



PROTOTYP/FUNKČNÍ VZOREK

**Biothreat xMAP panel – diagnostický prostředek pro
simultánní detekci bakterií zneužitelných jako
biologické zbraně, konkrétně: *Bacillus anthracis*,
Yersinia pestis, *Francisella tularensis*
a *Brucella* spp.**

**Ing. Pavlína Jelínková, Ph.D.
Mgr. Jakub Hrdý
MVDr. Markéta Reichelová
MVDr. Jiří Volf, Ph.D.
doc. RNDr. Ivan Rychlík, Ph.D.**

**5329
2020**

Prototyp/Funkční vzorek

5329/2020

Biothreat xMAP panel – diagnostický prostředek pro simultánní detekci bakterií zneužitelných jako biologické zbraně, konkrétně: *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*, *Francisella tularensis* a *Brucella* spp.

Pavlína Jelínková
Jakub Hrdý
Markéta Reichelová
Jiří Volf
Ivan Rychlík

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

ISBN 978-80-7672-001-5

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i. Hudcova 70 62100 BRNO	Druh dokumentace: Popis technického řešení pro přihlášku prototypu	Verze: 01 Strana: 2/15 Počet příloh: 0		
Výtisk č. 1		Účinnost od: 21.12.2020		
Název dokumentace: Biothreat xMAP panel – diagnostický prostředek pro simultánní detekci bakterií zneužitelných jako biologické zbraně, konkrétně: <i>Bacillus anthracis</i>, <i>Yersinia pestis</i>, <i>Francisella tularensis</i> a <i>Brucella</i> spp. Popis technického řešení pro přihlášku prototypu				
Evidence o převzaté dokumentaci				
Číslo výtisku	Funkce	Jméno	Datum	Podpis
1	vedoucí oddělení	Ivan Rychlík	21.12.2020	
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: Pavčina Jelínková Jakub Hrdý Markéta Reichelová Jiří Volf	Vydal: Jiří Volf	Schválil: Ivan Rychlík	

Obsah

1. Úvod.....	4
2. Oblast techniky	6
3. Aktuální stav techniky (diagnostiky)	6
4. Popis technického řešení a nároků na ochranu	7
5. Nároky na ochranu	9
6. Vysvětlení nároků na ochranu	10
7. Seznam materiálu obsaženém v diagnostické soupravě	12
8. Literatura.....	15

1. Úvod

Jako bioteroristické prostředky (zbraně) jsou označovány patogenní organismy popř. biologické toxiny, které lze použít za účelem terorismu k vyvolání nemocí či smrti u lidí a zvířat nebo k poškození rostlin. Těmito nástroji mohou být mikroorganismy vyskytující se v přírodě, ale i jejich modifikované formy upravené za účelem zvýšení jejich virulence, odolnosti vůči současným antibiotikům nebo vakcínám, nebo zvýšení schopnosti šířit se v populaci vnímavých hostitelů. Přesná definice pojmů „bakteriologická (biologická) a toxinová zbraň“ je uvedena v zákoně č. 281/2002 Sb. Z pohledu terorismu lze považovat biologické prostředky za atraktivní alternativu ke konvenčním zbraním hromadného ničení, protože ve srovnání s nimi jsou biologické prostředky relativně levné a technologicky dostupné a zároveň mají vysoký potenciál vyvolat rozsáhlé sociální a ekonomické narušení života společnosti. Bioteroristické zbraně mohou být použity v řadě forem, přičemž nejnebezpečnější je aerosol. Jeho výroba a použití jsou však naštěstí technologicky poměrně vysoce náročné. Existuje však řada dalších způsobů, kterými lze tyto látky poměrně snadno šířit, např. prostřednictvím kontaminace potravin, krmiv nebo zdrojů vody. *Bacillus anthracis* – původce antraxu, *Yersinia pestis* – původce moru, *Francisella tularensis* – původce tularemie nebo *Brucella* spp. – původce brucelózy patří mezi bakterie nejvíce zneužívané jako biologické zbraně. Centrum pro kontrolu a prevenci nemocí (CDC) klasifikuje biologické látky z pohledu bioterorismu do kategorií A - C, kde kategorie A zahrnuje nejnebezpečnější patogeny. S výjimkou *Brucella* spp., která je zařazena do kategorie B, jsou všechny výše uvedené patogeny řazeny do skupiny A.

B. anthracis je původcem sněti slezinné – antraxu, závažného onemocnění spojeného s vysokou mortalitou u lidí. Patří k sporotvorným bakteriím, což mu umožňuje zachovávat životaschopnost po mnoho desetiletí. Lidé mohou být nakaženi kontaktem s infikovanými zvířaty nebo kontaminovanými živočišnými produkty. Aerogenní infekce způsobená vdechováním spor je sice za přírodních podmínek poměrně vzácná, ale zůstává závažným problémem, pokud je spojena s bioterorismem, neboť vede k plicní formě, která je nejzávažnější (nejvyšší smrtnost až 85 %). Případy zneužití antraxových spor v dopisech z října 2001 ukázaly, že k vyvolání infekce v důsledku teroristické akce stačí pouze malé množství spor.

Dalším nebezpečným onemocněním s rizikem zneužití bioteroristy je mor způsobený *Y. pestis*. Nejběžnějším přenosem je kousnutí blechami, ale infekce se může šířit také manipulací nebo konzumací nedostatečně tepelně upraveného masa z infikovaných zvířat. Přenos *Y. pestis* z člověka na člověka, tj. primární pneumonický mor, je možný vzdušnou cestou pomocí kapének nebo aerosolu a je-li neléčen, je 100% smrtelný. Mor se vyznačuje krátkou inkubační dobou a velmi nízkou infekční dávkou, kdy onemocnění může způsobit pouze 1 až 10 bakterií.

F. tularensis je původcem vysoce infekčního onemocnění zvaného tularemie. Tularemie je primárně onemocnění divokých zvířat (zajáci, králíci), které se může přenášet na člověka. Onemocnění je přenášeno krevsajícími členovci - klíšťaty, muškami, komáry, ale také kontaminovanými potravinami, vodou, půdou. Přenos z člověka na člověka nebyl dosud zaznamenán. K infekci člověka může vést i vystavení velmi malému počtu bakteriálních buněk (řádově jednotky původce). Z hlediska bioterorismu je nejnebezpečnější poddruh *F. t. tularensis*, označovaný též jako typ A, který představuje nejvirulentnější poddruh *F. tularensis* a je obvykle spojován s těžkými plicními infekcemi, které jsou bez včasné léčby smrtelné.

Brucella spp. je sice klasifikována podle CDC jako patogen skupiny B, ale stále způsobuje závažné nakažlivé onemocnění přenosné na člověka, které, ačkoliv nebývá smrtelné, vede ke dlouhotrvajícímu onemocnění s rozsáhlými medicínskými a ekonomickými důsledky. Rod *Brucella* zahrnuje několik druhů vykazujících hostitelské adaptace. *B. abortus* (hovězí dobytek), *B. melitensis* (ovce a kozy) *B. suis* (prasata) patří mezi nejběžnější a jsou virulentní nejen pro hospodářská zvířata, ale také pro divokou zvěř a lidi. K přenosu na člověka dochází přímým kontaktem, vdechováním kapének nebo konzumací infikovaného masa nebo mléčných výrobků. Pro rozvoj onemocnění postačuje 10^2 až 10^3 bakteriálních buněk.

Pro včasné a účinné zásahy proti důsledkům bioteroristických útoků je v první řadě nezbytné správně a co nejrychleji identifikovat použité biologické agens. Nejčastěji jsou v současné době používány detekční systémy založené na potvrzení přítomnosti nukleových kyselin jednotlivých patogenů. Ideální detekční systém by měl být schopen detekovat patogeny ve velmi nízké koncentraci a v různých maticích. Kromě toho by měl být přenosný a uživatelsky přívětivý. Nespornou výhodou je schopnost detekovat více

patogenů zároveň, protože při potenciálních hrozbách není v drtivé většině případů předem známo, který patogen byl použit. Jako ideální detekční metoda se v současnosti jeví polymerázová řetězová reakce v reálném čase (qPCR), a to zejména kvůli vysoké citlivosti, vysoké specifitě a možnosti kvantifikace. Nevýhoda této metody spočívá v omezené možnosti vytvářet multiplexní systémy pro rychlou detekci většího počtu patogenů. Předkládaný diagnostický prostředek, který umožňuje simultánní *in vitro* detekci bakteriálních patogenů: *Bacillus anthracis* (BA), *Yersinia pestis* (YP), *Francisella tularensis* (FT) a *Brucella* spp. (Br.spp.) v různých typech matric (voda, potraviny, stěry z prostředí či rukou osob a klinický materiál) v jedné reakci tento nedostatek odstraňuje. Tento prostředek, označený jako „Biothreat xMAP panel – detekce BA, YP, FT a Br.spp.“, je unikátní svým složením a jednoduchostí použití. Souprava zahrnuje interní pozitivní kontrolu (IPK), která umožňuje validní analýzu každého jednoho vzorku [1-4].

2. Oblast techniky

Produkt je zaměřen na diagnostiku v široké oblasti veterinární i humánní a to zejména pro potřeby organizačních složek Ministerstva vnitra a Ministerstva obrany ČR.

3. Aktuální stav techniky (diagnostiky)

Vzhledem k tomu, že většina výše uvedených agens je řazena podle CDC do kategorie A (nejnebezpečnější) a zároveň do rizikové skupiny 3, je třeba se vzorky potencionálně kontaminovanými těmito patogeny nakládat v laboratořích, které odpovídají úrovni technického zabezpečení 3 (BSL-3). V těchto prostorách je personál chráněn před náhodným vystavením aerosolům a laboratoře jsou chráněny proti úniku agens do okolí. Vzhledem k vytiženosti i organizační a finanční náročnosti laboratoří BSL-3 je vhodné provést zde jen nejnutnější práci (inaktivaci bakteriálních buněk) a následnou práci s již neinfekčním materiálem provádět v laboratořích s nižším stupněm zabezpečení.

V současné době dostupné diagnostické nástroje jsou určeny vždy pro průkaz jednoho konkrétního agens. Analýza neznámých vzorků na přítomnost většího množství patogenů tak může být finančně i časově náročná. Pro srovnání např. Biovendor – Laboratorní medicína a.s. detekční kit pro stanovení *B. anthracis* pomocí metody qPCR vychází 350 Kč (bez DPH) za jedno stanovení (reakci), cena celého kitu na 25 reakcí je 8 750 Kč (bez DPH).

Náklady na provedení analýzy jednoho vzorku při využití předkládaného multiplexního detekčního nástroje na průkaz přítomnosti čtyř patogenů - BA, YP, FT a Br.spp. se pohybují okolo 432 Kč (bez DPH) při vyšetření dvou vzorků a jejich duplikátů (tzn. 4 reakce). Cenu za stanovení jednoho patogenu ve vzorku lze tedy počítat jako $432/8 = 54$ Kč (bez DPH). Při vyšším počtu vzorků se cena za jedno vyšetření ještě snižuje. Oproti v současnosti dostupným komerčním soupravám toto řešení představuje úsporu finančních prostředků.

4. Popis technického řešení a nároků na ochranu

Technické řešení diagnostického prostředku pro *in vitro* detekci biologických agens (BA, YP, FT a Br.spp.), které mohou být zneužity jak biologické zbraně v různých typech matric (klinický materiál, voda, potraviny, stěry z prostředí či rukou osob) využívá tzv. xMAP technologii (Luminex corporation, USA, Texas) na přístrojové platformě MagPix. Technologie xMAP je založena na třech po sobě jdoucích krocích: 1) multiplexní oligonukleotidová ligační assay, 2) PCR s univerzálním párem primerů shodným pro všechny cíle a 3) hybridizace. Spojení těchto kroků umožňuje simultánní detekci řady molekulárních cílů v široké škále matric.

Předkládaný detekční systém je pro zajištění spolehlivosti vybaven i systémem interní pozitivní kontroly pro vyloučení PCR inhibice a spočívá v přidání nukleové kyseliny o známé sekvenci do každého vzorku a její následné simultánní detekci spolu s ostatními detekčními cíli. Jako interní pozitivní kontrola (IPK) jednotlivých kroků MOL-PCR analýzy u každého vzorku je použita nekompetitivní syntetická sekvence založená na DNA sekvencích dvou vyhynulých druhů. Kontrolní syntetická sekvence byla syntetizována *de novo* a klonována do plazmidu. Tento přístup, tzn. použití přesně definovaného množství interní 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 veterinární i humánní medicíny. Zvolené řešení je unikátní v následujících položkách:

Interní pozitivní kontrola postupu analýzy vzorku (IPK)

- Interní pozitivní kontrola celého postupu analýzy vzorků na přítomnost BA, YP, FT a Br.spp. je složena ze specifických sekvencí dvou vyhynulých živočišných druhů; vakovlka

(*Thylacinus cynocephalus*) a ptáka moa (*Dinornis struthoides*). Specifická sekvence je klonována do plazmidu a namnožena za použití kompetentních buněk *Escherichia coli*. Takto vytvořená interní kontrola je unikátní a zcela arteficiální. Proto je možné ji použít při detekci jakéhokoliv typu vzorku a patogenu.

- Pro účely zajištění sensitivity a specifity procesu detekce interní pozitivní kontroly byly navrženy a testovány specifické unikátní sekvence nukleových kyselin (viz bod 7; tzv. oligonukleotidy, které jsou součástí reakčních směsí)
- Interní pozitivní kontrola je stabilní minimálně 12 měsíců při teplotě -20 ± 4 °C.

Složení diagnostického produktu „Biothreat xMAP panel – detekce BA, YP, FT a Br.spp.“ a jeho uživatelské vlastnosti

- Ligační směsi (LP1 a LP2) obsahují veškeré reakční složky pro průběh ligace: ligázu, pufr, specifické oligonukleotidy v definovaných koncentracích. Směs specifických oligonukleotidů zajistí analýzu vzorku na přítomnost genomu BA, YP, FT, Br.spp. a IPK.
- Reakční směs (tzv. PCR) v jedné zkumavce obsahuje veškeré reakční složky nezbytné pro průběh PCR. Tyto složky jsou: reakční pufr s optimalizovaným množstvím iontů hořčíku (Mg^{2+}), směs všech potřebných oligonukleotidů, která zajistí analýzu vzorku na přítomnost genomu BA, YP, FT, Br.spp. a IPK.
- Směs specifických magnetických fluorescenčně označených mikrosfér, jejichž fluorescenční signál umožní stanovit přítomnost detekčních cílů z genomu BA, YP, FT, Br.spp. a IPK.
- Předkládaný produkt kromě výše popsaných reakčních směsí obsahuje zkumavky "pozitivní kontrola", obsahující naklonované jednotlivé detekční cíle, které 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 směsí“ a přidání vzorku nebo/a „pozitivních kontrol“.
- Produkt je v popsaném složení stabilní minimálně 12 měsíců při teplotě -20 ± 4 °C.

5. Nároky na ochranu

I. Sekvence nukleotidů cílových úseků interní pozitivní kontroly analytického postupu nebo jejich části, použité oligonukleotidy (rozpoznávací sekvence pro ligaci) 5' - 3':

- a) PHO-ATTAGCACAATGAATAATCATCGTCTCACTTCTTACTACCGCG
- b) ACTCGTAGGGAATAAACCGTATTGTGAAAGAAAGAGAAGAAATTTA
TACACACGCAATCACCAC

II. Sekvence oligonukleotidů specifických k cílovým úsekům genomu BA, YP, FT a Br.spp. (rozpoznávací sekvence pro ligaci) 5' - 3':

- c) PHO-ATTACAAGTATTATTCAGAGAACGTTCTCACTTCTTACTACCGCG
- d) ACTCGTAGGGAATAAACCGTTATTAGAGTTTGAGAATAAGTAGTGGTA
TTTTTTGCTTCAATGGTG
- e) PHO-CTGTATCAGCGGTATTTAAACTCTCACTTCTTACTACCGCG
- f) ACTCGTAGGGAATAAACCGTTGAGTAAGTTTGTATGTTTAAGTAATCT
AATATCGGCATTTAATCTTG
- g) PHO-TTCTGTTGTTTTGCCTTGACATTCTCCTCTCACTTCTTACTACC
GCG
- h) ACTCGTAGGGAATAAACCGTGTGTTATAGAAGTTAAATGTTAAGCATA
ATGACGGGGCGCTCA
- i) PHO-AGGAACCACTAGCACATCTTCTCACTTCTTACTACCGCG
- j) ACTCGTAGGGAATAAACCGTGTAAGATTAGAAGTTAATGAAGAACTTA
CTCTTGCGGCTATAAAAC
- k) PHO-TGAGATGATAACAAGACAACAGTCTCACTTCTTACTACCGCG
- l) ACTCGTAGGGAATAAACCGTGTAAGAGTATTGAAATTAGTAAGAACT
AAAAAAAGGAGAATGATTATGAG
- m) PHO-ACTATCTAGAAATGTTCAAGCAAGTGTTCTCACTTCTTACTACC
GCG
- n) ACTCGTAGGGAATAAACCGTAGTAAGTGTTAGATAGTATTGAATGGGT
GGTGGTCTTAAGTTTGA
- o) PHO-CAGGCTACGAATCCAGAAATCTCACTTCTTACTACCGCG

- p) ACTCGTAGGGAATAAAACCGTATTTGTTATGATAAATGTGTAGTGCGCA
CTGAATCTCTGTTTTTC
- q) PHO-TATGCCATTCGCCGCCTGATCTCACTTCTTACTACCGCG
- r) ACTCGTAGGGAATAAAACCGTGTGATTGAATAGTAGATTGTTTAACATT
CTTCACATCCAGGAAACCCGAC

III. Složení reakčních směsí, tzv. LP1, LP2, PCR, KM, které obsahují minimálně tyto reakční složky nezbytné pro průběh reakce: ligáza, reakční pufry, směs všech potřebných oligonukleotidů (specifických úseků nukleové kyseliny), mix specifických mikrosfér.

6. Vysvětlení nároků na ochranu

Ad I. – II.) 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 xMAP provést validní analýzu vzorků na přítomnost genomu BA, YP, FT, *Brucella* spp. Sekvence interní pozitivní kontroly analytického postupu je naprosto jedinečná, proto připravený konstrukt (specifická sekvence klonována do plazmidu) je možné použít pro jakoukoliv matici (klinický materiál, potravina, prostředí). Tzn. metodika je použitelná pro diagnostiku v rámci veterinární i humánní medicíny. Přesné určení sekvencí genomu výše uvedených bakteriálních agens a interní pozitivní kontroly je podmínkou pro 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 bakterií a interní kontroly. Předmětem ochrany tedy mají být právě uvedené sekvence nukleotidů, které jsou použity v tomto diagnostickém prostředku 5' - 3':

- a) PHO-ATTAGCACAATGAATAATCATCGTCTCACTTCTTACTACCGCG
- b) ACTCGTAGGGAATAAAACCGTATTGTGAAAGAAAGAGAAGAAATTTATACA
CACGCAATCACCAC
- c) PHO-ATTACAAGTATTATTCAGAGAACGTTCTCACTTCTTACTACCGCG
- d) ACTCGTAGGGAATAAAACCGTTATTAGAGTTTGAGAATAAGTAGTGGTATTT
TTTGCTTCAATGGTG

- e) PHO-CTGTATCAGCGGTATTTAAACTCTCACTTCTTACTACCGCG
- f) ACTCGTAGGGAATAAAACCGTTGAGTAAGTTTGTATGTTTAAGTAATCTAAT
ATCGGCATTTAATCTTG
- g) PHO-TTCTGTTGTTTTGCCTTGACATTCTCCTCTCACTTCTTACTACCGCG
- h) ACTCGTAGGGAATAAAACCGTGTGTTATAGAAGTTAAATGTTAAGCATAAT
GACGGGGCGCTCA
- i) PHO-AGGAACCACTAGCACATCTTCTCACTTCTTACTACCGCG
- j) ACTCGTAGGGAATAAAACCGTGTAAGATTAGAAGTTAATGAAGAACTTACT
CTTGGCGGCTATAAAAC
- k) PHO-TGAGATGATAACAAGACAACAGTCTCACTTCTTACTACCGCG
- l) ACTCGTAGGGAATAAAACCGTGTAAGAGTATTGAAATTAGTAAGAACTAA
AAAAAGGAGAATGATTATGAG
- m) PHO-ACTATCTAGAAATGTTCAAGCAAGTGTTCTCACTTCTTACTACCGCG
- n) ACTCGTAGGGAATAAAACCGTAGTAAGTGTTAGATAGTATTGAATGGGTGG
TGGTCTTAAGTTTGA
- o) PHO-CAGGCTACGAATCCAGAAATCTCACTTCTTACTACCGCG
- p) ACTCGTAGGGAATAAAACCGTATTTGTTATGATAAATGTGTAGTGCGCACTG
AATCTCTGTTTTTC
- q) PHO-TATGCCATTCGCCGCCTGATCTCACTTCTTACTACCGCG
- r) ACTCGTAGGGAATAAAACCGTGTGATTGAATAGTAGATTGTTTAACATTCTT
CACATCCAGGAAACCCGAC

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

Ad III.) 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: LP1 a LP2 (reakční pufr, specifické oligonukleotidy, interní kontrola), PCR (enzym polymeráza, dATP, dCTP, dGTP, dTTP, reakční pufr, směs všech potřebných oligonukleotidů, tzv. primerů) a KM (mix specifických mikrosfér). Součástí diagnostického prostředku jsou také zkumavky s reakční směsí LP3, AP (analyzační pufr), KM2, KM3 a zkumavky s pozitivní 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 BA, YP, FT, *Brucella* spp. a současně ověřit řádnost celého analytického postupu v rámci jedné reakce.

Specifickým znakem nároku na ochranu jsou čtyři zkumavky, 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 DNA BA, YP, FT, <i>Brucella</i> spp. (<i>abortus</i> , <i>melitensis</i> a <i>suis</i>) (pozitivní kontrola)
IPK	obsahuje interní kontrolu analytického postupu, tzn. syntetickou sekvenci založenou na DNA sekvencích dvou vyhynulých druhů (vakovlk tasmanický, pták moa), která je klonována do plazmidu. Tato sekvence je zcela uměle vytvořená a nevyskytuje se v žádném živočišném, rostlinném či bakteriálním druhu.
PUH	obsahuje PCR ultra H ₂ O
LP směsi	LP1 obsahuje: vodu, pufr, specifické oligonukleotidy M1 LP2 obsahuje: vodu, pufr, specifické oligonukleotidy M2 LP3 obsahuje: enzym ligázu
	Poznámka: složení LP3 není předmětem nároku na ochranu

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

Poznámka: složení PCR není předmětem nároku na ochranu.

KM směsi KM1 obsahuje směs specifických mikrosfér

KM2 obsahuje roztok NaCl

KM3 obsahuje roztok MES (pufr)

Poznámka: složení KM2, KM3 není předmětem nároku na ochranu.

AP obsahuje analyzační pufr

Poznámka AP není předmětem nároku na ochranu.

Specifické oligonukleotidy (krátké úseky nukleové kyseliny, vyznačující se unikátní sekvencí za sebou řazených nukleotidů; zajišťující sensitivitu a specifitu detekce). Sekvence oligonukleotidů specifických pro BA, YP, FT, Br.spp. a IPK:

Oligo	Sekvence (5' - 3')	Délka
BA_5345_M1	PHO-AATTACAAGTATTATTCAGAGAACGTTCTCAC TTCTTACTACCGCG	46
BA_5345_M2	ACTCGTAGGGAATAAACCGTTATTAGAGTTTGAGA ATAAGTAGTGGTAT	49
BApagA_M1	PHO-TGTATCAGCGGTATTTAAACTCTCACTT CTTACTACCGCG	40
BApagA_M2	ACTCGTAGGGAATAAACCGTTGAGTAAGTTTGTAT GTTTAAGTAATCTAATATCGGCATTTAATCTTG	68
YPpla_M1	PHO- TTCTGTTGTTTTGCCTTGACATTCTCCTCTCAC TTCTTACTACCGCG	47
YPpla_M2	ACTCGTAGGGAATAAACCGTGTGTTATAGAAGTTA AATGTTAAGCATAATGACGGGGCGCTCA	63
YPcaf1_M1	PHO-AGGAACCACTAGCACATCTTCTCACTTC TTACTACCGCG	39

YPcaf1_M2	ACTCGTAGGGAATAAAACCGTGTAAGATTAGAAGT TAATGAAGAACTTACTCTTGGCGGCTATAAAAC	67
FTspp.23kDa_M1	PHO-TGAGATGATAACAAGACAACAGTCTCACTTCTTA CTACCGCG	42
FTspp.23kDa_M2	ACTCGTAGGGAATAAAACCGTGTAAGAGTATTGAA ATTAGTAAGAACTAAAAAAGGAGAATGATTA TGAG	71
FTspp_fopA_M1	PHO-ACTATCTAGAAATGTTCAAGCAAGTGTTCTCA CTTCTTACTACCGCG	47
FTspp_fopA_M2	ACTCGTAGGGAATAAAACCGTAGTAAGTGTTAGATA GTATTGAATGGGTGGTGGTCTTAAGTTTGA	65
Br.spp._omp2_M1	PHO-CAGGCTACGAATCCAGAAATCTCACTTCTTA CTACCGCG	39
Br.spp._omp2_M2	ACTCGTAGGGAATAAAACCGTATTTGTTATGATAAA TGTGTAGTGCGCACTGAATCTCTGTTTTTC	65
Br.spp._bcsp31_M1	PHO-TATGCCATTCGCCGCCTGATCTCACTTCTTACT ACCGCG	39
Br.spp._bcsp31_M2	ACTCGTAGGGAATAAAACCGTGTGATTGAATAGTA GATTGTTTAACATTCTTCACATCCAGGAAACCCGAC	70
IPK_M1	PHO-ATTAGCACAATGAATAATCATCGTCTCACTTCT TACTACCGCG	43
IPK_M2	ACTCGTAGGGAATAAAACCGTATTGTGAAAGAAAG AGAAGAAATTTATACACACGCAATCACCAC	64

Vývoj prototypu diagnostického prostředku – detekční soupravy probíhal v rámci řešení projektu Bezpečnostního výzkumu MV ČR VI20152020044.

8. Literatura

1. Thavaselvam, D. and R. Vijayaraghavan, *Biological warfare agents*. Journal of pharmacy & bioallied sciences, 2010. **2**(3): p. 179-188.
2. Pisa, L., et al., *INTERLABORATORY COMPARATIVE TESTS OF BIOLOGICAL LABORATORIES OF THE NATO ARMIES*. Mil. Med. Sci. Lett, 2011. **80**: p. 159-168.
3. Mölsä, M., et al., *Monitoring biothreat agents (Francisella tularensis, Bacillus anthracis and Yersinia pestis) with a portable real-time PCR instrument*. J Microbiol Methods, 2015. **115**: p. 89-93.
4. Matero, P., et al., *Rapid field detection assays for Bacillus anthracis, Brucella spp., Francisella tularensis and Yersinia pestis*. Clinical Microbiology and Infection, 2011. **17**(1): p. 34-43.



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