

**M A S A R Y K O V A
U N I V E R Z I T A**

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Dizertační práce

JAKUB HRDÝ

Brno 2022

**M A S A R Y K O V A
U N I V E R Z I T A**

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

**Vývoj a validace multiplexní
technologie xMAP pro detekci
a kvantifikaci patogenních virů
v prostředí**

Dizertační práce

JAKUB HRDÝ

Vedoucí práce: Mgr. Petra Vašíčková, Ph.D.

Ústav experimentální biologie

Brno 2022

Bibliografický záznam

Autor:	Mgr. Jakub Hrdý Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita Ústav experimentální biologie
Název práce:	Vývoj a validace multiplexní technologie xMAP pro detekci a kvantifikaci patogenních virů v prostředí
Studijní program:	PřF D-MIKR_ Mikrobiologie, doktorský studijní program
Vedoucí práce:	Mgr. Petra Vašíčková, Ph.D.
Akademický rok:	2021/2022
Počet stran:	58
Klíčová slova:	virus; izolace nukleových kyselin; detekce; multiplexní; xMAP; viry kontaminující potraviny; viry kontaminující vodní zdroje

Bibliographic Entry

Author: Mgr. Jakub Hrdý
Faculty of Science, Masaryk University
Department of Experimental Biology

Title of Thesis: Development and validation of multiplex xMAP technology for detection and quantification of pathogenic viruses in the environment

Degree programme: PřF D-MIKR_ Microbiology, doctoral degree programme

Supervisor: Mgr. Petra Vašíčková, Ph.D.

Academic Year: 2021/2022

Number of Pages: 58

Keywords: virus; isolation of nucleic acids; detection; multiplex; xMAP; foodborne viruses, waterborne viruses

Abstrakt

Se stále postupujícím technologickým vývojem a rozvojem moderní společnosti narůstají i požadavky na zajištění dostatečného množství kvalitních a bezpečných potravin, vodních zdrojů a celkové bezpečnosti prostředí, ve kterém žijeme. I přes dostupné pokročilé technologie stále existují určitá rizika, která se pojí s jejich potenciální kontaminací patogenními agens. Přispívají k tomu procesy globalizace a i v současnosti populární trend konzumace čerstvých a minimálně opracovaných potravin. V případě prostředí budou v budoucnosti navíc hrát stále podstatnější roli i probíhající klimatické změny. Po dlouhou dobu byla věnována pozornost především bakteriálním patogenům. Tento přístup se však rychle mění a větší pozornost se obrací i na viry a parazity, jakožto významná agens, jejichž socioekonomický dopad a dopad na zdraví populace může být značný. Aby bylo možné monitorovat výskyt kontaminací a včasné identifikovat původce v případě vypuknutí epidemií, je zapotřebí mít dostupné spolehlivé nástroje detekce. Ty musí splňovat požadavky dostatečné citlivosti a specifity. Tato práce se zabývá problematikou detekce virových agens ze vzorků potravin, vod a prostředí. Zlatým standardem detekce virových částic (resp. specifických oblastí jejich genomu) jsou v současnosti metody polymerázové řetězové reakce probíhající v reálném čase. Na pracovišti Výzkumného ústavu veterinárního lékařství, v.v.i. jsou zavedeny a využívány pro detekci virových agens v humánních a zvířecích vzorcích nebo ve vzorcích potravin, vod či prostředí. V kombinaci s metodami pro prvotní zpracování vzorků, které většinou musí být cíleny přímo na konkrétní matrice, byly využity pro získání dat, díky kterým vznikla řada publikací, které jsou součástí této práce. Používané metody polymerázové reakce probíhající v reálném čase mají však také své limity. Jednou z nejvýraznějších je omezená možnost vytvářet robustnější multiplexní systémy. Pro identifikaci vícera patogenů je tak zapotřebí použití několika individuálních systémů. Cílem této práce proto bylo vyvinout a validovat metodu využívající multiplexní oligonukleotidovou ligaci s polymerázovou řetězovou reakcí v kombinaci s technologií xMAP, a tak překonat omezení současných metod. V rámci vývoje vzniklo několik aplikovaných výsledků zaměřených na detekci nejen virových patogenů. Byla zavedena a mezilaboratorními testy i ověřena robustní metoda detekce s dostatečnou specifitou a citlivostí, která má potenciál stát se spolehlivým rutinním nástrojem pro monitoring a kontrolu bezpečnosti potravin a prostředí.

Abstract

With the ever-advancing technological progress and the development of modern society, the requirement to ensure sufficient amount of quality and safe food, water resources and the overall safety of the environment in which we live is also growing. Despite the available advanced technologies, there are still certain risks associated with their potential contamination with pathogenic agents. The processes of globalization and the currently popular trend of consuming fresh and minimally processed food contribute to this issue. In the case of the environment, ongoing climate changes will also play an increasingly important role in the future. For a long time, attention was paid mainly to bacterial pathogens. However, this approach is changing rapidly and more attention is being paid to viruses and parasites, as important agents whose socio-economic and health impact on the population can be considerably significant. Reliable detection tools are needed to monitor the incidence of contamination and to identify the cause of epidemics in a timely manner. These must meet the requirements of sufficient sensitivity and specificity. This thesis deals with the detection of viral agents from food, water and environmental samples. Real-time polymerase chain reaction methods are currently the “gold standard” for virus particle (i.e. specific regions of their genome) detection. These methods are established and used in the laboratories of the Veterinary Research Institute, v.v.i. for the detection of viral agents in human, animal, food, water or environmental samples. Together with the methods for the initial processing of samples, which usually have to be targeted at specific matrices, they were used to obtain data, which resulted in a number of publications that are part of this dissertation. However, the real-time polymerase reaction methods also have their limitations. One of the most significant is the limited ability to create more robust multiplex systems. Hence, the use of several individual systems is required to identify multiple pathogens. The main aim of this thesis was to develop and validate a method using multiplex oligonucleotide ligation with polymerase chain reaction in combination with xMAP technology, and thus overcome the limitations of current methods. During the development, several applied results focused on the detection of not only viral pathogens were created. A robust detection technique with sufficient specificity and sensitivity has been introduced and verified by inter-laboratory tests, this method has the potential to become a reliable routine tool for monitoring and control of food and environmental safety.

Poděkování

Na tomto místě bych chtěl poděkovat vedoucí své disertační práce, Mgr. Petře Vašíčkové, Ph.D. (Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i.), za ochotu, cenné rady, poskytnutý materiál, věnovaný čas a trpělivé vedení při vypracovávání této práce. Stejně tak bych rád poděkoval i kolegům z pracovní skupiny Virologie potravin a prostředí, Lence Palasové, Mgr. Magdaléně Krásné a také všem ostatním spoluautorům přiložených publikací a aplikovaných výsledků, které by bez jejich zapojení mohly jen těžko vzniknout. Rovněž bych chtěl poděkovat všem svým blízkým za podporu a trpělivost během celého studia.

SEZNAM ZKRATEK

AdV	adenovirus
AdV 40/41	adenovirus, sérotypy 40 a 41
DNA	deoxyribonukleová kyselina
Fw primer	„forward“ primer
HAV	virus hepatitidy A
HEV	virus hepatitidy E
HEV-1	virus hepatitidy E, genotyp 1
HEV-3	virus hepatitidy E, genotyp 3
MFI	medián intenzity fluorescence
MOL	multiplexní oligonukleotidová ligace
MOLigo	krátký párový specifický oligonukleotid / sonda
NaCl	chlorid sodný
NoV	norovirus
NoV GI a GII	norovirus, „genogroups“ GI a GII
PCR	polymerázová řetězová reakce
PEG	polyethylenglykol
qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce probíhající v reálném čase
Rev primer	„reverse“ primer
RNA	ribonukleová kyselina
RT	reverzní transkripce
RV	rotavirus
RVA	rotavirus skupiny A
SAPe	streptavidin, R-Phycoerythrin konjugát
SARS-CoV-2	koronavirus 2. typu způsobující těžký akutní respirační syndrom
VÚVeL	Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.
xMAP	„Multi-Analyte Profiling“

Originální publikace a vymezení podílu autora dizertační práce

Práce vychází celkem z 8 rukopisů autora dizertace (Jakub Hrdý, JH) a 13 ostatních výsledků v podobě aplikovaných výsledků (prototypy a příslušným orgánem státní správy certifikované či schválené metodiky).

Článek 1 (Annex 1 k této dizertační práci)

HRDY, Jakub, Petra VASICKOVA, Michaela NESVADBOVA, Jiri NOVOTNY, Tomas MATI a Petr KRALIK. MOL-PCR and xMAP Technology A Multiplex System for Fast Detection of Food- and Waterborne Viruses. *The Journal of Molecular Diagnostics*. Elsevier, 2021, roč. 23, č. 6, s. 765-776. ISSN 1525-1578. doi:10.1016/j.jmoldx.2021.03.005.

JH se podílel na přípravě designu studie, připravil plán experimentů, samostatně realizoval laboratorní experimenty v práci popsané (vyjma kruhových testů), sepsal draft rukopisu a připravil finální verzi textu k publikaci po implementaci připomínek od spoluautorů.

Článek 2 (Annex 2 k této dizertační práci)

HRDY, Jakub a Petra VASICKOVA. Virus detection methods for different kinds of food and water samples – The importance of molecular techniques. *Food Control*. Elsevier, 2022, roč. 134, April, s. 108764-108784. ISSN 0956-7135. doi:10.1016/j.foodcont.2021.108764.

JH se podílel na návrhu obsahu publikace, sepsal draft rukopisu a připravil finální verzi textu k publikaci po implementaci připomínek od spoluautora.

Článek 3 (Annex 3 k této dizertační práci)

RESLOVA, Nikol, Veronika HUVAROVA, **Jakub HRDY**, Martin KASNY a Petr KRALIK. A novel perspective on MOL-PCR optimization and MAGPIX analysis of in-house multiplex foodborne pathogens detection assay. *Scientific reports*. London: Nature Publishing Group, 2019, roč. 9, č. 2719, s. 1-13. ISSN 2045-2322. doi:10.1038/s41598-019-40035-5.

JH se podílel na přípravě designu studie, samostatně realizoval vybrané experimenty v práci popsané, získané výsledky integroval s výsledky od spoluautorů a připravil dílčí podklady pro publikaci.

Článek 4 (Annex 4 k této dizertační práci)

JELINKOVA, Pavlina, **Jakub HRDY**, Jirina MARKOVA, Jiri DRESLER, Petr PAJER, Oto PAVLIS, Pavel BRANICH, Gabriela BORILOVA, Markéta REICHELOVA, Vladimír BABAK, Nikol RESLOVA a Petr KRALIK. Development and Inter-Laboratory Validation of Diagnostics Panel for Detection of Biothreat Bacteria Based on MOL-PCR Assay. *Microorganisms*. Basel: MDPI, 2021, roč. 9, č. 1, s. 1-15. ISSN 2076-2607. doi:10.3390/microorganisms9010038.

JH se podílel na přípravě designu studie, realizoval dílčí optimalizační experimenty v práci popsané, získané výsledky integroval s prací od spoluautorů a připravil dílčí podklady pro finální publikaci.

Článek 5 (Annex 5 k této dizertační práci)

DZIEDZINSKA, Radka, Petra VASICKOVA, **Jakub HRDY**, Michal SLANY, Vladimír BABAK a Monika MORAVKOVA. Foodborne Bacterial, Viral, and Protozoan Pathogens in Field and Market Strawberries and Environment of Strawberry Farms. *Journal of Food Science*, HOBOKEN: WILEY, 2018, roč. 83, č. 12, s. 3069-3075. ISSN 0022-1147. doi:10.1111/1750-3841.14401.

JH prováděl dílčí experimentální práce popsané v publikaci, podílel se na designu a realizoval optimalizační experimenty týkající se izolace virových agens ze vzorků vod.

Článek 6 (Annex 6 k této dizertační práci)

DZIEDZINSKA, Radka, Monika MORAVKOVA, **Jakub HRDÝ**, Iva SLANA, Hana VLKOVA, Hana KUNSTOVNA a Petra VASICKOVA. Occurrence of selected viral, bacterial and protozoan pathogens in fresh juices and smoothies in Prague, Czech Republic. *Food Control*, Oxford: Elsevier Science Ltd, 2018, roč. 93, s. 310-314. ISSN 0956-7135. doi:10.1016/j.foodcont.2018.05.015.

JH prováděl dílčí experimentální práce popsané v publikaci, navrhl design a realizoval optimalizační experimenty týkající se izolace virových agens ze vzorků ovocných a zeleninových šťáv a „smoothies“.

Článek 7 (Annex 7 k této dizertační práci)

DZIEDZINSKÁ, Radka, Monika MORÁVKOVÁ, **Jakub HRDÝ**, Iva SLANÁ, Hana VLKOVÁ, Hana KUNSTOVNÁ a Petra VAŠÍČKOVÁ. Čerstvé džusy a smoothies – sledování výskytu legislativou neregulovaných významných patogenů bakteriálního, virového a parazitárního původu. *Výživa a potraviny*, Výživa servis s.r.o., 2018, roč. 2018, č. 5, s. 136-140. ISSN 1211-846X.

JH prováděl dílčí experimentální práce popsané v publikaci, navrhl design a realizoval optimalizační experimenty týkající se izolace virových agens ze vzorků ovocných a zeleninových šťáv a „smoothies“.

Článek 8 (Annex 8 k této dizertační práci)

MORAVKOVA, Monika, Petra VASICKOVA, Michal SLANY, Ivana KOLACKOVA, **Jakub HRDÝ**, Renata KARPISKOVA a Petr KRALIK. Selected viral, protozoan and

bacterial agents on minimally processed vegetables and sprouts at point of sale. *Journal of Food and Nutrition Research*. Bratislava: VUP Food Research Institute, 2021, roč. 60, č. 2, s. 138-145. ISSN 1336-8672.

JH prováděl dílčí experimentální práce popsané v publikaci týkající se izolace virových agens ze vzorků minimálně zpracovaných rostlinných produktů.

Prototyp 1 (Annex 9 k této dizertační práci)

HRDÝ, Jakub a Petra VAŠÍČKOVÁ. 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. 2019. ISBN 978-80-7672-018-3.

JH navrhl design aplikovaného výsledku, samostatně realizoval laboratorní experimenty a se spoluautorem zpracoval podklady a finální text pro publikaci výsledku.

Prototyp 2 (Annex 10 k této dizertační práci)

HRDÝ, Jakub a Magdaléna KRÁSNA. Diagnostický prostředek pro simultánní detekci influenzy typu A (IVA), influenzy typu B (IVB) a koronaviru SARS-CoV-2. 2021. ISBN 978-80-7672-006-0.

JH se podílel na návrhu designu aplikovaného výsledku, realizoval dílčí laboratorní experimenty a zpracoval podklady a finální text pro publikaci výsledku.

Prototyp 3 (Annex 11 k této dizertační práci)

JELÍNKOVÁ, Pavlína, **Jakub HRDÝ**, Markéta Reichlová a Jiří VOLF. Biothreat xMAP panel – diagnostický prostředek pro simultánní detekci bakterií zneužitelných jako

biologické zbraně, konkrétně: *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*, *Francisella tularensis* and *Brucella* spp. 2020. ISBN 978-80-7672-001-5.

JH se podílel na návrhu designu aplikovaného výsledku, realizoval dílčí laboratorní experimenty a připravil podklady pro publikaci výsledku.

Certifikovaná metodika 1 (Annex 12 k této dizertační práci)

HRDÝ, Jakub a Petr KRÁLÍK. Kvalitativní detekce adenovirů (sérotypy 40 a 41) pomocí metody MOL-PCR. 2019. ISBN 978-80-88233-60-2.

JH navrhl design aplikovaného výsledku, samostatně realizoval laboratorní experimenty a zpracoval podklady a finální text pro publikaci výsledku.

Certifikovaná metodika 2 (Annex 13 k této dizertační práci)

HRDÝ, Jakub a Petr KRÁLÍK. Kvalitativní detekce viru hepatitidy E (HEV-1 a HEV-3) pomocí metody MOL-PCR. 2019. ISBN 978-80-88233-62-6.

JH navrhl design aplikovaného výsledku, samostatně realizoval laboratorní experimenty a zpracoval podklady a finální text pro publikaci výsledku.

Certifikovaná metodika 3 (Annex 14 k této dizertační práci)

HRDÝ, Jakub a Petr KRÁLÍK. Kvalitativní detekce viru hepatitidy A pomocí metody MOL-PCR. 2019. ISBN 978-80-88233-61-9

JH navrhl design aplikovaného výsledku, samostatně realizoval laboratorní experimenty a zpracoval podklady a finální text pro publikaci výsledku.

Certifikovaná metodika 4 (Annex 15 k této dizertační práci)

HRDÝ, Jakub a Petr KRÁLÍK. Kvalitativní detekce norovirů (genogroups GI a GII) pomocí metody MOL-PCR. 2019. ISBN 978-80-88233-63-3.

JH navrhl design aplikovaného výsledku, samostatně realizoval laboratorní experimenty a zpracoval podklady a finální text pro publikaci výsledku.

Certifikovaná metodika 5 (Annex 16 k této dizertační práci)

HRDÝ, Jakub a Petr KRÁLÍK. Kvalitativní detekce rotaviru A pomocí metody MOL-PCR. 2019. ISBN 978-80-88233-64-0.

JH navrhl design aplikovaného výsledku, samostatně realizoval laboratorní experimenty a zpracoval podklady a finální text pro publikaci výsledku.

Certifikovaná metodika 6 (Annex 17 k této dizertační práci)

HRDÝ, Jakub a Pavlína JELÍNKOVÁ. Kvalitativní detekce bovinního herpesviru 1 pomocí metody MOL-PCR. 2020. ISBN 978-80-88233-90-9.

JH navrhl design aplikovaného výsledku, realizoval dílčí laboratorní experimenty a zpracoval podklady pro finální text výsledku.

Certifikovaná metodika 7 (Annex 18 k této dizertační práci)

KRÁSNA, Magdaléna, **Jakub HRDÝ** a Hana MALENOVSKÁ. Kvalitativní detekce viru reprodukčního a respiračního syndromu prasat (PRRSV) pomocí metody MOL-PCR. 2021. ISBN 978-80-88233-96-1.

JH se podílel na psaní textu a na návrhu designu aplikovaného výsledku.

Certifikovaná metodika 8 (Annex 19 k této dizertační práci)

KRÁSNA, Magdaléna, Jakub HRDÝ a Hana MALENOVSKÁ. Kvalitativní detekce Prasečí chřipky pomocí metody MOL-PCR. 2021. ISBN 978-80-88233-97-8.

JH se podílel na psaní textu a na návrhu designu aplikovaného výsledku.

Certifikovaná metodika 9 (Annex 20 k této dizertační práci)

KRÁSNA, Magdaléna, Jakub HRDÝ a Hana MALENOVSKÁ. Kvalitativní detekce viru SARS-CoV-2 pomocí metody MOL-PCR. 2021. ISBN 978-80-88233-94-7.

JH se podílel na psaní textu a na návrhu designu aplikovaného výsledku.

Schválená metodika 1 (Annex 21 k této dizertační práci)

VAŠÍČKOVÁ Petra, Jakub HRDÝ, Magdaléna KRÁSNA, Kateřina SOVOVÁ, Lucia GHARWALOVÁ A Hana MLEJNKOVÁ. Metodický postup analýzy odpadních vod na přítomnost specifických oblastí genomu viru SARS-CoV-2. 2022. ISBN 978-80-7672-021-3.

JH se podílel na návrhu designu aplikovaného výsledku, realizoval dílčí laboratorní experimenty a zpracoval podklady pro finální text aplikovaného výsledku.

OBSAH

1. Úvod	1
2. Přehled problematiky	3
2.1 Viry v souvislosti s alimentárními infekcemi.....	3
2.2 Prvotní zpracování vzorků a izolace nukleových kyselin	5
2.3 Detekce virových agens	6
2.4 xMAP – MOL-PCR	7
3. Cíle.....	12
4. Výsledky.....	13
4.1 Metody prvotního zpracování vzorků pro požadované matrice a jejich využití v praxi.....	13
4.1.1 „Smoothies“ a ovocné / zeleninové šťávy	13
4.1.2 Pitné, užitkové a odpadní vody	13
4.1.3 Využití metod prvotního zpracování vzorků v praxi.....	15
4.2 Detekce virových agens	17
4.2.1 Optimalizace protokolu pro xMAP – MOL-PCR	17
4.2.2 Konstrukce panelu pro detekci virových agens spojených s kontaminacemi potravin a vodních zdrojů	25
4.2.3 Design systémů pro detekci dalších vybraných virových a bakteriálních agens	26
5. Závěr a diskuze.....	28
6. Bibliografie.....	31

1. Úvod

Mikrobiální bezpečnost potravin a prostředí je v posledních letech stále aktuálnější téma. Současný zájem a oblasti výzkumu již nejsou soustředěny pouze na bakteriální agens, ale stále častěji se zaměřují na dříve opomíjené viry a parazity. Děje se tak v souvislosti s narůstajícími požadavky na množství, bezpečnost a kvalitu potravin a prostředí, v němž žijeme. V současnosti je pozorovatelný trend přechodu k čerstvým či minimálně opracovaným potravinám, což značně, zejména při častém nedodržování správné hygienické praxe, zvyšuje rizika výskytu alimentárních infekcí. Stejně tak dochází k nárůstu a stárnutí populace, to s sebou nese poptávku po zvýšené produkci potravin a narůstá rovněž počet citlivých a imunokompromitovaných jedinců. Stále rostoucí cestovní ruch a častější dovoz zboží a potravin ze vzdálených lokalit (zejména rozvojové země) ve spojitosti s nedostatečnými kontrolami nezávadnosti daných komodit jen podporují šíření patogenů, a to nejen v souvislosti s alimentárními infekcemi. Čekají nás i významné globální klimatické změny (nedostatek pitné vody a vody k zavlažování, změny teplot aj.) a výskyt nových emergentních patogenů. Příkladem je současná situace, kdy je celý svět sužován pandemií nového koronaviru (Godoy et al., 2021; Hiscott et al., 2020). Všechny tyto změny představují náročnou výzvu pro vývoj dostatečně citlivých, specifických a robustních nástrojů pro detekci nejen patogenních virových agens.

Pozitivní průkaz patogenních virů ve vzorcích potravin a prostředí je poměrně častou záležitostí poslední doby. Mohou za to nejen výše zmíněné problémy, ale i technologický vývoj, ať už se jedná o nové technické vybavení, molekulární metody nebo infromatické nástroje (dokonalejší a výkonnější software) pro zpracování získaných dat. Nové objevy a inovace nám dávají do rukou stále sofistikovanější

a citlivější prostředky pro spolehlivější průkaz přítomnosti patogenních agens, a to i v komplexnějších nebo náročnějších maticích. Podstatnou roli v nárůstu zachycených případů hraje i narůstající povědomí a znalosti dané problematiky v případě státních dozorových orgánů či široké veřejnosti.

Největší problém v případě virových agens ve spojitosti s potravinami a prostředím je stále poměrně značný nedostatek informací o rozsahu výskytu jednotlivých agens, rozlišení infekčních a neinfekčních virových částic a s tím spojená ucelená data o jejich perzistenci mimo hostitelský organismus. Analýza potravin a prostředí na přítomnost patogenních virů totiž až na výjimky prozatím nepatří mezi standardně prováděné procedury a ani není dosud legislativou vyžadována. Kvůli nedostatku informací tak není možné zavádět dostatečně spolehlivá preventivní bezpečnostní opatření pro limitaci rizik s tímto problémem spojených. Většina v současnosti existujících a prováděných studií je často úzce zaměřena pouze na výskyt konkrétního patogenu a specifický typ matrice. Používané analytické metody jsou i proto většinou aplikovatelné na úzké spektrum agens a daný typ vzorků. Vývoj vhodných dostatečně citlivých, specifických, zároveň robustních a multiplexních metod pro detekci virových částic či jejich specifických oblastí genomu je tedy klíčovým krokem pro stanovení a zhodnocení rizik spojených s potenciálně kontaminovanými potravinami nebo prostředím a je zároveň i v zájmu ochrany veřejného zdraví (Hrdy & Vasickova, 2022; Annex 2).

2. Přehled problematiky

2.1 Viry v souvislosti s alimentárními infekcemi

Mezi patogenní virová agens, která se dostávají do spojitosti s kontaminací potravin a prostředí a následným alimentárním onemocněním lidí se řadí poměrně široké spektrum různých virů, nejčastěji jsou diskutovány viry z čeledi *Caliciviridae* (noroviry; NoV), *Picornaviridae* (virus hepatitidy A; HAV), *Reoviridae* (rotaviry; RV), *Adenoviridae* (adenoviry; AdV) a *Hepeviridae* (virus hepatitidy E; HEV) (Bosch et al., 2018; EFSA & ECDC, 2018; King et al., 2017). Pro většinu agens z této morfologicky i geneticky diverzní skupiny je typická relativně nízká infekční dávka a vysoká stabilita jejich virových částic (Atmar et al., 2014; Teunis et al., 2008; Yezli & Otter, 2011), která se týká jak vnějšího prostředí, tak i vnitřního prostředí jejich hostitele. Až na výjimky tato skupina virů vykazuje významnou odolnost vůči vysychání, výrazným výkyvům pH, teplotním stresům nebo působení některých desinfekčních prostředků a čistících procesů. Vysoká stabilita spolu s nízkou infekční dávkou jen podporují úspěšné šíření těchto virů, jehož potenciál je v dnešním globalizovaném světě takřka neomezený (Barker, 2001; Boone & Gerba, 2007; Bosch et al., 2018; van Maarseveen et al., 2010; Widen et al., 2011).

Nejběžnějším následkem infekce výše zmíněnými viry jsou gastroenteritidy, některá virová agens však mohou způsobit i poněkud závažnější stavy (paralýzy, meningitidy, encefalitidy, hepatitidy, respirační a oční či kožní onemocnění; Bintsis, 2017; Bosch et al., 2018; O'Shea et al., 2019). Mezi nejvíce postižené patří zejména malé děti, senioři a imunokompromitovaní jedinci (White et al., 2016). Celosvětově se gastrointestinální onemocnění stále řadí mezi nejčastější příčiny morbidit a mortality se skoro 5 miliardami případů onemocnění a více než 1,6 milióny mrtvých ročně (Naghavi et al.,

2017; Roth et al., 2018; Troeger et al., 2018). Nejhorší situace je v rozvojových zemích, kde stále patří k nejčastějším důvodům úmrtí, a to zejména malých dětí do 5 let (Akhtar et al., 2014; Mills, 2014; Roth et al., 2018; Wardlaw et al., 2010). Kromě negativních následků na zdraví člověka, které jsou ve většině případů mírné a krátce trvající, je nutné zvážit i socioekonomický dopad těchto onemocnění, který je značný a je tak často tím hlavním důvodem nutného řešení ve vyspělých částech světa. Jedná se zejména o ztráty spojené s morbiditou a s náklady vyloženými na zmírnění dopadu možné epidemie na celkovou populaci (Bányai et al., 2018; Graves, 2013; Oude Munnink & van der Hoek, 2016).

Skupina virů spojovaných s alimentárními infekcemi zahrnuje agens, jejichž genom je v podobě deoxyribonukleové kyseliny (DNA) i ribonukleové kyseliny (RNA). Obzvláště u virů s genomem v podobě RNA je prokázána vysoká frekvence mutací, která může vést k překonání mezidruhových bariér. Z tohoto důvodu je zapotřebí vzít v úvahu možný zoonotický potenciál těchto virů. Přenos ze zvířete na člověka byl již prokázán v případě HEV (Meng, 2010; Smith et al., 2016; Wang et al., 2021; Yugo & Meng, 2013) nebo RV (Cliver, 2009; Martella et al., 2010; Simsek et al., 2021), stále diskutován je i zoonotický potenciál NoV (Ludwig-Begall et al., 2018; Sisay et al., 2016; Villabruna et al., 2020; Villabruna et al., 2019). Kromě nových možností přenosu může díky těmto rychlým genetickým změnám docházet i ke vzniku variant virů spojených s mnohem závažnějšími projevy onemocnění (Newell et al., 2010).

Z celého souboru výše zmíněných virových agens jsou v souvislosti s epidemiemi alimentárních onemocnění nejčastěji zachyceny, zejména v rozvinutých zemích, HAV a NoV („genogroups“ GI a GII; NoV GI a GII; EFSA & ECDC, 2017, 2018, 2021). Zvláštní pozornosti se však v souvislosti s kontaminací potravin živočišného původu a v případě rozvojových zemí i vodních zdrojů dostává i HEV (EFSA & ECDC, 2017;

Van der Poel, 2014; von Wulffen et al., 2017). V rámci této disertační práce byly proto vývoj, validace a zavádění detekčních metod zaměřeny zejména na tato výše zmíněná agens. Následně byly vzhledem ke svému významu pro lidské zdraví dále zařazeny i viry z čeledi *Reoviridae* (rotavirus skupiny A; RVA) a *Adenoviridae* (adenovirus sérotypů 40 a 41; AdV 40/41), jakožto často navrhované indikátory fekálního znečištění v případě kontaminace viry (EFSA & ECDC, 2018; McQuaig et al., 2012; Wyer et al., 2012). Kvůli epidemické situaci v letech 2020 a 2021 byla pozornost rovněž věnována i novému typu koronaviru SARS-CoV-2, původci onemocnění covid-19, a jeho potenciálu šířit se prostřednictvím kontaminovaných potravin a vod (Godoy et al., 2021; Han et al., 2020; Hiscott et al., 2020; Hu et al., 2021; Zhang et al., 2021).

2.2 Prvotní zpracování vzorků a izolace nukleových kyselin

Prvním krokem detekce virů ve vzorcích potravin a prostředí je separace virových částic ze vzorku a jejich další případné zakoncentrování. Vzhledem k nízkým koncentracím, v jakých se tato agens v těchto vzorcích většinou vyskytují, je často nutné zpracovávat větší objemy vzorků. To spolu s častou a vysokou mírou přítomnosti řady inhibičních látek dělá ze separace virových částic kritický krok celé analýzy. Vytvoření robustní univerzální metody pro separaci virových částic ze všech možných typů vzorků potravin a prostředí se nejeví příliš reálné. Vzorky vykazují vysokou variabilitu, pokud jde o obsah vody, proteinů, lipidů, sacharidů, huminových kyselin nebo širokého spektra solí (Bosch et al., 2016; Julian & Schwab, 2012; Matheson et al., 2010; Widen et al., 2011). Z toho důvodu je nutné minimálně metody pro separaci virových částic přizpůsobit danému okruhu / typu vzorků a detekovaných agens (Hrdy & Vasickova, 2022; Annex 2).

Vzhledem k problematické kultivovatelnosti některých z výše uvedených virů na buněčných kulturách a časové a materiální náročnosti je nejčastěji detekce virových částic založena na průkazu genomu jednotlivých patogenů. Z toho důvodu je nutné před samotou detekcí provést izolaci nukleových kyselin. Za tímto účelem je ve většině případů využíváno optimalizovaných komerčních izolačních souprav. Jejich výběr je vázán na daný typ matrice. V případě použití „in house“ metod je velmi náročné dostat požadované reprodukovatelnosti a stálosti výsledků. V některých případech však mohou představovat finančně méně náročnou alternativu (Hrdy & Vasickova, 2022; Annex 2).

2.3 Detekce virových agens

Tato disertační práce se částečně zaměřuje na krok prvotního zpracování vzorků (uvolnění či oddělení virových částic od matrice a jejich další zakoncentrování), jejím hlavním cílem je však následný krok detekce. V současnosti je nejčastějším a pravděpodobně i neoptimalizovanějším nástrojem detekce virových částic v těchto vzorcích metoda polymerázové řetězové reakce (PCR) sledovaná v reálném čase (qPCR), v případě RNA virů navíc s předcházejícím krokem reverzní transkripce (RT). Nicméně, i detekční systémy založené na qPCR/RT-qPCR mají svá úskalí, jedním z nejvýznamnějších je omezená možnost vytvářet multiplexní systémy. Z důvodů vzájemných interakcí jednotlivých sad primerů / sond a zejména také vzhledem k počtu dostupných fluorescenčních značek či detekčních kanálů není možné vytvářet robustnější systémy. V případě multiplexních qPCR metod většinou dochází i ke snížení citlivosti s narůstajícím počtem detekovaných cílů (vzájemné nespecifické

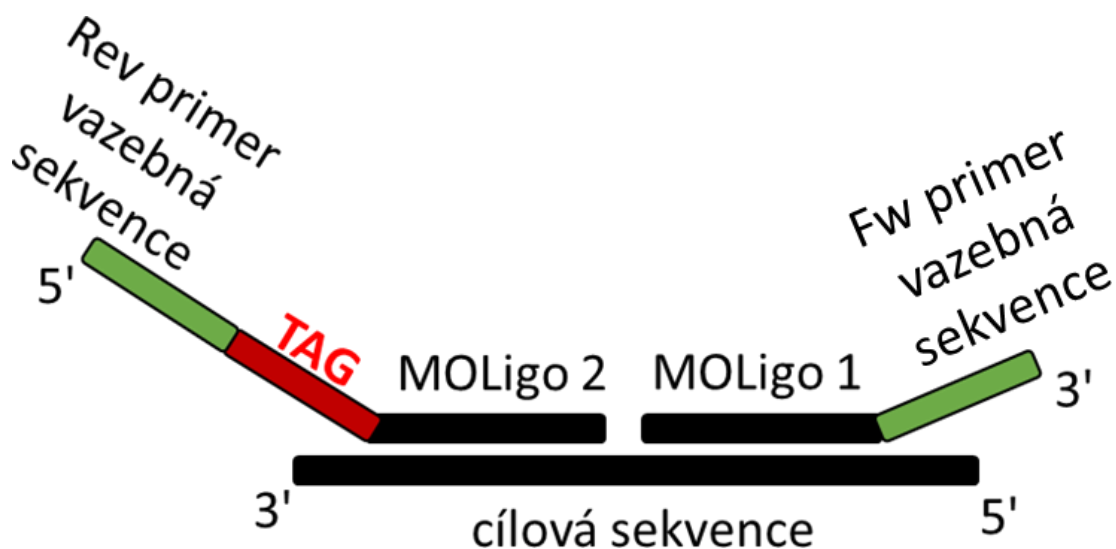
interakce jednotlivých podsystémů a kompetice o reagenty). To může představovat významný problém v případě detekce virových agens v potravinách a prostředí z hlediska jejich nízké koncentrace v analyzovaných matricích (Bosch et al., 2018; Huang et al., 2011; van Maarseveen et al., 2010). Překonat toto omezení qPCR umožňuje nově navržená metoda pro detekci patogenních virů ve spojitosti s kontaminacemi potravin a prostředí – multiplexní oligonukleotidová ligační (MOL) PCR s předcházejícím krokem RT v kombinaci s xMAP technologií („Multi-Analyte Profiling“; Luminex Corporation, Austin, Texas, USA).

2.4 xMAP – MOL-PCR

Metoda MOL-PCR kombinuje multiplexní ligaci několika párů specifických sond (MOLig) v přítomnosti cílových DNA molekul s následnou amplifikací ligovaných produktů za využití singleplexní PCR s univerzálními primery (fluorescenčně značený „reverse“ primer). Samotnou detekci těchto amplifikovaných produktů pak zajišťuje technologie xMAP (Hrdy et al., 2021; Reslova et al., 2019; Annex 1, 3).

Tento detekční systém je schopen zpracovat pouze templát v podobě DNA (vlastnosti ligačního enzymu). Většina z výše zmíněných virů má však genom v podobě RNA (NoV, HAV, HEV, RV). Z tohoto důvodu je prvním krokem detekce nutné provedení RT. Tato reakce může probíhat se směsí specifických reverzních primerů pro všechny vybrané cíle. Po provedení reverzní transkripce následuje samotná ligační reakce. V rámci ligace je využito dvou sond (MOLigo 1 a MOLigo 2) specifických pro každý cíl. Jedná se o krátké oligonukleotidy, z nichž jeden obsahuje tzv. TAG sekvenci (24 bází dlouhá unikátní sekvence pro daný cíl). Na koncích obou MOLig jsou umístěny vazebné sekvence pro univerzální primery. Důležitou roli hraje

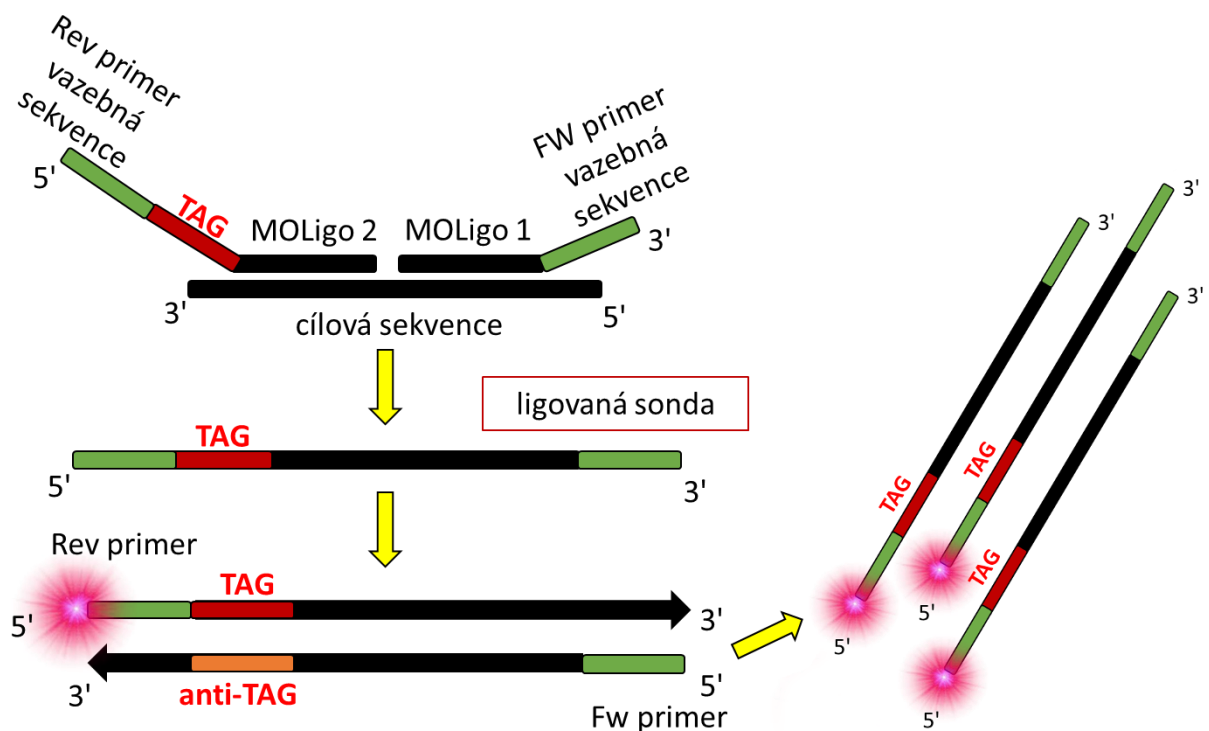
5' konec MOLiga 1 a 3' konec MOLiga 2. Na těchto koncích se nachází sekvence komplementární k vybranému cíli (vybraná konzervativní část sekvence genomu umožňující specifickou identifikaci cíle patogenu; viz Obr. 1).



Obrázek 1. Ligační sondy – MOLigo 1 a MOLigo 2. MOLigo = krátký párový specifický oligonukleotid / sonda; Rev primer = „reverse“ primer; Fw primer = „forward“ primer; TAG = 24 bází dlouhá unikátní sekvence pro daný cíl. *Upraveno dle Hrdy et al. (2021).*

V přítomnosti cílové molekuly DNA dochází k nasednutí komplementárních konců obou MOLig na sousedící místa. Poté může díky fosforylovanému 5' konci MOLiga 1 dojít k ligaci obou sond. Krok ligace je tedy klíčovým krokem detekce přítomnosti cílové molekuly / specifické sekvence v analyzovaném vzorku. Sekvence pro univerzální primery na obou koncích této nově vzniklé spojené molekuly následně umožní její amplifikaci v rámci konvenční PCR. Tyto univerzální primery jsou společné pro všechny ligované sondy, krok amplifikace tedy probíhá uniformně pro všechny

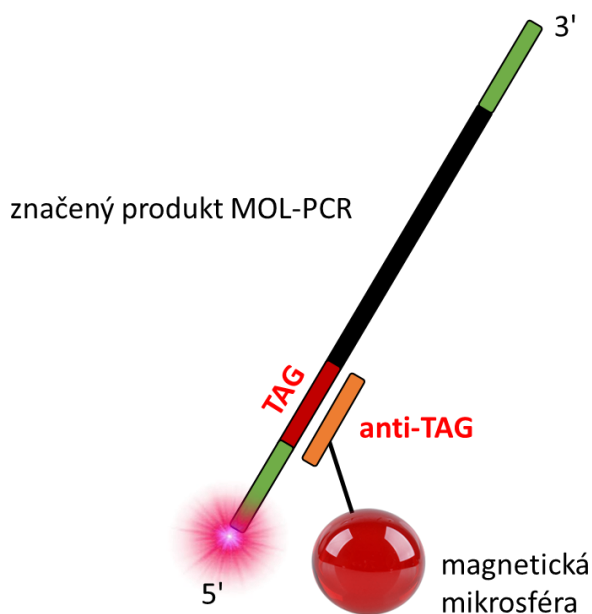
obsažené cíle (minimalizace rizik amplifikačního „bias“ či „cross-hybridization“). „Reverse“ primer použitý v této reakci je na svém 5' konci značen fluorescenční značkou (BODIPY-TMRX, Eurofins, Luxembourg, Lucembursko) umožňující detekci amplifikovaných molekul v následujících krocích (viz Obr. 2).



Obrázek 2. Zjednodušené schéma MOL-PCR. MOLigo = krátký párový specifický oligonukleotid / sonda; Rev primer = „reverse“ primer; Fw primer = „forward“ primer; TAG = 24 bází dlouhá unikátní sekvence pro daný cíl; anti-TAG = 24 bází dlouhá unikátní sekvence komplementární k TAG sekvenci. *Upraveno dle Hrdy et al. (2021).*

Pro detekci značených amplikonů slouží sety magnetických mikrosfér (6,5 µm; Lumindex Corporation). Každý set těchto mikrosfér obsahuje ve svém polystyrenovém

jádře rozdílný poměr dvou červených barviv, to mu udává unikátní absorpční / emisní profil umožňující vzájemné rozlišení jednotlivých setů mikrosfér (celkem až 50 různých kombinací dostupných pro MAGPIX™; Luminex Corporation). Mikrosféry jsou pokryty krátkými specifickými oligonukleotidy, tzv. anti-TAGy, kdy každý set je pokryt pouze jedním typem těchto anti-TAGů (Angeloni et al., 2018; Tang & Stratton, 2013). Amplifikované ligované sondy se tak v rámci následného provedení hybridizační reakce naváží prostřednictvím svých TAG sekvencí ke komplementárním anti-TAG sekvencím na povrchu daných mikrosfér (mikrosféry s unikátním spektrálním profilem určené pro daný cíl; viz Obr. 3).



Obrázek 3. Hybridizace produktu MOL-PCR na magnetické mikrosféry. MOL-PCR = multiplexní oligonukleotidová ligační polymerázová řetězová reakce; TAG = 24 bází dlouhá unikátní sekvence pro daný cíl; anti-TAG = 24 bází dlouhá unikátní sekvence komplementární k TAG sekvenci. *Upraveno dle Hrdy et al. (2021).*

Následně je nutné magnetické mikrosféry roztřídit a odečíst hodnotu fluorescence navázaných amplikonů. Pro tento účel slouží přístroj MAGPIX™ (viz Obr. 4). Přístroj využívá magnetu a dvojici diod. Mikrosféry jsou po vstupu do přístroje zachyceny na magnetu díky své magnetické vrstvě. Červená dioda poté slouží k rozlišení jednotlivých setů mikrosfér dle jejich unikátních spektrálních vlastností (mikrosféry s odpovídajícími anti-TAGy určené pro daný cíl). Zelená dioda dále slouží k odečtení intenzity fluorescenčního signálu amplikonů navázaných na povrchu příslušných mikrosfér.



Obrázek 4. MAGPIX™ přístrojové vybavení. *Autor fotografie: Jakub Hrdý.*

3. Cíle

Hlavní cíle této disertační práce je možné rozdělit do tří tematických okruhů:

1. Návrh a optimalizace metod pro prvotní zpracování vzorků určených k detekci virových agens v požadovaných maticích a jejich implementace do současné rutinní laboratorní praxe.
2. Design a vytvoření nového multiplexního detekčního systému založeného na RT-MOL-PCR v kombinaci s xMAP technologií.
3. Optimalizace navrženého detekčního systému a jeho ověření na reálných vzorcích a v rámci provedených mezilaboratorních testů.

4. Výsledky

4.1 Metody prvotního zpracování vzorků pro požadované matrice a jejich využití v praxi

4.1.1 „Smoothies“ a ovocné / zeleninové šťávy

Pro matrice typu ovoce a zelenina je v akreditovaných laboratořích výzkumné skupiny Virologie potravin a prostředí na Výzkumném ústavu veterinárního lékařství, v.v.i. (VÚVeL) v Brně zavedena metoda oplachu puforem s vyšší hodnotou pH s následným zakoncentrováním polyethylenglykolem (PEG) a precipitací roztokem chloroformu a butanolu (Dziedzinska, Vasickova, et al., 2018; Moravkova et al., 2021; Annex 5 a 8). Tento přístup je založen na poměrně nedávno vzniklých a pravidelně aktualizovaných normách (Anonymous, 2017, 2019). Zvláštní protokol však bylo nutné optimalizovat v případě nové matrice v podobě ovocných / zeleninových šťáv a „smoothies“. Byla testována řada v současnosti používaných a dostupných metod pro podobné matrice (ovoce/zelenina, voda). Jako experimentálně nejúčinnější metoda bylo zvoleno smíchání vzorku s fosfátovým puforem o vysokém pH a jeho následná centrifugace. Takto je získána peleta, ze které je možné následně provést samotnou izolaci DNA/RNA (Dziedzinska, Moravkova, et al., 2018a; Dziedzinska, Moravkova, et al., 2018b; Annex 6 a 7).

4.1.2 Pitné, užitkové a odpadní vody

Jako velmi obtížná se projevila separace virových částic ze vzorků různých typů vod (pitná, užitková a odpadní voda). Zde bylo již dříve otestováno několik metod

využívajících filtračních kolon se sloupcem skelné sodnovápenaté vaty, komerčně dostupných filtračních systémů (koncentrační pipety; InnovaPrep, Drexel, Missouri, USA), membránových filtrů (celulose nitrate HA Millipore membrane, 0,45 μm ; Merck, Darmstadt, Německo) a dále i různých flokulačních roztoků (hovězí extrakt s glycinem, odstředěné mléko, roztok chloridu hlinitého; prezentovaná, ale nepublikovaná data). Jako nejúčinnější metoda pro zpracování vzorků o velkém objemu (cca 10 L) se osvědčila a byla zavedena metoda filtrace přes negativně nabitě membránové filtry s následným srážením eluátu při nízkém pH v roztoku hovězího extraktu s glycinem (Dziedzinska, Vasickova, et al., 2018; Annex 5). Pro vzorky s malým objemem (cca 500 ml), u kterých je tento přístup aplikovatelný jen s výrazně nižší citlivostí, byla zvolena a optimalizována metoda přímé organické flokulace roztokem hovězího extraktu s glycinem při nízkém pH (prezentované, ale prozatím nepublikované výsledky).

Výrazně problematickou maticí představují vzorky odpadních vod, jejichž analýza je žádoucí z důvodu vytvoření prediktivního nástroje pro sledování vývoje epidemie nového koronaviru SARS-CoV-2. Tyto vzorky se vyznačují výrazně vyšším podílem pevné složky a jejich zpracování standardním postupem proto není vhodné. Rovněž jsou nutná zvýšená bezpečnostní opatření, která s sebou přináší řadu omezení. Z tohoto důvodu byla vytvořena nová separační metoda vycházející z technik pro zakoncentrování roztoku s využitím směsi PEG a chloridu sodného (NaCl; Masclaux et al., 2013; Zhang et al., 2020). Vzorky jsou smíchány se směsí PEG 6000 (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Německo) / NaCl (Sigma-Aldrich) ve formě roztoku nebo prášku (40 g PEG 6000 a 8,8 g NaCl / 500 ml vzorek odpadní vody). Následuje inkubace vzorku při chladničkové teplotě (± 4 °C) po dobu 12-16 hodin,

centrifugace a resuspendace získané pelety ve fosfátovém pufru, ze kterého je provedena izolace DNA/RNA (Annex 21).

4.1.3 Využití metod prvotního zpracování vzorků v praxi

Výše uvedené separační metody byly po své řádné optimalizaci spolu s již ostatními zavedenými protokoly použity pro testování širokého spektra potravinových matric a vzorků prostředí v laboratořích Virologie potravin a prostředí (VÚVeL). Finální detekce patogenních virových agens proběhla za využití několika systémů založených na qPCR/RT-qPCR. Toto testování probíhalo v rámci monitorování výskytu virových, bakteriálních a parazitárních agens v daných matricích. Získané dílčí výsledky byly zveřejněny ve spoluautorských publikacích.

V rámci studie Dziedzinska, Vasickova, et al. (2018; Annex 5) se podařilo detekovat přítomnost genomu humánních NoV u 1,3 % vzorků jahod odebraných přímo z farem na území ČR (celkem 156 vzorků) a u 1,4 % testovaných vzorků jahod z tržní sítě (celkem 70 vzorků; 45 vzorků s původem v ČR, vyjma testovaných farem, a 25 vzorků s původem v jiných státech EU), u vzorků prostředí (celkem 241 vzorků) byla zachycena pozitivita na NoV u 2,1 % vzorků (ruce pracovníků, toalety, vzorky vod).

V publikacích Dziedzinska, Moravkova, et al. (2018a); Dziedzinska, Moravkova, et al. (2018b; Annex 6 a 7) byly prezentovány výsledky testování ovocných / zeleninových čerstvých šťáv a „smoothies“ na přítomnost patogenních agens. Celkem bylo otestováno 80 různých vzorků z území hlavního města Prahy. V tomto případě však přítomnost virových původců gastrointestinálních onemocnění prokázána nebyla. V 1/5 vzorků byla detekována jen bakteriální či parazitární agens (*Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica*, *Cryptosporidium* sp. a *Giardia Lamblia*).

V rámci studie Moravkova et al. (2021; Annex 8) bylo analyzováno 175 vzorků čerstvě sklizené zeleniny, mražené zeleniny a klíčků s původem v ČR nebo jiných evropských zemích na přítomnost bakteriálních, virových a parazitárních agens. Z celého souboru byla v 1,1 % vzorků detekována přítomnost genomu NoV, jednalo se o vzorky rukoly a mražených zeleninových směsí.

V roce 2020 se z důvodu pandemie zapříčiněné novým koronavirem (onemocnění covid-19) objevila příležitost testovat vzorky odpadních vod z různých fází procesu zpracování čistíren odpadních vod. V tomto případě bylo nejdříve využito výše zmíněné metody přímé organické flokulace pro analýzu vzorků vod malého objemu. Specifický charakter této matrice si však vyžádal zavedení zcela nového, časově méně náročného způsobu zpracování vzorku. Za tímto účelem byla vytvořena a optimalizována výše popsaná metoda separace virových částic pro tento typ vzorků, jež vyšla i v podobě aplikovaného výsledku ve formě schválené metodiky (Annex 21). Pravidelné testování vzorků odpadních vod na přítomnost tohoto agens může sloužit jako důležitý epidemiologický ukazatel. Existuje zde totiž předpoklad, že narůstající detekce nového koronaviru (resp. jejich genomu) v odpadních vodách předchází vypuknutí jednotlivých vln epidemií. Práce na tomto projektu stále probíhají, v pravidelných intervalech jsou analyzovány vzorky z různých fází probíhající epidemie, a sběr a vyhodnocení dat tak nejsou ukončeny. Nicméně, předběžné výsledky, které byly doposud shromážděny, potvrzují výše zmíněný předpoklad korelace. Tyto unikátní vzorky odpadních vod jsou také analyzovány na přítomnost dalších virových agens (NoV, HAV, AdV; prozatím nepublikovaná data).

4.2 Detekce virových agens

V současnosti optimalizované a zavedené RT-qPCR nebo qPCR systémy používané na pracovišti Virologie potravin a prostředí ve VÚVeL představují dostatečně citlivý a specifický nástroj pro detekci vybraných patogenních virových agens. Do určité míry umožňují i tvorbu multiplexních systémů, kdy je možné stanovit více cílů, včetně zahrnuté vnitřní amplifikační kontroly (IAC). Kontrola celého procesu analýzy všech vzorků na tomto pracovišti je zajištěna prostřednictvím cílené kontaminace před začátkem zpracování vzorků za využití kontroly v podobě uměle připravených virových částic (Mikel et al., 2015; Mikel et al., 2016). Nicméně, právě možnost vytvářet multiplexní systémy je u RT-qPCR/qPCR výrazně omezena. Počet cílů v rámci jednoho systému je limitován počtem dostupných fluorescenčních značek / detekčních kanálů. Z tohoto důvodu byla vyvinuta a optimalizována nová detekční metoda, která je schopna tyto limitace RT-qPCR/qPCR obejít. Jedná se o metodu kombinující MOL-PCR s detekčním systémem xMAP (Luminex Corporation). Díky této metodě je možné nejen navýšit počet detekovaných patogenů v rámci jedné reakce, ale i využít více cílů v rámci jednotlivých sledovaných patogenů. Jak již bylo zmíněno, některé z uvedených virů podléhají velmi rychlým genetickým změnám, více cílů tak snižuje pravděpodobnost falešně negativních vzorků.

4.2.1 Optimalizace protokolu pro xMAP – MOL-PCR

Technologie xMAP vznikla na počátku 21. století. První aplikace se objevily již v roce 2004 (Biagini et al., 2004). Nejedná se tedy o převratně novou technologii. Novější je však její aplikace v kombinaci s multiplexní ligační reakcí (Thierry et al., 2013; Wuyts et al., 2015), zejména optimalizace celého procesu, zavedení na

pracovišti VÚVeL a validace celého systému (Hrady et al., 2021; Reslova et al., 2019; Annex 1 a 3). Původní xMAP technologie je využívána především pro detekci a analýzu proteinů, její použití pro analýzu nukleových kyselin je výrazně limitované, a to jak dostupnými technickými materiály, tak i počtem reálných aplikací a uživatelů (Angeloni et al., 2018). Aplikace této technologie ve spojení s MOL-PCR pro detekci patogenních virových agens (detekce jejich genomu), která se pojí s kontaminacemi potravin a prostředí je zcela unikátní.

Během posledních let byl na pracovišti VÚVeL testován a následně aplikován nespočet optimalizací protokolu pro xMAP – MOL-PCR / xMAP – RT-MOL-PCR. Řada z nich vedla k časové a materiální úspoře nebo k celkovému snížení pracnosti celého procesu. Většina těchto modifikací byla prováděna pro maximalizaci získaného detekčního signálu oproti signálu pozadí a v rámci zjednodušení celého protokolu pro jeho snadnou adaptaci do běžného laboratorního provozu.

4.2.1.1 Ligace

V rámci ligační reakce bylo během optimalizací testováno několik parametrů. Důležitou roli hrála volba ligačního enzymu. Dále byly testovány i různé teplotní protokoly pro průběh ligace a doba jejich trvání nebo design, koncentrace a vzájemné poměry jednotlivých MOLig či celkový objem reakce (Hrady et al., 2021; Reslova et al., 2019; Annex 1 a 3).

Na začátku optimalizací byla prvním nutným krokem separace ligační reakce od následné singleplexní PCR. I když jsou zde nezpochybnitelné výhody provedení v rámci jedné zkumavky (jednoduchost, pracnost a riziko možných kontaminací), nevýhody tohoto uspořádání prozatím převládají (vzájemná interakce jednotlivých

složek směsí či omezená možnost kontroly jednotlivých kroků; Hrdy et al., 2021; Reslova et al., 2019; Annex 1 a 3; Deshpande et al., 2010; Stucki et al., 2012; Walker et al., 1992).

Dalším důležitým parametrem ligace je i koncentrace jednotlivých MOLig. Na základě předchozích publikovaných aplikací byly testovány koncentrace 10 000, 1 000, 50, 10, 5 a 1 nM, jako optimální se ukázala koncentrace 5 nM. V tomto případě bylo dosaženo nejlepšího poměru mezi hodnotou signálu pozitivního vzorku a hodnotou signálu pro negativní kontrolu (Reslova et al., 2019; Annex 3). Kromě koncentrace párů MOLig v reakci byl testován i poměr jednotlivých MOLig (MOLigo 1 : MOLigo 2) v rámci páru. V případě testování jen jednotlivých systémů bylo experimentálně prokázáno, že nadbytek MOLiga 1 oproti MOLigu 2 (4:1), vede k potlačení signálu pozadí. Nicméně, v případě, že reakce probíhala v multiplexním provedení (několik různých párů MOLig), tento výhodný efekt zcela vymizel. Nadbytek MOLiga 1 jednoho systému byl zřejmě vykompenzován přítomností MOLig 1 systémů ostatních (nepublikovaná data).

Kromě výše zmíněných parametrů ligace týkajících se MOLig bylo testováno i umístění specifické TAG sekvence. Nejlepších výsledků bylo dosaženo v případě její polohy na MOLigu 2 (Hrdy et al., 2021; Reslova et al., 2019; Annex 1 a 3). Roli zde zřejmě hraje vzdálenost fluorescenčního značení navázaného produktu od magnetické mikrosféry (rozlišení a interakce signálů; nepublikovaná data).

Pokud jde o volbu ligačního enzymu, byl zvolen takový, který měl v danou dobu nejvyšší deklarovanou účinnost a přesnost a zároveň byl komerčně dostupný (Hifi Taq DNA Ligase; New England BioLabs, Ipswich, Massachusetts, USA). V případě testování jiného enzymu (Ampligase; Epicentre, Madison, Wisconsin, USA), který byl využit v dřívějších podobných aplikacích (Deshpande et al., 2010), docházelo k navýšení hodnot signálu pozadí, což by vedlo k nepoužitelnosti jednotlivých

detekčních systémů. (Reslova et al., 2019; Annex 3). Kromě jednotlivých reakčních komponent byly testovány i podmínky, za kterých ligace probíhá. Jednou z nejdůležitějších je teplota. Byl testován gradient teplot 55-70 °C. Vyšší teploty, které se blíží teplotám tání MOLig zajišťují vyšší stringenci (Barany, 1991). Stejně tak bylo bráno v potaz i doporučení výrobce pro daný enzym a jeho optimální podmínky. Jako nejvýhodnější se ukázala teplota ligace 59-60 °C. Dalším testovaným parametrem byla doba trvání a cyklování ligační reakce. Jako optimální byl zvolen delší protokol ligace zahrnující cyklování (denaturace 10 min při 95 °C, 20 cyklů po 30 s při 95 °C a 1 min při 60 °C), oproti kratšímu protokolu bez cyklování (denaturace 5 min při 95 °C a 60 °C po 15 min). Kratší protokol bez cyklování vedl ke vzniku nespecifických produktů a nárůstu signálu pozadí (Reslova et al., 2019; Annex 3).

4.2.1.2 PCR

Pro následující singleplexní PCR reakci byly testovány různé dostupné komerční směsi, teplotní protokoly reakce, koncentrace a vzájemné poměry univerzálních primerů, koncentrace iontů a celkový objem reakce (Reslova et al., 2019; Annex 3).

Jedním z nejdůležitějších faktorů pro singleplexní PCR byla volba reakční směsi. Z důvodu reprodukovatelnosti a stálosti výsledků bylo využito pouze komerčně dostupných kompletních reakčních směsí. Celkem bylo testováno 6 různých směsí. Tento výběr zahrnoval i směsi již dříve využitě pro podobné aplikace - HotStarTaq DNA Polymerase (Qiagen, Hilden, Německo; Thierry et al., 2013; Wuyts et al., 2015) a AmpliTaq Gold 360 Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA; Deshpande et al., 2010; Woods et al., 2016). Nejlepšího výsledku bylo dosaženo s pomocí EliZyme HS Robust mix (Elisabeth Pharmacon, Brno, Česká republika). Kromě nejlepšího poměru hodnoty signálu pozitivního vzorku a hodnoty signálu

negativní kontroly je výhodný i reakční protokol pro tuto směs, který je časově méně náročný, oproti ostatním dostupným alternativám (Reslova et al., 2019; Annex 3). Kromě vhodné reakční směsi byla testována i koncentrace a vzájemný poměr univerzálních primerů, jejichž sekvence byly převzaty od Thierry et al. (2013). Byly testovány následující poměry a koncentrace primerů: 0,125 / 0,5 μ M; 0,25 / 1 μ M; 0,0625 / 0,25 μ M; 0,05 / 2,5 μ M a 0,25 / 0,25 μ M („forward“ primer / „reverse“ primer). Nadbytek „reverse“ primeru byl použit z toho důvodu, aby vznikal i nadbytek fluorescenčně značených produktů (princip asymetrické PCR), jejichž signál je následně po hybridizaci na magnetické mikrosféry detekován. Jako nejvhodnější byla experimentálně ověřena koncentrace univerzálních primerů 0,0625 / 0,25 μ M („forward“ primer / „reverse“ primer). Oproti uniformní koncentraci obou primerů bylo dosaženo výrazně vyšších hodnot fluorescence (Reslova et al., 2019; Annex 3).

4.2.1.3 Hybridizace

Optimalizace fáze hybridizace produktů singleplexní PCR na magnetické mikrosféry zahrnovaly teplotní protokol reakce, složení hybridizační směsi, testování minimální koncentrace použitých mikrosfér a testování komerčně dostupných mikrosfér s již potaženými anti-TAGy oproti „in house“ potaženým mikrosférám. Jedním z nejvýznamnějších aspektů celé metody je i způsob signalizace resp. značení detekovaných produktů (Hrdy et al., 2021; Reslova et al., 2019; Annex 1 a 3).

Tradiční aplikace xMAP technologie pro přístroj MAGPIX ve většině případů využívají streptavidin, R-Phycoerythrin konjugát (SAPE) a jeho afinity k biotinu, který nesou detekované molekuly. SAPE má teoreticky poskytovat nejvyšší hodnoty signálu fluorescence s minimálním signálem pozadí (Angeloni et al., 2018). V rámci optimalizací bylo kromě značení SAPE dále otestováno celkem 6 různých

fluorescenčních značení: HEX, TAMRA, BODIPY-TMRX, DY480, Cy3 a Alexa Fluor532. Nejlepších výsledků bylo dosaženo s využitím SAPE. Nicméně, tento způsob značení má podstatné nevýhody. Vysoké hodnoty signálu vykazují výraznou variabilitu. Další problém je v náročném provedení značení, které vyžaduje řadu inkubačních a promývacích kroků, které kromě časové a materiální náročnosti i zvyšují riziko možné kontaminace. Oproti dalším alternativním možnostem značení je navíc tento přístup finančně náročnější. Z tohoto důvodu bylo přistoupeno na přímé fluorescenční značení „reverse“ primeru. Hned po SAPE dosahovalo nejlepších hodnot značení BODIPY-TMRX, což nekorespondovalo s doporučením ostatních fluorescenčních značení, které měly teoreticky poskytovat znatelně lepší hodnoty (Angeloni et al., 2018; Reslova et al., 2019; Annex 3).

Takřka všechny současné aplikace využívají v rámci implementace xMAP technologie komerčně dostupné mikrosféry s již navázanými specifickými oligonukleotidy (TAGy/antiTAGy) - MagPlex-TAG Microspheres a MicroPlex Microspheres (Luminex Corporation). V tomto případě odpadá nutnost provádět vlastní potahování mikrosfér. V rámci optimalizačních experimentů bylo provedeno srovnání výsledků získaných za využití komerčně dostupných již potažených mikrosfér a mikrosfér, jejichž potažení bylo provedeno tzv. „in-house“ metodou. MagPlex Microspheres ($12,5 \times 10^6$ mikrosfér/ml; Luminex Corporation) byly potaženy anti-TAGy podle nově zavedeného protokolu vycházejícího z „Bio-Plex Bead Coupling protocol“ (Bio-Rad, Hercules, Kalifornie, USA). Během tohoto srovnání bylo zjištěno, že s použitím komerčně dostupných potažených mikrosfér nelze dosáhnout ani poloviční síly fluorescenčního signálu, který je detekován při použití mikrosfér, které byly potaženy „in-house“ metodou (Reslova et al., 2019; Annex 3). Kromě způsobu potažení mikrosfér hraje důležitou roli i jejich koncentrace v hybridizační směsi,

respektive jejich počet ve finálním roztoku pro analýzu. V rámci prvotních optimalizací bylo testováno množství 350, 750, 1 000, 1 500, 2 500, 3 500, and 5 000 mikrosfér na reakci s nutnou podmínkou minimálně 50 detekovaných mikrosfér ve vzorku. Jako optimální bylo stanoveno množství mikrosfér ve vzorku na 2 500 (síla fluorescenčního signálu pozitivních vzorků a negativních kontrol, dostatečný počet detekovaných mikrosfér; Reslova et al., 2019; Annex 3). Po provedení dalších optimalizací a úpravy protokolu pro hybridizaci byl počet mikrosfér nutných pro správný průběh analýzy ve 100 % případech stanoven na 1 250. Tato úprava vedla ke snížení celkové finanční náročnosti metody, jelikož mikrosféry představují jednu z nejdražších materiálních položek celého systému (Hrdy et al., 2021; Annex 1).

Protokol, za kterého probíhá samotná hybridizace i následné složení a aplikace analyzačního pufru byl původně převzat z Deshpande et al. (2010); (Reslova et al., 2019). Další experimenty během tvorby detekčního panelu pro patogenní virová agens však vedly k dalším modifikacím, kdy se jako nejvhodnější protokol pro hybridizaci osvědčil standardní protokol z xMAP Cookbook (Angeloni et al., 2018) původně určený pro hybridizaci se SAPE. Hybridizace tedy probíhá při 96 °C po 90 s a následných 37 °C po dobu 30 min (Hrdy et al., 2021; Annex 1).

4.2.1.4 MAGPIX analýza

Pro finální analýzu na přístroji MAGPIX bylo nutné vytvořit protokol pro údržbu a kalibraci přístroje (volba promývacích a nosných roztoků a výběr vhodného software) vyhovující používané aplikaci. Bylo testováno i několik laboratorních plastů, ve kterých probíhá samotná analýza vzorků, a složení a množství analyzačního roztoku. Všechny tyto aspekty měly značný vliv na průběh a finální výsledky celé analýzy (nepublikovaná data). Kromě toho bylo nutné vytvořit i metodiku pro vyhodnocení získaných surových

dat, která bude dostatečně jednoduchá na provedení a zároveň poskytne jednoznačné stanovení positivity či negativity testovaných vzorků (Hrdy et al., 2021; Reslova et al., 2019; Annex 1 a 3).

Pro vyhodnocení získaných výsledků bylo v rámci prvotních optimalizací využito dvou kritérií. Hodnota mediánu intenzity fluorescence (MFI) pro analyzovaný vzorek musela dosahovat minimálně 200 a její poměr k hodnotě MFI pro příslušnou negativní kontrolu musel být minimálně 4 (Reslova et al., 2019; Annex 3). Tento způsob hodnocení získaných dat se však neosvědčil v rámci hodnocení výsledků získaných při tvorbě detekčního panelu pro patogenní virová agens. Jeho použití by v tomto případě výrazně zvýšilo počet falešně negativních vzorků. Z tohoto důvodu byl pro vyhodnocení získaných dat zvolen odlišný přístup. Vzorek je vyhodnocen jako pozitivní v případě, že jeho hodnota MFI po odečtení hodnoty MFI negativní kontroly (signál pozadí) překračuje hodnotu 50 (Hrdy et al., 2021; Annex 1).

4.2.2 Konstrukce panelu pro detekci virových agens spojených s kontaminacemi potravin a vodních zdrojů

První optimalizace celého systému byly prováděny na bakteriálních a parazitárních agens (Reslova et al., 2019; Annex 3). Již během těchto optimalizací však byly prováděny práce na konstrukci detekčního panelu pro vybraná cílová virová agens. Konkrétně se jedná o kombinaci systémů zaměřených na průkaz specifických oblastí genomu virů HAV, HEV (genotyp 1 a 3; HEV-1, HEV-3), NoV GI a GII, AdV 40/41 a RVA.

Využití kombinace xMAP technologie a MOL-PCR pro vytváření detekčních systémů pro viry má oproti systémům pro bakterie či parazity určitá specifika. Je nezbytné zavést a optimalizovat podmínky nutné RT (včetně návrhu specifických reverzních primerů), jelikož některé viry mají svůj genom v podobě RNA. Pokusy o návrhy a utilizaci sond, které by nasedaly přímo na cílovou RNA, totiž prozatím nebyly úspěšné i přes použití vhodného ligačního enzymu (SplintR® Ligase, New England BioLabs; nepublikovaná data). Další výzvu představuje poněkud vyšší variabilita genomu u vybraných virových agens. Vyhledávání dostatečně konzervovaných a dlouhých úseků a navrhování funkčních párů MOLig, které splňují požadovaná kritéria (tvorba vlásenek, teploty tání, tvorba dimerů, obsah G/C) je poměrně náročné.

V současnosti je na pracovišti Virologie potravin a prostředí již vytvořen a zaveden fungující multiplexní detekční panel (8 různých párů MOLig / cílů) zahrnující všechny výše uvedené patogeny a navíc i systém pro vnitřní kontrolu analýzy. Systémy pro jednotlivé patogeny byly publikovány v podobě 5 certifikovaných metodik (Annex 12, 13, 14, 15 a 16) a celý detekční panel vyšel v podobě prototypu (Annex 9). Funkčnost a aplikovatelnost detekčního panelu byla testována na širokém spektru reálných

biologických vzorků a navíc i ověřena provedením mezilaboratorních testů v nezávislých partnerských laboratořích (Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Vojenský veterinární ústav - Hlučín a Vojenský zdravotní ústav – Odbor biologické ochrany – Těchonín). Vývoj, optimalizace a verifikace tohoto panelu zaměřeného na viry kontaminující potraviny, vodní zdroje a prostředí byly publikovány v Hrdy et al. (2021; Annex 1). Limit detekce této metody byl stanoven na 5×10^0 (AdV, HEV a RVA) a 5×10^1 (HAV, NoV) genomových ekvivalentů v reakci. Vytvořený diagnostický panel tak má potenciál sloužit nejen pro výzkumné účely, ale i jako stěžejní nástroj v rutinní analýze komerčně testovaných vzorků.

4.2.3 Design systémů pro detekci dalších vybraných virových a bakteriálních agens

Kromě výše zmíněného panelu zaměřeného na detekci virů spojených s kontaminovanými potravinami či vodními zdroji bylo v rámci vývoje a optimalizace metody xMAP – MOL-PCR vytvořeno i několik dalších doprovodných systémů cílených na detekci vybraných bakteriálních a dalších virových agens. Tvorba těchto doprovodných systémů vedla k dalšímu ověření funkčnosti a aplikovatelnosti navržené metody.

V rámci spolupráce s Armádou České republiky byl vytvořen panel pro detekci bakterií, které jsou teoreticky využitelné pro tvorbu biologických zbraní. Konkrétně se jedná o *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*, *Francisella tularensis*, and *Brucella* spp. (Jelinkova et al., 2020; Annex 4). Tento detekční systém byl publikován i jako aplikovaný výsledek ve formě prototypu (Annex 11).

Pokud jde o detekci virů, byl vytvořen systém pro detekci bovinního herpesviru 1 (Annex 17), viru reprodukčního a respiračního syndromu prasat (Annex 18), viru

prasečí chřipky (Annex 19) a nového koronaviru SARS-CoV-2 (Annex 20). Všechny tyto systémy byly vydány jako aplikované výsledky ve formě certifikovaných metodik. Kromě toho byl vytvořen i panel pro detekci původců respiračních onemocnění – chřipky typu A, chřipky typu B a covid-19, který byl vydán jako aplikovaný výsledek ve formě prototypu (Annex 10).

5. Závěr a diskuze

Viry spojované s kontaminovanými potravinami, vodními zdroji a prostředím představují z lékařského a ekonomického hlediska vážný problém. Jsou takřka všudypřítomné a jejich význam a rizika s nimi spojená jsou i přes pokroky v posledních letech stále podhodnoceny. Nicméně, jsou zde určité tendence zavádět mechanismy pro kontrolu přítomnosti těchto patogenních agens a rovněž provádět opatření pro minimalizaci rizik případných kontaminací vodních zdrojů, potravin a prostředí jejich zpracování. V případě těchto kontrolních mechanismů, stejně jako při již existujícím podezření na možnou kontaminaci, je nutné mít k dispozici dostatečně optimalizované a spolehlivé metody detekce pro její včasnou identifikaci.

V posledních letech jsou v případě kontaminace potravin a vodních zdrojů nejčastěji diskutovány NoV, HAV, HEV, AdV a RV. Zvláštní pozornosti se dostává zejména novému koronaviru SARS-CoV-2.

Detekce virů ve vzorcích potravin, vod a prostředí je mnohem náročnější, než je tomu v případě klinických vzorků. Virové částice se v těchto typech vzorků vyskytují většinou ve velmi nízkých koncentracích a navíc je zde i častá přítomnost vysokých koncentrací různých látek inhibujících detekční metody. Existuje nespočet různých přístupů, technik a metod pro analýzu tohoto typu vzorků vykazujících různou míru účinnosti. Tato nejednotnost, spolu s absencí standardizovaných metodik je jedním ze stěžejních problémů této oblasti. V současnosti jsou dostupné standardizované metody pouze pro detekci NoV a HAV a pro omezené typy vzorků (zelenina, drobné ovoce, stěry povrchů potravin a povrchů pro styk s potravinami, mlži a balená voda; Anonymous, 2017, 2019). Z tohoto důvodu je v případě potřeby povětšinou nutné experimentálně ověřit široké spektrum možných potenciálně vhodných metod na

konkrétní požadované matrici / patogenu a na základě získaných dat pak následně zvolit tu nejvhodnější.

V rámci této disertační práce byly provedeny experimenty a studie, kdy byly různé vzorky vod, potravin a prostředí testovány na přítomnost příslušných patogenních virových agens za účelem zjištění rozsahu jejich výskytu. Bylo zapotřebí vytvořit a optimalizovat zcela nové metody pro extrakci virových částic ze vzorků různých typů vod (pitné, užitkové a odpadní) a ovocných a zeleninových šťáv či „smoothies“. Spolu s ostatními již zavedenými byly tyto metody adaptovány pro rutinní potřeby laboratoře Virologie potravin a prostředí ve VÚVeL. Pro samotnou detekci těchto agens je zde využíváno řady optimalizovaných systémů qPCR/RT-qPCR. Tyto systémy umožňují dostatečně citlivou a specifickou detekci konkrétního úseku virového genomu. Nicméně, jejich významnou nevýhodou je omezená možnost vytvářet multiplexní systémy. Limitovaný počet detekčních kanálů / fluorescenčních značek totiž neumožňuje vytvářet dostatečně robustní systémy. Povětšinou jsou v rámci jedné analýzy detekovány maximálně 3 až 4 cíle/sekvence (Anonymous, 2017, 2019; Vasickova et al., 2012; Wong et al., 2008). S narůstajícím počtem cílů navíc většinou dochází i k poklesu citlivosti metody (interference jednotlivých setů primerů, mimocílové interakce či vyčerpání reagentů). Tento fakt může představovat problém v případě detekce zmíněných patogenních virových agens vyznačujících se velmi nízkou infekční dávkou (Bosch et al., 2018; Huang et al., 2011; van Maarseveen et al., 2010). Z tohoto důvodu byl na tomto pracovišti vytvořen a zaveden nový systém využívající xMAP – RT-MOL-PCR. Tato nová metoda umožňuje vytvářet otevřené robustní panely sloužící k detekci několika patogenních agens současně, a tím obejít zmíněné limity qPCR systémů. Použitelnost této metody byla ověřena na reálných vzorcích a rovněž v rámci nezávislých mezilaboratorních kruhových testů. Bylo dosaženo specifity

a citlivosti srovnatelné s qPCR systémy (jednotky či desítky genomových ekvivalentů v izolované DNA/RNA v reakci). Tato metoda tak představuje spolehlivý, dostatečně specifický a citlivý nástroj detekce virů spojených s kontaminacemi potravin, vodních zdrojů a prostředí.

V budoucnu je možné provést další optimalizace zde prezentované metody multiplexní detekce. Jednou z možných je náhrada ligačního enzymu, který představuje jednu z nejvíce ekonomicky náročných položek celé analýzy vzorku. V současnosti však prozatím nebylo možné zvolit levnější a přitom stejně spolehlivou ligázu, která by vyhovovala dané aplikaci. Kromě změny ligačního enzymu je důležitou otázkou i volba směsi pro provedení singleplexní PCR. V současnosti používaný komerční produkt (Elizyme) neumožňuje pracovat s uracilem a uracil DNA glykosylázou, jejichž využití je výhodné pro minimalizaci rizik kontaminace vzorků produkty PCR. Stejně jako v případě ligázy však prozatím nebylo možné dosáhnout stejně kvalitních výsledků s žádným jiným testovaným enzymem či kompletní směsí pro PCR. Testování těchto dvou parametrů lze spojit v rámci teoreticky možného provedení celé analýzy v rámci jedné jediné zkumavky. Taková úprava by vedla k materiální a časové úspoře a ke zjednodušení celého procesu, nicméně, proveditelnost této změny a případná citlivost výsledné metody jsou diskutabilní. Další možnost optimalizace představuje obměna designu ligačních sond. Je možné je navrhnout tak, aby v přítomnosti detekovaného cíle došlo k jejich cirkularizaci. Toto je kombinováno s následným ošetřením vzorku zajišťujícím degradaci všech lineárních DNA (Boland et al., 2018), což by mohlo vést k menším interferencím a ve výsledku tedy i k nižším detekovaným hodnotám pozadí.

6. Bibliografie

- Akhtar, S., Sarker, M. R., & Hossain, A. (2014, Nov). Microbiological food safety: a dilemma of developing societies. *Crit Rev Microbiol*, 40(4), 348-359. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2012.742036>
- Angeloni, S., Das, S., Dunbar, S., Stone, V., & Swift, S. (2018). *xMAP® Cookbook. A collection of methods and protocols for developing multiplex assays with xMAP® Technology* (4 ed.). Luminex Corporation.
- Anonymous. (2017). *ISO 15216-1:2017 Microbiology of the food chain — Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus using real-time RT-PCR — Part 1: Method for quantification*. International Organization for Standardization.
- Anonymous. (2019). *ISO 15216-2:2019 Microbiology of the food chain — Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus using real-time RT-PCR — Part 2: Method for detection*. International Organization for Standardization.
- Atmar, R. L., Opekun, A. R., Gilger, M. A., Estes, M. K., Crawford, S. E., Neill, F. H., Ramani, S., Hill, H., Ferreira, J., & Graham, D. Y. (2014, 2014-4-1). Determination of the 50% Human Infectious Dose for Norwalk Virus. *The Journal of Infectious Diseases*, 209(7), 1016-1022. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit620>
- Bányai, K., Estes, M. K., Martella, V., & Parashar, U. D. (2018). Viral gastroenteritis. *The Lancet*, 392(10142), 175-186. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(18\)31128-0](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(18)31128-0)
- Barany, F. (1991, Jan 1). Genetic disease detection and DNA amplification using cloned thermostable ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(1), 189-193. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.1.189>
- Barker, J. (2001, Jul). The role of viruses in gastrointestinal disease in the home [Article; Proceedings Paper]. *Journal of Infection*, 43(1), 42-44. <https://doi.org/10.1053/jinf.2001.0847>
- Biagini, R. E., Sammons, D. L., Smith, J. P., MacKenzie, B. A., Striley, C. a. F., Semenova, V., Steward-Clark, E., Stamey, K., Freeman, A. E., Quinn, C. P., & Snawder, J. E. (2004, JAN 2004). Comparison of a multiplexed fluorescent covalent microsphere immunoassay and an enzyme-linked immunosorbent assay for measurement of human immunoglobulin G antibodies to anthrax toxins. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 11(1), 50-55. <https://doi.org/10.1128/CDLI.11.1.50-55.2004>
- Bintsis, T. (2017). Foodborne pathogens. *AIMS Microbiol*, 3(3), 529-563. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2017.3.529>

- Boland, C., Van Hessche, M., Mahillon, J., & Wattiau, P. (2018, May). A liquid bead array for the identification and characterization of fljB-positive and fljB-negative monophasic variants of *Salmonella* Typhimurium. *Food Microbiol*, 71, 17-24. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.04.006>
- Boone, S. A., & Gerba, C. P. (2007, Mar). Significance of fomites in the spread of respiratory and enteric viral disease [Review]. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(6), 1687-1696. <https://doi.org/10.1128/aem.02051-06>
- Bosch, A., Gkogka, E., Le Guyader, F. S., Loisy-Hamon, F., Lee, A., van Lieshout, L., Marthi, B., Myrmel, M., Sansom, A., Schultz, A. C., Winkler, A., Zuber, S., & Phister, T. (2018, Nov 20). Foodborne viruses: Detection, risk assessment, and control options in food processing. *Int J Food Microbiol*, 285, 110-128. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.06.001>
- Bosch, A., Pintó, R. M., & Guix, S. (2016, April 2016). Foodborne viruses. *Current Opinion in Food Science*, 8, 110-119. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2016.04.002>
- Cliver, D. O. (2009, Mar). Control of Viral Contamination of Food and Environment [Review]. *Food and Environmental Virology*, 1(1), 3-9. <https://doi.org/10.1007/s12560-008-9005-2>
- Deshpande, A., Gans, J., Graves, S. W., Green, L., Taylor, L., Kim, H. B., Kunde, Y. A., Leonard, P. M., Li, P.-E., Mark, J., Song, J., Vuylsich, M., & White, P. S. (2010, FEB 2010). A rapid multiplex assay for nucleic acid-based diagnostics. *Journal of Microbiological Methods*, 80(2), 155-163. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2009.12.001>
- Dziedzinska, R., Moravkova, M., Hrdy, J., Slana, I., Vlkova, H., Kunstovna, H., & Vasickova, P. (2018a, 2018). Čerstvé džusy a smoothies – sledování výskytu legislativou neregulovaných významných patogenů bakteriálního, virového a parazitárního původu. *Výživa a potraviny*, 73(5), 136-140.
- Dziedzinska, R., Moravkova, M., Hrdy, J., Slana, I., Vlkova, H., Kunstovna, H., & Vasickova, P. (2018b, November 1, 2018). Occurrence of selected viral, bacterial and protozoan pathogens in fresh juices and smoothies in Prague, Czech Republic. *Food Control*, 93, 310-314. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.05.015>
- Dziedzinska, R., Vasickova, P., Hrdy, J., Slany, M., Babak, V., & Moravkova, M. (2018, DEC 2018). Foodborne Bacterial, Viral, and Protozoan Pathogens in Field and Market Strawberries and Environment of Strawberry Farms. *Journal of Food Science*, 83(12), 3069-3075. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14401>
- EFSA, & ECDC. (2017, 12/2017). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. *EFSA Journal*, 15(12). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.5077>

- EFSA, & ECDC. (2018). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. *EFSA Journal*, 16(12), 262. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5500>
- EFSA, & ECDC. (2021, Feb). The European Union One Health 2019 Zoonoses Report. *EFSA J*, 19(2), e06406. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6406>
- Godoy, M. G., Kibenge, M. J. T., & Kibenge, F. S. B. (2021, Apr 15). SARS-CoV-2 transmission via aquatic food animal species or their products: A review. *Aquaculture*, 536, 736460. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736460>
- Graves, N. S. (2013, Sep). Acute gastroenteritis. *Prim Care*, 40(3), 727-741. <https://doi.org/10.1016/j.pop.2013.05.006>
- Han, J., Zhang, X., He, S., & Jia, P. (2020, Oct 1). Can the coronavirus disease be transmitted from food? A review of evidence, risks, policies and knowledge gaps. *Environ Chem Lett*, 1-12. <https://doi.org/10.1007/s10311-020-01101-x>
- Hiscott, J., Alexandridi, M., Muscolini, M., Tassone, E., Palermo, E., Soultioti, M., & Zevini, A. (2020, Jun). The global impact of the coronavirus pandemic. *Cytokine Growth Factor Rev*, 53, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2020.05.010>
- Hrdy, J., & Vasickova, P. (2022). Virus detection methods for different kinds of food and water samples – The importance of molecular techniques. *Food Control*, 134. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108764>
- Hrdy, J., Vasickova, P., Nesvadbova, M., Novotny, J., Mati, T., & Kralik, P. (2021, Jun). MOL-PCR and xMAP Technology: A Multiplex System for Fast Detection of Food- and Waterborne Viruses. *J Mol Diagn*, 23(6), 765-776. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2021.03.005>
- Hu, L., Gao, J., Yao, L., Zeng, L., Liu, Q., Zhou, Q., Zhang, H., Lu, D., Fu, J., Liu, Q. S., Li, M., Zhao, X., Hou, X., Shi, J., Liu, L., Guo, Y., Wang, Y., Ying, G. G., Cai, Y., Yao, M., Cai, Z., Wu, Y., Qu, G., & Jiang, G. (2021, Mar 2). Evidence of Foodborne Transmission of the Coronavirus (COVID-19) through the Animal Products Food Supply Chain. *Environ Sci Technol*, 55(5), 2713-2716. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c06822>
- Huang, Q., Zheng, L., Zhu, Y., Zhang, J., Wen, H., Huang, J., Niu, J., Zhao, X., & Li, Q. (2011, Jan 14). Multicolor combinatorial probe coding for real-time PCR. *PLOS ONE*, 6(1), e16033. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016033>
- Jelinkova, P., Hrdy, J., Markova, J., Dresler, J., Pajer, P., Pavlis, O., Branich, P., Borilova, G., Reichelova, M., Babak, V., Reslova, N., & Kralik, P. (2020, Dec 24). Development and Inter-Laboratory Validation of Diagnostics Panel for Detection of Biothreat Bacteria Based on MOL-PCR Assay. *Microorganisms*, 9(1). <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010038>

- Julian, T. R., & Schwab, K. J. (2012, Feb). Challenges in environmental detection of human viral pathogens [Article]. *Current Opinion in Virology*, 2(1), 78-83. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2011.10.027>
- King, T., Cole, M., Farber, J. M., Eisenbrand, G., Zabararas, D., Fox, E. M., & Hill, J. P. (2017). Food safety for food security: Relationship between global megatrends and developments in food safety. *Trends in Food Science & Technology*, 68, 160-175. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.08.014>
- Ludwig-Begall, L. F., Mauroy, A., & Thiry, E. (2018, Aug). Norovirus recombinants: recurrent in the field, recalcitrant in the lab - a scoping review of recombination and recombinant types of noroviruses. *J Gen Virol*, 99(8), 970-988. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001103>
- Martella, V., Banyai, K., Matthijssens, J., Buonavoglia, C., & Ciarlet, M. (2010, Jan 27). Zoonotic aspects of rotaviruses. *Veterinary Microbiology*, 140(3-4), 246-255. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.08.028>
- Masclaux, F. G., Hotz, P., Friedli, D., Savova-Bianchi, D., & Oppliger, A. (2013, Sep 15). High occurrence of hepatitis E virus in samples from wastewater treatment plants in Switzerland and comparison with other enteric viruses. *Water Res*, 47(14), 5101-5109. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.05.050>
- Matheson, C. D., Gurney, C., Esau, N., & Lehto, R. (2010). Assessing PCR Inhibition from Humic Substances. *The Open Enzyme Inhibition Journal*, 3, 38-45. <https://doi.org/10.2174/1874940201003010038>
- McQuaig, S., Griffith, J., & Harwood, V. J. (2012, 2012-09-15). Association of Fecal Indicator Bacteria with Human Viruses and Microbial Source Tracking Markers at Coastal Beaches Impacted by Nonpoint Source Pollution. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(18), 6423-6432. <https://doi.org/10.1128/AEM.00024-12>
- Meng, X. J. (2010, Jan 27). Hepatitis E virus: Animal reservoirs and zoonotic risk. *Veterinary Microbiology*, 140(3-4), 256-265. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.03.017>
- Mikel, P., Vasickova, P., & Kralik, P. (2015, Jun). Methods for Preparation of MS2 Phage-Like Particles and Their Utilization as Process Control Viruses in RT-PCR and qRT-PCR Detection of RNA Viruses From Food Matrices and Clinical Specimens [Article]. *Food and Environmental Virology*, 7(2), 96-111. <https://doi.org/10.1007/s12560-015-9188-2>
- Mikel, P., Vasickova, P., Tesarik, R., Malenovska, H., Kulich, P., Vesely, T., & Kralik, P. (2016, 2016-12-01). Preparation of MS2 Phage-Like Particles and Their Use As Potential Process Control Viruses for Detection and Quantification of Enteric RNA Viruses in Different Matrices. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01911>
- Mills, A. (2014, Feb 6). Health care systems in low- and middle-income countries. *N Engl J Med*, 370(6), 552-557. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1110897>

Moravkova, M., Vasickova, P., Slany, M., Kolackova, I., Hrady, J., Karpiskova, R., & Kralik, P. (2021). Selected viral, protozoan and bacterial agents on minimally processed vegetables and sprouts at point of sale. *JOURNAL OF FOOD AND NUTRITION RESEARCH*, 60(2), 138-145.

Naghavi, M., Abajobir, A. A., Abbafati, C., Abbas, K. M., Abd-Allah, F., Abera, S. F., Aboyans, V., Adetokunboh, O., Afshin, A., Agrawal, A., Ahmadi, A., Ahmed, M. B., Aichour, A. N., Aichour, M. T. E., Aichour, I., Aiyar, S., Alahdab, F., Al-Aly, Z., Alam, K., Alam, N., Alam, T., Alene, K. A., Al-Eyadhy, A., Ali, S. D., Alizadeh-Navaei, R., Alkaabi, J. M., Alkerwi, A. a., Alla, F., Allebeck, P., Allen, C., Al-Raddadi, R., Alsharif, U., Altirkawi, K. A., Alvis-Guzman, N., Amare, A. T., Amini, E., Ammar, W., Amoako, Y. A., Anber, N., Andersen, H. H., Andrei, C. L., Androudi, S., Ansari, H., Antonio, C. A. T., Anwari, P., Ärnlöv, J., Arora, M., Artaman, A., Aryal, K. K., Asayesh, H., Asgedom, S. W., Atey, T. M., Avila-Burgos, L., Avokpaho, E. F. G., Awasthi, A., Babalola, T. K., Bacha, U., Balakrishnan, K., Barac, A., Barboza, M. A., Barker-Collo, S. L., Barquera, S., Barregard, L., Barrero, L. H., Baune, B. T., Bedi, N., Beghi, E., Béjot, Y., Bekele, B. B., Bell, M. L., Bennett, J. R., Bensenor, I. M., Berhane, A., Bernabé, E., Betsu, B. D., Beuran, M., Bhatt, S., Biadgilign, S., Bienhoff, K., Bikbov, B., Bisanzio, D., Bourne, R. R. A., Breitborde, N. J. K., Bullo, L. N. B., Bumgarner, B. R., Butt, Z. A., Cahuana-Hurtado, L., Cameron, E., Campuzano, J. C., Car, J., Cárdenas, R., Carrero, J. J., Carter, A., Casey, D. C., Castañeda-Orjuela, C. A., Catalá-López, F., Charlson, F. J., Chibueze, C. E., Chimed-Ochir, O., Chisumpa, V. H., Chitheer, A. A., Christopher, D. J., Ciobanu, L. G., Cirillo, M., Cohen, A. J., Colombara, D., Cooper, C., Cowie, B. C., Criqui, M. H., Dandona, L., Dandona, R., Dargan, P. I., das Neves, J., Davitioiu, D. V., Davletov, K., de Courten, B., Defo, B. K., Degenhardt, L., Deiparine, S., Deribe, K., Deribew, A., Dey, S., Dicker, D., Ding, E. L., Djalalinia, S., Do, H. P., Doku, D. T., Douwes-Schultz, D., Driscoll, T. R., Dubey, M., Duncan, B. B., Echko, M., El-Khatib, Z. Z., Ellingsen, C. L., Enayati, A., Ermakov, S. P., Erskine, H. E., Eskandarieh, S., Esteghamati, A., Estep, K., Farinha, C. S. e. S., Faro, A., Farzadfar, F., Feigin, V. L., Fereshtehnejad, S.-M., Fernandes, J. C., Ferrari, A. J., Feyissa, T. R., Filip, I., Finegold, S., Fischer, F., Fitzmaurice, C., Flaxman, A. D., Foigt, N., Frank, T., Fraser, M., Fullman, N., Fürst, T., Furtado, J. M., Gakidou, E., Garcia-Basteiro, A. L., Gebre, T., Gebregergs, G. B., Gebrehiwot, T. T., Gebremichael, D. Y., Geleijnse, J. M., Genova-Maleras, R., Gesesew, H. A., Gething, P. W., Gillum, R. F., Giref, A. Z., Giroud, M., Giussani, G., Godwin, W. W., Gold, A. L., Goldberg, E. M., Gona, P. N., Gopalani, S. V., Gouda, H. N., Goulart, A. C., Griswold, M., Gupta, R., Gupta, T., Gupta, V., Gupta, P. C., Haagsma, J. A., Hafezi-Nejad, N., Hailu, A. D., Hailu, G. B., Hamadeh, R. R., Hambisa, M. T., Hamidi, S., Hammami, M., Hancock, J., Handal, A. J., Hankey, G. J., Hao, Y., Harb, H. L., Hareri, H. A., Hassanvand, M. S., Havmoeller, R., Hay, S. I., He, F., Hedayati, M. T., Henry, N. J., Heredia-Pi, I. B., Herteliu, C., Hoek, H. W., Horino, M., Horita, N., Hosgood, H. D., Hostiuc, S., Hotez, P. J., Hoy, D. G., Huynh, C., Iburg, K. M., Ikeda, C., Ileanu, B. V., Irenso, A. A., Irvine, C. M. S., Islam, S. M. S., Jacobsen, K. H., Jahanmehr, N., Jakovljevic, M. B., Javanbakht, M., Jayaraman, S. P., Jeemon, P., Jha, V., John, D., Johnson, C. O., Johnson, S. C., Jonas, J. B., Jürisson, M., Kabir, Z., Kadel, R., Kahsay, A., Kamal, R., Karch, A., Karimi, S. M., Karimkhani, C., Kasaeian, A., Kassaw, N. A., Kassebaum, N. J., Katikireddi, S. V., Kawakami, N., Keiyoro, P. N., Kemmer, L., Kesavachandran, C. N., Khader, Y. S., Khan, E. A., Khang, Y.-H., Khoja, A. T. A., Khosravi, M. H., Khosravi, A., Khubchandani, J., Kiadaliri, A. A., Kielsing, C., Kievlan, D., Kim, Y. J., Kim, D., Kimokoti, R. W., Kinfu, Y., Kisson, N., Kivimaki, M., Knudsen, A. K., Kopec, J. A., Kosen, S., Koul, P. A., Koyanagi, A., Kulikoff, X. R., Kumar, G. A., Kumar, P., Kutz, M., Kyu, H. H., Lal, D. K., Lalloo, R., Lambert, T. L. N., Lan, Q., Lansingh, V. C., Larsson, A., Lee, P. H., Leigh, J., Leung, J., Levi, M., Li, Y., Li Kappe, D., Liang, X., Liben, M. L., Lim, S. S., Liu, P. Y., Liu, A., Liu, Y., Lodha, R., Logroscino, G., Lorkowski, S., Lotufo, P. A., Lozano, R., Lucas, T.

C. D., Ma, S., Macarayan, E. R. K., Maddison, E. R., Magdy Abd El Razek, M., Majdan, M., Majdzadeh, R., Majeed, A., Malekzadeh, R., Malhotra, R., Malta, D. C., Manguerra, H., Manyazewal, T., Mapoma, C. C., Marczak, L. B., Markos, D., Martinez-Raga, J., Martins-Melo, F. R., Martopullo, I., McAlinden, C., McGaughey, M., McGrath, J. J., Mehata, S., Meier, T., Meles, K. G., Memiah, P., Memish, Z. A., Mengesha, M. M., Mengistu, D. T., Menota, B. G., Mensah, G. A., Meretoja, T. J., Meretoja, A., Milllear, A., Miller, T. R., Minnig, S., Mirarefin, M., Mirrakhimov, E. M., Misganaw, A., Mishra, S. R., Mohamed, I. A., Mohammad, K. A., Mohammadi, A., Mohammed, S., Mokdad, A. H., Mola, G. L. D., Mollenkopf, S. K., Molokhia, M., Monasta, L., Montañez, J. C., Montico, M., Mooney, M. D., Moradi-Lakeh, M., Moraga, P., Morawska, L., Morozoff, C., Morrison, S. D., Mountjoy-Venning, C., Mruts, K. B., Muller, K., Murthy, G. V. S., Musa, K. I., Nachega, J. B., Naheed, A., Naldi, L., Nangia, V., Nascimento, B. R., Nasher, J. T., Natarajan, G., Negoi, I., Ngunjiri, J. W., Nguyen, C. T., Nguyen, Q. L., Nguyen, T. H., Nguyen, G., Nguyen, M., Nichols, E., Ningrum, D. N. A., Nong, V. M., Noubiap, J. J. N., Ogbo, F. A., Oh, I.-H., Okoro, A., Olagunju, A. T., Olsen, H. E., Olusanya, B. O., Olusanya, J. O., Ong, K., Opio, J. N., Oren, E., Ortiz, A., Osman, M., Ota, E., Pa, M., Pacella, R. E., Pakhale, S., Pana, A., Panda, B. K., Panda-Jonas, S., Papachristou, C., Park, E.-K., Patten, S. B., Patton, G. C., Paudel, D., Paulson, K., Pereira, D. M., Perez-Ruiz, F., Perico, N., Pervaiz, A., Petzold, M., Phillips, M. R., Pigott, D. M., Pinho, C., Plass, D., Pletcher, M. A., Polinder, S., Postma, M. J., Pourmalek, F., Purcell, C., Qorbani, M., Quintanilla, B. P. A., Radfar, A., Rafay, A., Rahimi-Movaghar, V., Rahman, M. H. U., Rahman, M., Rai, R. K., Ranabhat, C. L., Rankin, Z., Rao, P. C., Rath, G. K., Rawaf, S., Ray, S. E., Rehm, J., Reiner, R. C., Reitsma, M. B., Remuzzi, G., Rezaei, S., Rezai, M. S., Rokni, M. B., Ronfani, L., Roshandel, G., Roth, G. A., Rothenbacher, D., Ruhago, G. M., Sa, R., Saadat, S., Sachdev, P. S., Sadat, N., Safdarian, M., Safi, S., Safiri, S., Sagar, R., Sahathevan, R., Salama, J., Salamati, P., Salomon, J. A., Samy, A. M., Sanabria, J. R., Sanchez-Niño, M. D., Santomauro, D., Santos, I. S., Santric Milicevic, M. M., Sartorius, B., Satpathy, M., Schmidt, M. I., Schneider, I. J. C., Schulhofer-Wohl, S., Schutte, A. E., Schwebel, D. C., Schwendicke, F., Sepanlou, S. G., Servan-Mori, E. E., Shackelford, K. A., Shahrzad, S., Shaikh, M. A., Shamsipour, M., Shamsizadeh, M., Sharma, J., Sharma, R., She, J., Sheikhabaehi, S., Shey, M., Shi, P., Shields, C., Shigematsu, M., Shiri, R., Shirude, S., Shiue, I., Shoman, H., Shrimme, M. G., Sigfusdottir, I. D., Silpakit, N., Silva, J. P., Singh, J. A., Singh, A., Skiadaresi, E., Sligar, A., Smith, D. L., Smith, A., Smith, M., Sobaih, B. H. A., Soneji, S., Sorensen, R. J. D., Soriano, J. B., Sreeramareddy, C. T., Srinivasan, V., Stanaway, J. D., Stathopoulou, V., Steel, N., Stein, D. J., Steiner, C., Steinke, S., Stokes, M. A., Strong, M., Strub, B., Subart, M., Sufiyan, M. B., Sunguya, B. F., Sur, P. J., Swaminathan, S., Sykes, B. L., Tabarés-Seisdedos, R., Tadakamadla, S. K., Takahashi, K., Takala, J. S., Talongwa, R. T., Tarawneh, M. R., Tavakkoli, M., Taveira, N., Tegegne, T. K., Tehrani-Banihashemi, A., Temsah, M.-H., Terkawi, A. S., Thakur, J. S., Thamsuwan, O., Thankappan, K. R., Thomas, K. E., Thompson, A. H., Thomson, A. J., Thrift, A. G., Tobe-Gai, R., Topor-Madry, R., Torre, A., Tortajada, M., Towbin, J. A., Tran, B. X., Troeger, C., Truelsen, T., Tsoi, D., Tuzcu, E. M., Tyrovolas, S., Ukwaja, K. N., Undurraga, E. A., Updike, R., Uthman, O. A., Uzochukwu, B. S. C., van Boven, J. F. M., Vasankari, T., Venketasubramanian, N., Violante, F. S., Vlassov, V. V., Vollset, S. E., Vos, T., Wakayo, T., Wallin, M. T., Wang, Y.-P., Weiderpass, E., Weintraub, R. G., Weiss, D. J., Werdecker, A., Westerman, R., Whetter, B., Whiteford, H. A., Wijeratne, T., Wiysonge, C. S., Woldeyes, B. G., Wolfe, C. D. A., Woodbrook, R., Workicho, A., Xavier, D., Xiao, Q., Xu, G., Yaghoubi, M., Yakob, B., Yano, Y., Yaseri, M., Yimam, H. H., Yonemoto, N., Yoon, S.-J., Yotebieng, M., Younis, M. Z., Zaidi, Z., Zaki, M. E. S., Zegeye, E. A., Zenebe, Z. M., Zerfu, T. A., Zhang, A. L., Zhang, X., Zipkin, B., Zodpey, S., Lopez, A. D., & Murray, C. J. L. (2017). Global, regional, and national age-sex specific mortality for 264 causes of death, 1980–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet*, 390(10100), 1151-1210. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(17\)32152-9](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(17)32152-9)

- 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. (2010, May). Food-borne diseases - The challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge [Article; Proceedings Paper]. *International Journal of Food Microbiology*, 139, S3-S15. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.01.021>
- O'Shea, H., Blacklaws, B. A., Collins, P. J., McKillen, J., & Fitzgerald, R. (2019). Viruses Associated With Foodborne Infections. In *Reference Module in Life Sciences*. Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.90273-5>
- Oude Munnink, B. B., & van der Hoek, L. (2016, Feb 8). Viruses Causing Gastroenteritis: The Known, The New and Those Beyond. *Viruses*, 8(2). <https://doi.org/10.3390/v8020042>
- Reslova, N., Huvarova, V., Hrdy, J., Kasny, M., & Kralik, P. (2019, Feb 25). A novel perspective on MOL-PCR optimization and MAGPIX analysis of in-house multiplex foodborne pathogens detection assay. *Sci Rep*, 9(1), 2719. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40035-5>
- Roth, G. A., Abate, D., Abate, K. H., Abay, S. M., Abbafati, C., Abbasi, N., Abastabar, H., Abd-Allah, F., Abdela, J., Abdelalim, A., Abdollahpour, I., Abdulkader, R. S., Abebe, H. T., Abebe, M., Abebe, Z., Abejie, A. N., Abera, S. F., Abil, O. Z., Abraha, H. N., Abrham, A. R., Abu-Raddad, L. J., Accrombessi, M. M. K., Acharya, D., Adamu, A. A., Adebayo, O. M., Adedoyin, R. A., Adekanmbi, V., Adetokunboh, O. O., Adhena, B. M., Adib, M. G., Admasie, A., Afshin, A., Agarwal, G., Agesa, K. M., Agrawal, A., Agrawal, S., Ahmadi, A., Ahmadi, M., Ahmed, M. B., Ahmed, S., Aichour, A. N., Aichour, I., Aichour, M. T. E., Akbari, M. E., Akinyemi, R. O., Akseer, N., Al-Aly, Z., Al-Eyadhy, A., Al-Raddadi, R. M., Alahdab, F., Alam, K., Alam, T., Alebel, A., Alene, K. A., Alijanzadeh, M., Alizadeh-Navaei, R., Aljunid, S. M., Alkerwi, A. a., Alla, F., Allebeck, P., Alonso, J., Altirkawi, K., Alvis-Guzman, N., Amare, A. T., Aminde, L. N., Amini, E., Ammar, W., Amoako, Y. A., Anber, N. H., Andrei, C. L., Androudi, S., Animut, M. D., Anjomshoa, M., Ansari, H., Ansha, M. G., Antonio, C. A. T., Anwari, P., Aremu, O., Ärnlöv, J., Arora, A., Arora, M., Artaman, A., Aryal, K. K., Asayesh, H., Asfaw, E. T., Ataro, Z., Atique, S., Atre, S. R., Ausloos, M., Avokpaho, E. F. G. A., Awasthi, A., Quintanilla, B. P. A., Ayele, Y., Ayer, R., Azzopardi, P. S., Babazadeh, A., Bacha, U., Badali, H., Badawi, A., Bali, A. G., Ballesteros, K. E., Banach, M., Banerjee, K., Bannick, M. S., Banoub, J. A. M., Barboza, M. A., Barker-Collo, S. L., Bärnighausen, T. W., Barquera, S., Barrero, L. H., Bassat, Q., Basu, S., Baune, B. T., Baynes, H. W., Bazargan-Hejazi, S., Bedi, N., Beghi, E., Behzadifar, M., Behzadifar, M., Béjot, Y., Bekele, B. B., Belachew, A. B., Belay, E., Belay, Y. A., Bell, M. L., Bello, A. K., Bennett, D. A., Bensenor, I. M., Berman, A. E., Bernabe, E., Bernstein, R. S., Bertolacci, G. J., Beuran, M., Beyranvand, T., Bhalla, A., Bhattarai, S., Bhaumik, S., Bhutta, Z. A., Biadgo, B., Biehl, M. H., Bijani, A., Bikbov, B., Bilano, V., Bililign, N., Bin Sayeed, M. S., Bisanzio, D., Biswas, T., Blacker, B. F., Basara, B. B., Borschmann, R., Bosetti, C., Bozorgmehr, K., Brady, O. J., Brant, L. C., Brayne, C., Brazinova, A., Breitborde, N. J. K., Brenner, H., Briant, P. S., Britton, G., Brugha, T., Busse, R., Butt, Z. A., Callender, C. S. K. H., Campos-Nonato, I. R., Campuzano Rincon, J. C., Cano, J., Car, M., Cárdenas, R., Carreras, G., Carrero, J. J., Carter, A., Carvalho, F., Castañeda-Orjuela, C. A., Castillo Rivas, J., Castle, C. D., Castro, C., Castro, F., Catalá-López, F., Cerin, E., Chaiah, Y., Chang, J.-C., Charlson, F. J., Chaturvedi, P., Chiang, P. P.-C., Chimed-Ochir, O., Chisumpa, V. H., Chittheer, A., Chowdhury, R., Christensen, H., Christopher, D. J., Chung, S.-C., Cicuttini, F. M., Ciobanu, L. G., Cirillo, M., Cohen, A. J., Cooper, L. T., Cortesi, P. A., Cortinovis, M.,

Cousin, E., Cowie, B. C., Criqui, M. H., Cromwell, E. A., Crowe, C. S., Crump, J. A., Cunningham, M., Daba, A. K., Dadi, A. F., Dandona, L., Dandona, R., Dang, A. K., Dargan, P. I., Daryani, A., Das, S. K., Gupta, R. D., Neves, J. D., Dasa, T. T., Dash, A. P., Davis, A. C., Davis Weaver, N., Davitoiu, D. V., Davletov, K., De La Hoz, F. P., De Neve, J.-W., Degefa, M. G., Degenhardt, L., Degfie, T. T., Deiparine, S., Demoz, G. T., Demtsu, B. B., Denova-Gutiérrez, E., Deribe, K., Dervenis, N., Des Jarlais, D. C., Dessie, G. A., Dey, S., Dharmaratne, S. D., Dicker, D., Dinberu, M. T., Ding, E. L., Dirac, M. A., Djalalinia, S., Dokova, K., Doku, D. T., Donnelly, C. A., Dorsey, E. R., Doshi, P. P., Douwes-Schultz, D., Doyle, K. E., Driscoll, T. R., Dubey, M., Dubljanin, E., Duken, E. E., Duncan, B. B., Duraes, A. R., Ebrahimi, H., Ebrahimpour, S., Edessa, D., Edvardsson, D., Eggen, A. E., El Bcheraoui, C., El Sayed Zaki, M., El-Khatib, Z., Elkout, H., Ellingsen, C. L., Endres, M., Endries, A. Y., Er, B., Erskine, H. E., Eshрати, B., Eskandarieh, S., Esmaeili, R., Esteghamati, A., Fakhari, M., Fakhim, H., Faramarzi, M., Fareed, M., Farhadi, F., Farinha, C. S. E. s., Faro, A., Farvid, M. S., Farzadfar, F., Farzaei, M. H., Feigin, V. L., Feigl, A. B., Fentahun, N., Fereshtehnejad, S.-M., Fernandes, E., Fernandes, J. C., Ferrari, A. J., Feyissa, G. T., Filip, I., Finegold, S., Fischer, F., Fitzmaurice, C., Foigt, N. A., Foreman, K. J., Fornari, C., Frank, T. D., Fukumoto, T., Fuller, J. E., Fullman, N., Fürst, T., Furtado, J. M., Futran, N. D., Gallus, S., Garcia-Basteiro, A. L., Garcia-Gordillo, M. A., Gardner, W. M., Gebre, A. K., Gebrehiwot, T. T., Gebremedhin, A. T., Gebremichael, B., Gebremichael, T. G., Gelano, T. F., Geleijnse, J. M., Genova-Maleras, R., Geramo, Y. C. D., Gething, P. W., Gezae, K. E., Ghadami, M. R., Ghadimi, R., Ghasemi Falavarjani, K., Ghasemi-Kasman, M., Ghimire, M., Gibney, K. B., Gill, P. S., Gill, T. K., Gillum, R. F., Ginawi, I. A., Giroud, M., Giussani, G., Goenka, S., Goldberg, E. M., Goli, S., Gómez-Dantés, H., Gona, P. N., Gopalani, S. V., Gorman, T. M., Goto, A., Goulart, A. C., Gnedovskaya, E. V., Grada, A., Grosso, G., Gughani, H. C., Guimaraes, A. L. S., Guo, Y., Gupta, P. C., Gupta, R., Gupta, R., Gupta, T., Gutiérrez, R. A., Gyawali, B., Haagsma, J. A., Hafezi-Nejad, N., Hagos, T. B., Hailegiyorgis, T. T., Hailu, G. B., Haj-Mirzaian, A., Haj-Mirzaian, A., Hamadeh, R. R., Hamidi, S., Handal, A. J., Hankey, G. J., Harb, H. L., Harikrishnan, S., Haro, J. M., Hasan, M., Hassankhani, H., Hassen, H. Y., Havmoeller, R., Hay, R. J., Hay, S. I., He, Y., Hedayatizadeh-Omran, A., Hegazy, M. I., Heibati, B., Heidari, M., Hendrie, D., Henok, A., Henry, N. J., Herteliu, C., Heydarpour, F., Heydarpour, P., Heydarpour, S., Hibstu, D. T., Hoek, H. W., Hole, M. K., Homaie Rad, E., Hoogar, P., Hosgood, H. D., Hosseini, S. M., Hosseinzadeh, M., Hostiuc, M., Hostiuc, S., Hotez, P. J., Hoy, D. G., Hsiao, T., Hu, G., Huang, J. J., Hussein, A., Hussen, M. M., Hutfless, S., Idrisov, B., Ilesanmi, O. S., Iqbal, U., Irvani, S. S. N., Irvine, C. M. S., Islam, N., Islam, S. M. S., Islami, F., Jacobsen, K. H., Jahangiry, L., Jahanmehr, N., Jain, S. K., Jakovljevic, M., Jalu, M. T., James, S. L., Javanbakht, M., Jayatilleke, A. U., Jeemon, P., Jenkins, K. J., Jha, R. P., Jha, V., Johnson, C. O., Johnson, S. C., Jonas, J. B., Joshi, A., Jozwiak, J. J., Jungari, S. B., Jürisson, M., Kabir, Z., Kadel, R., Kahsay, A., Kalani, R., Karami, M., Karami Matin, B., Karch, A., Karema, C., Karimi-Sari, H., Kasaeian, A., Kassa, D. H., Kassa, G. M., Kassa, T. D., Kassebaum, N. J., Katikireddi, S. V., Kaul, A., Kazemi, Z., Karyani, A. K., Kazi, D. S., Kefale, A. T., Keiyoro, P. N., Kemp, G. R., Kengne, A. P., Keren, A., Kesavachandran, C. N., Khader, Y. S., Khafaei, B., Khafaeie, M. A., Khajavi, A., Khalid, N., Khalil, I. A., Khan, E. A., Khan, M. S., Khan, M. A., Khang, Y.-H., Khater, M. M., Khoja, A. T., Khosravi, A., Khosravi, M. H., Khubchandani, J., Kiadaliri, A. A., Kibret, G. D., Kidanemariam, Z. T., Kiiirithio, D. N., Kim, D., Kim, Y.-E., Kim, Y. J., Kimokoti, R. W., Kinfu, Y., Kisa, A., Kissimova-Skarbek, K., Kivimäki, M., Knudsen, A. K. S., Kocarnik, J. M., Kochhar, S., Kokubo, Y., Kolola, T., Kopec, J. A., Koul, P. A., Koyanagi, A., Kravchenko, M. A., Krishan, K., Kuate Defo, B., Kucuk Bicer, B., Kumar, G. A., Kumar, M., Kumar, P., Kutz, M. J., Kuzin, I., Kyu, H. H., Lad, D. P., Lad, S. D., Lafranconi, A., Lal, D. K., Lalloo, R., Lallukka, T., Lam, J. O., Lami, F. H., Lansingh, V. C., Lansky, S., Larson, H. J., Latifi, A., Lau, K. M.-M., Lazarus, J. V., Lebedev, G., Lee, P. H., Leigh, J., Leili, M., Leshargie, C. T., Li, S., Li, Y., Liang, J., Lim, L.-L., Lim, S. S., Limenih, M.

A., Linn, S., Liu, S., Liu, Y., Lodha, R., Lonsdale, C., Lopez, A. D., Lorkowski, S., Lotufo, P. A., Lozano, R., Lunevicius, R., Ma, S., Macarayan, E. R. K., Mackay, M. T., MacLachlan, J. H., Maddison, E. R., Madotto, F., Magdy Abd El Razek, H., Magdy Abd El Razek, M., Maghavani, D. P., Majdan, M., Majdzadeh, R., Majeed, A., Malekzadeh, R., Malta, D. C., Manda, A.-L., Mandarano-Filho, L. G., Manguerra, H., Mansournia, M. A., Mapoma, C. C., Marami, D., Maravilla, J. C., Marcenes, W., Marczak, L., Marks, A., Marks, G. B., Martinez, G., Martins-Melo, F. R., Martopullo, I., März, W., Marzan, M. B., Masci, J. R., Massenburg, B. B., Mathur, M. R., Mathur, P., Matzopoulos, R., Maulik, P. K., Mazidi, M., McAlinden, C., McGrath, J. J., McKee, M., McMahan, B. J., Mehata, S., Mehndiratta, M. M., Mehrotra, R., Mehta, K. M., Mehta, V., Mekonnen, T. C., Melese, A., Melku, M., Memiah, P. T. N., Memish, Z. A., Mendoza, W., Mengistu, D. T., Mengistu, G., Mensah, G. A., Mereta, S. T., Meretoja, A., Meretoja, T. J., Mestrovic, T., Mezgebe, H. B., Miazgowski, B., Miazgowski, T., Milllear, A. I., Miller, T. R., Miller-Petrie, M. K., Mini, G. K., Mirabi, P., Mirarefin, M., Mirica, A., Mirakhimov, E. M., Misganaw, A. T., Mitiku, H., Moazen, B., Mohammad, K. A., Mohammadi, M., Mohammadifard, N., Mohammed, M. A., Mohammed, S., Mohan, V., Mokdad, A. H., Molokhia, M., Monasta, L., Moradi, G., Moradi-Lakeh, M., Moradinazar, M., Moraga, P., Morawska, L., Moreno Velásquez, I., Morgado-Da-Costa, J., Morrison, S. D., Moschos, M. M., Mouodi, S., Mousavi, S. M., Muchie, K. F., Mueller, U. O., Mukhopadhyay, S., Muller, K., Mumford, J. E., Musa, J., Musa, K. I., Mustafa, G., Muthupandian, S., Nachega, J. B., Nagel, G., Naheed, A., Nahvijou, A., Naik, G., Nair, S., Najafi, F., Naldi, L., Nam, H. S., Nangia, V., Nansseu, J. R., Nascimento, B. R., Natarajan, G., Neamati, N., Negoi, I., Negoi, R. I., Neupane, S., Newton, C. R. J., Ngalesoni, F. N., Ngunjiri, J. W., Nguyen, A. Q., Nguyen, G., Nguyen, H. T., Nguyen, H. T., Nguyen, L. H., Nguyen, M., Nguyen, T. H., Nichols, E., Ningrum, D. N. A., Nirayo, Y. L., Nixon, M. R., Nolutshungu, N., Nomura, S., Norheim, O. F., Noroozi, M., Norrving, B., Noubiap, J. J., Nouri, H. R., Nourollahpour Shiadeh, M., Nowroozi, M. R., Nyasulu, P. S., Odell, C. M., Ofori-Asenso, R., Ogbo, F. A., Oh, I.-H., Oladimeji, O., Olagunju, A. T., Olivares, P. R., Olsen, H. E., Olusanya, B. O., Olusanya, J. O., Ong, K. L., Ong, S. K. S., Oren, E., Orpana, H. M., Ortiz, A., Ortiz, J. R., Otstavnov, S. S., Øverland, S., Owolabi, M. O., Özdemir, R., P A, M., Pacella, R., Pakhale, S., Pakhare, A. P., Pakpour, A. H., Pana, A., Panda-Jonas, S., Pandian, J. D., Parisi, A., Park, E.-K., Parry, C. D. H., Parsian, H., Patel, S., Pati, S., Patton, G. C., Paturi, V. R., Paulson, K. R., Pereira, A., Pereira, D. M., Perico, N., Pesudovs, K., Petzold, M., Phillips, M. R., Piel, F. B., Pigott, D. M., Pillay, J. D., Pirsahab, M., Pishgar, F., Polinder, S., Postma, M. J., Pourshams, A., Poustchi, H., Pujar, A., Prakash, S., Prasad, N., Purcell, C. A., Qorbani, M., Quintana, H., Quistberg, D. A., Rade, K. W., Radfar, A., Rafay, A., Rafiei, A., Rahim, F., Rahimi, K., Rahimi-Movaghar, A., Rahman, M., Rahman, M. H. U., Rahman, M. A., Rai, R. K., Rajsic, S., Ram, U., Ranabhat, C. L., Ranjan, P., Rao, P. C., Rawaf, D. L., Rawaf, S., Razo-García, C., Reddy, K. S., Reiner, R. C., Reitsma, M. B., Remuzzi, G., Renzaho, A. M. N., Resnikoff, S., Rezaei, S., Rezaeian, S., Rezai, M. S., Riahi, S. M., Ribeiro, A. L. P., Rios-Blancas, M. J., Roba, K. T., Roberts, N. L. S., Robinson, S. R., Roeber, L., Ronfani, L., Roshandel, G., Rostami, A., Rothenbacher, D., Roy, A., Rubagotti, E., Sachdev, P. S., Saddik, B., Sadeghi, E., Safari, H., Safdarian, M., Safi, S., Safiri, S., Sagar, R., Sahebkar, A., Sahraian, M. A., Salam, N., Salama, J. S., Salamati, P., Saldanha, R. D. F., Saleem, Z., Salimi, Y., Salvi, S. S., Salz, I., Sambala, E. Z., Samy, A. M., Sanabria, J., Sanchez-Niño, M. D., Santomauro, D. F., Santos, I. S., Santos, J. V., Milicevic, M. M. S., Sao Jose, B. P., Sarker, A. R., Sarmiento-Suárez, R., Sarrafzadegan, N., Sartorius, B., Sarvi, S., Sathian, B., Satpathy, M., Sawant, A. R., Sawhney, M., Saxena, S., Sayyah, M., Schaeffner, E., Schmidt, M. I., Schneider, I. J. C., Schöttker, B., Schutte, A. E., Schwebel, D. C., Schwendicke, F., Scott, J. G., Sekerija, M., Sepanlou, S. G., Serván-Mori, E., Seyedmousavi, S., Shabaninejad, H., Shackelford, K. A., Shafieesabet, A., Shahbazi, M., Shaheen, A. A., Shaikh, M. A., Shams-Beyranvand, M., Shamsi, M., Shamsizadeh, M., Sharafi, K., Sharif, M., Sharif-Alhoseini, M., Sharma, R., She, J., Sheikh, A., Shi, P., Shiferaw, M. S., Shigematsu,

M., Shiri, R., Shirkoohi, R., Shiue, I., Shokraneh, F., Shrimel, M. G., Si, S., Siabani, S., Siddiqi, T. J., Sigfusdottir, I. D., Sigurvinsdottir, R., Silberberg, D. H., Silva, D. A. S., Silva, J. P., Silva, N. T. D., Silveira, D. G. A., Singh, J. A., Singh, N. P., Singh, P. K., Singh, V., Sinha, D. N., Sliwa, K., Smith, M., Sobaih, B. H., Sobhani, S., Sobngwi, E., Soneji, S. S., Soofi, M., Sorensen, R. J. D., Soriano, J. B., Soyiri, I. N., Sposato, L. A., Sreeramareddy, C. T., Srinivasan, V., Stanaway, J. D., Starodubov, V. I., Stathopoulou, V., Stein, D. J., Steiner, C., Stewart, L. G., Stokes, M. A., Subart, M. L., Sudaryanto, A., Sufiyan, M. a. B., Sur, P. J., Sutradhar, I., Sykes, B. L., Sylaja, P. N., Sylte, D. O., Szoeki, C. E. I., Tabarés-Seisdedos, R., Tabuchi, T., Tadakamadla, S. K., Takahashi, K., Tandon, N., Tassew, S. G., Taveira, N., Tehrani-Banihashemi, A., Tekalign, T. G., Tekle, M. G., Temsah, M.-H., Temsah, O., Terkawi, A. S., Teshale, M. Y., Tessema, B., Tessema, G. A., Thankappan, K. R., Thirunavukkarasu, S., Thomas, N., Thrift, A. G., Thurston, G. D., Tilahun, B., To, Q. G., Tobe-Gai, R., Tonelli, M., Topor-Madry, R., Torre, A. E., Tortajada-Girbés, M., Touvier, M., Tovani-Palone, M. R., Tran, B. X., Tran, K. B., Tripathi, S., Troeger, C. E., Truelsen, T. C., Truong, N. T., Tsadik, A. G., Tsoi, D., Tudor Car, L., Tuzcu, E. M., Tyrovolas, S., Ukwaja, K. N., Ullah, I., Undurraga, E. A., Updike, R. L., Usman, M. S., Uthman, O. A., Uzun, S. B., Vaduganathan, M., Vaezi, A., Vaidya, G., Valdez, P. R., Varavikova, E., Vasankari, T. J., Venketasubramanian, N., Villafaina, S., Violante, F. S., Vladimirov, S. K., Vlassov, V., Vollset, S. E., Vos, T., Wagner, G. R., Wagnew, F. S., Waheed, Y., Wallin, M. T., Walson, J. L., Wang, Y., Wang, Y.-P., Wassie, M. M., Weiderpass, E., Weintraub, R. G., Weldegebreal, F., Weldegwergs, K. G., Werdecker, A., Werkneh, A. A., West, T. E., Westerman, R., Whiteford, H. A., Widecka, J., Wilner, L. B., Wilson, S., Winkler, A. S., Wiysonge, C. S., Wolfe, C. D. A., Wu, S., Wu, Y.-C., Wyper, G. M. A., Xavier, D., Xu, G., Yadgir, S., Yadollahpour, A., Yahyazadeh Jabbari, S. H., Yakob, B., Yan, L. L., Yano, Y., Yaseri, M., Yasin, Y. J., Yentür, G. K., Yeshaneh, A., Yimer, E. M., Yip, P., Yirsaw, B. D., Yisma, E., Yonemoto, N., Yonga, G., Yoon, S.-J., Yotebieng, M., Younis, M. Z., Yousefifard, M., Yu, C., Zadnik, V., Zaidi, Z., Zaman, S. B., Zamani, M., Zare, Z., Zeleke, A. J., Zenebe, Z. M., Zhang, A. L., Zhang, K., Zhou, M., Zodpey, S., Zuhlke, L. J., Naghavi, M., & Murray, C. J. L. (2018, 11/2018). Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *The Lancet*, 392(10159), 1736-1788. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32203-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32203-7)

Simsek, C., Corman, V. M., Everling, H. U., Lukashev, A. N., Rasche, A., Maganga, G. D., Binger, T., Jansen, D., Beller, L., Deboutte, W., Gloza-Rausch, F., Seebens-Hoyer, A., Jordanov, S., Sylverken, A., Oppong, S., Sarkodie, Y. A., Vallo, P., Leroy, E. M., Bourgarel, M., Yinda, K. C., Van Ranst, M., Drosten, C., Drexler, J. F., & Matthijssens, J. (2021, Jan 19). At Least Seven Distinct Rotavirus Genotype Constellations in Bats with Evidence of Reassortment and Zoonotic Transmissions. *mBio*, 12(1). <https://doi.org/10.1128/mBio.02755-20>

Sisay, Z., Djikeng, A., Berhe, N., Belay, G., Abegaz, W. E., Wang, Q. H., & Saif, L. J. (2016, Oct). First detection and molecular characterization of sapoviruses and noroviruses with zoonotic potential in swine in Ethiopia. *Arch Virol*, 161(10), 2739-2747. <https://doi.org/10.1007/s00705-016-2974-9>

Smith, D. B., Van der Poel, W. H. M., Meng, X.-J., Koenig, M., Harrison, T. J., Oliveira-Filho, E. F., Johne, R., Purdy, M. A., Ulrich, R. G., Simmonds, P., Jameel, S., Okamoto, H., & Izopet, J. (2016, 2016-03-01). Proposed reference sequences for hepatitis E virus subtypes. *Journal of General Virology*, 97(3), 537-542. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000393>

- Stucki, D., Malla, B., Hostettler, S., Huna, T., Feldmann, J., Yeboah-Manu, D., Borrell, S., Fenner, L., Comas, I., Coscolla, M., & Gagneux, S. (2012). Two new rapid SNP-typing methods for classifying *Mycobacterium tuberculosis* complex into the main phylogenetic lineages. *PLOS ONE*, 7(7), e41253. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041253>
- Tang, Y.-W., & Stratton, C. W. (2013). *Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology* (2 ed.). Springer US.
- Teunis, P. F. M., Moe, C. L., Liu, P., Miller, S. E., Lindesmith, L., Baric, R. S., Le Pendu, J., & Calderon, R. L. (2008, Aug). Norwalk virus: How infectious is it? [Article]. *Journal of Medical Virology*, 80(8), 1468-1476. <https://doi.org/10.1002/jmv.21237>
- Thierry, S., Hamidjaja, R. A., Girault, G., Lofstrom, C., Ruuls, R., & Sylviane, D. (2013, Dec). A multiplex bead-based suspension array assay for interrogation of phylogenetically informative single nucleotide polymorphisms for *Bacillus anthracis*. *J Microbiol Methods*, 95(3), 357-365. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2013.10.004>
- Troeger, C., Blacker, B. F., Khalil, I. A., Rao, P. C., Cao, S., Zimsen, S. R. M., Albertson, S. B., Stanaway, J. D., Deshpande, A., Abebe, Z., Alvis-Guzman, N., Amare, A. T., Asgedom, S. W., Anteneh, Z. A., Antonio, C. A. T., Aremu, O., Asfaw, E. T., Atey, T. M., Atique, S., Avokpaho, E. F. G. A., Awasthi, A., Ayele, H. T., Barac, A., Barreto, M. L., Bassat, Q., Belay, S. A., Bensenor, I. M., Bhutta, Z. A., Bijani, A., Bizuneh, H., Castañeda-Orjuela, C. A., Dadi, A. F., Dandona, L., Dandona, R., Do, H. P., Dubey, M., Dubljanin, E., Edessa, D., Endries, A. Y., Eshrati, B., Farag, T., Feyissa, G. T., Foreman, K. J., Forouzanfar, M. H., Fullman, N., Gething, P. W., Gishu, M. D., Godwin, W. W., Gughani, H. C., Gupta, R., Hailu, G. B., Hassen, H. Y., Hibstu, D. T., Ilesanmi, O. S., Jonas, J. B., Kahsay, A., Kang, G., Kasaeian, A., Khader, Y. S., Khalil, I. A., Khan, E. A., Khan, M. A., Khang, Y.-H., Kisosoon, N., Kochhar, S., Kotloff, K. L., Koyanagi, A., Kumar, G. A., Magdy Abd El Razek, H., Malekzadeh, R., Malta, D. C., Mehata, S., Mendoza, W., Mengistu, D. T., Menota, B. G., Mezgebe, H. B., Mlashu, F. W., Murthy, S., Naik, G. A., Nguyen, C. T., Nguyen, T. H., Ningrum, D. N. A., Ogbo, F. A., Olagunju, A. T., Paudel, D., Platts-Mills, J. A., Qorbani, M., Rafay, A., Rai, R. K., Rana, S. M., Ranabhat, C. L., Rasella, D., Ray, S. E., Reis, C., Renzaho, A. M. N., Rezai, M. S., Ruhago, G. M., Safiri, S., Salomon, J. A., Sanabria, J. R., Sartorius, B., Sawhney, M., Sepanlou, S. G., Shigematsu, M., Sisay, M., Somayaji, R., Sreeramareddy, C. T., Sykes, B. L., Taffere, G. R., Topor-Madry, R., Tran, B. X., Tuem, K. B., Ukwaja, K. N., Vollset, S. E., Walson, J. L., Weaver, M. R., Weldegewergs, K. G., Werdecker, A., Workicho, A., Yenesew, M., Yirsaw, B. D., Yonemoto, N., El Sayed Zaki, M., Vos, T., Lim, S. S., Naghavi, M., Murray, C. J. L., Mokdad, A. H., Hay, S. I., & Reiner, R. C. (2018). Estimates of the global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of diarrhoea in 195 countries: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet Infectious Diseases*, 18(11), 1211-1228. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(18\)30362-1](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(18)30362-1)
- Van der Poel, W. H. (2014, 02/2014). Food and environmental routes of Hepatitis E virus transmission. *Current Opinion in Virology*, 4, 91-96. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2014.01.006>

- van Maarseveen, N. M., Wessels, E., de Brouwer, C. S., Vossen, A. C., & Claas, E. C. (2010, Nov). Diagnosis of viral gastroenteritis by simultaneous detection of Adenovirus group F, Astrovirus, Rotavirus group A, Norovirus genogroups I and II, and Sapovirus in two internally controlled multiplex real-time PCR assays. *J Clin Virol*, *49*(3), 205-210. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2010.07.019>
- Vasickova, P., Kralik, P., Slana, I., & Pavlik, I. (2012, March 1, 2012). Optimisation of a triplex real time RT-PCR for detection of hepatitis E virus RNA and validation on biological samples. *Journal of Virological Methods*, *180*(1), 38-42. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2011.12.007>
- Villabruna, N., Izquierdo Lara, R. W., Szarvas, J., Koopmans, M. P. G., & Graaf, M. (2020, Nov 10). Phylogenetic Investigation of Norovirus Transmission between Humans and Animals. *Viruses*, *12*(11). <https://doi.org/10.3390/v12111287>
- Villabruna, N., Koopmans, M. P. G., & de Graaf, M. (2019, May 25). Animals as Reservoir for Human Norovirus. *Viruses*, *11*(5). <https://doi.org/10.3390/v11050478>
- von Wulffen, M., Westhölter, D., Lütgehetmann, M., & Pischke, S. (2017, 2017-12-28). Hepatitis E: Still Waters Run Deep. *Journal of Clinical and Translational Hepatology*, *5*(4), 1-8. <https://doi.org/10.14218/JCTH.2017.00030>
- Walker, G. T., Fraiser, M. S., Schram, J. L., Little, M. C., Nadeau, J. G., & Malinowski, D. P. (1992, Apr). STRAND DISPLACEMENT AMPLIFICATION - AN ISOTHERMAL, INVITRO DNA AMPLIFICATION TECHNIQUE [Article]. *Nucleic Acids Research*, *20*(7), 1691-1696. <https://doi.org/10.1093/nar/20.7.1691>
- Wang, J., Li, N., Zhang, H., Li, F., Fanning, S., & Jiang, T. (2021, Feb). Detection of Hepatitis E Virus in the Pig Livers and Retail Pork Samples Collected in Selected Cities in China. *Foodborne Pathog Dis*, *18*(2), 97-103. <https://doi.org/10.1089/fpd.2020.2837>
- Wardlaw, T., Salama, P., Brocklehurst, C., Chopra, M., & Mason, E. (2010). Diarrhoea: why children are still dying and what can be done. *The Lancet*, *375*(9718), 870-872. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(09\)61798-0](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(09)61798-0)
- White, P. A., Netzler, N. E., & S., H. G. (2016). *Foodborne Viral Pathogens*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781315392301>
- Widen, F., Vagsholm, I., Belak, S., & Muradrasoli, S. (2011, Nov). Achievement V - Methods for breaking the transmission of pathogens along the food chain Detection of viruses in food [Article]. *Trends in Food Science & Technology*, *22*, S49-S57. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.05.008>
- Wong, S., Pabbaraju, K., Pang, X. L., Lee, B. E., & Fox, J. D. (2008, May). Detection of a broad range of human adenoviruses in respiratory tract samples using a sensitive multiplex real-time PCR assay. *J Med Virol*, *80*(5), 856-865. <https://doi.org/10.1002/jmv.21136>

- Woods, T. A., Mendez, H. M., Ortega, S., Shi, X., Marx, D., Bai, J., Moxley, R. A., Nagaraja, T. G., Graves, S. W., & Deshpande, A. (2016). Development of 11-Plex MOL-PCR Assay for the Rapid Screening of Samples for Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. *Front Cell Infect Microbiol*, 6, 92. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00092>
- Wuyts, V., Roosens, N. H., Bertrand, S., Marchal, K., & De Keersmaecker, S. C. (2015). Guidelines for optimisation of a multiplex oligonucleotide ligation-PCR for characterisation of microbial pathogens in a microsphere suspension array. *Biomed Res Int*, 2015, 790170. <https://doi.org/10.1155/2015/790170>
- Wyer, M. D., Wyn-Jones, A. P., Kay, D., Au-Yeung, H.-K. C., Gironés, R., López-Pila, J., de Roda Husman, A. M., Rutjes, S., & Schneider, O. (2012, 9/2012). Relationships between human adenoviruses and faecal indicator organisms in European recreational waters. *Water Research*, 46(13), 4130-4141. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.04.008>
- Yezli, S., & Otter, J. A. (2011). Minimum Infective Dose of the Major Human Respiratory and Enteric Viruses Transmitted Through Food and the Environment. *Food and Environmental Virology*, 3(1), 1-30. <https://doi.org/10.1007/s12560-011-9056-7>
- Yugo, D. M., & Meng, X. J. (2013, Sep 25). Hepatitis E virus: foodborne, waterborne and zoonotic transmission. *Int J Environ Res Public Health*, 10(10), 4507-4533. <https://doi.org/10.3390/ijerph10104507>
- Zhang, D., Ling, H., Huang, X., Li, J., Li, W., Yi, C., Zhang, T., Jiang, Y., He, Y., Deng, S., Zhang, X., Wang, X., Liu, Y., Li, G., & Qu, J. (2020, Nov 1). Potential spreading risks and disinfection challenges of medical wastewater by the presence of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) viral RNA in septic tanks of Fangcang Hospital. *Sci Total Environ*, 741, 140445. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140445>
- Zhang, J., Fang, X., Mao, Y., Qi, H., Wu, J., Liu, X., You, F., Zhao, W., Chen, Y., & Zheng, L. (2021, Jun 1). Real-time, selective, and low-cost detection of trace level SARS-CoV-2 spike-protein for cold-chain food quarantine. *NPJ Sci Food*, 5(1), 12. <https://doi.org/10.1038/s41538-021-00094-3>