

Certifikovaná metodika

Molekulární detekce a druhové zařazení piroplasem

Metodika byla vypracovaná jako výstup výzkumného projektu QK1920258 „Šíření klíšťat a klíšťaty přenášených onemocnění: nová a opomíjená rizika pro domácí a hospodářská zvířata a člověka“ v rámci Programu aplikovaného výzkumu Ministerstva zemědělství na období 2017-2025, ZEMĚ

Autoři:

Mgr. Kristýna Hrazdilová, Ph.D.

Prof. MVDr. David Modrý, Ph.D.

Oponenti:

MVDr. Petr Šatrán, Ph.D. Státní veterinární správa

MVDr. Kamil Sedlák, Ph.D. SVÚ Praha Lysolaje

Brno, září 2020

Obsah

Cíl metodiky	3
Úvod	4
Vlastní popis metodiky	5
Materiál a přístroje.....	5
Odběr vzorků biologického materiálu	5
Vzorky zvířat	5
Vzorky klíšťat	6
Izolace DNA	6
Z krve	6
Z klíšťat/tkáně.....	6
Detekce cílové sekvence DNA – nested PCR	7
Sekvence primerů pro detekci 18S rDNA piroplasem	7
Sekvence primerů pro detekci Cox1 piroplasem.....	7
Kontroly PCR.....	7
Příprava reakční směsi a amplifikace	7
Detekce cílové sekvence DNA – elektroforéza.....	9
Příprava PCR produktů na sekvenaci.....	10
Sekvenace.....	10
Analýza sekvenačního výsledku	10
Ověření identity PCR produktu.....	10
Druhové zařazení izolátu piroplasem	11
Srovnání novosti postupů.....	11
Ekonomické aspekty	12
Seznam použité související literatury	12
Seznam publikací předcházejících metodice.....	14
Dedikace	14

Cíl metodiky

Z parazitických prvků kmene Apicomplexa mají v České republice neoddiskutovatelný význam pro zdraví zvířat a potenciálně i člověka klíšťaty přenášení zástupci rodů *Babesia* a *Theileria*. Vzhledem k expanznímu šíření některých druhů klíšťat (Modrý *et al.*, 2019), ale i kvůli téměř neomezenému pohybu zvířat (zejména psů a koní), doprovázejících majitele v rámci dovolených či za sportovními soutěžemi po celé Evropě, je zásadní možnost rychlé a přesné diagnostiky piroplasem, jakožto původců piroplasmóz.

Z více než stovky druhů je nutné v ČR věnovat pozornost zejména piroplasmám infikujícím psy (*Babesia canis*, *B. vogeli*, *B. gibsoni* a *Theileria annae*) (Annoscia *et al.*, 2017; Baneth *et al.*, 2019; Modrý *et al.*, 2019), koně (*B. caballi*, *T. equi*) (Bělková *et al.*, 2020) a volně žijící zvířata (zoonotické druhy *B. divergens*, *Babesia* sp. EU1, nebo *B. capreoli* patogenní pro nepůvodní hostitele) (Hrazdilová *et al.*, 2020). Klinický obraz infekcí je následkem často masivního napadení erytrocytů (případně lymfocytů) a nespecifické příznaky jako horečka, apatie a anorexie jsou doprovázeny hemolytickou anémií s potenciálně fatálními následky. Rychlá a přesná diagnostika včetně druhového rozlišení piroplasem umožňuje okamžité nasazení adekvátní léčby a minimalizaci ekonomických dopadů v chovech domácích i hospodářských zvířat.

Současná diagnostika je postavena zejména na přímém mikroskopickém průkazu parazita v krevním nátěru barveném podle Giemsy. Tímto způsobem lze pouze rozlišit piroplasmy dle velikosti (tzv. „malé“ a „velké“), u chronických infekcí je navíc nedostatečná sensitivita a mikroskopická detekce je neprůkazná. Testy detekující IgM/IgG protilátky je možné použít nejdříve 10-14 dnů po infekci, navíc bez druhové specifity (křížové reakce), takže nejsou vhodné k určení přesné diagnózy v počáteční, akutní fázi infekce ani ke specifikaci původce chronické infekce. Využití serologických testů je navíc problematické u nedomácích zvířat. Jako diagnostický standard s dostatečnou sensitivitou umožňující přesné druhové zařazení je doporučovaná detekce DNA metodou PCR (ideálně nestedPCR) (Lempereur *et al.*, 2017). Současně dostupná komerční PCR diagnostika se zaměřuje téměř výhradně na babézie infikující psy; ostatní skupiny, včetně zoonotických druhů, jsou opomíjeny.

Cílem předkládané metodiky je umožnit rychlou detekci přítomnosti nukleové kyseliny piroplasem (18S rRNA genu) ve vzorcích plné krve/tkáně širokého spektra hostitelů i vektorů (psi, koně, skot, ovce, kozy, aj.) a po sekvenaci produktu i jejich přesné druhové zařazení. V případě blízce příbuzných druhů (např. *B. divergens* a *B. capreoli*), kdy je rozlišení na základě sekvence 18S rRNA genu nemožné, je součástí metodiky druhová specifikace na základě amplifikace a sekvenace mitochondriálního genu podjednotky 1 cytochrom c oxidázy (Cox1). Díky sensitivitě předkládané metodiky je tato vhodná i k monitoringu efektivity léčby, kdy opakovaný screening vzorků několik týdnů po ukončení léčby umožňuje potvrdit eliminaci patogena z organismu. Metodika využívá běžné vybavení molekulárně-diagnostické laboratoře a její využití tak není vázáno na vstupní investice. Předkládaná metodika je v souladu v doporučeními pro přímou detekci *Babesia* spp. a *Theileria* spp. pro diagnostické a epidemiologické účely z roku 2017 (Lempereur *et al.*, 2017).

Úvod

Krevní prvoci rodů *Babesia* a *Theileria* jsou intracelulární jednobuněční parazité, jejichž definitivním hostitelem jsou různé druhy klíšťat z čeledi klíšťatovití (*Ixodidae*). V krevních buňkách obratlovců (erythrocyty v případě babesií, lymfocyty v případě theilerií) probíhá jejich nepohlavní rozmnožování. Po trypanosomách jsou považováni za druhého nejčastějšího krevního parazita savců (Schnittger et al., 2012). Klinický průběh infekce domácích, hospodářských i volně žijících zvířat závisí na věku, imunologickém stavu, koinfekcích a/nebo genetických faktorech daného jedince. K obecným příznakům akutní piroplazmózy patří horečka, anémie, hemoglobinurie, letargie, anorexie, malátnost; chronické infekce probíhají často bezpříznakově. Některé z druhů mají zoonotický potenciál, v severní Americe zejména *B. microti*, v Evropě pak *B. divergens* a *Babesia* sp. EU1 (syn. *B. venatorum*) (Krause, 2019).

Babezióza psů byla v ČR donedávna onemocněním exotickým, výhradně importovaným. Nedávný popis autochtonní nákazy psa z jižní Moravy (Křivánková et al., 2018), detekce *B. gibsoni* (Mitková et al., 2017) a změny rozšíření přenašečů (Modrý et al., 2019) ukazují, že je potřeba s touto nákazou počítat nejen u psů cestujících z endemických oblastí výskytu. Původcem onemocnění mohou být babézie mikroskopicky rozlišitelné na tzv. velké (cca 5 x 2,5 µm; *B. canis* a *B. vogeli*) a malé (1,5 x 2 µm, *T. annae*, *B. gibsoni*) (Solano-Gallego et al., 2016). *Babesia canis* je vázána na výskyt přenašeče pijáka lužního, *Dermacentor reticulatus*, jehož areál výskytu zasahuje již významnou část ČR (Modrý et al., 2019). *Babesia vogeli* přenášena klíšťaty komplexu *Rhipicephalus sanguineus* s.l. je nákazou typickou spíše pro jižní část Evropy, ale nejen vzhledem k rozmachu cestování nelze její výskyt v ČR vyloučit. Za přenašeče *B. gibsoni* je také považován *R. sanguineus*, nicméně se tento prvok vyskytuje i v zemích *R. sanguineus*-prostých (např. Německo, Slovensko), kde k přenosu dochází mj. pokousáním, a jeho výskyt v ČR byl již také zaznamenán u importovaných psů (Mitkova et al., 2017). Posledním druhem je taxonomicky neukotvená *Theileria annae* (*Babesia* "Spanish dog isolate", *Babesia* "microti-like", "*Babesia* (*Theileria*) *annae*", *Babesia* cf. *microti*, *Babesia vulpes*) (Baneth et al., 2019), příbuzná *B. microti*, zodpovědná za vážné klinické onemocnění v některých částech Evropy, jako Španělsko, Portugalsko nebo Chorvatsko (Nayyar Ghauri et al., 2019). Jejím rezervoárem jsou zejména lišky, předpokládaným vektorem klíšťata rodu *Ixodes*, případně *D. reticulatus* a *R. sanguineus* a proto lze výskyt této babézie předpokládat i na území ČR.

Piroplazmóza koní je rozšířená celosvětově, s výjimkou několika zemí (např. Austrálie, Kanada, Japonsko). Původcem jsou dva druhy piroplasem, *Theileria equi* a *Babesia caballi*, přenášené klíšťaty rodů *Rhipicephalus*, *Dermacentor* a *Hyalomma*; mimo to je možný i iatrogenní a u *T. equi* i transplacentární přenos (Onyiche et al., 2019). *B. caballi* napadá přímo erythrocyty, *T. equi* v první fázi lymfocyty, následně teprve erythrocyty. Česká republika byla považována za prostou této nákazy, nicméně nedávná studie prokázala autochtonní nákazu (i koinfekci oběma piroplasmami) jak sérologicky, tak přímým průkazem DNA u několika koní (Bělková et al., 2020). Vzhledem k intenzitě přepravy koní a četným nálezům klíštěte *D. reticulatus* na území České republiky se riziko vzniku případného ohniska nákazy zvyšuje.

Vysoce opomíjenou skupinou jsou piroplasmy volně žijících zvířat, z nichž některé jsou prokazatelně zoonotické (Krause, 2019; Young et al., 2019), jiné mohou způsobit fatální onemocnění při naze nepůvodních druhů. V ČR jsou významným rezervoárem několika druhů piroplasem volně žijící přežvýkavci (zejména jeleni a srnci). Na území ČR jsou popsány čtyři blízce příbuzné druhy, všechny přenášené klíštětem *Ixodes ricinus* (Hrazdilová et al., 2020). *B. divergens* je nejvýznamnějším z nich, je jak původcem babeziózy skotu způsobující významné ekonomické ztráty, tak druhem se zoonotickým

potenciálem (Zintl *et al.*, 2003). V ČR nebyly případy babeziózy u skotu ani u člověka v posledních desetiletích zaznamenány, ale výskyt *B. divergens* u >40% jelenů v ČR nelze ignorovat. Klinické případy lidské babeziózy způsobené druhem *Babesia* sp. EU1 (syn. *B. venatorum*) byly reportovány z několika Evropských zemí mj. v Německu a Rakousku. Babezióza může mít až fatální průběh, zejména u imunosuprimovaných, splenektomizovaných jedinců. Vzhledem k možnosti přenosu infekce nejen klíšťaty, ale i transfúzí či při manipulaci s infikovanými zvířaty nelze tyto prvoky v ČR ignorovat (Young *et al.*, 2019). *B. capreoli* je v ČR vlastní zejména srncům, pro ostatní zvířecí hostitele (např. na farmách chované soby) je potenciálně fatální (Malandrin *et al.*, 2010). Poslední je taxonomicky nepopsaný druh *Babesia* „deer-clade“, o jehož patogenitě pro zvířata i člověka lze pouze spekulovat (Hrazdilová *et al.*, 2020).

Přesná diferenciální diagnostika původce klinické piroplazmózy/babeziózy je zásadní z hlediska volby včasné a správné terapie. Rozšířená mikroskopická diagnostika je bez sporu nedostačující, přesné druhové zařazení umožňuje detekce DNA piroplasem s následnou sekvenací. Všechny výše zmíněné druhy s potenciálním výskytem v ČR lze detekovat univerzální a sensitivní metodou nestedPCR cílící na část 18S rRNA genu. Pouze v případě blízké příbuzných druhů (*B. divergens* a *B. capreoli*) je vhodné doplnit analýzu o sekvenaci genu podjednotky 1 cytochrome c oxidázy umožňující spolehlivé druhové zařazení.

Vlastní popis metodiky

Materiál a přístroje

10 ml odběrové zkumavky s antikoagulantem K3EDTA

Zkumavky typu eppendorf 1,5 ml

0,2 ml tenkostěnné PCR zkumavky, případně 8-mi zkumavkové PCR-stripy s jednotlivými víčky

Sterilní skalpel/čepel

Sterilní petriho misky

PCR cycler s vyhříváním víkem

Aparatura pro horizontální gelovou elektroforézu

Centrifuga na 10 ml zkumavky

Centrifuga na 1,5 ml zkumavky

Centrifuga na 0,2 ml zkumavky/stripy

Lednice (+4°C), mrazák (-20°C)

Odběr vzorků biologického materiálu

Vzorky zvířat

Pro diagnostické účely je odebírána periferní krev do plastových 10 ml zkumavek s antikoagulantem K3EDTA. Je třeba dodržet maximální hladinu krve označenou ryskou na zkumavce. Ihned po odběru je krev ve zkumavce nutné důkladně promíchat s antikoagulantem, uchovávat při +4°C a zpracovat bezprostředně po doručení do laboratoře nebo skladovat při -20°C do izolace DNA (je třeba minimalizovat počet cyklů zmražení/rozmražení).

Pro izolaci DNA z plné krve je třeba cca 200 µl krve (v závislosti na konkrétním použitém izolačním postupu; viz níže). V případě, že není možné odebrat periferní krev (zejména u kadaverních vzorků), lze jako alternativní materiál použít vzorek sleziny, případně jater. Sterilně odebranou tkáň lze před izolací DNA uchovávat v -20°C.

Vzorky klíšťat

Vzorky klíšťat lze krátkodobě (do 48 hodin) skladovat v +4°C, jinak je vložíme do ≥70% etanolu a skladujeme v -20°C. S klíšťaty manipulujeme sterilní pinzetou. Před izolací DNA provedeme oplach:

- 5 minut/destilovaná voda (nebo sterilní PBS)
- 5 minut/70-80% etanol
- 5 minut/ destilovaná voda (nebo sterilní PBS)
- Oschnutí na sterilním podkladu (filtrační papír, petriho miska apod.) následované izolací DNA

Izolace DNA

Z krve

Izolaci celkové DNA z krve lze provádět komerčně dostupnými kity jak manuálně tak automaticky. Při izolaci je potřeba dodržet návod výrobce konkrétního kitu. Lze použít kterýkoli z níže doporučených kitů, případně adekvátní alternativu (kvalitu extrakce je nutné ověřit na paralelní izolaci a následné detekci *A. phagocytophilum* 20 pozitivních a 10 negativních vzorků a výsledky porovnat s jedním z níže doporučených kitů).

Doporučené kity pro izolaci:

1. QIAamp DNA Blood mini kit, Qiagen, Germany
2. DNeasy Blood & Tissue Kits, Qiagen, Germany
3. Exgene Tissue SV (Plus!), GeneAll, Korea
4. Exgene Clinic SV, GeneAll, Korea
5. Exgene Cell SV, GeneAll, Korea
6. High Pure PCR Template Preparation Kit, Roche, Switzerland
7. MagCore Genomic DNA Whole Blood Kit, RBCBioscience, Taiwan
8. Maxwell 16 Blood DNA Purification Kit, Promega, USA

Z klíšťat/tkáně

Izolaci celkové DNA z klíšťat či tkáně lze provádět níže doporučenými komerčně dostupnými kity jak manuálně tak automaticky. Při izolaci je potřeba dodržet návod výrobce konkrétního kitu. Lze použít kterýkoli z níže doporučených kitů, případně adekvátní alternativu (kvalitu extrakce je nutné ověřit na paralelní izolaci a následné detekci *Babesia/Theileria* spp. 20 pozitivních a 10 negativních vzorků a výsledky porovnat s jedním z níže doporučených kitů). Je nutné zajistit adekvátní mechanické narušení vzorku pro usnadnění lyzačního kroku. V případě vzorků jedinců nedospělých stádií klíšťat (nymf) se pro izolaci použije celý vzorek; za použití sterilního skalpelu a sterilní petriho misky (či adekvátní alternativy) je potřeba vzorek před prvním, lyzačním krokem mechanicky rozmělnit. V případě dospělých klíšťat se vzorek sterilním skalpelem rozřízne podélně na poloviny, z nichž se pro izolaci DNA použije jedna, kterou je taktéž nutné mechanicky rozmělnit (viz. výše). Takto připravený vzorek je vstupním materiálem pro izolaci kitem. U tkání postupujte dle doporučení konkrétního výrobce.

Doporučené kity pro izolaci:

1. DNeasy Blood & Tissue Kits, Qiagen, Germany
2. Exgene Tissue SV (Plus!), GeneAll, Korea
3. Exgene Clinic SV, GeneAll, Korea
4. Exgene Cell SV, GeneAll, Korea
5. High Pure PCR Template Preparation Kit, Roche, Switzerland

Detekce cílové sekvence DNA – nested PCR

Pro detekci DNA piroplasem byl vybrán úsek genu 18s rRNA, který je dostatečně konzervovaný, umožňující navržení dvou sad primerů pro nested PCR obklopující variabilní úsek pro bližší charakterizaci izolátu. Amplifikovaný úsek cca 550-590 bp (~550 bp pro všechny druhy babézií, ~580 bp pro *T. equi* a ~590 bp pro *T. annae*) je přijatelně krátký, aby byl snadno amplifikovatelný a tím vhodný pro diagnostické účely, ale zároveň variabilní, aby umožnil zařazení do příslušného rodu/druhu. V současné době je dostupný dostatečný počet (>100 000) sekvencí 18S rRNA genu širokého spektra piroplasem umožňující jejich zařazení do rodů, případně druhů (viz. níže). Pro spolehlivé rozlišení druhů s nízkou variabilitou 18S rRNA genu (např. *B. divergens* a *B. capreoli* jsou >99% identické) je doporučena následná amplifikace a sekvenace Cox1.

Varianta nested PCR (tedy dvoukrokové amplifikace pomocí dvou setů primerů) je zvolena z důvodu vysoké sensitivity i specifity.

Sekvence primerů pro detekci 18S rDNA piroplasem

Název	Sekvence 5' → 3'	Délka produktu	Reference
BTH-F	CCTGMGARACGGCTACCACATCT	~680 nt	(Criado-Fornelio <i>et al.</i> , 2003)
BTH-R	TTGCGACCATACTCCCCCA		
GF2	GTCTTGTAATTGGAATGATGG	~560-590 nt	(Zintl <i>et al.</i> , 2011)
GR2	CCAAAGACTTTGATTTCTCTC		

Sekvence primerů pro detekci Cox1 piroplasem

Název	Sekvence 5' → 3'	Délka produktu	Reference
BaFor1	ATWGGATTYTATATGAGTAT	1250 nt	(Hrazdilová <i>et al.</i> , 2020)
BaRev1	TCTCTWCATGGWTTAATTATGATAT		
BaFor2	ATAATCWGGWATYCTCCTTGG	975 nt	
BaRev2	TAGCTCCAATTGAHARWACAAAGTG		

Kontroly PCR

Pro každou sadu testovaných DNA se používají dvě negativní kontroly. První slouží ke kontrole čistoty použitých reagensů, druhá ke kontrole pracovního postupu. Pro každou sadu testovaných vzorků se používá jedna pozitivní kontrola obsahující sekvenačně potvrzenou DNA *Babesia* sp..

Příprava reakční směsi a amplifikace

1. Reakční směs se připravuje vždy čerstvá v boxu dekontaminovaném UV zářením po dobu 10 minut; templát (vzorek či reakce prvního kola) se přidává mimo prostory pro přípravu mastermixu.
2. Roztoky, reagentie i vzorky necháme rozmrazit při +4°C, poté jemným poklepem na zkumavku promícháme (nevortexujeme) a centrifugujeme při maximálních otáčkách pět sekund.
4. Dle počtu analyzovaných vzorků (počet vzorků + 4) připravíme mastermix napipetováním jednotlivých komponent v pořadí a poměru uvedeném níže, vortexujeme 5 s, při maximálních otáčkách centrifugujeme 5 s a rozdělíme do jednotlivých PCR zkumavek či stripů s jednotlivými víčky (typ odpovídající použitému cykleru), které ihned uzavřeme.

	Objem na 1 reakci v μ l	
PCR H ₂ O	4	
Primer BTH-F 10 μ M	0,75	
Primer BTH-R 10 10 μ M	0,75	
2x PCRBIO Taq Mix Red (PCR Biosystems, UK)	7,5	
Objem mastermixu na 1 reakci	13	
vzorek		2 μ l
Celkový objem		15 μl

5. Do první negativní kontroly přidáme PCR vodu odpovídající objemu vzorku a uzavřeme.

6. Mimo box na přípravu mastermixu přidáme do jednotlivých PCR zkumavek/stripů odpovídající množství vzorků, pozitivní kontroly a PCR vodu do druhé negativní kontroly (v tomto pořadí). Nikdy nesmí být otevřeny dvě PCR zkumavky zároveň – po přidání vzorku je nutné jednotlivé zkumavky pečlivě uzavřít. Před amplifikací všechny PCR zkumavky/stripy centrifugujeme při maximálních otáčkách 5 s.

7. Amplifikace probíhá dle níže uvedeného teplotního profilu v cykleru s vyhřívaným víčkem (např. Biometra TRIO, Analytik Jena; T100/C1000 Thermal Cycler, BioRad).

18S rDNA	Teplota	Čas	Počet cyklů
Denaturace	95°C	1'	
Denaturace	95°C	15''	x 35
Annealing	60°C	15''	
Elongace	72°C	15''	
Finální elongace	72°C	5'	
	12°C	∞	

Cox1	Teplota	Čas	Počet cyklů
Denaturace	95°C	1'	
Denaturace	95°C	15''	x 35
Annealing	45°C	15''	
Elongace	72°C	1'	
Finální elongace	72°C	5'	
	12°C	∞	

Po skončení amplifikace a vychlazení cykleru na 12°C lze vzorky vyjmout a pokračovat dle bodu 8., případně je v tomto bodě možné postup přerušit a PCR zkumavky skladovat v +4°C (do 24 hodin), nebo -20°C (v řádu týdnů).

8. Mastermix pro druhé kolo PCR připravíme analogicky bodu 4. dle níže uvedeného rozpisu:

	Objem na 1 reakci v μl	
PCR H ₂ O	9,5	
Primer GF2 10 μM	1	
Primer GR2 10 μM	1	
2x PCR BIO Taq Mix Red (PCR Biosystems, UK)	12,5	
Objem mastermixu na 1 reakci	24	
Reakce prvního kola		1 μl
Celkový objem		25 μl

9. Mimo box na přípravu mastermixu přidáme do jednotlivých PCR zkumavek/stripů odpovídající množství reakce prvního kola - první negativní kontrolu, poté vzorky, pozitivní kontrolu a druhou negativní kontrolu (v tomto pořadí). Nikdy nesmí být otevřeny dvě PCR zkumavky zároveň – po přidání vzorku je nutné jednotlivé zkumavky pečlivě uzavřít. Před amplifikací všechny PCR zkumavky/stripy centrifugujeme při maximálních otáčkách 5 s.

10. Amplifikace probíhá dle níže uvedeného teplotního profilu v cyklu s vyhříváním víčkem (např. Biometra TRIO, Analytik Jena; T100/C1000 Thermal Cycler, BioRad).

18S rDNA	Teplota	Čas	Počet cyklů
Denaturace	95°C	1'	
Denaturace	95°C	15''	x 35
Annealing	50°C	15''	
Elongace	72°C	15''	
Finální elongace	72°C	5'	
	12°C	∞	

Cox1	Teplota	Čas	Počet cyklů
Denaturace	95°C	1'	
Denaturace	95°C	15''	x 35
Annealing	49°C	15''	
Elongace	72°C	1'	
Finální elongace	72°C	5'	
	12°C	∞	

Po skončení amplifikace a vychlazení cyklu na 12°C lze vzorky vyjmout a pokračovat ve vizualizaci PCR produktu, případně je v tomto bodě možné postup přerušit a PCR zkumavky skladovat v +4°C (do 24 hodin), nebo -20°C (v řádu týdnů).

Detekce cílové sekvence DNA – elektroforéza

Produkty amplifikace jsou separovány a vizualizovány na 1,5 – 2% agarózovém gelu v 1x TAE pufru v aparatuře určené pro horizontální elektroforézu (Lee *et al.*, 2012):

1. odpovídající množství agarózy (1,5 – 2,0 g/100 ml) v kvalitě pro molekulární biologii rozvaříme v 1x TAE pufru (40 mM Tris base, 20mM kyselina octová, 1mM EDTA) v mikrovlnné troubě a po vychlazení doplníme destilovanou vodou na původní objem

2. po vychladnutí na cca 50 °C přidáme 4 µl/100 ml MIDORIGreen Advance (Nippon Genetics, Germany) a po důkladném promíchání nalijeme do formičky, vložíme hřeben odpovídající počtu a objemu analyzovaných vzorků a necháme zchladnout a ztuhnout (cca 30 minut)
3. Gel vložíme do aparatury a přelijeme 1×TAE puřrem tak, aby hladina dosahovala 1-2 mm nad gel, vyjmeme hřeben
4. Do jednotlivých jamek pipetujeme 18 µl od každého vzorku, v pořadí: první negativní kontrola, velikostní standard, vzorky, volná jamka, pozitivní kontrola, velikostní standard, druhá negativní kontrola; zavřeme aparaturu a necháme proběhnout elektroforézu při 1-5 V/cm mezi elektrodami po dobu nutnou k dostatečné separaci produktů; velikostní standard volíme adekvátně délce PCR produktu (561 nt/975 nt), např. 100 bp DNA Ladder (New England Biolabs, USA/ThermoFisher Scientific, USA)
5. Po skončení elektroforézy jsou produkty vizualizovány prosvícením gelu na UV transluminátoru, obrazový výsledek zdokumentován a uložen do databáze pro dodatečné vyhodnocení nebo ověření.
6. V případě následné sekvenace PCR produktů vyřizneme jednotlivé bandy sterilním skalpelem tak, abychom minimalizovali množství nadbytečné agarózy a přemístíme je do sterilních 1,5 ml zkumavek. Produkty lze skladovat v +4°C (do 24 hodin), nebo -20°C (v řádu týdnů).

Příprava PCR produktů na sekvenaci

PCR produkty izolujeme z gelu komerčními kity dle doporučení výrobce (např. QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen, Germany; Gel / PCR DNA Fragments Extraction Kit, GenaAid Biotech, Taiwan).

Sekvenace

Sekvenace PCR produktů Sangerovým sekvenováním za použití apmifikačních primerů (GF2 a GR2/BaFor2 a BaRev2) může být řešena formou komerčně dostupné služby (např. Seqme, Macrogen Europe) nebo na pracovišti.

Analýza sekvenačního výsledku

Ověření identity PCR produktu

Chromatogramy (ve formátu .ab1) získané sekvenací obou řetězců složíme do tzv. contigu pomocí funkce assembly (např. volně dostupný software BioEdit, případně licencované softwary Geneious, CLCWorkBench apod.) a editujeme sekvenci tak, abychom získali výslednou sekvenci s vysokou kvalitou chromatogramů (zejména zkrátíme začátek a konec sekvenační reakce, tzv. trim ends).

Výslednou sekvenci porovnáme se sekvencemi dostupnými v databázi GenBank za využití algoritmu megaBLAST:

https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome

S následujícími parametry (ostatní nastavení zůstává defaultní):

Job Title: kód/název vzorku

Database: standard databases -> nucleotide collection (nr/nt)

Organisms: nevyplňujeme

Descriptions		Graphic Summary	Alignments	Taxonomy		
Sequences producing significant alignments						
<input checked="" type="checkbox"/> select all 100 sequences selected		GenBank Graphics Distance tree of results				
Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Babesia vulpes isolate MOS-1 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	1009	1009	100%	0.0	99.64%	MT509981.1
<input checked="" type="checkbox"/> Babesia cf. microti isolate FF11 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1009	1009	100%	0.0	99.64%	KY693667.1
<input checked="" type="checkbox"/> Babesia cf. microti isolate 322 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1009	1009	100%	0.0	99.64%	KY246306.1
<input checked="" type="checkbox"/> Babesia cf. microti isolate Dr27 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1009	1009	100%	0.0	99.64%	KY447297.1
<input checked="" type="checkbox"/> Babesia annae isolate Fox 129 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	1009	1009	100%	0.0	99.64%	KY486299.1
<input checked="" type="checkbox"/> Babesia vulpes isolate 03/00349 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1009	1009	100%	0.0	99.64%	KT223483.1
<input checked="" type="checkbox"/> Babesia annae clone 7-3 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1009	1009	100%	0.0	99.64%	KT580785.1
<input checked="" type="checkbox"/> Babesia sp. JH-2014 isolate 14C/14 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1009	1009	100%	0.0	99.64%	KP216411.1
<input checked="" type="checkbox"/> Babesia cf. microti isolate fox5 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1009	1009	100%	0.0	99.64%	KM115972.1
<input checked="" type="checkbox"/> Babesia cf. microti isolate fox1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1009	1009	100%	0.0	99.64%	KM115968.1
<input checked="" type="checkbox"/> Theileria annae isolate Fox-Theil1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1009	1009	100%	0.0	99.64%	HM212628.1

Druhové zařazení izolátu piroplasem

U většiny druhů lze druhové zařazení provést na základě výsledků porovnání získané sekvence části 18S rRNA genu s veřejně dostupnou databází GenBank. V případě, že je pět prvních nalezených sekvencí se 100% pokrytím analyzovaného úseku (tzv. Query cover) identických s izolátem >98% (tzv. Per Ident), pak lze daný izolát považovat za daný druh. Výjimkou je *Babesia* sp. deer clade, kde postačují tři první výsledky, z důvodu novosti druhu a nedostatku 18S rRNA sekvencí v databázi. Vzhledem k nízké variabilitě (<1%) genu 18S rRNA druhů *B. divergens*, *B. capreoli* a *Babesia* sp. deer clade, doporučujeme potvrdit druhovou příslušnost sekvencí úseku genu Cox1 s následnou BLAST analýzou (viz. Výše) se stejnými parametry druhového zařazení (Query cover 100%, Per Ident >98%).

Vzhledem k taxonomické nejednotnosti uvádíme možná synonyma jednotlivých druhů:

Druh	Délka ampliconu 18S rRNA	synonyma
<i>Babesia canis</i>	~550 nt	<i>Babesia canis canis</i>
<i>Babesia vogeli</i>	~550 nt	<i>Babesia canis vogeli</i>
<i>Babesia gibsoni</i>	~550 nt	
<i>Theileria annae</i>	~590 nt	<i>Babesia annae</i> , <i>Babesia vulpes</i> , <i>Babesia cf. microti</i> , <i>Babesia</i> sp. 'spanish dog'
<i>Babesia caballi</i>	~550 nt	
<i>Theileria equi</i>	~580 nt	<i>Babesia equi</i>
<i>Babesia divergens</i>	~550 nt	
<i>Babesia capreoli</i>	~550 nt	
<i>Babesia</i> sp. EU1	~550 nt	<i>Babesia</i> sp. 'venatorum'
<i>Babesia</i> sp. deer clade	~550 nt	<i>Babesia cf. odocoilei</i>

Srovnání novosti postupů

V současné době není v ČR k dispozici dostupná metodika zabývající se druhovým zařazením piroplasem na základě sekvenační analýzy. Běžně využívaná mikroskopická diagnostika umožňuje rozlišení pouze dvou kategorií, tzv. velkých a malých piroplasem. Testy detekující IgM/IgG protilátky je možné použít nejdříve 10-14 dnů po infekci, navíc bez druhové specifity (nebezpečí křížové reakce), takže nejsou vhodné k určení přesné diagnózy v počáteční, akutní fázi infekce ani ke specifikaci původce chronické infekce. Současně dostupná komerční PCR diagnostika se zaměřuje téměř výhradně na babézie infikující psy.

Zásadní novost postupu je dostupná a rychlá diagnostika s přesným druhovým zařazením na základě sekvenční podobnosti dvou genů, jaderného genu 18S rRNA a mitochondriálního Cox1 a ve stanovení jasných kritérií na základě sekvenční shody. Předložená metodika byla ověřena na širokém spektru hostitelských druhů i vektorů v ČR.

Ekonomické aspekty

Zavedení metodiky v diagnostické laboratoři s již zavedenou molekulární diagnostikou (PCR) nevyžaduje investice na implementaci výše popsaných postupů metodiky „Molekulární detekce a druhové zařazení piroplasem“.

Základní finanční náročnost materiálu pro zpracování jednoho vzorku (na základě cen platných v roce 2020) byla stanovena následovně:

	Cena v Kč
Izolace DNA	100,-
PCR (mastermix)	10,-
Izolace amplikonu z gelu*	20,-
Sekvenace*	180,-
Spotřební materiál (plastik, agaróza aj.)	50,-
Celkem za 1 vzorek: pozitivní*/negativní	360,-/160,-

Ekonomický přínos pro uživatele metodiky závisí na vybavení daného pracoviště, již zavedených postupech, personální kapacitě a v neposlední řadě na stanovené ceně vyšetření vzorků. Významnou roli bude hrát dostupnost a využití automatizace (izolátory DNA, pipetovací roboty apod.) a počet vzorků v jednotlivých krocích zpracovávaných paralelně.

Seznam použité související literatury

- Annoscia, G., Latrofa, M. S., Cantacessi, C., Olivieri, E., Manfredi, M. T., Dantas-Torres, F. and Otranto, D.** (2017). A new PCR assay for the detection and differentiation of *Babesia canis* and *Babesia vogeli*. *Ticks and Tick-borne Diseases* **8**, 862–865. doi: 10.1016/j.ttbdis.2017.07.002.
- Baneth, G., Cardoso, L., Brillhante-Simões, P. and Schnittger, L.** (2019). Establishment of *Babesia vulpes* n. sp. (Apicomplexa: Babesiidae), a piroplasmid species pathogenic for domestic dogs. *Parasites and Vectors* **12**,. doi: 10.1186/s13071-019-3385-z.
- Bělková, T., Jahn, P., Bártová, E., Řičařová, D., Jadnová, V., Hrazdilova, K., Modrý, D. and Sedlák, K.** (2020). Nálezy *Theileria equi* a *Babesia caballi* u koní v České republice. *Veterinářství* **3**, 174–178.
- Criado-Fornelio, A., Martinez-Marcos, A., Buling-Saraña, A. and Barba-Carretero, J. C.** (2003). Molecular studies on *Babesia*, *Theileria* and Hepatozoon in southern Europe: Part I. Epizootiological aspects. *Veterinary Parasitology* **113**, 189–201. doi: 10.1016/S0304-4017(03)00078-5.
- Hrazdilová, K., Rybářová, M., Šíroky, P., Votýpka, J., Zintl, A., Burgess, H., Steinbauer, V., Žákovčík, V. and Modrý, D.** (2020). Diversity of *Babesia* spp. in cervid ungulates based on the 18S rDNA and cytochrome c oxidase subunit I phylogenies. *Infection, Genetics and Evolution* **77**, 104060. doi: 10.1016/j.meegid.2019.104060.
- Krause, P. J.** (2019). Human babesiosis. *International Journal for Parasitology* **49**, 165–174. doi: 10.1016/j.ijpara.2018.11.007.

- Křivánková, J., Lásková, K., Sitařová, B., Hrazdilová, K., Modrý, D. and Hanzlíček, D.** (2018). Autochtonní babezióza u psa , popis klinického případu. *Veterinářství* **11**, 765–768.
- Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C. Y. and Kim, Y. H.** (2012). Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *Journal of Visualized Experiments* 1–5. doi: 10.3791/3923.
- Lempereur, L., Beck, R., Fonseca, I., Marques, C., Duarte, A., Santos, M., Zúquete, S., Gomes, J., Walder, G., Domingos, A., Antunes, S., Baneth, G., Silaghi, C., Holman, P. and Zintl, A.** (2017). Guidelines for the Detection of Babesia and Theileria Parasites. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* **17**, 51–65. doi: 10.1089/vbz.2016.1955.
- Malandrin, L., Jouglin, M., Sun, Y., Brisseau, N. and Chauvin, A.** (2010). Redescription of Babesia capreoli (Enigk and Friedhoff, 1962) from roe deer (Capreolus capreolus): Isolation, cultivation, host specificity, molecular characterisation and differentiation from Babesia divergens. *International Journal for Parasitology* **40**, 277–284. doi: 10.1016/j.ijpara.2009.08.008.
- Mitkova, B., Hrazdilova, K., Novotna, M., Jurankova, J., Hofmannova, L., Forejtek, P. and Modry, D.** (2017). Autochthonous Babesia canis, Hepatozoon canis and imported Babesia gibsoni infection in dogs in the Czech Republic. *VETERINARNI MEDICINA* **62**, 138–146. doi: 10.17221/152/2016-VETMED.
- Modrý, D., Modrý, M., Hrazdilová, K. and Mažgútová, D.** (2019). O stavu pijáků v zemích českých : výsledky ročního sledování výskytu Dermacentor reticulatus v České republice. *Veterinářství* **3**, 139–142.
- Nayyar Ghauri, H., Ijaz, M., Farooqi, S. H., Ali, A., Ghaffar, A., Saleem, S., Iqbal, M. K., Aziz, M. U., Ghani, U., Ullah, M. R. and Ahmad, H. M.** (2019). A comprehensive review on past, present and future aspects of canine theileriosis. *Microbial Pathogenesis* **126**, 116–122. doi: 10.1016/j.micpath.2018.10.033.
- Onyiche, T. E., Sukanuma, K., Igarashi, I., Yokoyama, N., Xuan, X. and Thekiso, O.** (2019). A review on equine piroplasmiasis: Epidemiology, vector ecology, risk factors, host immunity, diagnosis and control. *International Journal of Environmental Research and Public Health* **16**,. doi: 10.3390/ijerph16101736.
- Schnittger, L., Rodriguez, A. E., Florin-Christensen, M. and Morrison, D. A.** (2012). Babesia: A world emerging. *Infection, Genetics and Evolution* **12**, 1788–1809. doi: 10.1016/j.meegid.2012.07.004.
- Solano-Gallego, L., Sainz, Á., Roura, X., Estrada-Peña, A. and Miró, G.** (2016). A review of canine babesiosis: The European perspective. *Parasites and Vectors* **9**, 1–18. doi: 10.1186/s13071-016-1596-0.
- Young, K. M., Corrin, T., Wilhelm, B., Uhland, C., Greig, J., Mascarenhas, M. and Waddell, L. A.** (2019). *Zoonotic Babesia: A scoping review of the global evidence*. doi: 10.1371/journal.pone.0226781.
- Zintl, A., Mulcahy, G., Skerrett, H. E., Taylor, S. M. and Gray, J. S.** (2003). Babesia divergens, a bovine blood parasite of veterinary and zoonotic importance. *Clinical Microbiology Reviews* **16**, 622–636. doi: 10.1128/CMR.16.4.622.
- Zintl, A., Finnerty, E. J., Murphy, T. M., De Waal, T. and Gray, J. S.** (2011). Babesias of red deer (Cervus elaphus) in Ireland. *Veterinary Research* **42**, 7. doi: 10.1186/1297-9716-42-7.

Seznam publikací předcházejících metodice

Hrazdilová, K., Rybářová, M., Široký, P., Votýpka, J., Zintl, A., Burgess, H., Steinbauer, V., Žákovčik, V. and Modrý, D. (2020). Diversity of *Babesia* spp. in cervid ungulates based on the 18S rDNA and cytochrome c oxidase subunit I phylogenies. *Infection, Genetics and Evolution* **77**, 104060. doi: 10.1016/j.meegid.2019.104060.

Hrazdilova, K., Mysliwy, I., Hildebrand, J., Bunkowska-Gawlik, K., Janaczyk, B., Perec-Matysiak, A. and Modry, D. (2019). Paralogs vs. genotypes? Variability of *Babesia canis* assessed by 18S rDNA and two mitochondrial markers. *Veterinary Parasitology* **266**, 103–110. doi: 10.1016/j.vetpar.2018.12.017.

Dedikace

Vypracování metodiky bylo financováno projektem QK1920258 „Šíření klíšťat a klíšťaty přenášených onemocnění: nová a opomíjená rizika pro domácí a hospodářská zvířata a člověka“ v rámci Programu aplikovaného výzkumu Ministerstva zemědělství na období 2017-2025, ZEMĚ.