



## FUNKČNÍ VZOREK

---

**Metodický postup multiplexní detekce indikátorů  
fekálního znečištění s přihlédnutím na výskyt  
patogenních agens virového původu**

**Mgr. Magdaléna Krásna  
Mgr. Jakub Hrdý, Ph.D.  
Mgr. Petra Vašíčková, Ph.D.**

**3046  
2022**

**Funkční vzorek 3046/2022**

**Metodický postup multiplexní detekce indikátorů fekálního  
znečištění s přihlédnutím na výskyt patogenních agens virového  
původu**

**Autoři**

Mgr. Magdaléna Krásna  
Mgr. Jakub Hrdý, Ph.D.  
Mgr. Petra Vašíčková, Ph.D.

**Funkční vzorek byl vytvořen v rámci projektu Ministerstva zemědělství QK1810212**

**2022**

**ISBN 978-80-7672-024-4**

Vydal: Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i.

## Obsah

1. Úvod.....	3
2. Předmět funkčního vzorku.....	3
3. Vlastní popis metodiky funkčního vzorku.....	4
3.1. Popis MOL-PCR systému.....	4
3.2 Interní kontrola.....	6
3.3 Sekvence univerzálních primerů:.....	7
3.4 Hodnocení výstupu.....	7
3.5. Kvalitativní hodnocení.....	7
3.6. Specificita.....	8
3.7. Citlivost/limit detekce (LOD).....	9
4. Srovnání „novostí postupů“.....	9
5. Uplatnění funkčního vzorku.....	9
7. Seznam použité literatury.....	9

## 1. Úvod

Adenoviry (AdV) jsou řazeny do čeledi *Adenoviridae*. Jedná se o středně velké neobalené ikosahedrální virové částice s genomem v podobě lineární nesegmentované dvouřetězcové DNA o velikosti od 26 do 45 kb. Velikost virové kapsidy se pohybuje v rozsahu od 65 do 80 nm. AdV způsobují infekce jak u lidí, tak i u řady vnímavých zvířat (např. prasata, skot, psy, koně, myši, ptáky). Lidské adenoviry se třídí do 7 skupin (A-G) a dále do 67 odlišných typů (Barnadas et al. 2018; Buckwalter et al. 2012; Davison et al. 2003; Ghebremedhin 2014). Jsou původci druhově specifických onemocnění respiračního i trávicího traktu, zánětů či onemocnění očí (Gonzales-Gustavson et al. 2019).

Virová agens jsou často detekována ve vzorcích, které splňují kritéria určená na základě bakteriologických rozborů. Z tohoto důvodu je nutno zvolit vhodnější indikátory fekálního znečištění, které lépe korespondují s výskytem patogenních virů. Vzhledem ke svému širokému rozšíření jsou AdV řazeny mezi viry, jejichž průkaz ve sledovaných vzorcích lze spojit s indikací výskytu fekálního znečištění a tak přítomností dalších patogenních virů (Wyn-Jones et al. 2011). Předkládaný funkční vzorek proto nabízí multiplexní standardizovaný postup detekce přítomnosti AdV (respektive jejich genomu) ve vzorcích prostředí (např. pitné i užitkové vodě či potravinách rostlinného a živočišného původu). Díky druhové specifitě těchto virů lze stanovit původ fekálního znečištění analyzovaných vzorků.

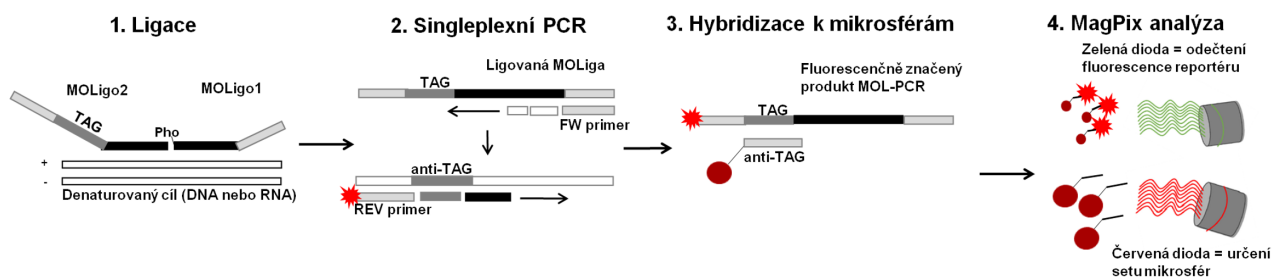
## 2. Předmět funkčního vzorku

Funkční vzorek nabízí rychlý a standardizovaný systém k detekci přítomnosti humánních (hAdV), bovinních (bAdV), porcinních (pAdV), psích (cAdV) a ptačích (fAdV), respektive jejich genomu (DNA), ve vzorku. Popsaný systém může být součástí komplexní multiplexní detekce patogenů, která umožňuje detekovat v jedné reakci až několik desítek různých agens, přičemž jako templátová DNA může být použita izolovaná nukleová kyselina různého původu, např. prostředí, pitná či užitková voda, suroviny a potraviny živočišného i rostlinného původu. Systém je využitelný jako vhodný komplexní nástroj skriningových testů pro široké spektrum agens.

### 3. Vlastní popis metodiky funkčního vzorku

#### 3.1. Popis MOL-PCR systému

Průkaz přítomnosti AdV je založen na detekci specifické sekvence vyskytující se v genomu těchto virů. Prvním krokem analýzy je multiplexní MOL-PCR systém (Reslova et al. 2019), kde detekce probíhá prostřednictvím hybridizace dvou specifických modulárních detekčních sond neboli MOLig bezprostředně vedle sebe k cílové sekvenci a jejich následné ligace 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 přesnou identifikaci jednotlivých setů mikrosfér a tak i identifikaci specifického cíle vyvázaného na jejich povrchu. Samotné kvalitativní vyhodnocení probíhá prostřednictvím odečtení fluorescenčního signálu mikrosfér, které je přímo úměrné množství 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.

Cíle č.1 ,2 ,3 ,5 jsou navrženy pro oblast kódující hexon protein AdV, cíl č.4 je detekuje specifickou oblast genomu kódující penton protein AdV. Hexon protein patří mezi hlavní

kapsidové proteiny. Společně s penton proteinem hrají klíčovou roli v úvodních fázích infekce; podílejí se na buněčné receptorové interakci s hostitelskou buňkou. Hexonový protein je hlavním stavebním „blokem“ proteinového obalu (Zubieta et al. 2005)

### **Cíl č. 1 – Hexon protein – Human mastadenovirus F (hAdV)**

#### **Sekvence MOLig:**

Tučně = sekvence pro vazbu univerzálních PCR primerů; podtrženě = sekvence specifická pro hAdV\_v2; malá písmena = TAG sekvence MTAG-A062 umožňující specifickou vazbu k mikrosférám (set A062); PHO = fosfátová skupina.

#### hAdV\_v2\_M1:

5' - PHO - CACATCKCSGGNCAGGAYGCTCTCACTTCTTACTACCGCG – 3' (40)

#### hAdV\_v2\_M2:

5' - ACTCGTAGGGAATAAACCGTtgaaatgtgtatttgtatgttagTGCCSCARTGGKCKTACATG – 3' (64)

### **Cíl č.2 – Hexon protein – Bovine atadenovirus E (bAdV)**

#### **Sekvence MOLig:**

Tučně = sekvence pro vazbu univerzálních PCR primerů; podtrženě = sekvence specifická pro bAdV\_v1; malá písmena = TAG sekvence MTAG-A072 umožňující specifickou vazbu k mikrosférám (set A072); PHO = fosfátová skupina.

#### bAdV\_v1\_M1:

5' - PHO - CGAGGGAATATCTGTCTGAATCTCACTTCTTACTACCGCG – 3' (40)

#### bAdV\_v1\_M2:

5' - CTCGTAGGGAATAAACCGTaattgagaaagagataaatgatagTCACATTGCGGGTAGAAATG – 3' (64)

### **Cíl č.3 – Hexon protein – Porcine mastadenovirus A (pAdV)**

#### **Sekvence MOLig:**

Tučně = sekvence pro vazbu univerzálních PCR primerů; podtrženě = sekvence specifická pro pAdV\_v2; malá písmena = TAG sekvence MTAG-A063 umožňující specifickou vazbu k mikrosférám (set A063); PHO = fosfátová skupina.

#### pAdV\_v2\_M1:

5' - PHO - TTGCCCTCAAGAGCCTGCTGTCTCACTTCTTACTACCGCG – 3' (40)

#### pAdV\_v2\_M2:

5' - ACTCGTAGGGAATAAACCGTtttgtgttaagtagttagtagATCCAGGTGCCGCAAAAAGTTCT – 3' (66)

### **Cíl č.4 – Penton protein – Canine mastadenovirus A (cAdV)**

### **Sekvence MOLig:**

Tučně = sekvence pro vazbu univerzálních PCR primerů; podtrženě = sekvence specifická pro cAdV\_v2; malá písmena = TAG sekvence MTAG-A073 umožňující specifickou vazbu k mikrosférám (set A073); PHO = fosfátová skupina.

#### cAdV\_v2\_M1:

5' - PHO - CCTACGTGTACAAAAGCTTGGTCTCACTTCTTACTACCGCG – 3' (41)

#### cAdV\_v2\_M2:

5' - ACTCGTAGGGAATAAACCGTgttgagaattagaatttgataaagGATGCAAGAAGAAGAGTGTGTC – 3' (66)

### **Cíl č.5 – Hexon protein – Fowl aviadenovirus A (fAdV)**

#### **Sekvence MOLig:**

Tučně = sekvence pro vazbu univerzálních PCR primerů; podtrženě = sekvence specifická pro fAdV\_v1; malá písmena = TAG sekvence MTAG-A055 umožňující specifickou vazbu k mikrosférám (set A056); PHO = fosfátová skupina.

#### fAdV\_v1\_M1:

5' - PHO - ATGGGRGCSACCTACTTCGATCTCACTTCTTACTACCGCG – 3' (40)

#### Fadv\_v1\_M2:

5' - ACTCGTAGGGAATAAACCGTgaagatattgaaagaattgatgtGSGACAGYGGGTKYTGGAC – 3' (64)

### **3.2 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 unikátní syntetická sekvence, která je složena z 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  $-20^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$  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'-CTCGTAGGGAATAAACCGTtattgtgaagaaagagaagaattTATACACACGCAATCACCAC- 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.

### 3.3 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).

### 3.4 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.**

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

### 3.5. Kvalitativní hodnocení

Kvalitativní hodnocení se provádí podle následující tabulky:

Cíl č.1 (hAdV)	Cíl č.2 (bAdV)	Cíl č.3 (pAdV)	Cíl č.4 (cAdV)	Cíl č.5 (fAdV)	IC	Celkový výsledek
Pozitivní (+)	Pozitivní (+)	Pozitivní (+)	Pozitivní (+)	Pozitivní (+)	Pozitivní (+)	Vzorek je pozitivní na přítomnost AdV (hAdV, bAdV, pAdV, cAdV, fAdV)
Pozitivní (+)	Pozitivní (+)	Pozitivní (+)	Pozitivní (+)	Pozitivní (+)	Negativní (-)	Vzorek je pozitivní na přítomnost adenovirů (hAdV, bAdV, pAdV, cAdV, fAdV) <sup>a</sup>



Pozitivní (+)	Pozitivní (+)	Pozitivní (+)	Pozitivní (+)	Negativní (-)	Pozitivní (+)	Vzorek je pozitivní na přítomnost hAdV, bAdV, pAdV, cAdV a negativní na přítomnost fAdV
Negativní (-)	Negativní (-)	Negativní (-)	Negativní (-)	Negativní (-)	Negativní (-)	Vzorek je falešně negativní <sup>b</sup>

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

<sup>a</sup> Vzorek je pozitivní na přítomnost detekovaného cíle, nicméně je negativní v případě interní kontroly. V tomto případě neproběhla reakce ideálním způsobem a je nutné izolovanou DBA 5× a 10× naředit, případně zopakovat izolaci DNA ze zásobního duplikátu, a detekční reakci zopakovat. Ředění je třeba vzít v potaz v rámci vyhodnocování výsledků celého analytického postupu.

<sup>b</sup> Vzorek je negativní na přítomnost detekovaného cíle i v případě interní kontroly. V tomto případě neproběhla reakce ideálním způsobem a je nutné izolovanou DNA 5× a 10× naředit, případně zopakovat izolaci DNA ze zásobního duplikátu, a detekční reakci zopakovat. Ředění je třeba vzít v potaz v rámci vyhodnocování výsledků celého analytického postupu.

### 3.6. Specificita

Systém byl testován na příbuzných izolátech AdV způsobujících respirační nemoci i gastrointestinální nemoci u lidí a zvířat: Human mastadenovirus F (CAPM V-662; hAdV; kmen: Dugan (79-18025)), Bovine atadenovirus (CAPM V-397; bAdV; kmen: 671130), Porcine mastadenovirus A (CAPM V-308; pAdV; kmen: neznámy), Canine mastadenovirus A (CAPM V-478; cAdV; kmen: Utrecht), Fowl aviadenovirus A (CAPM V-135; fAdV; kmen: Ote). Viry byly získány ze Sbírký zoopatogenních mikroorganismů (CAPM), případně z National Collection of Pathogenic Viruses (NCPV, UK).

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.

**Tabulka č.2 Detekce adenovirů na příbuzných izolátech**

Agens	Cíl č. 1	Cíl č. 2	Cíl č. 3	Cíl č. 4	Cíl č. 5
hAdV	0/4	4/4	0/4	0/4	0/4
bAdV	0/4	0/4	0/4	4/4	0/4

pAdV	0/4	0/4	4/4	0/4	0/4
cAdV	0/4	0/4	0/4	0/4	4/4
fAdV	4/4	0/4	0/4	0/4	0/4

### 3.7. Citlivost/limit detekce (LOD)

LOD je určena jako koncentrace, kterou je pomocí daného testu možné detekovat s 95% mírou pravděpodobnosti. Dle těchto parametrů byl LOD výše uvedeného systému stanoven na  $1 \times 10^0$  genomových ekvivalentů cílových agens/μl izolované DNA.

**Tabulka č.3 Stanovení limitu detekce systému**

Umělá kontaminace (množství stanoveno dle qPCR)	Počet pozitivních vzorků/ celkový počet analyzovaných vzorků
$10^5$	8/8
$10^4$	8/8
$10^3$	8/8
$10^2$	8/8
$10^1$	8/8
$10^0$	8/8

## 4. Srovnání „novostí postupů“

Uvedený systém je oproti dříve publikovaným inovativní svým vysokým stupněm multiplexu, schopného kombinovat detekci několika nezávislých cílů a interní kontroly. Tato kombinace tak umožňuje rychlý skrining vyšetřovaného vzorku na předpokládané spektrum patogenů, jejichž výskyt je vázaný na danou matici a současně umožňuje vyloučit falešně negativní výsledek v důsledku přítomnosti inhibitorů.

## 5. Uplatnění funkčního vzorku

Funkční vzorek je určen k rychlému skriningu a monitoringu výskytu indikátorů fekálního znečištění s přihlédnutím na potenciální výskyt dalších patogenních virových agens v různých typech vzorků (vzorky prostředí). Výsledky lze využít k posouzení nutnosti zavedení preventivních a kontrolních opatření. Uživatelem systému/výsledků získaných uplatněním budou laboratoře zabývající se diagnostikou onemocnění zvířat, lidí, případně další laboratoře zabývající se vyšetřováním surovin a potravin živočišného a rostlinného původu.

## 7. Seznam použité literatury

Barnadas C, Schmidt DJ, Fischer TK, Fonager J (2018) Molecular epidemiology of human adenovirus infections in Denmark, 2011-2016. *J Clin Virol* 104:16-22 doi:10.1016/j.jcv.2018.04.012

Buckwalter SP, Teo R, Espy MJ, Sloan LM, Smith TF, Pritt BS (2012) Real-time qualitative PCR for 57 human adenovirus types from multiple specimen sources. *J Clin Microbiol* 50(3):766-71 doi:10.1128/JCM.05629-11

Davison AJ, Benko M, Harrach B (2003) Genetic content and evolution of adenoviruses. *J Gen Virol* 84(Pt 11):2895-908 doi:10.1099/vir.0.19497-0

Ghebremedhin B (2014) Human adenovirus: Viral pathogen with increasing importance. *Eur J Microbiol Immunol (Bp)* 4(1):26-33 doi:10.1556/EuJMI.4.2014.1.2

Gonzales-Gustavson E, Rusinol M, Medema G, Calvo M, Girones R (2019) Quantitative risk assessment of norovirus and adenovirus for the use of reclaimed water to irrigate lettuce in Catalonia. *Water Res* 153:91-99 doi:10.1016/j.watres.2018.12.070

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

Olive M, Eisenlohr L, Flomenberg N, Hsu S, Flomenberg P (2002) The adenovirus capsid protein hexon contains a highly conserved human CD4+ T-cell epitope. *Hum Gene Ther* 13(10):1167-78 doi:10.1089/104303402320138952

Reslova N, Huvarova V, Hrdy J, Kasny M, Kralik P (2019) A novel perspective on MOL-PCR optimization and MAGPIX analysis of in-house multiplex foodborne pathogens detection assay. *Sci Rep* 9(1):2719 doi:10.1038/s41598-019-40035-5

Thierry S, Hamidjaja RA, Girault G, Lofstrom C, Ruuls R, Sylviane D (2013) A multiplex bead-based suspension array assay for interrogation of phylogenetically informative single nucleotide polymorphisms for *Bacillus anthracis*. *J Microbiol Methods* 95(3):357-65 doi:10.1016/j.mimet.2013.10.004

Zubieta Ch., Schoehn, Chroboczek J., Cusack (2005) The structure of the Human Adenovirus 2 Penton. *Molecular Cell* 17(1):121-135 [doi.org/10.1016/j.molcel.2004.11.041](https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.11.041)

Wyn-Jones AP, Carducci A, Cook N, D'Agostino M, Divizia M, Fleischer J, Gantzer C, Gawler A, Girones R, Holler C, Husman AMD, Kay D, Kozyra I, Lopez-Pila J, Muscillo M, Nascimento MS, Papageorgiou G, Rutjes S, Sellwood J, Szewzyk R, Wyer M (2011) Surveillance of adenoviruses and noroviruses in European recreational waters. *Water Research* 45(3):1025-1038 doi:10.1016/j.watres.2010.10.015

## **Dedikace**

Funkční vzorek byl vytvořen v rámci projektu Ministerstva zemědělství QK1810212.

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)