VŠCHT PRAHA

ÚSTAV TECHNOLOGIE VODY A PROSTŘEDÍ

Optimalizace metody PCR pro její využití na vzorky KONTAMINOVANÝCH PITNÝCH VOD

Dana Vejmelková, Milan Šída, Kateřina Jarošová, Jana Říhová Ambrožová

VODÁRENSKÁ BIOLOGIE, 1. 2. 2017

ÚVOD

Sledované parametry, princip PCR

KONTROLA MIKROBIÁLNÍ KVALITY PITNÝCH VOD

Vybrané mikrobiologické ukazatele v pitné vodě dané Vyhl. č. 252/2004 Sb.

Ukazatel	Jednotka	Limit	Typ limitu
Clostridium perfringens	KTJ/100 ml	0	MH
Intestinální enterokoky	KTJ/100 ml	0	NMH
Escherichia coli	KTJ/100 ml	0	NMH
Koliformní bakterie	KTJ/100 ml	0	MH

KONTROLA MIKROBIÁLNÍ KVALITY PITNÝCH VOD

SOUČASNOST

- kultivace
- 1-3 dny

BUDOUCNOST?

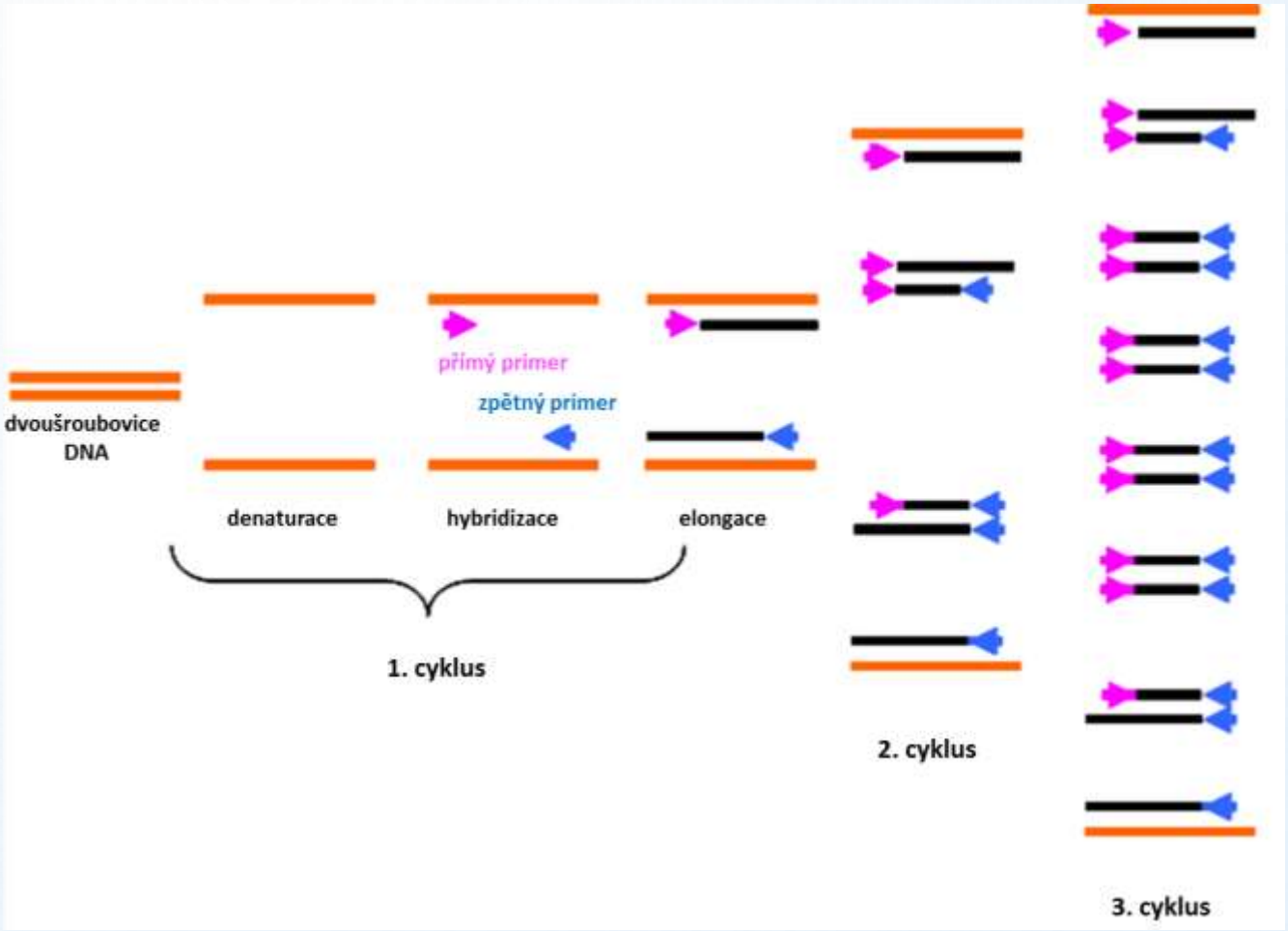
- PCR
- 4-5 h

MOŽNOSTI:

- izolace DNA/RNA
- PCR/qPCR

PRINCIP PCR

- pomnožení vybraného úseku DNA
- zkoumaný úsek ohraničen primery, různě specifické
- 3 základní kroky se cyklicky opakují
- počet kopií roste exponenciálně (2^n) (n = 25-50)



CÍL PRÁCE

Optimalizovat PCR tak, aby byla v určitých případech (havárie apod.) použitelná pro stanovení vybraných mikrobiologických ukazatelů v pitné vodě.

METODIKA

Izolace DNA, PCR

SCHÉMATICKÝ POSTUP PCR

izolace DNA

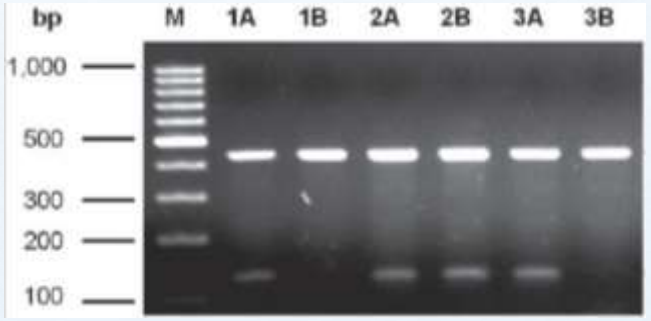
smíchání potřebných reagencií ve zkumavce

pomnožení úseku DNA (PCR)

gelová elektroforéza

obarvení DNA

fotodokumentace



ANO/NE

IZOLACE DNA

- filtrace vzorku (100 – 500 ml) přes membránový filtr
- 3 různé komerční kity:

Speciální pro vodu (součástí jsou zkumavky pro vložení filtru):

- **PowerWater** (MO BIO)

Další primárně určené na vzorky půdy:

- **Exgene Soil SV** (GeneAll)
- **NucleoSpin® Soil** (MACHEREY-NAGEL), 2 lyzační činidla: SL1, SL2

PCR – použité primery

Ukazatel	Označení páru primerů	Cílový gen	Velikost PCR produktu [bp]
koliformy, *E. coli*	lacZ	ß-D-galaktosidáza koliformních bakterií	264
	uidA	ß-D-glukuronidáza *E. coli*, shigel aj.	319
	cyd	cytochrom oxidáza d některých enterobakterií	393
	lacY	galaktosid permeáza některých enterobakterií	463
C. perfringens	cpa	α-toxin *Clostridium perfringens*	402
enterokoky	tuf	elongační faktor Tu enterokoků	112

Horáková 2008

PCR – multiplex

1x PCR	lacZ	uidA	cyd	lacY	tetraplex
pufr	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl
$MgCl_2$	1,6 µl	1,6 µl	1,6 µl	1,6 µl	1,6 µl
dNTP	0,75 µl	0,75 µl	0,75 µl	0,75 µl	0,75 µl
BSA	1,5 µl	1,5 µl	1,5 µl	1,5 µl	1,5 µl
primery (+/-)	0,5 µl každý	0,5 µl každý	0,5 µl každý	0,5 µl každý	0,5 µl každý
polymeráza	0,3 µl	0,3 µl	0,3 µl	0,3 µl	0,3 µl
PCR H_2O	12,35 µl	12,35 µl	12,35 µl	12,35 µl	**9,35** µl
templát (DNA)	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
celkem	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl

PCR – cyklační podmínky

Primery	Úvodní denaturace		Denaturace		Hybridizace		Extenze		Počet cyklů	Závěrečná extenze	
	T [°C]	t [s]	T [°C]	t [s]	T [°C]	t [s]	T [°C]	t [s]	-	T [°C]	t [s]
lacZ, uidA, cyd, lacY	**94**	**180**	**94**	**30**	**58**	**25**	**72**	**30**	**30**	**72**	**180**
tuf	95	180	95	30	55	30	72	60	35	72	420
cpa	94	300	94	60	55	60	72	60	30	72	180
tuf, cpa	**94**	**300**	**94**	**30**	**55**	**30**	**72**	**60**	**35**	**72**	**420**

VÝSLEDKY

Porovnání izolačních kitů

Zhodnocení filtrovaného objemu vzorku

Stanovení koliformů, *E. coli* a enterokoků + *C. perfringens*

POROVNÁNÍ 3 IZOLAČNÍCH KITŮ

- PowerWater (MO BIO)
- Exgene Soil SV (GeneAll)
- NucleoSpin® Soil (MACHEREY-NAGEL), 2 lyzační činidla: SL1, SL2

- koncentrace DNA – většinou **pod mezí detekce** (NucleoSpin® Soil)
- PCR možná, ale nemožnost standardizace množství DNA do reakce

Vzorek	Filtrovaný objem [ml]	DNA kit	Konc. DNA [ng/µl]	lacZ	cyd	uidA	lacY	tuf	cpa
V7	100	PW	< 0,5	?	?	-	-	+	-
	200	PW	< 0,5	+	+	-	+	+	-
	100	ES	< 0,5	+	+	-	+	+	-
	200	ES	< 0,5	+	+	-	+	+	-
	100	NS_SL1	< 0,5	-	+	-	-	-	-
	200	NS_SL1	**4,47**	+	+	-	-	+	-
V8	100	PW	< 0,5	+	+	-	+	+	-
	100	ES	< 0,5	+	+	-	+	+	-
	100	NS_SL1	**5,47**	+	+	+	+	+	-
	100	NS_SL2	**4,47**	+	+	+	+	+	-
V9	300	PW	< 0,5	+	+	+	+	+	-
	300	ES	< 0,5	+	+	?	+	+	-
	300	NS_SL1	< 0,5	+	+	+	+	+	-
	300	NS_SL2	< 0,5	+	+	?	+	+	-
V10	200	PW	< 0,5	?	?	-	+	+	-
	200	ES	< 0,5	?	?	-	-	+	-
	200	NS_SL1	< 0,5	?	?	-	+	+	-
	200	NS_SL2	< 0,5	?	?	-	+	+	-

ZHODNOCENÍ FILTROVANÉHO OBJEMU VZORKU

Vzorek	Filtrovaný objem [ml]	lacZ	cyd	uidA	lacY	tuf	cpa
V1	100	-	-	-	+	+	-
	500	+	+	+	+	+	-
V2	100	+	+	?	+	+	-
	500	+	+	+	+	+	-
V3	100	+	?	?	+	+	-
	500	+	+	+	+	+	-
V4	100	+	+	-	+	+	-
	500	+	+	+	+	+	-
V5	100	?	?	-	+	+	-
	500	+	+	+	+	+	-

ZHODNOCENÍ FILTROVANÉHO OBJEMU VZORKU

Kultivace:

- filtrace 100 ml → KTJ/100 ml
- vyrostlá kolonie z 1 buňky/několika buněk/shluku buněk?

PCR:

- izolace DNA/RNA
- DNA: 1 molekula/buňka, RNA: více/spousta? kopií

  → izolace DNA „blíž“ ke KTJ?

ZHODNOCENÍ FILTROVANÉHO OBJEMU VZORKU

„PCR je citlivá metoda, která umožňuje detekci **jediné kopie DNA** ve vzorku“

100 ml vzorku → 100 µl DNA → 5 µl do reakce = **20 %**

Jediná molekula DNA v původních 100 ml filtrovaného vzorku → nízká pravděpodobnost, že ji zrovna zachytíme pro PCR (pro jeden ukazatel).

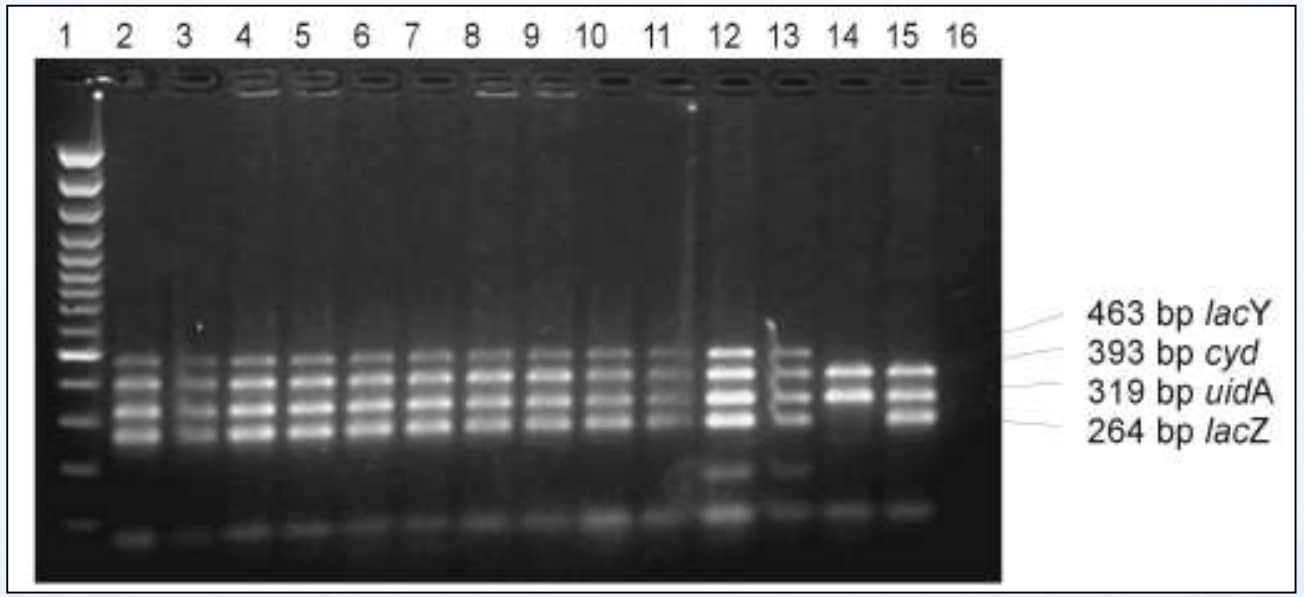
→ analýza 1 DNA ze 100 ml vzorku → filtrovat 20x 100 ml = **2000 ml vzorku**

ZÁVĚR (potřeba ověřit):

- filtrace 100 ml → izolace RNA
- filtrace cca 500 - 2000 ml vzorku → izolace DNA

Koliformy, *E. coli* – TETRAPLEX vs. DUPLEX

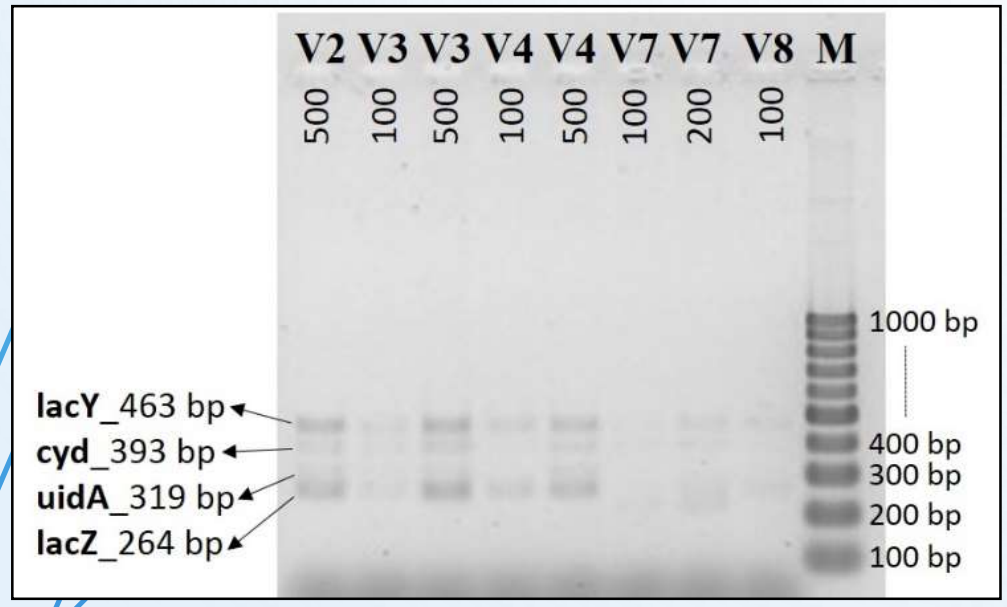
- 4 páry primerů (lacZ, uidA, cyd, lacY)
- *E. coli* = pozitivní se všemi 4 páry
- ostatní koliformy = 1 – 3 pozitivity

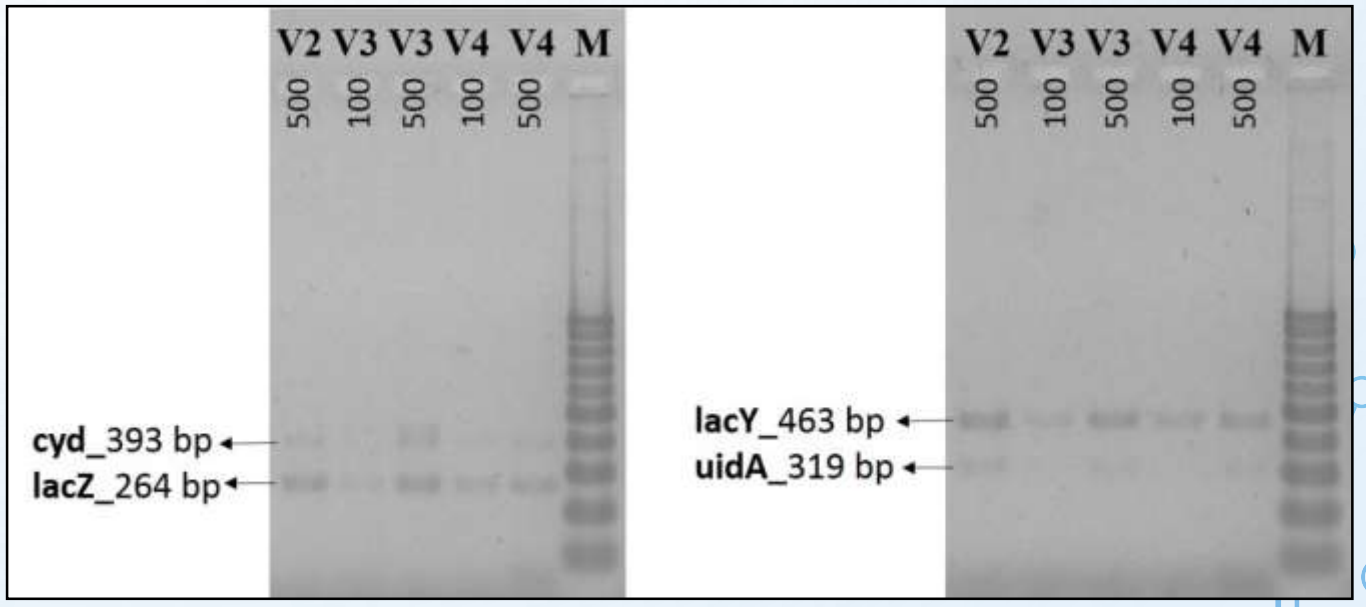


2-13: **sbírkové kmeny** *E. coli*, 14: *Shigella flexneri* CCM 4422, 15: *S. sonnei* CCM 4421 (Horáková 2008)

Koliformy, *E. coli* – TETRAPLEX vs. DUPLEX

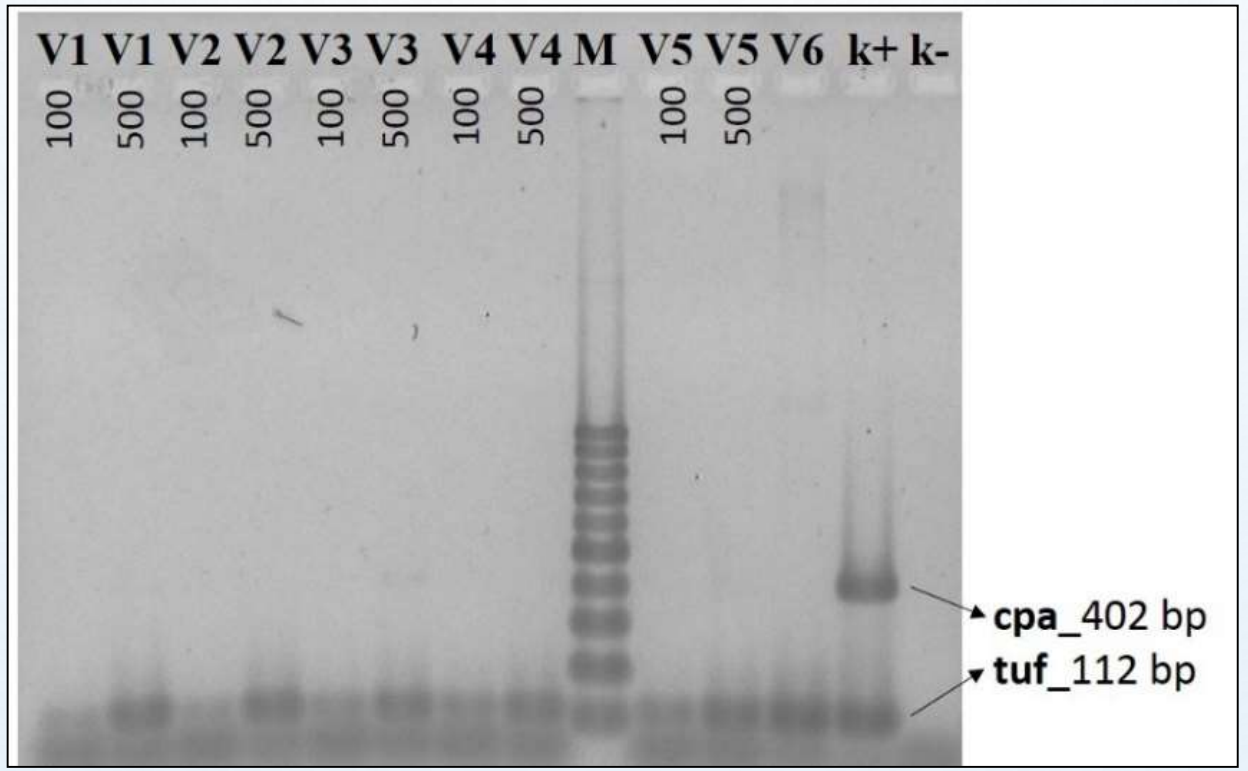
- kultivace: všechny vzorky pozitivní (koliformy i *E. coli* ve 100 ml)
- tetraplex: nejasné výsledky, především primer uidA
- duplex: přijatelnější výsledky
- doporučení: použití duplex PCR, popř. další optimalizace





Enterokoky, *C. perfringens* – DUPLEX PCR

- duplex: ověření u enterokoků + č. k. *C. perfringens*



Enterokoky, *C. perfringens* – PCR vs. KULTIVACE

- filtrace 100 ml vzorku

Vzorek	Enterokoky		*C. perfringens*	
	PCR - tuf	KTJ/100 ml	PCR - cpa	KTJ/100 ml
V1	+	přerostlé	-	1
V2	+	13	-	1
V3	+	0	-	0
V4	+	2	-	2
V5	+	5	-	3
V7	+	4	-	0
V8	+	4	-	2

→ kultivace F/P nebo PCR F/N ?

SHRNUTÍ

- testována a optimalizována **kvalitativní PCR** jako nejjednodušší a nejlevnější molekulárně biologická alternativa ke kultivačním stanovením
- **koliformní bakterie + *E. coli***: prozatímní doporučení duplex PCR, optimalizace
- **enterokoky + *C. perfringens***: funkčnost duplex PCR, ověřit na environmentálních vzorcích obsahující *C. perfringens* a zhodnocení F/N vs. F/P?

- limitace: vhodný DNA izolační kit, objem vzorku
- testování do budoucna: izolace **RNA** (100 ml vz.) vs. izolace **DNA** (500 - 2000 ml), **kvantitativní PCR**

PODĚKOVÁNÍ

PVK, a.s. za velmi **vstřícnou spolupráci** při přípravě testovaných vzorků a jejich dodání do naší laboratoře a dále za **finanční podporu** při řešení této problematiky v roce 2016.

DĚKUJI ZA POZORNOST

PCR – ČASOVÁ NÁROČNOST

JEDNOTLIVÉ KROKY	PRŮMĚRNÁ ČASOVÁ NÁROČNOST
FILTRACE VZORKU PŘES MEMBRÁNOVÝ FILTR	10 min
IZOLACE DNA/RNA	60 min
PCR	120 min
ELEKTROFORÉZA	60 min
BARVENÍ	15 (max 30) min
FOTODOKUMENTACE	5 min
celkem	4,5 h

PCR – PROVEDITELNOST

- mýtus o náročnosti na provedení
- většinu práce zvládne laborant/ka
- příklad z klinických laboratoří →

JEDNOTLIVÉ KROKY	PRACOVNÍK
FILTRACE VZORKU	laborant/ka
IZOLACE DNA/RNA	laborant/ka
sestavení protokolu	VŠ pracovník
PCR	laborant/ka
ELEKTROFORÉZA	laborant/ka
BARVENÍ	laborant/ka
FOTODOKUMENTACE	laborant/ka
vyhodnocení	VŠ pracovník

PCR – MOŽNÉ LIMITACE

- cena významně klesá s rostoucím počtem vzorků

  → vhodné zpracovávat více vzorků najednou

  → využitelné pouze ve větších provozech (cena provozu vs. transport vzorků)

- investiční náklady: PCR cykler, PCR box, elektroforetický systém, transiluminátor, fotodokumentační zařízení atd. (cca 280 000 Kč)

- provozní náklady: chemikálie (polymeráza), izolační kit, spotřební materiál (zkumavky, špičky apod.)

  ✕ kultivace také nejsou zadarmo (půdy, misky apod.)

Tab. 4.7: Přehled PCR produktů multiplex PCR u sbírkových kmenů

kontrolní sbírkové kmeny	PCR produkty			
	lacZ	*uidA*	*cyd*	*lacY*
Escherichia coli CCM 2024	+	+	+	+
Escherichia coli CCM 2260	+	+	+	+
Escherichia coli CCM 3773	+	+	+	+
Escherichia coli CCM 3880	+	+	+	+
Escherichia coli CCM 3954	+	+	+	+
Escherichia coli CCM 3988	+	+	+	+
Escherichia coli CCM 4225	+	+	+	+
Escherichia coli CCM 4517	+	+	+	+
Escherichia coli CCM 4723	+	+	+	+
Escherichia coli CCM 4724	+	+	+	+
Escherichia coli CCM 4787	+	+	+	+
Escherichia coli CCM 5172	+	+	+	+
Shigella sonnei CCM 4421	+	+	+	-
Shigella flexneri CCM 4422	-	+	+	-
Edwardsiella tarda CCM 2238	-	-	-	-
Yersinia enterocolitica CCM 5671	-	-	-	-
Enterobacter cloacae CCM 1903	+	-	-	+
Citrobacter koseri CCM 2535	+	-	-	-
Citrobacter freundii CCM 7187	+	-	-	+
Kluyvera ascorbata CCM 3669	+	-	-	+
Serratia marcescens CCM 303	-	-	-	-
Serratia odorifera CCM 3388	-	-	-	-
Rahnella aquatilis CCM 4086	-	-	-	-
Pragia fontium CCM 3716	-	-	-	-
Pseudomonas aeruginosa CCM 3955	-	-	-	-
Butiauxella agrestis CCM 4664	-	-	-	-
Budvicia aquatica CCM 3714	-	-	-	-
Morganella morganii ssp. *morganii* CCM 680	-	-	-	-
Providencia rettgeri CCM 4504	-	-	-	-
Hafnia alvei CCM 2636	-	-	-	-
Bacillus subtilis ssp. *spizizenii CCM* 1999	-	-	-	-
Proteus sp. CCM 1799	-	-	-	-
Staphylococcus aureus CCM 3953	-	-	-	-
Clostridium perfringens CCM 4435	-	-	-	-
Salmonella enterica ssp. *enterica* sérovar Enteritidis CCM 4420	-	-	-	-
Klebsiella pneumoniae ssp. *pneumoniae* CCM 5852	+	-	-	+
Klebsiella pneumoniae ssp. *pneumoniae* CCM 2800	-	-	+	-
Klebsiella pneumoniae ssp. *pneumoniae* CCM 4415	-	-	+	-
Klebsiella pneumoniae ssp. *ozaenae* CCM 5792T	-	-	+	-
Klebsiella pneumoniae ssp. *rhinoscleromatis* CCM 5791T	-	-	+	-
Klebsiella oxytoca CCM 2934	-	-	+	-
Klebsiella oxytoca CCM 3565	-	-	+	-
Raoutella planticola CCM 3721T	-	-	+	-
Raoutella planticola CCM 4428	+	-	-	+
Raoutella terrigena CCM 3570	-	-	+	-
Raoutella terrigena CCM 3568T	-	-	+	-

lacZ - sekvence genu kódujícího β-D-galaktosidázu, *uidA* - sekvence genu kódujícího β-D-glukuronidázu, *cyd* - sekvence genu kódujícího cytochrom d oxidázu, *lacY* - sekvence genu kódujícího galaktosid permeázu, + pozitivní výsledek amplifikace, - negativní výsledek amplifikace

Horáková K. (2008) Možnosti izolace a identifikace hygienicky významných bakterií ve vodách. Dizertační práce, Masarykova univerzita Brno

GENOTYPOVÉ METODY VS. KULTIVACE

KULTIVAČNÍ METODY

- detekce pouze kultivovatelných MO (cca 1 %)
- stresové podmínky (např. chlorace) → falešně negativní výsledek
- potřeba indikátorových organismů

METODY GENOTYPOVÉ

- nezávislé na kultivaci
- na úrovni genetické informace DNA/RNA

→ nerizikové pro pracovníky

- většinou časově méně náročné