



PROTOTYP

**xMAP panel pro detekci vybraných patogenů
v živočišné matrici**

**MSc. Barbora Zalewska, Ph.D.
Ing. Michaela Nesvadbová, Ph.D.
Mgr. Radka Hulánková, Ph.D.**

**3836
2021**

Prototyp 3836/2021

xMAP panel pro detekci vybraných patogenů v živočišné matrici

**Barbora Zalewska
Michaela Nesvadbová
Radka Hulánková**

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.

ISBN 978-80-7672-020-6



Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i. Hudcova 70 621 00 Brno	Druh dokumentace: Popis technického řešení pro přihlášku prototypu	Verze: 01 Strana: 1/26 Počet příloh: 0		
Výtisk č.1		Účinnost od: 21.12.2021		
Název dokumentace: Diagnostický prostředek pro simultánní detekci patogenních agens v živočišné matrici. Popis technického řešení pro přihlášku prototypu				
Evidence o převzaté dokumentaci				
Číslo výtisku	Funkce	Jméno	Datum	Podpis
1	vedoucí akreditované laboratoře	Petra Vašíčková	21.12.2021	
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: Barbora Zalewska Michaela Nesvadbová Radka Hulánková	Vydal: Barbora Zalewska	Schválil: Petra Vašíčková	

Obsah

1. Úvod	4
2. Oblast techniky.....	12
3. Aktuální stav techniky (diagnostiky)	12
4. Popis technického řešení a nároků na ochranu.....	12
5. Nároky na ochranu	15
6. Vysvětlení nároků na ochranu	17
7. Seznam materiálu obsaženého v diagnostické soupravě	20
8. Literatura.....	24

Vývoj prototypu diagnostického prostředku – detekční soupravy probíhal v rámci řešení projektu Ministerstva Zemědělství QK1810212.

1. Úvod

Bakteriální původci onemocnění s vysoce závažnými klinickými projevy jsou v popředí zájmu bezpečnosti potravin. V posledních letech roste zájem i o patogeny, které nejsou v legislativě podchyceny konkrétními limity, jako např. *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter spp.* či *Yersinia enterocolitica*. Potraviny živočišného původu představují hlavní vehikula hromadných případů onemocnění z potravin (EFSA and ECDC, 2021), což je dáno i tím, že většina původců alimentárních nákaz se vyskytuje primárně v trávicím traktu zvířat. Konzumace živočišných potravin se neustále zvyšuje spolu s rostoucí mírou populace (Dhama et al., 2013). Nejvíce zastoupené komodity jsou maso a masné výrobky a vejce a vaječné výrobky jako hlavní vehikula nejčastěji se vyskytujících alimentárních onemocnění - kampylobakterióz (v případě masa) a salmonelóz (v případě vajec a masa). Mezi další vehikula patří ryby a plody moře a mléko a mléčné výrobky. Největší riziko představuje konzumace syrových nebo nedostatečně tepelně opracovaných potravin, i když ani sekundární kontaminace z prostředí potravinářských provozoven, případně pracovníků manipulujících s potravinami není výjimkou.

Pro prototyp detekčního panelu byly na základě literární rešerše vybrány následující patogeny, které se mohou vyskytovat v živočišné matrici: *Bacillus cereus*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Echinococcus granulosus*, *Escherichia coli* O157 (STEC), *Grimontia hollisae*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium, *Shigella spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio fluvialis*, *Vibrio furnissii*, *Vibrio mimicus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, *Toxoplasma gondii*, *Trichinella spiralis* a *Yersinia enterocolitica*. Některé z těchto cílů (*Bacillus cereus*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium botulinum*, *E. coli* O157 (STEC), *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*, *Shigella spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae* a *Yersinia enterocolitica*) byly převzaty z dříve publikovaného prototypu detekčního panelu pro rostlinnou matrici, vyvinutého v rámci řešení téhož projektu (prototyp č. 1775/2021), jelikož se jedná o patogeny vyskytující se také v matrici živočišné. Výše uvedené patogeny jsou detekovány prostřednictvím několika cílů z důvodu eliminace falešně negativních výsledků.

Bacillus cereus, grampozitivní fakultativně anaerobní bakterie se běžně vyskytuje v půdě a potravinách. Tato bakterie roste při širokém rozmezí teplot od 4° C do 48° C, i když většina kmenů se pomnožuje až při teplotách nad 10°C. Většina případů onemocnění způsobených *B.*

cereus vzniká v důsledku nesprávně tepelně upraveného nebo ještě častěji nesprávně skladovaného jídla, včetně mléčných výrobků a masa, vařené rýže, brambor a těstovin, kdy pasterační teploty aktivují klíčení spor s následným pomnožením bakterie v nedostatečně rychle zchlazeném pokrmu. Otravy způsobené *B. cereus* lze rozdělit na dva typy podle příznaků a podílejících se toxinů – rychleji nastupující emetický syndrom objevující se po požití potravin s emetickým toxinem a průjemový syndrom vyvolaný enterotoxiny produkovanými ve střevě.

Rod *Campylobacter* je skupina spirálovitých bakterií, která zahrnuje více než 20 druhů. Většina humánních kampylobakterióz je způsobena druhem *Campylobacter jejuni*, v menší míře *C. coli*. Tato gramnegativní termotolerantní bakterie je označována jako nejčastější původce střevních onemocnění v Evropě. K příznakům onemocnění patří zvracení, průjem, nevolnost nebo zvýšená teplota. Za hlavní rezervoár je považován zažívací trakt, a to zejména drůbeže, kde nákaza probíhá většinou asymptomaticky. Odtud se pak dostává kampylobakter jako kontaminant do prostředí a do potravin. Ve většině případů jsou bakterie přenášeny potravou (zejména syrovou drůbeží a syrovými mléčnými výrobky), ale také povrchovou vodou kontaminovanou výkaly.

Clostridium botulinum je řazeno mezi grampozitivní obligátně anaerobní tyčinkovité bakterie produkující vysoce toxický neurotoxin, který způsobuje botulismus (otrava nervového systému). Botulotoxin (také známý jako klobásový jed) je produkován bakterií při teplotách od 4° C. V rámci tohoto bakteriálního druhu rozlišujeme několik antigenních sérovarů (označeny A - G), které se vyskytují v půdě, hnoji zvířat, zelenině i mořském sedimentu. Pro konzumenty jsou nebezpečné zejména vakuově balené ryby a (zejména po domácku) konzervované potraviny (masné výrobky, ovoce, zelenina a houby), pro malé děti i med obsahující spóry.

Clostridium difficile je spojováno zejména s nosokomiálními infekcemi a sporadickými průjmy po léčbě antibiotiky. I v tomto případě je onemocnění spojeno s produkcí celé řady toxinů, zejména enterotoxinu, cytotoxinu a binárního toxinu. V rámci komunitního šíření se jako vektory mohou uplatňovat maso, plody moře včetně ryb, případně i zelenina. Stejně jako u ostatních patogenních klostridií, spóry přežívají pasteraci (Lim et al., 2020).

Clostridium perfringens způsobuje alimentární onemocnění v důsledku produkce řady toxinů, zejména enterotoxinu, jehož tvorba je typická pro nejvýznamnější toxigenní typ F. Na rozdíl od *C. botulinum* není tento patogen striktně anaerobní, ale snáší i nízké procento kyslíku.

Vyznačuje se také schopností rychlého množení. Běžně se vyskytuje v půdě a v gastrointestinálním traktu zvířat. V nedostatečně tepelně upravených potravinách, zvláště mase, mohou přežít a následně vyklíčit spory a způsobit průjemové onemocnění (Gohari et al., 2021).

Escherichia coli způsobuje různá onemocnění, jako je průjem, hemoragická kolitida a potenciálně fatální hemolyticko-uremický syndrom. Tato gramnegativní fakultativně anaerobní tyčinkovitá bakterie se vyskytuje jako součást běžné mikroflóry tlustého střeva. Většina kmenů je nepatogenních, existují však sérotypy, které jsou vysoce patogenní. K nim patří enterohemoragická *Escherichia coli* O157:H7, která se nejčastěji přenáší prostřednictvím nedostatečně tepelně upraveného mletého masa, nepasterizovaného nebo nedostatečně pasterovaného mléka, klíčků a zeleniny.

Listeria monocytogenes způsobuje listeriózu, infekci s úmrtností až 20 %. Listeriíza se přenáší prostřednictvím kontaminovaných potravin, jako jsou mléčné výrobky z nepasterovaného mléka, lahůdky, maso a uzeniny, měkké sýry a ryby uzené za studena. Tato grampozitivní tyčinkovitá bakterie se vyskytuje v půdě, vodě i potravinách. Je schopna růstu i při chladírenských teplotách a má schopnost perzistovat ve formě biofilmu na površích v prostředí potravinářských provozoven, odkud může kontaminovat RTE potraviny, např. při krájení. U zdravých lidí, stejně jako u domácích zvířat, zůstává toto onemocnění neodhaleno, většinou totiž probíhá bezpříznakově (asymptomatictí nosiči), eventuálně se projevuje pouze mírnými příznaky (nevolnost, zvracení, průjem), vyvolanými *Listeria monocytogenes* množícími se v buňkách střevní sliznice, ale nepronikajícími dále do organismu. Je-li však organismus oslabený, může docházet k šíření bakterií lymfatickými a krevními cévami do tkání a k rozvoji značných zdravotních komplikací, jako je meningitida. U listeriízy může také dojít k transplacentálnímu přenosu.

Salmonella enterica je gramnegativní, fakultativně anaerobní bakterie způsobující průjemovité onemocnění zvířat i lidí. Jako salmonelóza je označováno onemocnění projevující se typicky jako gastroenteritida. K nákaze člověka dochází nejčastěji prostřednictvím kontaminovaných potravin - společně s kampylobakterem je salmonela nejrozšířenějším alimentárním patogenem v Evropě. V současné době je tento druh rozdělován na jednotlivé poddruhy a ty jsou dále rozdělovány na sérotypy (sérovary), kterých je v současné době více než 2500. Nejvýznamnější jsou sérotypy Enteritidis a Typhimurium, pro které existuje požadavek na nepřítomnost

v čerstvém drůbežím masě (Nařízení (ES) 2073/2005), a proto má význam i jejich samostatná detekce. Salmonely se vyskytují v syrovém masě, drůbeži a vejcích, v syrové zelenině, nepasterovaných mléčných výrobcích, mohou se však nacházet i v jiných druzích potravin a vodě.

Bakterie rodu *Shigella* jsou původci akutních, vysoce nakažlivých průjemových onemocnění s typickou příměsí hlenu a krve ve stolici. Závažnost onemocnění je ovlivněna věkem, výživou pacienta a velikostí infekční dávky. Alimentární přenos nákazy se děje kontaminovanou potravinou, mlékem a často vodou. Tyto gramnegativní aerobní bakterie ve tvaru tyček jsou velmi citlivé na vlivy vnějšího prostředí (včetně běžně dostupných dezinfekčních prostředků). Stejně jako *Staphylococcus aureus* tyto bakterie tvoří toxiny, které jsou přímo zodpovědné za vysokou patogenitu.

Staphylococcus aureus je velmi rozšířeným oportunním patogenem vyskytujícím se běžně u zvířat i lidí. Tato grampozitivní fakultativně anaerobní bakterie způsobuje různé infekce od mírných zánětů kůže a tkání až po život ohrožující septické stavy a nekrotizující pneumonie. Z hlediska alimentárního onemocnění má význam schopnost produkce termostabilních enterotoxinů v potravinách. Intoxikace se projevuje rychlým nástupem příznaků, jako je nevolnost, zvracení a průjem (bez horečky). Tento patogen je schopný se množit při širokém rozmezí pH a je značně odolný vůči vysušení. Nejvýznamnějším vehikulem je mléko a mléčné výrobky, méně často pak maso a výrobky z něj.

Toxoplasma gondii je zoonotický parazit, který je schopen nakazit člověka přímou cestou z trusu nakažených zvířat, nebo skrze konzumaci kontaminovaných a špatně tepelně upravených potravin. Nejčastější je přenos z masa hospodářských zvířat obsahujícího tkáňové cysty a z vody, kde se mohou vyskytovat oocysty *T. gondii* vyloučené definitivním hostitelem (kočkovité šelmy). Poměrně vzácný je přenos syrovým mlékem, který je možný pouze v akutní fázi infekce dojnice. V těle hostitele pak tato kokcidie může způsobit onemocnění zvané toxoplazmóza, které většinou probíhá jako běžné virové onemocnění. Po odeznění příznaků akutní infekce parazit přežívá ve formě tkáňových cyst až do konce života. Vážné následky představuje toxoplazmóza pro pacienty s poruchou imunity a také u těhotných žen, kde může infekce vést až k fatálním důsledkům či alespoň těžkému poškození plodu.

Trichinella spp. je hlístice, která se přenáší výhradně syrovým nebo nedostatečně tepelně opracovaným masem obsahujícím larvy tohoto parazita. Nejčastějším a nejvýznamnějším druhem je *T. spiralis*, která je celosvětově rozšířena. Primárním rezervoárem jsou hlodavci, jejichž konzumací se mohou nakazit jak hospodářská zvířata, tak volně žijící masožravci a všežravci. Mezi hospodářská zvířata vnímavá k infekci, a proto povinně vyšetřovaná na přítomnost trichinel patří domácí prasata a koně, nicméně české chovy domácích prasat jsou dlouhodobě prosté trichinel. V současnosti je tak v našich podmínkách za nejrizikovější zdroj považováno maso prasete divokého, ve kterém se tento parazit ojediněle vyskytuje. Jednotlivé druhy trichinel od sebe nelze odlišit morfologicky, proto se v praxi využívají metody molekulární biologie (Bilska-Zajac et al., 2021; EFSA and ECDC, 2021).

Rod *Vibrio* je taxonomicky zařazen do čeledi *Vibrionaceae*. Celý rod zahrnuje více než 30 různých druhů s různým patogenním potenciálem. Všichni zástupci jsou gramnegativní, fakultativně anaerobní, nesporeující, rovné, či lehce zahnuté tyčinky schopné pohybu. Přírodním rezervoárem vibrií jsou brakické a pobřežní vody, kde jsou přítomny volně ve vodě, v planktonu, sedimentech, osidlují ale i přítomnou floru a faunu. Podmínkou množení vibrií je teplota mořské vody nad 15 °C a 2-3 % salinita. Zejména Středozemní moře se vlivem klimatických změn ohřívá a vznikají tak ideální podmínky pro množení vibrií. Nejvýznamnějšími zástupci s prokázaným patogenním účinkem na lidské zdraví jsou *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* a *V. vulnificus*, do původců vibrióz je však zahrnována široká škála druhů vibrií a dokonce i několik blízkých příbuzných rodů.

Dobře známým patogenem kontaminující vodní zdroje je *V. cholerae*. Po celém světě, zejména však v rozvojových zemích, způsobuje každoročně epidemie cholery, což je závažné průjemové onemocnění. Podobně jako ostatní zástupci rodu *Vibrio* je celý druh rozdělen na sérotypy (více než 200 odlišných typů) vykazujících různou patogenitu. Za epidemiemi cholery stojí především sérotypy O1 a O139, ostatní typy jsou označeny jako non-O1/ non-O139 *V. cholerae*. Tyto ostatní sérotypy neprodukují cholera toxin, ale v různé míře další typy toxinů (např. enterotoxin, hemoliziny) a řadí se mezi původce vibriózy. Zdrojem vibrií bývá nejčastěji voda kontaminovaná fekáliemi, ale také ryby a plody moře (Awasthi et al., 2019; Rober-Pillot et al., 2014).

V. parahaemolyticus se vyskytuje hojně v mořském prostředí i v brakické vodě po celém světě (Ward et Bej, 2006). Z pohledu bezpečnosti potravin je kromě tvorby toxinů taktéž důležitá

schopnost *V. parahaemolyticus* tvořit biofilmy. Celý druh se dělí podle přítomnosti O a K antigenů na povrchu bakteriální buňky na sérotypy, které vykazují různě závažnou patogenitu. Pro člověka jsou za nejnebezpečnější považovány sérotypy O3:K6, O4:K68 a O1:K. Onemocnění vyvolané póry tvořícími toxiny *V. parahaemolyticus* se projeví po konzumaci syrových, případně nedostatečně tepelně opracovaných ryb, krevet, krabů aj. plodů moře, nejčastěji literatura uvádí mořské měkkýše. Pro toto onemocnění je typická sezónnost s vyššími záchyty v letních měsících. Příznaky onemocnění zahrnují nevolnost, bolest břicha, zvracení, zvýšenou teplotu, hlenovité či vodnaté průjmy. Nebezpečí představuje *V. parahaemolyticus* zejména pro pacienty s jinými primárními chorobami (onemocnění jater, ledvin, dýchacího aparátu apod.) a imunodeficiencí, kde může být průběh těžší a skončit fatálně (Wang et al., 2015).

Třetím nejvýznamnějším druhem patogenních vibrií je *V. vulnificus*. I tento druh se vnitřně rozlišuje na různé biotypy, přičemž biotyp 1 je hlavním humánním patogenem odpovědným za gastroenteritidu, biotypy 2 a 3 infikují rány a měkké tkáně a jsou patogenní i pro mořské živočichy (Passalacqua et al., 2016). *V. vulnificus* produkuje celou řadu faktorů virulence, největší význam mají proteázy, hemolyziny a transmembránové proteiny. Predispozicí pro vznik a rozvoj onemocnění po konzumaci potravin jsou jaterní dysfunkce a imunodeficience. Oba stavy rovněž napomáhají rozvoji infekce ran po manipulaci se syrovými rybami, měkkýši či plody moře. Septická forma je typická rychlým průběhem (v řádu několika hodin), poklesem krevního tlaku, nevolností a celkovou slabostí. Sepse jako následek infekce *V. vulnificus* je u více než 35 % pacientů fatální (Elbashir et al., 2018).

Mezi vzácné původce humánních infekcí lze zařadit *V. alginolyticus*. Kromě gastroenteritidy způsobuje častěji infekce ran, záněty vnějšího i středního ucha či spojivky, a to jako následek koupání v mořských či brakických vodách, které osidluje. Náchylnější k onemocnění jsou děti, imunitně oslabení jedinci či pacienti s jinou primární chorobou. Při diagnostice je nejdůležitější důkladná anamnéza, ve které se pravidelně objevuje koupání v moři, kontakt s mořskými rybami, plody moře či kontaminace ran mořskou vodou. Infekce *V. alginolyticus* jsou na vzestupu zejména v pobřežních oblastech USA a Číny (Fu et al., 2016; Li et al., 2009).

V. fluvialis patří mezi další humánní patogeny, které vyvolávají gastrointestinální onemocnění podobné choleře. Zdrojem infekce bývá nejčastěji kontaminovaná voda, konzumace syrových ryb či plodů moře, a to zejména v rozvojových zemích. U imunitně oslabených jedinců mohou

prvotní příznaky, mezi které se řadí vodnaté průjmy, zvracení, teplota, nevolnost a bolest břicha, rozvinout v onemocnění systémové – bakteriémii, šok a orgánové selhání. Podobně jako ostatní vibria i *V. fluvialis* může působit lokálně a vyvolat záněty ran, zejména po manipulaci s rybami, kraby aj. plody moře (Igbinsosa et Okoh, 2010; Ramamurthy et al., 2014).

Mezi vibria s prokázaným patogenním účinkem patří i *V. furnisii*. Jedná se o druh fenotypově úzce příbuzný s *V. fluvialis*. Průjmy, které jsou hlavním příznakem postižení gastrointestinálního traktu, se objevují za 2-3 dny po konzumaci tepelně neopracovaných či nedostatečně tepelně opracovaných mořských ryb a plodů (Derber et al., 2011). Gastrointestinální příznaky jsou ve většině případů mírné a krátkodobé. Pouze u starších pacientů s jinými přidruženými chorobami, typicky diabetes II. typu aj., může *V. furnisii* způsobit těžké stavy, jako je bakteriémie či orgánová selhání (Ballal et al., 2017).

Dalším patogenním zástupcem rodu *Vibrio* je *V. mimicus*. Jeho působení v gastrointestinálním traktu vyvolává zánětlivé změny, které se projevují průjmy, nevolností, zvracením či bolestí břicha a někdy i horečkou (Hernández-Robles et al., 2021). Největší riziko představují kmeny, které nesou cholera gen - pokud dojde k jejich expresi, jsou pacienti postiženi těžkými vodnatými průjmy, které jsou typické pro cholera. Zdrojem všech vibrií včetně *V. mimicus* jsou především mořské ryby a plody moře konzumované v syrovém nebo polosyrovém stavu (Guardiola-Avila et al., 2016).

Grimontia hollisae byla poprvé popsána v roce 1982 a pojmenována *Vibrio hollisae*. Až po více než 20 letech bylo zjištěno, že je nutné celý rod vyčlenit samostatně, prozatím je *G. hollisae* jediným zástupcem (Thompson et al., 2003). Bakterie přítomná ve vodním prostředí produkuje řadu toxinů, které působí patogenně v trávicím traktu lidí a způsobují průjmy. V případě jiných primárních onemocnění a věku, které pacienta oslabují, může být působení toxinů natolik závažné, že vyvolá bakteriémii (Edouard et al., 2009). I u jinak zdravých lidí, kteří mají v anamnéze konzumaci mořských plodů je při diferenciální diagnostice těžkých průjmů doprovázených celkovou slabostí, dehydratací a horečkou nutné uvažovat právě o *G. hollisae* jako o možném původci. Odborná literatura také uvádí, že *G. hollisae* byla v několika případech původcem sepse či extraintestinálních infekcí (Hinestrosa et al., 2007).

Yersinia je rod gramnegativních bakterií ve tvaru tyčinky. *Yersinia enterocolitica* je zoonotickým patogenem způsobujícím akutní gastroenteritidu. Nejčastěji se vyskytuje

yersinióza u dětí mladších 5 let, přičemž převládajícími příznaky jsou horečka, bolest břicha a průjem, který může být i krvavý. Největším rizikovým faktorem je konzumace vepřových produktů (prase je považováno za hlavní rezervoár), jako je mleté vepřové maso, vepřový jazyk nebo maso z hlav. Byly však zaznamenány i epidemie yersiniózy, kde vehikulem byla zelenina. Vzhledem k faktu, že může růst a množit se při teplotě 4° C i méně, jedná se také o významný potravinový patogen.

Zejména kvůli citlivosti, specifitě a možnosti kvantifikace je v současné době nejvíce používanou metodou průkazu výše uvedených agens polymerázová řetězová reakce v reálném čase (real time PCR, qPCR). Pomocí qPCR lze multiplexovat v závislosti na přístrojovém vybavení obvykle 6 nezávislých cílů (patogenů). Avšak i tento počet nemusí být v některých případech dostačující. Výhody testování jednoho vzorku na více potenciálně přítomných patogenů pomocí jediného testu jsou zřejmé a zahrnují zkrácení doby testování, možnosti identifikovat ko-infekci a v neposlední řadě i značnou finanční úsporu (Freeman a kol., 2017). Takovouto metodou je xMAP technologie, která se v oblasti bezpečnosti potravin inkorporuje do diagnostických laboratoří. Jedná se o technologii využívající již řadu let známé metody molekulární biologie, jako jsou ligace, hybridizace, magnetická separace a PCR. Díky těmto jednotlivým metodám spojeným dohromady v sledu jednotlivých kroků lze pomocí přístroje MAGPIX® současně detekovat řadu patogenů v daném vzorku. V současné době je kapacita přístroje omezena na 50 cílových molekul bez možnosti určení přesného množství (kvantifikace). Díky možnosti skládání (multiplexování) různých detekčních cílů dle požadavků na různé patogeny či různé matrice lze v krátkém čase vyšetřit relativně značné množství vzorků.

Na základě uvedených výhod byl vyvinut diagnostický prostředek, který umožňuje *in vitro* detekci *Bacillus cereus*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Echinococcus granulosus*, *Escherichia coli* O157 (STEC), *Grimontia hollisae*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium, *Shigella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio fluvialis*, *Vibrio furnissii*, *Vibrio mimicus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, *Toxoplasma gondii*, *Trichinella spiralis* a *Yersinia enterocolitica* v živočišné matrici. Tento prostředek, označený jako „xMAP panel pro detekci vybraných patogenů v živočišné matrici“,

je unikátní svým složením a jednoduchostí použití. Souprava zahrnuje i kontrolu analýzy vzorků (IC), která umožňuje kontrolu analýzy každého analyzovaného vzorku.

2. Oblast techniky

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

3. Aktuální stav techniky (diagnostiky)

Přestože se jedná zejména o bakteriální patogeny, které jsou více či méně dobře kultivovatelné, pro jejich detekci je třeba několik různých specifických médií. Kultivace navíc probíhají v několika návazných krocích a kultivační stanovení tak celkově trvají řadu dní. Proto je v současnosti detekce stále více zaměřena na metody molekulární biologie využívají pro detekci či případnou charakterizaci patogenů specifické úseky genů. Na současném trhu existuje řada komerčních produktů sloužících k molekulární diagnostice (tzn. k průkazu nejvýznamnějších patogenů). Nicméně tyto produkty v rámci jedné reakce umožňují detekovat pouze jeden patogen. Analýza vzorků na přítomnost většího počtu druhů patogenů tak může být finančně i časově náročná.

Pro vybrané bakteriální původce lze najít komerčně dodávané diagnostické soupravy pro detekci buď pomocí kultivačního vyšetření nebo i pomocí qPCR. Jedná se o několik málo firem, které mají ve svém portfoliu soupravy pro tzv. potravinové patogeny. Například německé firmy BIOTECON Diagnostics a Qiagen nebo americká firma Norgen Biotek corporation (např. foodproof® *E. coli* O157 Detection Kit, foodproof SL *Staphylococcus aureus* Detection Kit). Nicméně ani jedna firma nenabízí komplexní řešení a pro diagnostiku několika patogenů v rámci jedné reakce a je nezbytné si zakoupit více diagnostických souprav, což značně zvyšuje finanční náročnost na analýzu.

4. Popis technického řešení a nároků na ochranu

Technické řešení diagnostického prostředku, který umožňuje *in vitro* detekci *Bacillus cereus*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Echinococcus granulosus*, *Escherichia coli* O157 (STEC), *Grimontia hollisae*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica*

serovar Enteritidis, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium, *Shigella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio fluvialis*, *Vibrio furnissii*, *Vibrio mimicus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, *Toxoplasma gondii*, *Trichinella spiralis* a *Yersinia enterocolitica* v živočišné matrici. Toto diagnostické řešení využívá kombinaci xMAP technologie (Luminex corporation, USA, Texas), multiplexní oligonukleotidové ligační reakce a polymerázové řetězové reakce. Spojení těchto technologií umožňuje v jedné reakci analýzu vzorku na přítomnost deoxyribonukleových kyselin *Grimontia hollisae*, *Vibrio alginolyticus*, *V. fluvialis*, *V. furnissii*, *V. mimicus*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* (panel 1), *Bacillus cereus*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Echinococcus granulosus*, *Escherichia coli* O157 (STEC), *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium, *Shigella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Toxoplasma gondii*, *Trichinella spiralis* a *Yersinia enterocolitica* (panel 2 a 3).

Součástí diagnostického prostředku je interní kontrola. Tato kontrola je trvale součástí všech analýz a umožňuje odhalení falešně negativního výsledku v důsledku inhibice analyzovaného vzorku. Tato kontrola vznikla spojením sekvencí dvou vyhynulých druhů a přirozeně se tedy v reálných vzorcích nevyskytuje. *De novo* připravená sekvence byla naklonována do komerčně dostupného plasmidu, ten byl transformován do komerčně dostupných buněk (vše firma Qiagen) a je uchovávána ve formě hluboce zamražené bakteriální suspenze. Použití xMAP technologie ve spojení s IC zaručuje kontrolu analytického postupu. Takto sestavená metoda, jejíž použití je univerzální (veterinární i humánní medicína) je unikátní v následujících položkách:

Kontrola postupu analýzy vzorku (IC)

- Kontrola analýzy vzorků na přítomnost interní kontroly, *Bacillus cereus*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Echinococcus granulosus*, *Escherichia coli* O157 (STEC), *Grimontia hollisae*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium, *Shigella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio fluvialis*, *Vibrio furnissii*, *Vibrio mimicus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, *Toxoplasma gondii*, *Trichinella spiralis* a *Yersinia enterocolitica* je složena ze specifických sekvencí dvou vyhynulých živočišných druhů; vakovka

tasmánského (*Thylacinus cynocephalus*) a ptáka moa (*Dinornis struthoides*). Připravený konstrukt (připraven pomocí klonování do komerčního kitu od firmy Qiagen) je zcela unikátní a jeho použití je univerzální pro typ vzorku a druh patogenů.

- Pro účely zajištění sensitivity a specificity procesu detekce kontroly byly navrženy a testovány specifické unikátní sekvence nukleových kyselin (viz v Seznam materiálu tzv. oligonukleotidy, které jsou součástí reakčních směsí).
- Kontrola je stabilní až jeden rok při teplotě -20 ± 4 °C.

Složení diagnostického produktu „xMAP panel pro detekci vybraných patogenů v živočišné matrici“ a jeho uživatelské vlastnosti

- Ligační směsi (označeny Lig 1.1 a Lig 2.1; resp. Lig 1.2, Lig 2.2 a Lig 1.3, Lig 2.3) obsahující veškeré složky pro průběh ligace: ligázu, pufr, specifické oligonukleotidy v definovaných koncentracích. Směs specifických oligonukleotidů zajistí analýzu vzorku na přítomnost interní kontroly a genomu *Bacillus cereus*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Echinococcus granulosus*, *Escherichia coli* O157 (STEC), *Grimontia hollisae*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium, *Shigella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio fluvialis*, *Vibrio furnissii*, *Vibrio mimicus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, *Toxoplasma gondii*, *Trichinella spiralis* a *Yersinia enterocolitica*.
- Reakční směs (označena PCR) v jedné zkumavce obsahuje veškeré reakční složky nezbytné pro průběh konvenční PCR. Tyto složky jsou: voda, enzym polymeráza, deoxyribonukleotidy (dATP, dCTP, dGTP, dUTP), reakční pufr s optimalizovaným množstvím iontů hořčíku (Mg^{2+}), směs všech potřebných oligonukleotidů.
- Mix specifických mikrosfér (označen M 1.1; resp. M 1.2 a M 1.3), jejichž fluorescenční signál umožní stanovit přítomnost interní kontroly a genomu *Bacillus cereus*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Echinococcus granulosus*, *Escherichia coli* O157 (STEC), *Grimontia hollisae*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium, *Shigella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio*

cholerae, *Vibrio fluvialis*, *Vibrio furnissii*, *Vibrio mimicus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, *Toxoplasma gondii*, *Trichinella spiralis* a *Yersinia enterocolitica*.

- Produkt kromě výše popsanych reakčních směsí obsahuje zkumavku označenou „PK“, která slouží jako pozitivní kontrola reakcí. Obsahuje také 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 „PK“.
- Tento produkt je v popsaném složení stabilní maximálně po dobu jednoho roku (při teplotě -20 ± 4 °C).

5. Nároky na ochranu

- 1) Sekvence oligonukleotidů cílových úseků kontroly analytického postupu nebo jejich části, použité jako oligonukleotidy (rozpoznávací sekvence ligaci) 5' - 3':

a. PHO-ATTAGCACAATGAATAATCATCGTCTCACTTCTTACTACCGCG

b. ACTCGTAGGGAATAAACCGTATTGTGAAAGAAAGAGAAGAAATTTAT
ACACACGCAATCACCAC.

- 2) Sekvence oligonukleotidů specifických k cílovým úsekům genomu *Bacillus cereus* (1,2), *Campylobacter jejuni* (3,4), *Campylobacter coli* (5,6), *Clostridium botulinum* (7,8), *Clostridium difficile* (9,10), *Clostridium perfringens* (11,12), *Echinococcus granulosus* (13,14), *Escherichia coli* O157 (STEC; 15,16,17), *Grimontia hollisae* (18,19), *Listeria monocytogenes* (20,21), *Salmonella enterica* (22,23), *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis (24), *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium (25), *Shigella* spp. (26), *Staphylococcus aureus* (27,28), *Vibrio alginolyticus* (29,30), *Vibrio cholerae* (31,32), *Vibrio fluvialis* (33,34), *Vibrio furnissii* (35,36), *Vibrio mimicus* (37,38), *Vibrio parahaemolyticus* (39,40), *Vibrio vulnificus* (41,42), *Toxoplasma gondii* (43,44), *Trichinella spiralis* (45,46) a *Yersinia enterocolitica* (47,48). Rozpoznávací sekvence pro ligaci ve směru 5' - 3':

1) PHO TTCTAAGTTTGCAAATGGAAATTCCC a TTCTTGAGAACATGTTGTACGAGTTAC

2) PHO GGCTGAGTTCCTTCAATAATAAGTGG a GTTGTCGTAGTTAATTGTCCACCC

3) PHO TCCTACTTTGTAATCACTCACGCT a CTCCTTCCTTGTCGCTTAATTCTTC

4) PHO GGGTGGAAATTGAAGTGGCTAAAT a GTCCAACGGCGCATTATTCTAT

5) PHO GTTGTAATTGTAGTAAAGAAGTACACGCGAAGAAATTATAGAAAGATTTAAG a
CCCTGAAGTGCTTAATCAATATGTAG

6) PHO AAATAAGAATAGAGAGAGAAAGTTGAAGACTCCGATATTTGCTTTAAGAAC a
CCCAATAAAGGCTGAAAGTATCGC

- 7) PHO CTATGCTAGAGGTTTGTATATGTTGAATCC a CCTAGAAATATTGATGCAGCACCTAG
- 8) PHO AGGATGTGCTTGGTGTGAGG a GAGTGTATAGAGTGTGAAGTTGCAAC
- 9) PHO ATTGTTGAATGTGTTTAAAGAGACATATTGTGGCTCCATAATCCAAAG a
CCACAATACAGCTACAGATACTAGT
- 10) PHO GATTGATATTTGAATGTTTGTGTTGATCYTCATTGTTAACATGCATCCA a
AGCAGTCTGTGTTAACTTGGTAA
- 11) PHO TATTAGAGAGAAATTGTAGAGATTCATCCTGCTAATGTTACTGCCG a
TTGATAGCGCAGGACATGTTAAG
- 12) PHO TTTGTTGTTAAGTATGTGATTTAGTCYTCATTGTTAACATGCATCCAA a
GCAGTCTGTGTTAACTTGGTAAAG
- 13) PHO GATAGATTTAGAATGAATTAAGTGTGTCATCATGTTCCATTTCCAGGC a
CGTGATCTGCATAACTTTTCAGCT
- 14) PHO AGTGAATGTAAGATTATGATTTTGCACCCTGGCCCTATTCTCT a
CTCTGTGTGGGTATTGCTGC
- 15) PHO GATCATCCAGTGTTGTACGAAATCC a TCATTACATAAGAACGCCCACTGA
- 16) PHO CTGGCGTTAATGGAGTTCAGTG a TCGTCACTCACTGGTTTCATCATAT
- 17) PHO CCGCAATCTTCCCTGATTTCTG a CGTAATTGTTCTTCTTACTGTTTCG
- 18) PHO AAATAAGAATAGAGAGAGAAAGTTGATCAAGCGCGCAGAAGATG a
GTAAGAAACGCCACCTGAC
- 19) PHO TTTGATTTAAGAGTGTGAAATGTACGTGATAGTCTGCGCCAATG a
GCAGTCGCTTGGTCATATCAG
- 20) PHO TAACGGAACCTTTGCTAGTCCAA a AGTAGTACCACCAACAACGATTAGTAA
- 21) PHO GTTGAGCGAATTCCTTGTCTCTG a GGGACGGATGAAGCTAGTCTG
- 22) PHO CAGATAGGTAGGTAATGGAATGACGA a TCAGTGCGATCAGGAAATCAA
- 23) PHO GTTAAGATTTATGCCTGCCCTGA a GGATCAGCAAAGCCCAGATC
- 24) PHO TTGTGATAGTAGTTAGATATTTGTCAAAGCCCATAAGATCAGCGG a
CGATCTCCTGAGTAAGTTTGAGGT
- 25) PHO AAATTAGTTGAAAGTATGAGAAAGTGCAAGTAGGACAGGCTGG a
GAATTCTGGGATCAACGGTGG
- 26) PHO CTGTCTCCCGACTTAAAGAATGTCT a CGGTGAAGAGCGTGATGAGG
- 27) PHO TCTACGGTTGTTTGGCTAATAGATAAATG a TTCGTCTAATAGAAGTTGATATGCATGC
- 28) PHO GCGACCTATTTCTAATGCAGC a TGTATGAACCTATGTCCGATTATTTTC
- 29) PHO GTTGAGAATTAGAATTTGATAAAGCAGATGGTAGTGTGCAAGGG a
TGACGGCTGATGTAGTCCTG
- 30) PHO TTGTGATAGTAGTTAGATATTTGTGTTTCATGGTGGAGAAAGCCG a
CGGGCTTGAACATTGTCTGC
- 31) PHO GACAAGCTTGCATATTCAATCTTTAAG a GCAGTTATGGCCGTTACATATATG
- 32) PHO GTGGTGTCTGTGCAATGGAG a ATTGTGGATGAAGGTGTTAGCG
- 33) PHO TATTAGAGAGAAATTGTAGAGATTCATCAATATTACGCCGAAACCT a
TGATGGATGAGGCGTGTATGG
- 34) PHO TTTGTGTGTTATTGTAATTGAGATGATGAACCACGCTTTGCTGAA a
GTAGCTCGTGAAATGGTGGTAT
- 35) PHO AATAAGAGAATTGATATGAAGATGACTCATTATTCGAATCAGTACGCATT a
CGAAGATTTGATGATGGCGGC
- 36) PHO ATTAAGTAAGAATTGAGAGTTTGTAGAGAAGACCATTGAGATTATCGAAGT a
GGTGTATCAGCCTGAACGTG
- 37) PHO TAGAGAAAGAGAGAATTGTATTAAGGTTTCATCTTCTGGCAAGTG a
CGGATGARTTTGCTAATGAAGTG
- 38) PHO GTATAGTGTGATTAGATTTGTAAACAACCCATTACGCATTGCAGT a
ATGAAGGGCGGCATATCAATG
- 39) PHO GATAGATTTAGAATGAATTAAGTGGAAACAACAGCAAACCCATCATCA a
ATCTATCGGTGCAACAGCAACT
- 40) PHO GATTGATATTTGAATGTTTGTGTTGCTTGGAGTTCTTCTGCTAACAC a
TCGCCATTCTTTGACTTTATTGTG
- 41) PHO TGAAATGTGTATTTGTATGTTTAGCAATTGTTTGTGTTGGAATCACAGTGA a
AGGYGAGTTGGTAGGRGC
- 42) PHO GTAAGAGTATTGAAATTAGTAAGACTAGATGCCGCTGTCACTTATC a
AGATGCTGCCGAATGATGAG
- 43) PHO TTTGTTAGAATGAGAAGATTATGCGGCTACAGATCCAWCTCCT a
GAAGAAGTGTGAGCATCTGGTG

- 44) PHO TTTGTTGTTAAGTATGTGATTTAGTACATGCTCAAGTACGACTCTGT a
GCATGGAAAGTTCGACGGC
- 45) PHO TTTGTGTGTTATTGTAATTGAGATCTGCAAATTGGAAACCAGGCT a
CTTTGACCATAGATCCGCATCC
- 46) PHO GTAAGAGTATTGAAATTAGTAAGACAATGTGCATCGTGTGAAAGCTT a
TGAAATTCAACCATTAGCACGACG
- 47) PHO GCACAGAGATAATTTCCGGGTCA a TCCAGTCAACGGCAACCAC
- 48) PHO TGTTGACGGACTATGGCAAGG a GTGAGTATTGCTGCTGTTGTGG

- 3) Složení reakčních směsí, tzv. Lig 1.1, Lig 2.1 (resp. Lig 1.2, Lig 2.2 a Lig 1.3, Lig 2.3), PCR, M 1.1 (resp. M 1.2 a M 1.3), které obsahují minimálně tyto reakční složky nezbytné pro průběh reakce: enzymy ligáza a polymeráza, deoxyribonukleotidy (dATP, dCTP, dGTP, dUTP), reakční pufry, směs všech potřebných oligonukleotidů, mix specifických mikrosfér.

6. Vysvětlení nároků na ochranu

Ad 1 a 2) Jedná se o unikátní sekvence, které dosud nebyly použity, byly originálně navrženy a testovány v laboratořích Veterinární univerzity Brno a Výzkumného ústavu veterinárního lékařství, v.v.i.. S jejich pomocí je možné technologií založenou na xMAP provést validní analýzu vzorků na přítomnost genomu *Bacillus cereus* (1,2), *Campylobacter jejuni* (3,4), *Campylobacter coli* (5,6), *Clostridium botulinum* (7,8), *Clostridium difficile* (9,10), *Clostridium perfringens* (11,12), *Echinococcus granulosus* (13,14), *Escherichia coli* O157 (STEC; 15,16,17), *Grimontia hollisae* (18,19), *Listeria monocytogenes* (20,21), *Salmonella enterica* (22,23), *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis (24), *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium (25), *Shigella* spp. (26), *Staphylococcus aureus* (27,28), *Vibrio alginolyticus* (29,30), *Vibrio cholerae* (31,32), *Vibrio fluvialis* (33,34), *Vibrio furnissii* (35,36), *Vibrio mimicus* (37,38), *Vibrio parahaemolyticus* (39,40), *Vibrio vulnificus* (41,42), *Toxoplasma gondii* (43,44), *Trichinella spiralis* (45,46) a *Yersinia enterocolitica* (47,48). Sekvence kontroly analytického postupu je naprosto jedinečná, proto je možné ji použít při diagnostice jakékoli matrice (potravina, prostředí, klinické vzorky). Tento metodický produkt je použitelný pro diagnostiku v rámci humánní i veterinární medicíny či bezpečnosti potravin. Přesné určení sekvencí genomu výše uvedených bakteriálních agens a 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 patogenů a kontroly. Předmětem ochrany tedy mají být právě uvedené sekvence oligonukleotidů, které jsou použity v tomto diagnostickém prostředku (směr 5' - 3'):

- 1) PHO TTCTAAGTTTGCAAATGGAAATTCCC a TTCTTGAGAACATGTTGTACGAGTTAC
- 2) PHO GGCTGAGTTCCTTCAATAATAAGTGG a GTTGTCGTAGTTAATTGTCCACCC
- 3) PHO TCCTACTTTGTAATCACTCACGCT a CTCCTTCCTTGTCGCTTAATTCTTC
- 4) PHO GGGTGGAATTGAAGTGGCTAAAT a GTCCAACGGCGCATTATTCTAT
- 5) PHO GTTGTAATTGTAGTAAAGAAGTACACGCGAAGAAATTATAGAAAGATTTAAG a CCCTGAAGTGCTTAATCAATATGTAG
- 6) PHO AAATAAGAATAGAGAGAGAAAGTTGAAGACTCCGATATTTGCTTTAAGAAC a CCCAATAAAGGCTGAAAGTATCGC
- 7) PHO CTATGCTAGAGTTTGTATATGTTGAATCC a CCTAGAAATATTGATGCAGCACCTAG
- 8) PHO AGGATGTGCTTGGTGTGAGG a GAGTGTATAGAGTGTGAAGTTGCAAC
- 9) PHO ATTGTTGAATGTGTTTAAAGAGACATATTGTGGCTCCATAATCCAAAG a CCACAATACAGCTACAGATACTAGT
- 10) PHO GATTGATATTTGAATGTTTGTGTTGATCYTCATTGTTAACATGCATCCA a AGCAGTCTGTGTTAAACTTGGTAA
- 11) PHO TATTAGAGAGAAATTGTAGAGATTCATCCTGCTAATGTTACTGCCG a TTGATAGCGCAGGACATGTTAAG
- 12) PHO TTTGTTGTTAAGTATGTGATTTAGTCYTCATTGTTAACATGCATCCAA a GCAGTCTGTGTTAACTTGGTAAAG
- 13) PHO GATAGATTTAGAATGAATTAAGTGTGTCATCATGTTCCATTTCCAGGC a CGTGATCTGCATAACTTTACGCT
- 14) PHO AGTGAATGTAAGATTATGTATTTGCACCCTGGCCCTATTCTCT a CTCTGTGTGGGTATTGCTGC
- 15) PHO GATCATCCAGTGTGTACGAAATCC a TCATTACATAAGAACGCCCACTGA
- 16) PHO CTGGCGTTAATGGAGTTCAGTG a TCGTCACTCACTGGTTTCATCATAT
- 17) PHO CCGCAATCTTTCCCTGATTTCTG a CGTAATTGTTCCCTTCTACTGTTCC
- 18) PHO AAATAAGAATAGAGAGAGAAAGTTGATCAAGCGCGCAGAAGATG a GTAAGAAACGCCACCTGAC
- 19) PHO TTTGATTTAAGAGTGTGTAATGTACGTGATAGTCTGCGCCAATG a GCAGTCGCTTGGTCATATCAG
- 20) PHO TAACGGAACCTTTGCTAGTCCAA a AGTAGTACCACCAACAACGATTAGTAA
- 21) PHO GTTGAGCGAATTCCTTGTCTG a GGGACGGATGAAGCTAGTCTG
- 22) PHO CAGTAGGTAGGTAATGGAATGACGA a TCAGTGCGATCAGGAAATCAA
- 23) PHO GTTAAGATTTATGCCTGCCCTGA a GGATCAGCAAAGCCCAGATC
- 24) PHO TTGTGATAGTAGTTAGATATTTGTCAAAGCCCATAAGATCAGCGG a CGATCTCCTGAGTAAGTTGAGGT
- 25) PHO AAATTAGTTGAAAGTATGAGAAAGTGCAAGTAGGACAGGCTGG a GAATTCTGGGATCAACGGTGG
- 26) PHO CTGTCTCCCGACTTAAAGAATGTCT a CGGTGAAGAGCGTGATGAGG
- 27) PHO TCTACGGTTGTTTGGCTAATAGATAAATG a TTCGTCTAATAGAAGTTGATATGCATGC
- 28) PHO GCGACCTATTTCTAATGCAGC a TGTATGAACCCTATGTCCGATTATTTTC
- 29) PHO GTTGAGAATTAGAATTTGATAAAGCAGATGGTAGTGTGCAAGGG a TGACGGCTGATGTAGTCCTG
- 30) PHO TTGTGATAGTAGTTAGATATTTGTGTTTCATGGTGGAGAAAGCCG a CGGGCTTGAACATTGTGCGC
- 31) PHO GACAAGCTTGGGATATTCAATCTTTAAG a GCAGTTATGGCCGTTACATATATG
- 32) PHO GTGGTGTCTGTGCAATGGAG a ATTGTTGGATGAAGGTGTTAGCG
- 33) PHO TATTAGAGAGAAATTGTAGAGATTCATCAATATTACGCCGAAACCT a TGATGGATGAGGCGTGATGG
- 34) PHO TTTGTGTGTTATTGTAATTGAGATGATGAACCACGCTTTGCTGAA a GTAGCTCGTGAAATGGTGGTAT
- 35) PHO AATAAGAGAATTGATATGAAGATGACTCATTATTCGAATCAGTACGCATT a CGAAGATTTGATGATGGCGGC

- 36) PHO ATTAAGTAAGAATTGAGAGTTTGAGAGAAGACCATTGAGATTATCGAAGT a
GGTGTATCAGCCTGAACGTG
- 37) PHO TAGAGAAAGAGAGAATTGTATTAAGGTTTCATCTTCTGGCAAGTG a
CGGATGARTTTGCTAATGAAGTG
- 38) PHO GTATAGTGTGATTAGATTTGTAAACAACCCATTACGCATTGCAGT a
ATGAAGGGCGGCATATCAATG
- 39) PHO GATAGATTTAGAATGAATTAAGTGGAACAACAGCAAACCCATCATCA a
ATCTATCGGTTCGAACAGCAACT
- 40) PHO GATTGATATTTGAATGTTTGTCTTGGAGTTCTTCTGCTAACAC a
TCGCCATTCTTTGACTTTATTGTG
- 41) PHO TGAATGTGTATTTGTATGTTTAGCAATTGTTTGTGTTGGAATCACAGTGA a
AGGYGAGTTGGTAGGRGC
- 42) PHO GTAAGAGTATTGAAATTAGTAAGACTAGATGCCGCTGTCACTTATC a
AGATGCTGCCGAATGATGAG
- 43) PHO TTTGTTAGAATGAGAAGATTTATGCGGCTACAGATCCAWCTCCT a
GAAGAAGTGTGAGCATCTGGTG
- 44) PHO TTTGTTGTTAAGTATGTGATTTAGTACATGCTCAAGTACGACTCTGT a
GCATGGAAAGTTCGACGGC
- 45) PHO TTTGTGTGTTATTGTAATTGAGATCTGCAAATTGGAAACCAGGCT a
CTTTGACCATAGATCCGCATCC
- 46) PHO GTAAGAGTATTGAAATTAGTAAGACAATGTGCATCGTGTGAAAGCTT a
TGAAATTCAACCATTAGCACGACG
- 47) PHO GCACAGAGATAATTTCCGGGTCA a TCCAGTCAACGGCAACCAC
- 48) PHO TGTTGACGGACTATGGCAAGG a GTGAGTATTGCTGCTGTTGTGG

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

Ad 3) 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: Lig 1.1, Lig 2.1; resp. Lig 1.2, Lig 2.2 a Lig 1.3, Lig 2.3 (voda, pufr, specifické oligonukleotidy 1 a 2 pro panel 1, 2 nebo 3), Lig 3 (ligáza), PCR (enzym polymeráza, dATP, dCTP, dGTP, dUTP, reakční pufr, směs všech potřebných oligonukleotidů), IC (interní kontrola) a M 1.1; resp. M 1.2 a M 1.3 (mix specifických mikrosfér pro panel 1, 2 nebo 3). Součástí diagnostického prostředku jsou také zkumavky s reakční směsí PK, DDW, M 2, M 3 a AP. Výhodou pro zákazníka je jednoduché použití, kdy k provedení detekce postačí do zkumavky odebrat daný objem reakční směsi a přidat izolovanou nukleovou kyselinu ze vzorku. Dalším benefitem je možnost kontroly analýzy vzorku na přítomnost *Bacillus cereus*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Echinococcus granulosus*, *Escherichia coli* O157 (STEC), *Grimontia hollisae*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium, *Shigella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio fluvialis*, *Vibrio furnissii*, *Vibrio mimicus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, *Toxoplasma gondii*, *Trichinella spiralis* a *Yersinia enterocolitica* pomocí kontroly.

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 obsaženého v diagnostické soupravě

IC	obsahuje kontrolu analytického postupu
PK	obsahuje DNA patogenů <i>Bacillus cereus</i> , <i>Campylobacter jejuni</i> , <i>Campylobacter coli</i> , <i>Clostridium botulinum</i> , <i>Clostridium difficile</i> , <i>Clostridium perfringens</i> , <i>Echinococcus granulosus</i> , <i>Escherichia coli</i> O157 (STEC), <i>Grimontia hollisae</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Salmonella enterica</i> , <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Enteritidis, <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium, <i>Shigella</i> spp., <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Vibrio alginolyticus</i> , <i>Vibrio cholerae</i> , <i>Vibrio fluvialis</i> , <i>Vibrio furnissii</i> , <i>Vibrio mimicus</i> , <i>Vibrio parahaemolyticus</i> , <i>Vibrio vulnificus</i> , <i>Toxoplasma gondii</i> , <i>Trichinella spiralis</i> a <i>Yersinia enterocolitica</i>
DDW	obsahuje vodu v PCR kvalitě
Lig směsi	Lig 1.1 obsahuje: vodu, pufr, specifické oligonukleotidy 1 pro panel 1 Lig 2.1 obsahuje: vodu, pufr, specifické oligonukleotidy 2 pro panel 1 Lig 1.2 obsahuje: vodu, pufr, specifické oligonukleotidy 1 pro panel 2 Lig 2.2 obsahuje: vodu, pufr, specifické oligonukleotidy 2 pro panel 2 Lig 1.3 obsahuje: vodu, pufr, specifické oligonukleotidy 1 pro panel 3 Lig 2.3 obsahuje: vodu, pufr, specifické oligonukleotidy 2 pro panel 3 Lig 3 obsahuje: ligázu Poznámka: složení Lig 3 není předmětem nároku na ochranu
PCR	obsahuje vodu, deoxyribonukleotidy, pufr, polymerázu, specifické oligonukleotidy, ale neobsahuje nukleové kyseliny Poznámka: složení PCR není předmětem nároku na ochranu
M směsi	M 1.1 obsahuje směs specifických mikrosfér pro panel 1 M 1.2 obsahuje směs specifických mikrosfér pro panel 2 M 1.3 obsahuje směs specifických mikrosfér pro panel 3 M 2 obsahuje roztok NaCl M 3 obsahuje roztok MES

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

AP obsahuje analyzační pufr

Poznámka: složení AP není předmětem nároku na ochranu

Sekvence oligonukleotidů specifických pro *Grimontia hollisae*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio cholerae*, *V. fluvialis*, *V. furnissii*, *V. mimicus*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* (panel 1), *Bacillus cereus*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Echinococcus granulosus*, *Escherichia coli* O157 (STEC), *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium, *Shigella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Toxoplasma gondii*, *Trichinella spiralis* a *Yersinia enterocolitica* (panel 2 a 3) a IC:

Panel 1	Název oligo	Sekvence	Délka (nt)
<i>Grimontia hollisae</i>	GH_1_M1	PHO CACGATGAGTCCTGAGTAACAAATAAGAATAGAGAGAGAAAG TTGATCAAGCGCGCAGAAGATG	64
	GH_1_M2	GTAAGAAACGCCCCACCTGACTGAGGTAGTAAGAGGTGAGG	40
	GH_2_M3	PHO CACGATGAGTCCTGAGTAACCTTTGATTGAAGAGTGTGAATGTA CGTGATAGTCTGCGCCAATG	64
	GH_2_M4	GCAGTCGCTTGGTCATATCAGTGAGGTAGTAAGAGGTGAGG	41
<i>Vibrio alginolyticus</i>	VA_1_M1	PHO CACGATGAGTCCTGAGTAACGTTGAGAATTAGAATTTGATAAA GCAGATGGTAGTGTGCAAGGGA	65
	VA_1_M2	TGACGGCTGATGTAGTCCTGTGAGGTAGTAAGAGGTGAGG	40
	VA_2_M3	PHO CACGATGAGTCCTGAGTAACCTTGTGATAGTAGTTAGATATTTGT GTTTCATGGTGGAGAAAGCCG	65
	VA_2_M4	CGGGCTTGAACATTGTGCTGAGGTAGTAAGAGGTGAGG	39
<i>Vibrio cholerae</i>	VCH_1_M1	PHO GACAAGCTTGCATATTCAATCTTTAAGTGAGGTAGTAAGAGG TGAGG	48
	VCH_1_M2	ACGATGAGTCCTGAGTAACCTATGAATGTTATTGTGTGTTGATTGCAG TTATGGCCGTTACATATATG	68
	VCH_2_M3	PHO GTGGTGTCTGTGCAATGGAGTGAGGTAGTAAGAGGTGAGG	40
	VCH_2_M4	CACGATGAGTCCTGAGTAACAAGATGATAGTTAAGTGTAAGTTAATT GTGGATGAAGGTGTTAGCG	66
<i>Vibrio fluvialis</i>	VFl_1_M1	PHO CACGATGAGTCCTGAGTAACCTATTAGAGAGAAATTGTAGAGAT TCATCAATATTACGCCGAAACCT	67
	VFl_1_M2	TGATGGATGAGGCGTGTATGGTGAGGTAGTAAGAGGTGAGG	41
	VFl_2_M3	PHO CACGATGAGTCCTGAGTAACCTTTGTGTGTTATTGTAATTGAGAT GATGAACCACGCTTTGCTGAA	65
	VFl_2_M4	GTAGCTCGTGAAATGGTGGTATTGAGGTAGTAAGAGGTGAGG	42
<i>Vibrio furnissii</i>	VFu_1_M1	PHO CACGATGAGTCCTGAGTAACAATAAGAGAATTGATATGAAGAT GACTCATTATTGCAATCAGTACGCATT	70
	VFu_1_M2	CGAAGATTTGATGATGGCGGCTGAGGTAGTAAGAGGTGAGG	41
	VFu_2_M3	PHO CACGATGAGTCCTGAGTAACATTAAGTAAGAATTGAGAGTTTG AGAGAAGACCATTGAGATTATCGAAGT	70
	VFu_2_M4	GGTGTATCAGCCTGAACGTGTGAGGTAGTAAGAGGTGAGG	40

<i>Vibrio mimicus</i>	VM_1_M1	PHO CACGATGAGTCCTGAGTAACTAGAGAAAGAGAGAATTGTATTA AAAGGTTTCATCTTCTGGCAAGTG	66
	VM_1_M2	CGGATGARTTTTGCTAATGAAGTGTGAGGTAGTAAGAGGTGAGG	43
	VM_2_M3	PHO CACGATGAGTCCTGAGTAACGTATAGTGTGATTAGATTTGTAAA CAACCCATTACGCATTGCAGT	65
	VM_2_M4	ATGAAGGGCGGCATATCAATGTGAGGTAGTAAGAGGTGAGG	41
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	VP_1_M1	PHO CACGATGAGTCCTGAGTAACGATAGATTTAGAATGAATTAAGT GGAACAACAGCAAACCCATCATCA	67
	VP_1_M2	ATCTATCGGTCTGAACAGCAACTTGAGGTAGTAAGAGGTGAGG	42
	VP_2_M3	PHO CACGATGAGTCCTGAGTAACGATTGATATTTGAATGTTTGTGTTG TCTTGAGTTCTTCTGCTAACAC	67
	VP_2_M4	TCGCCATTCTTTGACTTTATTGTGTGAGGTAGTAAGAGGTGAGG	44
<i>Vibrio vulnificus</i>	VV_1_M1	PHO CACGATGAGTCCTGAGTAACTGAAATGTGTATTTGTATGTTTAG CAATTGTTTGTGTTGGAATCACAGTGA	70
	VV_1_M2	AGGYGAGTTGGTAGGRGCTGAGGTAGTAAGAGGTGAGG	38
	VV_2_M3	PHO CACGATGAGTCCTGAGTAACGTAAGAGTATTGAAATTAGTAAG ACTAGATGCCGCTGTCACTTATC	66
	VV_2_M4	AGATGCTGCCGAATGATGAGTGAGGTAGTAAGAGGTGAGG	40
Panel 2 a 3			
<i>Bacillus cereus</i>	BC_1_M1	PHO TTCTAAGTTTGCAAATGGAAATTCCTGAGGTAGTAAGAGGTG AGG	46
	BC_1_M2	CACGATGAGTCCTGAGTAACTTTGTGTGTTATTGTAATTGAGATTTCT TGAGAACATGTTGTACGAGTTAC	71
	BC_2_M3	PHO GGCTGAGTTCCTTCAATAATAAGTGGTGAGGTAGTAAGAGGTG AGG	46
	BC_2_M4	CACGATGAGTCCTGAGTAACTTTGTTAGAATGAGAAGATTTATGGTT GTCGTAGTTAATTGTCCACCC	68
<i>Campylobacter jejuni</i>	CJ_1_M1	PHO TCCTACTTTGTAATCACTCACGCTTGAGGTAGTAAGAGGTGAGG	44
	CJ_1_M2	CACGATGAGTCCTGAGTAACGTTATGATATAGTGAGTTGTTATTCTC CTTCCTTGTCGCTTAATTCTTC	69
	CJ_2_M3	PHO GGGTGGAATTGAAGTGGCTAAATTGAGGTAGTAAGAGGTGAGG	43
	CJ_2_M4	CACGATGAGTCCTGAGTAACAATGTAAAGTAAAGAAAGTGATGAGT CCAACGGCGCATTATTCTAT	66
<i>Campylobacter coli</i>	CC_1_M1	PHO CACGATGAGTCCTGAGTAACGTTGTAAATTGTAGTAAAGAAGT ACACGCGAAGAAATTATAGAAAGATTTAAG	73
	CC_1_M2	CCCTGAAGTGCTTAATCAATATGTAGTGAGGTAGTAAGAGGTGAGG	46
	CC_2_M3	PHO CACGATGAGTCCTGAGTAACAAATAAGAATAGAGAGAGAAAG TTGAAGACTCCGATATTTGCTTTAAGAAC	71
	CC_2_M4	CCCAATAAAGGCTGAAAGTATCGCTGAGGTAGTAAGAGGTGAGG	44
<i>Clostridium botulinum</i>	CB_1_M1	PHO CTATGCTAGAGGTTTGTATATGTTGAATCCTGAGGTAGTAAGAG GTGAGG	50
	CB_1_M2	CACGATGAGTCCTGAGTAACGTGTGTTATTTGTTTGTAAGTATCCT AGAAATATTGATGCAGCACCTAG	70
	CB_2_M3	PHO AGGATGTGCTTGGTGTGAGGTGAGGTAGTAAGAGGTGAGG	40
	CB_2_M4	CACGATGAGTCCTGAGTAACTTTGATTAAAGAGTGTGAATGTAGAG TGTATAGAGTGTGAAGTTGCAAC	70
<i>Clostridium difficile</i>	CD_1_M1	PHO CACGATGAGTCCTGAGTAACTATTGTTGAATGTGTTTAAAGAGA CATATTGTGGCTCCATAATCCAAAG	69
	CD_1_M2	CCACAATACAGCTACAGATACTAGTGTGAGGTAGTAAGAGGTGAGG	46
	CD_2_M3	PHO CACGATGAGTCCTGAGTAACGATTGATATTTGAATGTTTGTGTTG ATCYTCATTGTTAACATGCATCCA	68
	CD_2_M4	AGCAGTCTGTGTTAACTTGGAATGAGGTAGTAAGAGGTGAGG	44
<i>Clostridium perfringens</i>	CP_1_M1	PHO CACGATGAGTCCTGAGTAACTATTAGAGAGAAATTGTAGAGAT TCATCCTGCTAATGTTACTGCCG	66
	CP_1_M2	TTGATAGCGCAGGACATGTTAAGTGAGGTAGTAAGAGGTGAGG	43

	CP_2_M3	PHO CACGATGAGTCCTGAGTAACTTTGTTGTTAAGTATGTGATTTAG TCYTCATTGTAAACATGCATCCAA	68
	CP_2_M4	GCAGTCTGTGTTAAACTTTGGTAAAGTGAGGTAGTAAGAGGTGAGG	45
<i>Echinococcus granulosus</i>	EG_1_M1	PHO CACGATGAGTCCTGAGTAACGATAGATTTAGAATGAATTAAGT GTCATCATGTTCCATTTCAGGC	66
	EG_1_M2	CGTGATCTGCATAACTTTTCAGCTTGAGGTAGTAAGAGGTGAGG	43
	EG_2_M3	PHO CACGATGAGTCCTGAGTAACAGTGAATGTAAGATTATGTATTTG CACCTGGCCCTATTCTCT	63
	EG_2_M4	CTCTGTGTGGGTATTGCTGCTGAGGTAGTAAGAGGTGAGG	40
	EC_1_M1	PHO GATCATCCAGTGTTGTACGAAATCCTGAGGTAGTAAGAGGTGA GG	45
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	EC_1_M2	CACGATGAGTCCTGAGTAACATTAAGTAAGAATTGAGAGTTTGATCA TTACATAAGAACGCCCACTGA	68
	EC_2_M3	PHO CTGGCGTTAATGGAGTTCAGTGTGAGGTAGTAAGAGGTGAGG	42
	EC_2_M4	CACGATGAGTCCTGAGTAACGTATATGTTAATGAGATGTTGTATCG TCACTCACTGGTTTCATCATAT	69
	EC_3_M5	PHO CCGCAATCTTTCCCTGATTTCTGTGAGGTAGTAAGAGGTGAGG	43
	EC_3_M6	CACGATGAGTCCTGAGTAACAAAGAATTAGTATGATAGATGAGACG TAATTGTTCTTCTTACTGTTCG	70
	LM_1_M1	PHO TAACGGAACCTTTGCTAGTCCAATGAGGTAGTAAGAGGTGAGG	43
<i>Listeria monocytogenes</i>	LM_1_M2	CACGATGAGTCCTGAGTAACGTAATTGAATTGAAAGATAAGTGTAGT AGTACCACCAACAACGATTAGTAA	71
	LM_2_M3	PHO GTTGAGCGAATTCCTTGTCTGTGAGGTAGTAAGAGGTGAGG	42
	LM_2_M4	CACGATGAGTCCTGAGTAACGTATAGTGTGATTAGATTTGTAAAGG GACGGATGAAGCTAGTCTG	65
	SE_1_M1	PHO CAGATAGGTAGGTAATGGAATGACGATGAGGTAGTAAGAGGTG AGG	46
<i>Salmonella enterica</i>	SE_1_M2	ACGATGAGTCCTGAGTAACGTTAGTTATGATGAATATTGTGTATCAG TGCGATCAG GAAATCAAC	65
	SE_2_M3	PHO GTTAAGATTTATGCCTGCCCTGATGAGGTAGTAAGAGGTGAGG	43
	SE_2_M4	CACGATGAGTCCTGAGTAACCTTTAAGTGAGTTATAGAAGTAGTAGGA TCAGCAAAGCCCAGATC	64
	SEt_1_M1	PHO CACGATGAGTCCTGAGTAACAAATTAGTTGAAAGTATGAGAAA GTGCAAGTAGGACAGGCTGG	63
	SEt_1_M2	GAATTCTGGGATCAACGGTGGTGAGGTAGTAAGAGGTGAGG	41
<i>S. Enteritidis</i>	SEe_1_M3	PHO CACGATGAGTCCTGAGTAACTTTGTGATAGTAGTTAGATATTTGT CAAAGCCCATAAGATCAGCGG	65
	SEe_1_M4	CGATCTCCTGAGTAAGTTTGAGGTTGAGGTAGTAAGAGGTGAGG	44
<i>Shigella</i> spp.	SF_1_M1	PHO CTGTCTCCCGACTTAAAGAATGTCTTGAGGTAGTAAGAGGTGA GG	45
	SF_1_M2	CACGATGAGTCCTGAGTAACAAATAAGAATAGAGAGAGAAAGTTTCG GTGAAGAGCGTGATGAGG	64
<i>Staphylococcus aureus</i>	SA_1_M1	PHO TCTACGGTTGTTTGGCTAATAGATAAATGTGAGGTAGTAAGAG GTGAGG	49
	SA_1_M2	ACGATGAGTCCTGAGTAACGTTGTAAATTGTAGTAAAGAAGTATTCG TCTAATAGAAGTTGATATGCATGC	71
	SA_2_M3	PHO GCGACCTATTTCCCTAATGCAGCTGAGGTAGTAAGAGGTGAGG	42
	SA_2_M4	CACGATGAGTCCTGAGTAACGTTGAGAATTAGAATTTGATAAAGTGT ATGAACCCTATGTCCGATTATTC	71
<i>Toxoplasma gondii</i>	TG_1_M1	PHO CACGATGAGTCCTGAGTAACTTTGTTAGAATGAGAAGATTTATG CGGCTACAGATCCAWCTCCT	64
	TG_1_M2	GAAGAAGTGTCAGCATCTGGTGTGAGGTAGTAAGAGGTGAGG	42
	TG_2_M3	PHO CACGATGAGTCCTGAGTAACTTTGTTGTTAAGTATGTGATTTAG TACATGCTCAAGTACGACTCTGT	67
	TG_2_M4	GCATGGAAAGTTTCGACGGCTGAGGTAGTAAGAGGTGAGG	39

<i>Trichinella spiralis</i>	TS_1_M1	PHO CACGATGAGTCCTGAGTAACCTTGTGTGTTATTGTAATTGAGAT CTGCAAATTGGAAACCAGGCT	65
	TS_1_M2	CTTTGACCATAGATCCGCATCCTGAGGTAGTAAGAGGTGAGG	42
	TS_2_M3	PHO CACGATGAGTCCTGAGTAACGTAAGAGTATTGAAATTAGTAAG ACAATGTGCATCGTGTGAAAGCTT	67
	TS_2_M4	TGAAATTCAACCATTAGCACGACGTGAGGTAGTAAGAGGTGAGG	44
<i>Yersinia enterocolitica</i>	YE_1_M1	PHO GCACAGAGATAATTTCCGGGTCATGAGGTAGTAAGAGGTGAGG	43
	YE_1_M2	CACGATGAGTCCTGAGTAAGTAGAGAAAGAGAGAATTGTATTAATC CAGTCAACGGCAACCAC	63
	YE_2_M3	PHO TGTTGACGGACTATGGCAAGGTGAGGTAGTAAGAGGTGAGG	41
	YE_2_M4	CACGATGAGTCCTGAGTAACAATTAGAAGTAAGTAGAGTTTAAGGT GAGTATTGCTGCTGTTGTGG	66

Vývoj prototypu diagnostického prostředku – detekční soupravy probíhal v rámci řešení projektu Ministerstva Zemědělství ČR QK1810202.

8. Literatura

- Awasthi S.P., Chowdhury N., Neogi S.B., Hinenoya A., Hatanaka N., Chowdhury G., Ramamurthy T., Yamasaki S. 2019. Development of a multiplex PCR assay for the detection of major virulence genes in *Vibrio cholerae* including non-O1 and non-O139 serogroups. *J Microbiol Methods*. 157:54-58.
- Ballal M., Shetty V., Bangera S.R., Prabhu M., Umakanth S. 2017. *Vibrio furnissii*, an emerging pathogen causing acute gastroenteritis: a Case Report. *JMM Case Rep*. 12;4(9):e005111.
- Bilska-Zajac, E., Thompson, P., Rosenthal, B., Rozycki, M., Cencek, T. 2021. Infection, genetics, and evolution of *Trichinella*: Historical insights and applications to molecular epidemiology. *Infection Genetics and Evolution* 95: 105080.
- Derber C., Coudron P., Tarr C., Gladney L., Turnsek M., Shankaran S., Wong E. 2011. *Vibrio furnissii*: an unusual cause of bacteremia and skin lesions after ingestion of seafood. *J Clin Microbiol*. 49(6):2348-9.
- Dhama K., Rajagunalan S., Chakraborty S., Verma A.K., Kumar A., Tiwari R., Kapoor S. 2013 Food-borne pathogens of animal origin-diagnosis, prevention, control and their zoonotic significance: A review. *Pak J Biol Sci*. 16(20):1076-85.
- Edouard, S., Daumas, A., Branger S., Durand, J.-M., Raoult D., Four, P.-E. 2009. *Grimontia hollisiae*, a potential agent of gastroenteritis and bacteraemia in the Mediterranean area. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 28, 705–707.
- EFSA (European Food Safety Authority) & ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). 2021. The European Union One Health 2019 Zoonoses Report. *EFSA Journal* 19(2): 6406, 286 pp.

- Elbashir S., Parveen S., Schwarz J., Rippen T., Jahncke M., DePaola A. 2018. Seafood pathogens and information on antimicrobial resistance: A review. *Food Microbiol.* 70:85-93.
- Freeman, K., Mistry, H., Tsertsvadze, A., Royle, P., McCarthy, N., Taylor-Phillips, S., Manuel, R., Mason, J. 2017. Multiplex tests to identify gastrointestinal bacteria, viruses and parasites in people with suspected infectious gastroenteritis: a systematic review and economic analysis. *Health Technol Assess*, 21(23): 1-188.
- Fu K., Li J., Wang Y., Liu J., Yan H., Shi L., Zhou L. 2016. An Innovative Method for Rapid Identification and Detection of *Vibrio alginolyticus* in Different Infection Models. *Frontiers in microbiology*, 7: 651.
- Gohari, I. M., Navarro, M. A., Li, J. H., Shrestha, A., Uzal, F., and McClane, B. A. 2021. Pathogenicity and virulence of *Clostridium perfringens*. *Virulence* 12, 723–753.
- Guardiola-Avila, I., Acedo-Felix, E., Sifuentes-Romero, I., Yepiz-Plascencia, G., Gomez-Gil, B., Noriega-Orozco, L. 2016. Molecular and Genomic Characterization of *Vibrio mimicus* Isolated from a Frozen Shrimp Processing Facility in Mexico. *PLoS ONE* 11(1).
- Hernández-Robles, M.F., Natividad-Bonifacio, I., Álvarez-Contreras, A.K., Tercero-Alburo, J.J., Quiñones-Ramírez, E.I., Vázquez-Salinas, C. 2021. Characterization of Potential Virulence Factors of *Vibrio mimicus* Isolated from Fishery Products and Water. *International Journal of Microbiology*, 7 pages.
- Hinestrosa, F., Madeira, R.G., Bourbeau, P.P. 2007. Severe Gastroenteritis and Hypovolemic Shock Caused by *Grimontia* (*Vibrio*) *hollisae* Infection. *Journal of Clinical Microbiology*, 3462–3463.
- Chiu T.H., Kao L.Y., Chen M.L. 2013. Antibiotic resistance and molecular typing of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, isolated from seafood. *J Appl Microbiol.* 114(4):1184-92.
- Igbiosa E.O., Okoh A.I. *Vibrio fluvialis*: an unusual enteric pathogen of increasing public health concern. 2010. *Int J Environ Res Public Health*. 7(10):3628-43.
- Li X.C., Xiang Z.Y., Xu X.M., Yan W.H., Ma J.M. 2009. Endophthalmitis caused by *Vibrio alginolyticus*. *J Clin Microbiol.* 47(10):3379-81.
- Lim S.C., Knight D.R., Riley T.V. *Clostridium difficile* and One Health. *Clin Microbiol Infect* 2020; 26:857-863.
- Passalacqua P.L., Zavatta E., Bignami G., Serraino A., Serratore P. 2016. Occurrence of *Vibrio Parahaemolyticus*, *Vibrio Cholerae* and *Vibrio Vulnificus* in the Clam *Ruditapes Philippinarum* (Adams & Reeve, 1850) from Emilia Romagna and Sardinia, Italy. *Ital J Food Saf.* 5(1):5709.

- Ramamurthy T., Chowdhury G., Pazhani G.P., Shinoda S. 2014. *Vibrio fluvialis*: an emerging human pathogen. *Front Microbiol.* 5:91.
- Rivas A.J., Lemos M.L., Osorio C.R. *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, a bacterium pathogenic for marine animals and humans. 2013. *Front Microbiol.* 4:283.
- Robert-Pillot A., Copin S., Himber C., Gay M., Quilici M.L. 2014. Occurrence of the three major *Vibrio* species pathogenic for human in seafood products consumed in France using real-time PCR. *Int J Food Microbiol.* 189:75-81.
- Romalde J.L. *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*: an integrated view of a bacterial fish pathogen. 2002. *Int Microbiol* 5:3-9.
- Thompson, F.L., Hoste, B., Vandemeulebroecke, K., Swings, J. 2003. Reclassification of *Vibrio hollisae* as *Grimontia hollisae* gen. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53, 1615–1617.
- Wang R., Zhong Y., Gu X., Yuan J., Saeed A.F., Wang S. 2015. The pathogenesis, detection, and prevention of *Vibrio parahaemolyticus*. *Front Microbiol.* 6:144.
- Ward L.N., Bej A.K. 2006. Detection of *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish by use of multiplexed real-time PCR with TaqMan fluorescent probes. *Appl Environ Microbiol.* 72(3):2031-42.



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