



FUNKČNÍ VZOREK

**Diagnostický prostředek pro multiplexní detekci
a rozlišení hlavních bakteriálních původců
vyvolávajících abscesy u malých přežvýkavců**

**Ing. Pavlína Jelínková, Ph.D.
MVDr. Jiřina Marková, Ph.D.
MVDr. Markéta Reichelová**

4176
2021

Funkční vzorek 4176/2021

**Diagnostický prostředek pro multiplexní detekci a rozlišení
hlavních bakteriálních původců vyvolávajících abscesy u
malých přežvýkavců**

Ing. Pavlína Jelínková, Ph.D.

MVDr. Jiřina Marková, Ph.D.

MVDr. Markéta Reichelová

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i., Brno

Funkční vzorek byl vytvořen v rámci projektu Ministerstva zemědělství QK1910082

a MZE-RO0518.

2021

ISBN 978-80-7672-012-1

Obsah

1. Úvod	3
2. Cíl metodiky funkčního vzorku.....	3
3. Vlastní popis metodiky funkčního vzorku a nároků na ochranu	3
3.1. Předmluva	3
3.2. Metodika	4
3.2.1. Izolace DNA ze vzorků.....	4
3.2.2. Návrh MOLigo sond (krátkých specifických oligonukleotidů)	4
3.2.3. Postup provedení MOL-PCR reakce.....	5
3.2.3.1. Multiplexní oligonukleotidová ligace	5
3.2.3.2. PCR reakce s univerzálním párem primerů.....	6
3.2.3.3. Hybridizace a analýza pomocí platformy MAGPIX.....	7
3.3. Kvalitativní vyhodnocení	7
4. Vyhodnocení funkčnosti systému	8
5. Srovnání novosti postupů	8
6. Uplatnění funkčního vzorku	8
7. Ekonomické aspekty	8
8. Dedikace.....	9
9. Seznam použité literatury	9

1. Úvod

Původci infekční lymfadenitidy u malých přežvýkavců způsobené *Corynebacterium pseudotuberculosis* a *Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobius* jsou široce distribuováni po celém světě a mají za následek značné ekonomické ztráty. Jako součást bakteriálního spektra lymfadenitidy ovcí a koz bývají popisováni také *Streptococcus* species a *Trueperella pyogenes* [1, 2]. V dnešní době se velmi často objevuje u bakterie *S. aureus* rezistence na betalaktamová antibiotika (ATB), která je způsobena genem *mecA*. Zjištění této rezistence a diagnostika meticilin-rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA) jsou velmi důležité pro následnou léčbu. Aby se zabránilo šíření původce, použila se účinná preventivní opatření k zastavení šíření infekčních chorob a předešlo se tak ekonomickým ztrátám pro chovatele ovcí a koz, je podstatné rychle identifikovat a specifikovat bakteriální druhy způsobující abscesy u malých přežvýkavců. Metodou volby pro rychlou a spolehlivou identifikaci patogenů v různých matricích je polymerázová řetězová reakce (PCR) [3]. Analýza mnoha vzorků na přítomnost více infekčních agens pomocí PCR však vyžaduje úpravy pracovního postupu. Jednou z možností je použít PCR jako suspenzní pole, ve kterém je fluorescenčně značený PCR produkt vizualizován jeho připojením ke konkrétní magnetické mikrosféře a to díky unikátní sekvenci xTAG. Existuje řada modifikací, jednou z nich je PCR s multiplexní oligonukleotidovou ligací (MOL-PCR). Tato modifikace umožňuje použití pouze jediného páru univerzálních primerů, což usnadňuje optimalizaci celého testu [4].

Metodika funkčního vzorku popisuje MOL-PCR diagnostiku kaseózní lymfadenitidy (caseous lymphadenitis, CLA) ovcí a koz způsobovanou bakterií *Corynebacterium pseudotuberculosis*, ale i dalších vybraných patogenů nacházejících se v abscesech malých přežvýkavců. To vše se děje na multiplexní molekulární úrovni v jedné reakci a za použití platformy MagPix (Luminex Corp.).

2. Cíl metodiky funkčního vzorku

Cílem metodiky funkčního vzorku bylo využít specifické sekvence DNA pro detekci nejčastěji se vyskytujících bakteriálních patogenů v abscesech u malých přežvýkavců a tím vytvořit nový detekční multiplexní panel za použití platformy MagPix (Luminex Corp.).

3. Vlastní popis metodiky funkčního vzorku a nároků na ochranu

3.1. Předmluva

Technické řešení diagnostického prostředku pro *in vitro* multiplexní detekci a rozlišení hlavních bakteriálních původců vyvolávajících abscesy u malých přežvýkavců (*Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Corynebacterium ulcerans*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* subspecies *anaerobius*, *Streptococcus* spp., *Trueperella pyogenes* a meticilin-rezistentní *S. aureus*), využívá tzv. xMAP technologii (Luminex corporation, USA, Texas) na přístrojové platformě MagPix. Technologie xMAP je založena na třech po sobě jdoucích krocích: 1) multiplexní oligonukleotidová ligační assay, 2) PCR s univerzálním párem primerů shodným pro všechny cíle a 3) hybridizace. Spojení těchto kroků umožňuje simultánní detekci řady molekulárních cílů v široké škále matric, v tomto případě v abscesech malých přežvýkavců (ovcí a koz). Předkládaný detekční systém je pro zajištění spolehlivosti vybaven i systémem interní pozitivní kontroly pro vyloučení PCR inhibice a spočívá v přidání

nukleové kyseliny o známé sekvenci do každého vzorku a její následné simultánní detekci spolu s ostatními detekčními cíli. Jako interní pozitivní kontrola (IPK) jednotlivých kroků MOL-PCR analýzy u každého vzorku je použita nekompetitivní syntetická sekvence založená na DNA sekvencích dvou vyhynulých živočišných druhů. Kontrolní syntetická sekvence byla syntetizována *de novo* a klonována do plazmidu. Tento přístup, tzn. použití přesně definovaného množství interní kontroly ve spojení s xMAP technologií, zajišťuje kontrolu analytického postupu každého jednoho analyzovaného vzorku. Metoda je specifikována jedinečnými parametry, které umožňují její použití v oblasti veterinární medicíny a laboratorní diagnostiky.

3.2. Metodika

3.2.1. Izolace DNA ze vzorků

Extrakce genomové DNA (gDNA) byla provedena z obsahu abscesů (20 mg hnisu) za použití izolační soupravy DNeasy® Blood & Tissue (Qiagen, Německo) podle protokolu výrobce s několika modifikacemi, jak bylo popsáno dříve [5].

3.2.2. Návrh MOLigo sond (krátkých specifických oligonukleotidů)

Pro detekci vybraných zástupců bakteriálních patogenů nacházejících se nejčastěji v abscesech malých přežvýkavců byly vybrány cílové geny se specifickými, unikátními sekvencemi, které se následně porovnály s referenčními sekvencemi těchto vybraných patogenů dostupnými v databázi NCBI (National Center for Biotechnology Information). Dále byly stanoveny v cílových unikátních sekvencích dva krátké specifické a bezprostředně na sebe navazující oligonukleotidové úseky (základ pro tzv. MOLigo sondy). K identifikaci *Corynebacterium pseudotuberculosis* se designovaly sondy pro dva detekční cíle a to *pld* gen kódující fosfolipázu D, jakožto hlavní determinant virulence a gen *faqA*, kódující integrální membránový protein. Využití dvou cílů v jedné reakci výrazně zvyšuje pravděpodobnost úspěšné detekce. Pro bakterii *Corynebacterium ulcerans* byl zvolen gen *leuA* kódující 2-isopropylmalát syntázu, pro patogen *Staphylococcus aureus* gen *nuc*, kódující termostabilní nukleázu specifickou pro *S. aureus*, a gen *mecA*, který kóduje PBP2a propůjčující rezistenci na β -laktamová antibiotika. K rozlišení, zda se jedná o *S. aureus* subspecies *anaerobius* byl vybrán gen *katB*, kódující katalázu. Detekce *Trueperella pyogenes* probíhala přes gen *plp*, kódující faktor virulence pyolysin. Pro druhy rodu *Streptococcus* byl vybrán gen *tuf*, kódující elongační faktor Tu. Všechny páry MOLigo sond obsahují stejnou sekvenci pro hybridizaci univerzálních primerů (Reverse - Rw a Forward - Fw). Jedna z MOLigo sond ještě navíc vlastní jedinečnou 24 bazickou DNA sekvenci zvanou xTAG (od společnosti Luminex corporation; <https://www.luminexcorp.com/magplex-tag-microspheres/>), kterou produkty PCR hybridizují k anti-TAG sekvenci na povrchu magnetické mikrosféry. Specifické části sekvencí MOLigo sond (specifická sekvence pro daný cíl - část 1 a část 2) byly testovány pomocí nástroje OligoAnalyzer 3.1 (<https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>) a to za účelem identifikace vlastností jako je teplota tání, vlásenky, tvorba dimerů apod. Teoretická specifita MOLigo sond byla ověřena analýzou pomocí databáze BLAST NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>). Seznam sekvencí MOLigo sond a univerzálních primerů popisuje tabulka 1.

Tabulka 1 Seznam sekvencí MOLigo sond a univerzálních primerů pro MOL-PCR

Pho = fosfát; podtrženě = sekv. specifická pro cíl; tučně = vazebná sekv. uni primerů; malým = TAG.

Patogen	Cíl	Název	Sekvence 5'-3'	TAG	Mikro sféry
<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	<i>pld</i>	Coryne_pseudo_PLD_M1 Coryne_pseudo_PLD_M2	Pho- <u>CTGCCTGGAAGACAATCACCTCTCACTTCTTACTACCGG</u> ACTCGTAGGGAATAAACCGT tattgttgaatgtgttaaagaga <u>TTCTATAAGACAGTCGGCGGAC</u>	47	47
<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	<i>fagA</i>	CLA_fagA_M1_V1 CLA_fagA_M2_V1	Pho- <u>CAAACGCCCAACAATATCCGCTCTCACTTCTTACTACCGG</u> ACTCGTAGGGAATAAACCGT gttatgatagtagtgattgatt <u>GAAATTCGCCGGGGACAAT</u>	77	62
<i>Corynebacterium ulcerans</i>	LeuA	CoryUI_LeuA_M1 CoryUI_LeuA_M2	Pho- <u>TTTGCCCATGAATACCTGGATTCTCACTTCTTACTACCGG</u> ACTCGTAGGGAATAAACCGT gtgatagaattgtgttaataa <u>TCCAA GAACATGTGGGACATC</u>	71	64
<i>S. aureus</i>	<i>nuc</i>	SA_nuc_M1 SA_nuc_M2	Pho- <u>GAAAATGCAAAGAAAATTGAAGTCTCTCACTTCTTACTACCGG</u> ACTCGTAGGGAATAAACCGT attgttatgataaatgttagtg <u>GTGCATTTACGAAAAAATGGTA</u>	42	12
<i>S. aureus subsp. anaerobius</i>	<i>katB</i>	SAN_catB_M1 SAN_catB_M2	Pho- <u>TGATTCATCTCAACGCGATCTCACTTCTTACTACCGG</u> ACTCGTAGGGAATAAACCGT gttgagaattagaattgataaag <u>CTGAAATTATAGCAACAGGTGC</u>	73	73
<i>Streptococcus</i> spp.	<i>tuf</i>	Strep_tuf_M1_V1 Strep_tuf_M2_V1	Pho- <u>TAAAGTCAATGATGAAGTTGAAATCGTTTCTCACTTCTTACTACCGG</u> ACTCGTAGGGAATAAACCGT aatgaaatagtgtaaatgagtg <u>GTATCGACCGTGGTACTGT</u>	74	74
<i>Trueperella pyogenes</i>	<i>plo</i>	T.pyogenes_plo_M1 T.pyogenes_plo_M2	Pho- <u>AGAATAAGGTCGTCATCAACAATCCCACTCTCACTTCTTACTACCGG</u> ACTCGTAGGGAATAAACCGT gattagtagtagtagtaagag <u>TTGATTTGCCAGGATTAGTTGACGGTA</u>	70	75
Methicillin-rezistentní <i>S. aureus</i>	<i>mecA</i>	MRSA_M1 MRSA_M2	Pho- <u>GTTGGTCCCATTA ACTCTGAAGATCTCACTTCTTACTACCGG</u> ACTCGTAGGGAATAAACCGT atgaaagattagttgtgagatat <u>AAGCGACTTCACATCTATTAGGTTAT</u>	69	63
Interní kontrola	aDNA	IC_2_M1 IC_2_M2	Pho- <u>ATTAGCACAAATGAATAATCATCGTCTCACTTCTTACTACCGG</u> ACTCGTAGGGAATAAACCGT attgtgaaagaaagagaagaatt <u>TATACACAGCAATCACCAC</u>	14	36
Forward primer		uni FW	CGCGGTAGTAAGAAGTGAGA		
Reverse primer		uni REV	BODIPY-TMRX-ACTCGTAGGGAATAAACCGT		

3.2.3. Postup provedení MOL-PCR reakce

3.2.3.1. Multiplexní oligonukleotidová ligace

Multiplexní ligační směs byla optimalizována a připravena podle množství uvedených v tabulce 2 do konečného objemu reakce 25 µl. Ligační reakce probíhala v termocykleru (DNA Engine Dyad, Bio-Rad, Foster City, CA, USA) dle protokolu: počáteční denaturace 10 minut při 95 °C; následovalo 20 cyklů (30 s při 95 °C a 60 s při 59 °C). Ligační produkty byly skladovány při 10 °C až do dalšího kroku MOL-PCR reakce.

Tabulka 2 Složení multiplexní ligační směsi

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 (NEB)	2,5 µl	250 µl	1X
MOLigo sondy CLA_pld_M1 a CLA_pld_M2 pro cíl (1 pmol/µl každá)	2 × 0,125 µl	2 × 12,5 µl	5 nM každá
MOLigo sondy CLA_fagA_M1 a CLA_fagA_M2 pro cíl (1 pmol/µl každá)	2 × 0,125 µl	2 × 12,5 µl	5 nM každá
MOLigo sondy leuA_M1 a leuA_M2 pro cíl (1 pmol/µl každá)	2 × 0,125 µl	2 × 12,5 µl	5 nM každá
MOLigo sondy SA_nuc_M1 a SA_nuc_M2 pro cíl (1 pmol/µl každá)	2 × 0,125 µl	2 × 12,5 µl	5 nM každá
MOLigo sondy SAN_katB_M1 a SAN_katB_M2 pro cíl (1 pmol/µl každá)	2 × 0,125 µl	2 × 12,5 µl	5 nM každá
MOLigo sondy Strep_tuf_M1 a Strep_tuf_M2 pro cíl (1 pmol/µl každá)	2 × 0,125 µl	2 × 12,5 µl	5 nM každá
MOLigo sondy TP_plo_M1 a TP_plo_M2 pro cíl (1 pmol/µl každá)	2 × 0,125 µl	2 × 12,5 µl	5 nM každá
MOLigo sondy MRSA_M1 a MRSA_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
IC plazmid 0,75ng/µl	0,1 µl	10,0 µl	
Hifi <i>Taq</i> DNA Ligase (NEB)	0,5 µl	50 µl	
UNG (Roche)	0,2 µl	20 µl	
Carrier DNA z rybích spermií (Serva Electrophoresis, kat.č.1858001) 50 ng/µl	1 µl	100 µl	
DNA	2,5 µl	100 × 2,5 µl	
celkem	25 µl	2500 µl	

3.2.3.2. PCR reakce s univerzálním párem primerů

Premix pro amplifikaci ligačních produktů byl namíchan dle množství uvedených v tabulce 3 v konečném objemu 24 µl. Ligační produkty byly přidány do již připravených zkumavek s PCR premixem v poměru 1:3, tj. 6 µl produktů a 18 µl premixu. PCR protokol pro tuto reakci: počáteční denaturace při 95 °C po dobu 2 minut, následovaná 40 cykly (95 °C po dobu 15 s, 60 °C po dobu 15 s a 72 °C po dobu 15 s).

Tabulka 3 Složení PCR premixu s univerzálním párem primerů

Složka	1 reakce	100 reakcí (96 + 4 rezerva)	Výsledná koncentrace
PCR voda	5,25 µl	525 µl	
Luna® Universal Probe qPCR Master 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	

3.2.3.3. Hybridizace a analýza pomocí platformy MAGPIX

Kuličkový mix pro hybridizaci s PCR produkty se míchá čerstvý na konkrétní počet vzorků v reakci (Tabulka 4) a ihned se upotřebí k hybridizaci MOL-PCR produktů k povrchu magnetických mikrosfér. Tento mix se tedy nepřipravuje a neuchovává ve formě premixu. Podle počtu stanovovaných cílů (párů MOLigo sond) v reakci se přidává příslušný počet specifických setů mikrosfér, tzn. jeden pár sond – jeden set mikrosfér.

Směs mikrosfér v objemu 5 µl na vzorek byla pipetována do 0,2 ml stripů (BIOplastics, Landgraaf, Nizozemsko) a poté bylo přidáno 10 µl PCR produktů z předchozího kroku. Připravené stripy s kuličkovým mixem a PCR produkty byly vloženy do termocykleru s následujícím protokolem: denaturace 96 °C po dobu 90 s, hybridizace při 37 °C po dobu 30 minut a poté udržováno při 37 °C do dalšího zpracování. Bezprostředně po dokončení hybridizace bylo přidáno 45 µl analyzačního pufru (10 mM Tris-Cl (pH 8,0); 0,1 mM EDTA; 90 mM NaCl a 0,2% Tween 20). Stripy s takto hybridizovanými produkty a analyzačním pufrem byly umístěny na 0,2 ml stojánek Multi Rack (Bioplastics) a analyzovány v přístroji MAGPIX (Bio-Plex MAGPIX, Bio-Rad) pomocí xPONENT 4.2.® SOFTWARE (Luminex, Austin, TX, USA).

Tabulka 4 Složení kuličkové směsi

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	1 250 mikrosfér/set	125 000 mikrosfér/set	
1X TE pufr	doplnit objem	100 × doplnit objem	
celkem	5 µl	500 µl	

3.3. Kvalitativní vyhodnocení

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 200 MFI a poměr mezi pozitivním a negativním vzorkem vyšší než 4, vzorek je vyhodnocen jako pozitivní.

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

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

4. Vyhodnocení funkčnosti systému

Použitím referenčních kmenů *Corynebacterium pseudotuberculosis* CAPM 6558, *Streptococcus pneumoniae* CAPM 5361, *Trueperella pyogenes* CAPM 5079, *Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobius* CAPM 6559, *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* CAPM 6676, meticilin-rezistentní *Staphylococcus aureus* CAPM 6565 ze Sbírký zoopatogenních mikroorganismů (CAPM) a klinických izolátů z abscesů malých přežvýkavců typizovaných hmotnostní spektrometrií MALDI-TOF (Matrix Assisted Desorption Ionization – Time of Flight) byla potvrzena specifita MOLigo sond navržených pro jednotlivé patogeny. Zároveň nebyla zjištěna žádná interakce mezi jednotlivými sondami. Specifita převzatých univerzálních primerů se ověřovala na 13-ti genotypech *Bacillus anthracis* v případě Thierry et. al. [6] a také na 11-ti sérotypech *Escherichia coli* (STEC) v publikaci Woods et. al. [7].

5. Srovnání novosti postupů

Představený funkční vzorek založený na bázi multiplexní oligonukleotidové ligační eseje s následnou PCR za použití jednoho páru univerzálních primerů a hybridizací na magnetické kuličky je oproti dříve publikovaným postupům inovativní svým vysokým stupněm multiplexu. Použitá metoda je schopna kombinovat detekci několika nezávislých cílů (až 50 v jedné reakci) a interní kontroly. Tato kombinace tak umožňuje rychlý skrínink vyšetřovaného vzorku, v našem případě obsahu abscesů ovcí a koz na předpokládané spektrum patogenů (*Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Corynebacterium ulcerans*, *S. aureus*, *S. aureus* subsp. *anaerobius*, meticilin-rezistentní *S. aureus*, *Trueperella pyogenes*, *Streptococcus* spp.). Současně umožňuje vyloučit falešně negativní výsledek v důsledku přítomnosti inhibitorů. Na základě rychlé a spolehlivé kvalitativní detekce je pak možné vybrané vzorky vykazující pozitivitu podrobit cílené kvantifikační analýze pomocí real-time PCR a determinovat tak množství bakterií ve vyšetřované matici.

6. Uplatnění funkčního vzorku

Funkční vzorek představuje simultánní multiplexní detekční metodu, která je určena k rychlému skríninku a monitoringu výskytu vybraných patogenních bakterií způsobujících abscesy u malých přežvýkavců (ovcí a koz). Funkční vzorek je určen především pro diagnostické laboratoře a výzkumné ústavy s přesahem pro chovatelskou praxi. Součástí funkčního vzorku jsou uvedené protokoly umožňující rutinní detekci vybraných bakteriálních agens v abscesech malých přežvýkavců (ovcí a koz) na molekulární úrovni pomocí platformy MagPix (Luminex Corp.). Metody qPCR pomocí TaqMan, SybrGreen sond a Luminex xTAG jsou v současnosti ve velkém popředí vědeckého zájmu a jeví se jako jedny z velmi perspektivních diagnostických metod, ať už z hlediska citlivosti či jejich specifčnosti detekce. Rychlá simultánní multiplexní detekční metoda je jednou z efektivních cest, která je schopna identifikovat nemocný kus ve stádě. Tak mohou být co nejrychleji vytvořena potřebná opatření v chovu pro zabránění dalšího šíření onemocnění.

7. Ekonomické aspekty

Pro diagnosticky vybavenou laboratoř spočívají náklady v syntéze oligonukleotidů a pořízení spotřebního materiálu, soupravy pro izolaci DNA, chemikálií a enzymů pro ligační eseje, PCR reakci a hybridizaci včetně magnetických mikrosfér. Cena materiálu na vyšetření jednoho

vzorku v duplikátu se pohybuje kolem 600 Kč (bez DPH). Při zavedení funkčního vzorku do diagnostické praxe se ušetří čas i náklady spojené s analýzou. Vzhledem ke komplexnosti analýzy je úspora nákladů reálná, protože komplexní vyšetření vzorku v jedné reakci představuje vždy výhodu ve srovnání s prováděním oddělených, jedno druhově cílených PCR nebo např. různých sérologických testů.

Pořízení přístroje Bio-Plex MAGPIX Multiplex Reader představuje jednorázovou investici kolem 700.000 – 800.000,- Kč.

Rychlá a citlivá detekce vybraných bakteriálních agens v abscesech malých přežvýkavců může přispět k významnému snížení ekonomických ztrát daného podniku, jelikož na základě výsledků je možné vytvořit příslušná cílená opatření v chovu a zamezit tak případnému dalšímu přenosu nákazy ve stádě. Nález bakteriálních patogenů způsobujících abscesy u malých přežvýkavců může vést k ekonomickým ztrátám způsobeným neprodejností infikovaného materiálu a také ztrátě důvěry a konkurenceschopnosti podniku. Včasné otestování vzorků z nakažených kusů ovcí a koz pomocí rychlých molekulárních detekčních metod tak v širším měřítku povede k finanční úspoře.

8. Dedikace

Funkční vzorek byl vytvořen v rámci projektu Ministerstva zemědělství QK1910082 a MZE-RO0518.

9. Seznam použité literatury

1. Baird, G.J. and M.C. Fontainet, *Corynebacterium pseudotuberculosis and its role in ovine caseous lymphadenitis*. Journal of Comparative Pathology, 2007. **137**(4): p. 179-210.
2. de la Fuente, R., et al., *Short communication: Isolation frequency of bacteria causing lymphadenitis and abscesses in small ruminants in central Spain*. Small Ruminant Research, 2017. **154**: p. 5-8.
3. Saiki, R.K., et al., *Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia*. Science, 1985. **230**(4732): p. 1350-1354.
4. Jelinkova, P., et al., *Development and Inter-Laboratory Validation of Diagnostics Panel for Detection of Biothreat Bacteria Based on MOL-PCR Assay*. Microorganisms, 2021. **9**(1): p. 38.
5. Slana, I., et al., *Distribution of Mycobacterium avium subsp. avium and M. a. hominissuis in artificially infected pigs studied by culture and IS901 and IS1245 quantitative real time PCR*. Veterinary Microbiology, 2010. **144**(3): p. 437-443.
6. Thierry, S., et al., *A multiplex bead-based suspension array assay for interrogation of phylogenetically informative single nucleotide polymorphisms for Bacillus anthracis*. Journal of Microbiological Methods, 2013. **95**(3): p. 357-365.
7. Woods, T.A., et al., *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, 2016. **6**(92).

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