

Detekce rotaviru A (RVA) ve vzorcích odpadních vod

1. Extrakce RNA

Celková RNA byla extrahována ze 100 µl odpadní vody (dodaný vzorek) pomocí TRI Reagent (Sigma, St. Louis, Mo, USA) podle pokynů výrobce. Výsledná RNA byla rozpuštěna ve 100 µl dH₂O.

2. RT-qPCR

Pro detekci rotaviru A byl zvolen genový segment *NSP3* kódující nestrukturní protein NSP3 lokalizovaný v cytoplasmě infikovaných buněk. Gen *NSP3* je geneticky konzervovaný a představuje stabilní cíl pro detekci rotavirů A.

Reverzně-transkripční kvantitativní PCR byla provedena na přístroji Roche LightCycler 480 za použití kitu Luna Universal Probe One-Step RT-qPCR Kitu (New England Biolabs, USA) podle pokynů výrobce. Použité primery a proba viz Moutelíková a kol. (2018).

Kvantifikace RVA ve vzorcích odpadní vody byla provedena za použití standardu, kterým byla kultura RVA (kmen OSU) dříve kvantifikovaná metodou počítání virových částic v zorném poli transmisního elektronového mikroskopu (Malenovska, 2013).

3. Výsledky kvantifikace

	Cp	Počet vir. částic v 1 µl vzorku
Vzorek č. 1 (před filtrací)	29,08	$1,69 \times 10^3$
Vzorek č. 2 (před filtrací)	29,24	$1,51 \times 10^3$
Vzorek č. 3 (po filtraci)	-	nedetekováno
Vzorek č. 4 (po filtraci)	-	nedetekováno
Negativní kontrola	-	nedetekováno

Počet virových částic je stanoven v 1 µl zasláního vzorku, který byl ve vaší laboratoři zakoncentrován. Původní koncentraci v surové odpadní vodě je nutno přepočítat.

Moutelíková, R.; Dvořáková Heroldová, M.; Holá, V.; Sauer, P.; Prodělalová, J. Human rotavirus A detection: Comparison of enzymatic immunoassay and rapid chromatographic test with two quantitative RT-PCR assays. *Epidemiol. Mikrobiol. Imunol.* **2018**, 67, 110–113.

Malenovska, H. Virus quantitation by electron microscopy, TCID₅₀, and the role of timing virus harvesting: A case study of three animal viruses. *J. Virol. Methods* **2013**, 191, 136-140.

11. 11. 2019

Jana Prodělalová

VÝZKUMNÝ ÚSTAV
STÁTNÍHO LÉKAŘSTVÍ, v.v.i.
diagnostika
Hudcova 70