

Vytvořil:  
SÚJCHBO, v.v.i.

Certifikovaná metodika

Označení metodiky:  
B2/MOLB/071

**Průkaz přítomnosti genetického materiálu viru SARS pro potřeby kontroly zákazu biologických zbraní pomocí real-time PCR s „UPL sondou“**

**Mgr. Kateřina Rosenbergová, Ph.D.;**

**Ing. Karel Bílek, Ph.D.;**

**Mgr. Martina Grochová**

Realizační výstup projektu MV ČR „Vývoj nových metodik pro detekci biologických agens v oblastech souvisejících s dodržováním Úmluvy o zákazu biologických zbraní“ číslo: VI20172019063.

Oponent: Mgr. Václav Hönic, Ph.D.  
Ing. Miroslava Zichová, Ph.D.

prosinec 2018

## Obsah

1	CÍL METODIKY .....	3
2	VLASTNÍ POPIS METODIKY .....	3
2.1	Charakteristika viru SARS .....	3
2.2	Laboratorní diagnostika viru SARS .....	5
2.3	Vlastní metoda.....	6
2.3.1	Referenční vzorky .....	7
2.3.2	Opatření pro manipulaci s infekčním materiálem.....	7
2.3.3	Extrakce RNA z testovaného materiálu .....	7
2.3.4	Působení DNázou I a reverzní transkripce.....	8
2.3.5	Polymerázová řetězová reakce.....	9
2.3.6	Vyhodnocení analýzy.....	11
2.3.7	Kontrola specificity .....	12
2.3.8	Validace a limity reakce.....	14
3	INOVAČNÍ ASPEKTY, NOVOST POSTUPŮ .....	16
4	POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY .....	17
5	LITERATURA.....	18

## 1 CÍL METODIKY

Cílem metodiky je poskytnout inspektorům Státního úřadu pro jadernou bezpečnost (SÚJB) vhodnou metodu pro průkaz přítomnosti genetického materiálu viru způsobující těžký akutní respirační syndrom z ang. *Severe Acute Respiratory Syndrome* (dále jen SARS) ve vzorcích získaných při kontrole dodržování zákazu biologických zbraní.

Metodika se cíleně zaměřuje na:

- možnost detekce viru SARS v neznámých terénních vzorcích;
- nezávislost detekce na kultivaci cílového organismu;
- na rychlou analýzu s jasnou interpretací výsledků pro zaškolený personál;
- možnost ověření pozitivitu reakce sekvenací amplifikačních produktů v případech nejasných prvotních výsledků metody.

## 2 VLASTNÍ POPIS METODIKY

### 2.1 Charakteristika viru SARS

Virus SARS je dle Baltimorovy klasifikace řazen do IV. skupiny, resp. jedná se o virus s pozitivně orientovanou jednořetězcovou nesegmentovanou molekulou RNA (Baltimore, 1971). Taxonomicky je virus zařazen do řádu *Nidovirales*, čeledi *Coronaviridae*. Viry čeledě *Coronaviridae* jsou evolučně příbuzné obalené RNA viry obratlovců. Čeleď *Coronaviridae* je dále členěna na podčeleď *Torovirinae* a *Coronavirinae*, ta je dále členěna na rod Alpha-, Beta-, Delta-, Gamma-coronavirus. Pro účely této metodiky je zajímavý zejména rod Betacoronavirus. Tento rod se dále dělí na čtyři základní antigenové skupiny (A, B, C a D), které jsou definovány na základě povrchových proteinů podílejících se na vstupu viru do vnímavé buňky (Yang *et* Leibowitz, 2015). Do skupiny A je zařazen např. lidský koronavirus HCoV-229E a HCoV-NL63, dále betakoronaviry HCoV-OC43 a HCoV-HKU1 nebo zástupci napadající psy, kočky a další obratlovce. Do skupiny B patří zejména koronavirus SARS a viry způsobující onemocnění u netopýrů. Skupina C zahrnuje pro člověka rizikový virus identifikovaný roku 2012 *Middle East Respiratory Syndrome* MERS-CoV, který je blíže příbuzný netopýřím koronaviřům HKU4 a HKU5 (de Groot *et al.*, 2013). Zástupci skupiny D jsou viry napadající pouze netopýry, např. HKU9. Z výše uvedených skupin bylo doposud identifikováno šest koronaviřů způsobujících onemocnění u lidí (*human coronaviruses* –

HCoV) tj. HCoV-229E; HCoV-NL63; HCoV-OC43; HCoV-HKU1; SARS-CoV a MERS-CoV (Corman et al., 2014).

Virus SARS je morfologicky typickým zástupcem čeledi *Coronaviridae*, na snímcích z elektronového mikroskopu jsou na povrchu patrné kyjovité výběžky vyčnívající z virionu. Tyto výběžky obklopují částici sférického tvaru o průměru přibližně 100 nm (Ng *et al.*, 2004). Virion se skládá ze čtyř glykoproteinů – E (obalu – *envelope*), M (membrány – *membrane*), N (nukleokapsidy – *nucleocapsid*) a tzv. proteinu S (z ang. *spike*). Posledně jmenovaný S protein je významný z důvodu několika funkcí: je nástrojem virulence; váže se na buněčný receptor; reaguje s protilátkami neutralizující virus a má antigenní peptid stimulující cytotoxické T-lymfocyty (Rajčáni *et Čiampor*, 2006).

Co do genetické výbavy se virus řadí mezi nejobsáhlejší RNA viry s obsahem téměř 30 kb (Mara *et al.*, 2003). I přesto, že má vlákno RNA pozitivní polaritu, není infekční na rozdíl od jiných ssRNA+ virů (Yang *et Leibowitz*, 2015). Stejně jako stavba, je i organizace genomu viru SARS odpovídající čeledi *Coronaviridae*. Na 5' konci se nachází gen pro replikázu (*rep*), jenž zahrnuje přibližně dvě třetiny velikosti genomu viru a kóduje dva polyproteiny ozn. *pol1a* a *pol1b* (ORF1a, resp ORF1b). Gen pro replikázu následují čtyři čtecí rámce, které pokračují sekvencemi pro strukturní proteiny: S, E, M, N směrem k 3' konci. Na obou koncích genomu viru se nacházejí nepřekládané úseky (Rota *et al.*, 2003). Celkově genom viru SARS kóduje min. 20 proteinů, tj. mimo výše uvedených např. ještě gen pro hemaglutinin-esterázu nebo pět nestrukturních genů ozn. X1-X5 s dosud neznámou funkcí (Rota *et al.*, 2003; Rajčáni *et Čiampor*, 2006; McBride *et Burtram*, 2012).

Jak bylo uvedeno výše, hlavní úlohu při adsorpci viru do vnímavé buňky hraje glykoprotein S, který reaguje s povrchovými receptory buněk dýchacího epitelu, ale i gastrointestinálního traktu. Po proniknutí do cytoplazmy se z molekuly vRNA na ribozomech nejprve přímo přepíše oba čtecí rámce genu *pol1a* a *pol1b* a tím vzniknou prekurzorové polyproteiny. Ty se pomocí endogenních proteáz štěpí na aktivní proteiny, které se mj. stávají součástí komplexu RNA-polymerázy (např. gen *pol1b* kóduje polymerázu, transkriptázu, helikázu a NTPázu). Funkcí RNA-polymerázy je přepis vRNA na kRNA (komplementární negativní vlákno), ze kterého se syntetizují kratší transkripty pro ostatní proteiny. Tyto transkripty ozn. jako subgenová mRNA mají odlišná místa iniciace, ale společnou koncovou sekvenci. Tak se pravděpodobně přepíše celá kRNA, která se stává templátem pro syntézu nové vRNA. Závěrem se glykoprotein N asociuje s nově vytvořenou vRNA a ostatní prekurzorové glykoproteiny jsou transportovány do endoplazmatického retikula. Poté se přes Golgiho aparát přesouvají směrem k buněčné membráně, kde dochází k fúzi vezikul Golgiho

zóny a cytoplazmatických vakuol a následně dochází k uvolňování virových částic. (McBride *et Burtram*, 2012; Rajčáni *et Čiampor*, 2006).

Výskyt onemocnění způsobeného virem SARS byl poprvé hlášen v listopadu 2002 v provincii Guangdong v Číně. Onemocnění se projevovalo atypickou pneumonií, která se opakovala i v únoru následujícího roku u pacientů v Honkongu. Tito lidé se pravděpodobně vyskytovali v provincii Guangdong v čase předchozí události. Poté se virus rychle rozšířil do Singapuru, Vietnamu, ale např. i Kanady a dalších zemí (Rota *et al.*, 2003). Do konce roku 2003 bylo zaznamenáno celosvětově 774 fatálních případů (Yang *et Leibowitz*, 2015).

Virus pravděpodobně před rokem 2002 u lidí onemocnění nevyvolával, virus je považován za zoonózu, jejíž původce se adaptoval na člověka. Primární zvířecí hostitel dosud nebyl zjištěn, i když byl tzv. SARS-like virus detekován ve stolici himalájských cibetek a mývalů (Beneš *et al.*, 2009).

Virus způsobuje těžké onemocnění dýchacích cest, tzv. těžký akutní respirační syndrom, či syndrom náhlého selhání dýchání. Virus je přenášen především kapénkovou infekcí, případně prostřednictvím různých předmětů potřísněných sekrety dýchacích cest, jinými tělesnými tekutinami nebo stolicí (Zhao *et al.*, 2003). Byl popsán i vzdušný přenos virových částic (Beneš *et al.*, 2009).

Inkubační doba je 2–7 dní, v některých případech až 10 dní. Infekce vždy začíná vysokou teplotou (nad 38 °C), bolestmi hlavy, celkovou únavou. Dalšími příznaky mohou být kašel, bolest v krku, malátnost, zimnice apod. Po 2–7 dnech se přidružuje suchý kašel a dýchací obtíže. SARS se klinicky manifestuje náhle vzniklou atypickou pneumonií s minimálním poslechovým nálezem. U dětí mladších 12 let probíhá onemocnění mírněji. Úmrtnost na toto onemocnění je 9-10% (Gretebeck *et Subbarao*, 2015).

## **2.2 Laboratorní diagnostika viru SARS**

Pro laboratorní diagnostiku jsou k dispozici jak nepřímé (např. detekce protilátek), tak přímé (např. RT-PCR) metody. Z nepřímých metod jsou to především sérologické testy pro průkaz virově-specifických protilátek ve fázi virémie. Detekce virového antigenu (SARS-CoV S1 protein) je prováděna např. pomocí „sandwich“ ELISA testu (Sunwoo *et al.*, 2013). Virově specifický IgM a IgG lze prokázat pomocí „protein microarray technology“ (Reusken *et al.*, 2013). Nicméně je nutno pamatovat, že protilátky nastupují až s poklesem virové nálože kolem 10. dne.

Primární výsledky sérologických testů jsou zpravidla ověřovány metodami molekulární biologie založených na reverzně transkripčních RT-PCR (Poon *et al.*, 2004). Přítomnost virů byla prokázána v sekretu dýchacích cest, moči, stolice a vzorků plicní tkáně (Beneš *et al.*, 2009). Důležitým faktorem pro přímý průkaz viru SARS z izolovaného vzorku je jeho kvalita viz <http://www.who.int/csr/sars/diagnostictests/en/>. Z přímých metod lze dále zmínit, při použití vzorků sputa z nosu nebo nosohltanu, imunofluorescenční metody nebo histochemické barvení. V neposlední řadě lze virus detekovat, zejména u vzorků stolice, elektronovou mikroskopií (Rajčáni *et Čiampor*, 2006).

Vlastní izolace viru se provádí kultivací na tkáňových kulturách Vero-E6, MDCK, HeLa (Rajčáni *et Čiampor*, 2006; Zhang *et al.*, 2005). Pro kultivaci viru je nutné zvolit odpovídající úroveň technického zabezpečení, ideálně BSL 4 (z ang. *biosafety level*).

### 2.3 Vlastní metoda

Metoda pro detekci RNA viru SARS je založena na průkazu specifické sekvence genu kódujícího „*spike glycoprotein*“.

Vlastní detekce přítomnosti RNA viru SARS je prováděna pomocí metody real-time PCR využívající systém Universal Probe Library (dále jen UPL) fy Roche (Roche Diagnostic, Německo). Pomocí reverzní transkripce je nejprve proveden přepis virové RNA do struktury komplementární DNA (dále jen cDNA). Pro specifickou detekci přítomnosti virové RNA jsou následně využity specifické primery v kombinaci s UPL sondou. Současně je v reakční směsi i nespecifické interkalační barvivo druhé generace SYTO 61 (Invitrogen, USA). Při reakci je amplifikován fragment o velikosti 151 bp, který obsahuje hybridizační místo pro UPL sondu. Bezprostředně po amplifikační reakci následuje analýza teploty tání PCR produktu, prováděná prostřednictvím SYTO 61. V reakční směsi je přítomna i interní kontrola (dále jen IC) pro vyloučení možné inhibice PCR reakce. Detekce IC je prováděna současně s amplifikací cílového produktu. Metodika je zpracována dle požadavků publikace Bustin *et al.*, 2009: *The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments*.

### **2.3.1 Referenční vzorky**

Metodika byla prakticky ověřována na pozitivní kontrole (virus SARS, Virologický ústav SAV, Bratislava) a dále s použitím DNA syntetické kontroly (Invitrogen, USA) navržené dle nukleotidové sekvence pokrývající část detekovaného genu o délce 191 bp.

### **2.3.2 Opatření pro manipulaci s infekčním materiálem**

Manipulace s infekčním materiálem není součástí této metodiky, ale tato problematika je zpracována jak v interní metodice B2/OST/2: Postup zpracování neznámého vzorku, tak v Provozním řádu pracoviště, kde jsou zakotvena režimová opatření pro vlastní manipulaci s infekčním materiálem. Případný odběr vzorku popisuje interní metodika B2/OST/009: Odběr neznámého vzorku na průkaz biologických agens. Výše zmíněné informace lze také čerpat z dalších veřejně dostupných materiálů, např. manuálu OIE Terrestrial Manual (<http://www.oie.int/standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>), nebo podle WHO Laboratory biosafety manual (<http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/Biosafety7.pdf?ua=1>). Pracovník je také povinen zkontrolovat zařazení biologického agens do rizikové skupiny, např. dle přílohy k Nařízení vlády č. 361/2007 Sb.<sup>1</sup>, a tomu přizpůsobit režim práce a ochranné prostředky.

### **2.3.3 Extrakce RNA z testovaného materiálu**

K extrakci virové RNA je nejvhodnější použití komerčně dodávaných izolačních souprav. Vzhledem k různorodosti potenciálně kontaminovaných vzorků lze jednoznačně doporučit „univerzální“ izolační soupravy určené pro extrakci tzv. „celkové“ RNA např. *Rneasy Mini Kit* (Qiagen, Germany), případně *Nucleo Spin RNA* (Macherey-Nagel, Germany). Při izolaci RNA postupujeme vždy dle návodu od výrobce. Izolovaná RNA je poté bezprostředně použita do PCR reakce, příp. je uchována při teplotě -80 °C.

---

<sup>1</sup> Nařízení vlády, kterým se stanoví podmínky ochrany zdraví při práci.

### 2.3.4 Působení DNázou I a reverzní transkripce

Vzorky byly před dalšími analýzami vystaveny působení DNázy I, viz použité reagensie kitu uvedené v Tab. I, podle návodu výrobce (AMPD1, SIGMA-ALDRICH, USA). Směs izolované nukleové kyseliny, reakčního pufru a DNázy I byla inkubována 15 min při laboratorní teplotě. Pro ukončení aktivity DNázy I byla poté přidána EDTA a celá směs byla podrobena denaturaci při 70 °C po dobu 10 min. Po denaturaci byly vzorky ihned přeneseny na chladicí bloček a proces pokračoval plynule přidáním složek pro reverzní transkripci.

Tab. I: Složky směsi pro působení DNázou I

Složky reakční směsi	Množství (μl)
Reakční pufr 10x	1
DNáza I (1 U/μl)	1
EDTA (50 mM)	1
RNA	8
Celkový objem	11

Reverzní transkripce byla provedena rekombinantní reverzní transkriptázou M-MuLV s redukovanou aktivitou RNázy H a zvýšenou termostabilitou. V Tab. II jsou uvedeny složky reakční směsi vypočtené pro jednu reakci reverzní transkripce za použití kitu Protoscript II First Strand cDNA Synthesis Kit (New England Biolabs, UK). Manipulace s roztoky probíhá v chladicím bločku.

Tab. II: Složky směsi pro reverzní transkripci pomocí Protoscript II

Složky reakční směsi	Množství (μl)
Protoscript II reakční mix (2x)	12,5
Protoscript II enzymový mix (10x)	2,5
Mix obsahující směs náhodných hexamerů (6 μM)	2,5
RNA po působení DNázou I	7,5
Celkový objem	25

Jelikož denaturační krok pro odstranění sekundárních struktur je součástí protokolu působení DNázou I, byl při reverzní transkripci použit rychlý protokol s vynecháním kroku inkubace při 65 °C. Všechny složky z Tab. II byly proto smíchány a inkubovány při 25 °C po



dobu 5 min, poté již probíhala reverzní transkripce standardně při 42 °C v délce 1 hod a nakonec 80 °C po dobu 5 min pro ukončení reakce. Zásobní roztoky cDNA byly před přidáním do PCR mixu ředěny 10x na pracovní roztoky. Pracovní i zásobní roztoky cDNA byly skladovány při -20 °C.

### 2.3.5 Polymerázová řetězová reakce

Vlastní detekce přítomnosti RNA viru SARS je prováděna pomocí metody real-time PCR využívající systém Universal Probe Library (dále jen UPL) fy Roche (Roche Diagnostic, Německo). Primery a UPL sonda byly vybrány v sekvenci genu pro S glykoprotein (*spike glycoprotein* - sekvence č. DQ514531.1) s využitím genové databáze NCBI a počítačového programu Vector NTI Suite 5.5.

Primery byly syntetizovány komerčně (fa Generi Biotech, ČR). Sekvence primerů a UPL sondy jsou uvedeny v Tab. III. PCR reakce je koncipována jako dvoukroková.

Tab. III: Sekvence primerů a UPL sondy pro detekci viru SARS

Název primeru / sondy	Cílové sekvence primerů	Velikost cílové sekvence
SARS F	5'-GGTCTTTTATTGAGGACTTGCTCTT-3'	
SARS R	5'-AGCAGAGGTGGCAACACTGTA-3'	151 bp
Sonda UPL # 159	5' [FAM] GATGCTGG [Tamra]3'	

Zpracovaná cDNA viz kapitola 2.3.4 byla dále používána pro přípravu vlastní amplifikační reakce. Pro analýzy byla využita komerční souprava „*qPCR 2x Master Mix*“ od fa Top-Bio, ČR. Reakční směs obsahuje všechny potřebné komponenty (Taq DNA polymerázu, pufr s MgCl<sub>2</sub>, nukleotidy, monoklonální protilátku anti-Taq a aditiva) ve vhodných koncentracích, je nutno dodat pouze primery, sondu a templátovou cDNA. Složení reakční směsi a objem jednotlivých komponent na jeden vzorek je popsáno v Tab. IV. Zkumavku se složkou „*qPCR 2x Master Mix*“ lze dlouhodobě uchovávat při -20 °C (snáší opakované rozmrazování), při 5 °C je možno mix uchovávat maximálně 1 měsíc. Dále je v reakci použita interní kontrola od fy Generi Biotech, ČR, tzv. UCO Standard detekovaný v kanálu HEX/JOE.

Tab. IV: Složky reakční směsi pro real-time PCR

Složky reakční směsi	Množství (μl)
ddH <sub>2</sub> O	0,5
qPCR 2x Master Mix	10
primer Sn (10 pmol/μl)	1
primer Asn (10 pmol/μl)	1
UPL sonda (10 pmol/μl)	0,5
SYTO 61 (50 μM)	1
UCO Assay HEX (int. kontrola)	2
UCO Standard (int. kontrola)	1
cDNA	3
celkový objem	20

Real-time PCR reakce je prováděna v termocykléru Rotor-Gene RG - 3000 (Corbett Research, Australia) za reakčních podmínek uvedených v Tab. V.

Tab. V: Reakční podmínky pro real-time PCR

Program	Teplota	Čas	Počet cyklů	Měření fluorescence	
denaturace	95 °C	30 s	1		
amplifikace	denaturace	95 °C	5 s	45	
	annealing	59 °C	20 s		
	extenze	65 °C	30 s		FAM/ Cy5/JOE*
melting křivka (T <sub>m</sub> )	po 0,2 °C	64-95 °C	1 s		kontinuálně (Cy5)
chlazení	40 °C	1 min.			

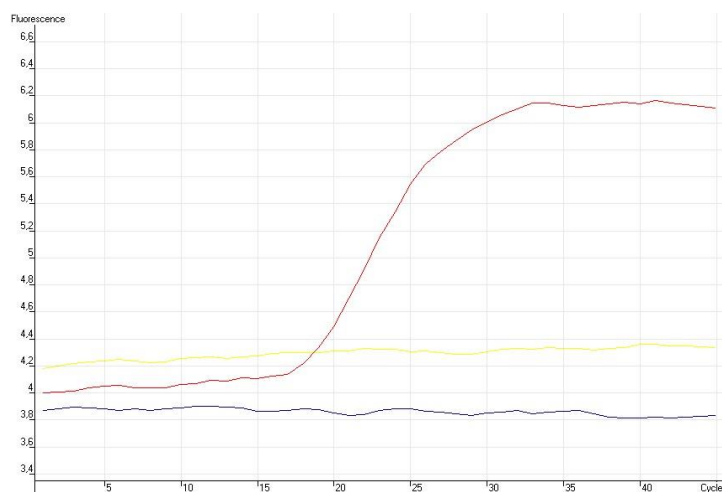
\* nastavení fluorescenčních kanálů: FAM – analýza vzorku, Cy5 – stanovení T<sub>m</sub>, JOE – analýza interní kontroly

Veškerou přípravu mixu provádíme vždy v PCR boxu, pracujeme v rukavicích neošetřených maskem. Do reakce je nutno vždy použít pozitivní kontrolu (cílová RNA), negativní kontrolu (jiná než cílová RNA) a NTC (vzorek bez RNA = No Template Control).

Po vložení vzorků do cykléru se provede dekontaminace PCR boxu UV světlem po dobu 20 min. Po ukončení analýz jsou vzorky dekontaminovány autoklávováním nebo 2% Persterilem.

### 2.3.6 Vyhodnocení analýzy

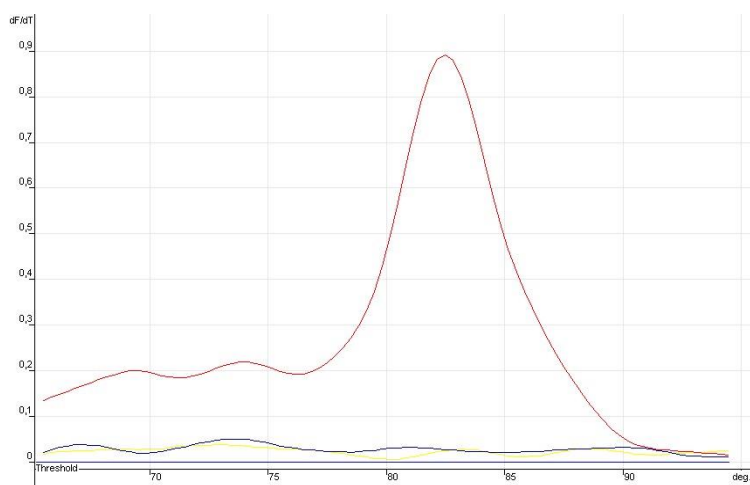
Za průkaz přítomnosti cDNA viru SARS ve vzorku je považován prokazatelný nárůst fluorescenčního signálu ve fluorescenčním kanálu FAM max. do 30. cyklu amplifikační reakce (Obr. 1),



■ pozitivní kontrola (virus SARS), resp. pozitivní terénní vzorek  
■ negativní kontrola (ostatní patogeny), resp. negativní terénní vzorek ■ negativní kontrola (voda)

Obr. 1: Nárůst fluorescence při průkazu specifické sekvence viru SARS

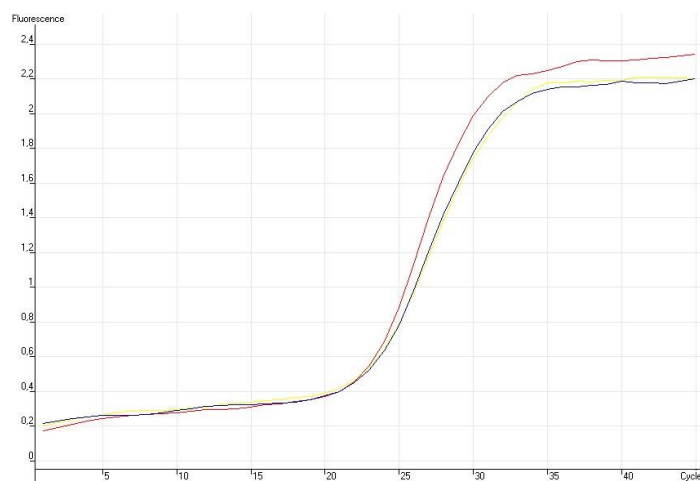
dále pak stanovení  $T_m$  (melting teploty) ve fluorescenčním kanálu Cy5 (Obr. 2). Specifická  $T_m$  pro amplifikovaný fragment je  $82,5 \pm 0,1$  °C.



■ pozitivní kontrola (virus SARS), resp. pozitivní terénní vzorek  
■ negativní kontrola (ostatní patogeny), resp. negativní terénní vzorek ■ negativní kontrola (voda)

Obr. 2: Stanovení  $T_m$  amplifikačních produktů (SYTO 61)

Inhibice reakce je vyloučena prokazatelným nárůstem fluorescenčního signálu interní kontroly ve fluorescenčním kanálu JOE (Obr. 3), především u negativních vzorků, včetně negativní kontroly. U pozitivních vzorků, resp. pozitivní kontroly nemusí být nárůst fluorescenčního signálu vždy zaznamenán z důvodu kompetice složek reakce.



■ pozitivní kontrola (virus SARS), resp. pozitivní terénní vzorek  
■ negativní kontrola (ostatní patogeny), resp. negativní terénní vzorek ■ negativní kontrola (voda)

Obr. 3: Nárůst fluorescence interní kontroly

### 2.3.7 Kontrola specificity

Specificita výše popsané metody byla ověřována na pozitivní kontrole (virus SARS, Virologický ústav SAV, Bratislava). Dále na panelu negativních kontrol, které zahrnovaly jak vybranou skupinu RA a VRA agens (vyjmenovaných ve vyhlášce č. 474/2002 Sb.<sup>2</sup>), tak další vybraná agens (Tab. VI). U pozitivní kontroly byl zaznamenán odpovídající nárůst fluorescenčního signálu. Při cross-species ověřování neodhalily testy amplifikaci jiného druhu nebo rodu.

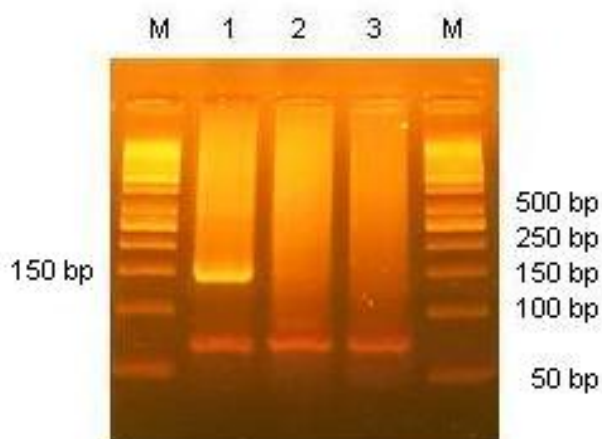
<sup>2</sup> Vyhláška, kterou se provádí zákon č. 281/2002 Sb., o některých opatřeních souvisejících se zákazem bakteriologických (biologických) a toxinových zbraní a o změně živnostenského zákona.

Tab. VI: Seznam RA a VRA patogenů testovaných v rámci ověřování specifity metody

<b>Patogen</b>	<b>Kmen</b>	<b>Patogen</b>	<b>Kmen</b>
Virus influenzy drůbeže	H5N1, 239	<i>Bacillus anthracis</i>	NCTC 10340T
Virus newcastleské choroby drůbeže	210 (Komarov)	<i>Escherichia coli</i>	3954
Virus žluté zimnice	D17	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	2737
Camelpox virus	538	<i>Enterobacter cloacae</i>	1903
Virus Vaccinia	SU016	<i>Francisella tularensis</i>	5540
Virus kravských neštovic	V-158 3723	<i>Kytococcus sedentarius</i>	2699
Virus australské encefalidity	506	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1960
Virus Dengue	189 TYP-1	<i>Yersinia enterocolitica</i>	CCM 5671
Virus encefalidity St.Louis	607	<i>Salmonella enterica subsp.</i>	3808
Virus horečky Kyasanurského lesa	SU028	<i>Shigella sonnei</i>	4421
Virus klíšťové encefalidity	521	<i>Brucella melitensis (biovar canis)</i>	1/74
Virus Powassan	M5	<i>Clostridium tetani</i>	18/50
Virus západní nilské horečky	31124	<i>Brucella melitensis</i>	5520 (abortus)
Virus žluté zimnice	D17	<i>Burkholderia mallei</i>	10248
Virus Chikungunya	636	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	10274
Virus venezuelské koňské	690 (H12/93)	<i>Clostridium botulinum</i>	5950
Virus Sindbis	SU014	<i>Salmonella typhi</i>	115/39
Virus Hazara	530	<i>Shigella dysenteriae I.</i>	13/41
Bovinní respirační syncytiální virus	V-362	<i>Vibrio cholerae</i>	71/89
Virus bovinní parainfluenzy 3	V-27	<i>Yersinia pestis</i>	5923
Bovinní adenovirus	V-294	<i>Coxiella burnetii</i>	SU001
Parvovirus prasat	V-196	<i>Rickettsia rickettsii</i>	SU001
Virus vrtivky	212	<i>Rickettsia canadensis</i>	
Sin Nombre virus	176, HN107	<i>Rickettsia conori</i>	
Rift Valley fever virus	559, H13/96	<i>Legionella pneumophila</i>	1030
Virus Hantaan	547, 76/118	<i>Xanthomonas campestris</i>	1/79
Crimean-Congo virus	SU019, Afg09-2990	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	5666
Puumala virus			
Dobrava - Belgrade virus	608		
Seoul	203		

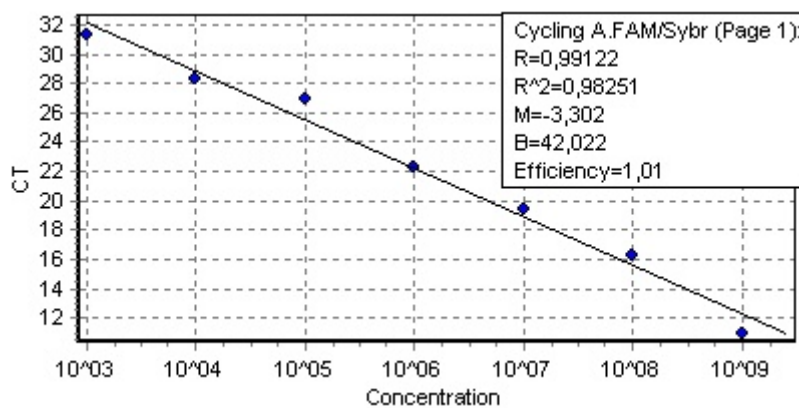
### 2.3.8 Validace a limity reakce

Ověření výsledků (určení specifity amplifikačních produktů) bylo provedeno na gelové elektroforéze odečtením délky specifického PCR produktu (151 bp) dle molekulového hmotnostního standardu 50 bp DNA Ladder (GeneRuler™ DNA Ladder Mix, Fermentas) (Obr. 4).



Obr. 4: Vyhodnocení specifity amplifikačních produktů pomocí gelové elektroforézy (dráhy zleva: M, molekulový hmotnostní standard (GeneRuler™ DNA Ladder Mix, Fermentas); 1, pozitivní kontrola (virus SARS), resp. pozitivní terénní vzorek; 2, negativní kontrola (ostatní patogeny), resp. negativní terénní vzorek; 3, negativní kontrola (dd H<sub>2</sub>O); M, molekulový hmotnostní standard viz výše.

Citlivost reakce byla zjištěna komparací koncentrace vzorku syntetické kontroly analyzovaného genu s izolátem RNA viru SARS o spektrometricky změřené koncentraci na základě standardní křivky, sestrojené z desítkového ředění DNA syntetické kontroly. Linearita reakce byla zjištěna v koncentračním rozpětí  $1 \times 10^9$  až  $1 \times 10^3$  kopií genu v reakci, koeficient korelace byl větší než 0,99 (Obr. 5).



Obr. 5: Standardní křivka analýzy dekadického ředění s uvedenými parametry reakce.

### 3 INOVAČNÍ ASPEKTY, NOVOST POSTUPŮ

Do doby zavedení této metodiky detekce a identifikace sledovaného biologického agens nebyla v Laboratoři biologického monitorování a ochrany (dále jen LBMO) Státního ústavu jaderné, chemické a biologické ochrany, v.v.i. (dále jen SÚJCHBO, v.v.i.) využívána žádná metoda pro detekci viru SARS. Vzhledem k tomu, že pro detekci tohoto viru nejsou dostupné komerční sety, bylo rozhodnuto o vývoji a zavedení vlastní metodiky detekce a identifikace viru SARS do laboratorní praxe LBMO SÚJCHBO, v.v.i.

Pro detekci byly navrženy, optimalizovány a ověřeny dosud nepublikované sekvence primerů, které byly vybírány se snahou zabránit případným falešně pozitivním a negativním výsledkům. Pro zajištění správnosti výsledků byla pro hodnocení reakce zahrnuta kombinace jak specifických primerů, tak fluorescenčně značené UPL sondy. Reakční podmínky pro diagnostický proces jsou navrženy tak, aby bylo možné provádět detekci většího počtu biologických agens uvedených na seznámech příloh vyhlášky č. 474/2002 Sb.<sup>3</sup> současně a tím výrazně zkrátit čas potřebný pro detekci těchto agens.

Dále lze u prezentovaného postupu detekce a identifikace viru SARS provést i dodatečnou sekvenaci amplifikovaných produktů a tím ověřit správnost výsledků PCR reakce.

---

<sup>3</sup> Vyhláška, kterou se provádí zákon č. 281/2002 Sb., o některých opatřeních souvisejících se zákazem bakteriologických (biologických) a toxinových zbraní a o změně živnostenského zákona.



#### **4 POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY**

Metodika byla vyvinuta jako hlavní analytický postup metodicko-odborné podpory laboratoře LBMO SÚJCHBO, v.v.i při plnění úkolů státního dozoru SÚJB v oblasti zákazu biologických zbraní pro zmíněné agens.

Metodika bude využívána pro potřeby dozoru nad dodržováním zákona č. 281/2002 Sb.<sup>4</sup>, konkrétně bude sloužit k průkazu přítomnosti genetického materiálu viru SARS ve vzorcích získaných při dozorové činnosti pracovníků SÚJB. Lze předpokládat, že by metodika mohla být rovněž využita k detekci a identifikaci viru SARS pro potřeby integrovaného záchranného systému v případech, kdy existuje podezření na přítomnost uvedeného agens v neznámých vzorcích (biologické tkáně, stěry, tzv. bílé prášky neznámého původu apod.).

---

<sup>4</sup> Zákon o některých opatřeních souvisejících se zákazem bakteriologických (biologických) a toxinových zbraní a o změně živnostenského zákona.

## 5 LITERATURA

Baltimore D. (1971) Expression of animal virus genomes. *Bacteriol Rev.* 1971 Sep;35(3):235-41.

Beneš, Jiří. (2009) *Infekční lékařství*. Praha: Galén, 2009. ISBN 978-80-7262-644-1.

Bustin S.A., Benes V., Garson J.A., Hellems J., Huggett J., Kubista M., Mueller R., Nolan T., Pfaffl M.W., Shipley G.L., Vandesompele J., Wittwer C.T. (2009): The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*, 55(4): 611-22.

Corman, V. M., Kallies, R., Philipps, H., Göpner, G., Müller, M. A., Eckerle, I., Brünink, S., Drosten, C. Drexler, J. F. *et al.* (2014). Characterization of a novel betacoronavirus related to middle East respiratory syndrome coronavirus in European hedgehogs. *Journal of virology*, 88(1), 717-24.

de Groot, R. J., Baker, S. C., Baric, R. S., Brown, C. S., Drosten, C., Enjuanes, L., Fouchier, R. A., Galiano, M., Gorbalenya, A. E., Memish, Z. A., Perlman, S., Poon, L. L., Snijder, E. J., Stephens, G. M., Woo, P. C., Zaki, A. M., Zambon, M., Ziebuhr, J. *et al.* (2013). Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV): announcement of the Coronavirus Study Group. *Journal of virology*, 87(14), 7790-2.

Gretebeck L.M. and Subbarao K. (2015): Animal models for SARS and MERS coronaviruses. *Curr Opin Virol.*, 13: 123-129.

Marra M.A., Jones S.J., Astell C.R. *et al.* (2003): The Genome sequence of the SARS-associated coronavirus. *Science*. 2003 May 30;300(5624):1399-404. Epub 2003 May 1.

McBride, R. *et* Burtram C. F. (2012) “The role of severe acute respiratory syndrome (SARS)-coronavirus accessory proteins in virus pathogenesis” *Viruses* vol. 4,11 2902-23. 7 Nov. 2012, doi:10.3390/v4112902

Ng M., Lee J., Leong M., *et al.* Topographic Changes in SARS Coronavirus–infected Cells during Late Stages of Infection. *Emerging Infectious Diseases*. 2004;10(11):1907-1914. doi:10.3201/eid1011.040195.

Poon L.L., Chan K.H., Wong O.K., Cheung T.K., Ng I., Zheng B., Seto W.H., Yuen K.Y., Guan Y., Peiris J.S. (2004): Detection of SARS coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome by conventional and real-time quantitative reverse transcription-PCR assays. *Clin Chem*. 2004 50(1): 67-72.

Rajčáni, J. a Čiampor, F. (2006). *Lekárska virológia*. VEDA, 2006, Bratislava.

Reusken C., Mou H., Godeke G.J., van der Hoek L., Meyer B., Müller M.A., Haagmans B., de Sousa R., Schuurman N., Dittmer U., Rottier P., Osterhaus A, Drosten C., Bosch B.J., Koopmans M. (2013): Specific serology for emerging human coronaviruses by protein microarray. *Euro Surveill.*, 18: 204-41.

Rota, P.A., Oberste, M.S., Monroe, S.S., Nix, W.A., Campagnoli, R., Icenogle, J.P., Penaranda, S., Bankamp, B., Maher, K., Chen, M.H., Tong, S., Tamin, A., Lowe, L., Frace, M., DeRisi, J.L., Chen, Q., Wang, D., Erdman, D.D., Peret, T.C., Burns, C., Ksiazek, T.G., Rollin, P.E., Sanchez, A., Liffick, S., Holloway, B., Limor, J., McCaustland, K., Olsen-Rasmussen, M., Fouchier, R., Gunther, S., Osterhaus, A.D., Drosten, C., Pallansch, M.A., Anderson, L.J., Bellini, W.J., 2003. Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *Science*. 2003 May 30; 300(5624): 1394–1399.

Sunwoo H.H., Palaniyappan A., Ganguly A., Bhatnagar P.K., Das D., El-Kadi A.O., Suresh M.R. (2013): Quantitative and sensitive detection of the SARS-CoV spike protein using bispecific monoclonal antibody-based enzyme-linked immunoassay. *J Virol Methods*, 187: 72-8.

Xu, J., Hu, J., Wang, J., Han, Y., Hu, Y., Wen, J., Li, Y., Ji, J., Ye, J., Zhang, Z., Wei, W., Li, S., Wang, J., Wang, J., Yu, J., Yang, H., *et al.* (2016). Genome organization of the SARS-CoV. *Genomics, proteomics & bioinformatics*, 1(3), 226-35.

Yang D., Leibowitz J.L. (2015): The structure and functions of coronavirus genomic 3' and 5' ends. *Virus Res.*, 206: 120-33.

Zhang S.L., Ma L.J., Tian G., Zhang L.Y., Zhang X.Y., Wang X.L. (2005): Conditions for SARS-CoV cultivation and inactivation. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi.*, 19: 135-7.

Zhao Z., Zhang F., Xu M., Huang K., Zhong W., Cai W., Yin Z., Huang S., Deng Z., Wei M., Xiong J., Hawkey P.M. (2003): Description and clinical treatment of an early outbreak of severe acute respiratory syndrome (SARS) in Guangzhou, PR China. *J Med Microbiol.*, 52: 715-20.