



PROTOTYP

**Diagnostický prostředek pro simultánní detekci
humánních norovirů (NoV GI a NoV GII),
viru hepatitidy A, viru hepatitidy E (HEV-1, HEV-3),
adenovirů 40/41 a rotavirů A**

**Mgr. Jakub Hrdý
Mgr. Petra Vašíčková, Ph.D.**

**5277
2019**



Prototyp

5277/2019

**Diagnostický prostředek pro simultánní detekci humánních norovirů (NoV GI
a NoV GII), viru hepatitidy A, viru hepatitidy E (HEV-1, HEV-3), adenovirů
40/41 a rotavirů A**

Jakub Hrdý
Petra Vašíčková

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

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i. Hudcova 70 621 00 BRNO	Druh dokumentace: Popis technického řešení pro přihlášku prototypu		Verze: 01 Strana: 2/13 Počet příloh: 0	
Výtisk č.1			Účinnost od: 1.10.2019	
Název dokumentace: Diagnostický prostředek pro simultánní detekci humánních norovirů (NoV GI a NoV GII), viru hepatitidy A, viru hepatitidy E (HEV-1, HEV-3), adenovirů 40/41 a rotavirů A Popis technického řešení pro přihlášku prototypu				
Evidence o převzaté dokumentaci				
Číslo výtisku	Funkce	Jméno	Datum	Podpis
1	vedoucí oddělení	Petr Králík	1.10.2019	
2				
3				
4				
5				
Evidence o seznámení s dokumentací				
	Funkce	Jméno	Datum	Podpis
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
Rozsah působnosti: Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.	Zpracoval: Jakub Hrdý Petra Vašíčková	Vydal: Jakub Hrdý	Schválil: Petr Králík	

Obsah

1. Úvod.....	4
2. Oblast techniky	5
3. Aktuální stav techniky (diagnostiky)	5
4. Popis technického řešení a nároků na ochranu	6
5. Nároky na ochranu	8
6. Vysvětlení nároků na ochranu	9
7. Seznam materiálů.....	11
8. Literatura.....	12

Vývoj prototypu diagnostického prostředku – detekční soupravy probíhal v rámci řešení projektu Ministerstva Zdravotnictví ČR NV17-31921A.

1. Úvod

Významnou oblastí zájmu bezpečnosti potravin se v posledních letech stávají virová agens. O jejich významu svědčí periodické zprávy Evropského úřadu pro bezpečnost potravin (EFSA), podle kterých jsou viry řazeny mezi nejčastější původce onemocnění z potravin. Zároveň tyto studie poukazují na vzrůstající počet epidemií souvisejících s viry a potravinami (od roku 2011 byl hlášen téměř dvojnásobný počet). Ačkoli byl přenos alimentární cestou popsán u téměř 11 čeledí virů, mezi nejčastější a nejvýznamnější agens onemocnění z potravin patří noroviry (NoV GI a NoV GII), virus hepatitidy A (HAV) a virus hepatitidy E (HEV). Vzhledem ke svému významu pro lidské zdraví je možné mezi tato agens zařadit i viry z čeledi *Adenoviridae* (adenovirus 40 a 41; AdV 40/41) a rotaviry (zejména rotavirus A; RVA). NoV, AdV 40/41 a RVA jsou původci typických virových gastroenteritid s krátkou inkubační dobou (1 až 6 dní, u AdV 40/41 až 10 dní) a typickými příznaky onemocnění, jako jsou zvracení a průjemy, v některých případech i horečka. HAV a HEV způsobují hepatitidy, inkubační doba těchto onemocnění je delší (přibližně 2 až 6 týdnů). Nejčastější klinické příznaky zahrnují horečku, malátnost, nechutenství, nevolnost, zvracení a tmavou moč, icterus nastupuje pouze v některých případech. Onemocnění často vyžaduje hospitalizaci.

Hlavní způsob přenosu těchto virových agens je fekálně-orální přenos, v případě HEV je k hlavnímu způsobu šíření řazena i konzumace syrového nebo nedostatečně tepelně upravovaného masa či vnitřností infikovaných zvířat. Zatímco zdrojem nákazy HAV, NoV a AdV 40/41 jsou zejména lidé, akutně nemocní či bezpříznakoví nosiči, u HEV je nutno zdroje infekcí rozšířit o prasata domácí, prasata divoká a případně jelenovité. Zoonotický potenciál RVA byl také popsán. K šíření těchto agens dochází nejčastěji přímým kontaktem s infikovanými jedinci (klinicky nemocnými či asymptomatickými přenašeči). Přesto kontaminované potraviny, voda a povrchy různých zařízení (např. kliky, splachovadla toalet, povrchy potravinářských zařízení a nástrojů) hrají významnou roli v jejich přenosu. Výše zmíněné viry byly prokázány ve stolici infikovaných jedinců (NoV i ve zvracích či slinách). Nakažený jedinec většinou vylučuje zmíněné viry již před objevením prvních klinických příznaků, a i několik týdnů po jejich odeznění. Z organismu hostitele jsou vylučovány ve vysokých množstvích (10^6 až 10^{11} částic/g stolice), přičemž infekční dávka se pohybuje v rozmezí 10 až 100 infekčních virových částic, u HEV existují domněnky o vyšší infekční dávce (cca 20 000 infekčních virových částic).^{1, 2, 3}

Zejména kvůli citlivosti, specifitě a možnosti kvantifikace je v současné době nejvhodnější metodou průkazu výše uvedených agens polymerázová řetězová reakce v reálném čase (qPCR). V případě virů, jejichž genom je v podobě RNA, předchází qPCR krok reverzní transkripce (RT; RT-qPCR). Tento přístup má však velkou nevýhodu v omezené možnosti vytvářet multiplexní systémy pro rychlou detekci většího počtu patogenů. Proto byl vyvinut diagnostický prostředek, který umožňuje *in vitro* detekci NoV (NoV GI, NoV GII), HAV, HEV (HEV-1, HEV-3), AdV 40/41 a RVA v různých typech matric (voda, potraviny, stěry z prostředí či rukou osob a klinický materiál) v jedné reakci. Tento prostředek, označen jako „xMAP panel – detekce NoV (NoV GI, NoV GII), HAV, HEV (HEV-1, HEV-3), AdV 40/41 a RVA“, je unikátní svým složením a jednoduchostí jeho použití. Souprava zahrnuje i externí kontrolu analýzy vzorků (EAC), která umožňuje validní analýzu každého jednoho vzorku. Kit je navržen v souladu s aktuálně platnou legislativou ČR a EU.^{4, 5}

2. Oblast techniky

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

3 Aktuální stav techniky (diagnostiky)

Vzhledem k tomu, že výše uvedená agens jsou problematicky kultivovatelná na buněčných kulturách, metody detekce těchto virů jsou založeny na molekulárně genetických (tzn. na přímé detekci genomu viru) nebo ELISA metodách. Na současném trhu existuje řada komerčních produktů sloužících ve zdravotnické diagnostice (tzn. k průkazu HAV, HEV, NoV, AdV 40/41 či RVA v klinickém materiálu). Nicméně tyto produkty v rámci jedné reakce umožňují detekovat pouze jeden patogen. Analýza vzorků na přítomnost většího množství patogenů tak může být finančně i časově náročná.

Průkaz virů v potravinách či prostředí je oproti klinickým vzorkům časově i metodicky náročnější, proto je při analýze takovýchto matric dle ISO metod požadována kontrola celého analytického postupu. Díky stálému metodickému zlepšování existuje celá řada postupů analýzy vzorků potravin či prostředí; v několika případech mají různá pracoviště zavedeny vlastní diagnostické metody (tzv. „home-made“). Účinnost těchto metod může být různá a výsledky tak nesrovnatelné. Žádná ze společností nabízející komerčně dostupné soupravy k průkazu výše uvedených virů nenabízí komplexní a zároveň vhodné řešení pro řádnou

analýzu potravinových matric a vzorků prostředí, částečně s výjimkou firmy CEERAM S.A.S. (Francie). Tato firma nabízí samostatné soupravy pro průkaz NoV GI a/nebo NoV GII, HAV. Kontrola celého analytického postupu (zejména izolace nukleových kyselin) je zajišťována další soupravou Kit mengovirus@ceeramTools™. Cena soupravy pro průkaz NoV GI či NoV GII je 18 260 Kč bez DPH/48 reakcí (každý), souprava sloužící ke kontrole izolace nukleových kyselin je prodávána za 19 020 Kč bez DPH/50 reakcí. Tzn. analýza jednoho vzorku na přítomnost NoV GI, NoV GII a současná kontrola izolace nukleových kyselin je ceněna na 4 525 Kč bez DPH (analýza je dle požadavků ISO metod prováděna v duplikátu s neředěnou a 10× naředěnou nukleovou kyselinou, cena je bez započítání izolace nukleových kyselin a negativních kontrol). Pokud do analýzy vzorku zahrneme další agens, např. HAV cena analýzy jednoho vzorku bude navýšena o dalších 1 553 Kč. Zahrnutí dalších patogenů do analýzy cenu opět navýší.

Náklady na provedení analýzy jednoho vzorku při využití výše zmíněného multiplexního detekčního nástroje na průkaz přítomnosti NoV (NoV GI, NoV GII), HAV, HEV (HEV-1, HEV-3), AdV 40/41 a RVA se pohybují okolo 752 Kč bez DPH (analýza dle požadavků ISO metod prováděna v duplikátu s neředěnou a 10× naředěnou nukleovou kyselinou, cena je bez započítání izolace nukleových kyselin a negativních kontrol). Oproti v současnosti dostupným komerčním soupravám tak toto řešení představuje výrazně méně finančně náročnou variantu.

4. Popis technického řešení a nároků na ochranu

Technické řešení diagnostického prostředku, který umožňuje *in vitro* detekci humánních norovirů (NoV GI, NoV GII), viru hepatitidy A (HAV), viru hepatitid E (genotyp 1 a 3; HEV-1, HEV-3), adenoviru sérotypu 40/41 (AdV 40/41) a rotavirů A (RVA) v různých typech matric (klinický materiál, voda, potraviny a stěry z prostředí či rukou osob). Toto diagnostické řešení využívá kombinaci xMAP technologie (Luminex corporation, USA, Texas), multiplexní oligonukleotidové ligační reakce a polymerázové řetězové reakce s předcházejícím krokem reverzní transkripce. Spojení těchto technologií umožňuje v jedné reakci analýzu vzorku na přítomnost nukleových kyselin NoV (NoV GI, NoV GII), HAV, HEV (HEV-1, HEV-3), AdV 40/41 a RVA.

Jako externí kontrola jednotlivých kroků analýzy u každého vzorku je použit defektní bakteriofág MS2. Tento přístup, tzn. použití přesně definovaného množství externí kontroly

ve spojení s xMAP technologií, umožňuje kontrolu analytického postupu každého jednoho analyzovaném vzorku. Metoda je specifikována jedinečnými parametry, které umožňují její použití v oblasti bezpečnosti potravin i humánní medicíny. Zvolené řešení je unikátní v následujících položkách:

Externí kontrola postupu analýzy vzorku (EAC)

- Externí kontrola celého postupu analýzy vzorků na přítomnost NoV (NoV GI, NoV GII), HAV, HEV (HEV-1, HEV-3), AdV 40/41 a RVA je složena ze specifických sekvencí dvou vyhynulých živočišných druhů; vakovlka tasvánského (*Thylacinus cynocephalus*) a ptáka moa (*Dinornis struthoides*). Specifická sekvence je začleněna do genomu bakteriofága MS2 a obalena jeho proteiny. Připravený konstrukt je zcela arteficiální, proto defektní částice MS2 je možné použít k umělé kontaminaci každého typu vzorku.
- Pro účely zajištění sensitivity a specificity procesu detekce externí kontroly byly navrženy a testovány specifické unikátní sekvence nukleových kyselin (viz Seznam materiálu; tzv. oligonukleotidy, které jsou součástí reakčních směsí)
- Externí kontrola je stabilní až 12 měsíců při teplotě -20 ± 4 °C.

Složení diagnostického produktu „xMAP panel – detekce NoV (NoV GI, NoV GII), HAV, HEV (HEV-1, HEV-3), AdV 40/41 a RVA“ a jeho uživatelské vlastnosti

- Reakční směsi pro reverzní transkripci (tzv. RT1, RT2 a RT3) obsahují veškeré reakční složky nezbytné pro průběh reverzní transkripce: enzym reverzní transkriptázu, RNase inhibitor, deoxyribonukleotidy (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), reakční pufr a směs potřebných oligonukleotidů (úseků nukleové kyseliny - tzv. primerů) v definovaných koncentracích. Směs specifických oligonukleotidů zajistí analýzu vzorku na přítomnost RNA NoV (NoV GI, NoV GII), HAV, HEV (HEV-1, HEV-3), RVA a EAC.
- Ligační směsi (LG1 a LG2) obsahují veškeré reakční složky pro průběh ligace: ligázu, pufr, specifické oligonukleotidy v definovaných koncentracích. Směs specifických oligonukleotidů zajistí analýzu vzorku na přítomnost genomu NoV (NoV GI, NoV GII), HAV, HEV (HEV-1, HEV-3), AdV 40/41, RVA a EAC.
- Reakční směs (tzv. PCR) v jedné zkumavce obsahuje veškeré reakční složky nezbytné pro průběh PCR. Tyto složky jsou: enzym polymeráza, deoxyribonukleotidy (dATP,

dCTP, dGTP, dTTP), reakční pufr s optimalizovaným množstvím iontů hořčíku (Mg^{2+}), směs všech potřebných oligonukleotidů (převzato z ⁶), která zajistí analýzu vzorku na přítomnost genomu NoV (NoV GI, NoV GII), HAV, HEV (HEV-1, HEV-3), AdV 40/41, RVA a EAC.

- Mix specifických mikrosfér, jejichž fluorescenční signál umožní stanovit přítomnost genomu NoV (NoV GI, NoV GII), HAV, HEV (HEV-1, HEV-3), AdV 40/41, RVA a EAC.
- Produkt kromě výše popsaných reakčních směsí obsahuje zkumavku "pozitivní kontrola", kterou je možno použít jako pozitivní kontrolu reakcí, a příbalovou informaci o použití diagnostické soupravy (včetně návodu k interpretaci získaných výsledků).
- Práce s produktem u uživatele spočívá pouze v odebrání potřebného předepsaného množství „reakční směsi“ a přidání vzorku nebo „pozitivní kontroly“.
- Produkt je v popsaném složení stabilní až 12 měsíců při teplotě -20 ± 4 °C.

5. Nároky na ochranu

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

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

- 2) Sekvence oligonukleotidů specifických k cílovým úsekům genomu NoV (NoV GI, NoV GII), HAV, HEV (HEV-1, HEV-3), AdV 40/41 a RVA (rozpoznávací sekvence pro metodu RT a ligaci) 5'-3':

- a. GTCCCAATTTAGACTCCTACAGCT
- b. PHO-ATGGAGCTGTAGGAGTCTAATCTCACTTCTTACTACCGCG
- c. ACTCGTAGGGAATAAACCGTTATTAGAGTTTGAGAATAAGTAGTGG
GTCAACTCCATGATTAGC
- d. CACAAGCAAATAAACTATAACTCCCG
- e. PHO-GTGGGTAAAACCTCGGGATCTCACTTCTTACTACCGCG

- f. ACTCGTAGGGAATAAAACCGTTGTATATGTTAATGAGATGTTGTACA
GCGCCTTAAGATGAAG
- g. AAGGGGTTGGTTGGATGAAT
- h. PHO-ATTCATCCAACCAACCCCTTCTCACTTCTTACTACCGCG
- i. ACTCGTAGGGAATAAAACCGTTTGTGTAGTTAAGAGTTGTTTAATCTT
CGCCCTCCCCTAT
- j. GTCYT TAGACGCCATCRTC
- k. PHO-GAYGATGGCGTCTAARGACTCTCACTTCTTACTACCGCG
- l. ACTCGTAGGGAATAAAACCGTAGTAAGTGTTAGATAGTATTGAATGC
RATCTYYTSCCCGAWTWYGTAAAT
- m. TCAYTCGACGCCATCTTCAC
- n. PHO-ATCGCAATCTKGCYCCRTCTCACTTCTTACTACCGCG
- o. ACTCGTAGGGAATAAAACCGTTATGAATGTTATTGTGTGTTGATTVA
GCACDTGGGAGGGCG
- p. PHO-GCCAGCACBTWCTTTGACATTCTCACTTCTTACTACCGCG
- q. ACTCGTAGGGAATAAAACCGTAAATAAGAATAGAGAGAGAAAGTTG
ACAACMGRGTGYTRGAYATG
- r. AACTGCAGCTTCAAAAGAAGAG
- s. PHO-CTCAAGATGGAGTCTACGCAACATCTCACTTCTTACTACCGCG
- t. ACTCGTAGGGAATAAAACCGTGATAGATTTAGAATGAATTAAGTGAT
TTAATGCTTTTCAGTGGTTGATG

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

6. Vysvětlení nároků na ochranu

Ad1 - 2) Jedná se o unikátní sekvence, které dosud nebyly použity, byly originálně navrženy a testovány v laboratořích Výzkumného ústavu veterinárního lékařství, v.v.i.. S jejich pomocí je možné technologií založenou xMAP provést validní analýzu vzorů na přítomnost genomu NoV (NoV GI, NoV GII), HAV, HEV (HEV-1, HEV-3), AdV 40/41 a RVA. Sekvence externí kontroly analytického postupu je naprosto jedinečná, proto

připravený konstrukt (defektní bakteriofág MS2) je možné použít k umělé kontaminaci jakékoli matrice (klinický materiál, potravin, prostředí). Tzn. metodika je použitelná pro diagnostiku v rámci humánní medicíny a bezpečnosti potravin. Přesné určení sekvencí genomu výše uvedených virových agens a externí kontroly je podmínkou správné a přesné hybridizace nukleových kyselin ve vyšetřovaném vzorku s navrženými krátkými sekvencemi DNA (oligonukleotidy); tyto specifické oligonukleotidy se tak váží výhradně na nukleovou kyselinu výše uvedených virů a externí kontroly. Předmětem ochrany tedy mají být právě uvedené sekvence nukleotidů, které jsou použity v tomto diagnostickém prostředku 5' - 3':

- a) GGTTTAGAATGTTTTCTCCCGT
- b) PHO-ATTAGCACAATGAATAATCATCGTCTCACTTCTTACTACCGCG
- c) ACTCGTAGGGAATAAACCGTATTGTGAAAGAAAGAGAAGAAATTTATACA
CACGCAATCACCAC
- d) GTCCCCAATTTAGACTCCTACAGCT
- e) PHO-ATGGAGCTGTAGGAGTCTAATCTCACTTCTTACTACCGCG
- f) ACTCGTAGGGAATAAACCGTTATTAGAGTTTGAGAATAAGTAGTGGGTCA
ACTCCATGATTAGC
- g) CACAAGCAAATAAACTATAACTCCCG
- h) PHO-GTGGGTAAAACCTCGGGATCTCACTTCTTACTACCGCG
- i) ACTCGTAGGGAATAAACCGTTGTATATGTTAATGAGATGTTGTACAGCGCC
TTAAGATGAAG
- j) AAGGGGTTGGTTGGATGAAT
- k) PHO-ATTCATCCAACCAACCCCTTTCTCACTTCTTACTACCGCG
- l) ACTCGTAGGGAATAAACCGTTTGTGTAGTTAAGAGTTGTTTAATCTTCGCC
CTCCCCTAT
- m) GTCYT TAGACGCCATCRTC
- n) PHO-GAYGATGGCGTCTAARGACTCTCACTTCTTACTACCGCG
- o) ACTCGTAGGGAATAAACCGTAGTAAGTGTTAGATAGTATTGAATGCRATCT
YYTSCCGAWTWYGTRAAT
- p) TCAYTCGACGCCATCTTCAC
- q) PHO-ATCGCAATCTKGCYCCRTCTCACTTCTTACTACCGCG
- r) ACTCGTAGGGAATAAACCGTTATGAATGTTATTGTGTGTTGATTTVAGCAC
DTGGGAGGGCG
- s) PHO-GCCAGCACBTWCTTTGACATTCTCACTTCTTACTACCGCG

- t) ACTCGTAGGGAATAAACCGTAAATAAGAATAGAGAGAGAAAGTTGACAA
CMGRGTGYTRGAYATG
- u) AACTGCAGCTTCAAAAAGAAGAG
- v) PHO-CTCAAGATGGAGTCTACGCAACATCTCACTTCTTACTACCGCG
- w) ACTCGTAGGGAATAAACCGTGATAGATTTAGAATGAATTAAGTGATTTAAT
GCTTTTCAGTGGTTGATG.

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

Ad3) Složení reakčních směsí je pro část navržené metody typické a obecně známé. V navrženém nároku na ochranu je však požadována ochrana reakčních směsí, které obsahují všechny uvedené složky najednou: RT1 (dATP, dTTP, dCTP, dGTP, specifické oligonukleotidy), LG1 a LG2 (reakční pufr, specifické oligonukleotidy), PCR (enzym polymeráza, dATP, dCTP, dGTP, dTTP, reakční pufr, směs všech potřebných oligonukleotidů tzv. primerů) a BM1 (mix specifických mikrosfér). Součástí diagnostického prostředku jsou také zkumavky s reakční směsí RT2 a RT3, LG3, AP, BM2, BM3 a zkumavka s pozitivní kontrolou a externí kontrolou. Výhodou pro zákazníka je jednoduché použití, kdy k provedení detekce postačí do zkumavky odebrat daný objem reakční směsi a přidat izolát nukleové kyseliny ze vzorku. Další z výhod je možnost analýzy vzorku na přítomnost NoV (NoV GI, NoV GII), HAV, HEV (HEV-1, HEV-3), NoV GI a NoV GII, AdV (40/41) a RVA a současně ověřit řádnost celého analytického postupu v rámci jedné reakce.

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

7. Seznam materiálu obsaženém v diagnostické soupravě

- | | |
|-----|---|
| PK | obsahuje RNA/DNA NoV (NoV GI, NoV GII), HAV, HEV (HEV-1, HEV-3), AdV 40/41 a RVA (pozitivní kontrola) |
| EAC | obsahuje externí kontrolu analytického postupu, tzn. defektní bakteriofág MS2 do jehož genomu je včleněna uměle vytvořená sekvence (vakovlk tasníkářský, pták moa), která je začleněna do jeho genomu |

DDW	obsahuje RNase-free vodu
RT směsi	RT1 obsahuje: vodu, deoxyribonukleotidy, specifické oligonukleotidy RT2 obsahuje: enzym reverzní transkriptáza, RNase inhibitor RT3 obsahuje: pufr, voda Poznámka: složení RT2 a RT3 není předmětem nároku na ochranu.
LG směsi	LG1 obsahuje: vodu, pufr, specifické oligonukleotidy M1 LG2 obsahuje: vodu, pufr, specifické oligonukleotidy M2 LG3 obsahuje: ligázu Poznámka: složení LG3 není předmětem nároku na ochranu.
PCR směs	obsahuje vodu, deoxyribonukleotidy, pufr, polymerázu, specifické oligonukleotidy, ale neobsahuje nukleové kyseliny Poznámka: složení PCR není předmětem nároku na ochranu.
BM směsi	BM1 obsahuje směs specifických mikrosfér BM2 obsahuje roztok NaCl BM3 obsahuje roztok MES Poznámka: složení BM2, BM3 není předmětem nároku na ochranu.
AP	obsahuje analyzační pufr Poznámka: složení AP není předmětem nároku na ochranu.

Specifické oligonukleotidy (krátké úseky nukleové kyseliny, vyznačující se unikátní sekvencí za sebou řazených nukleotidů; zajišťují sensitivitu a specifitu detekce). Sekvence oligonukleotidů pro reverzní transkripci specifických pro NoV (NoV GI, NoV GII), HAV, HEV (HEV-1, HEV-3), RVA a EAC:

Oligo	Sekvence (5' - 3')	Délka
HAV_RP	GTCCCCAATTTAGACTCCTACAGCT	25 nt
HEV_G1_RP	CACAAGCAAATAAACTATAACTCCCG	26 nt
HEV_G3_RP	AAGGGGTTGGTTGGATGAAT	20 nt
NoV_GI_RP	GTCYT TAGACGCCATCRTC	19 nt
NoV_GII_RP	TCAYTCGACGCCATCTTCAC	20 nt
RVA_RP	AACTGCAGCTTCAAAAGAAGAG	22 nt
EAC_RP	GGTTTAGAATGTTTTCTCCCGT	22 nt

Sekvence oligonukleotidů specifických pro NoV (NoV GI, NoV GII), HAV, HEV (HEV-1, HEV-3), AdV 40/41, RVA a EAC:

Oligo	Sekvence (5' - 3')	Délka
HAV_M1	PHO-ATGGAGCTGTAGGAGTCTAATCTCACTTCTTACTACCGCG	40 nt
HAV_M2	ACTCGTAGGGAATAAAACCGTTATTAGAGTTTGAGAATAAGTAGTGGGTCA ACTCCATGATTAGC	64 nt
HEV_G1_M1	PHO-GTGGGTAAAACTCGGGATCTCACTTCTTACTACCGCG	37 nt
HEV_G1_M2	ACTCGTAGGGAATAAAACCGTTGTATATGTTAATGAGATGTTGTACAGCGCC TTAAGATGAAG	62 nt
HEV_G3_M1	PHO-ATTCATCCAACCAACCCCTTTCTCACTTCTTACTACCGCG	40 nt
HEV_G3_M2	ACTCGTAGGGAATAAAACCGTTTGTGTAGTTAAGAGTTGTTTAATCTTCGCC CTCCCTAT	60 nt
NoV_GI_M1	PHO-GAYGATGGCGTCTAARGACTCTCACTTCTTACTACCGCG	21 nt
NoV_GI_M2	ACTCGTAGGGAATAAAACCGTAGTAAGTGTTAGATAGTATTGAATGCRATC TYYTSCCCGAWTWYGTAAAT	70 nt
NoV_GII_M1	PHO-ATCGCAATCTKGCCCTCTCACTTCTTACTACCGCG	38 nt
NoV_GII_M2	ACTCGTAGGGAATAAAACCGTTATGAATGTTATTGTGTGTTGATTTVAGCAC DTGGGAGGGCG	62 nt
AdV_40/41_M1	PHO-GCCAGCACBTWCTTTGACATTCTCACTTCTTACTACCGCG	40 nt
AdV_40/41_M2	ACTCGTAGGGAATAAAACCGTAAATAAGAATAGAGAGAGAAAGTTGACAA CMGRGTGYTRGAYATG	65 nt
RVA_M1	PHO-CTCAAGATGGAGTCTACGCAACATCTCACTTCTTACTACCGCG	43 nt
RVA_M2	ACTCGTAGGGAATAAAACCGTGATAGATTTAGAATGAATTAAGTGATTTAA TGCTTTTCAGTGGTTGATG	69 nt
EAC_M1	PHO-ATTAGCACAATGAATAATCATCGTCTCACTTCTTACTACCGCG	43 nt
EAC_M2	ACTCGTAGGGAATAAAACCGTATTGTGAAAGAAAGAGAAGAAATTTATACA CACGCAATCACCAC	64 nt

Vývoj prototypu diagnostického prostředku – detekční soupravy probíhal v rámci řešení projektu Ministerstva Zdravotnictví ČR s reg. č. NV17-31921A.

Literatura

1. Newell, D.G., Koopmans, M., Verhoef, L., Duizer, E., Aidara-Kane, A., Sprong, H., Opsteegh, M., Langelaar, M., Threlfall, J., Scheutz, F., van der Giessen, J., Kruse, H. Food-borne diseases - the challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. Int J Food Microbiol 2010;139: S3-15.
2. Koopmans, M., Duizer, E. Foodborne viruses: an emerging problem. Int J Food Microbiol 2004; 90: 23-41.

3. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). Scientific Opinion on An update on the present knowledge on the occurrence and control of foodborne viruses. EFSA Journal, 2011; 9: 96 ss.
4. ISO/TS 1526-1, 2017, 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.
5. ISO/TS 1526-2, 2013, Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time RT-PCR part 2: Method for qualitative detection.
6. Thierry, S., Hamidjaja, R.A., Girault, G., Löfström, C., Ruuls, R., Sylviane, D. A multiplex bead-based suspension array assay for interrogation of phylogenetically informative single nucleotide polymorphisms for *Bacillus anthracis*. J Microbiol Meth 2013; 95: S357-365.



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