



CERTIFIKOVANÁ METODIKA

Kvalitativní detekce Suid herpesvirus 1 pomocí metody MOL-PCR

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

121
2019

UPLATNĚNÁ CERTIFIKOVANÁ METODIKA

č. 121/2019

Kvalitativní detekce *Suid herpesvirus 1* 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 978-80-88233-70-1

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

Aujezského choroba patří mezi onemocnění postihující domácí prasata (*Sus scrofa domestica*). Původcem nemoci je dvouvláknový DNA virus *Suid herpesvirus 1* (SuHV1), který je součástí rodiny *Herpesviridae*, podrodiny *Alphaherpesvirinae*, rodu *Varicelovirus* (Fauquet et al. 2005). Zároveň je jejím jediným sérotypem. K přenosu onemocnění dochází oronasální cestou. Přenos je možný také vzduchem, vodou nebo kontaminovanými předměty. Infikování jiných živočišných druhů (kromě člověka a primátů) probíhá po konzumaci masa z nakažených prasat.

U nakažených mladých prasat dochází k jejich úhynu nebo neurologickým poškozením. U dospělých jedinců SuHV1 způsobuje respirační problémy a v případě březích samic dochází k abortům. V případě infikování jiných živočišných druhů končí onemocnění smrtí. Prevencí vůči vzniku onemocnění je vakcinace prasat, která ovšem neposkytuje imunitu vůči divokému typu viru.

Jedním z cílů, na který byly navrženy specifické modulární detekční sondy v metodě Mol-PCR byl gen kódující glykoprotein B (gB), který patří mezi nejvíc konzervované geny (Pereira L. 1994). Jeho přítomnost je esenciální jak pro fúzi mezi virionovým obalem a buněčnou cytoplazmatickou membránou, tak pro přímé šíření viru z buňky do buňky (Spear P. 1993)

Druhý gen, na který je zaměřena diagnostika MOL-PCR je glykoprotein E (gE), který patří mezi 6 strukturálních proteinů, které jsou součástí virového obalu SuHV1 (Mettenleiter 1999). Ukázalo se, že gE není pro virovou replikaci esenciální, a proto není součástí rekombinantní vakcíny. Výhodou je, že se proto může používat pro účely diagnostiky SuHV1 (van Oirschot et al. 1990; Ao et al. 2003). Glykoprotein E zodpovídá za virulenci, sehrává úlohu v postupování viru do centrální nervové soustavy (Mettenleiter 1999; Fuchs et al. 1990) a odchod viru z infikovaných buněk (Fuchs et al. 1990).

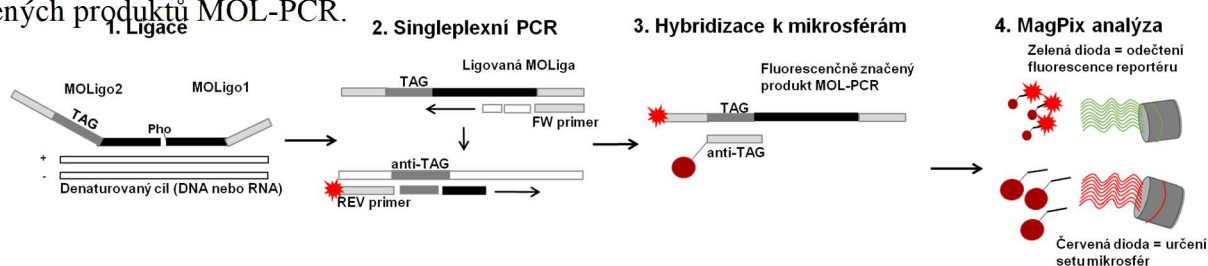
I) CÍL METODIKY

Předkládaná metodika nabízí rychlý a standardizovaný postup detekce přítomnosti viru *Suid herpesviridae 1*, respektive jeho nukleové kyseliny (DNA) ve vzorku. Tato metodika může být součástí komplexní multiplexní detekce patogenů, která umožňuje detekovat v jedné reakci až několik desítek různých patogenů, přičemž jako templátová DNA může být použita izolovaná DNA různého původu, např. z tkání a krve zvířat, z prostředí, vody nebo 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 SuHV1 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.



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 č. 1 - gB

Glykoprotein B (gB), který patří mezi nejvíc konzervované geny (Pereira L. 1994). Jeho přítomnost je esenciální pro fúzi mezi virionovým obalem a buněčnou cytoplazmatickou membránou. Také zabezpečuje přímé šíření viru z buňky do buňky (Spear P. 1993)

Sekvence MOLig:

Tučně = sekvence pro vazbu univerzálních PCR primerů; podtrženě = sekvence specifická pro SuHV1; malá písmena = TAG sekvence MTAG-A053 umožňující specifickou vazbu k mikrosférám; PHO = fosfátová skupina.

SUHV1_gB_01_M1: 5'-PHO-

CCACATCTACTACAAGAACGTCATCGTTCTCACTTCTTACTACCGCG
– 3' (47)

SUHV1_gB_02_M2: 5'-

ACTCGTAGGGAATAAACCGTgtttgtgtttgtataagttgtaaCCCCGCACAAGTTCAAGGC – 3' (63)

1.2 Cíl č. 2 – gE

Druhý gen, na který je zaměřená diagnostika MOL-PCR je glykoprotein E se podílí na virovém pučení (Fuchs et al. 1990) a také při rozšiřování viru do nervové soustavy (Mettenleiter 1999; Fuchs et al. 1990). Nehraje roli ve virové replikaci a není součástí existujících vakcín, proto je vhodným cílem diagnostických metod.

Sekvence MOLig:

Tučně = sekvence pro vazbu univerzálních PCR primerů; podtrženě = sekvence specifická pro SuHV1; malá písmena = TAG sekvence MTAG-A068 umožňující specifickou vazbu k mikrosférám; PHO = fosfátová skupina.

SUHV1_gE_01_M1: 5'-PHO-

CCCRGGRACACGTTTCGACCTCTCACTTCTTACTACCGCG -3' (39)

SUHV1_gE_02_M2: 5'-

ACTCGTAGGGAATAAACCGTtatttgataagagaatgaagaagtTTCCACGCGCTCGGCTTCC
- 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 tasvánského (*Thylacinus cynocephalus*, Acc. No. FJ515781.1) a ptáka moa (*Dinornis struthoides*, Acc. No. AY326187.1). Tato kontrolní syntetická sekvence o délce 150 bp byla převzata z Mikel et al. (2016), syntetizována *de novo* a klonována do plazmidu. Takto připravený konstrukt je zcela arteficiální a podobná sekvence se nevyskytuje v žádném známém živočišném, rostlinném, či bakteriálním druhu. IC je tedy možné použít pro jakýkoliv templát či matrici. IC je skladována při teplotě $-20^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$ ve 2 ml zkumavkách se šroubovacím víčkem do vypotřebování.

Sekvence MOLig:

Tučně = sekvence pro vazbu univerzálních PCR primerů; podtrženě = 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'-

ACTCGTAGGGAATAAACCGTtattgtgaaagaagagaagaattTATACACACGCAATCACCA
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 amplikonu odpovídá délce jednotlivých produktů ligace (~ 110 bp).

2 Předmět a působnost

Tato metodika slouží ke kvalitativní detekci SuHV1 na základě cílových genů (zastupujících konzervovaný gen gB a gen gE využívaný při diagnostice) 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 μ l (s chybou do 5%)

s rozsahem nastavitelným od 20 – 200 μ l (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 mikrozkuhavky o objemu 0,2 ml x 96 se separátními víčky (Bioplastics, Nizozemsko)
- PCR deska s jamkami na objem 0,2 ml (Bioplastics, Nizozemsko)
- Chladnička (do 5 °C)
- Mrazicí box (-20 °C)
- Centrifuga MiniSpin
- Vortex V-1 Plus

5 Chemikálie a roztoky

5.1 Ligáza

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

5.2 Master Mix

2X EliZymeTM HS Robust MIX (Elisabeth Pharmacon, Česká republika), katalogové číslo EZ6060. Master Mix je doporučeno skladovat při teplotě -20 °C a neměl by být dlouhodobě vystavován světlu. V případě skladování Master Mixu při teplotě 4 °C je stabilita deklarována po dobu jednoho měsíce. Za normálních podmínek je Master Mix stabilní do data expirace.

5.3 Voda pro MOL-PCR

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

5.4 Ředění MOLig a PCR primerů

Specifická MOLiga a univerzální PCR primery se dodávají v lyofilizovaném stavu od firmy Generi-Biotech (Česká republika). Podle návodu uvedeného výrobcem jsou na pracovišti rozpuštěny v PCR vodě tak, aby výsledná zásobní koncentrace byla 100 pmol/ 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/μl, jak je uvedeno v odstavci 5.5. Při přípravě PCR premixu se používá pracovní roztok o koncentraci univerzálních primerů 10 pmol/μl, jak je uvedeno v odstavci 5.6.

5.5 Příprava ligačního premixu

Pro reprodukovatelnou kvantitativní detekci pomocí MOL-PCR je doporučeno připravit si alikvoty premixů pro 100 reakcí skládající se ze všech komponent kromě ligázy a templátové DNA. Premixy se skladují při cca -20°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 gE_01_M1 a gE_01_M2 pro cíl (1 pmol/μl každá)	2 × 0,125 μl	2 × 12,5 μl	5 nM každá
MOLigo sondy gB_01_M1 a gB_01_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 /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	

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°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 rozalikovat 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 rozalíkovat 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 do kolonek v přístroji. Roztoky se připravují za použití ultračisté vody. Výsledné roztoky se skladují při pokojové teplotě a užívají se až do úplné spotřeby.

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

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 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 SuHV1 a obsahuje oblasti gB a gE
Pozitivní (+)	Negativní (-)	Pozitivní (+)	Vzorek je pozitivní na SuHV1, ale neobsahuje oblast gE
Negativní (-)	Pozitivní (+)	Pozitivní (+)	Vzorek je pozitivní na SuHV1, ale neobsahuje oblast gB
Negativní (-)	Pozitivní (+)	Negativní (-)	Vzorek je pozitivní na SuHV1*
Pozitivní (+)	Pozitivní (+)	Negativní (-)	Vzorek je pozitivní na SuHV1, ale obsahuje oblasti gB a gE*
Negativní (-)	Negativní (-)	Pozitivní (+)	Vzorek je negativní na SuHV1 a neobsahuje oblasti gB a gE
Negativní (-)	Negativní (-)	Negativní (-)	Vzorek je negativní na SuHV1**

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 systémy.

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 SuHV1 oblast gB			
		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 SuHV1 oblast gE			
		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	+	+	+	+
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 specifická 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 SuHV1 a je použitelný pro široké využití ve veterinární oblasti.

IV) POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY

Metodika je určena k rychlému skríninku a monitoringu výskytu Aujeszského choroby v různých typech vzorků (klinických vzorcích, masných 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

Ao JQ, Wang JW, Chen XH, Wang XZ, Long QX. 2003. Expression of pseudorabies virus gE epitopes in *Pichia pastoris* and its utilization in an indirect PRV gE-ELISA. *Journal of Virology Methods*; 114:145–150. DOI: 10.1016/j.viromet.2003.09.012

Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J., Desselberger U. and Ball L.A. 2005. Eds., *Virus Taxonomy: VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, Elsevier/Academic Press, San Diego, Calif, USA, 2005.

Fuchs W, Rziha HJ, Lukacs N, Braunschweiger I, Visser N, Lutticken D, Schreurs CS, Thiel HJ, Mettenleiter TC. 1990. Pseudorabies virus glycoprotein gI: in vitro and in vivo analysis of immunorelevant epitopes. *Journal General Virology*; 71:1141–1151. DOI: 10.1099/0022-1317-71-5-1141

Mettenleiter TC. 1999. Aujeszky's disease (pseudorabies) virus: the virus and molecular pathogenesis - state of the art. *Veterinary Research* 2000; 31:99–115. DOI: 10.1051/vetres:2000110

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.

Pereira L. 1994. Function of glycoprotein B homologues of the family herpesviridae. *Infectious Agents and Disease*. 3:9–28.

Spear P. 1993 Entry of alphaherpesviruses into cells. *Seminars in Virology*. 4:167–180. <https://doi.org/10.1006/smvy.1993.1012>

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*.

Spear P. 1993 Entry of alphaherpesviruses into cells. *Seminars in Virology*. 4:167–180. <https://doi.org/10.1006/smvy.1993.1012>

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.

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.

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)

van Oirschot JT, Gielkens AL, Moormann RJ, Berns AJ. 1990. Marker vaccines, virus protein-specific antibody assays and the control of Aujeszky's disease. *Veterinary Microbiology*; 23:85–101. DOI: 10.1016/0378-1135(90)90139-m

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