



FUNKČNÍ VZOREK

**Metoda izolace a detekce DNA viru
afrického moru prasat
v maticích masa a masných výrobků**

**Ing. Miroslava Krzyžánková, Dr.rer.nat
Mgr. Petra Vašíčková, Ph.D.**

**5704
2019**

Funkční vzorek 5704/2019

**Metoda izolace a detekce DNA viru afrického moru prasat v matricích masa
a masných výrobků**

Autoři

Ing. Miroslava Krzyžánková, Dr.rer.nat

Mgr. Petra Vašíčková, Ph.D.

Funkční vzorek byl vytvořen v rámci projektu Ministerstva zemědělství QK1920113.

2019

ISBN 978-80-88233-81-7

Obsah

1. Úvod.....	3
2. Předmět funkčního vzorku.....	4
3. Vlastní popis metodiky funkčního vzorku.....	4
3.1. Předmluva.....	4
3.2. Metodika funkčního vzorku.....	5
3.2.1. Izolace virových nukleových kyselin z matric masa a masných výrobků	5
3.2.2. Detekce a kvantifikace kmene CAPM V-402	6
3.2.3. Detekce a kvantifikace genomu ASFV	6
3.2.4. Kvantifikace izolované DNA kmene CAPM V-402 a ASFV, stanovení účinnosti a limitu detekce metody	7
3.3. Výsledky.....	8
3.3.1. Výběr metody.....	8
3.3.2. Popis vybrané metody izolace DNA kmene CAPM V-402 a ASFV ze vzorků masa a masných výrobků	8
3.3.3. Koncentrace a čistota izolované DNA	9
3.3.4. Limit detekce a účinnost metody	9
3.4. Kontrolní body metody.....	10
3.4.1. Použití interní amplifikační kontroly	10
3.4.2. Vyjádření výsledku stanovení možné přítomnosti DNA ASFV ve vzorku	10
3.4.3. Operativní řízení jakosti	10
3.4.4. Skladování jednotlivých komponent.....	11
4. Srovnání „novosti postupů“	11
5. Uplatnění funkčního vzorku	12
6. Ekonomické aspekty	12
7. Seznam použité literatury	12

1. Úvod

Virus afrického moru prasat (ASFV) patří mezi viry zásadně ohrožující velkochovy a malochovy prasat domácích. Jelikož spotřeba vepřového masa patří v České republice dlouhodobě k nejvyšším, má jeho šíření značný ekonomický dopad. Tento virus je relativně odolný vůči okolním podmínkám a v prostředí bohatém na proteiny je jeho odolnost ještě zvýšena. V tkáních infikovaných prasat může přetrvávat až několik měsíců, za běžných teplot až měsíc i bez nosné matrice. Z toho důvodu je důležitá jeho spolehlivá a rychlá detekce. Pro prokázání částic ASFV existují různé způsoby založené jednak na detekci specifických protilátek, nebo na přímé detekci agens, případně virové DNA.

ASFV je jediný zástupce čeledi *Asfviridae*. Jedná se o obalený virus, jehož genom je tvořen dvěma vlákny DNA. Virion se skládá z ikosahedrální kapsidy o velikosti 200 nm sestávající se z několika koncentrických vrstev, přičemž zralý virion AMP je tvořen vnějším obalem, kapsidou, vnitřním obalem a dalším obalem obsahujícím nukleoid. Délka jeho genomu se pohybuje mezi 170-194 kb a kóduje, 150-167 proteinů, včetně těch, které jsou nutné k jeho replikaci (Alonso et al. 2018; Dixon et al. 2019).

Průkaz genomu ASFV pomocí polymerázové řetězové reakce v reálném čase (qPCR) představuje vysoce citlivou, specifickou a rychlou metodu. S jejím použitím je možná nejen detekce, ale i kvantifikace virových agens (genomu) v různých typech matric. Provedení této reakce předchází krok izolace nukleových kyselin. Je nutné získat DNA v dostatečném množství a čistotě. Pro ASFV zatím není dosud popsán způsob izolace virových částic (případně virových nukleových kyselin) z masa či masných výrobků. V případě živočišných tkání se nejčastěji používá 10% tkáňový homogenát. Dále je pro maso možná izolace nukleových kyselin z masové šťávy, pro jiné masné výrobky však tento způsob není vhodný. Jako vhodná metoda se jeví fenol-chloroformová extrakce DNA s následnou izolací nukleové kyseliny na magnetických kuličkách.

Maso a masné výrobky jako komplexní matrice obsahují celou řadu látek, které mohou působit inhibici qPCR a tím zkreslovat její výsledky. Použití interní amplifikační kontroly (IAC) připravené *in vitro* a její přidání do každé qPCR reakce umožní identifikovat vzorek obsahující PCR inhibitory. Pro kvantifikaci viru by měly být výsledky vztaženy k známé

koncentraci cílové sekvence DNA a měla být vytvořena kalibrační křivka. Ke kontrole čistoty práce a křížových kontaminací během analýz vzorků je vhodné použít systém negativních kontrol (negativní kontrola izolace nukleových kyselin a negativní kontrola qPCR).

2. Předmět funkčního vzorku

Cílem funkčního vzorku bylo optimalizovat a zavést metodu pro izolaci a detekci DNA ASFV v matricích masa a tepelně neopracovaných masných výrobků. Pro kontrolu správnosti postupu, minimalizaci falešně pozitivních nebo falešně negativních výsledků se v popisované metodě nachází systém kontrol.

3. Vlastní popis metodiky funkčního vzorku

3.1. Předmluva

Pro izolaci virových částic z potravin se používají různé metody v závislosti od typu nosné matrice, ze které je virus izolován. Metody pro izolaci virových částic jsou standardizovány pro drobné ovoce, listovou zeleninu, mlže, stěry z prostředí a pitnou vodu v normách ISO/TS 15216 (Anonymous 2013a, b; Lowther et al. 2019). Bohužel, pro maso a masné výrobky standardizované metodiky získání virových nukleových kyselin zatím chybí. Pro viry jejichž genom je tvořen RNA byly popsány metody homogenizace ve vodě (Hennechart-Collette et al. 2019), fosfátovém pufru (PBS) či roztoku na bázi TRIreagent® (Moor et al. 2018). Pro virová agens s DNA genomem je nejčastějším způsob extrakce virové DNA z tkání příprava 5-10% tkáňového homogenátu v PBS (Aguero et al. 2004), nebo masové šťávy u izolací ze svaloviny (McKillen et al. 2010), případně lýze RLT pufrem (Monini et al. 2016).

Tepelně neopracované maso a masné výrobky představují komplexní matici sestávající ze zvýšeného obsahu proteinů a tuků. Obě uvedené látky způsobují zpomalení enzymatických reakcí, mezi které patří i qPCR. U nevhodně zvolené metody izolace nukleové kyseliny mohou zbytky uvedených složek vzorek kontaminovat a působit inhibici qPCR reakce a zkreslení jejich výsledků. Oplach matrice pomocí lyzačního pufru způsobí rozrušení povrchu matrice a uvolnění virů do roztoku. Přidáním směsi fenolu, chloroformu a izoamylalkoholu a následným intenzivním promícháváním dochází k separaci roztoku do dvou fází – vodné obsahující DNA a organické obsahující fenol a chloroform. Na rozhraní těchto dvou fází se

hromadí proteiny. Po centrifugaci je možné vodnou fází oddělit od zbytku a izolovat nukleovou kyselinu. Pro samotnou izolaci nukleové kyseliny existuje k dispozici velké množství izolačních souprav, založených na použití magnetických částic nebo silikagelových kolonek, kde se nukleová kyselina zachytí, promyje a následně, vlivem změny vazebních podmínek, eluuje.

Pro izolaci virové DNA z masa a masných výrobků jsme použili kombinaci fenol chloroformové extrakce DNA a její další izolace pomocí komerční soupravy na principu separace na magnetických kuličkách. Hlavní výhodou tohoto typu izolace je možnost použít větší objemový rozsah – od 1 až po 10 ml vzorku. Významnou výhodou je také použití fenol-chloroformové extrakce v prvním kroku izolace, které způsobí inaktivaci viru. Tento krok umožní, že v prostorách laboratoře se zabezpečením třetího stupně (BL3) může být provedena pouze počáteční práce – oplach matrice. Další výhodou je možnost následující zpracování vzorku pomocí automatického analyzátoru nukleových kyselin, co může v budoucnu urychlit samotnou metodu a sníží její pracnost.

3.2. Metodika funkčního vzorku

Experimentální práce s ASFV je možné provádět jenom v prostorách BL3. Z toho důvodu jsme pro vývoj a optimalizaci metody použili „náhradní“ virus, jehož vlastnosti (např. genom a přítomnost obalu) jsou podobné ASFV, s nímž je možno pracovat v laboratořích se stupněm zabezpečení 2 a lze ho bez problémů kultivovat na buněčných liniích – bovinní herpes virus 1 (BHV 1, kmen CAPM V-402). Uvedený virus (čeleď *Herpesviridae*, podčeleď *Alphaherpesviridae*, rod *Varicellovirus*) je obalený virus ikozáhedralní symetrie, genom je tvořen DNA.

3.2.1. Izolace virových nukleových kyselin z matric masa a masných výrobků

Pro izolaci virových nukleových kyselin z matrice masa a masných výrobků byla použita navážka 5 g výchozí matrice. Jako vzorová matrice bylo použito mleté vepřové maso a vinná klobása (typ tepelně neopracovaného masného výrobku). Tato navážka vzorku byla uměle kontaminována definovaným množstvím kmene CAPM V-402 (4×10^5 genomových ekvivalentů; kvantifikace dle qPCR).

Na základě dostupných dat byly pro výběr nejvhodnější metody pro izolaci DNA testovány způsoby izolace pomocí TRIreagent® a fenol/chloroformové extrakce s následnou izolací

DNA na magnetických kuličkách. V rámci izolace pomocí TRIreagent® jsme provedli z jednoho vzorku jak izolaci DNA, tak i RNA, jelikož izolovaná RNA často obsahuje i DNA. Po provedení jednotlivých izolací byly srovnány účinnosti jednotlivých postupů a vybraná nejvhodnější metoda (tabulka 1). K vybrané metodě byl stanoven limit detekce a byla ověřena na genomu ASFV.

3.2.2. Detekce a kvantifikace kmene CAPM V-402

K detekci a zejména kvantifikaci kmene CAPM V-402 byla zavedena a optimalizována qPCR. K průkazu specifické oblasti genomu BHV 1 byly vybrány specifické oligonukleotidy (primery a sonda) dle publikace (Chandranaiik et al. 2013). K systému byla k rozlišení falešně negativních (inhibovaných) a skutečně negativních vzorků ve formě plazmidové DNA přidána interní amplifikační kontrola (IAC) dle publikace (Slana et al. 2008). Amplifikace a detekce fluorescence byla provedena na přístroji LightCycler 480 Instrument (Roche Molecular Diagnostics) a následující analýza s použitím “Fitpoint analysis” programu Light Cycler 480 Software release 1.5.0 (verze 1.5.0.39). Množství CAPM V-402 bylo stanoveno na základě kvantifikačního standardu (plazmidové DNA; koncentrace 1×10^6 , 1×10^5 , 1×10^4 , 1×10^3 , 1×10^2 a 1×10^1 kopií/ μ l).

Plazmidová DNA byla připravena naklonováním PCR produktů získaných pomocí primerů specifických pro BHV 1 a IAC do pDrive Cloning Vector (Qiagen) s následující transformací do chemokompetentních buněk *Escherichia coli*. Po selekci pozitivních kolonií a pomnožení byly plazmidové inzerty ověřeny sekvenováním a základě změřených koncentrací byly naředěny na požadované koncentrace.

3.2.3. Detekce a kvantifikace genomu ASFV

K průkazu a možné kvantifikaci genomu ASFV byla zavedena a optimalizována qPCR, která vycházela ze standardního operačního postupu Evropské referenční laboratoře pro africký mor prasat (Gallardo and Nieto, 2018). K systému byla přidána IAC dle (Slana et al. 2008). qPCR byla provedena v celkovém objemu 20 μ l: 10 μ l of LightCycler 480 Probes Master (Roche Molecular Diagnostics), 10 pmol primerů King-s, King-a, IAC F a IAC F, 4 pmol sondy King-probe, 2 pmol sondy IAC P, 0,2 U Uracil DNA Glycosylase (Roche), 10^3 IAC a 5 μ l templátové DNA. Amplifikace a detekce fluorescence byla provedena na přístroji

LightCycler 480 Instrument (Roche Molecular Diagnostics) za následujících podmínek: denaturace při 95 °C/4 min s následující amplifikací při 95 °C/10 s a 58 °C/30 s, 45 cyklů. Množství dekovaneho ASFV (genomových ekvivalentů) bylo stanoveno na základě kvantifikačního gradientu (plazmidová DNA; koncentrace 1×10^6 , 1×10^5 , 1×10^4 , 1×10^3 , 1×10^2 a 1×10^1 kopií/ μ l) a programu Light Cycler 480 Software release 1.5.0 (Fitpoint analysis, verze 1.5.0.39).

Plazmidová DNA byla připravena naklonováním PCR produktů získaných pomocí primerů specifických pro ASFV a IAC do pDrive Cloning Vector (Qiagen) s následující transformací do chemokompetentních buněk *Escherichia coli*. Po selekci pozitivních kolonií a pomnožení byly plazmidové inzerty ověřeny sekvenováním. Na základě změřených koncentrací byly naředěny na požadované koncentrace.

K zavedení a optimalizaci qPCR byl použit kmen Ba71V ASFV, systém byl následně ověřen na terénních vzorcích, které pocházely z výskytu afrického moru prasat v okrese Zlín.

3.2.4. Kvantifikace izolované DNA kmene CAPM V-402 a ASFV, stanovení účinnosti a limitu detekce metody

Ke každému qPCR experimentu byl přidán kvantifikační gradient (koncentrace 1×10^6 , 1×10^5 , 1×10^4 , 1×10^3 , 1×10^2 a 1×10^1 kopií plazmidové DNA/ μ l). Podle příslušné kalibrační křivky byla provedena absolutní kvantifikace cílové DNA pro každý analyzovaný vzorek. Množství prokázaných cílů ve vzorku bylo stanoveno dle vzorce:

$$N_{\text{kopií DNA}^*} = (N_{\text{kopií DNA ve stanovovaném vzorku}}/5) \times y$$

* - celkový počet kopií DNA (genomových ekvivalentů) BHV1/ASFV v celkové izolované DNA

x - počet kopií cíle v reakci (qPCR)

y – množství, do kterého je eluována izolovaná nukleová kyselina (udáváno v μ l, v popsané metodě 100 μ l)

Stanovení účinnosti vybrané metody bylo provedeno dle vzorce:

$$\text{účinnost izolace (\%)} = N_{\text{kopií DNA}^*}/z \times 100$$

* - počet kopií DNA pro BHV1/ASFV v celkové izolované DNA

z – množství genomových ekvivalentů BHV1/ASFV, kterým byl vzorek uměle kontaminován

Limit detekce vybrané metody byl stanoven na základě umělé kontaminace 5 g masa a masného výrobku množstvím viru definovaným na základě qPCR. Následně byla provedena izolace DNA, qPCR a výpočty dle výše uvedených vzorců. Vzorek byl považován za

pozitivní, pokud byl zachycen fluorescenční signál alespoň v jednom z duplikátů qPCR reakce.

3.3. Výsledky

3.3.1. Výběr metody

Na základě srovnání účinnosti jednotlivých metod pro izolaci DNA pro matrice masa a masných výrobků jsme zvolili metodu, která poskytuje nejvyšší hodnoty zpětné izolace virové DNA a má vyhovující parametry čistoty (hodnoceno jako poměr absorbancí A_{260}/A_{280} a A_{260}/A_{230}). Průměrné hodnoty účinnosti pro jednotlivé metody jsou uvedeny v tabulce 1. Na základě hodnot účinnosti jsme jako nejvhodnější metodu vybrali metodu fenol/chloroform v kombinaci s Nuclisense® magnetic extraction reagents (Biomérieux).

Tabulka 1: Metody použité k izolaci nukleových kyselin ze vzorků masa a masných výrobků

Metoda	Účinnost (průměr ±SO)	n	Čistota NK	
			A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}
TRIrea® DNA maso	0,6 ± 0,3	9	~1,7	~1,0
TRIrea® DNA klobása	3,2 ± 1,7	9	~1,7	~1,4
TRIrea® RNA maso	1,1 ± 0,3	9	>1,8	>1,8
TRIrea® RNA klobása	0,2 ± 0,3	9	~1,7	~1,0
Fenol/Chloroform	40,7 ± 11,0	6	>1,8	>1,8

3.3.2. Popis vybrané metody izolace DNA kmene CAPM V-402 a ASFV ze vzorků masa a masných výrobků

Ke vzorku masa nebo masného výrobku bylo přidáno 5 ml lyzačního roztoku pro izolaci DNA (2% SDS; 400mM NaCl, 100mM TrisCl pH 8,0, 50mM EDTA). Po intenzivním promíchání (vortex, 30 s) bylo ke směsi přidáno 5 ml roztoku fenol: chloroform: izoamylalkohol =25:24:1 a směs byla opět intenzivně protřepána (vortex, 30 s). Po inkubaci 3 min, následovala centrifugace (4300 rpm/10 min/4 °C). Vzniklá vodná fáze (~5 ml) byla opatrně přenesena do čisté zkumavky a smíchaná s 10 ml lyzačního roztoku Nuclisens® (BioMérieux). Následná izolace nukleové kyseliny probíhala dle návodu výrobce, od tohoto kroku je možná automatizace izolace nukleových kyselin. Po krocích promývání nukleové

kyseliny byla tato následně eluována do 100 µl elučního roztoku. Její koncentrace a čistota byla změřena na přístroji NanoDrop. 5 µl izolované nukleové kyseliny bylo použito pro kvantifikaci množství cílové sekvence pomocí qPCR, výpočet účinnosti metody a stanovení limitu detekce.

3.3.3. Koncentrace a čistota izolované DNA

Koncentrace izolované DNA uvedenou metodou se pohybuje v rozmezí 75 ng/µl až 155 ng/µl a vykazuje vysokou čistotu ($A_{260}/A_{280} > 1,8$; $A_{260}/A_{230} > 1,8$), je tedy vhodná pro další použití v qPCR detekčních systémech. Použití separace na magnetických kuličkách umožňuje také efektivní odstranění zbývajících PCR inhibitorů.

3.3.4. Limit detekce a účinnost metody

Za účelem stanovení limitu detekce vybrané metody byly vzorky uměle kontaminovány definovaným množstvím cílových agens (kvantifikace dle qPCR; 4×10^5 , 4×10^4 , 4×10^3 , 4×10^2 a 4×10^1 genomových ekvivalentů/vzorek). Stejným množstvím bylo vždy uměle kontaminováno osm vzorků. Limit detekce byl specifikován jako nejnižší množství stanovených agens se 100% pravděpodobností (tabulka 2). Dle těchto parametrů byl limit detekce výše uvedené metody stanoven na 400 genomových ekvivalentů DNA cílových agens.

Tabulka 2: Stanovení limitu detekce vybrané metody

Umělá kontaminace	Získané množství		Počet vzorků/celkový analyzovaných vzorků	počet pozitivních	Účinnost metody (%) ^d
	průměr	SO			
400 000	111 850	25 030	8/8		37,7
40 000	9 738	1 862	8/8		32,8
4 000	646	114	8/8		21,8
400	115	50	8/8		39,0
40	41	46	4/8		41,8

3.4. Kontrolní body metody

3.4.1. Použití interní amplifikační kontroly

Kontrolním bodem je použití IAC, která se součástí každé provedené qPCR reakce. Plazmidová DNA je přítomná v reakční směsi, společně s příslušnými primery a sondou. V případě neinhibované qPCR proběhne amplifikace plazmidu a na záznamu pozorujeme klasickou sigmoidní křivku. V případě inhibice reakce amplifikace proběhne jenom částečně, nebo neproběhne vůbec. V daném případě se doporučuje vzorek 10 × a 100 × naředit.

3.4.2. Vyjádření výsledku stanovení možné přítomnosti DNA ASFV ve vzorku

Hodnocení experimentu probíhá v prostředí softwaru LightCycler software (version LCS480 1.2.0.169) pomocí „Fit point“ analýzy (kanál FAM DNA ASFV) a druhého derivačního maxima (pro IAC, kanál Cy5). Přepočtení množství DNA ASFV ve vzorku je nutno vždy provádět podle kvantifikačního gradientu v daném experimentu. Kvalitativní hodnocení lze provádět dle tabulky 3.

Tabulka 3: Kvalitativní hodnocení výsledků qPCR

Fluorescence DNA ASFV (Kanál FAM)	Fluorescence IAC (Kanál Cy5)	Celkový výsledek
<i>Pozitivní</i>	<i>Pozitivní</i>	<i>DNA ASFV pozitivní</i>
<i>Pozitivní</i>	Negativní	<i>DNA pozitivní</i>
Negativní	<i>Pozitivní</i>	DNA ASFV negativní
Negativní	Negativní	Inhibice qPCR*

* vzorek je nutno 10 × a 100 × naředit a podrobit qPCR, pokud i v tomto případě je reakce inhibována, je nutno opakovat izolaci nukleové kyseliny ze zásobního vzorku.

3.4.3. Operativní řízení jakosti

Jakost příslušné analýzy je řízená použitím

- a) negativní izolační kontroly během izolace DNA
- b) pozitivní a negativní kontroly qPCR
- c) provedením qPCR v duplikátech.

Jako negativní kontrola izolace je v ekvivalentním vzorku použita voda pro PCR, která je dále zpracovávána jako ostatní vzorky. Pozitivní kontrolu qPCR představuje kvantifikační

gradient. Kvantifikační gradient musí být použitý při každém qPCR experimentu. Všechny vzorky jsou analyzovány v duplikátu.

3.4.4. Skladování jednotlivých komponent

Směs pro izolaci nukleových kyselin (fenol: chloroform: izoamylalkohol; 25: 24: 1) a složky Nuclisense® magnetic extraction reagents (Biomerieux) se skladují na 4-8 °C. Lyzační pufr obsahující SDS se uchovává při pokojové teplotě. Přípravuje se ze zásobních roztoků jednotlivých složek a je stabilní týden ode dne přípravy.

Reakční směs pro qPCR a kvantifikační DNA standard se uchovávají v malých poměrných objemech zamrazeny na -20 °C po dobu nejdéle 6 měsíců a lze je opakovaně rozmrazovat a zamrazovat.

4. Srovnání „novosti postupu“

Pro správnou a přesnou molekulární detekci genomu cíle je důležité získat nukleovou kyselinu v požadované koncentraci a čistotě. Matrice masa a masných výrobků obsahují zvýšený obsah proteinů, tuků, ale také solí a kořenících směsí. Všechny tyto látky jsou potenciálními inhibitory qPCR a jejich obsah v izolované nukleové kyselině je nutné minimalizovat. Izolace doposud známými metodami – oplachem vodou, roztoky s pH v alkalické oblasti, precipitací s polyetylglykolem nepřinesla pro uvedené matrice požadovaný efekt. qPCR bývá v uvedených případech často inhibována, a vzorky je nutné ředit. V případě nízkého obsahu cílové nukleové kyseliny se naředěním vzorku tato může dostat pod limit detekce a vést k vzniku falešně negativních výsledků.

Použitý lyzační pufr s obsahem SDS efektivně smáčí povrch matrice, přítomná EDTA inhibuje DNAázy. Následná extrakce nukleových kyselin pomocí směsi fenolu, chloroformu a izoamylalkoholu odstraní ze směsi proteiny a tuky. Vodní vrstva se použije na izolaci nukleových kyselin s využitím magnetických kuliček. Izolovaná nukleová kyselina se vyznačuje vysokou čistotou, a vzorky před analýzou není nutné ředit. Hodnoty účinnosti izolační metody se pohybují mezi 20-40 %. Navíc je systém Nuclisense® magnetic extraction reagents kompatibilní s automatickým izolátorem nukleových kyselin, co v případě budoucího využití uvedené metody sníží pracnost izolace a celý proces významně urychlí.

5. Uplatnění funkčního vzorku

Funkční vzorek je určen pro izolaci nukleové kyseliny a její detekci pro stanovení množství DNA ASFV v mase a masných výrobcích. Může být využit především Státní veterinární správou ČR. Uvedena souprava však může být nabídnuta i dalším laboratorům pro izolaci DNA a detekci DNA virových patogenů v mase a masných výrobcích a může být využita v rámci portfolia akreditovaných laboratoří Výzkumného ústavu veterinárního lékařství, v.v.i.

6. Ekonomické aspekty

V současné době nelze ekonomické aspekty odhadnout. Náklady na zavedení metodiky do laboratoře se týkají pořízení spotřebního materiálu, chemikálií a souprav pro izolaci nukleových kyselin a na provedení qPCR. Jiné náklady (spojené s nákupem drobného hmotného majetku nutného na provedení metody (pipety, centrifugy a pod) ani náklady na velké přístroje (chlazená centrifuga, real-time thermocycler) nejsou zahrnuty, neboť jsou v současnosti standardním vybavením laboratoře. Náklady na materiál na vyšetření jednoho vzorku podle uvedené metodiky (bez DPH) jsou 680 Kč.

Dedikace

Funkční vzorek byl vytvořen v rámci projektu Ministerstva zemědělství QK1920113.

7. Seznam použité literatury

Aguero, M., Fernandez, J., Romero, L.J., Zamora, M.J., Sanchez, C., Belak, S., Arias, M., Sanchez-Vizcaino, J.M., 2004. A highly sensitive and specific gel-based multiplex RT-PCR assay for the simultaneous and differential diagnosis of African swine fever and Classical swine fever in clinical samples. *Vet. Res.* 35(5), 551-563.

Alonso, C., Borca, M., Dixon, L., Revilla, Y., Rodriguez, F., Escribano, J.M., Consortium, I.R., 2018. ICTV Virus Taxonomy Profile: Asfarviridae. *Journal of General Virology* 99(5), 613-614.

Anonymous, 2013a. ISO/TS 15216-1, Microbiology of food and animal feed - Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time RT-PCR part 1: Method for quantification. First edition, corrected version 2013-05-01. International Organization for Standardization.

Anonymous, 2013b. ISO/TS 15216-2, Microbiology of food and animal feed - Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time RT-PCR

part 2: Method for qualitative detection. First edition, corrected version 2013-05-01. International Organization for Standardization.

Dixon, L.K., Sun, H., Roberts, H., 2019. African swine fever. *Antiviral Res.* 165, 34-41.

Hennechart-Collette, C., Fraisse, A., Guillier, L., Perelle, S., Martin-Latir, S., 2019. Evaluation of methods for elution of HEV particles in naturally contaminated sausage, figatellu and pig liver. *Food Microbiol.* 84.

Gallardo, C.; Nieto, R.: European Union Reference Laboratory for ASF, (EURL-ASF), 2018. CISA-INIA, Valdeolmos 28130, Madrid, Spain, 1.

Chandranaik, B.M., Rathnamma, D., Patil, S.S., Kovi, R.C., Dhawan, J., Ranganatha, S., Isloor, S., Renukprasad, C., Prabhudas, K., 2013. Development of a Probe Based Real Time PCR Assay for Detection of Bovine Herpes Virus-1 in Semen and Other Clinical Samples. *Indian J. Virol.* 24(1), 16-26.

Lowther, J.A., Bosch, A., Butot, S., Ollivier, J., Maede, D., Rutjes, S.A., Hardouin, G., Lombard, B., in't Veld, P., Leclercq, A., 2019. Validation of EN ISO method 15216-Part 1-Quantification of hepatitis A virus and norovirus in food matrices. *Int. J. Food Microbiol.* 288, 82-90.

McKillen, J., McMenemy, M., Hjertner, B., McNeilly, F., Uttenthal, A., Gallardo, C., Adair, B., Allan, G., 2010. Sensitive detection of African swine fever virus using real-time PCR with a 5' conjugated minor groove binder probe. *J. Virol. Methods* 168(1-2), 141-146.

Monini, M., Vignolo, E., Ianiro, G., Ostanello, F., Ruggeri, F.M., Di Bartolo, I., 2016. Detection of Torque Teno Sus Virus in Pork Bile and Liver Sausages. *Food Environ Virol* 8(4), 283-288.

Moor, D., Liniger, M., Baumgartner, A., Felleisen, R., 2018. Screening of Ready-to-Eat Meat Products for Hepatitis E Virus in Switzerland. *Food Environ Virol.*,10(3), 263-271.

Slana, I., Kralik, P., Kralova, A., Pavlik, I., 2008. On-farm spread of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* in raw milk studied by IS900 and F57 competitive real time quantitative PCR and culture examination. *Int. J. Food Microbiol.* 128(2), 250-257.

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