128/JCM.41.9.4431-4434.2003

Bastos, A.D.S., Penrith, M.L., Crucière, C., Edrich, J.L., Hutchings, G., Roger, F., Couacy Hymann, E., Thomson, G.R., 2003. Genotyping field strains of African swine fever virus by partial p72 gene characterisation. *Arch. Virol.* <https://doi.org/10.1007/s00705-002-0946-8>

Dixon, L.K., Escribano, K.J.M., Martins, C., Rock, D.L., Salas M.L., Wilkinson P.J. 2005. Asfarviridae. In: Fauquet, C.M., M.A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger, and L.A. Ball (eds), *Virus Taxonomz. VIII. Report of the ICTV*, pp. 135-143. Elsevier, Academic Press London.

Guinat, C., Gogin, A., Blome, S., Keil, G., Pollin, R., Pfeiffer, D.U., Dixon, L., 2016. Transmission routes of African swine fever virus to domestic pigs: Current knowledge and future research directions. *Veterinary Records*. 178, 262–267.

<https://doi.org/10.1136/vr.103593>

King D.P., Reid S.M., Hutchings G.H., Grierson S.S., Wilkinson P.J., Dixon L.K., Bastos A.D.S., Drew T.W. 2003. Development of a TaqMan[®]PCR assay with internal amplification control for the detection of African swine fever virus. *Journal of Virological methods*. 107: 53-61. DOI:[10.1016/s0166-0934\(02\)00189-1](https://doi.org/10.1016/s0166-0934(02)00189-1)

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](https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01911).

Reslová, N., Huvarová, V., Hrdý, J., Kašný, M., Králík, P. 2019. A novel perspective on MOL-PCR optimization and MAGPIX analysis of in-house multiplex foodborne pathogens detection assay. *Scientific Reports*.

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, doi:[10.1371/journal.pone.0041253](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041253).

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](https://doi.org/10.1016/j.mimet.2013.10.004).

Tulman, E.R. and Rock, D.L., 2001. Novel virulence and host range genes of African swine fever virus. *Current Opinion in Microbiology*. 4: 456–461. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(00\)00235-6](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(00)00235-6)

Yu M., Morrisy C.J. and Westbury H.A. 1996. Strong sequence conservation of African swine fever virus p72 protein provides the molecular basis for its antigenic stability. *Archives of Virology*.9: 1795-802. DOI:[10.1007/bf01718302](https://doi.org/10.1007/bf01718302)

Zsak L., Borca M.V., Risatti G.R., Zsak A., French R.A., Lu Z., Kutish G.F.,

J. G. Neilan J.G., Callahan J.D., Nelson W.M., and Rock D.L. 2005. Preclinical Diagnosis of African Swine Fever in Contact-Exposed Swine by a Real-Time PCR Assay. *Journal of Clinical Microbiology*. 43: 112-119. doi:10.1128/JCM.43.1.112-119.2005

Wilkinson P.J. 1984. The Persistence of African swine fever in Africa and the Mediterranean. *Preventive Veterinary Medicine*. 2: 71-82

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.

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