



FUNKČNÍ VZOREK

**Postup pro detailní charakterizaci
významných původců virových
onemocnění hospodářských zvířat
ve formě sbírkových položek
deponovaných ve Sbírce zoopatogenních
mikroorganismů (CAPM)**

**RNDr. Jana Prodělalová, Ph.D.
Ing. Jitka Motlová
Mgr. Hana Malenovská
Mgr. Romana Moutelíková, Ph.D.**

**5513
2017**

Funkční vzorek

5513/2017

**Postup pro detailní charakterizaci významných
původců virových onemocnění hospodářských zvířat
ve formě sbírkových položek deponovaných ve Sbírce
zoopatogenních mikroorganismů (CAPM)**

RNDr. Jana Prodělalová, Ph.D.
Ing. Jitka Motlová
Mgr. Hana Malenovská
Mgr. Romana Moutelíková, Ph.D.

2017

ISBN 978-80-88233-28-2

Funkční vzorek

Postup pro detailní charakterizaci významných původců virových onemocnění hospodářských zvířat ve formě sbírkových položek deponovaných ve Sbírce zoopatogenních mikroorganismů (CAPM)

RNDr. Jana Prodělalová, Ph.D

Ing. Jitka Motlová

Mgr. Hana Malenovská

Mgr. Romana Moutelíková, Ph.D.

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

Funkční vzorek byl vytvořen v rámci projektu Národní agentury pro zemědělský výzkum, číslo projektu QJ1630210.

**Metodický postup funkčního vzorku je určen pouze pro vnitřní
potřebu virologické laboratoře Sbírky zoopatogenních
mikroorganismů (CAPM).**

OBSAH

1.	Úvod.....	3
2.	Cíl metodiky funkčního vzorku.....	3
3.	Vlastní popis funkčního vzorku.....	3
3.1	Přehled postupů pro kultivaci virových kmenů.....	4
3.2	Přehled postupů pro eliminaci mykoplazmových kontaminací z virových suspenzí a buněčných linií.....	4
3.3	Přehled postupů pro detekci kontaminant virových kmenů.....	8
3.3.1	Detekce viru bovinní virové diarrhoei (BVDV) ve virových kmenech a buněčných liniích metodou standardní reverzně transkripční PCR.....	8
3.3.2	Detekce mykoplazem ve virových kmenech a buněčných liniích metodou standardní reverzně transkripční PCR.....	9
3.4	Přehled postupů pro molekulárně-biologickou charakterizaci virových kmenů.....	9
3.4.1	DNA viry.....	9
3.4.2	RNA viry.....	16
3.4.3	Seznam použité literatury.....	22
3.4.4	Postup pro extrakci nukleových kyselin.....	24
3.4.5	Postup pro PCR.....	25
3.4.6	Postup pro reverzně transkripční PCR.....	25
3.4.7	Postup pro sekvenaci amplifikovaných částí genomu.....	26
4.	Srovnání novosti postupů.....	26
5.	Uplatnění funkčního vzorku.....	27
6.	Ekonomické aspekty.....	27
7.	Dedikace.....	27

1. ÚVOD

Kvalita služeb poskytovaných Sbírkou zoopatogenních mikroorganismů (CAPM) VÚVeL Brno je závislá zejména na kvalitě virových kmenů dodávaných koncovým uživatelům. Tyto kmeny jsou využívány především v oblasti veterinární diagnostiky a výzkumu. Proto je pro jejich uživatele zcela zásadní, aby zároveň s dodanými kmeny získali co nejvíce údajů, mimo jiné také o virových nebo bakteriálních kontaminantech, které jsou mnohdy ve vzorku přítomny kvůli jeho původu nebo metodice, která byla v minulosti využita při jeho izolaci z biologického materiálu. Významné jsou také údaje o klasifikaci virů a jejich aktuálním taxonomickém zařazení. Podrobná charakteristika virových kmenů významně přispěje také ke zvýšení biologické bezpečnosti při nakládání s těmito patogeny.

2. CÍL METODIKY FUNKČNÍHO VZORKU

Cílem metodiky funkčního vzorku je příprava virových kmenů významných původců onemocnění hospodářských zvířat. Virové kmeny budou opatřeny podrobnými informacemi o jejich vlastnostech. Fyzicky se bude jednat převážně o lyofilizáty ve skleněných ampulích. Součástí funkčního vzorku je metodický postup, specifikovaný v tomto textu, který vede k získání charakterizovaných kmenů. Vysoká kvalita distribuovaných kmenů patogenních virů představuje významné zvýšení úrovně v diagnostice infekčních onemocnění hospodářských zvířat.

3. VLASTNÍ POPIS FUNKČNÍHO VZORKU

3.1 PŘEHLED POSTUPŮ PRO KULTIVACI VIROVÝCH KMENŮ

Viry jsou pomnožovány *in vitro* na permanentních buněčných liniích a primárních buňkách (Tabulka 1) dle interních postupů, které nejsou součástí funkčního vzorku). Biologický materiál určený pro množení virů slouží pouze k potřebám Sbírkou zoopatogenních mikroorganismů (CAPM) a není součástí kolekce virových kmenů charakterizovaných v rámci funkčního vzorku.

Tabulka 1: Kultivace virů

Buněčná linie	BTU (Bovine turbinate cell line)
Virové kmeny	CAPM V-164
Buněčná linie	EBTr (Embryonal bovine tracheal cell line)
Virové kmeny	CAPM V-172; CAPM V-225
Buněčná linie	EPC (Epithelioma papulosum cyprini cell line)
Virové kmeny	CAPM V-540
Buněčná linie	FMH (Fathead minnow cell line)
Virové kmeny	CAPM V-350
Buněčná linie	MARC-145 (Monkey kidney cell line)
Virové kmeny	CAPM V-490; CAPM V-501; CAPM V-502
Buněčná linie	MDBK (Madin Darby bovine kidney cell line)
Virové kmeny	CAPM V-10; CAPM V-19; CAPM V-25; CAPM V-44; CAPM V-54; CAPM V-63; CAPM V-231; CAPM V-232; CAPM V-317; CAPM V-326; CAPM V-457
Buněčná linie	MDCK (Madin Darby canine kidney cell line)
Virové kmeny	CAPM V-1
Buněčná linie	PK-15 (Pig kidney cell line)
Virové kmeny	CAPM V-250; CAPM V-310
Buněčná linie	RK 13 (Rabbit kidney cell line)
Virové kmeny	CAPM V-94; CAPM V-166; CAPM V-258; CAPM V-319
Buněčná linie	SK-6 (Swine kidney cell line)
Virové kmeny	CAPM V-167; CAPM V-316
Buněčná linie	ST (Swine testes cell line)
Virové kmeny	CAPM V-66; CAPM V-91; CAPM V-126; CAPM V-197; CAPM V-198
Buněčná linie	VERO (African Green monkey kidney cell line)
Virové kmeny	CAPM V-201; CAPM V-362; CAPM V-442; CAPM V-531; CAPM V-534
Primární buňky	Primární kuřecí embryonální fibroblasty
Virové kmeny	CAPM V-56; CAPM V-83; CAPM V-100; CAPM V-101; CAPM V-135; CAPM V-455

3.2 PŘEHLED POSTUPŮ PRO ELIMINACI MYKOPLAZMOVÝCH KONTAMINACÍ Z VIROVÝCH SUSPENZÍ A BUNĚČNÝCH LINIÍ

Mykoplazmové kontaminace ve virových suspenzích jsou velmi rozšířené kvůli častým kontaminacím buněčných kultur, které se používají pro množení virů. Při odstraňování těchto kontaminací je hlavním úskalím neúčinnost běžných antibiotik a také časté rezistence některých mykoplazmových kmenů na antibiotika jinak účinná.

Odstranění mykoplazem z buněčných linií se provádí pouze pomocí antibiotik. U virových suspenzí je antibiotické ošetření podpořeno předcházející filtrací suspenze, ta způsobí snížení

titru mykoplazem. Antibiotika jsou zvolená v takové kombinaci, aby zajistila odstranění mykoplazem i v případě rezistence na některý typ použitého antibiotika.

Přístroje a pomůcky

- sterilní kultivační lahvičky
- jednokanálová mikropipeta se sterilními špičkami
- PES 0,22 μ m stříkačkové filtry
- sterilní jednorázové 2 ml stříkačky a jehly
- sterilní mikrocentrifugační zkumavky
- sterilní serologické pipety a automatický dávkovač (pipetor)
- ochranné rukavice
- termostat s přívodem CO₂
- biohazard box
- mrazicí box na -80 °C
- vodní lázeň
- světelný mikroskop
- chladnička

Chemikálie a roztoky

- MycoKill AB (PAA Laboratories), zásobní roztok: 50x koncentrovaný v PBS
-pracovní koncentrace: 10 μ g/ml média
- BM Cyclin (BM Cyclin 1 a 2, Roche), zásobní roztok: 250x koncentrovaný v PBS
-pracovní koncentrace BM Cyclin 1: 10 μ g/ml
-pracovní koncentrace BM Cyclin 2: 5 μ g/ml
- Trypsin-EDTA solution 10x
- DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)
- DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)
- MEM (Minimum Essential Medium)
- FBS (fetální bovinní sérum) inaktivované 30 min při 56 °C
- dezinfekční roztok Desprej

Postup

Bezpečnostní opatření

Práce s buněčnou kulturou se provádí sterilně v biohazard boxu. K dezinfekci boxu se používá UV zářivka (30 min před i po práci) a dezinfekční roztok (Desprej).

Provedení metody

POUŽITÍ ANTIBIOTIK MYCOKILL AB

Eliminace mykoplazem z buněčných linií

- Z kultivační lahvičky s narostlou buněčnou kulturou se odstraní médium, buňky se dvakrát opláchnou roztokem 1x trypsin/EDTA v DPBS, větší díl roztoku se odstraní a buňky se inkubují 5 min při 37 °C.
- Po uvolnění se buňky promíchají v kultivačním médiu, rozdělí v poměru 1:2-1:4 a nasadí na nové 25 cm² kultivační lahvičky do 10ml média obsahujícího 1x Mycokill AB (ředění 1:50, 200 µl zásobního roztoku/10 ml).
- Buňky se kultivují 3 dny, opět trypsinují a v další pasáži kultivují 4 dny v médiu s 1x Mycokill AB
- Výše uvedený postup se opakuje 2x, tedy celkem 4 pasáže s Mycokill AB.
- Před ověřením účinnosti eliminace se buňky 3x pasážují v médiu bez Mycokillu.
- Kultivační podmínky jednotlivých buněčných linií jsou uvedeny v příloze SOP č. 001.

Eliminace mykoplazem z virové suspenze

- Virová suspenze se zfiltruje přes 0,22 µm stříkačkový filtr a 0,5 ml filtrátu se inkubuje při 37°C 4 hod s 2x Mycokill (ředění 1:25, 20 µl zásobního roztoku/0,5 ml).
- Virem se infikuje kultivační lahvička s vnímavou buněčnou linií bez mykoplazmové kontaminace, po hodinové inkubaci se doplní kultivační médium s Mycokill (ředění 1:50, 200 µl zásobního roztoku/10 ml).
- Buněčná linie infikovaná virem se kultivuje do CPE (cytopatického efektu) na cca 80% buněk a zamrazí se v -80 °C.
- Celkem se provedou 3 po sobě jdoucí pasáže viru s Mycokillem AB.
- Pasáže s Mycokillem AB jsou následovány 3 pasážemi bez Mycokillu.

- Ověří se účinnost eliminace pomocí PCR.
- Seznam vnímavých linií pro konkrétní virus a kultivační podmínky virů je uveden v Příloze SOP č. 001.

POUŽITÍ ANTIBIOTIK BM CYCLIN

BM Cyclin se používá pouze v případě neúspěšné eliminace pomocí Mycokillu AB.

Eliminace mykoplazem z buněčných linií

- Buňky se po trypsinaci nasadí do 25 cm² kultivační lahvičky s 10 ml kultivačního média s BM Cyclinem 1 (ředění 1:250, 40 µl zásobního roztoku/10 ml) a kultivují 3 dny.
- Po následné trypsinaci se kultivují 4 dny v médiu s BM Cyclinem 2 (ředění 1:250, 40 µl zásobního roztoku na 10 ml média).
- Výše uvedený postup se opakuje 2x.
- Před ověřením účinnosti eliminace se buňky 3x pasážují v médiu bez BM Cyclinu.

Eliminace mykoplazem z virové suspenze

- Virová suspenze se před infekcí zfiltruje přes 0,22 µm stříkačkový filtr a 0,5 ml filtrátu se inkubuje 4 hod s BM Cyclinem 1 (ředění 1:100, 5 µl zásobního roztoku/0,5 ml).
- Virem se infikuje vnímavá buněčná linie bez mykoplazmové kontaminace, po hodinové inkubaci se doplní kultivační médium s 1x BM Cyclin 1 (ředění 1:250, 40 µl zásobního roztoku/10 ml).
- Buňky infikované virem se kultivují do výrazného CPE (na cca 80% buněk) a zamrazí v – 80 °C.
- Rozmražená virová suspenze z předchozí kultivace se zfiltruje a inkubuje 4 hod s BM Cyclinem 2 (ředění 1:100, 5 µl zásobního roztoku/0,5 ml) a použije na infekci buněčné kultury.
- Po infekci se doplní médium s 1x BM Cyclin 2 (ředění 1:250, 40 µl zásobního roztoku na 10 ml média).
- Buňky se kultivují do výrazného CPE a zamrazí v -80 °C.
- Celý postup se opakuje 2x, tedy celkem 2 pasáže s BM Cyclinem 1 a 2 pasáže s BM Cyclinem 2.

- Virus se 3x pasáže bez antibiotik a ověří se účinnost eliminace.

Ověření výsledku

Úspěšnost eliminace mykoplazmových kontaminací je ověřena pomocí PCR (viz kapitola 3.3.2).

Literatura

Malenovská, H., Reichelová, M.: Elimination of mycoplasma contamination of virus stocks. *Vet. Med. - Czech*, 2011, 56 (11), 547-550.

Malenovská, H., Reichelová, M., Prodělalová, J.: Inovace ve virologických metodách ve Sbírce zoopatogenních mikroorganismů. *Veterinářství*, 2013, 8, 611-614.

3.3 PŘEHLED POSTUPŮ PRO DETEKCI KONTAMINANT VÍROVÝCH KMENŮ

3.3.1. DETEKCE VIRU BOVINNÍ VÍROVÉ DIARRHOEI (BVDV) VE VÍROVÝCH KMENECH A BUNĚČNÝCH LINIÍCH METODOU STANDARDNÍ REVERZNĚ TRANSKRIPČNÍ PCR

Detekční oligonukleotidy:

Ridpath JF, Bolin SR, Differentiation of types 1a, 1b and 2 bovine viral diarrhoea virus (BVDV) by PCR. *Molecular and Cellular Probes* **12**:101-106 (1998).

F (BVD-f): 5'-cat gcc cat agt agg ac-3'

R (BVD-r): 5'-cca tgt gcc atg tac ag-3'

Velikost produktu: 283 bp

$T_a = 50^{\circ}\text{C}$

Extrakce RNA

K extrakci nukleových kyselin Chemagic Viral DNA/RNA Kit (Perkin Elmer) dle návodu výrobce.

Extrahuje se zároveň RNA i DNA, což je výhodné vzhledem k charakteru detekovaných kontaminant i následné molekulárně-biologické charakterizaci virových kmenů. Izolované nukleové kyseliny je nutné uchovávat při -80°C . Nejprve je výhodné provést detekci DVDV (RNA virus) vzhledem k citlivosti RNA na opakované zamražení/rozmražení. DNA (detekce mykoplazmat a molekulární charakterizace virových kmenů) je mnohem odolnější a opakované zamražení snáší lépe.

Kontrolní kmeny

CAPM V-315, BVDV strain Oregon C24 V (USA)

Provedení RT-PCR

HyperScript™ (GeneAII) – One Step RT-PCR Premix

- Na jednu reakci: do zkumavky s premixem přidat 1 µl forward primeru, 1,5 µl reverse primeru, 2,5 µl PCR vody a 5 µl extrahované RNA (maximální koncentrace 2 µg na reakci).
- Směr primerů a vody lze připravit v podobě premixu dle počtu vzorků (nebo ve větším objemu zamrazit do zásoby, na 100 reakcí 100 µl primeru F, 150 µl primeru R a 250 µl vody pro PCR), pak se přidává 5 µl premixu a 5 µl RNA.
- Promíchat, krátce stočit.
- Program termocyklu:
 1. 55°C/30 min
 2. 94°C/5 min
 3. 35x: 94°C/30 s
50°C/30 s
72°C/30 s
 4. 72°C/5 min

Provedení gelové elektroforézy

- 1,5% agarózový gel v TBE pufru (1x)

3.3.2 DETEKCE MYKOPLAZEM VE VIROVÝCH KMENECH A BUNĚČNÝCH LINIÍCH METODOU STANDARDNÍ REVERZNĚ TRANSKRIPČNÍ PCR

Pro detekci kontaminujících mykoplazem byla použita diagnostická souprava na bázi standardní end-point PCR Venor® GeM Advance (Minerva Biolabs), dodavatel Bio Consult Laboratories, spol. s r.o., dle návodu doporučeného výrobcem.

3.4 PŘEHLED POSTUPŮ PRO MOLEKULÁRNĚ-BIOLOGICKOU CHARAKTERIZACI VIROVÝCH KMENŮ

3.4.1 DNA viry

Čeleď Adenoviridae

Fowl aviadenovirus

Klasifikace: rod *Aviadenovirus* (dříve jako Fowl adenovirus)

PCR detekce:

Cíl: L1 oblast genu pro hexon
F: Hexon A caa rtt cag rca gac ggt
R: Hexon B tag tga tgm cgs gac atc at
T_a: 50 °C

Produkt: 897 bp
Literatura: Gúnes et al. (2010)

Charakteristika kmene:

Fowl aviadenovirus CAPM V-135, Sb. 6455

PCR: cílová sekvence detekována
Sekvence: L1 oblast genu pro hexon
Mykoplasma: nedetekováno
BVDV: nedetekováno

Bovine mastadenovirus

Klasifikace: rod *Mastadenovirus* (dříve jako Bovine adenovirus)

PCR detekce:

Cíl: V1 hypervariabilní oblast genomu
F: MaAdV_F1 cag tgg tch tac atg cac atc
R: MaAdV_R gca taa gac ccg tag caw gg
T_a: touch-down PCR, 10x65°-55 °C (pokles 1 °C na cyklus), 30x55°C
Produkt: 599-725 bp
Literatura: Sibley et al. (2011)

Charakteristika kmenů:

Bovine mastadenovirus A CAPM V-457, Sb. 6000

PCR: cílová sekvence detekována
Sekvence: V1 hypervariabilní oblast genomu
Mykoplasma: nedetekováno
BVDV: nedetekováno

Bovine mastadenovirus B CAPM V-63, Sb. 6490

PCR: cílová sekvence detekována
Sekvence: V1 hypervariabilní oblast genomu
Mykoplasma: nedetekováno
BVDV: nedetekováno

Porcine mastadenovirus B CAPM V-310, Sb. 6425

PCR: cílová sekvence detekována
Sekvence: V1 hypervariabilní oblast genomu
Mykoplasma: nedetekováno
BVDV: cílová sekvence detekována - kontaminace

Čeled' Herpesviridae

Bovine alphaherpesvirus 1

Klasifikace: rod *Varicellovirus* (dříve jako Infectiou bovine rhinotracheitis virus)

PCR detekce:

Cíl: gen pro glykoprotein G
F: CR19 cac gac ctg ggc ggg cag cac
R: CR40 ctg caa cgc gaa ggt gtg gct gt
T_a: 60 °C
Produkt: 702 bp
Literatura: Ros and Belak (1999)

Charakteristika kmenů:

Bovine alphaherpesvirus 1 CAPM V-19, Sb. 5933

PCR: cílová sekvence detekována
Sekvenace: gen pro glykoprotein G
Mykoplasma: nedetekováno
BVDV: nedetekováno

Bovine alphaherpesvirus 1 CAPM V-25, Sb. 5851

PCR: cílová sekvence detekována
Sekvenace: gen pro glykoprotein G
Mykoplasma: nedetekováno
BVDV: nedetekováno

Bovine alphaherpesvirus 1 CAPM V-317, Sb. 4941

PCR: cílová sekvence detekována
Sekvenace: gen pro glykoprotein G
Mykoplasma: nedetekováno
BVDV: nedetekováno

Bovine alphaherpesvirus 2

Klasifikace: rod *Simplexvirus* (dříve jako Bovine mammilitis virus)

PCR detekce:

Cíl: gen pro glykoprotein B
F: BoHV26528_F ctc cag cga cga tcc taa ttt
R: BoHV27151_R tat gcg ttg tgc tct gag tg
T_a: 55 °C
Produkt: 624 bp
Literatura: Torres et al. (2009)

Charakteristika kmene:

Bovine alphaherpesvirus 2 CAPM V-225, Sb. 5569

PCR: cílová sekvence detekována
Sekvenace: gen pro glykoprotein B
Mykoplasma: cílová sekvence detekována - kontaminace
BVDV: nedetekováno

Bovine gammaherpesvirus 4

Klasifikace: rod *Rhadinovirus* (dříve jako Bovine herpesvirus 4, Movar virus)

PCR detekce:

Cíl: gen pro glykoprotein B (ORF8)
F: gB1 ccc ttc ttt acc acc acc tac a
R: gB2 tgc cat agc aga gaa aca atg a
T_a: 50 °C
Produkt: 615 bp
Literatura: Wellenberg et al. (2001)

Charakteristika kmene:

Bovine gammaherpesvirus 4 CAPM V-54, Sb. 6648

PCR: cílová sekvence detekována
Sekvenace: gen pro glykoprotein B
Mykoplasma: nedetekováno
BVDV: cílová sekvence detekována - kontaminace

Columbid alphaherpesvirus 1

Klasifikace: rod *Mardivirus* (dříve jako Pigeon herpesvirus)

PCR detekce:

Cíl: gen pro DNA polymerázu
F: CoHV1 GATGGCGGCCTGCTGTTTGT
R: CoHV2 CGCCGTGGACGACTTGCGT
T_a: 60 °C
Produkt: 200 bp
Literatura: Wozniakowski et al. (2013)

Charakteristika kmene:

Columbid alphaherpesvirus 1 CAPM V-455, Sb. 6445

PCR: cílová sekvence detekována
Sekvenace: gen pro DNA polymerázu
Mykoplasma: nedetekováno
BVDV: nedetekováno

Equid alphaherpesvirus 1

Klasifikace: rod *Varicellovirus* (dříve jako Equine abortion virus)

PCR detekce:

Cíl: ORF68
F: EHV1_68F agc att gcc aaa cag ttc c
R: EHV1_68R caa gaa acc act gct caa cc
T_a: 60 °C
Produkt: 925 bp
Literatura: Nugent et al. (2006)

Charakteristika kmene:

Equid alphaherpesvirus 1 CAPM V-44, Sb. 5566

PCR: cílová sekvence detekována
Sekvenace: ORF68
Mykoplasma: nedetekováno
BVDV: nedetekováno

Gallid alphaherpesvirus 1

Klasifikace: rod *Iltovirus* (dříve jako Avian infectious laryngotracheitis virus)

PCR detekce:

Cíl 1: gen pro thymidin kinázu
F: ILTVf ctg ggc taa atc atc caa gac atc a
R: ILTVr gct ctc tcg agt aag aat gag tac a
T_a: 55 °C
Produkt: 2,24 kb
Cíl 2: gen *ICP*
F: ICP 1F act gat agc ttt tcg tac agc acg
R: ICP 1R cat cgg gac att ctc cag gta gca
T_a: 55 °C
Produkt: 688 bp
Literatura: Kirkpatrick et al. (2006)

Charakteristika kmenů:

Gallid alphaherpesvirus 1 CAPM V-56, Ly841/10

PCR: obě cílové sekvence detekovány
Sekvenace: gen pro thymidin kinázu; gen *ICP*
Mykoplasma: cílová sekvence detekována – kontaminace
BVDV: nedetekováno

Gallid alphaherpesvirus 1 CAPM V-83, Ly838/10

PCR: obě cílové sekvence detekovány
Sekvenace: gen pro thymidin kinázu; gen *ICP*
Mykoplasma: cílová sekvence detekována – kontaminace
BVDV: nedetekováno

Suid alphaherpesvirus 1

Klasifikace: rod *Varicellovirus* (dříve jako Pseudorabies virus)

PCR detekce:

Cíl: gen pro glykoprotein B
F: SuHV1-1783F atg gcc atc tcg cgg tgc
R: SuHV1-2099R act cgc ggt cct cca gca
T_a: 55 °C
Produkt: 334 bp
Literatura: Balasch et al. (1998)

Charakteristika kmenů:

Suid alphaherpesvirus 1 CAPM V-94, Ly 504/62

PCR: cílová sekvence detekována
Sekvenace: gen pro glykoprotein B
Mykoplasma: nedetekováno
BVDV: nedetekováno

Suid alphaherpesvirus 1 CAPM V-166, Sb. 6647

PCR: cílová sekvence detekována
Sekvenace: gen pro glykoprotein B
Mykoplasma: nedetekováno
BVDV: cílová sekvence detekována - kontaminace

Čeleď Parvoviridae

Ungulate bocaparvovirus 1

Klasifikace: rod *Bocaparvovirus* (dříve jako Bovine parvovirus)

PCR detekce:

Cíl: gen VP2
F: BoBocaP1 GCTCTGGAGTGGGCTACT
R: BoBocaP2 AGGTGTTGCCAGTCATTAG
T_a: 55 °C
Produkt: 240 bp
Literatura: Luo et al. (2013)

Charakteristika kmene:

Ungulate bocaparvovirus 1 CAPM V-172, Sb. 5582

PCR: cílová sekvence detekována
Sekvenace: gen VP2

Mykoplasma: nedetekováno
BVDV: cílová sekvence detekována – kontaminace

Ungulate parvovirus 1

Klasifikace: rod *Protoparvovirus* (dříve jako Porcine parvovirus)

PCR detekce:

Cíl: gen VP2
F: qPPV1-F cag aat cag caa cct cac ca
R: qPPV1-R gct gct ggt gtg tat gga ag
T_a: 60 °C
Produkt: 100 bp
Literatura: Opriessing et al. (2011)

Charakteristika kmenů:

Ungulate parvovirus 1 CAPM V-197, Sb. 6420

PCR: cílová sekvence detekována
Sekvence: gen VP2
Mykoplasma: nedetekováno
BVDV: cílová sekvence detekována - kontaminace

Ungulate parvovirus 1 CAPM V-198, Sb. 6351

PCR: cílová sekvence detekována
Sekvence: gen VP2
Mykoplasma: nedetekováno
BVDV: cílová sekvence detekována - kontaminace

Čeleď *Poxviridae*

Fowlpox virus

Klasifikace: rod *Avipoxvirus*

PCR detekce:

Cíl: lokus fpv167
F: M2925 (P1) cag cag gtg cta aac aac aa
R: M2926 (P2) cgg tag ctt aac gcc gaa ta
T_a: 52 °C
Produkt: 578 bp
Literatura: Ruíz-Martínez et al. (2016)

Charakteristika kmenů:

Fowlpox virus CAPM V-100, Sb. 6454

PCR: cílová sekvence detekována
Sekvence: lokus fpv167
Mykoplasma: nedetekováno
BVDV: nedetekováno

Pigeonpox virus

Klasifikace: rod *Avipoxvirus*

PCR detekce:

Cíl: lokus fpv167
F: M2925 (P1) cag cag gtg cta aac aac aa

R: M2926 (P2) cgg tag ctt aac gcc gaa ta
T_a: 52 °C
Produkt: 578 bp
Literatura: Ruíz-Martínez et al., (2016)

Charakteristika kmenů:

Pigeonpox virus CAPM V-101, Sb. 6444

PCR: cílová sekvence detekována
Sekvenace: lokus fpv167
Mykoplasma: nedetekováno
BVDV: nedetekováno

Bovine papular stomatitis virus

Klasifikace: rod *Parapoxvirus*

PCR detekce:

Cíl: gen *B2L*
F: PPP-1 gtc gtc cac gat gag cag ct
R: PPP-4 tac gtg gga agc gcc tcg ct
T_a: 55 °C
Produkt: 594 bp
Literatura: Inoshima et al. (2000)

Charakteristika kmene:

Bovine papular stomatitis virus CAPM V-164, Sb. 5963

PCR: cílová sekvence detekována
Sekvenace: gen *B2L*
Mykoplasma: cílová sekvence detekována - kontaminace
BVDV: cílová sekvence detekována - kontaminace

Myxomavirus

Klasifikace: rod *Leporipoxvirus*

PCR detekce:

Cíl: gen *M071L*
F: M071-F acc cgc caa gaa cca cag tag t
R: M071-R taa cgc gag gaa tat cct gta cca
T_a: 57 °C
Produkt: 471 bp
Literatura: Cavadini et al. (2010)

Charakteristika kmene:

Myxomavirus CAPM V-531, Sb. 6385

PCR: cílová sekvence detekována
Sekvenace: gen *M071L*
Mykoplasma: cílová sekvence detekována - kontaminace
BVDV: nedetekováno

3.4.2 RNA VIRY

Čeled' Arteriviridae

Equine arteritis virus

Klasifikace: rod *Equartevirus*

PCR detekce:

Cíl 1: gen *M*
F: EAV_M1 CTGAGGTATGGGAGCCATAG
R: EAV_M10 GGCCTGCGGACGTGATCG
T_a: 60 °C
Produkt: 449 bp
Cíl 2: gen *GP5*
F: GL105F GCTGACGGATCGCGGCGTTATT
R: GL675R ATAGTGGGCCTACCTGGGACTAA
T_a: 60 °C
Produkt: 591 bp
Literatura: Echeverría et al. (2007)

Charakteristika kmene:

Equine arteritis virus CAPM V-319, Sb. 6505

PCR: obě cílové sekvence detekovány
Sekvence: gen *M*; gen *GP5*
Mykoplasma: nedetekováno
BVDV: cílová sekvence detekována – kontaminace

Porcine reproductive and respiratory disease virus

Klasifikace: rod *Porarterivirus*

PCR detekce:

Cíl: ORF7/3'NCR
F: dgPRRS_F ATGGCCAGCCAGTCAATCA
R: dgPRRS_R TCGCCCTAATTGAATAGGTGA
T_a: 52 °C
Produkt: 398 bp Type 1 EU; 433 bp Type 2 AM
Literatura: Choi et al. (2013)

Charakteristika kmene:

PRRSV CAPM V-490, Sb. 5947

PCR: cílová sekvence detekována
Sekvence: ORF7/3'NCR
Mykoplasma: nedetekováno
BVDV: nedetekováno

PRRSV CAPM V-501, Sb. 6617

PCR: cílová sekvence detekována
Sekvence: ORF7/3'NCR
Mykoplasma: nedetekováno
BVDV: nedetekováno

PRRSV CAPM V-502, Sb. 5948

PCR: cílová sekvence detekována

Sekvenace: ORF7/3'NCR
Mykoplasma: nedetekováno
BVDV: nedetekováno

Čeled' *Coronaviridae*

Alphacoronavirus 1 (TGEV)

Klasifikace: rod *Alphacoronavirus* (dříve jako Transmissible gastroenteritis virus TGEV)

PCR detekce:

Cíl: gen *S* (S gene deletion area)
F: TGEV-F ggg taa gtt gct cat tag aaa taa tgg
R: TGEV-R ctt ctt caa agc tag gga ctg
T_a: 55 °C
Produkt: 1 006 bp
Literatura: Kim et al. (2000)

Charakteristika kmenů:

TGEV CAPM V-66, Sb. 5067

PCR: cílová sekvence detekována
Sekvenace: gen *S*
Mykoplasma: nedetekováno
BVDV: cílová sekvence detekována - kontaminace

TGEV CAPM V-91, Sb. 6603

PCR: cílová sekvence detekována
Sekvenace: gen *S*
Mykoplasma: nedetekováno
BVDV: cílová sekvence detekována - kontaminace

TGEV CAPM V-126, Sb. 5628

PCR: cílová sekvence detekována
Sekvenace: gen *S*
Mykoplasma: nedetekováno
BVDV: cílová sekvence detekována - kontaminace

Betacoronavirus 1 (BoCoV)

Klasifikace: rod *Betacoronavirus* (dříve jako Bovine coronavirus)

PCR detekce:

Cíl: hypervariabilní oblast genu pro S1 podjednotku S proteinu
F: S1HS CTATACCCAATGGTAGGA
R: S1HA CTGAAACACGACCGCTAT
T_a: 52 °C
Produkt: 885 bp
Literatura: Brandao et al. (2006)

Charakteristika kmene:

Bovine coronavirus CAPM V-326, Sb. 6011

PCR: cílová sekvence detekována
Sekvenace: gen *S*
Mykoplasma: nedetekováno
BVDV: cílová sekvence detekována – kontaminace

Betacoronavirus 1 (PHEV)

Klasifikace: rod *Betacoronavirus* (dříve jako Porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus)

PCR detekce:

Cíl: gen pro hemagglutinin esterázu
F: PHEVIIP3 GTTTGGCCTCTTTWTCCTTWTG
R: PHEVIIP4 TCAGAGCTAATAGATGGCACACC
Ta: 50 °C
Produkt: 322 bp
Literatura: Dong et al. (2014)

Charakteristika kmenů:

PHEV CAPM V-167, Sb. 1999

PCR: cílová sekvenec detekována
Sekvenace: gen pro hemagglutinin esterázu
Mykoplasma: nedetekováno
BVDV: nedetekováno

PHEV CAPM V-316, Sb. 6634 - BMK3

PCR: cílová sekvenec detekována
Sekvenace: gen pro hemagglutinin esterázu
Mykoplasma: nedetekováno
BVDV: nedetekováno

Čeleď *Orthomyxoviridae*

Influenza A virus

Klasifikace: *Influenza A virus*

PCR detekce:

Cíl: HA₀ cleavage site IAV; panHA RT-PCR assay
F: HA1057.1F GGR GAA TGC CCC AAA TAY GT
F: HA1057.2F GGR ARA TGC CCC AGR TAT GT
F: HA1057.3F GGR GAA TGC CCC AAR TAY AT
R: HA1232.1/555)-R CTAGTCCGAACATTGAGTTGCTATGVTGRTAWCCATACC
R: HA1232.2/555)-R CTGAGTCCGAACATTGAGTTYTGATGYCTGAADCCRTAC
Ta: 50 °C
Produkt: 164-176 bp
Literatura: Gall et al. (2008)

Charakteristika kmene:

Influenza A virus (swine) CAPM V-1, Sb. 6520

PCR: cílová sekvenec detekována
Sekvenace: gen pro HA (HA₀ cleavage site IAV)
Mykoplasma: nedetekováno
BVDV: nedetekováno

Čeleď *Paramyxoviridae*

Avian avulavirus 1

Klasifikace: rod *Avulavirus* (dříve Avian paramyxovirus 1; Newcastle disease virus)

PCR detekce:

Cíl: F (Fusion protein) gene, Class II
F: AMPV1_A ATGGGCGCCAGACYCTTCTAC
R: AMPV1_B CTGCCACTGCTAGTTGTGATAATCC
Ta: 52 °C
Produkt: 535 bp
Literatura: Liu et al. (2011)

Charakteristika kmenů:

Avian avulavirus 1 CAPM V-201, Sb. 6547

PCR: cílová sekvence detekována
Sekvence: gen *F*
Mykoplasma: nedetekováno
BVDV: nedetekováno

Avian avulavirus 1 CAPM V-442, Sb. 6548

PCR: cílová sekvence detekována
Sekvence: gen *F*
Mykoplasma: nedetekováno
BVDV: nedetekováno

Čeled' *Pneumoviridae*

Bovine orthopneumovirus

Klasifikace: rod *Orthopneumovirus* (dříve jako Bovine respiratory syncytial virus)

PCR detekce:

Cíl 1: gen *N* (nukleoprotein)
F: N2.3 CAT CTC AAT AAG TTG TGT GG
R: N2.4 TCT ACA ACC TGT TCC ATT TC
Ta: 49 °C
Produkt: 731 bp
Cíl 2: gen *G* (glykoprotein)
F: VG1 CCA CCC TAG CAA TGA TAA CCT TGA C
R: VG4 GCT AGT TCT GTG GTG GAT TGT TGT C
Ta: 58 °C
Produkt: 541 bp
Literatura: Valarcher et al. (2004)

Charakteristika kmenů:

Bovine orthopneumovirus CAPM V-362, Sb. 5536

PCR: obě cílové sekvence detekovány
Sekvence: gen *N*; gen *G*
Mykoplasma: nedetekováno
BVDV: nedetekováno

Bovine orthopneumovirus CAPM V-534, Sb. 5517

PCR: obě cílové sekvence detekovány
Sekvence: gen *N*; gen *G*
Mykoplasma: nedetekováno
BVDV: nedetekováno

Čeleď *Picornaviridae*

Enterovirus E

Klasifikace: rod *Enterovirus* (dříve jako Bovine enterovirus type 1)

PCR detekce:

Cíl: 5'UTR (pozn. pouze ke klasifikaci do rodu)
F: Non-HuEV5UTR_F GGGAGTAGTCCGACTCCG
R: Non-HuEV5UTR_R CRGAGCTACCACTGGGGT
T_a: 55 °C
Produkt: 220 bp
Literatura: Boros et al. (2012)

Charakteristika kmenů:

Bovine enterovirus CAPM V-10, Sb. 5850

PCR: cílová sekvence detekována
Sekvenace: neprovedeno
Mykoplasma: nedetekováno
BVDV: nedetekováno

Bovine enterovirus CAPM V-231, Sb. 5144

PCR: cílová sekvence detekována
Sekvenace: neprovedeno
Mykoplasma: nedetekováno
BVDV: nedetekováno

Enterovirus F

Klasifikace: rod *Enterovirus* (dříve jako Bovine enterovirus type 2)

PCR detekce:

Cíl: 5'UTR (pozn. pouze ke klasifikaci do rodu)
F: Non-HuEV5UTR_F GGGAGTAGTCCGACTCCG
R: Non-HuEV5UTR_R CRGAGCTACCACTGGGGT
T_a: 55 °C
Produkt: 220 bp
Literatura: Boros et al. (2012)

Charakteristika kmene:

Bovine enterovirus CAPM V-232, Sb. 6107

PCR: cílová sekvence detekována
Sekvenace: neprovedeno
Mykoplasma: nedetekováno
BVDV: nedetekováno

Erbovirus A

Klasifikace: rod *Erbovirus* (dříve jako Equine rhinitis A virus, rod Aphthovirus)

PCR detekce:

Cíl 1: 5'UTR
F: ERAV5'UTR_F TCAGCCCCCTGTCATTGACT
R: ERAV5'UTR_R TGRTCAGGGCTGTAACCA
T_a: 50 °C

Produkt: 446 bp
Cíl 2: polyprotein
F: ERAVpoly2F TGGATGAAGTGGTTTTTGC
R: ERAV poly2R ACTCTCATTGCATCAGCTGC
T_a: 50 °C

Produkt: 612 bp
Literatura: Lu et al. (2012)

Charakteristika kmene:

Equine rhinitis A virus CAPM V-258, Sb. 6485

PCR: obě cílové sekvence detekovány
Sekvenace: 5'UTR; polyprotein
Mykoplasma: nedetekováno
BVDV: cílová sekvence detekována - kontaminace

Teschovirus A

Klasifikace: rod *Teschovirus* (dříve jako Porcine enterovirus)

PCR detekce:

Cíl: 5'UTR
F: pev1a AGT TTT GGA TTA TCT TGT GCC C
R: pev1e CGC GAC CCT GTC AGG CAG CAC
T_a: 55 °C
Produkt: 316 bp
Literatura: Krumbholz et al. (2003)

Charakteristika kmenů:

Porcine teschovirus CAPM V-250, Sb. 5351

PCR: cílová sekvence detekována
Sekvenace: 5'UTR
Mykoplasma: nedetekováno
BVDV: cílová sekvence detekována - kontaminace

Čeleď *Rhabdoviridae*

Piscine novirhabdovirus

Klasifikace: rod *Novirhabdovirus* (dříve jako Viral haemorrhagic septicemia virus)

PCR detekce:

Cíl: gen *N*
F: VN_For ATG GAA GGA GGA ATT CGT GAA GCG
R: VN-Rev GCG GTG AAG TGC TGC AGT TCC C
T_a: 55 °C
Produkt: 505 bp
Literatura: Snow et al. (2004)

Charakteristika kmene:

Viral haemorrhagic septicemia virus CAPM V-350, Sb. 6553

PCR: cílová sekvence detekována
Sekvenace: gen *N*
Mykoplasma: cílová sekvence detekována
BVDV: nedetekováno

Carp spirivirus

Klasifikace: rod *Spirivirus* (dříve jako Spring viremia of carp virus)

PCR detekce:

Cíl: gen *G*
F: SVCV_G1 TGAAGAYTGTGTCAATCAAGTC
R: SVCV_G2 GCGARTGCAGAGAAAAAGTG
T_a: 55 °C
Produkt: 369 bp
Literatura: Shimahara et al. (2016)

Charakteristika kmene:

Spring viremia of carp virus CAPM V-540, Sb. 6553

PCR: cílová sekvence detekována
Sekvenace: gen *G*
Mykoplasma: nedetekováno
BVDV: nedetekováno

3.4.3 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Balasch, M., Pujols, J., Segalés, J. et al. (1998) Aujeszky's disease (pseudorabies) virus detection in cerebrospinal fluid in experimentally infected pigs. *Veterinary Microbiology* 60:99-106.

Boros, Á., Pankovics, P., Knowles, N.J. et al. Natural interspecies recombinant bovine/porcine enterovirus in sheep. *Journal of General Virology* 93: 1941-1951.

Brandão, P.E., Gregori, F., Richtzenhain, L.J. et al. (2006) Molecular analysis of Brazilian strains of bovine coronavirus (BCoV) reveals a deletion within hypervariable region of the S1 subunit of the spike glycoprotein also found in human coronavirus OC43. *Archives of Virology* 151:1735-1748.

Cavadini, P., Botti, G., Barbieri, I. et al. (2010) Molecular characterization of SG33 and Borghi vaccines used against myxomatosis. *Vaccine* 28: 5414-5420.

Choi, E.-J., Lee, C.-H., Song, J.-Y. et al. (2013) Genetic diversity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Korea. *Journal of Veterinary Science* 14:114-124.

Dong, B., Li, H., Zhao, K. et al. (2014) Identification and genetic characterization of porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus from domestic piglets in China. *Archives of Virology* 159:2329-2337.

Echeverría, M.G., Díaz, S., Metz, G.E. et al. (2007) genetic typing of equine arteritis virus isolates from Argentina. *Virus Genes* 35:313-320.

- Gall, A.**, Hoffmann, B., Harder, T. et al. (2008) Universal primer set for amplification and sequencing of HA₀ cleavage site of all influenza A viruses. *Journal of Clinical Microbiology* 46:2561-2567.
- Günes, A.**, Marek, A., Grafl, B. et al. (2012) Real-time PCR assay for universal detection and quantification of all five species of fowl adenoviruses (FAdV-A to FAdV-E). *Journal of Virological Methods* 183: 147-153.
- Inoshima, Y.**, Morooka, A., Sentsui, H. (2000) Detection and diagnosis of parapoxvirus by the polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods* 84: 201-208.
- Kim, L.**, Chang, K.-O., Sestak, K. et al. (2000) Development of a reverse-transcription nested polymerase chain reaction assay for differential diagnosis of transmissible gastroenteritis virus and porcine respiratory coronavirus from feces and nasal swabs of infected pigs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 12:385-388.
- Kirkpatrick, N.C.**, Mahmoudian, A., O'Rourke, D. et al. (2006) Differentiation of infectious laryngotracheitis virus isolates by restriction fragment length polymorphic analysis of polymerase chain reaction products amplified from multiple genes. *Avian Diseases* 50: 28-34.
- Krumbholz, A.**, Wurm, R., Scheck, O. et al. (2003) Detection of porcine teschoviruses by LightCycler real-time PCR. *Journal of Virological Methods* 113:51-63.
- Liu, H.**, Zhao, Y., Zheng, D. et al. (2011) Multiplex RT-PCR for rapid detection and differentiation of class I and class II Newcastle disease viruses. *Journal of Virological Methods* 171:149-155.
- Lu, Z.**, Timoney, P.J., White, J. et al. (2012) Development of one-step TaqMan® real-time reverse transcription-PCR and conventional reverse transcription-PCR for the detection of equine rhinitis A and B viruses. *BMC Veterinary Research* 8:120.
- Luo, J.-G.**, Ge, J.-W., Tang, L.-J. et al. (2013) Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of bovine parvovirus. *Journal of Virological Methods* 191:155-161.
- Nugent, J.**, Birch-Machin, I., Smith, K.C. et al. (2006) Analysis of equid herpesvirus 1 strain variation reveals a point mutation of the DNA polymerase strongly associated with neuropathogenic versus nonneuropathogenic disease outbreaks. *Journal of Virology* 80: 4047-4060.

Opriessing, T., Shen, H.G., Pal, N. (2011) A live-attenuated chimeric porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccine is transmitted to contact pigs but is not upregulated by concurrent infection with porcine parvovirus (PPV) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and is efficacious in a PCV2b-PRRSV-PPV challenge model. *Clinical and Vaccine Immunology* 18: 1261-1268.

Ros, C., Belák, S. (1999) Studies of genetic relationships between bovine, caprine, cervine, and rangiferine alphaherpesviruses and improved molecular methods for virus detection and identification. *Journal of Clinical Microbiology* 37: 1247-1253.

Ruiz-Martínez, J., Ferraguti, M., Figuerola, J. et al. (2016) Prevalence and genetic diversity of avipoxvirus in house sparrow in Spain. *PLoS ONE* 11:0168690.

Shimahara, Y., Kurita, J., Nishioka, T. et al. (2016) Development and improvement RT-PCR for specific detection of spring viraemia of carp virus. *Journal of Fish Diseases* 39:269-275.

Sibley, S., Goldberg, T., Pedersen, J.A. (2011) Detection of known and novel adenoviruses in cattle wastes via broad-spectrum primers. *Applied and Environmental Microbiology* 77: 5001-5008.

Snow, M., Bain, N., Black, J. et al. (2004) Genetic population structure of marine viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV). *Disease of Aquatic Organisms* 61:11-21.

Torres, F.D., Almeida, S.R., Silva, M.S. et al. (2009) Distribution of latent bovine herpesvirus 2 DNA in tissues of experimentally infected sheep. *Research in Veterinary Science* 87: 161-166.

Valarcher, J.-F., Schelcher, F., Bouhry, H. (2000) Evolution of bovine respiratory syncytial virus. *Journal of Virology* 74: 10714-10728.

Wellenberg, G.J., Verstraten, E.R.A.M., Belak, S. et al. (2001) Detection of bovine herpesvirus 4 glycoprotein B and thymidine kinase DNA by PCR analysis in bovine milk. *Journal of Virological Methods* 97: 101-112.

Woźniakowski, G.J., Samorek-Salamonowicz, E., Szymański, P. et al. (2013) Phylogenetic analysis of Columbid herpesvirus-1 in rock pigeons, birds of prey and non-raptorial birds in Poland. *BMC Veterinary Research* 9:52.

3.4.4 POSTUP PRO EXTRAKCI NUKLEOVÝCH KYSELIN

Pro extrakci nukleových kyselin z virové suspenze je vzhledem k dalšímu postupu vhodné využít metodu umožňující současnou extrakci DNA a RNA. Pro účely postupu byla použita

souprava **Chemagic Viral DNA/RNA Kit (Perkin Elmer)** dle návodu výrobce. Pro extrakci nukleových kyselin je dále potřeba stojan pro magnetickou separaci v 1,5/2 ml mikrozkrumavkách, který není součástí soupravy. Pro účely postupu byl použit stojánek **Chemagic Stand 2x12 (Perkin Elmer)**. Dodavatelem pro výše uvedený materiál je Elisabeth Pharmacon spol. s r.o. Extrahovanou směs nukleových kyselin je vhodné uchovávat při teplotě -80 °C.

3.4.5 POSTUP PRO PROVEDENÍ PCR

Pro provedení polymerázové řetězové reakce (PCR) ke specifické detekci částí virového genomu DNA virů byla použita souprava **Aptamer Hot Start Mastermix (Top-Bio)** dle návodu výrobce. Vzhledem k obsahu aditiv a barviva se po provedení PCR vzorek vkládá přímo na agarózový gel. Dodavatelem materiálu je Top-Bio, s.r.o. Složení reakční směsi je uvedeno v Tabulce 2. Teplotní profil amplifikační reakce je uveden v Tabulce 3.

Tabulka 2: Složení reakční směsi pro soupravu Aptamer Hot Start Mastermix (Top-Bio)

<i>Komponenta</i>	<i>Finální koncentrace</i>	<i>Množství na 1 vzorek</i>
mastermix	1x	20 µl
voda	-	12 µl
primer F [10 pmol/ µl]	0,5 µM	2 µl
primer R [10 pmol/ µl]	0,5 µM	2 µl
cDNA		4 µl
<i>Celkový objem reakční směsi</i>		40 µl

Tabulka 3: Teplotní profil amplifikační reakce pro soupravu Aptamer Hot Start Mastermix (Top-Bio)

počáteční denaturace	94 °C/1 min	1 cyklus
denaturace	94 °C/15 s	35 cyklů
nasednutí primerů	x °C/15 s*	
syntéza	72 °C/30 s	
závěrečná syntéza	72 °C/7 min	1 cyklus
chlazení	12 °C	-

*T_a pro oligonukleotidové primery k detekci jednotlivých virů zahrnutých ve Funkčním vzorku jsou uvedeny v kapitole 3.4.1

3.4.6 POSTUP PRO PROVEDENÍ REVERZNĚ TRANSKRIPČNÍ PCR

Pro provedení jednokrokové reverzně transkripční PCR (RT-PCR) ke specifické detekci částí virového genomu RNA virů byla použita souprava **HyperScript™ One-step RT-PCR Premix (Geneall Biotechnology Co., Ltd.)** dle návodu výrobce. Dodavatelem materiálu je Bohemia

Genetics s.r.o. Složení reakční směsi je uvedeno v Tabulce 4. Teplotní profil amplifikační reakce je uveden v Tabulce 5.

Tabulka 4: Složení reakční směsi pro soupravu HyperScript™ One-step RT-PCR Premix (Geneall Biotechnology Co., Ltd.)

Komponenta	Koncentrace	Množství na 1 vzorek
RT-PCR premix	1x	10 µl (baleno ve stripech 8x0,2 µl zkumavky)
primer F – P3 [10 pmol/ µl]	0,5 µM	1 µl
primer R – P4 [10 pmol/ µl]	0,75 µM	1,5 µl
voda bez nukleáz**	-	2,5 µl
RNA	max. 2 µg	5 µl
<i>Celkový objem reakční směsi</i>		20 µl

Tabulka 5: Teplotní profil amplifikační reakce pro soupravu HyperScript™ One-step RT-PCR Premix (Geneall Biotechnology Co., Ltd.)

reverzní transkripce	reverzní transkripce	55 °C/45 min	1 cyklus
	inaktivace/denaturace	94 °C/4 min	
polymerázová řetězová reakce	denaturace	94 °C/30 s	35 cyklů
	nasednutí primerů	x °C/30 s*	
	syntéza	72 °C/30 s	
závěrečná syntéza		72 °C/5 min	1 cyklus
chlazení		12 °C	-

*T_a pro oligonukleotidové primery k detekci jednotlivých virů zahrnutých ve Funkčním vzorku jsou uvedeny v kapitole 3.4.2

3.4.7 POSTUP PRO SEKVENACI AMPLIFIKOVANÝCH ČÁSTÍ GENOMU

Po provedení agarózové gelové elektroforézy byl amplifikovaný produkt o očekávané velikosti purifikován pomocí **Wizard®SV Gel and PCR Clean-Up system (Promega)** dle návodu výrobce. Dodavatelem soupravy je East Port Praha, s.r.o. Sekvence byla provedena externím dodavatelem Eurofins Genomics obousměrně s využitím **Mix2Seq Kit (Eurofins Genomics)**.

4. SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

Ověřování přítomnosti specifické virové nukleové kyseliny jednotlivých sbírkových položek a detekce kontaminujících mykoplazem (*Mycoplasma* sp.) a viru bovinní epidemické diarhei (BVDV) se u nově připravených šarží sbírkových kmenů doposud rutinně neprovádělo. Využití navržených postupů výrazně zkvalitní služby poskytované Sbírkou zoopatogenních mikroorganismů (CAPM) VÚVeL Brno.

5. UPLATNĚNÍ FUNKČNÍHO VZORKU

Funkční vzorek je na pracovišti autorů zaveden. Jeho další komerční využití se vzhledem k charakteru výsledku a jedinečnosti pracoviště, kdy Sběrka zoopatogenních mikroorganismů (CAPM) je jediná sbírka uchováající virové původce významných veterinárních nákaz, nepředpokládá. Význam uplatnění funkčního vzorku spočívá ve zlepšení postupů přípravy nových šarží virových kmenů deponovaných na Sbírce zoopatogenních mikroorganismů (CAPM) VÚVeL Brno.

6. EKONOMICKÉ ASPEKTY

V současné době není možná ekonomické aspekty funkčního vzorku určit.

7. DEDIKACE

Funkční vzorek byl vytvořen v rámci projektu Národní agentury pro zemědělský výzkum, číslo projektu QJ1630210.



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