



FUNKČNÍ VZOREK

**Multiplexní systém pro stanovení vybraných zástupců
Protozoa u mláďat malých přežvýkavců
pomocí metody MOL-PCR**

**MVDr. Jiřina Marková, Ph.D.
Mgr. Nikol Reslová, Ph.D.
Mgr. Veronika Huvarová
Prof. MVDr. Břetislav Koudela, CSc.**

**5083
2022**

Funkční vzorek 5083/2022

**Multiplexní systém pro stanovení vybraných zástupců
Protozoa u mláďat malých přežvýkavců pomocí metody
MOL-PCR**

MVDr. Jiřina Marková, Ph.D.

Mgr. Nikol Reslová, Ph.D.

Mgr. Veronika Huvarová

Prof. MVDr. Břetislav Koudela, CSc.

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

Funkční vzorek byl vytvořen v rámci projektu Ministerstva zemědělství QK1910082

a MZE-RO0518.

2022

ISBN 978-80-7672-029-9

Obsah

1. Úvod	3
3. Vlastní popis metodiky funkčního vzorku a nároků na ochranu	4
3.1. Předmluva	4
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.....	6
3.2.3.1. Multiplexní oligonukleotidová ligace	6
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	9
8. Poděkování a dedikace	9
9. Seznam použité literatury	9

1. Úvod

Mláďata malých přežvýkavců mají na počátku svého života méně vyvinutou imunitu v porovnání s dospělými jedinci. Díky tomu jsou vnímavější na různé infekce, a to i na infekce parazitární. Mezi takové patří také protozoální parazité, jako jsou kokcidie rodu *Eimeria*, dále rod *Cryptosporidium* anebo *Giardia intestinalis*, kteří mohou způsobovat průjmy u jehňat a kůzlat [1]. Řada druhů rodu *Eimeria* je patogenních a působí vážná onemocnění zejména mladých zvířat, která v některých případech vedou až k úhynu postižených jedinců. Charakter onemocnění závisí na mnoha faktorech od množství požitých oocyst, stavu imunitního systému hostitele až po klimatické podmínky dané oblasti [2, 3]. Klinická forma onemocnění bývá zaznamenána nejčastěji u mláďat ve věku jeden až tři měsíce a ztráty na úhynech mohou přesáhnout i 50% [1, 3]. Kryptosporidie jsou velmi častou příčinou průjmů u mladých přežvýkavců ve stáří sedmi až čtrnácti dnů. K nákaze dochází fekálně-orální cestou požitím infikované potravy, vody anebo mléka kontaminovaného výkaly s oocystami. Může také dojít k autoinfekci v lumen střeva vedoucí k přetrvávajícím infekcím [1, 4]. Určení jednotlivých druhů kryptosporidií u zvířat za pomoci molekulárně biologických metod je významné zejména kvůli zoonotickému přenosu na člověka. Za jeden z druhů se zoonotickým potenciálem je považována také *Cryptosporidium parvum*, u níž je popisována malá hostitelská specifita a která byla potvrzena i u malých přežvýkavců [5]. *Giardia intestinalis* se přenáší také fekálně-orální cestou a cysty vylučované s výkaly kontaminují prostředí, vodu a potravu. K nákaze giardiemi může dojít v každém věku, ale mladá zvířata jsou náchylnější. Jehňata a kůzlata se nejčastěji nakazí velmi záhy zhruba do čtvrtého dne po narození a infekce přetrvává klidně i několik týdnů [6, 7]. Mezi další patogeny způsobující střevní infekce u mladých jedinců se řadí také *Salmonella enterica* nebo *Escherichia coli* [1].

Aby bylo možné cíleně diagnostikovat původce průjmových onemocnění mláďat malých přežvýkavců a zajistit tak efektivnější léčbu a profylaxi, je důležitý průkaz jednotlivých parazitů v závislosti na věku zvířat. Jednou z možností vyšetření širšího spektra patogenů v analyzovaném vzorku je použití polymerázové řetězové reakce (PCR) jako suspenzního pole, kde je fluorescenčně značený PCR produkt vizualizován připojením k magnetické mikrosféře díky unikátní sekvenci xTAG. Existuje řada modifikací, mezi něž patří také PCR s multiplexní oligonukleotidovou ligací (MOL-PCR), což umožňuje použití pouze jediného páru univerzálních primerů a usnadňuje tak optimalizaci celého testu [8].

Předkládaná metodika funkčního vzorku popisuje MOL-PCR diagnostiku zejména protozoálních parazitů vyvolávajících průjmy u mláďat malých přežvýkavců (*Eimeria* spp., *Cryptosporidium* spp., *Cryptosporidium parvum*, *Giardia intestinalis*) a dvou bakteriálních druhů *Salmonella enterica* a *Escherichia coli* (sérotyp O26). Celý diagnostický proces se děje na multiplexní molekulární úrovni v jedné reakci za použití platformy MagPix (Luminex Corp.).

2. Cíl metodiky funkčního vzorku

Cílem metodiky funkčního vzorku je využití specifických sekvencí DNA zejména k detekci vybraných protozoálních parazitů ve výkalech mláďat malých přežvýkavců a tím vytvoření detekčního multiplexního panelu pro platformu MagPix (Luminex Corp.).

3. Vlastní popis metodiky funkčního vzorku a nároků na ochranu

3.1. Předmluva

Diagnostický prostředek pro *in vitro* multiplexní detekci především protozoálních původců vyvolávajících průjmy u mláďat malých přežvýkavců (*Eimeria* spp., *Cryptosporidium* spp., *Cryptosporidium parvum*, *Giardia intestinalis*) a dvou bakteriálních druhů *Salmonella enterica* a *Escherichia coli* (sérotyp O26) využívá xMAP technologii (Luminex corporation, Texas, USA) na přístrojové platformě MagPix. Technologie xMAP je založena na třech po sobě jdoucích krocích a to 1. multiplexní oligonukleotidové ligační assay, 2. PCR s univerzálním párem primerů shodným pro všechny cíle a 3. na hybridizaci. Spojení těchto jednotlivých kroků umožňuje simultánní detekci více molekulárních cílů v široké škále matric, v tomto případě ve výkalech jehňat a kůzlat. Pro zajištění spolehlivosti navržený detekční systém obsahuje systém interní pozitivní kontroly sloužící k vyloučení PCR inhibice. Jedná se o přidání nukleové kyseliny o známé sekvenci do každého vzorku a její simultánní detekci spolu s ostatními detekčními cíli. Jako interní pozitivní kontrola (IPK) jednotlivých kroků analýzy je u každého vzorku použita nekompetitivní syntetická sekvence založená na DNA sekvencích dvou vyhynulých živočišných druhů [9]. Tato kontrolní syntetická sekvence byla syntetizována *de novo* a zaklonována do plazmidu. Použití přesně definovaného množství IPK tak zajišťuje kontrolu analytického postupu každého jednoho vyšetřovaného 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 ze suspenze výkalů jehňat a kůzlat za použití izolační soupravy Quick-DNA Fecal/Soil Microbe MiniPrep Kit (Zymo Research, Kalifornie, USA) podle protokolu od výrobce.

3.2.2. Návrh MOLigo sond (krátkých specifických oligonukleotidů)

Pro detekci jednotlivých zástupců protozoálních parazitů a dvou bakteriálních druhů způsobujících průjmy jehňat a kůzlat byly vybrány cílové geny se specifickými sekvencemi, které byly následně porovnány s referenčními sekvencemi těchto parazitů a bakterií dostupnými v databázi NCBI (National Center for Biotechnology Information). Dále byly v cílových unikátních sekvencích stanoveny dva krátké specifické a bezprostředně na sebe navazující oligonukleotidové úseky, které se staly základem pro tzv. MOLigo sondy. K identifikaci *Cryptosporidium* spp. byly designovány sondy pro úsek 18S rRNA genu, který umožňuje amplifikaci DNA a je shodný u všech druhů tohoto rodu [10]. Gen *gp60* (glykoprotein 60 kDa) byl zvolen pro detekci *Cryptosporidium parvum*. Tento gen se nachází na povrchu apikální oblasti invazivních stadií parazita a je hojně využívaným nástrojem pro subtypizaci [11]. K návrhu MOLigo sond na stanovení *Giardia intestinalis* ve vzorku byl využit konzervovaný lokus genu *Tef1* společný všem asamblážím *G. intestinalis* a kódující elongační faktor 1 alfa (ef1α) nezbytný pro biosyntézu proteinů [12]. U detekce *Eimeria* spp. bylo využito genu pro mitochondriální cytochrom c oxidázu podjednotka I (COI) [13]. Pro bakterii

Salmonella enterica byl zvolen gen *ttrC*, který je součástí lokusu *ttrRSBCA* nacházející se v blízkosti ostrova patogenity 2 a kódující mimo genu *ttrC* i geny *ttrA*, *ttrB*, *ttrS* a *ttrR* [14] a pro detekci *Escherichia coli* sérotyp O26 byl jako detekovaný cíl využit chromozomální gen *wzy* kódující O-antigen polymerázu. Tento gen je zodpovědný za antigenní variabilitu na povrchu buněk, podle které byly rozlišeny různé sérotypy O [15]. Všechny páry MOLigo sond obsahují také stejnou sekvenci pro hybridizaci univerzálních primerů (Forward - Fw a Reverse - Rw). Jedna z MOLigo sond navíc vlastní jedinečnou 24 bazickou DNA sekvenci zvanou xTAG (Luminex corporation; <https://www.luminexcorp.com/magplex-tag-microspheres/>), kterou produkty PCR hybridizují k anti-TAG sekvenci na povrchu magnetické mikrosféry. Specifická sekvence MOLigo sond pro daný cíl - část 1 a část 2 byly testovány pomocí nástroje OligoAnalyzer 3.1 (<https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>) za účelem identifikace vlastností jako je teplota tání, vlásenky, tvorba dimerů aj. 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 jsou uvedeny v tabulce 1.

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

Patogen	Cíl	Název	Sekvence 5'-3'	TAG	Mikro sféry
<i>Cryptosporidium</i> spp.	18S rRNA	Cryp_sp6_18S_M1 Cryp_sp6_18S_M2	Pho- <u>CGGTAGGGTATTGGCCTACTCTCACTTCTTACTACCGCG</u> <u>ACTCGTAGGGAATAAACCGT</u> ttgtgatagtagtagatattgtCAAGTT TCTGACCTATCAGCTTTAGA	39	39
<i>Cryptosporidium parvum</i>	gp60	CPa_gp60_M1_2 CPa_gp60_M2_2	Pho- <u>TTTCAGCACTCTCTGCTAATTCTCACTTCTTACTACCGCG</u> <u>ACTCGTAGGGAATAAACCGT</u> tatgaatgttattgtgtgttattAAATCA AGGTTAACGGTCAGGA	48	48
<i>Giardia intestinalis</i>	tef1	GI_spp_M1 GI_spp_M2	Pho- <u>CCGTCGTCCATCTTGTGTGATCTCACTTCTTACTACCGCG</u> <u>ACTCGTAGGGAATAAACCGT</u> gttgtaaatttagtaaagaagtaCCTTC GAGTACTTGACCTGG	15	30
<i>Eimeria</i> spp.	COI	EimeSp_COI_M1 EimeSp_COI_M2	Pho- <u>TACTGCTATTATGTTAATTGGTACACTCTCACTTCTTACTACCGCG</u> <u>ACTCGTAGGGAATAAACCGT</u> gataagaaagtgaatgtaaattgTATTC ACTTGGGCAATAGTCTT	51	51
<i>Salmonella enterica</i>	<i>ttrC</i>	SE_M1 SE_M2	Pho- <u>AACCGTCCCCAAGTTCAACTCTCACTTCTTACTACCGCG</u> <u>ACTCGTAGGGAATAAACCGT</u> gtatgttgaatgtattaagaagTGGAC ATTGTTGATTCAGGTACA	25	55
<i>Escherichia coli</i> O26:H11	<i>wzy</i>	EC26_M1 EC26_M2	Pho- <u>CGTATTTTCACCACTACTTTTCTCACTTCTTACTACCGCG</u> <u>ACTCGTAGGGAATAAACCGT</u> gatagatttagaatgaattaagtgTCTCG CTAATGTTATTTCTTTC	28	18
Interní kontrola	aDNA	IC_2_M1 IC_2_M2	Pho- <u>ATTAGCACAATGAATAATCATCGTCTCACTTCTTACTACCGCG</u> <u>ACTCGTAGGGAATAAACCGT</u> attgtgaaagaagaagaattTATA CACACGCAATCACCAC	14	36
Forward primer		uni FW	CGCGGTAGTAAGAAGTGAGA		
Reverse primer		uni REV	BODIPY-TMRX-ACTCGTAGGGAATAAACCGT		

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

3.2.3. Postup provedení MOL-PCR reakce

3.2.3.1. Multiplexní oligonukleotidová ligace

Množství jednotlivých složek pro multiplexní ligační směs bylo optimalizováno a výsledná směs připravena podle množství uvedených v tabulce 2 do konečného objemu 25 μ l na reakci. Ligační reakce probíhala v termocykleru (DNA Engine Dyad, Bio-Rad, Foster City, CA, USA) dle protokolu s počáteční 10 minutovou denaturací při 95 ° C následovanou 20 cykly (30 s při 95 ° C a 60 s při 59 ° C). Ligační produkty byly uchovány při teplotě 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 $\times$ doplnit objem	
10X Hifi <i>Taq</i> DNA Ligase Reaction Buffer (NEB)	2,5 μ l	250 μ l	1X
MOLigo sondy Cryp_sp6_18S_M1 a Cryp_sp6_18S_M2 pro cíl (1 pmol/ μ l každá)	1 $\times$ 0,5 μ l (M1) 1 $\times$ 0,125 μ l (M2)	1 $\times$ 500 μ l 1 $\times$ 12,5 μ l	20 nM (M1) 5 nM (M2)
MOLigo sondy CPa_gp60_M1_2 a CPa_gp60_M2_2 pro cíl (1 pmol/ μ l každá)	2 $\times$ 0,125 μ l	2 $\times$ 12,5 μ l	5 nM každá
MOLigo sondy GI_spp_M1 a GI_spp_M2 pro cíl (1 pmol/ μ l každá)	2 $\times$ 0,125 μ l	2 $\times$ 12,5 μ l	5 nM každá
MOLigo sondy EimeSp_COI_M1 a EimeSp_COI_M2 pro cíl (1 pmol/ μ l každá)	2 $\times$ 0,125 μ l	2 $\times$ 12,5 μ l	5 nM každá
MOLigo sondy SE_M1 a SE_M2 pro cíl (1 pmol/ μ l každá)	2 $\times$ 0,125 μ l	2 $\times$ 12,5 μ l	5 nM každá
MOLigo sondy EC26_M1 a EC26_M2 pro cíl (1 pmol/ μ l každá)	2 $\times$ 0,125 μ l	2 $\times$ 12,5 μ l	5 nM každá
MOLigo sondy IC_2_M1 a IC_2_M2 pro IC (1 pmol/ μ l každá)	2 $\times$ 0,125 μ l	2 $\times$ 12,5 μ l	5 nM každá
IC plazmid 0,75ng/ μ l	0,1 μ l	10,0 μ l	
Hifi <i>Taq</i> DNA Ligase (NEB)	0,5 μ l	50 μ l	
UNG (Roche)	0,2 μ l	20 μ l	
Carrier DNA z rybích spermií (Serva Electrophoresis, kat.č.1858001) 50 ng/ μ l	1 μ l	100 μ l	
DNA	2,5 μ l	100 $\times$ 2,5 μ l	
celkem	25 μ l	2500 μ l	

3.2.3.2. PCR reakce s univerzálním párem primerů

Pro amplifikaci produktů ligace byl namíchán premix podle množství uvedených v tabulce 3 v konečném objemu 24 μ l. Do připravených zkumavek s 18 μ l PCR premixu bylo přidáno 6 μ l ligačních produktů (poměr 1:3). PCR protokol pro tuto reakci s univerzálním párem primerů:

počáteční denaturace při 95 °C po dobu 2 minut, 40 cyklů (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 (NEB)	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

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

Směs těchto mikrosfér byla pipetována do 0,2 ml stripů (BIOplastics, Landgraaf, Nizozemsko) v objemu 5 µl na vzorek. Poté bylo přidáno 10 µl PCR produktů z předchozího kroku. Připravené stripy s kuličkovým mixem a PCR produkty byly vloženy do termocykleru s hybridizačním 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 hybridizovanými produkty a analyzačním pufrem byly umístěny na 0,2 ml stojánek Multi Rack (Bioplastics) a podrobeny analýze v přístroji MAGPIX (Bio-Plex MAGPIX, Bio-Rad) pomocí xPONENT 4.2.® SOFTWARE (Luminex, Austin, TX, USA).

Tabulka 4 Složení kuličkového mixu

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 MagPlex® Microspheres potažených anti-TAG	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) byla odečtena hodnota MFI příslušné negativní kontroly (NTC) pro daný region mikrosfér. Vzorek byl vyhodnocen jako pozitivní, pokud byla výsledná hodnota (P) vyšší než 200 MFI a poměr mezi pozitivním a negativním vzorkem vyšší než 4.

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

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

4. Vyhodnocení funkčnosti systému

Specifita MOLigo sond navržených pro jednotlivé protozoální parazity byla stanovována na DNA třinácti různých druhů kryptosporidií (*C. andersoni*, *C. bovis*, *C. hominis*, *C. proliferans*, *C. meleagridis*, *C. ryanae*, *C. chipmunk* I., *C. ornithophilus*, *C. tyzzeri*, *C. galli*, *C. ferret*, *C. bailey*, *C. ubiquitum*) poskytnutých z parazitologického ústavu Biologického centra AV ČR v. v. i. v Českých Budějovicích. Dále byla použita genomická DNA (gDNA) zakoupená z American Type Culture Collection (ATCC) a to kvantitativní gDNA *Cryptosporidium parvum* (ATCC PRA-67DQ) a *Giardia intestinalis* Portland-1 (ATCC 30888). Specifita MOLigo sond pro *Eimeria* spp. byla testována na DNA ze suspenze patogenních druhů kokcií *E. crandalis*, *E. ahsata* a *E. ovinoidalis* získaných z jehněčích výkalů a *E. arloingi*, *E. ninakohlyakimovae* ze vzorků kůzlečích výkalů poskytnutých z chovu soukromého chovatele a druhově určených na oddělení parazitologie na VETUNI v Brně. MOLigo sondy pro dva bakteriální druhy byly zařazeny do systému pro detekci protozoálních parazitů z důvodu lepší optimalizace zvoleného diagnostického panelu a byly testovány na ověřených kmenech ze sbírky zoopatogenních mikroorganismů Výzkumného ústavu veterinárního lékařství v. v. i. v Brně: *Escherichia coli* CAPM 5358 (sérotyp O26) a *Salmonella enterica* subs. *enterica* CAPM 5445 (sérovar Typhimurium). Nebyla zjištěna žádná interakce mezi jednotlivými sondami. Specifita převzatých univerzálních primerů se ověřovala na 13-ti genotypech *Bacillus anthracis* [16] a také na 11-ti sérotypech *Escherichia coli* (STEC) [17].

5. Srovnání novosti postupů

Představený funkční vzorek založený na multiplexní oligonukleotidové ligační eseji, PCR s jedním párem univerzálních primerů a hybridizaci na magnetické kuličky je oproti dříve publikovaným postupům inovativní vysokým stupněm multiplexu. Tato metoda je schopna kombinovat detekci několika nezávislých cílů (až 50 na jednu reakci) včetně interní kontroly. To umožňuje rychlý skrínink vyšetřovaného vzorku, v našem případě výkalů jehňat a kůzlat na předpokládané spektrum patogenů (*Eimeria* spp., *Cryptosporidium* spp., *Cryptosporidium parvum*, *Giardia intestinalis*, *Escherichia coli* (sérotyp O26) a *Salmonella enterica*). Současně systém umožňuje vyloučit falešně negativní výsledek v důsledku přítomnosti inhibitorů. Na základě rychlé a spolehlivé kvalitativní detekce je následně možné vybrané pozitivní vzorky podrobit cílené kvantifikační analýze pomocí real-time qPCR a stanovit tak množství sledovaných patogenů ve vyšetřované matrici.

6. Uplatnění funkčního vzorku

Funkční vzorek představuje simultánní multiplexní detekční metodu, která je určena především ke skríninku a monitoringu výskytu vybraných protozoálních parazitů a dvou bakterií způsobujících průjem u mláďat malých přežvýkavců (jehňat a kůzlat). Funkční vzorek je určen zejména pro diagnostické laboratoře a výzkumné ústavy s možným přesahem do chovatelské praxe. Součástí funkčního vzorku jsou uvedené protokoly umožňující rutinní detekci vybraných protozoálních parazitů a také bakterií ve výkalech jehňat a kůzlat na molekulární úrovni pomocí platformy MagPix (Luminex Corp.). Metody qPCR pomocí TaqMan a SybrGreen sond a Luminex xTAG jsou v současnosti ve velkém popředí vědeckého zájmu. Tyto metody se jeví jako jedny z velmi perspektivních diagnostických metod, ať už pro jejich citlivost či specifčnost detekce. Rychlá simultánní multiplexní detekční metoda je

jednou z efektivních cest jak identifikovat nemocný kus ve stádě. Díky tomu mohou být v chovu co nejrychleji vytvořena potřebná opatření pro zabránění dalšího šíření onemocnění.

7. Ekonomické aspekty

Diagnosticky vybavená laboratoř vynaloží náklady spojené s analýzami zejména na syntézu oligonukleotidů, pořízení spotřebního materiálu, pořízení souprav k extrakci DNA, chemikálií a enzymů pro ligační esej, pro PCR reakci a hybridizaci včetně magnetických mikrosfér. Pořízení přístroje Bio-Plex MAGPIX Multiplex Reader pak představuje jednorázovou investici (kolem 700.000 – 800.000 Kč) s přihlédnutím k dostupnosti produktu na trhu a jeho případným modernizacím. Cena materiálu na vyšetření jednoho vzorku v duplikátu se pohybuje kolem 700 Kč (bez DPH). Při zavedení funkčního vzorku do diagnostické praxe se však ušetří náklady spojené s analýzou vzhledem k její komplexnosti. Úspora nákladů je tedy reálná, protože komplexní vyšetření vzorku v jedné reakci představuje vždy výhodu ve srovnání s prováděním jedno druhově cílených vyšetření.

Z důvodu nižší přirozené odolnosti jsou jehňata a kůzlata více vnímavá na infekce různého původu, mimo jiné také na infekce parazitární. Komplexní a rychlý průkaz jednotlivých parazitů (příp. bakterií) v závislosti na věku zvířat tedy přispívá k cílenější diagnostice onemocnění mláďat, k efektivnějším způsobům léčby a k lepší prevenci průjmových či dalších infekčních onemocnění. To vše vede v širším měřítku ke zlepšení ekonomiky chovu.

8. Poděkování a dedikace

Rádi bychom poděkovali panu prof. Ing. Martinu Kváčovi, Ph.D. z parazitologického ústavu Biologického centra AV ČR v. v. i. v Českých Budějovicích za poskytnutí vzorků DNA kryptosporidií a MVDr. Markétě Reichelové za bakteriální kmeny ze sbírky zoopatogenních mikroorganismů Výzkumného ústavu veterinárního lékařství v. v. i. v Brně.

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

9. Seznam použité literatury

1. Underwood, W.J., et al., *Biology and Diseases of Ruminants (Sheep, Goats, and Cattle)*. Laboratory Animal Medicine. 2015:623-94. doi: 10.1016/B978-0-12-409527-4.00015-8. Epub 2015 Jul 10.
2. Reeg, K.J., et al., *Coccidial infections in housed lambs: oocyst excretion, antibody levels and genetic influences on the infection*. Vet Parasitol, 2005. **127**(3-4): p. 209-19.
3. Abo-Shehada, M.N. and H.A. Abo-Farieha, *Prevalence of Eimeria species among goats in northern Jordan*. Small Ruminant Research, 2003. **49**(2): p. 109-113.
4. Delafosse, A., et al., *Herd-level risk factors for Cryptosporidium infection in dairy-goat kids in western France*. Prev Vet Med, 2006. **77**(1-2): p. 109-21.
5. Ryan, U.M., et al., *Taxonomy and molecular epidemiology of Cryptosporidium and Giardia - a 50 year perspective (1971-2021)*. International Journal for Parasitology, 2021. **51**(13-14): p. 1099-1119.
6. Smith, H.V., et al., *Cryptosporidium and Giardia as foodborne zoonoses*. Vet Parasitol, 2007. **149**(1-2): p. 29-40.

7. Olson, M.E., et al., *Effects of giardiasis on production in a domestic ruminant (lamb) model*. Am J Vet Res, 1995. **56**(11): p. 1470-4.
8. 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.
9. Mikel, P., et al., *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, 2016. **7**.
10. Xiao, L.H., et al., *Phylogenetic analysis of Cryptosporidium parasites based on the small-subunit rRNA gene locus*. Applied and Environmental Microbiology, 1999. **65**(4): p. 1578-1583.
11. Xiao, L.H., *Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: An update*. Experimental Parasitology, 2010. **124**(1): p. 80-89.
12. Abe, N. and I. Teramoto, *Molecular evidence for person-to-person transmission of a novel subtype in Giardia duodenalis assemblage B at the rehabilitation institution for developmentally disabled people*. Parasitology Research, 2012. **110**(2): p. 1025-1028.
13. Al-Habsi, K., et al., *Morphological and molecular characterization of three Eimeria species from captured rangeland goats in Western Australia*. Veterinary parasitology, regional studies and reports, 2017. **9**: p. 75-83.
14. Malorny, B., et al., *Diagnostic real-time PCR for detection of Salmonella in food*. Applied and Environmental Microbiology, 2004. **70**(12): p. 7046-7052.
15. DebRoy, C., et al., *Detection of Escherichia coli serogroups O26 and O113 by PCR amplification of the wzx and wzy genes*. Applied and Environmental Microbiology, 2004. **70**(3): p. 1830-1832.
16. 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.
17. 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).



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