

Vytvořil:
SÚJCHBO, v.v.i.

Certifikovaná metodika

Označení metodiky:
B2/MOLB/070

**Průkaz přítomnosti genetického materiálu *Brucella abortus*,
B. melitensis a *B. suis* pro potřeby kontroly zákazu biologických
zbraní pomocí real-time PCR s následným odlišením pomocí HRM
analýzy**

Mgr. Martina Grochová
Ing. Karel Bílek, Ph.D.
Mgr. Kateřina Rosenbergová, Ph.D.

Realizační výstup projektu MV ČR „Vývoj nových metodik pro detekci biologických agens v oblastech souvisejících s dodržováním Úmluvy o zákazu biologických zbraní“ číslo: VI20172019063.

Oponenti: MVDr. Jaroslav Bzdil, Ph.D.
Ing. Miroslava Zichová, Ph.D.

květen 2018

Obsah

1.	CÍL METODIKY	3
2.	VLASTNÍ POPIS METODIKY	3
2. 1.	Charakteristika rodu <i>Brucella</i>	3
2. 2.	Laboratorní diagnostika brucelóz	6
2. 3.	Vlastní metoda	7
2. 3. 1.	Referenční vzorek	8
2. 3. 2.	Opatření pro manipulaci s infekčním materiálem	10
2. 3. 3.	Izolace DNA ze vzorku	10
2. 3. 4.	qPCR	10
2. 3. 5.	Pracovní postup a opatření pro manipulaci s materiálem	11
2. 3. 6.	Vyhodnocení analýzy	13
2. 3. 7.	Validace a limity reakce	16
3.	INOVAČNÍ ASPEKTY, NOVOST POSTUPŮ	18
4.	POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY	19
5.	LITERATURA	20

1. CÍL METODIKY

Hlavním cílem metodiky je poskytnout zejména inspektorům Státního úřadu pro jadernou bezpečnost (SÚJB) vhodnou metodiku pro průkaz přítomnosti genetického materiálu bakterií *Brucella abortus*, *B. melitensis* a *B. suis* ve vzorcích získaných při kontrole dodržování zákazu biologických zbraní.

Metodika se cíleně zaměřuje:

- na možnost detekce a identifikace bakterií *B. abortus*, *B. melitensis* a *B. suis* např. v neznámých terénních vzorcích;
- na specifické odlišení tří cílových bakterií;
- na použitelnost pro široký rozsah vzorků;
- na rychlou analýzu s jasnou interpretací výsledků pro zaškolený personál.

2. VLASTNÍ POPIS METODIKY

2.1. Charakteristika rodu *Brucella*

Rod *Brucella* je řazen mezi α -proteobakterie a zahrnuje druhy uvedené v Tab. I i s jejich přirozenými hostiteli. Genom brucel dosahuje velikosti přibližně 3,3 Mbp a je tvořen dvěma cirkulárními chromozomy o velikostech 2,1 Mbp a 1,2 Mbp (Seleem *et al.*, 2010). Poprvé byl zástupce rodu *Brucella*, konkrétně *B. melitensis*, izolován roku 1886 Brucem ze sleziny britského vojáka, který zemřel na horečnaté onemocnění, zvané maltská horečka (Beneš *et al.*, 2009; Seleem *et al.*, 2010). V roce 1895 zjistil dánský veterinář Bang, že potraty hovězího dobytka jsou způsobeny *B. abortus*, původcem tzv. Bangovy choroby lidí (Beneš *et al.*, 2009). Za původce potratů u prasat byla Traumem roku 1914 označena *B. suis*. Příbuznost mezi patogeny byla potvrzena až ve 20. letech 20. století a celý rod byl pojmenován dle Bruceho.

Tab. I: Jednotlivé druhy brucel a jejich hostitelé (Bednář *et al.*, 1996; Whatmore *et al.*, 2016)

Agens	Hostitel	Charakteristika
<i>B. abortus</i>	hovězí dobytek	klasické druhy
<i>B. melitensis</i>	ovce, kozy	
<i>B. suis</i>	prasata, zajíci, jeleni	
<i>B. canis</i>	psi	
<i>B. ovis</i>	ovce	
<i>B. neotomae</i>	hlodavci	
<i>B. pinnipedialis</i>	ploutvonožci	mořské druhy
<i>B. ceti</i>	kytovci	
<i>B. microti</i>	hraboši; (Scholz <i>et al.</i> , 2008)	nově přidané druhy
<i>B. papionis</i>	paviáni; (Whatmore <i>et al.</i> , 2014)	
<i>B. vulpis</i>	lišky; (Scholz <i>et al.</i> , 2016)	
<i>B. inopinata</i>	neuveđen; prsní implantát; (Scholz <i>et al.</i> , 2010)	

Z epidemiologického hlediska se jedná o původce jedné z celosvětově nejvýznamnějších zoonóz. Mezi země s endemickým výskytem patří např. Francie, Izrael a většina Latinské Ameriky, naopak nová ohniska výskytu vznikají zejména na Středním či Blízkém východě (Pappas *et al.*, 2006). Protože se jedná o onemocnění hospodářsky významných zvířat, může mít jejich rozšíření zásadní dopad na ekonomiku státu. V ČR byly brucelózy před eradikací spojeny pouze s výskytem *B. abortus* u hovězího dobytka (Beneš *et al.*, 2009). V současnosti se humánní brucelózy v ČR týkají jen importovaných nálezů, i když se *B. suis* vyskytuje u divokých zvířat, hlavně u zajíců.

Brucely tvoří aerobní či mikroaerofilní gramnegativní nesporulující kokobacily, nacházející se jako normální flóra močového a gastrointestinálního traktu u koz, prasat, krav a psů (Delost, 1997). Brucely vyvolávají potraty u ovcí a koz (*B. melitensis*), krav (*B. abortus*) a prasat (*B. suis*) (Pappas *et al.*, 2006). Dle kombinace růstových charakteristik, biochemických vlastností či sérotypu je možno tato agens rozlišit dále na biovary – sedm u *B. abortus*, pět u *B. suis* a tři u *B. melitensis* (Whatmore *et al.*, 2016). U člověka jsou zejména tyto tři druhy schopny vyvolat často chronické onemocnění, *B. canis* pak jen velmi zřídka. V nedávné době byly zaznamenány dva případy lidské neurobrucelózy, u nichž byla jako původce označena *B. neotomae* izolovaná z mozkomíšního moku (Suarez-Esquivel *et al.*, 2017).

Tito obligátní intracelulární parazité napadají retikuloendotelový systém. Konkrétně napadají makrofágy, v kterých se množí, a které roznášejí patogen po celém těle, hlavně do lymfatických

uzlin, sleziny, jater a kostní dřeně (Bednář *et al.*, 1996; Beneš *et al.*, 2009). Navíc aktivují mechanismy, které brání makrofágu v usmrcení patogena. Inkubační doba humánní brucelózy je 2-4 týdny. *B. abortus* způsobuje u lidí tzv. Bangovu chorobu projevující se mírným, ale chronickým průběhem, kdy je napaden pohybový aparát (Beneš *et al.*, 2009). Letalita se pohybuje v rozmezí 1-2 %. *B. melitensis* vyvolává tzv. maltskou horečku, která je charakterizována závažnějším průběhem s různými orgánovými komplikacemi, jako jsou encefalitida, meningitida, artritida, spondylitida a další. Jednu z nejvážnějších komplikací představuje endokarditida (Seleem *et al.*, 2010). Nemoc zpočátku probíhá akutní formou a postupně přechází do chronicity (Beneš *et al.*, 2009). Letalita dosahuje 5-10 %. Onemocnění způsobené *B. suis* je sice vzácnější než dříve zmíněné choroby, avšak jeho průběh je nejzávažnější. Může dojít k tvorbě abscesů v játrech, slezině a dalších orgánech. Letalita je 30-50 %.

Atenuované kmeny *B. melitensis* Rev. 1 a *B. abortus* S19 způsobují také onemocnění člověka, které ale trvá kratší dobu a jeho průběh je benigní (Seleem *et al.*, 2010). Člověk se může nakazit přímým kontaktem s infikovanými zvířaty či požitím nepasterizovaných mléčných produktů. Prevence před nákazou je proto založena na likvidaci zvířecí brucelózy (Beneš *et al.*, 2009). Humánní vakcíny *B. abortus* kmenů 19-BA a 104M jsou sice k dispozici v Číně a v zemích bývalého SSSR, ale nejsou příliš bezpečné a efektivní (Beneš *et al.*, 2009; Perkins *et al.*, 2010). Nejblíže příbuzní rodu *Brucella*, *Ochrobactrum anthropi* a *O. intermedium*, spadají mezi půdní bakterie, které u imunodeficientních osob mohou vyvolat oportunní infekce, ale na rozdíl od brucel se nemnoží intracelulárně (Whatmore *et al.*, 2016).

B. abortus, *B. melitensis* a *B. suis* jsou agens uvedená na seznamu přílohy č. 1 k vyhlášce č. 474/2002 Sb.¹ zákona č. 281/2002 Sb.² Jedná se tedy o i vysoce riziková biologická agens, a proto je právě tato metodika zaměřena právě na jejich identifikaci. Důvodem pro zařazení mezi vysoce riziková agens je možnost jejich zneužití k vývoji nebo výrobě biologické zbraně, čemuž nahrává nízká infekční dávka čítající přibližně 10-100 bakterií (Pappas *et al.*, 2006). Z hlediska bioterorismu představuje nejvýznamnější cestu přenosu na člověka vzdušný přenos aerosolem. Jsou známy vojenské testy s brucelami v Japonsku před a v průběhu druhé

¹ Dne 22. 11. 2017 vyšla ve Sbírce zákonů, v částce 133, vyhláška č. 379/2017 Sb., kterou se mění vyhláška č. 474/2002 Sb., kterou se provádí zákon č. 281/2002 Sb., o některých opatřeních souvisejících se zákazem bakteriologických (biologických) a toxinových zbraní a o změně živnostenského zákona, ve znění vyhlášky č. 74/2013 Sb.

² Dne 18. 8. 2017 vyšel ve Sbírce zákonů, v částce 89, zákon č. 253/2017 Sb., kterým se mění zákon č. 281/2002 Sb., o některých opatřeních souvisejících se zákazem bakteriologických (biologických) a toxinových zbraní a o změně živnostenského zákona, ve znění pozdějších předpisů.

světové války, stejně jako výroba prvních bomb naplněných brucelami v 50. letech v USA (Christopher *et al.*, 2005; Pappas *et al.*, 2006).

2. 2. Laboratorní diagnostika brucelóz

Přímý průkaz brucel probíhá izolací agens z krve, kostní dřeně, lymfatických uzlin či mozkomíšního moku, ve veterinární medicíně pak zejména z pohlavních orgánů, sleziny či jater. Mezi vhodná kultivační média patří Castanedovo dvoufázové medium, hemokultivace za pomoci membránových filtrů či kultivace ve žloutkovém vaku kuřecích embryí (Bednář *et al.*, 1996). Kultivace je ovšem časově náročná technika a záchyt tohoto patogena je obtížný (Beneš *et al.*, 2009). Jinou přímou technikou je molekulární analýza prostřednictvím PCR, častěji je však využívána ve veterinární diagnostice než v humánní, i když se jedná o rychlou a velmi citlivou metodu (Beneš *et al.*, 2009; Seleem *et al.*, 2010). Pro identifikaci na druhové úrovni představují vhodné analýzy tzv. „Bruce-ladder“ založený na end-point PCR (Kang *et al.*, 2011; Lopez-Goni *et al.*, 2008) či analýza tandemových repetitivních MLVA (*Multiple Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis*) (Whatmore *et al.*, 2006). Dále je možno použít i metody založené na real-time PCR spojené s analýzou křivek tání s vysokým rozlišením, která umožní diferenciaci mezi jednotlivými druhy (Gopaul *et al.*, 2014; Winchell *et al.*, 2010).

Nepřímé sérologické metody jsou pak většinou zaměřeny na detekci protilátek a vynikají vysokou citlivostí a rychlostí (aglutinační testy), ale nižší specificitou a možností falešně negativních, ale i falešně pozitivních výsledků (Beneš *et al.*, 2009; Pappas *et al.*, 2006). V případě sérologických testů také může dojít ke zkřížené reakci s protilátkami proti lipopolysacharidu jiných bakterií, např. *Francisella tularensis* (Beneš *et al.*, 2009). Mezi testy využívající aglutinaci patří sklíčková aglutinace RBT (Rose Bengal Test), latexová aglutinace nebo hemaglutinace (Bednář *et al.*, 1996; Mantur *et al.*, 2014). Mezi další metody diagnostiky se řadí detekce protilátek pomocí nepřímé imunofluorescence, nepřímá sendvičová ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) či komplement fixační test (Bednář *et al.*, 1996; Ducrotoy a Bardosh, 2017).

2. 3. Vlastní metoda

Metodika je navržena pro detekci bakterií rodu *Brucella* uvedených ve vyhlášce č. 474/2002 Sb.³ tak, aby cílové bakterie, tj. *B. abortus*, *B. melitensis* a *B. suis*, bylo navíc možno od sebe odlišit. Detekce probíhá na bázi real-time PCR (Polymerase Chain Reaction; polymerázová řetězová reakce) s následnou diferenciací amplifikovaných produktů prostřednictvím analýzy křivek tání s vysokým rozlišením (HRM; High Resolution Melting). HRM analýza bezprostředně navazuje na amplifikační část PCR bez nutnosti další manipulace se vzorkem a umožňuje detailní rozlišení ampliconů na základě rozdílnosti jejich sekvence. V průběhu HRM analýzy dochází k postupnému zvyšování teploty a snímání fluorescenčního signálu. V bodě, kdy dvouvláknový amplicon disociuje na jednovlákná, je zaznamenán pokles fluorescenčního signálu a tento je po derivaci zobrazen do podoby píku. Metodika využívá pro detekci čtyři různá cílová místa v genomu příslušných brucel, kam byly navrženy zcela nové primery:

- 1) delece 7 bp v genomech *B. abortus* a *B. melitensis* (ozn. jako lokus dAM)

Cílové místo nalezeno uvnitř sekvence PCR produktu o délce 759 bp (Kang *et al.*, 2011).

- 2) Jednobodový polymorfismus (SNP; *Single Nucleotide Polymorphism*) C u *B. abortus*, ve stejném místě SNP T u *B. melitensis* (ozn. jako lokus MEL, resp. MEL abo-diff, MEL mel-diff)

Cílové místo nalezeno v genu pro protein E při studiu oblasti GI3 (Wattam *et al.*, 2014).

- 3) SNP A u *B. suis* a *B. canis*, ve stejném místě SNP G u dalších brucel (ozn. jako lokus SU+CAN)

Cílové místo nalezeno uvnitř sekvence PCR produktu o délce 1682 bp (Lopez-Goni *et al.*, 2008).

- 4) delece 12 bp u *B. canis* (ozn. jako lokus CAN, resp. CAN su-diff, CAN can-diff)

Bylo využito cílové místo uvnitř sekvence PCR produktu o délce 300 bp (Kang *et al.*, 2014). Přítomnost delece v cílovém místě umožňuje odlišení mezi *B. suis* bv. 1-4 a *B. canis*.

³ Dne 22. 11. 2017 vyšla ve Sbírce zákonů, v části 133, vyhláška č. 379/2017 Sb., kterou se mění vyhláška č. 474/2002 Sb., kterou se provádí zákon č. 281/2002 Sb., o některých opatřeních souvisejících se zákazem bakteriologických (biologických) a toxinových zbraní a o změně živnostenského zákona, ve znění vyhlášky č. 74/2013 Sb.

Metodika je validována v provedení dvou samostatných reakcí ve formě duplexu při shodném nastavení přístroje. První duplex sestává z lokusů dAM a SU+CAN, druhý pak z lokusů MEL a CAN. Jednotlivé lokusy jsou umístěny uprostřed amplifikované sekvence. Metodika je zpracována v souladu s minimálními požadavky pro publikace experimentů založených na kvantitativní real-time PCR (Bustin *et al.*, 2009), tzv. MIQE (*Minimal Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*) doporučeními, které jsou přílohou metodiky.

2. 3. 1. Referenční vzorek

Metodika byla prakticky ověřena za použití kmenů v Tab. II, Tab. III,

Tab. IV a Tab. V.

Tab. II: *B. abortus* – použité kmeny

<i>B. abortus</i>		
Číslo kmene	Původ	Biovar
CNCTC 46/53		-
CNCTC 63/53		-
CNCTC 73/59		-
CNCTC 74/56		-
CNCTC 76/57		-
CNCTC 6/66	SZÚ Praha	-
CNCTC 5/53		-
CNCTC 12/53		-
CNCTC 13/53		-
CNCTC 15/53		-
CAMP 5520		-
CAMP 5660T	VÚVeL Brno	1
A104-10		3
A146-10	RKI Německo	-

Tab. III: *B. melitensis* – použité kmeny

<i>B. melitensis</i>		
Číslo kmene	Původ	Biovar
CNCTC 4/56		-
CTCTC 7/68 T		1
CNCTC 8/88	SZÚ Praha	-
CNCTC 9/88		-
CNCTC 10/88		-
A146-13		-
A104-11		1
A104-12	RKI Německo	2
A104-13		3
A148-9		3
A148-10		1
NCTC 8223	NCTC Velká Británie	1
NCTC 10508		2
NCTC 10509		3

Tab. IV: *B. suis* – použité kmeny

<i>Brucella suis</i>		
Číslo kmene	Původ	Biovar
CAMP 6073T	VÚVeL Brno	1
CAMP 6074		2
CNCTC 19/88	SZÚ Praha	-
A104-14		2
A101-7	RKI Německo	2
A479-1		2
NCTC 10511		3
NCTC 10385	NCTC Velká Británie	4
NCTC 11996		5

Tab. V: *B. canis* – použité kmeny

<i>Brucella canis</i>	
Číslo kmene	Původ
CNCTC 1/74T	
CNCTC 2/74	SZÚ Praha
CNCTC 3/75	

Pro určení jednotlivých parametrů dle MIQE požadavků byly připraveny v laboratoři /objednány koncentrační standardy (Invitrogen, USA).

2. 3. 2. Opatření pro manipulaci s infekčním materiálem

Manipulace s infekčním materiálem není součástí této metodiky, ale tato problematika je zpracována jak v interní metodice B2/OST/2: Postup zpracování neznámého vzorku, tak v Provozním řádu pracoviště, kde jsou zakotvena režimová opatření pro vlastní manipulaci s infekčním materiálem. Případný odběr vzorku popisuje interní metodika B2/OST/009: Odběr neznámého vzorku na průkaz biologických agens. Čerpat informace o odběru, uchovávání a zpracování vzorků je také možno z dalších veřejně dostupných materiálů, např. manuálu OIE Terrestrial Manual, kapitoly 1.1.2. a 1.1.3. (<http://www.oie.int/standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>), nebo WHO Laboratory biosafety manual (<http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/Biosafety7.pdf?ua=1>). Pracovník je také povinen zkontrolovat zařazení biologického agens do rizikové skupiny, např. dle přílohy k Nařízení vlády č. 361/2007 Sb.4, a tomu přizpůsobit režim práce a ochranné prostředky.

2. 3. 3. Izolace DNA ze vzorku

K izolaci bakteriální DNA ze vzorku lze použít komerčně dostupné izolační kity. Metodika byla ověřena s použitím izolačního kitu RTP Bacteria DNA Mini Kit (STRATEC Biomedical AG, Německo), podle interní metodiky B2/MOLB/053 a také za použití izolačního kitu Nexttec (Nexttec Biotechnologie, Německo), podle interní metodiky B2/MOLB/068. Izolovanou DNA je možno krátkodobě uchovávat v lednici při 4 °C či dlouhodobě při teplotě -20 °C.

2. 3. 4. qPCR

Reakce je prováděna za použití Master mixu qPCR 2x SYTO-9 (P593, Top-Bio, Praha, ČR). Jedná se o kompletní mix reagensií nutných pro PCR. Mix obsahuje interkalační fluorescenční barvivo SYTO-9, které dosahuje max. excitace při 485 nm a max. emise při 498 nm, signál tak bude odečten v SYBR/FAM kanálu přístroje. Mix se dlouhodobě skladuje při -20 °C, ale je možné i krátkodobé skladování maximálně však dva týdny při 4 °C. Metodika byla ověřena na přístroji Bio-Rad CFX96 (Bio-Rad, USA).

⁴ Nařízení vlády, kterým se stanoví podmínky ochrany zdraví při práci.

Sekvence navržených primerů (GENERI BIOTECH s.r.o, ČR) a délky jednotlivých produktů jsou uvedeny v Tab. VI.

Tab. VI: Primery pro detekci brucei

Název primeru	Sekvence primeru	Velikost produktu
Br_AM1_araC_F	5'-GCTTTCGAACGTAGCCTGC-3'	83 bp
Br_AM1_araC_R	5'-AGTCCGAGCAATATCCGCAA-3'	
Br_mel_BAB1_0255b_F	5'-TGGAAAGGCCGAGATTGAGC-3'	96 bp
Br_mel_BAB1_0255b_R	5'-CACACAATCAGCTTGTCACCC-3'	
Br_suis_F55	5'-AAAATGCCAATCAATTCAACA-3'	74 bp
Br_suis_R110	5'-TGAGAATCCCGTTCCTC-3'	
Br_canis_F	5'-GTTACGCGATATTTGGCCAGA-3'	74 bp
Br_canis_R2	5'-TTTTCACTGCGCCGGCAC-3'	

2. 3. 5. Pracovní postup a opatření pro manipulaci s materiálem

Při pracovních operacích vždy používat ochranné rukavice. Provádět veškeré operace při přípravě PCR mixu ve speciálním (PCR) boxu. Pro každé vyšetření využívat systému pozitivních kontrol a NTC (z angl. No Template Control) tj. vzorek bez nukleových kyselin.

- a) Přemístit potřebné roztoky, případně vzorky DNA z mrazicího boxu (cca 10-15 min. před započítáním práce) do lednice (požadované rozmražení v temnu), vyhnout se opakovanému rozmrazování, které může vést ke snížené senzitivitě.
- b) Připravit pro detekci potřebné množství PCR mixu (násobky objemu) ve složení ze zásobních roztoků dle Tab. VII a Tab. VIII a vložit roztoky do chladicího stojánku. Zásobní roztoky vrátit zpět do mrazicího boxu nebo lednice.
- c) PCR mix promíchat pipetováním. Následně rozpipetovat mix po 10 µl do potřebného množství zkumavek.
- d) Do zkumavek s PCR mixem označených „studovaný vzorek“ přidat 2 µl zkoumané DNA.
- e) Do zkumavky s PCR mixem označené „pozitivní kontrola“ přidat 2 µl DNA (použít čtyři pozitivní kontroly - pro *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* a *B. canis*).
- f) Do zkumavky s PCR mixem označené „NTC“ přidat 2 µl PCR vody.
- g) Zkumavky uzavřít víčky (pracovat sterilně), vložit do přístroje a spustit program uvedený v Tab. IX.

- h) Výsledky uložit a zálohovat do příslušného adresáře. Název souboru a cestu k souboru zapsat do protokolu.

Tab. VII: Složky reakční směsi 1. Master Mixu včetně příkladu kalkulace pro jednu reakci

Složky reakční směsi pro 1. Master Mix	Množství v μ l
PCR voda	2
qPCR 2x SYTO-9 Master Mix (150mM Tris-HCl, pH 8,8 (25°C), 40mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 5mM MgCl ₂ , 400 μ M dATP, 400 μ M dCTP, 400 μ M dGTP, 400 μ M dTTP, Taq DNA polymeráza (50 U/ml), monoklonální protilátka anti-Taq, SYTO-9, stabilizátory a aditiva)	6
Br_AM1_araC_F (10 μM)	0,5
Br_AM1_araC_R (10 μM)	0,5
Br_suis_F55 (10 μM)	0,5
Br_suis_R110 (10 μM)	0,5
Vzorek nebo + kontrola nebo NTC	2
Objem reakce celkem	12

Tab. VIII: Složky reakční směsi 2. Master Mixu včetně příkladu kalkulace pro jednu reakci

Složky reakční směsi pro 2. Master Mix	Množství v μ l
PCR voda	2
qPCR 2x SYTO-9 Master Mix (150mM Tris-HCl, pH 8,8 (25°C), 40mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 5mM MgCl ₂ , 400 μ M dATP, 400 μ M dCTP, 400 μ M dGTP, 400 μ M dTTP, Taq DNA polymeráza (50 U/ml), monoklonální protilátka anti-Taq, SYTO-9, stabilizátory a aditiva)	6
Br_mel_BAB1_0255b_F (10 μM)	0,5
Br_mel_BAB1_0255b_R (10 μM)	0,5
Br_canis_F (10 μM)	0,5
Br_canis_R (10 μM)	0,5
Vzorek nebo + kontrola nebo NTC	2
Objem reakce celkem	12

Tab. IX: Popis nastavení cyklu a podmínek PCR reakce pro detekci a odlišení vybraných bruceel

Program	Teplota	Čas	Počet cyklů	Měření fluorescence
Denaturace	94 °C	1 min	1	-
Amplifikace	Denaturace	94 °C	10 s	-
	Annealing	60 °C	15 s	-
	Extenze	72 °C	20 s	SYBR/FAM
Stabilizace	95 °C	10 s	1	-
HRM	60-95 °C	0,1 °C/2s	-	SYBR/FAM

2. 3. 6. Vyhodnocení analýzy

Za průkaz přítomnosti DNA vybraných brucelel ve vzorku je považován prokazatelný nárůst fluorescenčního signálu v SYBR/FAM kanálu do 35. cyklu. Pozitivní nárůst po 35. cyklu je nutno hodnotit individuálně a důkladně prozkoumat HRM analýzu. Zároveň s nárůstem fluorescenčního signálu v amplifikační fázi musí být v HRM analýze zaznamenána specifická teplota tání pro jednotlivé brucelely, viz Tab. X, a navíc musí být zaznamenán správný průběh křivky v daných regionech, viz Tab. XI. Výsledné rozvržení výsledků HRM analýzy by mělo reflektovat rozdělení v rámci patřičných klastrů. Nejprve je provedena analýza dat pro lokus dAM a SU+CAN, viz Obr. 1 a Obr. 3. V druhé fázi jsou analyzovány pouze vzorky charakterizované jako *B. abortus* či *B. melitensis* dle lokusu MEL, respektive jen vzorky charakterizované jako *B. suis* nebo *B. canis* jsou dále analyzovány dle lokusu CAN, viz Obr. 2 a Obr. 4. Pro vyhodnocení HRM analýzy lokusu CAN je využito tzv. módu „temperature-shifted“. Analýza HRM dat probíhala v software Precision Melt Analysis (Bio-Rad).

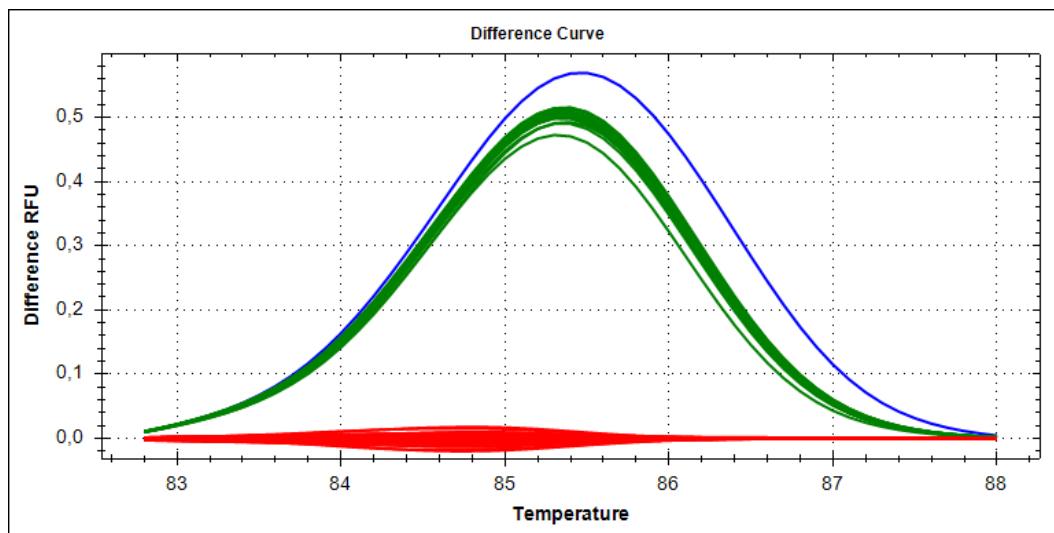
Tab. X: Specifická teplota tání cílových lokusů

Pozn.: abo-diff – pro *B. abortus*; mel-diff - pro *B. melitensis*; su-diff – pro *B. suis*; can-diff – pro *B. canis*.

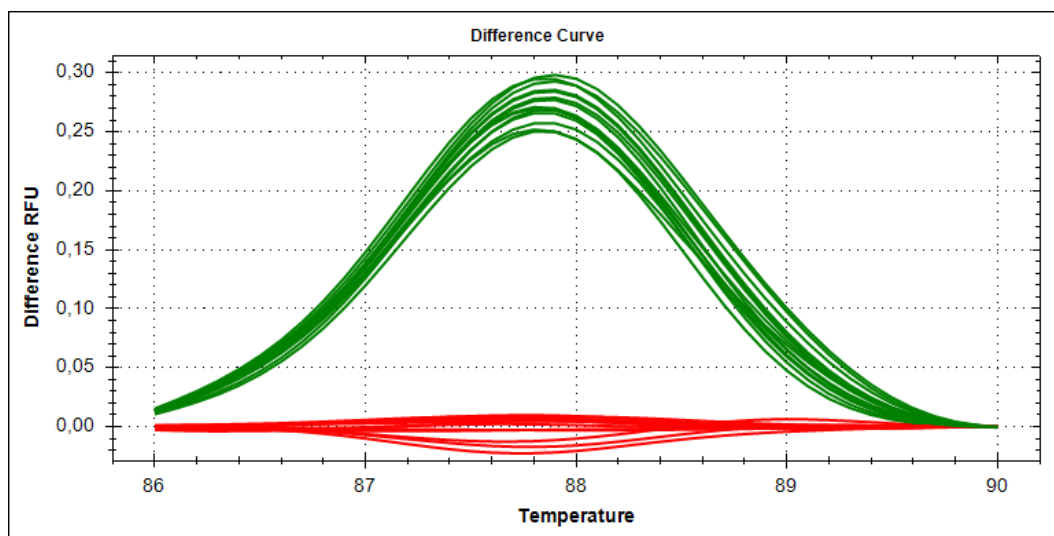
Lokus	Specifická teplota tání PCR produktu
dAM	84,6-84,8 ± 0,3 °C
MEL abo-diff	88,0-88,1 ± 0,3 °C
MEL mel-diff	87,4-87,5 ± 0,3 °C
SU+CAN	75,9-76,4 ± 0,2 °C
CAN su-diff	84,1-84,2 ± 0,3 °C
CAN can-diff	83,9-84,2 ± 0,3 °C

Tab. XI: Rozmezí regionů pro vyhodnocování dat z HRM analýzy

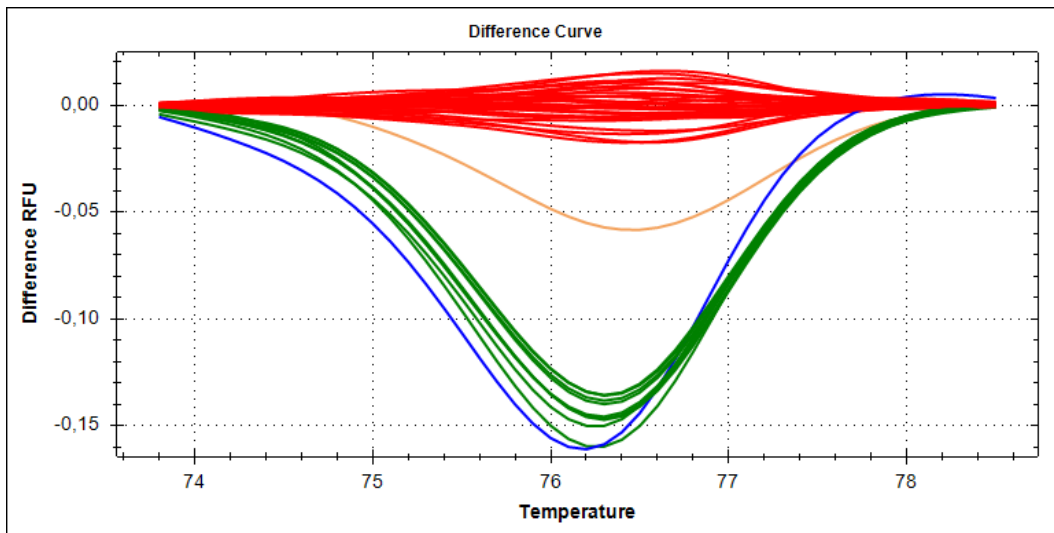
Lokus	Pre-melt rozmezí	Post-melt rozmezí
dAM	82,3-82,8	88,0-88,5
MEL	85,5-86,0	90,0-90,5
SU+CAN	73,3-73,8	78,5-79,0
CAN	81,8-82,3	86,5-87,0



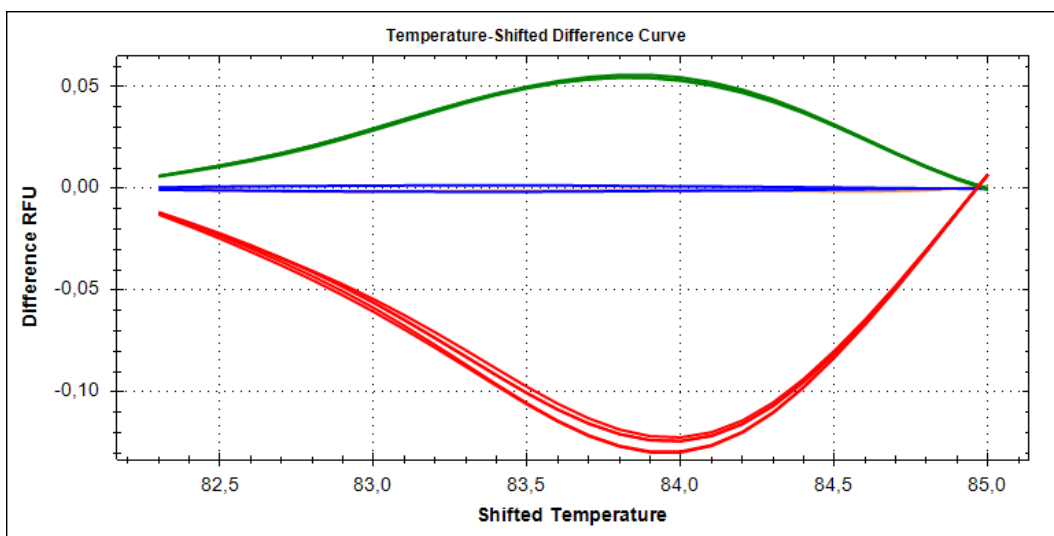
Obr. 1: Oddělení *B. abortus* a *B. melitensis* od *B. suis* a *B. canis*, respektive dalších brucei dle lokusu dAM
B. abortus a *B. melitensis* – červeně; *B. suis* (bv. 1, 2, 3, 4, 5) – zeleně; *B. canis* – modře a zeleně; *B. ceti*, *B. microti*, *B. neotomae*, *B. ovis* a *B. pinnipedialis* – zeleně.



Obr. 2: Odlišení *B. abortus* a *B. melitensis* dle lokusu MEL
B. abortus – zeleně; *B. melitensis* – červeně. Analyzovány jen vzorky spadající do červeného klastru na Obr. 1.



Obr. 3: Oddělení *B. suis* bv. 1-4 a *B. canis* od *B. abortus* a *B. melitensis*, respektive dalších brucel dle lokusu SU+CAN
B. suis, *B. suis* (bv. 1-4) – zeleně; *B. canis* – zeleně, modře, oranžově; *B. suis* bv. 5, *B. ceti*, *B. microti* a *B. neotomae* – červeně.



Obr. 4: Odlišení *B. suis* bv. 1-4 a *B. canis* dle lokusu CAN
B. suis bv. 1, 3 a bv. 4 – zeleně; *B. suis*, *B. suis* bv. 2 – červeně; *B. canis* – modře a oranžově. Analyzovány jen vzorky spadající do zeleného, modrého či oranžového klastru na Obr. 3.

2. 3. 7. Validace a limity reakce

Ověření výsledků bylo provedeno jak prostřednictvím analýzy teplot tání PCR produktu, respektive pomocí HRM analýzy, tak na gelové elektroforéze odečtením specifické délky pro PCR produkt dle velikostního markeru O'GeneRuler 50 bp DNA Ladder (Fermentas, ThermoFisher Scientific, USA). Specificita reakce byla nejprve studována *in silico* pomocí nástroje BLAST (z *angl.* Basic Local Alignment Search Tool), poté i prakticky ověřena pomocí souboru vybraných příbuzných i nepříbuzných agens. Seznam testovaných agens je uveden v Tab. XII a Tab. XIII.

Tab. XII: Seznam příbuzných bakterií použitých k ověření metodiky

Čeleď <i>Brucellaceae</i>	
Druh	Číslo kmene
<i>Brucella ceti</i>	NCTC 12891
<i>Brucella inopinata</i>	CAMP 6436T
<i>Brucella microti</i>	CCM 4915
<i>Brucella neotomae</i>	A148-7
<i>Brucella ovis</i>	CNCTC 6/88
<i>Brucella ovis</i>	CNCTC 6741T
<i>Brucella ovis</i>	CAMP 6374
<i>Brucella pinnipedialis</i>	A148-8
<i>Brucella vulpis</i>	DSM 101715T
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	CCM 999
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	CCM 4352
<i>Ochrobactrum intermedium</i>	CCM 7179T
<i>Ochrobactrum intermedium</i>	CCM 7036
<i>Paenochrobactrum gallinarii</i>	CCM 7656T
<i>Pseudochrobactrum lubricantis</i>	CCM 7581T

Limit detekce byl stanoven do řádu stovek kopií cílové sekvence v jednom μ l pro obě reakce, pro bližší informace viz formuláře MIQE - přílohy metodiky. Stanovení proběhlo za použití deseti replik vzorku v reakci (celkem 30 replik daného vzorku pro daný cílový lokus) s min. 95% úspěšností pozitivního záchytu. Validace limitu reakce byla potvrzena také stanovením počtu mikrobiálních buněk (CFU) pro tři referenční kmeny (*B. abortus* 5660T, *B. melitensis* 5659T a *B. suis* 6073T) a jejich detekcí touto metodikou. Limit detekce tak byl potvrzen v řádu stovek CFU/ml. Lineární dynamické rozpětí reakce pokrývá v případě obou duplexů sedm řádů. Efektivita reakce v duplexu pro lokusy dAM a SU+CAN činila 86 %, respektive 88 %. V duplexu pro lokusy MEL a CAN pak byla naměřena efektivita reakce 91 %, respektive 90 %.

Tab. XIII: Seznam dalších agens použitých k ověření metodiky

Druh	Číslo kmene
<i>Bacillus anthracis</i>	NCTC 10340T
<i>Bacillus cereus</i>	CCM 2010T
<i>Bacillus subtilis</i>	CNCTC 5615T
<i>Bartonella australis</i>	CIP 108987T
<i>Bartonella bovis</i>	CIP 106692T
<i>Bartonella japonica</i>	DSMZ 23650T
<i>Bartonella quintana</i>	CIP 103739
<i>Burkholderia glathei</i>	CCM 2742T
<i>Burkholderia mallei</i>	NCTC 12938T
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	NCTC 12939T
<i>Clostridium botulinum</i>	CAMP 5950T
<i>Clostridium botulinum</i>	CAMP 5944T
<i>Clostridium perfringens</i>	CAMP 5744T
<i>Clostridium tetani</i>	CNCTC 18/50
<i>Coxiella burnetii</i>	SU032
<i>Enterobacter cloacae</i>	CCM 1903
<i>Escherichia coli</i>	13708
<i>Francisella novicida</i>	CAMP 6041
<i>Francisella tularensis</i>	CAMP 5540T
<i>Chlamydomphila psittaci</i>	DSMZ 27007
<i>Kytococcus sedentarius</i>	CCM 2699
<i>Legionella pneumophila</i>	CNCTC 7371T
<i>Mycobacterium bovis</i>	CAMP 5034
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	CNCTC 7301T
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CCM 1960T
<i>Rickettsia canadensis</i>	VR-610
<i>Rickettsia conorii</i>	VR-613
<i>Rickettsia conorii</i>	SU004
<i>Rickettsia rickettsii</i>	SU005
<i>Rickettsia sibirica</i>	SU026
<i>Salmonella enterica subsp. enterica, ser. typhimurium</i>	CCM 7933T
<i>Salmonella typhi</i>	CNCTC 7028T
<i>Shigella dysenteriae</i>	CNCTC 13/41
<i>Shigella sonnei</i>	CCM 4421
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	CCM 2737T
<i>Vibrio cholerae</i>	NCTC 7254
<i>Xanthomonas campestris</i>	CNCTC 1/79
<i>Yersinia enterocolitica</i>	CCM 5671
<i>Yersinia pestis</i>	NCTC 5923T
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	CNCTC 22/90T

3. INOVAČNÍ ASPEKTY, NOVOST POSTUPŮ

Do doby zavedení této metodiky detekce a identifikace cílových brucel byla v Laboratoři biologického monitorování a ochrany (LBMO) Státního ústavu jaderné, chemické a biologické ochrany, v.v.i. (SÚJCHBO, v.v.i.) k dispozici metodika založená na real-time PCR cílená na záchyt rodu *Brucella*. Tuto metodiku lze použít jako vhodný screeningový nástroj pro orientaci v rámci širšího spektra bakterií. Na jejím základě však není možno odlišit *B. abortus*, *B. melitensis* či *B. suis* od ostatních brucel, ani tyto zájmové druhy identifikovat.

Cílové brucely lze diferencovat metodikou tzv. „Bruce-ladder“ založenou na multiplex end-point PCR, kdy je na gelu detekován soubor pruhů specifický pro danou brucelu. V LBMO jsme zavedli několik těchto metodik, avšak ne vždy je dosaženo adekvátního výsledku a může tak dojít k záměně v identifikaci mezi jednotlivými brucelami.

Předložená metodika pro detekci a identifikaci cílových brucel sestává ze čtyř použitých cílových míst, kdy dvě jsou zcela unikátní a další dvě byla využita na základě studia literatury. Navržené sekvence primerů nebyly dosud publikovány a délka amplikonu je uzpůsobena tak, aby byla optimální jednak pro aplikaci real-time PCR, ale také pro následnou HRM analýzu. Reakční podmínky pro diagnostický proces jsou navrženy tak, aby bylo možné současně provádět detekci většího počtu biologických agens uvedených na seznamech příloh vyhlášky č. 474/2002 Sb.⁵, ve znění pozdějších předpisů, a tím výrazně zkrátit čas potřebný pro detekci těchto agens.

Vybrané delece či SNP jsou umístěny uprostřed amplikonu a v sekvenci amplikonu se nenachází další oblast variability, která by mohla zkreslovat výsledky při HRM analýze. Výhodou je nejen rychlost analýzy, ale také jasná interpretace dosažených výsledků a není třeba další manipulace se vzorky, kdy by mohlo dojít k jejich záměně či vzájemné kontaminaci. Navíc lze master mix s interkalační barvou použít v kombinaci s jiným párem primerů pro detekci jiných agens nebo další PCR analýzy. Používáním co možná nejvíce jednotného chemismu v laboratoři je tak zajištěna obnova chemikálií.

⁵ Dne 22. 11. 2017 vyšla ve Sbírce zákonů, v částce 133, vyhláška č. 379/2017 Sb., kterou se mění vyhláška č. 474/2002 Sb., kterou se provádí zákon č. 281/2002 Sb., o některých opatřeních souvisejících se zákazem bakteriologických (biologických) a toxinových zbraní a o změně živnostenského zákona, ve znění vyhlášky č. 74/2013 Sb.

4. POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY

Metodika byla vyvinuta jako analytický postup metodicko-odborné podpory laboratoře LBMO SÚJCHBO, v.v.i. při plnění úkolů státního dozoru SÚJB nad dodržováním zákona č. 281/2002 Sb.⁶ v oblasti zákazu biologických zbraní. Konkrétně bude sloužit k průkazu přítomnosti genetického materiálu cílových brucel ve vzorcích získaných při dozorové činnosti pracovníků SÚJB. Lze předpokládat, že by metodika mohla být rovněž využita k detekci a identifikaci cílových brucel pro potřeby integrovaného záchranného systému v případech, kdy existuje podezření na přítomnost uvedených agens v neznámých vzorcích (biologické tkáně, stěry, tzv. bílé prášky neznámého původu apod.). Jako robustní skrínigový postup je možno metodiku též využít i v laboratořích orgánů ochrany veřejného zdraví nebo pro potřeby veterinárního dozoru.

⁶ Dne 18. 8. 2017 vyšel ve Sbírce zákonů, v částce 89, zákon č. 253/2017 Sb., kterým se mění zákon č. 281/2002 Sb., o některých opatřeních souvisejících se zákazem bakteriologických (biologických) a toxinových zbraní a o změně živnostenského zákona, ve znění pozdějších předpisů.

5. LITERATURA

Bednář, M., Fraňková, V., Hájek, V., Horák, P., Chaloupecký, J., John, C., Kalvodová, D., Kaprálek, F., Kolářová, L., Kozák, K., Kubín, M., Manych, J., Menčíková, E., Nohýnková, E., Pavlík, E., Russo-Marie, F., Scharfen, J., Schindler, J., Souček, A., Součková, A., Vávra, J., Volf, P. a Zavadová, M., 1996. Lékařská mikrobiologie. Marvil, Praha.

Beneš, J., Bartošová, D., Beran, J., Černý, Z., Dostál, V., Galský, J., Habanec, T., Hobstová, J., Holčíková, A., Holub, M., Honegr, K., Horák, M., Husa, P., Chalupa, P., Chemlík, V., Krbková, L., Kümpel, P., Machala, L., Marešová, V., Pícha, D., Plíšek, S., Rozsypal, H., Rožnovský, L., Sedláček, D., Staňková, M., Stejskal, F., Táborská, J. a Vaništa, J., 2009. Infekční lékařství. Galén, Praha.

Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J. a Wittwer, C. T., 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical chemistry* 55, 611-622.

Delost, M. D., 1997. Introduction to diagnostic microbiology: a text and workbook. Mosby, Inc., St. Louis.

Ducrottoy, M. J. a Bardosh, K. L., 2017. How do you get the Rose Bengal Test at the point-of-care to diagnose brucellosis in Africa? The importance of a systems approach. *Acta tropica* 165, 33-39.

Gopaul, K. K., Sells, J., Lee, R., Beckstrom-Sternberg, S. M., Foster, J. T. a Whatmore, A. M., 2014. Development and assessment of multiplex high resolution melting assay as a tool for rapid single-tube identification of five *Brucella* species. *BMC research notes* 7, 903.

Christopher, G. W., Agan, M. B., Cieslak, T. J. a Olson, P. E., 2005. History of U.S. military contributions to the study of bacterial zoonoses. *Military medicine* 170, 39-48.

Kang, S. I., Her, M., Kim, J. W., Kim, J. Y., Ko, K. Y., Ha, Y. M. a Jung, S. C., 2011. Advanced multiplex PCR assay for differentiation of *Brucella* species. *Applied and environmental microbiology* 77, 6726-6728.

Kang, S. I., Lee, S. E., Kim, J. Y., Lee, K., Kim, J. W., Lee, H. K., Sung, S. R., Heo, Y. R., Jung, S. C. a Her, M., 2014. A new *Brucella canis* species-specific PCR assay for the diagnosis of canine brucellosis. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases* 37, 237-241.

Lopez-Goni, I., Garcia-Yoldi, D., Marin, C. M., de Miguel, M. J., Munoz, P. M., Blasco, J. M., Jacques, I., Grayon, M., Cloeckart, A., Ferreira, A. C., Cardoso, R., Correa de Sa, M. I., Walravens, K., Albert, D. a Garin-Bastuji, B., 2008. Evaluation of a multiplex PCR assay (Bruce-ladder) for molecular typing of all *Brucella* species, including the vaccine strains. *Journal of clinical microbiology* 46, 3484-3487.

Mantur, B. G., Amarnath, S. K., Patil, G. A. a Desai, A. S., 2014. Clinical utility of a quantitative Rose Bengal slide agglutination test in the diagnosis of human brucellosis in an endemic region. *Clinical laboratory* 60, 533-541.

- Pappas, G., Panagopoulou, P., Christou, L. a Akritidis, N., 2006. Brucella as a biological weapon. Cellular and molecular life sciences : CMLS 63, 2229-2236.
- Perkins, S. D., Smither, S. J. a Atkins, H. S., 2010. Towards a Brucella vaccine for humans. FEMS microbiology reviews 34, 379-394.
- Seleem, M. N., Boyle, S. M. a Sriranganathan, N., 2010. Brucellosis: a re-emerging zoonosis. Veterinary microbiology 140, 392-398.
- Scholz, H. C., Hubalek, Z., Sedlacek, I., Vergnaud, G., Tomaso, H., Al Dahouk, S., Melzer, F., Kampfer, P., Neubauer, H., Cloeckaert, A., Maquart, M., Zygmunt, M. S., Whatmore, A. M., Falsen, E., Bahn, P., Gollner, C., Pfeffer, M., Huber, B., Busse, H. J. a Nockler, K., 2008. Brucella microti sp. nov., isolated from the common vole Microtus arvalis. International journal of systematic and evolutionary microbiology 58, 375-382.
- Scholz, H. C., Nockler, K., Gollner, C., Bahn, P., Vergnaud, G., Tomaso, H., Al Dahouk, S., Kampfer, P., Cloeckaert, A., Maquart, M., Zygmunt, M. S., Whatmore, A. M., Pfeffer, M., Huber, B., Busse, H. J. a De, B. K., 2010. Brucella inopinata sp. nov., isolated from a breast implant infection. International journal of systematic and evolutionary microbiology 60, 801-808.
- Scholz, H. C., Revilla-Fernandez, S., Al Dahouk, S., Hammerl, J. A., Zygmunt, M. S., Cloeckaert, A., Koylass, M., Whatmore, A. M., Blom, J., Vergnaud, G., Witte, A., Aistleitner, K. a Hofer, E., 2016. Brucella vulpis sp. nov., isolated from mandibular lymph nodes of red foxes (Vulpes vulpes). International journal of systematic and evolutionary microbiology 66, 2090-2098.
- Suarez-Esquivel, M., Ruiz-Villalobos, N., Jimenez-Rojas, C., Barquero-Calvo, E., Chacon-Diaz, C., Viquez-Ruiz, E., Rojas-Campos, N., Baker, K. S., Oviedo-Sanchez, G., Amuy, E., Chaves-Olarte, E., Thomson, N. R., Moreno, E. a Guzman-Verri, C., 2017. Brucella neotomae Infection in Humans, Costa Rica. Emerging infectious diseases 23, 997-1000.
- Wattam, A. R., Foster, J. T., Mane, S. P., Beckstrom-Sternberg, S. M., Beckstrom-Sternberg, J. M., Dickerman, A. W., Keim, P., Pearson, T., Shukla, M., Ward, D. V., Williams, K. P., Sobral, B. W., Tsolis, R. M., Whatmore, A. M. a O'Callaghan, D., 2014. Comparative phylogenomics and evolution of the Brucellae reveal a path to virulence. Journal of bacteriology 196, 920-930.
- Whatmore, A. M., Davison, N., Cloeckaert, A., Al Dahouk, S., Zygmunt, M. S., Brew, S. D., Perrett, L. L., Koylass, M. S., Vergnaud, G., Quance, C., Scholz, H. C., Dick, E. J., Jr., Hubbard, G. a Schlabritz-Loutsevitch, N. E., 2014. Brucella papionis sp. nov., isolated from baboons (Papio spp.). International journal of systematic and evolutionary microbiology 64, 4120-4128.
- Whatmore, A. M., Koylass, M. S., Muchowski, J., Edwards-Smallbone, J., Gopaul, K. K. a Perrett, L. L., 2016. Extended Multilocus Sequence Analysis to Describe the Global Population Structure of the Genus Brucella: Phylogeography and Relationship to Biovars. Frontiers in microbiology 7, 2049.
- Whatmore, A. M., Shankster, S. J., Perrett, L. L., Murphy, T. J., Brew, S. D., Thirlwall, R. E., Cutler, S. J. a MacMillan, A. P., 2006. Identification and characterization of variable-number tandem-repeat markers for typing of Brucella spp. Journal of clinical microbiology 44, 1982-1993.

Winchell, J. M., Wolff, B. J., Tiller, R., Bowen, M. D. a Hoffmaster, A. R., 2010. Rapid identification and discrimination of *Brucella* isolates by use of real-time PCR and high-resolution melt analysis. *Journal of clinical microbiology* 48, 697-702.