



## CERTIFIKOVANÁ METODIKA

---

### Kvalitativní detekce *Listeria monocytogenes* pomocí metody MOL-PCR

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

99  
2018

# UPLATNĚNÁ CERTIFIKOVANÁ METODIKA

č. 99/2018

## **Kvalitativní detekce *Listeria monocytogenes* 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. 20 k čj. MO 332470/2018-684808  
Vydalo: Agentura vojenského zdravotnictví AČR VÚ 6848, 500 02 Hradec Králové

ISBN 978-80-88233-41-1

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

*Listeria monocytogenes* (*LM*) je grampozitivní, nesporulující, tyčinkovitá, všudypřítomná bakterie vyskytující se v půdě, vodě a potravinách (Sauders et al., 2012). Osídluje trávicí trakt lidí i zvířat.

Je to významný potravinový patogen kontaminující převážně mléko a mléčné výrobky, čerstvou zeleninu nebo syrové maso, ale také krmiva. *LM* je odolná vůči nízkým teplotám a množí se i při 4 °C (Farber and Peterkin, 1991). Může tak docházet k primární kontaminaci syrových potravin nebo k sekundární kontaminace v průběhu vaření a uchování hotových pokrmů.

Onemocnění se zoonotickým potenciálem způsobené touto bakterií se nazývá listerióza (McLauchlin et al., 2004). U zdravých lidí, stejně jako u domácích zvířat (zejména skotu a ovcí), zůstává toto onemocnění neodhaleno, většinou totiž probíhá bezpříznakově. Infekční dávka je různá, při dostatečné funkci imunitního systému organismu nemusí dojít k onemocnění (asymptomatictí nosiči), eventuálně se projevuje pouze mírnými příznaky (nevolnost, zvracení, průjem), vyvolanými *LM* množícími se v buňkách střevní sliznice, ale nepronikajícími dále do organismu. Je-li však organismus oslabený např. stářím, nemocí, nebo v průběhu těhotenství, může docházet k šíření listérií lymfatickými a krevními cévami do tkání. To se projevuje meningitidami, dochází k infekci placenty nebo plodových obalů a může dojít k septikémii, která vede k smrtelnému poškození plodu nebo může způsobit potrat.

Předpokládá se, že zhruba u 1 - 10 % lidské populace tvoří *LM* součást střevní mikroflóry, aniž by vyvolala klinické onemocnění (Goulet et al., 2006; Ramaswamy et al., 2007). Infikované osoby však vylučují bakterie ve výkalech po dobu až několika měsíců. Většina případů lidské listeriózy se tak jeví jako sporadická a zdroj a cesta infekce jsou obvykle neznámé; avšak souvislost *LM* s několika rozsáhlými ohnisky výskytu onemocnění po požití kontaminovaných potravin naznačuje, že primárním zdrojem bakterie mohou být právě kontaminované potraviny (Farber and Peterkin, 1991).

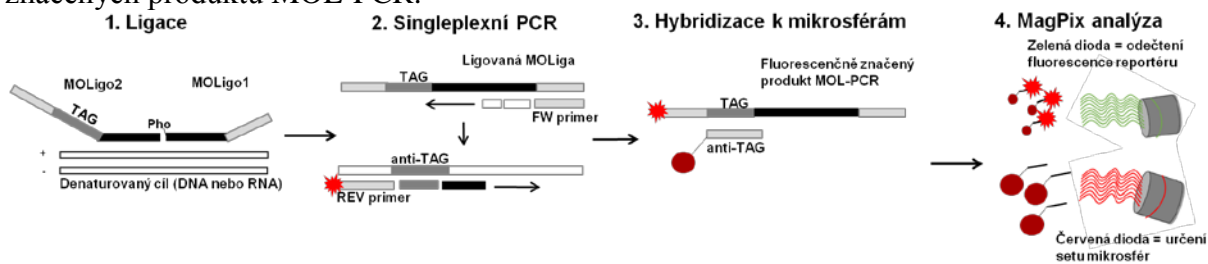
## I) CÍL METODIKY

Předkládaná metodika nabízí rychlý a standardizovaný postup detekce přítomnosti bakterie *Listeria monocytogenes*, 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 *LM* 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 vycytána 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 *rnc*

Pro detekci *LM* byl jako detekovaný cíl zvolen chromozomální gen *rnc* kódující ribonukleázu III (Toledo-Arana et al., 2009). Tento gen je součástí oblasti kódující 23S podjednotku rRNA a je specifický pro detekci této bakterie (Rodríguez-Lázaro et al., 2004). MOLigo sondy pro detekci genu *rnc* byly testovány na ověřeném kmenu ze sbírky zoopatogenních mikroorganismů Výzkumného ústavu veterinárního lékařství v Brně: *Listeria monocytogenes* CAPM 5879 (sérovár 1/2b).

### Sekvence MOLig:

Tučně = sekvence pro vazbu univerzálních PCR primerů; podtrženě = sekvence specifická pro *LM*; malá písmena = TAG sekvence MTAG-A027 umožňující specifickou vazbu k mikrosférám; PHO = fosfátová skupina.

LM\_M1: 5′-

PHO-ATGTGATTCCTCGTTCATTTACCATCTCACTTCTTACTACCGCG - 3′ (45)

LM\_M2: 5′

- ACTCGTAGGGAATAAACCGTaaagatgatagttaagtgttaagttGAGCCGCTTAGTACGTGA  
AAA - 3′ (65)

Těmito sondami je možné detekovat část genu *rnc* v rozsahu 255985 - 256030 bp (Acc. No. CP014790.1), délka sekvence specifické pro *CJ* = 46 bp. Celková délka produktu ligace detekčních sond = 110 bp.

## 1.2 Interní kontrola

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

a stejná sada univerzálních PCR primerů; jedná se tedy o univerzální IC. Při přípravě IC byla použita nekompetitivní syntetická sekvence založená na DNA sekvencích dvou vyhynulých druhů; konkrétně se jedná o mitochondriální DNA vakovlka tasmánského (*Thylacinus cynocephalus*, Acc. No. FJ515781.1) a ptáka moa (*Dinornis struthoides*, Acc. No. AY326187.1). Tato kontrolní syntetická sekvence o délce 150 bp byla převzata z Mikel et al. (2016), syntetizována *de novo* a klonována do plazmidu. Takto připravený konstrukt je zcela arteficiální a podobná sekvence se nevyskytuje v žádném známém živočišném, rostlinném, či bakteriálním druhu. IC je tedy možné použít pro jakýkoliv templát či matrici. IC je skladována při teplotě  $-20^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$  ve 2 ml zkumavkách se šroubovacím víčkem do vypotřebování.

### **Sekvence MOLig:**

Tučně = sekvence pro vazbu univerzálních PCR primerů; podtržené = sekvence specifická pro IC; malá písmena = TAG sekvence MTAG-A014 umožňující specifickou vazbu k mikrosférám; PHO = fosfátová skupina.

IC\_2\_M1 5'-

PHO- ATTAGCACAATGAATAATCATCGTCTCACTTCTTACTACCGCG- 3' (43)

IC\_2\_M2 5'-

ACTCGTAGGGAATAAACCGTtattgtgaaagaaagagaagaaattTATACACACGCAATCACCAC- 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 ampliconu odpovídá délce jednotlivých produktů ligace (~ 110 bp).

## **2 Předmět a působnost**

Tato metodika slouží ke kvalitativní detekci *LM* 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 mikrozkmavky o objemu 0,2 ml x 96 se separátními víčky (Bioplastics, Nizozemsko)
- PCR deska s jamkami na objem 0,2 ml (Bioplastics, Nizozemsko)



- Chladnička (do 5 °C)
- Mrazicí box (-20 °C)
- Centrifuga MiniSpin
- Vortex V-1 Plus

## **5 Chemikálie a roztoky**

### **5.1 Ligáza**

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

### **5.2 Master Mix**

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

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

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

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

Specifická MOLiga a univerzální PCR primery se dodávají v lyofilizovaném stavu od firmy Generi-Biotech (Česká republika). Podle návodu uvedeného výrobcem jsou na pracovišti rozpuštěny v PCR 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  $-20^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$ . Alikvoty premixů lze opakovaně zamrazovat a rozmrazovat maximálně však 5×.

Jednotlivé složky je doporučeno přidávat podle uvedeného pořadí:

Složka	1 reakce	100 reakcí (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 LM_M1 a LM_M2 pro cíl (1 pmol/μl každá)	2 × 0,125 μl	2 × 12,5 μl	5 nM každá
MOLigo sondy IC_2_M1 a IC_2_M2 pro IC (1 pmol/μl každá)	2 × 0,125 μl	2 × 12,5 μl	5 nM každá
Směs MOLig (1 pmol/μl každá)	$x_1 \times 0,125 \mu\text{l}$	$x_1 \times 12,5 \mu\text{l}$	5 nM každá
IC plazmid $10^4/\mu\text{l}$	0,1 μl	10,0 μl	$1 \times 10^3$ kopií
Hifi <i>Taq</i> DNA Ligase	0,5 μl	50 μl	
DNA	2,5 μl	100 × 2,5 μl	
celkem	25 μl	2500 μl	

$x_1$  = počet dalších MOLigo sond v multiplexní reakci

## 5.6 Příprava PCR premixu

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

Jednotlivé složky je doporučeno přidávat podle uvedeného pořadí:

Složka	1 reakce	100 reakcí (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<sup>®</sup> Microspheres (12,5 x 10<sup>6</sup> mikrosfér/ml; Luminex Corp., USA), katalogové číslo MC100XX-01 (XX = 12-78, dle seznamu dostupných setů od firmy Luminex Corp.). Potažené mikrosféry v 1X TE pufru je nutno skladovat v chladničce při teplotě 4 °C a chránit před světlem. Za normálních podmínek jsou stabilní déle než 1 rok. Před každým použitím je nutno mikrosféry řádně vortexovat a sonifikovat asi 30 s.

### 5.8 Roztoky pro hybridizaci

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

Příprava hybridizačních roztoků a jejich skladování:

Složka	Katalog. č.	Výsledná koncentrace	Množství/250 ml	pH	Skladování
MES	Sigma-Aldrich M2933 (USA)	0,1 M	4,88 g	4,5	4 °C
NaCl	Carl-ROTH 3957 (Německo)	5 M	73,05 g		pokožová teplota
100X TE pufr	SERVA 39799.02 (Německo)	1X	2,5 ml	8,0	pokožová 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 <sup>®</sup> 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 rozaliquotovat do zkumavek o objemu 5 ml, které slouží na jedno použití. Nutno skladovat v chladničce při teplotě 4 °C.

Složení a příprava analyzačního pufru:

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

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

### 5.12 Kalibrační a verifikační kity pro MAGPIX

Kalibrační kit MAGPIX® Calibrator Kit, RUO, 25 Uses (Luminex Corp., USA), katalogové číslo MPX-CAL-K25 a verifikační kit MAGPIX® Performance Verification Kit, RUO, 25 Uses (Luminex Corp., USA), katalogové číslo MPX-PVER-K25. Oba kity je doporučeno skladovat při teplotě 4 °C a chránit před světlem. Za normálních podmínek jsou kity stabilní do data expirace. Před každým použitím je nutno všechny složky kitů řádně vortexovat a sonifikovat asi 30 s. 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 expirace.

### 5.14 Roztoky pro údržbu přístroje MAGPIX

Údržbové rutiny přístroje i samotná analýza vyžadují doplnění dH<sub>2</sub>O, 70% isopropanolu, 0,1 N NaOH 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 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 Kalibrace měřícího prostředku před zkouškou

Po spuštění přístroje je třeba vždy provést několik úkonů. Nejprve se sací jehla promyje a sonifikuje v destilované vodě (dH<sub>2</sub>O). Zkontroluje se naplnění kontejnerů pro Drive fluid a odpad (waste container). V Bio-Plex Manager<sup>TM</sup> 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 <sup>a</sup>	10 °C

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

### 6.7.2 PCR protokol

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

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

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

### 6.7.3 Hybridizační protokol

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

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

<sup>a</sup> 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<sup>TM</sup> 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.

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

#### 7.1.1 Kvalitativní hodnocení

Kvalitativní hodnocení se provádí podle následující tabulky:

Cíl	IC	Celkový výsledek
Pozitivní (+)	Pozitivní (+)	Vzorek je pozitivní na LM
Pozitivní (+)	Negativní (-)	Vzorek je pozitivní na LM
Negativní (-)	Pozitivní (+)	Vzorek je negativní na LM
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 *Salmonella enterica*, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli* (EHEC), *Taenia saginata*, *Trichinella spiralis*, *Toxoplasma gondii* a *Giardia intestinalis*. 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).



Výsledky testování detekčního systému pro *LM* na různých sbírkových kmenech:

Sbírkové kmeny	<i>L. monocytogenes</i>
<i>Salmonella enterica</i> CAPM 5439	Negativní
<i>Salmonella enterica</i> CAPM 5445	Negativní
<i>Salmonella enterica</i> CAPM 5456	Negativní
<i>Salmonella enterica</i> CAPM 6324	Negativní
<i>Campylobacter jejuni</i> CAPM 6313	Negativní
<i>Campylobacter jejuni</i> CAPM 6316	Negativní
<i>Campylobacter jejuni</i> CAPM 6341	Negativní
<i>Campylobacter jejuni</i> CAPM 6352	Negativní
<i>Escherichia coli</i> CAPM 6009	Negativní
<i>Escherichia coli</i> CAPM 6120	Negativní
<i>Escherichia coli</i> CAPM 6130	Negativní
<i>Escherichia coli</i> CAPM 5905	Negativní
<i>Escherichia coli</i> CAPM 5928	Negativní
<i>Escherichia coli</i> CAPM 6556	Negativní
<i>Escherichia coli</i> CAPM 5969	Negativní
<i>Escherichia coli</i> CAPM 5933	Negativní
<i>Escherichia coli</i> CAPM 5224	Negativní
<i>Escherichia coli</i> CAPM 5357	Negativní
<i>Escherichia coli</i> CAPM 5358	Negativní
<i>Escherichia coli</i> CAPM 5399	Negativní
<i>Escherichia coli</i> CAPM 6113	Negativní
<i>Yersinia enterocolitica</i> CAPM 6154	Negativní
<i>Yersinia enterocolitica</i> CAPM 5671	Negativní
<i>Yersinia enterocolitica</i> CAPM 5908	Negativní
<i>Yersinia enterocolitica</i> CAPM 6458	Negativní
<i>Yersinia enterocolitica</i> CAPM 6459	Negativní
<i>Listeria monocytogenes</i> CAPM 5576	Pozitivní
<i>Listeria monocytogenes</i> CAPM 5577	Pozitivní
<i>Listeria monocytogenes</i> CAPM 5879	Pozitivní
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> CAPM 5763	Negativní
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> CAPM 6495	Negativní
<i>Yersinia ruckeri</i> CAPM 6095	Negativní
<i>Listeria grayi</i> CAPM 5887	Negativní
<i>Listeria ivanovii</i> CAPM 5884	Negativní
<i>Listeria seeligeri</i> CAPM 5885	Negativní
<i>Streptococcus agalactiae</i> CAPM 5668	Negativní
<i>Streptococcus pneumoniae</i> CAPM 5361	Negativní
<i>Klebsiella pneumoniae</i> CAPM 6241	Negativní
<i>Enterococcus faecalis</i> CAPM 5613	Negativní
<i>Enterobacter aerogenes</i> CAPM 5634	Negativní
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CAPM 5717	Negativní
<i>Arcanobacterium haemolyticum</i> CAPM 5948	Negativní
<i>Corynebacterium kutscheri</i> CAPM 6492	Negativní
<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> CAPM 6558	Negativní
<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i> CAPM 5014	Negativní
<i>Dermatophilus congolensis</i> CAPM 6439	Negativní
<i>Staphylococcus epidermidis</i> CAPM 5657	Negativní
<i>Staphylococcus hyicus</i> CAPM 6346	Negativní
<i>Staphylococcus aureus</i> CAPM 6566	Negativní
<i>Staphylococcus saccharolyticus</i> 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 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 popsáno v této certifikované metodice. Hodnota S (stopové množství) představuje koncentraci cílové DNA na hranici limitu detekce.

Vzorek	Vzorek po izolaci DNA	Kvalitativní detekce <i>LM</i>			
		VÚVeL	VVeÚ Hlučín	VFU Brno	ÚVN Praha
<b>Z</b>	Neředěný	+	+	+	+
<b>5X</b>	5X ředěný	+	+	+	+
<b>10X</b>	10X ředěný	+	+	+	–

<b>S</b>	100X ředěný	–	–	–	–
<b>Ex</b>	Negativní + 10X ředěná DNA <i>S. aureus</i>	–	–	–	–
<b>K+</b>	IC (1 ng/μl)	+	+	+	+
<b>NTC</b>	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 *LM* u hospodářských zvířat a krmiv a použití různých analytických metod neumožňuje získání srovnatelných údajů (EFSA, 2017), 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 matici a současně umožňuje vyloučit falešně negativní výsledek v důsledku přítomnosti inhibitorů. Zároveň jsou pro tuto metodiku stanoveny parametry limitu detekce. Na základě rychlé a spolehlivé kvalitativní detekce je pak možno vybrané vzorky vykazující pozitivitu podrobit kvantifikační analýze pomocí real time PCR a determinovat tak infekční dávku.

Předložená metodika byla vyvinuta s ohledem na její budoucí diagnostické uplatnění. Proto u ní byla provedena kompletní optimalizace, otestována specifita a citlivost, propracován systém kontrol a hodnocení. Funkčnost byla ověřena pro monoplexní i vysoce multiplexní účely. Předložený MOL-PCR systém umožňuje komplexní přístup k detekci bakterie *LM* 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 bakterie *Listeria monocytogenes*. Navržený postup je vhodný pro kontrolu ze vzorků trusu a stěrů.

## V) SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

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.

EFSA, 2017. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. *EFSA Journal* 15, 228.

Farber, J. M., & Peterkin, P. I. 1991. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiological reviews*, 55(3), 476-511.

Goulet, V., Jacquet, C., Martin, P., Vailant, V., Laurent, E., de Valk, H. 2006. Surveillance of human listeriosis in France 2001 - 2003. *Euro. Surveill.* 11(6):79-81.

McLauchlin, J., Mitchell, R., Smerdon, W. J., & Jewell, K. 2004. *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods. *International Journal of Food Microbiology*, 92(1), 15-33.

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.

Ramaswamy, V., Cresence, V.M., Rejitha, J.S., Lekshmi, M.U., Dharsana, K.S., Prasad, S.P., Vijila, H.M. 2007. *Listeria* – review of epidemiology and pathogenesis. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 40(1):4-13.

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*.

Sauders, B. D., Overdeest, J., Fortes, E., Windham, K., Schukken, Y., Lembo, A., & Wiedmann, M. 2012. Diversity of *Listeria* species in urban and natural environments. *Applied and Environmental Microbiology*, AEM-00282.

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](http://www.vri.cz); e-mail: [vri@vri.cz](mailto:vri@vri.cz)