



PROTOTYP/FUNKČNÍ VZOREK

**Diagnostický prostředek pro simultánní detekci
influenzy typu A (IVA), influenzy typu B (IVB)
a koronaviru SARS-CoV-2**

**Mgr. Jakub Hrdý
Mgr. Magdaléna Krásna**

405
2021

Prototyp/Funkční vzorek

405/2021

**Diagnostický prostředek pro simultánní detekci influenzy typu A (IVA),
influenzy typu B (IVB) a koronaviru SARS-CoV-2**

Jakub Hrdý
Magdaléna Krásna

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

ISBN 978-80-7672-006-0

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i. Hudcova 70 621 00 BRNO	Druh dokumentace: Popis technického řešení pro přihlášku prototypu	Verze: 01 Strana: 2/11 Počet příloh: 0		
Výtisk č.1		Účinnost od: 1. 2. 2021		
<p>Název dokumentace:</p> <p>Diagnostický prostředek pro simultánní detekci influenzy typu A (IVA), influenzy typu B (IVB) a koronaviru SARS-CoV-2</p> <p>Popis technického řešení pro přihlášku prototypu</p>				
Evidence o převzaté dokumentaci				
Číslo výtisku	Funkce	Jméno	Datum	Podpis
1	vedoucí oddělení	Ivan Rychlík	1. 2. 2021	
2				
3				
4				
5				
Evidence o seznámení s dokumentací				
	Funkce	Jméno	Datum	Podpis
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
Rozsah působnosti: Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.	Zpracoval: Jakub Hrdý Magdaléna Krásna	Vydal: Jakub Hrdý	Schválil: Ivan Rychlík	

Obsah

1. Úvod.....	4
2. Oblast techniky	4
3 Aktuální stav techniky (diagnostiky)	5
4. Popis technického řešení a nároků na ochranu	6
5. Nároky na ochranu	7
6. Vysvětlení nároků na ochranu	9
7. Seznam materiálu obsaženém v diagnostické soupravě	10
8. Literatura.....	12

Vývoj prototypu diagnostického prostředku – detekční soupravy probíhal v rámci řešení projektu Ministerstva vnitra ČR VI20152020044.

1. Úvod

Virová agens jsou nejčastějšími původci infekcí respiračního traktu, které se svou morbiditou představují významnou socioekonomickou zátěž. Klinické projevy těchto onemocnění jsou často velmi podobné, stanovení jejich původce je proto velmi obtížné. Z tohoto důvodu je žádoucí vytvoření dostatečně rychlé, senzitivní a specifické metody jejich detekce za účelem snížení negativních dopadů špatně indikované léčby či dalšího šíření infekce. Mezi časté původce závažných lidských virových onemocnění dýchacích cest patří původce sezónní chřipky typu A a B. Celosvětově se chřipce přičítá přes 645 tisíc úmrtí ročně (1). Subtypy viru chřipky typu A mají na svědomí i jedny z největších pandemií v dějinách lidstva, v případě tzv. španělské chřipky bylo postiženo více než 500 miliónů lidí, z nichž více než 50 miliónů zemřelo (2). V současné době pandemie onemocnění COVID-19 je zapotřebí odlišit tyto chřipkové viry od původce tohoto onemocnění – nového typu koronaviru SARS-CoV-2.

Polymerázová řetězová reakce v reálném čase (qPCR) je zejména kvůli citlivosti, specifitě a možnosti kvantifikace v současné době nejvhodnější metodou průkazu výše uvedených agens. V případě virů, jejichž genom je kódován RNA, nutně předchází qPCR krok reverzní transkripce (RT; RT-qPCR). Metoda qPCR má však velkou nevýhodu v omezené možnosti vytvářet multiplexní systémy pro rychlou simultánní detekci většího počtu patogenů. Proto byl vyvinut diagnostický prostředek, který umožňuje *in vitro* detekci IVA, IVB a SARS-CoV-2 v různých typech matric (voda, potraviny, stěry z prostředí či rukou osob a klinický materiál) v jedné reakci. Tento prostředek, označen jako „xMAP panel – detekce IVA, IVB a SARS-CoV-2“, je unikátní svým složením a jednoduchostí použití. Souprava zahrnuje i externí kontrolu analýzy vzorků (EAC), která umožňuje validní analýzu každého jednoho vzorku. Tento detekční nástroj je navržen v souladu s aktuálně platnou legislativou ČR a EU (3, 4).

2. Oblast techniky

Produkt je zaměřen na diagnostiku v oblasti bezpečnosti prostředí, potravin a především humánní medicíny.

3 Aktuální stav techniky (diagnostiky)

Vzhledem k tomu, že kultivace výše uvedených virových agens na buněčných kulturách je pracně a časově náročná, jsou metody detekce těchto virů založeny především na molekulárně genetických (tzn. na přímé detekci genomu viru), případně i imunologických metodách. Na současném trhu existuje řada dostupných komerčních produktů sloužících ve zdravotnické diagnostice (tzn. k průkazu IVA, IVB a SARS-CoV-2 v klinickém materiálu). Pověštinou jde o systémy založené na qPCR metodách. Nicméně tyto produkty v rámci jedné reakce umožňují detekovat často pouze jeden patogen. Limitované schopnosti qPCR vytvářet multiplexní systémy (omezený počet fluorescenčních kanálů) vedou častokrát k tomu, že i v případě, že je více cílů pro daný patogen v rámci jedné reakce, je jejich detekce sledována ve stejném kanále. Analýza vzorků na přítomnost většího množství patogenů / cílů tak může být finančně i časově náročná.

Na trhu existuje několik komerčně dostupných souprav určených pro detekci zmíněných respiračních virů. Cena souprav (kombinace dvou systémů se společnou interní kontrolou) od společnosti GeneProof (Česká republika) pro průkaz IVA, IVB, SARS-CoV-2 a respiračního syncytiálního viru je 33 725 Kč bez DPH / 100 reakcí. Tzn. analýza jednoho vzorku na přítomnost IVA, IVB a respiračního syncytiálního viru je ceněna na 760 Kč bez DPH a SARS-CoV-2 na 592 Kč bez DPH. Společná interní kontrola vychází na asi 27 Kč bez DPH na 1 vzorek. Jiná alternativa, detekční kit pro IVA, IVB a SARS-CoV-2 od společnosti Ingenetix (Rakousko), nabízí analýzu za cenu 27 000 Kč bez DPH / 100 reakcí (analýza jednoho vzorku je ceněna na 1080 Kč bez DPH). Společnost Genespector (Česká republika) nabízí kit pro detekci IVA, IVB a SARS-CoV-2 za cenu 23 800 Kč bez DPH / 100 reakcí (analýza jednoho vzorku stojí 952 Kč bez DPH). Ceny jsou uvedeny pro analýzu prováděnou dle požadavků ISO metod v duplikátu s neřaděnou a 10× nařaděnou nukleovou kyselinou, cena je bez započítání izolace nukleových kyselin a negativních kontrol.

Náklady na provedení analýzy jednoho vzorku při využití výše zmíněného multiplexního detekčního nástroje na průkaz přítomnosti IVA, IVB a SARS-CoV-2 se pohybují okolo 756 Kč bez DPH (analýza dle požadavků ISO metod prováděna v duplikátu s neřaděnou a 10× nařaděnou nukleovou kyselinou, cena je bez započítání izolace nukleových kyselin a negativních kontrol). Oproti v současnosti dostupným komerčním soupravám tak toto řešení představuje méně finančně náročnou variantu. Nespornou výhodou tohoto nástroje je možnost

přidání dalších detekčních cílů/patogenů/ mutací dle aktuálních potřeb bez znatelného navýšení nákladů.

4. Popis technického řešení a nároků na ochranu

Technické řešení diagnostického prostředku, který umožňuje *in vitro* detekci IVA, IVB a SARS-CoV-2 v různých typech matric (klinický materiál, voda, potraviny a stěry z prostředí či rukou osob). Toto diagnostické řešení využívá kombinaci xMAP technologie (Luminex corporation, USA, Texas), multiplexní oligonukleotidové ligační reakce a polymerázové řetězové reakce s předcházejícím krokem reverzní transkripce. Spojení těchto technologií umožňuje v jedné reakci analýzu vzorku na přítomnost nukleových kyselin IVA, IVB a SARS-CoV-2.

Jako externí kontrola jednotlivých kroků analýzy u každého vzorku je použit defektní bakteriofág MS2. Tento přístup, tzn. použití přesně definovaného množství externí kontroly ve spojení s xMAP technologií, umožňuje kontrolu analytického postupu každého jednoho analyzovaného vzorku. Metoda je specifikována jedinečnými parametry, které umožňují její použití v oblasti bezpečnosti prostředí, potravin i humánní medicíny. Zvolené řešení je unikátní v následujících položkách:

Externí kontrola postupu analýzy vzorku (EAC)

- Externí kontrola celého postupu analýzy vzorků na přítomnost IVA, IVB a SARS-CoV-2 je složena ze specifických sekvencí dvou vyhynulých živočišných druhů; vakovlka tasvánské (*Thylacinus cynocephalus*) a ptáka moa (*Dinornis struthoides*). Specifická sekvence je začleněna do genomu bakteriofága MS2 a obalena jeho proteiny. Připravený konstrukt je zcela arteficiální, proto je defektní částice MS2 možné použít k umělé kontaminaci každého typu vzorku.
- Pro účely zajištění sensitivity a specifity procesu detekce externí kontroly byly navrženy a testovány specifické unikátní sekvence nukleových kyselin (viz Seznam materiálu; tzv. oligonukleotidy, které jsou součástí reakčních směsí).
- Externí kontrola je stabilní minimálně 12 měsíců při teplotě -20 ± 4 °C.

Složení diagnostického produktu „xMAP panel – detekce IVA, IVB a SARS-CoV-2“ a jeho uživatelské vlastnosti

- Reakční směsi pro reverzní transkripci (tzv. RT1, RT2 a RT3) obsahují veškeré reakční složky nezbytné pro průběh reverzní transkripce: enzym reverzní transkriptázy, RNase inhibitor, deoxyribonukleotidy (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), reakční pufr a směs potřebných oligonukleotidů (úseků nukleové kyseliny - tzv. primerů) v definovaných koncentracích. Směs specifických oligonukleotidů zajistí analýzu vzorku na přítomnost RNA IVA, IVB, SARS-CoV-2 a EAC.
- Ligační směsi (LG1 a LG2) obsahují veškeré reakční složky pro průběh ligace: ligázu, pufr, specifické oligonukleotidy v definovaných koncentracích. Směs specifických oligonukleotidů zajistí analýzu vzorku na přítomnost genomu IVA, IVB, SARS-CoV-2 a EAC.
- Reakční směs (tzv. PCRMix) v jedné zkumavce obsahuje veškeré reakční složky nezbytné pro průběh PCR. Tyto složky jsou: enzym polymeráza, deoxyribonukleotidy (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), reakční pufr s optimalizovaným množstvím iontů hořčíku (Mg^{2+}), směs všech potřebných oligonukleotidů (převzato z ⁽⁵⁾), která zajistí analýzu vzorku na přítomnost genomu IVA, IVB, SARS-CoV-2 a EAC.
- Mix specifických mikrosfér, jejichž fluorescenční signál umožní stanovit přítomnost genomu IVA, IVB, SARS-CoV-2 a EAC.
- Produkt kromě výše popsaných reakčních směsí obsahuje zkumavku "pozitivní kontrola", kterou je možno použít jako pozitivní kontrolu reakcí, a příbalovou informaci o použití diagnostické soupravy (včetně návodu k interpretaci získaných výsledků).
- Práce s produktem u uživatele spočívá pouze v odebrání potřebného předepsaného množství „reakční směsi“ a přidání vzorku nebo „pozitivní kontroly“.
- Produkt je v popsaném složení stabilní minimálně 12 měsíců při teplotě -20 ± 4 °C.

5. Nároky na ochranu

- 1) Sekvence nukleotidů cílových úseků externí kontroly analytického postupu nebo jejich části, použité jako oligonukleotidy (rozpoznávací sekvence pro metodu RT a ligaci) 5'-3':

- a. GGTTTAGAATGTTTTCTCCCGT
- b. PHO-ATTAGCACAATGAATAATCATCGTCTCACTTCTTACTACCGCG
- c. ACTCGTAGGGAATAAACCGTATTGTGAAAGAAAGAGAAGAAATTTA
TACACACGCAATCACCAC

2) Sekvence oligonukleotidů specifických k cílovým úsekům genomu IVA, IVB a SARS-CoV-2 (rozpoznávací sekvence pro metodu RT a ligaci) 5' - 3':

- a. CTGTTCGTCTCTTCCACTCAC
- b. PHO-GGTATGAGGAGTTCACAATGTCTCACTTCTTACTACCGCG
- c. ACTCGTAGGGAATAAACCGTAATTAGAAGTAAGTAGAGTTTAAGCA
TTGAAGATAAGAGTACATGAGG
- d. TTCCAGGATTCAGGTACATGAC
- e. PHO-GAATGGGAACAACAGCAACAAATCTCACTTCTTACTACCGCG
- f. ACTCGTAGGGAATAAACCGTGTATGTTGTAATGTATTAAGAAAGCA
TCACAGAGCCCCTATCAG
- g. CTTTGTTAGCACCATAGGGAA
- h. PHO-GTATTTCTACTACCTAGGAACTGGTCTCACTTCTTACTACCGCG
- i. ACTCGTAGGGAATAAACCGTATTAAGTAAGAATTGAGAGTTTGATG
AAAGATCTCAGTCCAAGATG
- j. TGATGATCGGCTGCAACACG
- k. PHO-GAACTTTAAAATCTGTGTGGCTGTCTCACTTCTTACTACCGCG
- l. ACTCGTAGGGAATAAACCGTAGTGAATGTAAGATTATGTATTTGTCT
CTGTAGATCTGTTCTCTAAAC

3) Složení reakčních směsí, tzv. RT1, LG1, LG2, PCRmix, BM1, které obsahují minimálně tyto reakční složky nezbytné pro průběh reakce: enzymy reverzní transkriptáza, ligáza a polymeráza, deoxyribonukleotidy (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), reakční pufry, RNase inhibitor, směs všech potřebných oligonukleotidů (specifických úseků nukleové kyseliny), mix specifických mikrosfér.

6. Vysvětlení nároků na ochranu

Ad1 - 2) Jedná se o unikátní sekvence, které dosud nebyly použity, byly originálně navrženy a testovány v laboratořích Výzkumného ústavu veterinárního lékařství, v.v.i.. S jejich pomocí je možné technologií založenou xMAP provést validní analýzu vzorů na přítomnost genomu IVA, IVB, SARS-CoV-2 a EAC. Sekvence externí kontroly analytického postupu je naprosto jedinečná, proto připravený konstrukt (defektní bakteriofág MS2) je možné použít k umělé kontaminaci jakékoli matrice (klinický materiál, potravin, prostředí). Tzn. metodika je použitelná pro diagnostiku v rámci humánní medicíny a bezpečnosti potravin a prostředí. Přesné určení sekvencí genomu výše uvedených virových agens a externí kontroly je podmínkou správné a přesné hybridizace nukleových kyselin ve vyšetřovaném vzorku s navrženými krátkými sekvencemi DNA (oligonukleotidy); tyto specifické oligonukleotidy se tak váží výhradně na nukleovou kyselinu výše uvedených virů a externí kontroly. Předmětem ochrany tedy mají být právě uvedené sekvence nukleotidů, které jsou použity v tomto diagnostickém prostředí 5' - 3':

- a) GGTTTAGAATGTTTTCTCCCGT
- b) PHO-ATTAGCACAATGAATAATCATCGTCTCACTTCTTACTACCGCG
- c) ACTCGTAGGGAATAAACCGTATTGTGAAAGAAAGAGAAGAAATTTATACA
CACGCAATCACCAC
- d) CTGTTCGTCTCTTCCACTCAC
- e) PHO-GGTATGAGGAGTTCACAATGTCTCACTTCTTACTACCGCG
- f) ACTCGTAGGGAATAAACCGTAATTAGAAGTAAGTAGAGTTTAAGCATTGA
AGATAAGAGTACATGAGG
- g) TTCCAGGATTCAGGTACATGAC
- h) PHO-GAATGGGAACAACAGCAACAAATCTCACTTCTTACTACCGCG
- i) ACTCGTAGGGAATAAACCGTGTATGTTGTAATGTATTAAGAAAGCATCAC
AGAGCCCCTATCAG
- j) CTTTGTAGCACCATAGGGAA
- k) PHO-GTATTTCTACTACCTAGGAACTGGTCTCACTTCTTACTACCGCG
- l) ACTCGTAGGGAATAAACCGTATTAAGTAAGAATTGAGAGTTTGATGAAAG
ATCTCAGTCCAAGATG
- m) TGATGATCGGCTGCAACACG
- n) PHO-GAACTTTAAAATCTGTGTGGCTGTCTCACTTCTTACTACCGCG

o) ACTCGTAGGGAATAAACCGTAGTGAATGTAAGATTATGTATTTGTCTCTTG
TAGATCTGTTCTCTAAAC

Specifickým znakem nároku na ochranu je: kterákoliv z uvedených sekvencí nukleové kyseliny, pokud je obsažena v diagnostickém prostředku pro *in vitro* diagnostiku.

Ad3) Složení reakčních směsí je pro část navržené metody typické a obecně známé. V navrženém nároku na ochranu je však požadována ochrana reakčních směsí, které obsahují všechny uvedené složky najednou: RT1 (dATP, dTTP, dCTP, dGTP, specifické oligonukleotidy), LG1 a LG2 (reakční pufr, specifické oligonukleotidy), PCR (enzym polymeráza, dATP, dCTP, dGTP, dTTP, reakční pufr, směs všech potřebných oligonukleotidů tzv. primerů) a BM1 (mix specifických mikrosfér). Součástí diagnostického prostředku jsou také zkumavky s reakční směsí RT2 a RT3, LG3, AP, BM2, BM3 a zkumavka s pozitivní kontrolou a externí kontrolou. Výhodou pro zákazníka je jednoduché použití, kdy k provedení detekce postačí do zkumavky odebrat daný objem reakční směsi a přidat izolát nukleové kyseliny ze vzorku. Další z výhod je možnost analýzy vzorku na přítomnost IVA, IVB a SARS-CoV-2 a současně ověřit řádnost celého analytického postupu v rámci jedné reakce.

Specifickým znakem nároku na ochranu je pět zkumavek, které obsahují minimálně shora uvedené reakční složky, pokud jsou obsaženy v diagnostickém prostředku pro *in vitro* diagnostiku.

7. Seznam materiálu obsaženém v diagnostické soupravě

PK	obsahuje RNA IVA, IVB a SARS-CoV-2 (pozitivní kontrola)
EAC	obsahuje externí kontrolu analytického postupu, tzn. defektní bakteriofág MS2 do jehož genomu je včleněna uměle vytvořená sekvence (vakovlk tasmanický, pták moa), která je začleněna do jeho genomu
DDW	obsahuje RNase-free vodu
RT směsi	RT1 obsahuje: vodu, deoxyribonukleotidy, specifické oligonukleotidy RT2 obsahuje: enzym reverzní transkriptáza, RNase inhibitor RT3 obsahuje: pufr, voda Poznámka: složení RT2 a RT3 není předmětem nároku na ochranu.
LG směsi	LG1 obsahuje: vodu, pufr, specifické oligonukleotidy M1

LG2 obsahuje: vodu, pufr, specifické oligonukleotidy M2

LG3 obsahuje: ligázu

Poznámka: složení LG3 není předmětem nároku na ochranu.

PCRmix obsahuje vodu, deoxyribonukleotidy, pufr, polymerázu, specifické oligonukleotidy, ale neobsahuje nukleové kyseliny

Poznámka: složení PCR není předmětem nároku na ochranu.

BM směsi BM1 obsahuje směs specifických mikrosfér

BM2 obsahuje roztok NaCl

BM3 obsahuje roztok MES

Poznámka: složení BM2, BM3 není předmětem nároku na ochranu.

AP obsahuje analyzační pufr

Poznámka: složení AP není předmětem nároku na ochranu.

Specifické oligonukleotidy (krátké úseky nukleové kyseliny, vyznačující se unikátní sekvencí za sebou řazených nukleotidů; zajišťují sensitivitu a specifickou detekci). Sekvence oligonukleotidů pro reverzní transkripci specifických pro IVA, IVB, SARS-CoV-2 a EAC:

Oligo	Sekvence (5' - 3')	Délka
IVA_RP	CTGTTTCGTCTCTTCCACTCAC	21 nt
IVB_RP	TTCCAGGATTCAGGTACATGAC	22 nt
SARS-CoV-2_A_RP	CTTTGTTAGCACCATAGGGAA	21 nt
SARS-CoV-2_B_RP	TGATGATCGGCTGCAACACG	20 nt
EAC_RP	GGTTTAGAATGTTTTCTCCCGT	22 nt

Sekvence oligonukleotidů specifických pro IVA, IVB, SARS-CoV-2 a EAC:

Oligo	Sekvence (5' - 3')	Délka
IVA_M1	PHO-GGTATGAGGAGTTCACAATGTCTCACTTCTTACTACCGCG	40 nt
IVA_M2	ACTCGTAGGGAATAAACCGTAATTAGAAGTAAGTAGAGTTTAAGCA TTGAAGATAAGAGTACATGAGG	68 nt
IVB_M1	PHO-GAATGGGAACAACAGCAACAAATCTCACTTCTTACTACCGCG	42 nt
IVB_M2	ACTCGTAGGGAATAAACCGTGTATGTTGTAATGTATTAAGAAAGCA TCACAGAGCCCCTATCAG	64 nt
SARS-CoV2-A_M1	PHO-GTATTTCTACTACCTAGGAACTGGTCTCACTTCTTACTACCGCG	44 nt

SARS-CoV2-A_M2	ACTCGTAGGGAATAAACCGTATTAAGTAAGAATTGAGAGTTTGATG AAAGATCTCAGTCCAAGATG	66 nt
SARS-CoV2-B_M1	PHO-GAACTTTAAAATCTGTGTGGCTGTCTCACTTCTTACTACCGCG	43 nt
SARS-CoV2-B_M2	ACTCGTAGGGAATAAACCGTAGTGAATGTAAGATTATGTATTTGTCT CTTGTAGATCTGTTCTCTAAAC	69 nt
EAC_M1	PHO-ATTAGCACAATGAATAATCATCGTCTCACTTCTTACTACCGCG	43 nt
EAC_M2	ACTCGTAGGGAATAAACCGTATTGTGAAAGAAAGAGAAGAAATTTA TACACACGCAATCACCAC	64 nt

Vývoj prototypu diagnostického prostředku – detekční soupravy probíhal v rámci řešení projektu Ministerstva vnitra ČR s reg. č. VI20152020044.

8. Literatura

1. Iuliano AD, Roguski KM, Chang HH, Muscatello DJ, Palekar R, Tempia S, et al. Estimates of global seasonal influenza-associated respiratory mortality: a modelling study. *The Lancet*. 2018;391(10127):1285-300.
2. Chowell G, Sullivan P, Rothenberg R. Introduction to symposium: a century after the 1918 influenza pandemic. *Ann Epidemiol*. 2018;28(5):265-6.
3. Anonymous. ISO 15216-1:2017 Microbiology of the food chain — Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus using real-time RT-PCR — Part 1: Method for quantification. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization; 2017.
4. Anonymous. ISO 15216-2:2019 Microbiology of the food chain — Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus using real-time RT-PCR — Part 2: Method for detection. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization; 2019. 40 p.
5. Thierry S, Hamidjaja RA, Girault G, Lofstrom C, Ruuls R, Sylviane D. A multiplex bead-based suspension array assay for interrogation of phylogenetically informative single nucleotide polymorphisms for *Bacillus anthracis*. *J Microbiol Methods*. 2013;95(3):357-65.

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