VÚVeL
VÝZKUMNÝ ÚSTAV
VETERINÁRNÍHO
LÉKAŘSTVÍ, v.v.i.

CERTIFIKOVANÁ METODIKA

Kvalitativní detekce enterohemoragické *Escherichia coli* (EHEC) pomocí metody MOL-PCR

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

97
2018

UPLATNĚNÁ CERTIFIKOVANÁ METODIKA

č. 97/ 2018

Kvalitativní detekce enterohemoragické *Escherichia coli* (EHEC) pomocí metody MOL-PCR

Autoři

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

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

Osvědčení o uplatnění certifikované metodiky: Příloha č. 10 k čj. MO 332470/2018-684808
Vydalo: Agentura vojenského zdravotnictví AČR VÚ 6848, 500 02 Hradec Králové, 2018

ISBN 978-80-88233-39-8

Oponenti certifikované metodiky:

Mgr. Martina Grochová

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

Prof. RNDr. Aleš Knoll, Ph.D.

Mendelova univerzita v Brně

PŘEDMLUVA

Escherichia coli (*EC*) je gramnegativní, fakultativně anaerobní tyčinkovitá bakterie, vyskytující se u většiny teplokrevných živočichů jako součást běžné mikroflóry tlustého střeva (Bielaszewska et al., 2005). Většina kmenů *EC* je nepatogenní, ovšem některé sérotypy vykazují vysokou patogenitu (Durso et al., 2005) a působí extraintestinální a enteropatogenní infekce.

Lidské infekce spojené s kmeny *EC* sérotyp O26: H11 a O26: H- nebo H-nonmotilní (NM) jsou spojovány s průjmem, hemoragickou kolitidou a hemolytickým uremickým syndromem (HUS). V závislosti na faktorech virulence je *EC* O26 klasifikována jako enterohemoragická (EHEC) nebo enteropatogenní (EPEC). Kmeny EHEC O26 se objevují jako nejčastější non-O157 sérotypy, které způsobují HUS a průjmy u evropské populace a jsou spojovány s lidskými nemocemi po celém světě (Bielaszewska et al., 2005).

Rezervoárem kmenů non-O157 je zejména hovězí dobytek a člověk se může nakazit po požití kontaminovaných potravin, jako jsou masné a mléčné výrobky bez tepelného zpracování, ale také zelenina a ovoce. Mohou se však přenášet i kontaktem s infikovanými osobami a zvířaty nebo fekálně kontaminovanou vodou. Onemocnění EHEC nejsou povinně hlášena a jejich diagnostika je nedostatečná, což je důvod, proč je frekvence jejich záchytu v České republice řádově pouze desítky případů za rok (Marejková et al., 2009). Ve všech sousedních zemích, kde se diagnostika EHEC provádí rutinně u všech pacientů s průjmem nebo pacientů s krvavým průjmem a HUS, je frekvence záchytu těchto kmenů daleko vyšší.

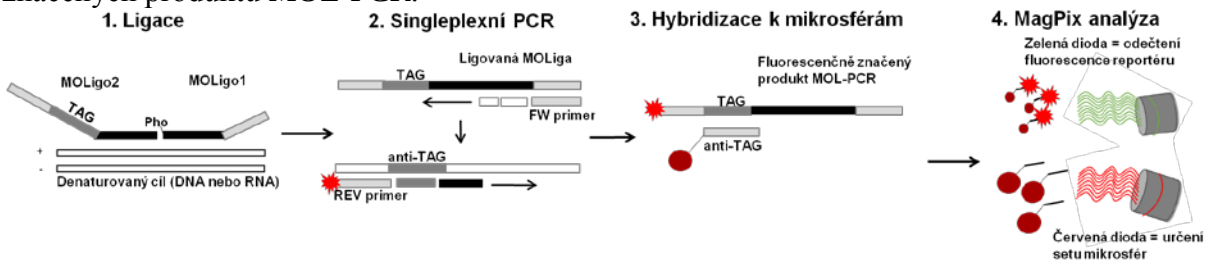
I) CÍL METODIKY

Předkládaná metodika nabízí rychlý a standardizovaný postup detekce přítomnosti enterohemoragické bakterie *Escherichia coli* O26, respektive její nukleové kyseliny (DNA), ve vzorku. Tato metodika může být součástí komplexní multiplexní detekce patogenů, která umožňuje detekovat v jedné reakci až několik desítek různých patogenů, přičemž jako templátová DNA může být použita izolovaná DNA různého původu, např. z tkání a trusu zvířat, z prostředí, vody nebo surovin a potravin živočišného i rostlinného původu určených pro lidskou spotřebu. Metodika je využitelná jako vhodný komplexní nástroj pro skríninkové testy na široké spektrum patogenů.

II) VLASTNÍ POPIS METODIKY

1 Popis MOL-PCR systému

Průkaz přítomnosti *EC* 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 – gen *wzy*

Pro detekci *EC* sérotyp O26 byl jako detekovaný cíl zvolen chromozomální gen *wzy* kódující O-antigen polymerázu (DebRoy et al., 2004). O-antigen je součástí lipopolysacharidu přítomného ve vnější membráně gramnegativních bakterií a sestává z mnoha opakování oligosacharidové jednotky (jednotky O). Je zodpovědný za antigenní variabilitu na povrchu buněk, podle které byly rozlišeny různé sérotypy O. MOLigo sondy pro detekci genu *wzy* byly testovány na ověřeném kmenu ze sbírky zoopatogenních mikroorganismů Výzkumného ústavu veterinárního lékařství v Brně: *Escherichia coli* CAPM 5358 (sérotyp O26).

Sekvence MOLig:

Tučně = sekvence pro vazbu univerzálních PCR primerů; podtrženě = sekvence specifická pro *EC;* malá písmena = TAG sekvence MTAG-A028 umožňující specifickou vazbu k mikrosférám; PHO = fosfátová skupina.

EC26_M1: 5´- PHO-CGTATTTTCACCACTACTTTT**TCTCACTTCTTACTACCGCG** - 3´ (41)

EC26_M2: 5´

- **ACTCGTAGGGAATAAACCGT**gatagatttagaatgaattaagtgTCTCGCTAATGTTATTTCT TTC - 3´ (66)

Těmito sondami je možné detekovat část genu *wzy*, který je součástí O-antigen genového klusteru *E. coli* O26, v rozsahu 6174 - 6216 bp (Acc. No. DQ196413.1), délka sekvence specifické pro *EC* = 43 bp. Celková délka produktu ligace detekčních sond = 107 bp.

1.2 Interní kontrola

Interní kontrola (IC) je přidávána do každé reakce. Slouží nejen k odhalení falešně negativních výsledků v důsledku inhibice MOL-PCR reakce, ale také jako pozitivní kontrola. IC byla navržena tak, aby pro všechny MOL-PCR systémy mohl být použit stejný pár IC MOlig

a stejná sada univerzálních PCR primerů; jedná se tedy o univerzální IC. Při přípravě IC byla použita nekompetitivní syntetická sekvence založená na DNA sekvencích dvou vyhynulých druhů; konkrétně se jedná o mitochondriální DNA vakovlka tasmánského (*Thylacinus cynocephalus,* Acc. No. FJ515781.1) a ptáka moa (*Dinornis struthoides,* Acc. No. AY326187.1). Tato kontrolní syntetická sekvence o délce 150 bp byla převzata z Mikel et al. (2016), syntetizována *de novo* a klonována do plazmidu. Takto připravený konstrukt je zcela arteficiální a podobná sekvence se nevyskytuje v žádném známém živočišném, rostlinném, či bakteriálním druhu. IC je tedy možné použít pro jakýkoliv templát či matrici. IC je skladována při teplotě -20°C ± 4°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- ATTAGCACAATGAATAATCATCG**TCTCACTTCTTACTACCGCG**- 3´ (43)

IC_2_M2 5´-
ACTCGTAGGGAATAAACCGTattgtgaaagaaagagaagaaattTATACACACGCAATCACCAC- 3´ (64)

Tyto sondy jsou komplementární k úseku kontrolní syntetické sekvence o délce 43 bp. Celková délka produktu ligace detekčních sond, a tím i amplikonu = 107 bp.

1.3 Sekvence univerzálních primerů:

Univerzální primery byly převzaty z publikace Thierry et al. (2013). Reverzní primer je značen fluoroforem BODIPY-TMRX, který v reakci slouží jako reportérová molekula značící výsledný produkt.

uni FW: 5´– CGCGGTAGTAAGAAGTGAGA – 3´ (20)
uni REV: 5´ – BODIPY-TMRX - ACTCGTAGGGAATAAACCGT – 3´ (20)

Tato sada univerzálních primerů amplifikuje všechny produkty ligace. Výsledná délka amplikonu odpovídá délce jednotlivých produktů ligace (~ 110 bp).

2 Předmět a působnost

Tato metodika slouží ke kvalitativní detekci *EC* na základě detekce vybraného genu při komplexní analýze vzorků pocházejících z trusu zvířat, prostředí a potravin pro lidskou spotřebu, prostřednictvím MOL-PCR.

3 Podstata zkoušky

Multiplexní oligonukleotidová ligační polymerázová řetězová reakce (MOL-PCR) s interní kontrolou (IC). Komplexní a simultánní detekce demonstrována v multiplexu čítajícím 5 bakteriálních a 5 parazitárních systémů - Salmonella enterica, Listeria monocytogenes, Yersinia enterocolitica, Escherichia coli (EHEC), Taenia saginata, Trichinella spiralis, Toxoplasma gondii a Giardia intestinalis. Kvalitativní detekce probíhá prostřednictvím odečtení fluorescenčního signálu vzorku oproti negativní kontrole.

4 Přístroje a pomůcky

- DNA Engine Dyad Peltier Thermal Cycler (Bio-Rad, USA)
- Bio-Plex MAGPIX Multiplex Reader (Bio-Rad, USA)
- Bio-Plex Manager™ MP software (Bio-Rad, USA)
- Bio-Plex Manager™ 6.1 software (Bio-Rad, USA)
- Ultrasonic Cleaning Bath (BioTech, Česká republika)
- Sada pipet:
  - s rozsahem nastavitelným od 1000 – 5000 µl (s chybou do 5%)
  - s rozsahem nastavitelným od 200 – 1000 µl (s chybou do 5%)
  - s rozsahem nastavitelným od 20 – 200 µl (s chybou do 5%)
  - s rozsahem nastavitelným od 5 – 50 µl (s chybou do 5%)
  - s rozsahem nastavitelným od 0,5 – 10 µl (s chybou do 5%)
- Špičky s filtrem k pipetám s příslušným rozsahem
- Sterilní mikrozkumavky 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 exspirace.

5.2 Master Mix

2X EliZyme^{TM} 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 exspirace.

5.3 Voda pro MOL-PCR

Pro ředění všech komponent MOL-PCR reakce se používá voda PCR H_2O (Top-Bio, Česká republika), katalogové číslo P242. Skladovat při pokojové teplotě.

5.4 Ředění MOLig a PCR primerů

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

5.5 Příprava ligačního premixu

Pro reprodukovatelnou kvantitativní detekci pomocí MOL-PCR je doporučeno připravit si alikvoty premixů pro 100 reakcí skládající se ze všech komponent kromě ligázy a templátové

DNA. Premixy se skladují při cca -20°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 *Taq* DNA Ligase Reaction Buffer	2,5 µl	250 µl	1X
MOLigo sondy EC26_M1 a EC26_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 *Taq* 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 EliZymeTM 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 10^6 mikrosfér/ml; Luminex Corp., USA), katalogové číslo MC100XX-01 (XX = 12-78, dle seznamu dostupných setů od firmy Luminex Corp.). Potažené mikrosféry v 1X TE pufru je nutno skladovat v chladničce při teplotě 4 °C a chránit před světlem. Za normálních podmínek jsou stabilní déle než 1 rok. Před každým použitím je nutno mikrosféry řádně vortexovat a sonifikovat asi 30 s.

5.8 Roztoky pro hybridizaci

Roztoky, které jsou součástí kuličkového mixu (odstavec 5.9) se připravují za použití ultračisté vody. Výsledné roztoky je třeba přefiltrovat 0,22 µm filtrem a rozalikvotovat do zkumavek o objemu 50 ml. Z důvodu předcházení kontaminací je pak vhodné používané roztoky měnit každé 3 měsíce.

Příprava hybridizačních roztoků a jejich skladování:

Složka	**Katalog. č.**	**Výsledná koncentrace**	**Množství/250 ml**	**pH**	**Skladování**
MES	Sigma-Aldrich M2933 (USA)	0,1 M	4,88 g	4,5	4 °C
NaCl	Carl-ROTH 3957 (Německo)	5 M	73,05 g		pokojová teplota
100X TE pufr	SERVA 39799.02 (Německo)	1X	2,5 ml	8,0	pokojová teplota

5.9 Příprava kuličkového mixu

Kuličkový mix se připravuje čerstvý pro konkrétní počet vzorků v reakci a ihned upotřebí k hybridizaci MOL-PCR produktů k povrchu magnetických mikrosfér; kuličkový mix se nepřipravuje a neuchovává ve formě premixu. Podle počtu MOLig v reakci (očekávaných cílů) se přidává příslušný počet specifických setů mikrosfér.

Jednotlivé složky je doporučeno přidávat podle uvedeného pořadí:

Složka	**1 reakce**	**100 reakcí (96 + 4 rezerva)**	**Výsledná koncentrace**
0,1 M MES	2,5 µl	250 µl	0,05 M
5 M NaCl	0,8 µl	80 µl	0,8 M
Směs potažených MagPlex® Microspheres	2 500 mikrosfér/set	250 000 mikrosfér/set	

1X TE pufr	doplnit objem	100 × doplnit objem	
celkem	5 µl	500 µl	

5.10 Příprava hybridizační reakce

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

Jednotlivé složky je doporučeno přidávat podle uvedeného pořadí:

Složka	**1 reakce**	**100 reakcí (96 + 4 rezerva)**
Kuličkový mix	5 µl	500 µl
MOL-PCR produkt	10 µl	100 × 10 µl
celkem	15 µl	1500 µl

5.11 Analyzační pufr

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

Složení a příprava analyzačního pufru:

Složka	**Katalog. č.**	**Výsledná koncentrace**	**Množství/250 ml**	**pH**
1 M Tris-Cl	Sigma T1503[a]	10 mM	2,5 ml	8,0
0,5 M EDTA	Amresco E522	0,1 mM	50 µl	
5 M NaCl	Carl ROTH 3957	90 mM	4,5 ml	
100% Tween 20	Alpha Diagnostic Intl Inc TW-100100	0,02 %	50 µl	
ultračistá H_2O	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 exspirace. Před každým použitím je nutno všechny složky kitů řádně vortexovat a sonifikovat asi 30 s. Bio-Plex Manager™ MP software sám naznačí, kdy je třeba

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

5.13 Drive fluid

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

5.14 Roztoky pro údržbu přístroje MAGPIX

Údržbové rutiny přístroje i samotná analýza vyžadují doplnění dH_2O, 70% isopropanolu, 0,1 N NaOH a 15% sava do kolonek v přístroji. Roztoky se připravují za použití ultračisté vody. Výsledné roztoky se skladují při pokojové teplotě a užívají se až do úplné spotřeby.

Složka	Katalog. č.	Výsledná koncentrace	Množství/250 ml	Skladování
100% isopropanol	PENTA 17510-20005 (Česká republika)	70%	180 ml	pokojová teplota
NaOH	PENTA 15760-31000 (Česká republika)	0,1 N	0,1 g	pokojová teplota
Savo Original	Unilever SAVO (Nizozemsko)	15%	37 ml	pokojová teplota

6 Postup zkoušky

6.1 Bezpečnostní opatření

Provedení metody nevyžaduje žádné zvláštní bezpečnostní opatření.

6.2 Okolní podmínky zkoušky

Provedení metody nevyžaduje kontrolu žádných limitních podmínek.

6.3 Množství vzorku

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

6.4 Slepý pokus

6.4.1 Negativní kontrola

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

6.4.2 Pozitivní kontrola

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

6.5 Replikáty

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

6.6 Kalibrace měřícího prostředku před zkouškou

Po spuštění přístroje je třeba vždy provést několik úkonů. Nejprve se sací jehla promyje a sonifikuje v destilované vodě (dH_2O). Zkontroluje se naplnění kontejnerů pro Drive fluid a odpad (waste container). V Bio-Plex Manager™ MP softwaru se postupně navolí údržbové rutiny: Calibration and Verification (dle potřeby), Verification a Prime. Po skončení analýz se před vypnutím přístroje vždy provádí rutina Shut Down.

6.7 Provedení zkoušky

6.7.1 Ligační protokol

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

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

[a] uchování do dalšího zpracování; nutno zpracovat během jednoho dne

6.7.2 PCR protokol

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

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

[a] uchování do dalšího zpracování

6.7.3 Hybridizační protokol

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

1 cyklus	Úvodní denaturace	94 °C (1 min)	
	Pomalé ochlazování	94 °C - > 25 °C	rychlost 0,1 °C/s
	Hold[a]	10 °C	

[a] uchování do dalšího zpracování; nutno zpracovat během jednoho dne

6.7.4 Analýza

Přístroj: Bio-Plex MAGPIX Multiplex Reader (Bio-Rad, California, USA). Analýza probíhá při pokojové teplotě a měření 96-ti jamkové desky trvá asi 45 minut. Naměřené hodnoty jsou zobrazeny v Bio-Plex Manager™ 6.1 softwaru (Bio-Rad, USA), odkud jsou hrubá data exportována do Excelu, kde jsou jednoduchým výpočtem vyhodnocena.

7 Výpočet a vyjádření výsledku

7.1 Hodnocení výstupu

Od naměřených hodnot mediánu intenzity fluorescence (MFI) se odečte hodnota blanku 30 MFI (empiricky stanovená hodnota). Jednotlivé MFI hodnoty vzorků se podělí MFI hodnotou negativní kontroly NTC. Je-li výsledný **poměr (P) vyšší než 3** a **hodnota MFI daného vzorku vyšší než 50**, vzorek je pozitivní.

$$P_{vzorku} = MFI_{vzorku} / MFI_{NTC}$$

7.1.1 Kvalitativní hodnocení

Kvalitativní hodnocení se provádí podle následující tabulky:

Cíl	IC	Celkový výsledek
Pozitivní (+)	Pozitivní (+)	Vzorek je pozitivní na *EC* O26 (EHEC)
Pozitivní (+)	Negativní (–)	Vzorek je pozitivní na *EC* O26 (EHEC)
Negativní (–)	Pozitivní (+)	Vzorek je negativní na *EC* O26 (EHEC)
Negativní (–)	Negativní (–)	Vzorek je inhibován

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

8 Validace

8.1 Specificita

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

Výsledky testování detekčního systému pro *EC* O26 na různých sbírkových kmenech:

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

8.2 Citlivost/limit detekce (LOD)

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

8.3 Optimalizace reakčních podmínek

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

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

8.4 Kruhový test

Vzorky pro kruhový test byly připraveny na VÚVeL v podobě koncentračního gradientu izolované DNA s ohledem na 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 *EC* O26 (EHEC)**			
		VÚVeL	**VVetÚ Hlučín**	**VFU Brno**	**ÚVN Praha**
Z	Neředěný	+	+	+	+
5X	5X ředěný	+	+	+	+
10X	10X ředěný	+	+	+	+

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

Výsledky kruhového testu potvrdily použitelnost metodiky v rutinní laboratorní praxi.

9 Operativní řízení jakosti

Je řešeno:

1) pomocí negativní kontroly

2) interní kontrolou (IC)

III) SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

Vzhledem k tomu, že nejsou k dispozici jednotné a srovnatelné metodické přístupy získávání dat o prevalenci enterohemoragické *EC* O26 a použití různých analytických metod neumožňuje získání srovnatelných údajů (Delannoy et al., 2013), je vypracování a využití další validované metody pro detekci tohoto patogenu účelné.

Představená metodika je oproti dříve publikovaným postupům inovativní svým vysokým stupněm multiplexu, schopného kombinovat detekci několika nezávislých cílů a interní kontroly. Tato kombinace tak umožňuje rychlý skrínink vyšetřovaného vzorku na předpokládané spektrum patogenů, jejichž výskyt je vázaný na danou matrici 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 enterohemoragické *EC* O26 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 enterohemoragické *Escherichia coli* O26. Navržený postup je vhodný pro kontrolu ze vzorků tkáně, trusu a stěrů.

V) SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Bielaszewska, M., Zhang, W., Tarr, P. I., Sonntag, A. K., & Karch, H. 2005. Molecular profiling and phenotype analysis of *Escherichia coli* O26: H11 and O26: NM: secular and geographic consistency of enterohemorrhagic and enteropathogenic isolates. *Journal of clinical microbiology*, 43(8), 4225-4228.

Delannoy, S., Beutin, L., Fach, P., 2013. Discrimination of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) from Non-EHEC Strains Based on Detection of Various Combinations of Type III Effector Genes. *Journal of Clinical Microbiology* 51, 3257-3262.

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

Durso, L. M., Bono, J. L., & Keen, J. E. 2005. Molecular serotyping of *Escherichia coli* O26: H11. *Applied and environmental microbiology*, 71(8), 4941-4944.

Marejková, M., Zieg, J., Dušek, J., Bláhová, K., & Petráš, P. 2009. Smrtelný případ diareapozitivního hemolyticko-uremického syndromu vyvolaného enterohemoragickým *Escherichia coli* O26. *Zprávy CEM* (SZÚ Praha), 18(6), 212-214.

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

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

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.

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