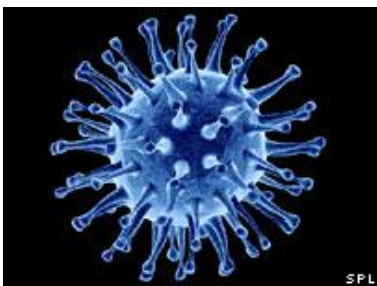


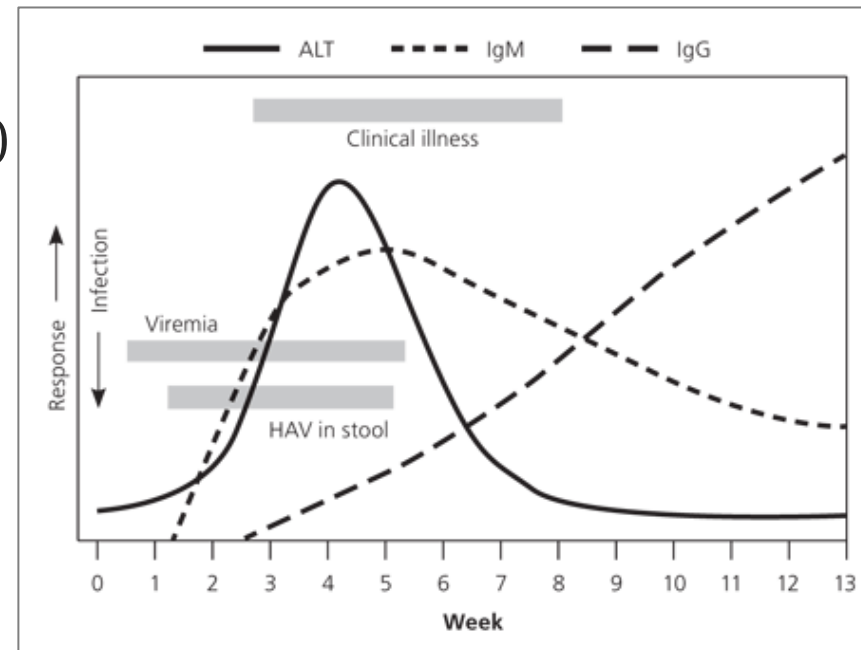
Metody detekce virů v potravinách a prostředí



Petra Vašíčková
pvasickova@sci.muni.cz

Metody detekce

- **Průkaz protilátek (IgM, IgG)** – komerčně dostupné soupravy
- **Přímý průkaz viru (RT-PCR, RT-qPCR)**
 - Stolice, sérum
 - Kladen důraz na včasný odběr vzorku, řádné skladování/transport
 - RT-qPCR možno použít ke stanovení virové nálože ve vzorku
 - RT-PCR - analýza sekvencí
(nástroj molekulární epidemiologie)



(Cristina and Costa-Mattioli, 2007)

Metody detekce – přímý průkaz viru

- **Infekce prasat či jiných experimentálních zvířat (opice, prase domácí, myš, tarbík, králík, potkan, kosman)**
- Klinické příznaky – opice, vysoká infekční dávka
- Bez klinických příznaků – vylučování viru trusem, viremie a/nebo serokonverze

Metody detekce – přímý průkaz viru

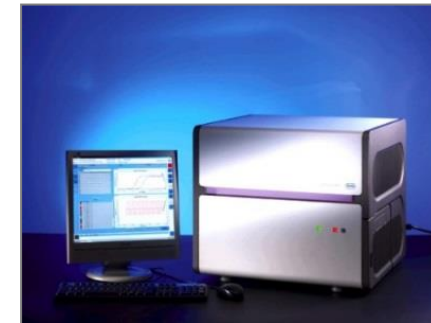
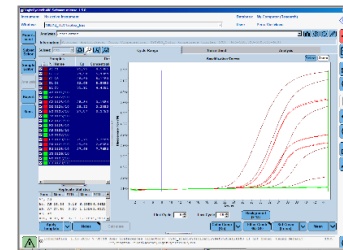
- **Buněčné kultury** – buněčné linie lidského karcinomu jater (PLC/PRF/5, HepG2/C3A), karcinomu plic (A549)
- **Ve většině případů bez cytopatického efektu - RT-qPCR, immunofluorescence**
- 2D × 3D formát
- **Není standardizováno**

Metody průkazu virů v potravinách a prostředí

- Problémové kultivace virů na tkáňových kulturách → metody založeny na přímém průkazu genomu viru
- V potravinách či prostředí malé množství virových částic → potřeba dostatečně citlivé metody

• RT-qPCR

• ISO/TS 15216



Metody průkazu virů v potravinách a prostředí

- „Komplikovaný“ proces analýzy vzorku → zavedení externí kontroly celé analýzy

- Bakteriofág MS2 - do genomu vložena unikátní sekvence (vakovlk tasmánský a pták moa)
- Kontrola celého postupu analýzy každého vzorku (přidáno definované množství)
- Stanovení účinnosti izolace NK – kvantifikace virové nálože v definovaném množství vzorku

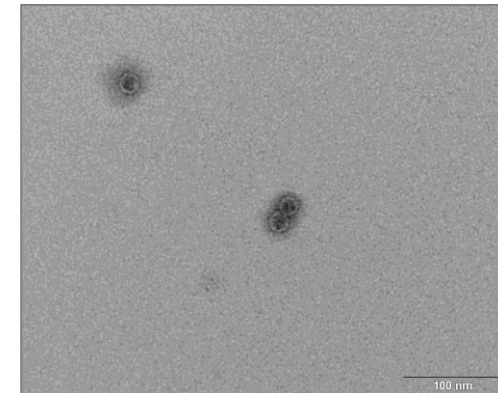
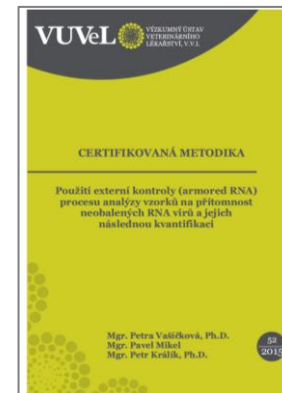


Foto H. Malenovská

Postup zpracování vzorků v laboratoři

Homogenizace

(Stomacher/vytřepávání
v TGBE)



Centrifugace

8 000 x g
20 min
4°C

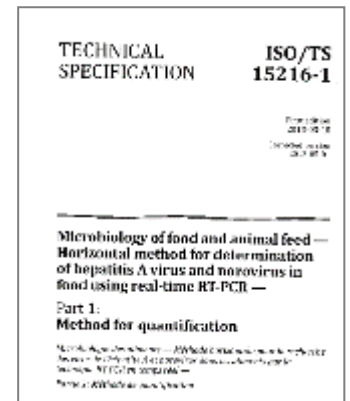
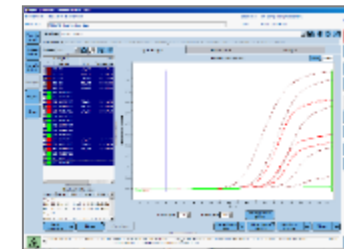


Peleta

Bakterie, parazité
Detekce DNA (qPCR)
Kultivace

Supernatant

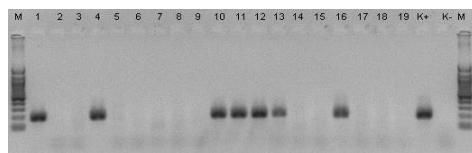
Viry
Detekce RNA (RT-qPCR)



Vyšetření vzorků



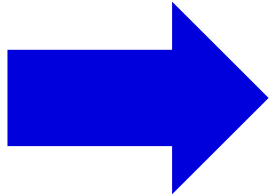
Izolace RNA



Nested RT-PCR

Sekvenování

Analýza sekvencí

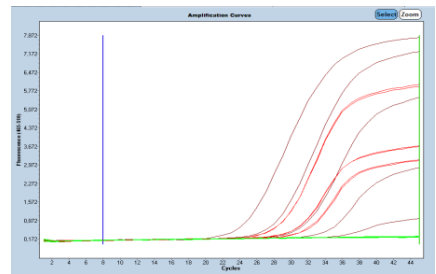
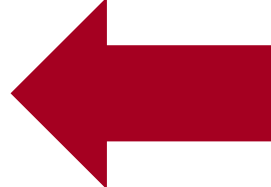


TqRT-PCR



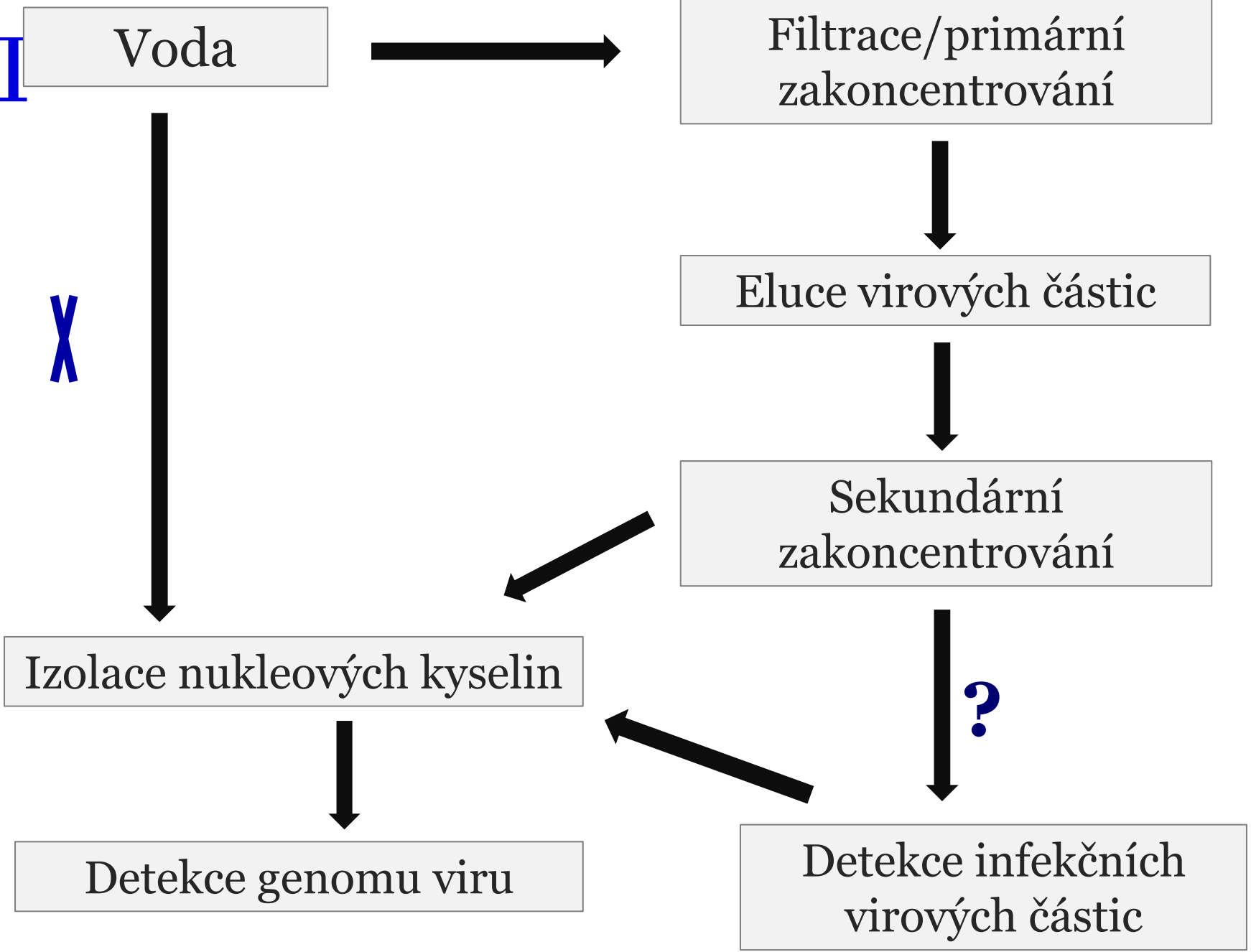
+

-



Genotypizace
Epidemiologické × epizootologické studie

M U N I
S C I

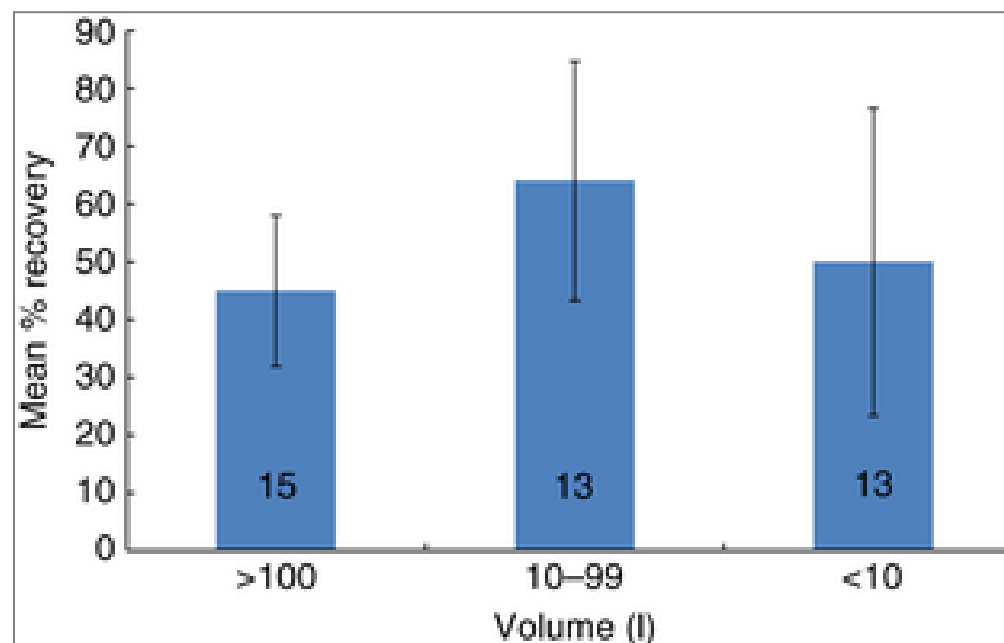


X

?

Odběr vzorku

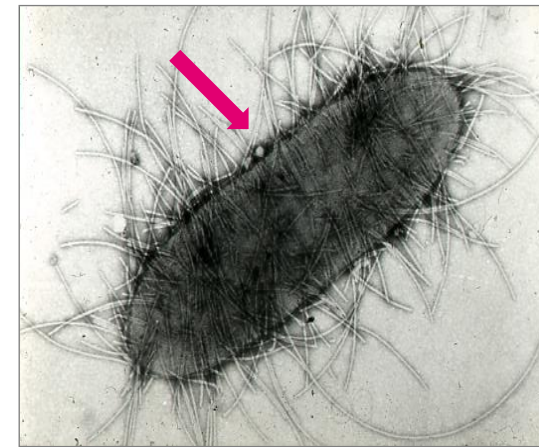
- Čistý kanystr/nádoba
- Objem vzorku 10 l, možnost i menší objemy (200 ml)
- Vzorek skladovat v temnu a chladu
- Transport do laboratoře (chlazené) nejlépe do 24 hod od odběru



(Cashdollar and Wymer, 2013)

Izolace virových částic z vody

- **Adsorpce na negativně nabitě filtry**
(Millipore)
 - 10 l
 - Limit detekce 100 000 virových částic
(10 000/l)
- **Přímá flokulace**
 - 200 ml
 - Limit detekce 10 000 virových částic
(50 000/l)



Průkaz viru ve vzorku

- Molekulární metody - qPCR, RT-qPCR
 - Kvantifikace – DNA/RNA koncentrační gradient
 - Problém s falešně negativními výsledky – inhibiční faktory (interní amplifikační kontrola, analýza ředěné NK)
- RT-PCR (molekulární epidemiologie/epizootologie)
- Problém rozlišit infekční × neinfekční virové částice

