

DIAGNOSTICKÁ SOUPRAVA qPCR BRUCident na detekci a kvantifikaci druhu *Brucella microti*

Mgr. Eva Marešová, Ph.D.
prof. RNDr. Ivo Rudolf, Ph.D.

1. Úvod

Bakterie rodu *Brucella* představují významné zoonotické patogeny obratlovců, zejména savců. Brucelóza je jednou z nejvíce celosvětově rozšířených, často opomíjených zoonóz a v posledních letech její incidence roste. *Brucella microti* patří k tzv. „atypickým“ druhům, které vykazují nestandardní fenotypové vlastnosti. *B. microti* byla poprvé izolována z hrabošů polních (*Microtus arvalis*) v České republice v roce 2001 (Hubálek a kol. 2007). Byla popsána jako nový druh v rámci rodu *Brucella* na základě komplexní fenotypové a molekulární analýzy. Vykazuje vysokou enzymatickou aktivitu a metabolické schopnosti, které nebyly pozorovány u jiných druhů. Má jedinečné genetické markery a několik kopií inzerční sekvence IS711 (Scholz, Hubálek, Sedláček, a kol. 2008). Navíc je známá svou schopností přetrvávat v půdě (Scholz, Hubálek, Nesvadbova a kol. 2008). Rónai a kol. (2015) poprvé izolovali *B. microti* z divočáka v Maďarsku poblíž rakouských hranic. V roce 2023 byla uveřejněna studie zabývající se prvním případem infekce *B. microti* u člověka, který byl nakažen po pokousání infikovaným hrabošem. Diagnózu komplikovala počáteční chybná identifikace patogenu jako *Ochrobactrum intermedium* (Hubálek a kol. 2023). Potenciální riziko infekce způsobené *B. microti* hrozí zemědělcům, farmářům, lesníkům, či myslivcům ale také těm, co se s těmito zvířaty dostanou do styku (veterináři, zoologové). Toto onemocnění se navíc obtížně diagnostikuje vzhledem k nespecifickým příznakům charakteristických i pro různá další onemocnění.

2. Cíl metodiky funkčního vzorku

Cílem vývoje funkčního vzorku qPCR BRUCident je jednoznačně detekovat a rozlišit druh *B. microti* od ostatních druhů rodu *Brucella*, které jsou si vzájemně geneticky velmi podobné, a to spolehlivou a finančně i časově dostupnou metodou.

3. Popis funkčního vzorku

3.1 Metodika funkčního vzorku

Metoda real-time PCR je založena na přímé kvantifikaci sekvence *B. microti* v reálném čase. Pro detekci bakterie jsme navrhli nové sekvence oligonukleotidů – primerů a to **Bruc2F** a **Bruc2R**, z nichž jeden jsme zaměřili uvnitř 12 kb inzerčního fragmentu, specifického pouze pro druh *B. microti*. Přesná sekvence primerů je součástí know-how pracoviště. Vyvinutá souprava bude zařazena do produktového portfolia Centra aplikované zoologie Ústavu biologie obratlovců AVČR.

Po izolaci celogenomové DNA *B. microti* (typový kmen CCM 4915^T) pomocí QIAamp DNA Mini kit (Qiagen, Hilden, Německo) byl nově navržený pár primerů nejdříve testován metodou konvenční PCR pro nalezení vhodných podmínek. Poté byla provedena qPCR reakce s použitím 2x SsoAdvanced Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad) v objemu 10 ul reakční směsi (Tab.1) za podmínek v Tab.2.

Tab.1 Reakční mix pro qPCR BRUCident.

	objem/reakce	finální koncentrace			
2x SsoAdvanced Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad)	5 ul	1x			
primery Bruc2F + Bruc2R	0,5 ul	Poměr	primerů	1:1	v cílové koncentraci 10uM
voda	3,5 ul				
templátová DNA	1 ul				
celkový reakční objem	10 ul				

Tab.2 Reakční podmínky real-time PCR s následnou analýzou křivky tání.

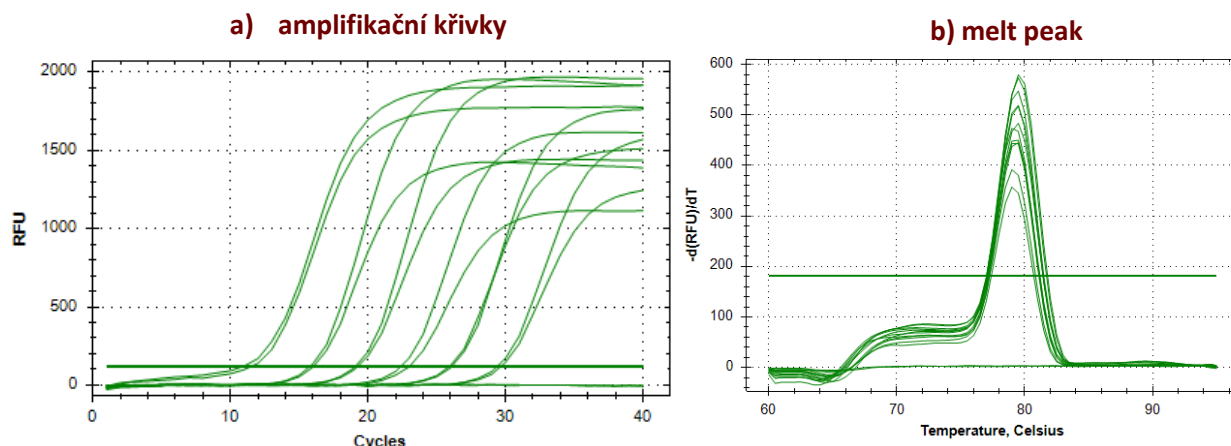
krok	čas	teplota	
Iniciální denaturace	3 min	95 °C	
cyklus			
denaturace	15 s	95 °C	
annealing	20 s	58 °C	
extenze	20 s	72 °C	
počet cyklů	40		
meltingová analýza	0,05 s	60 °C	+ plate read
	0,5 s	95 °C	

Analýzy byly prováděny na přístroji CFX Opus 96 (Bio-Rad), s následnou analýzou křivek tání (Obr. 1b) pro ověření specifity reakce tj. přítomnosti pouze jednoho produktu.

Jako pozitivní kontrola byla použita DNA izolovaná z bakteriální kultury *B. microti* (typový kmen CCM 4915^T), ze které byla následně pomocí desítkové ředící řady

vygenerována standardní křivka (Obr. 1a). Z této je následně stanovena efektivita reakce E, která by měla být 90–105 % a linearita reakce R^2 odrážející reproducibilitu dat (ideálně rovna 1). Jako negativní kontrola, reakce bez templátu, byla použita PCR voda bez nukleáz. Všechny vzorky byly analyzovány v technických duplikátech.

Obr. 1. Standardní křivka *B. microti* v desítkovém ředění $10^0 - 10^{-5}$ (a) a ověření specifity reakce přítomností jednoho píku, tzn. jedné cílové sekvence u křivky tání (b).



3.2. Validace funkčního vzorku

Nově navržený pár primerů jsme otestovali na vzorcích izolovaných z tkání (sleziny a ledviny) pozitivně testovaných hlodavců druhu *M. arvalis*. Vzorky byly původně testovány konvenční PCR dle práce Scholz a kol.(2008). Všechny směsné vzorky byly testovány námi navrženými primery pozitivně na druh *B. microti* v rozmezí Cq hodnot 24 – 33,4. U negativní kontroly byla detekována hodnota N/A. Efektivita reakce (E) byla spočtena ze standardní křivky a dosahuje hodnoty 98 %, linearita dat $R^2 = 0,998$.

4. Srovnání novosti postupů

Test detekce *B. microti* metodou real-time RT PCR není podle informací autorů v současné době zaveden.

5. Uplatnění funkčního vzorku

Diagnostická souprava qPCR BRUCident je zařazena do produktového portfolia Centra aplikované zoologie při ÚBO AV ČR a je laické i odborné veřejnosti nabízena pod kat. č. qPCR006. Je možné si ji zakoupit nebo poptat formou služby. Diagnostická souprava je v současnosti využívána pro molekulární surveillance tkání hlodavců na přítomnost *B. microti*. V budoucnosti by souprava mohla najít uplatnění při diagnostice horeček neznámého původu u lidí, kteří jsou v kontaktu s volně žijícími hlodavci (např. zemědělci, lesníci, veterináři, zoologové nebo pracovníci deratizačních firem).

6. Ekonomické aspekty

V současné době nelze ekonomické aspekty odhadnout.

7. Seznam použité literatury

Hubálek Z., Scholz H.C., Sedláček I., Melzer F., Sanogo Y.O., Nesvadbová J. (2007). Brucellosis of the common vole (*Microtus arvalis*). Vector Borne Zoonotic Diseases Winter;7(4):679-87.

Hubálek Z., Křivanová, A., Nesvadbová, J., & Rudolf, I. (2023). Zoonotic Potential of *Brucella microti*. Vector Borne and Zoonotic Diseases 23(8), 437–439.

Rónai Z., Kreizinge, Z., Dán Á., Drees K., Foster J. T., Bányai K., Marton S., Szeredi L., Jánosi S., & Gyuranecz, M. (2015). First isolation and characterization of *Brucella microti* from wild boar. BMC Veterinary Research, 11, 147.

Scholz H. C., Hubalek Z., Sedláček I., Vergnaud G., Tomaso H., Al Dahouk S., Melzer F., Kämpfer, P., Neubauer H., Cloeckeaert A., Maquart M., Zygmunt M. S., Whatmore A. M., Falsen E., Bahn P., Göllner C., Pfeffer M., Huber B., Busse H.-J., & Nöckler K. (2008). *Brucella microti* sp. Nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 58(2), 375–382.

Scholz H. C., Hubalek Z., Nesvadbova J., Tomaso H., Vergnaud G., Le Flèche P., Whatmore A. M., Al Dahouk S., Krüger M., Lodri C., & Pfeffer M. (2008). Isolation of *Brucella microti* from Soil. Emerging Infectious Diseases, 14(8), 1316–1317.

8. Dedikace

Funkční vzorek byl vytvořen v rámci projektu NU21-05-00143 Agentury pro zdravotnický výzkum Ministerstva zdravotnictví České republiky.