

Vytvořil:
SÚJCHBO, v.v.i.

Certifikovaná metodika

Označení metodiky:
B2/MOLB/064

**Průkaz přítomnosti genetického materiálu viru Ebola pro potřeby
kontroly zákazu biologických zbraní pomocí real-time PCR**

Ing. Karel Bílek, Ph.D.

Realizační výstup projektu MV ČR „Výzkum moderních metod detekce a identifikace nebezpečných CBRN látek a materiálů, metod snížení jejich nebezpečnosti a dekontaminace; výzkum moderních prostředků ochrany osob a prvků kritické infrastruktury“ číslo VF20112015013.

Oponenti: doc. RNDr. Daniel Růžek, Ph.D.
RNDr. Hana Kubátová, Ph.D.

říjen 2015

Obsah

| | |
|---------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. CÍL METODIKY | 3 |
| 2. VLASTNÍ POPIS METODIKY | 3 |
| 2.1 Charakteristika viru <i>Ebola</i> | 3 |
| 2.2 Laboratorní diagnostika viru <i>Ebola</i> | 4 |
| 2.3 Vlastní metoda | 4 |
| 2.3.1 Referenční vzorek viru | 5 |
| 2.3.2 Izolace RNA ze vzorku..... | 5 |
| 2.3.3 Reverzní transkripce | 6 |
| 2.3.4 qPCR..... | 6 |
| 2.3.5 Pracovní postup a opatření pro manipulaci s materiálem a kitem..... | 7 |
| 2.3.6 Vyhodnocení analýzy | 9 |
| 2.4 Validace a limity reakce..... | 9 |
| 3. INOVAČNÍ ASPEKTY, NOVOST POSTUPŮ..... | 13 |
| 4. POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY | 14 |
| 5. POUŽITÁ LITERATURA | 14 |

1. CÍL METODIKY

Hlavním cílem metodiky je poskytnout zejména inspektorům Státního úřadu pro jadernou bezpečnost (SÚJB) vhodnou metodu pro průkaz přítomnosti genetického materiálu viru *Ebola* ve vzorcích získaných při kontrole dodržování zákazu biologických zbraní.

Metodika se cíleně zaměřuje na:

- možnost detekce viru *Ebola* např. v neznámých terénních vzorcích;
- použitelnost pro široký rozsah vzorků;
- rychlou analýzu s jasnou interpretací výsledků pro zaškolený personál;
- možnost ověření positivity reakce sekvenací amplifikačních produktů (v případě nejasných výsledků reakce).

2. VLASTNÍ POPIS METODIKY

2.1 Charakteristika viru *Ebola*

Virus *Ebola* (EBOV) je taxonomicky zařazen do čeledi *Filoviridae*. Virus patří do skupiny hemoragických horeček, které způsobují onemocnění u lidí a některých primátů. Jde o typickou hemoragickou horečku, kde v klinickém obrazu dominuje horečka, vznik hemoragických petechií a krvácení do gastrointestinálního a urogenitálního systému. Letalita u nakažených osob dosahuje 50-90 %.

Virus *Ebola* je stočen do smyčky o délce cca 80 nm, která obsahuje téměř 19 tisíc nukleotidů. Zařazení viru dle struktury odpovídá RNA viru s jednovláknovou strukturou (-ssRNA) a negativní polaritou (Rajčáni *et* Čiampor, 2007). Genom viru kóduje sedm virových proteinů, konkrétně nucleoprotein (NP), phosphoprotein (VP35), matrix protein (VP40), glycoprotein (GP), replication-transcription protein (VP30), matrix protein (VP24), a polymerase (L) (Towner *et al.*, 2004). Napadení vnímavé buňky organismu, probíhá buď pinocytózou nebo Clathrin-zprostředkovanou endocytózou, kde virus vstupuje do buňky zprostředkovaně pomocí cholesterolového kanálu. Transkripční proces probíhá za využití transkripčního a translačního komplexu buňky, kde -ssRNA vlákno viru slouží jako templát pro syntézu nových molekul viru (Mühlberger, 2007).

V případě zneužití viru *Ebola* pro bioteroristický útok existuje předpoklad, že bude využito aerosolu jako nosného média. Možné zneužití viru *Ebola* by mohlo mít velice tragické následky a to z důvodů: u viru existuje interhumánní přenos a infekce virem vykazuje velmi vysokou smrtnost. Navíc, i když je aktuálně testováno několik vakcín a antivirotik proti

viru, tak zatím není žádný preparát registrovaný. Naopak proti zneužití viru hovoří např. tyto faktory: relativně nesnadná manipulace s virem, poměrně komplikované získání viru nebo relativně nízká odolnost/stabilita viru v prostředí. Nicméně výše popsané vlastnosti jsou fakta, díky kterým je virus zařazen do skupiny vysoce rizikových agens dle vyhlášky č. 474/2002 Sb.¹

2.2 Laboratorní diagnostika viru *Ebola*

Laboratorní diagnostika viru byla v případě prvních výskytů epidemie založena na imunofluorescenčních metodách. Imunofluorescence byla použita pro rychlou diagnostiku virové infekce, kde byla ale odhalena nízká citlivost metody (Johnson *et al.*, 1978; Towner *et al.*, 2004). Z toho důvodu byl do praxe zařazen molekulárně-genetický přístup k testování infekce resp. různé varianty PCR metody, které byly dostatečně senzitivní. Recentně je používána zejména tzv. RT- qPCR, která zajišťuje nejvyšší citlivost (Towner *et al.*, 2004). Kultivace viru se provádí na Vero buňkách.

Pro detekci viru je používána poměrně konzervativní oblast nukleoproteinu (NP). Nicméně dle posledních studií jak je uvedeno v Gire *et al.* (2014) je v případě použití této sekvence popsána nespecificita resp. falešně negativní výsledky u používaných testů. Zejména v případě aktuálně kolujícího viru, který v aktuální epidemii v roce 2014/2015 částečně zmutoval. Naneštěstí tato změna proběhla v cílových oblastech používaných testů (Gire *et al.*, 2014).

2.3 Vlastní metoda

Metoda je vyvinuta pro zpracování virové RNA izolované z vyšetřovaného vzorku, proto není vzorkování a izolace předmětem této metodiky. Metoda je založena na průkazu přítomnosti specifické sekvence kódující oblast NP viru.

Pro specifickou detekci přítomnosti virové RNA byly využity specifické primery, které byly porovnány s téměř 400 genomovými sekvencemi, které mj. zahrnovaly i celogenomové sekvence viru z aktuální epidemie ze Sierra Leone. Na základě analýzy byla zvolena sekvence detekující oblast genu NP a primery byly zvoleny tak, aby detekovaly EBOV Zaire (ZEBOV) a Sudan (SEBOV) a naopak nedetekovaly EBOV Reston, Cote d'Ivoire, ostatní původce hemoragických horeček nebo virových onemocnění. Navíc primery vymezují ve vnitřní

¹ 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.

sekvenci i vazebné místo pro Universal ProbeLibrary sondou (dále jen UPL, Roche Diagnostic GmbH, Německo). Současně je v reakční směsi i nespecifické interkalační barvivo třetí generace SYTO 61 (Invitrogen, USA). Vzhledem ke skutečnosti, že je detekce prováděna ve dvou oddělených fluorescenčních spektrech, byl pro analýzu zvolen cykler Rotor-Gene 6000 (CorbettResearch, Qiagen GmbH, Německo). Při reakci je amplifikován fragment o specifické délce 153 bp (ZEBOV), který obsahuje hybridizační místo pro UPL sondu. V případě detekce SEBOV je amplifikován fragment o shodné délce, ale reakce byla navržena jen pro kombinaci primerů a interkalačního barviva SYTO 61. Bezprostředně po PCR reakci následuje analýza teploty tání PCR produktu, která je prováděna prostřednictvím SYTO 61.

Materiál a zařízení nutné k provedení reakcí: provedení qPCR reakce bylo ověřeno na real-time PCR cykleru Rotor-Gene 6000, další spotřební materiál je PCR voda, PCR zkumavky popř. mikrozkušavky, mraznička, vortex, centrifuga, lednice, chladící bločky, dvě sady pipet (jedna sada pro izolaci a pipetování izolované RNA a jedna sada pipet pro pipetování reakční směsi). Metoda je popsána v souladu s minimálními požadavky pro publikace experimentů založených na kvantitativní real-time PCR (Bustin *et al.*, 2009).

2.3.1 Referenční vzorek viru

Referenční vzorek pro vývoj detekce bakterie byl získán z německé sbírky Bernhard Nocht Institute for Tropical Medicine, pod ozn. Ebola virus Zaire (typ Gabon 2003) resp. Ebola virus Sudan (typ Gulu), oba izoláty byly izolovány v roce 2010 a uchovány v -80 °C. Virus byl v německé laboratoři kultivován na Vero buňkách.

Pro určení koncentrace vzorku byla připravena syntetická kontrola viru (Invitrogen, USA).

2.3.2 Izolace RNA ze vzorku

K izolaci virové RNA ze vzorku lze použít komerčně dostupné izolační kity. Vzorek/vzorky virů hemoragických horeček byly dodány již izolované. Ostatní vzorky zahrnuté v metodice byly izolovány s použitím izolačního kitu RTP DNA/RNA Virus Mini Kit (STRATEC Biomedical AG, Německo). Izolace dle návodu výrobce. Izolovaná RNA je v případě potřeby uchována při teplotě -80 °C.

2.3.3 Reverzní transkripce

Pro reverzní transkripci byla vybrána rekombinantní reverzní transkriptáza M-MuLV s redukovanou aktivitou RNázy H a zvýšenou termostabilitou. V Tab. I jsou uvedeny složky reakční směsi vypočtené pro jednu reakci reverzní transkripce za použití kitu s vybranou reverzní transkriptázou - Protoscript II First Strand cDNA Synthesis Kit (E6560S; New England Biolabs, UK).

Tab. I: Složky reakční směsi pro reverzní transkripci.

| Složky reakční směsi | Množství (μl) |
|----------------------------------------|---------------|
| Protoscript II reakční mix (2x) | 10 |
| Protoscript II enzymový mix (10x) | 2 |
| Mix obsahující směs náhodných hexamerů | 2 |
| Izolovaná RNA | 6 |
| Celkový objem | 20 |

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. I byly proto smíchány a inkubovány při 25 °C 5 min, poté již probíhala reverzní transkripce při 42 °C 1 hod a nakonec 80 °C po dobu 5 min pro ukončení reakce. Pracovní i zásobní roztoky cDNA byly skladovány při -20 °C.

2.3.4 qPCR

Pro provedení reakce je použit qPCR Blue 2x Master mix (Top-Bio, ČR) číslo produktu: P521, P522, P523 a P523xl. Jedná se o kompletní mix reagentů nutných pro PCR. Mix se dlouhodobě skladuje při -20 °C, ale je možné i krátkodobé skladování maximálně však dva týdny při 4 °C.

Sekvence primerů použitých v protokolu:

ZEBOVF138: 5'-CTAAGATCACARGGGCCATTT-3'

ZEBOVR138: 5'-CATRGCCTCTTTTTTCAGTGAG-3'

SEBOVF138: 5'-CTAAAAACACAGGGTCCATTTG-3'

SEBOVR138: 5'-TAAGGCCTCCTTCTCACTCAAC-3'

Sekvence použité UPL sondy č. 138: 5'-ATCCACCA-3'

2.3.5 Pracovní postup a opatření pro manipulaci s materiálem a kitem

Při pracovních operacích vždy používat ochranné rukavice. Provádět veškeré operace při přípravě PCR mixu v PCR boxu. Pro každé vyšetření využívat systému pozitivní kontroly (cílová RNA/cDNA), negativních kontrol tj. jiná než cílová RNA/cDNA a NTC (z angl. No Template Control) tj. vzorek bez nukleových kyselin.

- a) Přemístit potřebné roztoky, případně vzorek RNA z mrazicího boxu (cca 10-15 min. před započítáním práce) do lednice (pozwolné rozmražení v temnu), vyhnout se opakovanému rozmrazování, které může vést ke snížené senzitivitě.
- b) Připravit pro detekci potřebné množství PCR mixu (násobky objemu) ve složení ze zásobních roztoků dle Tab. II a vložit roztoky do chladicího stojánku. Zásobní roztoky vrátit zpět do mrazicího boxu nebo lednice.

Tab. II: Složky reakční směsi včetně příkladu kalkulace pro jednu reakci.

| Složky reakční směsi | Množství (μl) |
|-----------------------------------------------------|---------------|
| PCR voda | 4,2 |
| qPCR Blue 2x Master Mix | 10 |
| ZEBOVF138 (10 μM) | 0,5 |
| ZEBOVR138 (10 μM) | 0,5 |
| SEBOVF138 (10 μM) | 0,5 |
| SEBOVR138 (10 μM) | 0,5 |
| Universal ProbeLibrary sonda #138 (10 μM) | 0,3 |
| SYTO 61 (50 μM) | 0,5 |
| Vzorek nebo + nebo - kontrola a nebo NTC (viz výše) | 3 |
| Celkový objem | 20 |

- c) Mix promíchat pipetováním. Následně rozpipetovat po 17 μl do potřebného množství zkumavek.

- d) Do zkumavek s PCR mixem označených „studovaný vzorek“ přidat 3 µl zkoumané DNA.
- e) Do zkumavky s PCR mixem označené „pozitivní kontrola“ přidat 3 µl izolované RNA/cDNA referenčního vzorku.
- f) Do zkumavky s PCR mixem označené „negativní kontrola“ přidat 3 µl jiného vzorku (jiného agens než je cílový virus/vzorek).
- g) Do zkumavky s PCR mixem označené „NTC“ přidat 3 µl PCR vody.
- h) Zkumavky uzavřít víčky (pracovat sterilně), vložit do přístroje a spustit program, reakční podmínky zadat pro kanály Green a Red viz Tab. III.
- i) Výsledky uložit a zálohovat do patřičného adresáře. Název souboru a cestu k souboru zapsat do protokolu.
- j) Použité laboratorní pomůcky (pipety) ponechat v pracovním boxu pro následnou dekontaminaci, použitý spotřební materiál odložit do plastového boxu a následně likvidovat odpovídajícím způsobem (spalovna).

Tab. III: Popis nastavení cykleru a podmínek PCR reakce.

| Program | | Teplota | Čas | Počet cyklů | Měření fluorescence |
|-------------|------------|-----------|--------|-------------|---------------------|
| Denaturace | | 94 °C | 1 min. | 1 | |
| Amplifikace | Denaturace | 94 °C | 20 s | 40 | |
| | Annealing | 60 °C | 20 s | | každý cyklus: G* |
| | Extenze | 72 °C | 20 s | | každý cyklus: R* |
| Stabilizace | | 60 °C | 90 s | 1 | |
| Melting | | po 0,2 °C | 3 s | 60-95 °C | kontinuálně: R* |
| Chlazení | | 40 °C | 1 min. | | |

* Nastavení fluorescenčního kanálu:

G = Green (např. FAM, SYBR Green I)

R = Red (např. Cy5, Alexa Fuor 633)

2.3.6 Vyhodnocení analýzy

Za průkaz přítomnosti RNA viru *Ebola* ve vzorku je považován prokazatelný nárůst fluorescenčního signálu v Green fluorescenčním spektru pro ZEBOV viz Obr. 1. Pro případ přítomnosti RNA/cDNA vzorku obsahujícím SEBOV je považován prokazatelný nárůst fluorescenčního signálu v Red fluorescenčním spektru. Pro ZEBOV i SEBOV je hodnocena specifická teplota tání PCR produktu (tzv. melting teplota) viz Tab. IV a Obr. 2.

Tab. IV: Specifická melting teplota pro amplifikovaný fragment.

| Detekovaný gen <i>NP</i> | Specifická melting teplota PCR produktu |
|--------------------------|-----------------------------------------|
| ZEBOV | $80 \pm 0,2 \text{ } ^\circ\text{C}$ |
| SEBOV | $80,5 \pm 0,2 \text{ } ^\circ\text{C}$ |

2.4 Validace a limity reakce

Ověření výsledků bylo provedeno na gelové elektroforéze, odečtením délky specifických PCR produktů dle velikostního markeru O'GeneRuler 50 bp DNA Ladder (Fermentas, ThermoFisher Scientific, USA). Pro vyloučení falešně pozitivního výsledku byla provedena kontrola s vybranými mikroorganismy, viry viz Tab V., VI kde nebyla potvrzena falešně pozitivní detekce.

Dále byla specifita a robustnost reakce ověřena na simulovaných terénních vzorcích (sušené mléko, pšeničná mouka, prášek do pečiva, moučkový cukr, prach, prací prášek, křída, pyl, motorový olej a nafta). Práškové vzorky byly připraveny v koncentraci 10 mg/ml a před reakcí byly smíchány v poměru 1:1 s kontrolním vzorkem RNA v závislosti na použitém objemu reakce. Reakce byla pozitivní u všech simulací s výjimkou směsného vzorku drcené křídly.

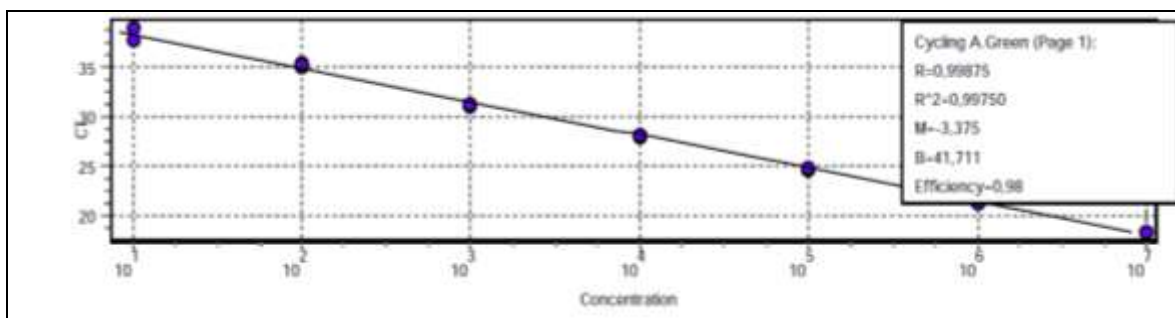
Tab. V: Seznam testovaných patogenů v rámci ověřování specifity metodiky.

| Bakterie | Kmen |
|--------------------------------------------|-----------|
| <i>Bacillus anthracis</i> | 10340T |
| <i>Bacillus cereus</i> | 2010T |
| <i>Bacillus subtilis</i> | 5615T |
| <i>Bartonella quintana</i> | 103739 |
| <i>Brucella melitensis abortus</i> | 5660T |
| <i>Brucella melitensis melitensis</i> | 5659T |
| <i>Brucella melitensis ovis</i> | 6741T |
| <i>Brucella melitensis suis</i> | 6073T |
| <i>Brucella microti</i> | 4915 |
| <i>Burkholderia glathei</i> | 2741T |
| <i>Burkholderia mallei</i> | 12938T |
| <i>Burkholderia pseudomallei</i> | 12939T |
| <i>Clostridium botulinum</i> | 5950T |
| <i>Clostridium botulinum</i> | 5944T |
| <i>Clostridium perfringens</i> | 5744T |
| <i>Clostridium tetani</i> | 18/50 |
| <i>Coxiella burnetii</i> | SU032 (1) |
| <i>Enterobacter cloacae</i> | 1903 |
| <i>Escherichia coli</i> | 6859T |
| <i>Francisella novicida</i> | 6041 |
| <i>Francisella tularensis</i> | 5540T |
| <i>Chlamydomphila psittaci</i> | 27007 |
| <i>Kytococcus sedentarius</i> | 314T |
| <i>Legionella pneumophila</i> | 7371T |
| <i>Mycobacterium bovis</i> | 5034 |
| <i>Mycobacterium tuberculosis</i> | 7301T |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 1960T |
| <i>Rickettsia rickettsii</i> | SU005 |
| <i>Salmonella enterica subsp. enterica</i> | 7933T |
| <i>Salmonella typhi</i> | 7028T |
| <i>Shigella dysenteriae I.</i> | 13/41 |
| <i>Shigella sonnei</i> | 4421 |
| <i>Staphylococcus haemolyticus</i> | 2737T |
| <i>Vibrio cholerae</i> | 7254T |
| <i>Xanthomonas campestris</i> | 1/79 |
| <i>Yersinia enterocolitica</i> | 5671 |
| <i>Yersinia pestis</i> | 5923T |
| <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> | 22/90T |

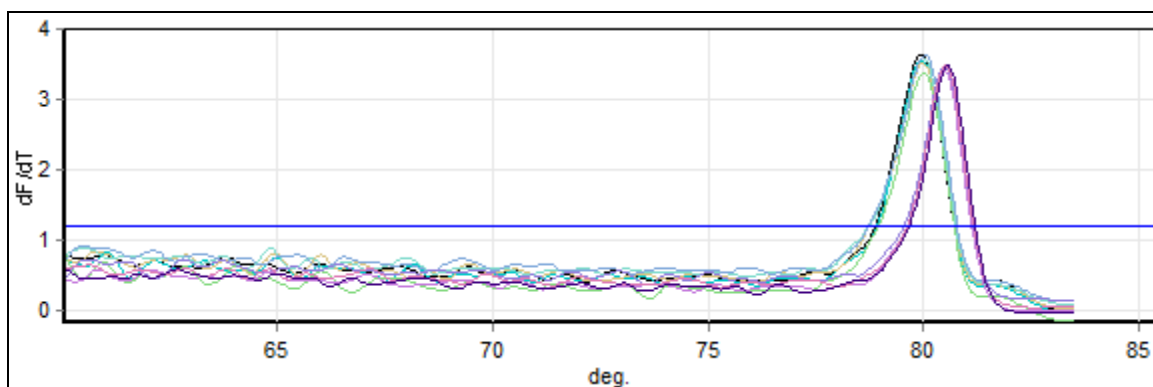
Tab. VI: Seznam testovaných virů v rámci ověřování specifity metodiky.

| Virus | Kmen/ozn. |
|--------------------------------------------|-----------------|
| Bovinní respirační syncytiální virus | Antanovo 448/82 |
| Virus Bhanja | M22 |
| Virus bovinní parainfluenzy 3 | R2-V |
| Virus bovinní virové diarrhoey | Oregon C 24 V |
| Virus Dobrava | NCPV H119/99 |
| Virus Guanarito | BNI SU036 |
| Virus Hazara | NCPV 530 |
| Virus horečky Lassa | BNI Josiah |
| Virus horečky údolí Rift | NCPV H13/96 |
| Virus Chikungunya | NCPV 636 |
| Virus influenzy drůbeže | Chicken-scot/59 |
| Virus Junin | BNI XJ |
| Virus katarální horečky ovčí | T-956 |
| Virus Kemerovo | KEB1 |
| Virus krymžsko-koňské hemoragické horečky | BNI Afg09-2990 |
| Virus Machupo | BNI Carvallo |
| Virus Marburg | BNI Popp |
| Virus Mopeia | NCPV M-152 |
| Virus Newcastleké choroby drůbeže | Komarov |
| Virus Oropouche | NCPV 1409261v |
| Virus Pappataci, Sandfly | M47 |
| Virus Puumala | NCPV 705 |
| Virus Sabia | BNI SPH114202 |
| Virus Seoul | NCPV R22 |
| Virus Sin Nombre | NCPV HN107 |
| Virus Sindbis | SU014 |
| Virus Tribeč | SU013 |
| Virus venezuelské koňské encefalomyelitidy | NCPV H12/93 |
| Virus východní koňské encefalomyelitidy | NCPV H178/99 |

Citlivost reakce byla stanovena tzv. LOD (z ang. *Limit Of Detection*) na úroveň 200 kopií cílové sekvence na reakci. Citlivost reakce byla zjištěna komparací koncentrace vzorku syntetické kontroly s izolátem virové RNA. Vzorek izolátu byl ověřen pro koncentrace 1×10^7 až 2×10^2 kopií v reakci. Koeficient korelace u standardní křivky byl větší než 0,99, efektivita reakce dosahovala hodnoty 98 % v případě UPL sondy.



Obr. č. 1: Výsledky ověření skutečné citlivosti metodiky, metoda vykazuje dynamické rozpětí až na úroveň 7 log – 1×10^7 až 1×10^1 (provedeno pomocí syntetické kontroly) pro UPL sondu č. 138 měřenou v kanálu Green.



Obr. č. 2: Grafické znázornění PCR produktu specifické teploty tání ZEBOV 80 °C a SEBOV 80,5 °C. Na ose y je uveden poměr fluorescence pozadí a generovaného signálu, osa x teplota ve stupních Celsia.

3. INOVAČNÍ ASPEKTY, NOVOST POSTUPŮ

Do doby zavedení této metodiky detekce a identifikace sledovaného biologického agens byla 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.) teoreticky využívána jen kultivace viru. Tato metoda je relativně zdlouhavá a navíc hrozí významné riziko pro personál nebo kontaminace laboratoře při manipulaci se vzorkem.

Vzhledem ke skutečnosti, že na pracovišti nebyla dosud zavedena detekce na RT-qPCR technologii, neexistovala zde ani možnost kvantifikace vzorku. Na základě těchto skutečností bylo rozhodnuto o vývoji a zavedení nové metodiky detekce viru *Ebola* 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 dvou rozdílných detekčních systémů. První z nich byl založen na využití modifikované TaqMan sondy, kterou lze díky semi-specifické sekvenci využít i pro další metodiky. Sonda obsahuje tzv. uzamčené nukleotidy (Letorra *et al.*, 2003), které umožňují syntézu krátkého oligonukleotidu, který má ovšem stejnou melting teplotu, jako konvenční TaqMan sonda. Druhý systém využíval pro verifikaci výsledků interkalační barvu SYTO 61 patřící do tzv. třetí generace interkalačních barviv, která umožňuje oproti první generaci interkalačních barviv daleko přesnější analýzu teploty tání PCR produktu (Bustin *et Nolan*, 2004). Využití semi-specifické sondy v kombinaci s ověřením amplikonu teplotou tání PCR produktu je zajištěna kvalitní verifikace výsledků. Výhodou výše popsaného systému detekce je, že lze jak semi-specifickou sondu, tak i interkalační barvu použít v kombinaci s jiným párem primerů pro detekci jiných agens nebo další PCR analýzy.

Reakční podmínky pro diagnostický proces jsou navrženy tak, aby bylo možné provádět detekci většího počtu biologických agens uvedených na seznamech příloh vyhlášky č. 474/2002 Sb.² současně a tím výrazně zkrátit čas potřebný pro detekci těchto agens.

V porovnání s komerčními soupravami lze u této metody detekce a identifikace *C. psittaci* provést dodatečnou kontrolu výsledků amplifikace sekvencí amplifikovaných produktů a tím dodatečně ověřit jejich správnost.

² 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.³, konkrétně bude sloužit k průkazu přítomnosti genetického materiálu viru *Ebola* ve vzorcích získaných při dozorové činnosti pracovníků SÚJB. Lze předpokládat, že by metodika mohla být rovněž využita k detekci viru 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.).

5. POUŽITÁ LITERATURA

Bustin S.A., Nolan T. (2004). Pitfalls of Quantitative Real-Time Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction. *J Biomol Tech.*, 2004, 15, 155-166 p.

Bustin S.A., Benes V., Garson J.A., Hellemans 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. *Clinical Chemistry* 55:4

Gire S.K. *et al.* (2014). Genomic surveillance elucidates Ebola virus origin and transmission during the 2014 outbreak. *Science* 12 September 2014: 345 (6202), 1369-1372.

Johnson K.M., Webb P.A., Heymann D.L. (1978). Evaluation of the plasmapheresis program in Zaire, p. 213–216. In S. R. Pattyn (ed.), *Ebola virus hemorrhagic fever*. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, The Netherlands.

Latorra D., Arar K., Hurley J.M. (2003). Design considerations and effects of LNA in PCR primers. *Mol Cell Probes*. 2003 Oct;17(5):253-9.

Mühlberger E. (2007). Filovirus replication and transcription. *Future Virol*. 2007 Mar;2(2):205-215.

Rajčáni, J. et Čiampor, F. (2006). Čel'ad' Flaviviridae, s. 435-452. . VEDA, Bratislava, ISBN: 80-224-0911-1.

Towner J.S., Rollin P.E., Bausch D.G., Sanchez A., Crary S.M., Vincent M., Lee W.F., Spiropoulou C.F., Ksiazek T.G., Lukwiya M., Kaducu F., Downing R., Nichol S.T. Rapid diagnosis of Ebola hemorrhagic fever by reverse transcription-PCR in an outbreak setting and assessment of patient viral load as a predictor of outcome. *J Virol*. 2004 Apr;78(8):4330-41.

³ Zákon o některých opatřeních souvisejících se zákazem bakteriologických (biologických) a toxinových zbraní a o změně živnostenského zákona.