



FUNKČNÍ VZOREK

**Technické řešení: Stanovení virucidní aktivity
dezinfekčních prostředků na virus afrického moru
prasat metodou povrchového testu za podmínek nízké
a vysoké biologické zátěže**

RNDr. Jana Prodělalová, Ph.D.

4713
2020

Funkční vzorek

4713/2020

Technické řešení: Stanovení virucidní aktivity dezinfekčních prostředků na virus afrického moru prasat metodou povrchového testu za podmínek nízké a vysoké biologické zátěže.

RNDr. Jana Prodělalová, Ph.D.

2020

ISBN 978-80-7672-003-9

Funkční vzorek

Technické řešení: Stanovení virucidní aktivity dezinfekčních prostředků na virus afrického moru prasat metodou povrchového testu za podmínek nízké a vysoké biologické zátěže.

RNDr. Jana Prodělalová, Ph.D.

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

Funkční vzorek byl vytvořen v rámci projektu Národní agentury pro zemědělský výzkum, číslo projektu QK1920187, název projektu Africký mor prasat v České republice: studium molekulární epizootologie a biologických vlastností tuzemských izolátů viru.

OBSAH

1. Úvod	3
2. Cíl metodiky funkčního vzorku	3
3. Vlastní popis funkčního vzorku	3
a. popis a příprava testovacího virového kmene	3
b. příprava buněčné linie	4
c. provedení testu	4
d. odečtení výsledku a vyhodnocení testu	4
4. Seznam použité literatury	5
5. Srovnání novosti postupů	5
6. Popis uplatnění funkčního vzorku	5
7. Ekonomické aspekty	5
8. Dedikace	5

1. Úvod

Biocidy představují zásadní prvek při zdolávání infekčních onemocnění lidí i zvířat. Účinnost biocidů vůči jednotlivým typům patogenů je stanovována za poměrně přísných podmínek, které jsou dány normami. Tyto normy však využívají konkrétní, přesně definované testovací virové kmeny, které jsou využívány jako modelové pro skupiny virů s určitými vlastnostmi (především obalené a neobalené viry). V případě nutnosti otestovat virus, který není běžně v testech z různých důvodů používán (např. v případě nebezpečných nebo obtížně kultivovatelných virových patogenů) je nutné postup optimalizovat s ohledem na vlastnosti daného virového kmene (např. titr viru, odolnost vůči zaschnutí, možnost kvantifikace). Metodický postup byl vytvořen na základě znalostí, které byly získány v naší laboratoři a publikovány v odborných časopisech (Prodělalová et al. 2017; Dvořáková et al. 2008).

2. Cíl metodiky funkčního vzorku

Cílem funkčního vzorku je poskytnout technické řešení testování účinnosti dezinfekčních prostředků na virus AMP za specifických podmínek vysokého stupně biologického znečištění, které simuluje situaci v terénu. Technické řešení je navrženo s ohledem na maximální robustnost postupu tak, aby byl v konkrétních fázích variabilní a umožňoval uživateli navrhnout vhodné řešení ve vztahu k testovanému biocidu a podmínkách, ve kterých se plánuje jeho používání.

3. Vlastní popis funkčního vzorku

a. popis a příprava testovacího virového kmene

Jako testovací virus je použit virus afrického moru prasat (AMPV) kmen Ba71V. Jedná se o atenuovaný laboratorní kmen genotypu I. Kmen lze získat z Evropské referenční laboratoře pro Africký mor prasat ve Španělsku (Union Reference Laboratory for African Swine Fever, CISA-INIA, Madrid, Spain); vzhledem k tomu, že je řazen mezi vysoce rizikové biologické činitele, musí být nakládání s tímto virem povoleno Státním úřadem pro jadernou bezpečnost (SÚJB) za podmínek stanovených úřadem.

Ba71V je schopen se pomnožovat na buněčné linii VERO a produkuje zde typický cytopatický efekt (CPE). Pro přípravu testovacího viru o dostatečné koncentraci (alespoň $10^{6,5}$ TCID₅₀), která je nutná k provedení testu, doporučujeme proto použít virové inokulum naředěné až 1000x, což sice prodlouží dobu kultivace (cca 5 až 7 dnů), ale na druhou stranu má získaná virová suspenze vyšší titr. V případě potřeby je možné virovou suspenzi zakoncentrovat pomocí koncentrátoru Pierce™ Protein Concentrator PES, 30 MWCO, 20-100 ml (Thermo Scientific).

Virovou suspenzi je nutné uchovávat při -80 °C v alikvotech určených pro provedení jednoho testu, neboť ji nelze opakovaně rozmrazovat.

b. příprava buněčné linie

Pro pomnožení a titraci kmene Ba71V se využívá buněčná linie VERO pocházející z opičích ledvin (*Cercopithecus aethiops*) z prověřeného zdroje (např. ATCC nebo jiné sbírky). V případě použití VERO buněčné linie z vlastního zdroje je nanejvýš vhodné ověřit její autenticitu a kontaminaci mykoplazmami. Při práci s buněčnou linií je vždy potřeba postupovat dle pokynů dodavatele. Pro potřeby stanovení koncentrace infekčního viru je na jeden test potřeba jedna 96 jamková mikrotitrační deska pro kultivaci buněk s rovným dnem s narostlým 24 hodinovým monolayerem VERO buněk.

c. provedení testu

- Smíchat 900 μl virové suspenze a 100 μl interferující látky, která simuluje biologické znečištění. Jako interferující látky se používá fetální bovinní sérum (FBS) a defibrinovaná beraní krev. Pro nižší stupeň znečištění se k virové suspenzi přidá FBS ve finální koncentraci 2 % a pro vyšší stupeň znečištění FBS nebo defibrinovaná beraní krev ve finální koncentraci 10 %.
- 30 μl připravené směsi se kápne na dno sterilní polystyrenové Petriho misky určené pro práci s tkáňovými kulturami a nechá se zaschnout při pokojové teplotě v biohazard boxu.
- Následně se zaschlý virus pokryje 27 μl roztoku testovaného dezinfekčního prostředku a inkubuje se požadovanou dobu při požadované teplotě.
- Současně se inkubuje kontrolní experiment, kdy se zaschlý virus pokryje destilovanou vodou namísto dezinfekčního prostředku.
- Po uplynuté doby expozice se přidá 243 μl ledově vychlazeného kultivačního média určeného pro práci s VERO buňkami a virus se pečlivě resuspenduje seškrabáním (získá se tak ředění viru 10^{-1}).
- Virová suspenze se naředí desítkovou řadou opět v ledově vychlazeném kultivačním médiu do ředění 10^{-8} .
- Každé ředění se vždy po čtyřech jamkách kultivuje na mikrotitrační desce.
- Každý test, i kontrolní, se provádí v biologickém duplikátu.
- Výsledek se odečítá mikroskopicky p 5 až 7 dnech.

d. vyhodnocení testu

Infekční virový titr (lg TCID_{50}) se počítá s využitím metody podle Spearman-Kärbera (Finney, 1964). Hodnota virucidní aktivity je vyjádřena jako rozdíl mezi infekčním titrem virové kontroly a titrem viru po ošetření dezinfekčním prostředkem (tj. lg TCID_{50} kontrolního experimentu s vodou mínus lg TCID_{50} testu s dezinfekčním prostředkem). Za účinný se považuje ten dezinfekční prostředek, který sníží infekční titr viru o alespoň 99,99 %, t.j. o čtyři logaritmické řády.

4. Seznam použité literatury

Dvorakova, H., Reichelova, M., Prodelalova, J. (2008). Comparative inactivation of Aujeszky's disease virus, Porcine teschovirus and Vesicular stomatitis virus by chemical disinfectants. *Veterinarni medicina* 53(5),236-242.

Finney, D.J. (1964). The Spearman-Kärber method. *Statistical methods in biological assays*. Charles Griffin, London, UK, p. 524-530.

Prodelalova, J., Malenovska, H., Moutelikova, R., Titera, D. (2017). Virucides in apiculture: persistence of surrogate enterovirus under simulated field conditions. *Pest Management Science* 73(12),2544-2549.

5. Srovnání novosti postupů

Technické řešení představuje modifikaci normovaných postupů tak, aby bylo možné testovat účinnost dezinfekčních prostředků na virus afrického moru prasat za specifických podmínek vysokého biologického znečištění, které se dá očekávat v chovech i při aktivitách souvisejících s myslivostí.

6. Popis uplatnění funkčního vzorku

Funkční vzorek nalezne uplatnění ve virologických laboratořích, které testují virucidní aktivitu chemických dezinfekčních prostředků nebo při vývoji nových typů účinných látek biocidů, a to v případě, kdy jsou testované přípravky určeny pro veterinární oblast, zemědělství a lesnictví.

7. Ekonomické aspekty

Ekonomické aspekty funkčního vzorku nelze v danou chvíli hodnotit. Jedná se o nadstavbovou metodu, se značnou finanční, materiálovou, metodickou i časovou náročností, která ovšem, pokud bude správně použita, představuje značný přínos při řešení výskytu AMP u divočáků.

8. Dedikace

Funkční vzorek byl vytvořen v rámci projektu Národní agentury pro zemědělský výzkum, číslo projektu QK1920187, název projektu Africký mor prasat v České republice: studium molekulární epizootologie a biologických vlastností tuzemských izolátů viru.

VÚVeL 

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