



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Sciences

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

**EBV jako příčina infekční mononukleózy, jeho
laboratorní diagnostika a další onemocnění jím
vyvolaná.**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program: **LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA**

Autor: Tereza Brůžková

Vedoucí práce: Mgr. Barbora Parýzková

České Budějovice 2025

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem „*EBV jako příčina infekční mononukleózy, jeho laboratorní diagnostika a další onemocnění jím vyvolaná.*“ jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby bakalářské práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé bakalářské práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 7.8 2025

.....

Tereza Brůžková

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucí své bakalářské práce, paní Mgr. Barboře Parýzkové, za její trpělivost, čas, nápady a rady, které mi poskytla během zpracování této práce.

Poděkování dále patří kolektivu imunologické laboratoře EUC Praha za odbornou spolupráci, cenné rady a umožnění provedení laboratorních analýz.

Dále bych ráda poděkovala paní MUDr. Daně Teislerové a celému kolektivu Pracoviště virologie NEMCB za poskytnutí potřebných dat, cenné připomínky a ochotu mi věnovat svůj čas.

V neposlední řadě děkuji své rodině a přátelům ze jejich podporu a trpělivost.

EBV jako příčina infekční mononukleózy, jeho laboratorní diagnostika a další onemocnění jím vyvolaná.

Abstrakt

Tato bakalářská práce je zaměřena na podrobnou charakteristiku viru Epstein-Barrové, který je významným původcem infekční mononukleózy postihující přibližně 35-50 % dospívajících jedinců. Virus je dále spojován s rozvojem řady dalších onemocnění, včetně onkohematologických (lymfomů) a autoimunitních onemocnění. Laboratorní diagnostika EBV je založena především na průkazu protilátek proti virovým antigenům. Cílem práce bylo vyhodnotit vztah mezi přítomností protilátek proti EBV, věkem vyšetřovaných osob a výskytem onemocnění. Výsledky ukázaly, že 77 % analyzovaných vzorků bylo pozitivních a nejvyšší výskyt protilátek byl zaznamenán u dospělých osob ve věku 31 až 50 let. Přítomnost protilátek ale nesouvisela s konkrétním onemocněním, resp. autoimunitním či onkohematologickým onemocněním (lymfomem). Dalším cílem práce bylo provést srovnání vybraných analytických metod CLIA, EIA a IFA využívaných k diagnostice EBV. Na základě výsledků bylo vyhodnoceno, že kromě metody EIA či IFA se jako vhodná jeví také metoda CLIA.

Klíčová slova

Epstein-Barrové virus (EBV); infekční mononukleóza (IM); autoimunitní onemocnění; lymfomy, EBV-asociovaná onemocnění; laboratorní diagnostika; VCA IgG; VCA IgM; EBNA-1 IgG; EA(D) IgG; CLIA; EIA; IFA

EBV as a cause of infectious mononucleosis, laboratory diagnostics and other diseases caused by it.

Abstrakt

This bachelor's thesis summarizes the detailed characterization of Epstein-Barr virus, which is an important agent of infectious mononucleosis affecting approximately 35-50 % of adolescents. The virus is also associated with other diseases, including oncohematological (lymfoma) or autoimmune diseases. Laboratory diagnostics of EBV is primarily based on the detection of antibodies to antigens of virus. The aim of this bachelor's thesis was to evaluate the relation between the antibodies to EBV, age of the patients and the incidence of the diseases. The results showed that 77 % of the analyzed samples were positive and the highest presence of antibodies was detected in adults at the age from 31 to 50 years. The presence of antibodies was not related to the specific disease, i.e., autoimmune or oncohematological diseases (lymfoma). Another aim of this thesis was to make a comparison of selected analytical methods CLIA, EIA and IFA used for diagnostics of EBV. From the results, it was evaluated that, the CLIA method is also suitable, in addition to the EIA and IFA methods.

Key words

Epstein-Barr virus (EBV); infectious mononucleosis (IM); autoimmune diseases, lymphoma; EBV-associated diseases; laboratory diagnostics; VCA IgG; VCA IgM; EBNA-1 IgG; EA(D) IgG; CLIA; EIA; IFA

Obsah

Úvod.....	8
1 VIRY.....	10
2 HERPETICKÉ VIRY	11
2.1 Charakteristika herpetických virů	11
2.2 Klasifikace herpetických virů	12
3 EPSTEIN-BARROVÉ VIRUS.....	14
3.1 Objev viru Epstein-Barrové.....	14
3.2 Struktura EBV.....	14
3.3 Virové antigeny.....	15
3.4 Vstup EBV do hostitelské buňky	16
3.5 Replikační cyklus.....	18
3.5.1 Lytická fáze	18
3.5.2 Latentní fáze	18
3.6 Onemocnění spojená s EBV	19
3.6.1 Infekční onemocnění	19
3.6.2 Nádorová onemocnění.....	20
3.6.3 Autoimunitní onemocnění	21
3.7 Laboratorní diagnostika EBV	23
3.7.1 Nepřímé nespecifické metody	23
3.7.2 Nepřímé specifické metody	24
3.7.3 Přímé metody.....	28
3.7.4 Metody detekce infekce EBV a jejich využití v jednotlivých fázích infekce..	29
4 CÍLE PRÁCE A HYPOTÉZY	30
5 METODIKA.....	31
5.1 Úvod do metodiky.....	31
5.2 Chemiluminiscenční imunoanalytická metoda (CLIA).....	31
5.2.1 Vyšetřovaný materiál	31
5.2.2 Princip metody.....	32
5.2.3 Přístrojové vybavení.....	33
5.2.4 Diagnostická souprava	34
5.2.5 Pracovní postup.....	36
5.2.6 Interpretace výsledků	36
5.3 EIA	38
5.3.1 Princip metody.....	38

5.3.2	Složení soupravy a další potřebné vybavení.....	39
5.3.3	Pracovní postup.....	40
5.3.4	Interpretace výsledků	40
5.4	IFA	42
5.4.1	Princip metody	42
5.4.2	IFA souprava a další potřebné vybavení	43
5.4.3	Pracovní postup.....	43
5.4.4	Interpretace výsledků	44
6	VÝSLEDKY	45
6.1	Počet vyšetřovaných pacientů metodou CLIA	45
6.2	Zastoupení pozitivního nálezu protilátek	46
6.3	Výskyt specifických protilátek proti jednotlivým antigenům EBV	47
6.4	Interpretace nálezů dle výskytu specifických protilátek proti antigenům EBV... ..	49
6.5	Tabulka pozitivních nálezů v souvislosti s diagnózou	50
6.6	Srovnání použitých laboratorních metod.....	51
7	DISKUZE.....	53
8	ZÁVĚR	56
9	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	57
10	SEZNAM ZKRATEK.....	62
11	SEZNAM OBRÁZKŮ	66
12	SEZNAM PŘÍLOH.....	67

Úvod

Epstein-Barrové virus (EBV) je první objevený lidský onkogenní herpetický virus, který patří do čeledi *Gammaherpesvirinae*. Rozlišují se dva podtypy EBV a to EBV 1. typu, který je rozšířený celosvětově, a EBV 2. typu, vyskytující se převážně v Africe (Houen & Trier, 2021). EBV primárně infikuje B-lymfocyty, a také epitelové buňky. V těchto buňkách probíhá buď lytická nebo latentní fáze infekce. Podle exprese virových genů může infekce přecházet z primární do perzistující formy, a může se podílet na rozvoji různých onemocnění (Rozman et al., 2022).

Nejčastějším onemocněním způsobeným virem Epstein-Barrové je infekční mononukleóza (IM), která postihuje přibližně 35-50 % dospívajících jedinců. Virus proniká do organismu orofaryngeální cestou a napadá epiteliální buňky a B-lymfocyty (Huang et al., 2023). EBV je schopen asociovat s onkogenními proteiny, čímž se může podílet na rozvoji nádorových onemocnění, jako jsou Burkittův lymfom, Hodgkinův lymfom nebo difúzní velkobuněčný B-lymfom (Damania et al., 2022). Infekce EBV je také často spojována se vznikem autoimunitních onemocnění, jako jsou roztroušená skleróza, revmatoidní artritida nebo systémový lupus erythematosus, kde EBV může působit jako aktivátor nebo přispívající faktor autoimunitních reakcí (Rzymiski & Szuster-Ciesielska, 2023).

Laboratorní diagnostika viru Epstein-Barrové zahrnuje široké spektrum testů pro přímou a nepřímou identifikaci, jejichž cílem je zajistit komplexní a diferenciální diagnostiku. Diagnostické metody jsou zaměřené na průkaz specifických protilátek proti antigenům EBV, zejména protilátek proti VCA IgG, VCA IgM, EBNA-1 IgG, EA(D) IgG, které se stanovují pomocí sérologických metod (např. EIA, IFA, CLIA). Kromě sérologických metod je možné využít také i přímou detekci virové DNA pomocí molekulárních metod, jako je PCR. Nejčastěji využívanou metodou je EIA, ale v současnosti je však čím dál častěji využívána i chemiluminiscenční imunoanalytická metoda (CLIA) (Smatti et al., 2018; Atefi, 2023).

Předkládaná práce dále analyzuje poskytnutá data z hlediska výskytu positivity protilátek proti antigenům EBV v závislosti na věku vyšetřovaných osob a přítomnosti různých onemocnění. Součástí práce je také podrobně popsat a vzájemně porovnat vybrané laboratorní metody CLIA, EIA a IFA využívané k diagnostice EBV a na základě provedeného srovnání vyhodnotit metodu vhodnou k tomuto účelu.

1 VIRY

První zmínky o existenci virů pocházejí z 19. století, kdy A.E. Mayer prováděl studii mozaikovitě nemoci tabáku. Až později D. I. Ivanovskij a M. W. Beijerinck prokázali, že původcem této nemoci je malá infekční částice, a právě M. W. Beijerinck tuto částici označil termínem „virus“ (Artenstein, 2012; The Editors of Encyclopaedia Britannica, 2024; Prono, 2025). Původ virů zůstává stále nejasný, ale uvažuje se o třech možných hypotézách, a to únikové, redukční a třetí předpokládá, že viry vznikly ještě před buněčným životem (de la Higuera & Lázaro, 2022).

Viry jsou velmi malé, obligatorní, intracelulární infekční částice, které se nacházejí na hranici živého a neživého organismu. Jsou tvořené organickými molekulami a účastní se metabolických procesů. Viry jsou zcela závislé na hostitelské buňce, díky čemuž jsou schopny replikace a přežití. (Schindler, 2014; Drnková, 2019). Základní virová jednotka se nazývá virion, který je tvořen nukleovou kyselinou (DNA nebo RNA). Kolem ní se nachází proteinová kapsida zodpovídající za ochranu genetické informace uložené v nukleové kyselině. U některých virů se může vyskytovat i lipidový obal s glykoproteinovými výběžky, které interagují s receptory hostitelské buňky (Wagner & Krug, 2025). Replikační cyklus viru zahrnuje několik fází, a to adsorpci viru na hostitelskou buňku a proniknutí viru dovnitř buňky, odstranění obalu viru, aktivaci a replikaci virového genomu, a vytvoření a uvolnění nových virionů z hostitelské buňky. Neobalené viry se uvolňují lýzou, naopak obalené viry pučením (Schindler, 2014; Wagner & Krug, 2025). Patogeneze virových onemocnění probíhá na třech úrovních, a to na úrovni intracelulární, která probíhá v hostitelské buňce. Na druhé úrovni, kdy virus proniká a napadá tkáň a orgány, a na třetí úrovni, která se vztahuje k šíření infekčních onemocnění mezi populacemi. Virus nejčastěji vstupuje do organismu přes dýchací nebo trávicí trakt, přímým kontaktem nebo přenosem z matky na dítě, a může vyvolat lytickou, perzistentní a latentní infekci. Některé viry jsou také schopny onkogenní transformace a podílet se na rozvoji autoimunitních reakcí (Hurych & Štícha, 2021).

Dnes existuje tisíce druhů virů, z nichž některé jsou již známé, zatímco jiné dosud ještě nebyly objeveny. Nejrozšířenějším systémem dělení virů je Baltimorský klasifikační systém, který rozděluje viry do sedmi tříd podle genetické materiálu a replikačního cyklu (Louten, 2016).

2 HERPETICKÉ VIRY

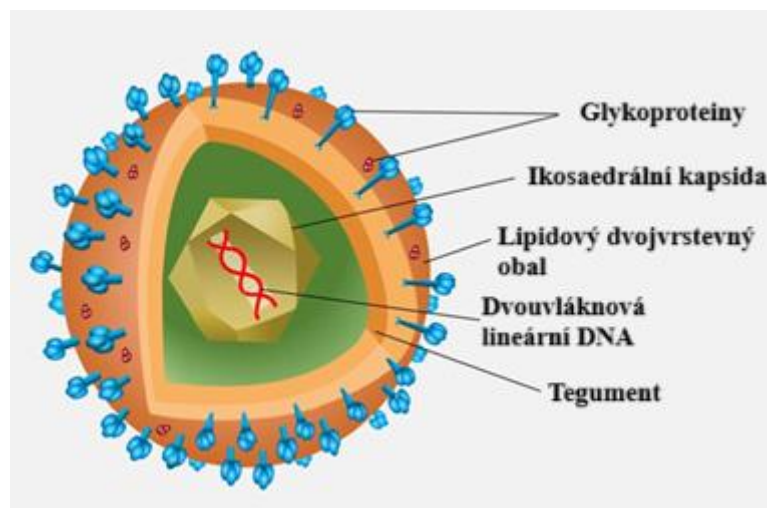
2.1 Charakteristika herpetických virů

Herpetické viry, známé jako herpesviry, spadají do čeledi *Herpesviridae*, odvozené od řeckého slova „herpes“ neboli plazit se. Podle Baltimorského klasifikačního systému patří mezi viry I. třídy, tzv. dsDNA viry. Genetickou informaci mají uloženou ve formě dvouvláknové lineární DNA, stejně jako u čeledi *Poxviridae* nebo *Adenoviridae*. Herpesviry procházejí dvěma odlišnými fázemi životního cyklu: latentní a lytickou. V latentní fázi virus aktivuje některé geny, díky nimž může zůstat v hostiteli po počáteční infekci po zbytek života a mít schopnost se reaktivovat. Naopak v lytické fázi jsou aktivovány odlišné virové geny, což vede k množení viru a šíření infekce (Weidner-Glunde et al., 2020).

Herpesviry se skládají ze tří hlavních částí. Vnitřní část viru se nazývá kapsida, která má ikosaedrální strukturu, v níž je uložena dvouvláknová lineární DNA. Existují tři typy kapsid: A-, B- a C-, které slouží k dozrávání viru (Li & Yu, 2020). Kapsida je velká přibližně 100 nm a složená ze 162 dutých kapsomer. Na ni je navázán tegument, který tvoří střední vrstvu mezi kapsidou a vnějším obalem viru, jak je znázorněno na obrázku č. 1 (Schindler, 2014).

Tegument je složen z virových proteinů a různých enzymů. Je rozdělen do dvou částí, kdy vnější část interaguje s glykoproteiny, které obsahuje lipidový obal viru, a část vnitřní je spojena s ikosaedrální kapsidou. Hlavními úkoly tegumentu je zajistit transport kapsidy viru do jádra hostitelských buněk, výstup viru z jádra, replikaci nových virionů, primární a sekundární obalení kapsidy a výsledné utvoření nových virionů. Počet tegumentových proteinů u herpesvirů se liší v závislosti na konkrétním druhu a obvykle se pohybuje v rozmezí 17 až 38 proteinů (Sucharita et al., 2023).

Vnější lipidový obal herpesvirů obsahuje glykoproteiny a glykoproteinové hroty vystupující z jeho povrchu. Díky těmto glykoproteinovým částicím je umožněna interakce se specifickými receptory na povrchu hostitelských buněk a umožněn vstup viru do buněk. Na tyto receptory hostitelských buněk se mohou vázat například glykoproteiny typu gB, gC gD, gH anebo gL (Beilstein et al., 2019).



Obrázek č. 1: Struktura herpetického viru (převzato a upraveno dle Chen et al., 2020).

2.2 Klasifikace herpetických virů

Na základě struktury a replikace genomu, biologických a antigenních vlastností a specifické morfologie virionů, jsou herpesviry rozděleny do tří podčeledí: *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* a *Gammaherpesvirinae*. Každý zástupce těchto podčeledí může způsobit vážná až smrtelná onemocnění u různých druhů živočichů, včetně lidí. Pouze osm z nich je významných pro člověka, ty jsou uvedeny v tabulce č. 1 (Zmasek et al., 2019).

Tabulka č. 1: Klasifikace lidských herpetických virů.

Člen	Zkratka	Podčeleď
Herpes simplex virus 1	HSV-1	<i>Alphaherpesvirinae</i>
Herpes simplex virus 2	HSV-2	
Varicella-zoster virus	VZV	
Epstein-Barrové virus	EBV	<i>Gammaherpesvirinae</i>
Cytomegalovirus	CMV	<i>Betaherpesvirinae</i>
Lidský herpesvirus 6 (A, B)	HHV-6 (6A a 6B)	
Lidský herpesvirus 7	HHV-7	
Lidský herpesvirus 8	HHV-8 (KSHV)	<i>Gammaherpesvirinae</i>

Převzato a upraveno dle Zmasek et al., 2019.

Podčeleď *Alphaherpesvirinae* zahrnuje tři lidské herpesviry: Herpes simplex virus 1 (HSV-1), Herpes simplex virus 2 (HSV-2) a Varicella-zoster virus (VZV). Tato skupina virů se vyznačuje velmi krátkým replikačním cyklem, díky kterému se mohou šířit rychleji a virové částice mohou být detekovány již během několika hodin (Weidner-Glunde et al., 2020). Infekce způsobené těmito viry jsou založené na interakci specifických glykoproteinů na jejich povrchu s membránou hostitelské buňky. Podle těchto specifických interakcí mohou způsobovat různé kožní problémy až poškození centrálního nervového systému (MA et al., 2023).

Betaherpesvirinae, mezi které patří lidský cytomegalovirus (CMV), dva druhy lidského herpesviru 6 A a B (HHV-6A a HHV-6B) a lidský herpesvirus 7, mají na rozdíl od *Alphaherpesvirinae* delší replikační cyklus trvající několik dní a pomalejší proces šíření. Tyto viry cíleně napadají převážně lidské buňky, jako jsou epitelální buňky, fibroblasty, monocyty a T-lymfocyty, zejména Th-lymfocyty.

Třetí skupinou herpetických virů je podčeleď *Gammapherpesvirinae*, která zahrnuje virus Epstein-Barrové (EBV) z rodu *Lymphocryptovirus* a lidský herpesvirus 8 spojený s Kaposiho sarkomem (KSHV) z rodu *Rhadinovirus*. Tyto viry primárně napadají B-lymfocyty, epitelální buňky, monocyty a dendritické buňky a způsobují celoživotní infekce v paměťových B-lymfocytech (Hristova & Galabov, 2022). Replikační fáze je odlišná od předchozích dvou skupin, kdy u *Alpha-* a *Betaherpesvirinae* dominuje fáze lytická, zatímco u *Gammapherpesvirinae* fáze latentní. Dalším rozdílem je schopnost *Gammapherpesvirinae* aktivovat onkogenezi, což vede k tvorbě nadměrného množství nádorově změněných buněk, které mohou zapříčinit vznik nádorového onemocnění (Weidner-Glunde et al., 2020; MA et al., 2023).

3 EPSTEIN-BARROVÉ VIRUS

3.1 Objev viru Epstein-Barrové

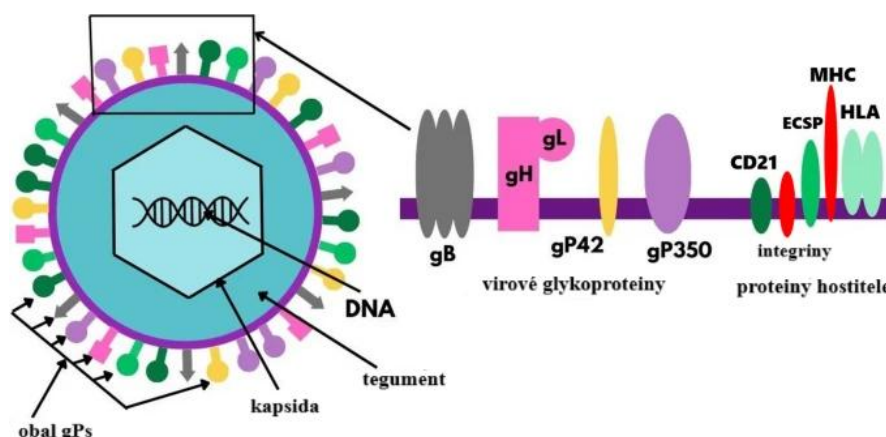
Název viru nese jména britského patologa Anthonyho Epsteina a jeho výzkumné asistentky a viroložky Yvonne Barr. V roce 1961 se Epstein účastnil přednášky o dětské rakovině v Africe, kterou vedl britský chirurg Denis Parsons Burkitt, se kterým později začal spolupracovat. Epstein analyzoval vzorky nádorových buněk na buněčných kulturách, které mu byly zasílány z Kampaly od Burkitta, a hledal známky virové infekce. Jeho pokusy byly dlouho neúspěšné. Až v roce 1963, za pomoci Yvonne Barr, se mu povedlo úspěšně analyzovat volně se pohybující nádorové buňky na buněčné kultuře. Za využití elektronového mikroskopu následně potvrdil objev nového herpetického viru a prvního lidského nádorového viru, který byl pojmenován jako virus Epstein-Barrové (Rickinson, 2024).

3.2 Struktura EBV

Epstein-Barrové virus (EBV), patří mezi herpetické viry, konkrétně do podčeledi *Gammaherpesvirinae*. Jedná se o první známý lidský onkogenní virus, který napadá převážně B-lymfocyty a epitelové buňky. EBV asociuje s onkogenními virovými proteiny, a kromě infekční mononukleózy, pro kterou je jeho přítomnost v krevním oběhu typická, může stát i za vznikem dalších, často nádorových onemocnění.

Strukturálně se EBV od ostatních zástupců herpetických virů příliš neliší. Jde o obalený DNA virus o průměru přibližně 122-180 nm (CUSABIO, c2007-2025). Jeho genom tvoří lineární dvouřetězcová nukleová kyselina, která je uložena uvnitř dvacetistěnné ikosaedrické kapsidy složené ze 162 kapsomer. Po vstupu do hostitelské buňky se lineární DNA mění na kruhovou DNA. Genom EBV obsahuje přibližně 172 000 párů bází s více než 85 geny kódující proteiny a 50 geny nekódující RNA. Geny jsou rozděleny na latentní a lytické. Genom EBV je složen ze dvou sekvenčních domén, krátké a dlouhé, a každá z nich obsahuje terminální a vnitřní repetice. Repetice zajišťují replikaci a stabilitu virové DNA v hostitelské buňce, regulují expresi virových genů a ukazují, zda infekce pochází z jedné nebo více buněk progenitorových (Smatti et al., 2018; Huang et al., 2023).

Kapsidu viru obklopuje dvouvrstevný tegument tvořený převážně proteiny. Jeho vnitřní vrstva přiléhá přímo ke kapsidě, zatímco vnější vrstva interaguje s lipidovým obalem viru, obsahujícím různé glykoproteiny. Společně tyto dvě části obalují celý virion (viz obrázek č. 2).



Obrázek č. 2: Struktura EBV se zobrazenými glykoproteiny a hostitelskými proteiny (převzato a upraveno dle Abdelmonem et al., 2024).

3.3 Virové antigeny

Existují dva podtypy EBV a to EBV 1. a 2. typu, napadající buňky člověka. Zatímco typ 1 je rozšířen celosvětově, typ 2 se vyskytuje převážně v Africe, především v oblastech položených jižně od Sahary (Houen & Trier, 2021). Hlavní rozdíl spočívá v sekvenci genů EBNA-2 a EBNA-3, kde shoda u obou typů je 51 % u EBNA-2 a 72 % u EBNA-3 (Correia et al., 2018).

Antigeny EBV jsou látky, které vyvolávají imunitní odpověď a mají hlavní roli v životním cyklu viru. Dělí se na latentní a lytické podle fáze cyklu, a mezi klíčové patří šest hlavních antigenů, uvedených v tabulce č. 2 (Houen & Trier, 2021; Elísková, 2022).

Tabulka č. 2: Klíčové antigeny EBV.

Antigen	Celý název antigenu	Úloha	Fáze životního cyklu
EBNA	EB-nukleární antigen	podpora replikace viru	latentní
LMP	Latentní membránový protein	mezibuněčná komunikace	latentní
VCA	Virový kapsidový antigen	marker prodělané infekce	lytická

Antigen	Celý název antigenu	Úloha	Fáze životního cyklu
EA	Časný antigen	podpora replikace viru	lytická
MA	Membránový antigen	sestavování viru	lytická
gp350/220	Obalový glykoprotein 350/220	vstup a připojení do buňky	lytická

Převzato a upraveno dle Houen & Trier, 2021; Elísková, 2022.

Mezi antigeny exprimované v latentní fázi životního cyklu EBV patří EB nukleární antigeny (EBNA) a latentní membránové proteiny (LMP). Antigeny EBNA vznikají v jádře buněk a jejich úkolem je podpora replikace virového genomu EBV. Celkem se rozlišuje šest typů, a to EBNA-1, -2, -3A, -3B, -3C a -LP, z nichž nejvýznamnější roli mají antigeny EBNA-1 a EBNA-2 (Houen & Trier, 2021; Elísková, 2022). Latentní membránové proteiny jsou tří typů: LMP-1, -2A a -2B. Jsou zabudované do cytoplazmatické membrány latentních infikovaných buněk a podílejí se na mezibuněčné komunikaci. LMP-1 bývá často spojován s rozvojem nazofaryngeálního karcinomu (*Imunoenzymatické soupravy k diagnostice infekční mononukleózy*, 2022).

Naopak v lytické fázi se uplatňují virové kapsidové antigeny (VCA), časné antigeny (EA), membránové antigeny (MA) a obalový glykoprotein 350/220. VCA představují komplex strukturálních proteinů, které jsou produkovány během aktivní infekce. Nejčastěji hledanými typy jsou VCA p18 a VCA p23. Přítomnost protilátek proti těmto antigenům ukazuje na prodělanou infekci. Časné antigeny (EA) jsou komplexy nestrukturálních proteinů exprimované v časné fázi lytického cyklu. Rozlišují se 2 typy, difúzní EA(D) a restricted EA(R), jejichž hlavním úkolem je podpora replikace viru a jsou markerem probíhající infekce. Membránové antigeny (MA) jsou na povrchu buněk a podílí se na sestavování viru. Obalové glykoproteiny 350/220 (gp350/220) se nachází na lipidovém obalu viru a váží se na povrch B-lymfocytů, čímž umožňují vstup viru do těchto buněk (Houen & Trier, 2021; Elísková, 2022; *Imunoenzymatické soupravy k diagnostice infekční mononukleózy*, 2022).

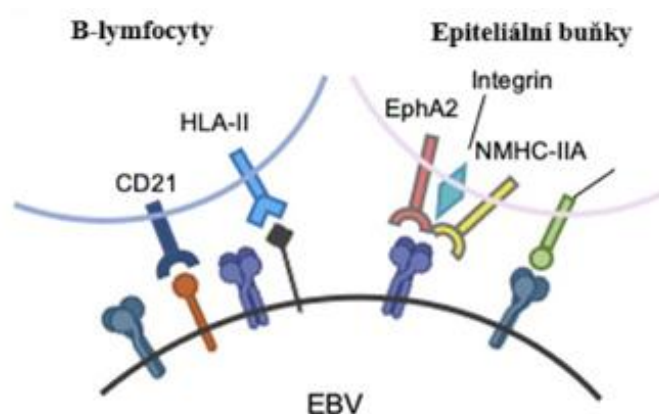
3.4 Vstup EBV do hostitelské buňky

Epstein-Barrové virus primárně infikuje epiteliální buňky a B-lymfocyty orofaryngeální cestou, a to přes dutinu ústní a hltan. Každý typ cílových buněk vyžaduje

jiný mechanismus pro připojení a následný vstup viru (viz obrázek č. 3). K připojení viru na epiteliální buňky může dojít různými interakcemi prostřednictvím komplexu gH/gL s integriny Ephrin A2 (EphA2) a/nebo $\alpha\beta 5$, $\alpha\beta 6$, $\alpha\beta 8$, nebo BMRF-1 s interginem $\beta 1$, nebo BMRF-2 s integrinem $\alpha\beta 1$ (Houen & Trier, 2021). Zatímco k připojení na B-lymfocyty, které jsou nositeli povrchového znaku CD21 a CD35, dochází vazbou gp350/220 k těmto receptorům (Damania et al., 2022).

Pro vstup viru do buňky je důležitý glykoprotein 42 (gp42), který má hlavní roli převážně u B-lymfocytů. Gp42 se váže na molekuly HLA II. třídy, přítomných na B-lymfocytech, a zahajuje vstupní membránový proces viru do buňky. Epiteliální buňky nenesou molekuly HLA II. třídy, a proto pro průnik viru do epiteliální buňky stačí jenom komplex gH/gL (Damania et al., 2022).

Další důležitý glykoprotein je gB. Jakožto hlavní fuzogenní protein má klíčovou roli při vstupu viru do buňky a zodpovídá za poslední krok ve fúzi viru s plazmatickou membránou buňky. Po navázání EBV na B-lymfocyty se utvoří vazba gB s komplexem gH/gL, což vede k endocytóze a fúzi viru s endozomální membránou, a následnému proniknutí celého viru do buňky. U epiteliálních buněk může EBV vstoupit do buňky přímou fúzí s buněčnou membránou nebo endocytózou prostřednictvím lipidového raftu a mikropinocytózy za účasti neuropilinu 1 (NRP-1) (Sun et al., 2021; Huang et al., 2023).



Obrázek č. 3: Vstup EBV do cílových buněk (převzato a upraveno dle Escalante et al., 2022).

3.5 Replikační cyklus

Replikační cyklus viru Epstein-Barrové zahrnuje dvě fáze, lytickou a latentní. Infekce začíná v epiteliálních buňkách, kde probíhá lytická fáze. Během této fáze je produkováno více než 80 lytických genů, aktivovaných ve třech postupných fázích, přičemž každá fáze je řízena specifickými geny a proteiny (Huang et al., 2023). Po dokončení lytické fáze EBV přechází do latentní fáze, která probíhá v B-lymfocytech. V této fázi může EBV dlouhodobě zůstat ukryt v neaktivní formě a je schopen se kdykoliv reaktivovat zpět do lytické fáze. Na rozdíl od lytické fáze je během latence produkováno výrazně méně latentních genů. Podle množství a exprese určitých latentních genů lze rozdělit latenci do 4 stádií (Rozman et al., 2022).

3.5.1 *Lytická fáze*

Lytická fáze začíná okamžitě časnou (IE) fází, která je aktivována zejména geny BZLF-1, kódující protein ZEBRA (Zta), a BRLF-1, kódující protein RTA (Rta) (Yakushina & Kisteneva, 2020). Tyto geny aktivují lytický cyklus a podílí se na transkripci genů potřebných pro následující fázi.

V časně (E) fázi jsou aktivovány časně geny, jako BNLF-2A, BILF-1 a BGLF-5. Tyto časně geny kódují přibližně 30 proteinů, které se podílejí na replikaci virové DNA, podpoře metabolismu EBV a expresi pozdních genů (Yakushina & Kisteneva, 2020; Huang et al., 2023).

Po aktivaci IE fáze a zahájení replikace EBV v E fázi následuje pozdní (L) fáze, kde jsou aktivovány pozdní geny, jako BCRF-1. Pozdní geny kódují strukturální proteiny, například glykoproteiny, proteázy a virový kapsidový antigen (VCA). Tyto proteiny se podílejí na sestavení virionu EBV a podporují imunitní únik, čímž umožňují přechod EBV do latence (Yakushina & Kisteneva, 2020; Rozman et al., 2022).

3.5.2 *Latentní fáze*

Během latentní fáze je produkováno přibližně deset hlavních latentních genů. Patří mezi ně šest jaderných antigenů EBNA-1, -2, -3A, -3B, -3C a -LP, tři latentní membránové proteiny LMP-1, -2A a -2B a několik nekódujících RNA, například EBER-1 a -2, miRNA BART nebo miRNA BHRF-1. (Yakushina & Kisteneva, 2020). Tato fáze

umožňuje EBV dlouhodobě přežívat v infikovaných B-lymfocytech a podílí se na imunitním úniku.

Nejaktivnějším stádiem latence je latence III, která jako první následuje po lytické fázi. Probíhá v naivních B-lymfocytech, kdy jsou exprimovány všechny jaderné antigeny EBNA, latentní membránové proteiny LMP a nekódující RNA. Dochází k proliferaci a transformaci naivních B-lymfocytů (Ward et al., 2022; Huang et al., 2023).

Poté následuje latence II, která se odehrává v aktivovaných B-lymfocytech v zárodečném centru. Exprese latentních genů se snižuje a jsou exprimovány geny EBNA-1, LMP-1 a -2 spolu s nekódující RNA EBER-1 a -2 a miRNA BART. Aktivované B-lymfocyty se během této fáze diferencují v paměťové B-lymfocyty (Yakushina & Kisteneva, 2020; Huang et al., 2023).

V paměťových B-lymfocytech, které jsou schopné dělení, probíhá latence I. V tomto stádiu jsou exprimovány pouze geny EBNA-1 a virové nekódující RNA EBER a miRNA BART. Existuje také latence 0, která nastává v klidových paměťových B-lymfocytech. Exprese je v tomto stádiu téměř potlačena a exprimovány jsou pouze nekódující RNA EBER-1 a -2 a miRNA BART. Díky tomu může EBV unikat imunitnímu dohledu (Rozman et al., 2022; Huang et al., 2023).

Epstein-Barrové virus se může dlouhodobě nepozorovaně ukrývat v paměťových B-lymfocytech. Pokud se tyto buňky diferencují na plazmatické buňky, EBV může reaktivovat a přejít zpět do lytické fáze. Tento přechod je řízen genem BZLF-1, který hraje klíčovou roli v aktivaci lytického cyklu, tak i v návratu do latence (Ward et al., 2022). Zároveň může dojít k přechodu z primární infekce do infekce perzistující a k rozvoji různých onemocnění (Damanian et al., 2022).

3.6 Onemocnění spojená s EBV

3.6.1 Infekční onemocnění

Nejčastějším onemocněním způsobeným virem Epstein-Barrové je infekční mononukleóza (IM). Jedná se o primární infekci, při níž EBV proniká do organismu orofaryngeální cestou a napadá epitelální buňky a B-lymfocyty. V důsledku proliferace B-lymfocytů mohou být infikované další buňky a tkáně, což vede k rozvoji klinických příznaků IM. EBV postihuje přibližně 35-50 % imunokompetentních dospívajících

a mladých dospělých, avšak ohrožené mohou být i děti (Huang et al., 2023). Inkubační doba trvá v průměru šest týdnů, přičemž nakažený jedinec může být infekční až sedm týdnů od vstupu viru do organismu. U dospělých se infekce projevuje bolestí v krku, horečkou, únavou, zvětšenými lymfatickými uzlinami, bělavými povlaky na mandlích a hepatosplenomegalií. U dětí probíhá infekce asymptomaticky nebo s mírnými příznaky. Laboratorně je IM doprovázena leukocytózou, zejména lymfocytózou a monocytózou. V krvi je zvýšené množství paměťových B-lymfocytů a přítomnost tzv. atypických lymfocytů, což jsou velké aktivované CD8⁺ T-lymfocyty s bazofilní cytoplazmou, které se snaží infikované B-lymfocyty eliminovat (Mihál & Michalková, 2022). Dále jsou zvýšené hladiny jaterních enzymů, konkrétně alaninaminotransferázy (ALT) a aspartátaminotransferázy (AST)) (Rozsypal, 2015; Fugl & Andersen, 2019).

3.6.2 Nádorová onemocnění

Díky schopnosti EBV asociovat s onkogenními virovými proteiny a transformovat B-lymfocyty do maligní formy, je virus považován za spouštěč některých nádorových onemocnění. Nejčastěji se podílí na vzniku Burkittova a Hodgkinova lymfomu a non-Hodgkinova lymfomu, jako je difúzní velkobuněčný B-lymfom (DLBCL). Kromě toho také může být příčinou posttransplantačního lymfoproliferativního onemocnění, nasofaryngeálního karcinomu, T-buněčných lymfomů, karcinomu žaludku nebo svalové tkáně (Damania et al., 2022; Rzymiski & Szuster-Ciesielska, 2023).

Burkittův lymfom

Burkittův lymfom je vysoce agresivní nádorové onemocnění postihující B-lymfocyty, které se vyskytuje nejhojněji v afrických zemích u malých dětí. Hlavní příčinou je chromozomální translokace protoonkogenu MYC a dysregulace enzymu AID, které společně podporují rozvoj infekce EBV. Úzká asociace s infekcí EBV vede ke zvýšení exprese AID, k nárůstu počtu infikovaných B-lymfocytů a vyšší expresi proteinů EBNA-1, miRNA BHRF-1 a EBER, a LMP-1. Tyto změny brání apoptóze B-lymfocytů a podporují vznik Burkittova lymfomu (Ward et al., 2022; Huang et al., 2023).

Hodgkinův lymfom

Hodgkinův lymfom je onemocnění charakterizované přítomností nádorových Reedové-Sternberga buněk (HRS), které jsou obklopeny zánětlivými CD4+ T-lymfocyty. Vyskytuje se u dětí a starších dospělých, zejména v méně rozvinutých zemích. HRS buňky obsahují nefunkční B-buněčný receptor (BCR) a jsou infikovány virem EBV, který se nachází v latenci II. Tyto změny podporují růst a přežití HRS buněk, což přispívá k rozvoji Hodgkinovy choroby (Jha et al., 2016; Huang et al., 2023). U jedinců infikovaných virem EBV s diagnostikovanou infekční mononukleózou je také zvýšené riziko vzniku Hodgkinovy choroby (Damania et al., 2022).

Difúzní velkobuněčný B-lymfom

Difúzní velkobuněčný B-lymfom (DLBCL) je nejčastějším typem non-Hodgkinova lymfomu, který se vyskytuje u starších dospělých. Novější studie však ukazují, že se může vyskytovat i u mladších lidí. Na základě genetických mutací v B-lymfocytech se DLBCL dělí na dva typy. Typ GCB vychází z germinálního centra B-lymfocytů a má příznivější prognózu. Naproti tomu typ ABC, vycházející z aktivovaných B-lymfocytů, má horší klinický průběh. V případě infekce EBV, která se nachází v latenci III, je diagnostika zaměřena především na detekci nekódující virové miRNA EBER v nádorových B-lymfocytech. Infekce EBV je významným faktorem vedoucím k imunitní nedostatečnosti a podílí se na vzniku difúzního velkobuněčného B-lymfomu (Malpica et al., 2022; Ward et al., 2022).

3.6.3 Autoimunitní onemocnění

Virus Epstein-Barrové je také často spojován s rozvojem autoimunitních onemocnění. Infekce EBV může fungovat jako aktivátor autoimunitních reakcí nebo se na jejich rozvoji podílet prostřednictvím reaktivace viru. Samotná přítomnost EBV však není hlavní příčinou autoimunit. Klíčovým faktorem je jeho vliv na imunitní systém, a to ve spojení s genetickými predispozicemi a environmentálními faktory (Houen & Trier, 2021). Indukce autoimunit vyvolaná infekcí EBV může být způsobena několika mechanismy. Jedním z nich jsou tzv. molekulární mimikry, kdy virus napodobuje lidské antigeny. Dalším mechanismem je vedlejší polyklonální aktivace B-lymfocytů i T-lymfocytů, která vede k produkci většího množství cytokinů, chemokinů a dalších zánětlivých faktorů. Třetí způsob iniciace autoimunit vede přes epitopy lidských

antigenů, které jsou infekcí EBV uvolňovány, což vede k následné autoimunitní reakci. Virus Epstein-Barrové je nejčastěji spojován se systémovými autoimunitními onemocněními, jako jsou roztroušená skleróza, systémový lupus erythematoses, Sjögrenův syndrom, revmatoidní artritida, systémová sklerodermie a autoimunitní onemocnění štítné žlázy (Rzymiski & Szuster-Ciesielska, 2023).

Roztroušená skleróza

Roztroušená skleróza (RS) je chronické zánětlivé demyelizační onemocnění centrálního nervového systému (CNS), postihující mozek a míchu. Nejčastěji se objevuje u mladých dospělých jedinců. Mezi nejvýznamnější faktory podílející se na vzniku tohoto onemocnění patří genetická predispozice, environmentální faktory a virová infekce, přičemž za jeden z nejpravděpodobnějších spouštěčů je považována infekce vyvolaná Epstein-Barrovým virem. Podle studie Sattarnezhad a kol. (2025) jsou za hlavní mechanismus rozvoje RS považovány tzv. molekulární mimikry mezi virovým antigenem EBNA-1 a antigeny CNS. Předpokládá se výrazná podobnost EBNA-1 se třemi specifickými antigeny CNS, konkrétně anoktaminem-2 (ANO2), alfa-B krystalinem (CRYAB) a adhezní molekulou gliových buněk (GlialCAM)). Tato podobnost může vést ke zkřížené reaktivitě vůči antigenům CNS, kdy organismus vytváří protilátky proti vlastním strukturám CNS a způsobuje poškození myelinových struktur. Zvýšená hladina protilátek proti EBNA-1 a GlialCAM a jejich výrazná křížová reaktivita, byly opakovaně spojovány s vyšším rizikem rozvoje RS (Sattarnezhad a kol., 2025).

Systémový lupus erythematoses

Systémový lupus erythematoses (SLE) je zánětlivé autoimunitní multiorgánové onemocnění postihující životně důležité orgány, zejména kůži, plíce, ledviny, srdce, ale také klouby a cévy. Typický je pro něj relabující-remitující průběh a vyskytuje se výrazně častěji u žen než mužů. Příčinou vzniku SLE je prolomení autotolerance, které je důsledkem genetických a environmentálních faktorů. Mezi nejčastěji uváděné příčiny patří UV záření, některé léky, kouření, nedostatek vitamínu D a infekce vyvolané viry EBV nebo CMV (Krejsek et al., 2016; Trier et al., 2019). Charakteristickým laboratorním markerem je přítomnost anti-dsDNA protilátek, které jsou specifické pro toto onemocnění. Podle studie Trier et al. (2019) je riziko rozvoje SLE spojeno s přítomností EBV v lytické formě. U pacientů s diagnostikovaným SLE bylo prokázáno výrazně vyšší

množství protilátek proti časnému difúznímu antigenu EBV (EA(D)). Dalším mechanismem, který může přispívat k rozvoji SLE nebo k zesílení autoimunitní reakce, mohou být molekulární mimikry mezi virovým antigenem EBNA-1 a autoantigenem Ro60 (Houen & Trier, 2021).

Revmatoidní artritida

Revmatoidní artritida (RA) je chronické zánětlivé autoimunitní onemocnění, které postihuje především periferní klouby, zejména klouby na rukou, zápěstí a nohou. Onemocnění je charakterizováno zánětem synoviální membrány, který vede k progresivní erozi postižených kloubů. RA se vyskytuje převážně u žen ve věku 40-50 let. Typickým diagnostickým ukazatelem tohoto onemocnění je přítomnost revmatoidních faktorů (RF) a protilátek proti citrulinovému proteinu (ACPA). Přesná příčina vzniku RA není stále jasná, ale významnou roli hraje genetická predispozice v oblasti HLA komplexu, a jedním z potenciálních spouštěčů může být i infekce EBV. Podle studie Trier et al. (2018) může virový glykoprotein gp42, nacházející se v lipidovém obalu EBV, silně interagovat s HLA-DRB1. Konkrétně se gp42 váže na kyselinu glutamovou (E46) a arginin (R72), čímž zvyšuje afinitu EBV k B-lymfocytům. Tato vazba může usnadnit vstup viru do B-lymfocytů a přispívat ke chronické EBV infekci, čímž může přispívat ke spuštění autoimunitní reakce vedoucí k rozvoji RA (Trier et al., 2018).

3.7 Laboratorní diagnostika EBV

Laboratorní diagnostika infekce virem Epstein-Barrové zahrnuje široké spektrum vyšetřovacích metod, které lze obecně rozdělit do dvou hlavních skupin podle principu detekce: na metody nepřímého průkazu, které hodnotí protilátkovou nebo buněčnou odpověď imunitního systému, a na metody přímého průkazu, které detekují virovou nálož. Cílem těchto metod je umožnit komplexní a diferenciální diagnostiku EBV (Smatti et al., 2018; Atefi, 2023). Každá z použitých metod se liší svou diagnostickou citlivostí, specificitou a možností praktického využití v různých klinických situacích.

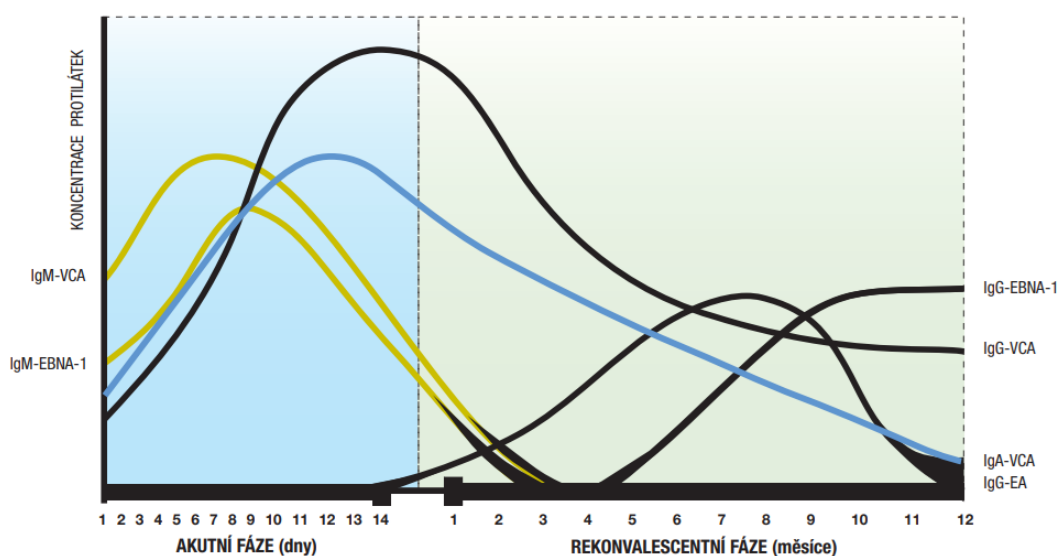
3.7.1 Nepřímé nespecifické metody

Mezi rychlé diagnostické testy nepřímého průkazu, které se využívají při podezření na infekční mononukleózu, patří tzv. **Monospot test**. Tento test je považován za

orientační a nespecifický, a proto by měl být doplněn o specifické sérologické vyšetření. Monospot test je založený na principu Paul-Bunnellovy reakce, jehož cílem je detekovat heterofilní protilátky. V případě pozitivního výsledku dochází k aglutinaci zvířecích erytrocytů se sérem nebo plazmou pacienta. Výhodou tohoto testu je jeho rychlá a snadná proveditelnost, kdy výsledek je obvykle poskytnut během několika minut. Jeho hlavní nevýhodou je nízká citlivost a specifita, která může vést k falešně negativním nebo pozitivním výsledkům. U malých dětí může docházet k falešně negativním výsledkům, z důvodu nedostatečné tvorby protilátek. Naopak falešně pozitivní výsledek se může objevit u pacientů s autoimunitními nebo nádorovými onemocněními (Smatti et al., 2018; Stuempfig & Seroy, 2023).

3.7.2 Nepřímé specifické metody

Nepřímé specifické metody zahrnují sérologické metody, které jsou využívány k detekci specifické protilátkové odpovědi organismu na infekci virem Epstein-Barrové. Testy jsou založeny na průkazu protilátek třídy IgM, IgG a IgA, které jsou namířené proti jednotlivým antigenům EBV, konkrétně proti VCA, EA a EBNA. Každá z těchto protilátek vykazuje různou dynamiku výskytu v jednotlivých fázích infekce EBV, což pomáhá rozlišit akutní, prodělanou nebo reaktivovanou formu infekce (Atefi, 2023), jak ukazuje obrázek č. 4.



Obrázek č. 4: Dynamika výskytu specifických protilátek proti antigenům EBV v různých fázích infekce (převzato a upraveno dle katalogu: VIDIA-DIAGNOSTIKA, 2018).

Humorální odpověď na infekci EBV

Protilátky proti VCA IgM se objevují již v časně akutní fázi infekce. Jsou prvním známým markerem primární infekce a jejich přítomnost obvykle přetrvává 4-6 týdnů. Protilátky proti VCA IgA mají výraznější protilátkovou odpověď a jejich zvýšená hladina je typická pro aktivní infekci. Sérokonverze protilátek proti VCA IgG může být detekována již v akutní fázi infekce, ale jejich přítomnost ve vysokých titrech je typická u prodělané infekce. Protilátky proti VCA IgG, na rozdíl od IgM a IgA, přetrvávají v organismu po celý život.

Protilátky proti EA IgG značí akutní infekci nebo reaktivaci viru do lytické fáze. Zároveň vysoké hladiny těchto protilátek jsou spojovány s EBV-asociovanými nádorovými onemocněními. Přítomnost protilátek proti difúznímu EA(D) IgG je typická pro pozdní akutní infekci. Obvykle se objevují 3-4 týdny po počáteční infekci a přetrvávají 3-4 měsíce, někdy i déle. Spolu s protilátkami proti EA(D) IgA jsou asociovány s nasofaryngeálním karcinomem. Protilátky proti restricted EA(R) IgG se objevují později než protilátky proti EA(D) IgG a mohou přetrvávat i několik let a často slouží jako marker reaktive EBV. Tyto protilátky se mohou vyskytovat ve vysokých titrech u pacientů s EBV-asociovaným Burkittovým lymfomem, zejména v endemických oblastech subsaharské Afriky (VIDIA-DIAGNOSTIKA, 2018).

Protilátky proti EBNA IgG se objevují několik týdnů až měsíců po infekci a přetrvávají po celý život. Jsou diagnostickým markerem prodělané infekce. U imunosuprimovaných jedinců se nemusí tvořit vůbec. Výskyt protilátek proti EBNA IgM je vzácný, ale mohou být detekovány v akutní fázi primární infekce EBV (VIDIA-DIAGNOSTIKA, 2018; Abusalah et al., 2020; Atefi, 2023).

Vyšetření protilátek proti EBV

Specifické protilátky proti antigenům EBV se rutinně detekují pomocí sérologických metod. Mezi nejčastěji vyšetřované protilátky patří EBNA IgG, VCA IgG, VCA IgM a EA(D) IgG (Smatti et al., 2018). K jejich detekci jsou využívány převážně imunochemické metody, mezi které patří nepřímá imunofluorescence (IFA), imunoenzymatická metoda (EIA) nebo chemiluminiscenční imunoanalytická metoda (CLIA), jež se liší principem detekce imunokomplexu specifických protilátek s virovými antigeny.

Nepřímá imunofluorescence (IFA) je metoda založená na detekci protilátek proti antigenům EBV v infikovaných buňkách za pomoci fluorescenční mikroskopie. Princip metody spočívá ve vytvoření imunokomplexu mezi antigenem a primární protilátkou, na který se následně naváže sekundární protilátka značená fluorescenčním barvivem, nejčastěji označená FITC (fluorescein-5-isothiokyanát). Fluorescenční signál je pak detekován mikroskopicky, přičemž intenzita a výskyt signálu umožňuje nejen potvrzení přítomnosti specifických protilátek proti antigenům EBV, ale i stanovení fáze infekce EBV. Metoda je vysoce specifická a citlivá, ale náročná kvůli manuálnímu provedení, subjektivnímu vyhodnocení výsledků a menší míře standardizace (Park et al., 2018; Abusalah et al., 2020; Atefi, 2023).

Imunoenzymatická metoda (EIA) je určena k detekci specifických protilátek v plazmě nebo séru pacienta, včetně protilátek proti antigenům EBV, která může být využita k diagnostice onemocnění spojených s infekcí EBV. Nejčastěji používaným typem je tzv. sendvičová ELISA, která je založená na jednoduchém principu interakce mezi antigenem, primární protilátkou a sekundární protilátkou značenou enzymem. Výsledek reakce je hodnocen po přidání substrátu na základě barevné změny, jejíž intenzita (optická densita) je přímo úměrná koncentraci cílových protilátek ve vzorku a měří se spektrofotometricky (TestLine Clinical Diagnostics s.r.o., n.d.). ELISA je běžně dostupná, rychlá, citlivá, spolehlivá a snadno automatizovatelná metoda, ale zahrnuje riziko falešně pozitivních výsledků u jedinců s jinými virovými infekcemi nebo autoimunitními onemocněními (Abusalah et al., 2020).

Chemiluminiscenční imunoanalytická metoda (CLIA) je moderní, automatizovatelná, vysoce specifická a citlivá metoda, která využívá emisi světla ke stanovení protilátek proti antigenům EBV. Principem metody je oddělení imunokomplexu, tvořeného antigenem a primární protilátkou, prostřednictvím magnetické částice. Po přidání sekundární protilátky značené chemiluminiscenční látkou vzniká intenzivní světelný záblesk, který je přímo úměrný koncentraci cílové protilátky ve vzorku. CLIA poskytuje vysoce přesné výsledky, avšak je finančně náročnější a vyžaduje specializované vybavení a další ověření (Park et al., 2018; Abusalah et al., 2020; Atefi, 2023)

Doplňující metody nepřímého průkazu

Pro přesnější určení fáze infekce virem Epstein–Barrové a ověření výsledků sérologických metod, jako jsou IFA, EIA a CLIA, se využívají doplňující diagnostické metody. Mezi nejčastěji používané patří Western blotting a test avidity pro hodnocení humorální odpovědi, a průtoková cytometrie k hodnocení buněčné imunitní odpovědi. Diagnostika infekce EBV je komplexní a vychází ze souhrnu výsledků laboratorních vyšetření, klinického obrazu a anamnézy pacienta.

Western blotting (WB) je imunoblotová analytická konfirmační metoda, která slouží k potvrzení přítomnosti specifických protilátek proti jednotlivým antigenům EBV v séru pacienta. Tato metoda je založená na elektroforetické separaci proteinů v gelu, které jsou přenášeny na membránu a následně inkubovány se sérem. Po inkubaci se sekundární enzymaticky značenou protilátkou a reakcí se substrátem se přítomnost specifických protilátek projeví v podobě viditelných proužků na membráně. WB umožňuje přesnou detekci protilátek proti jednotlivým antigenům EBV, konkrétně EBNA-1, VCA-p18, VCA-p23 a EA(D), a vyznačuje se vysokou specificitou a schopností rozlišení jednotlivých fází infekce EBV (Abusalah et al., 2020; *Imunoenzymatické soupravy k diagnostice infekční mononukleózy*, 2022).

Test avidity slouží k určení síly vazby protilátek, zejména třídy IgG, na multivalentní antigeny. Princip testu spočívá v inkubaci vytvořeného imunokomplexu s močovinou. Test dokáže rozlišit jednotlivá období primární infekce (nízká avidita) od již proběhlé infekce EBV (vysoká avidita). Test avidity se často provádí současně s metodou Western blotting, a je užitečná převážně pro určení časně fáze infekce EBV. Výsledky testu však mohou být ovlivněny různou dynamikou protilátek u různých pacientů a přítomností mateřských IgG protilátek u novorozenců (Abusalah et al., 2020).

Další metodou pro nepřímý průkaz infekce EBV je **průtoková cytometrie**, kterou se hodnotí stav buněčné imunity, jež jeví typické změny způsobené virem Epstein-Barrové. Jedná se o moderní bioanalytickou metodu, která umožňuje rychlou analýzu jednotlivých buněk na základě jejich fyzikálních a biologických vlastností. Princip této metody spočívá v přímé imunofluorescenci, při níž se využívají fluorescenčně značené protilátky k detekci specifických antigenů na povrchu nebo uvnitř buněk. Takto označené buňky procházejí laminárním proudem kapaliny a jednotlivě jsou

analyzovány laserovým paprskem. Výsledky jsou následně zpracovány pomocí specializovaného softwaru. Průtoková cytometrie se uplatňuje při diagnostice imunodeficitů a hematologických malignit, a také při rozlišení některých infekčních a imunologických onemocnění (Atefi, 2023). V případě infekce EBV je průtoková cytometrie považována za pozitivní, pokud jsou změněny alespoň čtyři z pěti hodnotících parametrů. Mezi tyto změny patří zvýšený celkový počet lymfocytů, snížený počet B-lymfocytů, snížený imunoregulační index (IRI) neboli poměr $CD4^+$ a $CD8^+$ T-lymfocytů pod 1, zvýšený počet aktivovaných T-lymfocytů a přítomnost zánětlivého markeru CD64 na $CD16^+$ granulocytech (Chaloupková, 2020).

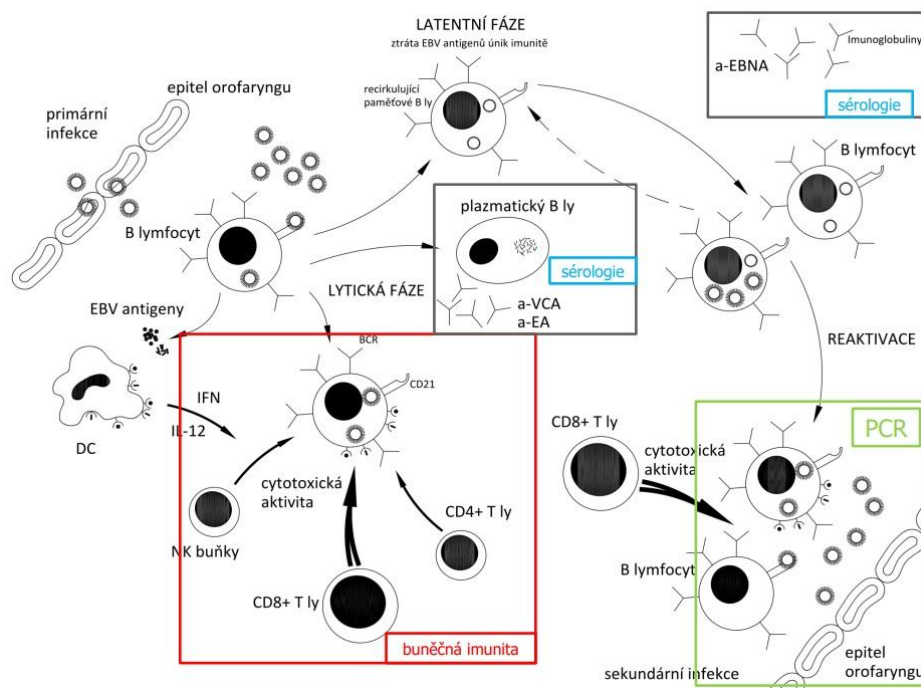
3.7.3 *Přímé metody*

Metody přímého průkazu slouží k detekci samotné přítomnosti viru Epstein-Barrové v různých typech biologického materiálu. Nejvýznamnější metodou je **polymerázová řetězová reakce (PCR)**, která umožňuje identifikaci a amplifikaci nukleových kyselin specifických pro EBV, konkrétně DNA EBV, pomocí fluorescenčního značení. PCR je vysoce citlivá, rychlá a specifická metoda, která umožňuje monitorování průběhu onemocnění, účinnosti léčby a případnou reaktivaci infekce, především u imunokompromitovaných jedinců a pacientů s lymfoproliferativním nebo nádorovým onemocněním souvisejícím s EBV. Nejčastěji využívanou variantou PCR je **real-time PCR (qPCR)**, která kromě samotné detekce EBV v krvi a plazmě také umožňuje kvantifikaci virové nálože v reálném čase. Díky tomu lze sledovat aktivitu EBV v organismu a hodnotit onemocnění související s infekcí EBV. Velkou výhodou qPCR je uzavřený systém, který snižuje riziko kontaminace a zároveň zvyšuje přesnost a spolehlivost výsledků. Naopak nevýhodou metody je nedostatečná standardizace a vysoké finanční nároky na specializované vybavení (Smatti et al., 2018; Abusalah et al., 2020).

Jako doplňkovou metodu lze využít metodu ***in situ* hybridizace (EBER-ISH)**. Jedná se o vysoce spolehlivou potvrzovací metodu, která se využívá k histologickému průkazu DNA EBV v tkáni nebo latentních infikovaných buňkách. Tato metoda využívá hybridizaci značené sondy s cílovou sekvencí EBV a vyhodnocení přítomnosti EBV se provádí mikroskopicky. EBER-ISH se využívá k detekci latentní fáze infekce EBV a určení buněk, které jsou virem infikované. Také nachází využití při potvrzení

EBV-asociovaných lymfoproliferativních onemocnění a vyloučení autoimunitních onemocnění (Abusalah et al., 2020; Atefi, 2023).

3.7.4 Metody detekce infekce EBV a jejich využití v jednotlivých fázích infekce



Obrázek č. 5: Imunopatogeneze infekce virem Epstein-Barrové (zdroj: Tinavská, 2020).

Virus Epstein-Barrové (EBV) infikuje epitelové buňky orofaryngu a B-lymfocyty slizniční imunity. V počáteční lytické fázi dochází k replikaci viru a expresi virových antigenů VCA a EA, na které reagují CD8+ T-lymfocyty. V této fázi infekce se uplatňuje průkaz vzniklých protilátek proti VCA (IgM, IgG) a EA, které se vyšetřují metodami EIA, CLIA nebo imunofluorescencí. Dále se může hodnotit stav buněčné imunity průtokovou cytometrií a přítomnost viru v krvi i plasmě pomocí PCR. Část infikovaných B-lymfocytů přechází do latence III, kdy virus exprimuje vybrané antigeny EBNA a LMP, které umožňují viru unikat před imunitním systémem. V této fázi lze prokázat protilátky proti EBNA-1 (IgG), které značí prodělanou infekci. Reaktivace vede zpět do lytické fáze, kdy se znovu exprimují antigeny VCA a EA, a viry se uvolňují do epitelu, kde mohou infikovat nové buňky. Reaktivaci lze prokázat výskytem protilátek proti EA(D) IgG nebo PCR průkazem DNA EBV (Krejsek et al., 2016).

4 CÍLE PRÁCE A HYPOTÉZY

Cíle:

1. Teoretická část bude složená z odborné rešerše na dané téma, zahrnující informovanost o viru Epstein-Barr a současných možnostech laboratorní diagnostiky.
2. V praktické části bude zahrnuto statistické zpracování a vyhodnocení získaných dat o nálezech EBV. Část získaných dat bude vyšetřena samostatně a část bude poskytnuta specializovanými pracovišti.

Hypotézy:

1. Je výskyt EBV a hladina protilátek ovlivněna věkem?
2. Je pozitivita EBV častějším ukazatelem autoimunitních onemocnění nebo lymfomů?
3. Jeví se ELISA jako nejvhodnější a nejspecifičtější metoda k průkazu protilátek proti EBV?

5 METODIKA

5.1 Úvod do metodiky

Metodická část této práce je z důvodu následného porovnání zaměřena na teoretický popis vybraných laboratorních metod, které slouží k detekci specifických protilátek proti viru Epstein-Barrové. Podrobně se jsou popsány tři imunochemické metody běžně využívané v klinické diagnostice, konkrétně chemiluminiscenční imunoanalytická metoda (CLIA), imunoenzymatická metoda (EIA) a nepřímá imunofluorescence (IFA). Tyto metody jsou následně porovnány z hlediska jejich principu, provedení, specifity a časové náročnosti. Cílem je zhodnotit jejich výhody a omezení a určit, která z nich je nejvhodnější pro laboratorní diagnostiku infekce EBV.

Dalším cílem práce je analýza výskytu protilátek proti antigenům EBV v různých věkových kategoriích pacientů a zároveň posoudit klinický význam jejich pozitivního nálezu, zejména v souvislosti s konkrétními onemocněními, u nichž může infekce EBV hrát významnou roli. Praktická část za cílem získání dat a jejich následné analýzy byla provedena metodou CLIA v laboratoři EUC Praha.

5.2 Chemiluminiscenční imunoanalytická metoda (CLIA)

5.2.1 *Vyšetřovaný materiál*

Pro stanovení protilátek proti antigenům EBV se využívá lidské sérum nebo plazma, získaná z venózní nebo arteriální krve. V Nemocnici České Budějovice, a.s. (NEMCB) se provádí stanovení z venózní srážlivé krve, která je odebírána do zkumavky s červenou nebo oranžovou zátkou obsahující akcelerátor srážení (viz tabulka č. 3). Využívá se odběrového systému BD Vacutanier od firmy Becton Dickinson, což je uzavřený odběrový systém, který umožňuje odběr pouze pomocí vakua v odběrové zkumavce. Po odběru je zkumavka ponechána při pokojové teplotě po dobu přibližně 30 minut, aby proběhl proces srážení. Následně je krev centrifugována po dobu 10 minut při odstředivé síle nižší než 1300 g, čímž dojde k úplnému oddělení séra, které je následně použito pro laboratorní vyšetření (*Laboratorní příručka LKCHI*, 2019).

Tabulka č. 3: Typy zkumavek.

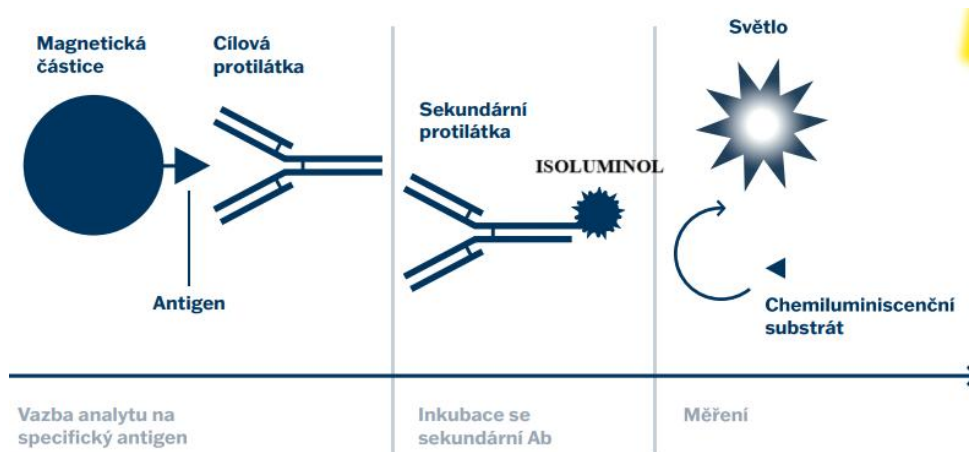
Primární vzorek	Barva víčka	Typ zkumavky	Objem krve (ml)	Počet promíchání
srážlivá venózní krev	oranžová	sérová se separačním gelem, aktivátor srážení	7	5-6
srážlivá venózní krev	červená	sérová bez separačního gelu, aktivátor srážení	4	5-6
nesrážlivá venózní krev	světle modrá	citrát sodný	4,5	3-4
nesrážlivá venózní krev	fialová	EDTA	2-3	8-10
nesrážlivá venózní krev	zelená	heparinát lithný	2-3	8-10

Převzato a upraveno dle *Laboratorní příručka LKCHI*, 2019.

Krevní sérum může být uchováváno při chladničkové teplotě 2-8 °C po dobu až sedmi dnů, nebo může být zmrazeno a skladováno v mrazáku při -20 °C po dobu maximálně tří měsíců. Po uplynutí této doby se musí pro další laboratorní vyšetření odebrat nový vzorek krve.

5.2.2 Princip metody

Metoda CLIA představuje moderní, plně automatizovatelnou, vysoce specifickou a citlivou analytickou metodu, která využívá k detekci protilátek proti antigenům EBV emisi světla. Princip této metody je založen na kombinaci separování imunokomplexu pomocí magnetické částice, a nepřímé světelné chemiluminiscence (viz obrázek č. 6). Magnetická částice nese specifický antigen, který má schopnost vázat se na cílovou protilátku obsaženou ve vzorku. Po vytvoření imunokomplexu dochází k navázání konjugátu, který je značený derivátem isoluminolu. Následně se přidají startovací reagenty a dojde k prudké chemiluminiscenční reakci ve formě intenzivního světelného záblesku. Intenzita světelného záblesku je měřena nízkošumovým fotonásobičem v relativních světelných jednotkách (RLU) a je přímo úměrná koncentraci navázané protilátky ve vzorku. Metoda CLIA slouží pro kvantitativní stanovení specifických protilátek proti vybraným antigenům EBV, kterými jsou antigeny VCA, EBNA-1 a EA(D) (DiaSorin: Návod pro použití LIAISON® VCA IgM, 2023).



Obrázek č. 6: Princip metody CLIA (převzato a upraveno dle <https://www.testlinecd.cz/clia>).

5.2.3 Přístrojové vybavení

Testované vzorky byly analyzovány pomocí přístroje Liaison® XL, který představuje plně automatizovaný chemiluminiscenční analyzátor určený pro nepřímou detekci specifických protilátek *in vitro* (viz obrázek č. 7). Tento moderní analyzátor umožňuje zpracovat až 171 vzorků za hodinu, čímž výrazně zkracuje dobu pro vyhodnocení výsledků (DiaSorin: *Advanced immunodiagnostic testing tools.*, n.d.; DiaSorin: *Příručka uživatele: Liaison® XL*, 2023).



Obrázek č. 7: Analyzátor Liaison® XL (zdroj: vlastní).

Analyzátor Liaison® XL je řízen prostřednictvím dotykového monitoru, který je propojen s laboratorním informačním systémem (LIS). Vzorky se vkládají do speciálních

stojánků, které se následně zasunují do prostoru pro stojánky ve střední části analyzátoru. Celková kapacita přístroje pro umístění vzorků je 120 pozic. Každý vzorek je opatřen jedinečným čárovým kódem, který je detekován prostřednictvím integrované laserové RFID čtečky uvnitř analyzátoru. Součástí analyzátoru jsou dvě robotická pipetovací ramena, která zajišťují přesnou manipulaci s reagensy. První pipetor, tzv. pravé rameno, zajišťuje manipulaci s reagensy pomocí ocelové jehly. Druhý, vzduchový pipetor (levé rameno), využívá jednorázové plastové špičky a je určen pro manipulaci se vzorky. Výsledky analýz jsou díky automatizaci dostupné v krátkém časovém intervalu, zpravidla během několika minut od zahájení zpracování vzorku.

Kromě samotného analytického přístroje je k provedení analýzy potřeba další spotřební materiál, jako jsou jednorázové plastové špičky, kyvety a nádoby na tekutý odpad a vak na pevný odpad (DiaSorin: *Příručka uživatele: Liaison® XL*, 2023).

5.2.4 Diagnostická souprava

Ke stanovení protilátek proti specifickým antigenům EBV se využívají diagnostické soupravy, které jsou určené pro automatické zpracování na analytickém přístroji Liaison® XL. Každá souprava je specificky navržena pro detekci protilátek proti jednomu určitému antigenu EBV a obsahuje všechny potřebné reagensy připravené k okamžitému použití (viz tabulka č. 4 a obrázek č. 8). V rámci CLIA analýzy se používají čtyři různé soupravy, přičemž každá cíleně detekuje protilátky proti odlišnému antigenu EBV. Pro stanovení protilátek třídy IgG se využívají soupravy obsahující rekombinantní časný antigen EA(D) (47-kDa polypeptid), nukleární antigen EBNA-1 (syntetický peptid EBNA-1) a kapsidový antigen VCA (syntetický peptid p18). Pro stanovení protilátek třídy IgM se používá souprava s kapsidovým antigenem VCA (syntetický peptid p18).

Tabulka č. 4: Souhrn reagensií diagnostické soupravy

Magnetická částice	SORB	magnetické částice s navázaným antigenem
Kalibrátor 1	CAL1	roztok obsahující nízké hladiny lidských protilátek IgM nebo IgG proti EBV
Kalibrátor 2	CAL2	roztok obsahující vysoké hladiny lidských protilátek IgM nebo IgG proti EBV
Roztok k ředění vzorků (pro VCA IgG, EBNA IgG a EA(D) IgG) Pufr A (pro VCA IgM)	DIL SPE BUF A	speciální diluent pro ředění vzorků kozí IgG proti lidským IgG
Konjugát	CONJ	roztok obsahující myší monoklonální protilátky proti lidským Ig konjugované s derivátem isoluminolu

Převzato a upraveno dle DiaSorin: Návod pro použití LIAISON® VCA IgM, 2023; DiaSorin: Návod pro použití LIAISON® VCA IgG, 2025).



Obrázek č. 8: Diagnostická souprava Liaison® XL VCA IgM (zdroj: vlastní).

Pro zajištění správnosti výsledků získaných pomocí diagnostických souprav je zapotřebí použít sady kontrolních sér, která slouží jako interní kontrola kvality. Ověření správné funkce přístroje Liaison® XL se provádí vždy na začátku každého nového dne před začátkem testování. Kontrolní sada obsahuje celkem čtyři kontroly, jednu pozitivní a negativní ve třídě protilátek IgG, a jednu pozitivní a negativní kontrolu ve třídě protilátek IgM.

Součástí metody CLIA je souprava startovacích reagensií Liaison® XL Starter Kit. K odstranění přebytečných konjugátů a molekul, které by mohly negativně ovlivnit výsledky, se používá promývací roztok Liaison® XL Wash/System Liquid. V rámci pravidelné denní údržby přístroje Liaison® XL se po ukončení měření provádí závěrečná

údržba přístroje, ke které se používá speciální čistící souprava Liaison® XL Cleaning Tool. Tato závěrečná údržba je nezbytná pro zachování správné funkčnosti přístroje (DiaSorin: Návod pro použití LIAISON® VCA IgM, 2023).

5.2.5 Pracovní postup

Po spuštění přístroje Liaison® XL a zapnutí dotykového monitoru dojde k automatické inicializaci přístroje. Následně proběhne kontrola hladin startovacích reagensů a promývacího roztoku. Současně se kontroluje dostupnost spotřebního materiálu, jako jsou kyvety a jednorázové plastové špičky. V případě nedostatku se komponenty doplní. Dále je zkontrolována kapacita nádob na tekutý a pevný odpad, které pokud jsou plné, je potřeba vyprázdnit nebo vyměnit.

Po dokončení výše uvedených kontrol reagensů a materiálu následuje interní kontrola kvality, která je provedena pomocí kontrolních sér. Do stojanu na reagenty se vloží příslušné diagnostické soupravy a stojan se zasune do přístroje. Stejným způsobem se připraví zkumavky obsahující sérum určené k analýze, které se zasunou do stojánku na vzorky. Zkumavky musí být umístěny čárovým kódem směrem dopředu, aby bylo zajištěno správné naskenování kódů.

Přístroj následně pomocí integrované RFID čtečky automaticky naskenuje veškeré čárové kódy zkumavek i reagensů. Po úspěšném naskenování kódů se spustí vlastní analýza. Přístroj Liaison® XL zanalyzuje testované vzorky a vypočítá hladinu protilátek přítomných ve vzorku. Výsledky jsou poté přístrojem automaticky odeslány do laboratorního informačního systému (LIS) (DiaSorin: *Příručka uživatele: Liaison® XL*, 2023).

5.2.6 Interpretace výsledků

Prostřednictvím přístroje Liaison® XL je na základě kalibrační křivky zjištěna koncentrace protilátek ve vzorku séra. Naměřená koncentrace se vyjadřuje v jednotkách U/ml a výsledky jsou interpretovány kvantitativně podle předem stanovených mezních hodnot, jež jsou odlišné pro všechny čtyři typy cílových protilátek proti antigenům EBV, konkrétně EA(D) IgG, EBNA-1 IgG, VCA IgG a VCA IgM. Kvantitativní interpretace výsledků je uvedena v tabulce č. 5.

Tabulka č. 5: Kvantitativní interpretace hladiny protilátek v jednotkách (U/ml).

Protilátky	Hladina protilátek (U/ml)	Hodnocení
VCA IgM	< 20	negativní
	20–40	hraniční
	≥ 40	pozitivní
VCA IgG	< 20	negativní
	≥ 20	pozitivní
EBNA-1 IgG	< 5	negativní
	5–20	hraniční
	≥ 20	pozitivní
EA(D) IgG	< 10	negativní
	10–40	hraniční
	≥ 40	pozitivní

Převzato a upraveno dle DiaSorin: Návod pro použití LIAISON® VCA IgM, 2023; EA(D) IgG, 2024; VCA IgG, 2025; EBNA-1 IgG, 2025).

Každá diagnostická souprava využívaná v přístroji Liaison® XL má určený specifický rozsah měření, který vymezuje mezní hodnoty, ve kterých je přístroj schopen stanovit hladinu protilátek. Přehled parametrů jednotlivých diagnostických souprav je uveden v tabulce č. 6.

Tabulka č. 6: Rozsah měřících souprav.

Protilátka	Rozsah měřící soupravy (U/ml)
VCA IgM	10,00–160,00
VCA IgG	10,00–750,00
EBNA-1 IgG	3,00–600,00
EA(D) IgG	5,00–150,00

Převzato a upraveno dle DiaSorin: Návod pro použití LIAISON® VCA IgM, 2023; EA(D) IgG, 2024; VCA IgG, 2025; EBNA-1 IgG, 2025).

Na základně kvantitativního vyhodnocení přítomnosti jednotlivých protilátek lze určit fázi infekce EBV, jak je uvedeno v tabulce č. 7. Zároveň se určení fáze infekce musí posuzovat s ohledem na klinický stav pacienta a jeho osobní anamnézu. Jednotlivé fáze infekce mohou také poukazovat na různá onemocnění asociovaná s EBV.

Tabulka č. 7: Jednotlivé fáze infekce EBV.

Interpretace	VCA IgM	VCA IgG	EBNA-1 IgG
negativní bez infekce EBV	< 20 U/ml	< 20 U/ml	< 20 U/ml
primoinfekce preklinická	≥ 20 U/ml	< 20 U/ml	< 20 U/ml
primoinfekce klinická	≥ 20 U/ml	≥ 20 U/ml	< 20 U/ml
primoinfekce pozdní fáze	≥ 40 U/ml	≥ 20 U/ml	≥ 20 U/ml
prodělaná nebo reaktivace	< 40 U/ml	≥ 20 U/ml	≥ 20 U/ml
prodělaná nebo reaktivace	< 20 U/ml	≥ 20 U/ml	≥ 5 U/ml
nejasně	< 20 U/ml	≥ 20 U/ml	< 5 U/ml

Převzato a upraveno dle DiaSorin: Návod pro použití LIAISON® VCA IgM, 2023; EA(D) IgG, 2024; VCA IgG, 2025; EBNA-1 IgG, 2025).

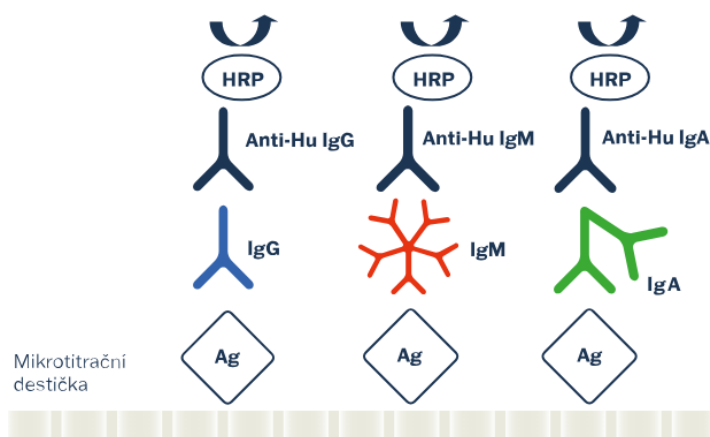
5.3 EIA

5.3.1 Princip metody

Imunoenzymatická metoda EIA je nepřímá analytická metoda, která se využívá k detekci specifických protilátek v séru nebo plazmě pacienta, která byla použita k detekci protilátek třídy IgM a IgG namířeným proti antigenům EBNA. Metoda EIA je snadno automatizovatelná, vysoce specifická, citlivá a spolehlivá metoda, která je založená na jednoduchém principu interakce mezi antigenem a protilátkou, kde je výsledek hodnocen na základě barevné změny.

Nejčastěji používaným typem metody je tzv. sendvičová ELISA (viz obrázek č. 11). Metoda zahrnuje mikrotitrační destičku s jamkami, ve kterých byly obsaženy rekombinantní antigeny s vysoce specifickými imunodominantními epitopy EBV EBNA-1. V případě přítomnosti cílových protilátek ve vzorku dojde k jejich navázání na antigeny a vznikne imunokomplex. Veškeré ostatní nenavázané protilátky se odstraní promytím. V dalším kroku se přidají sekundární monoklonální protilátky značené enzymem křenuv peroxidáza, které se vážou na imunokomplex. Po přidání substrátu

s TMB dojde k modré barevné změně. Reakce je ukončena zastavovacím kyselým roztokem, který stabilizuje výsledné zabarvení na žlutou. Intenzita tohoto zabarvení, vyjádřená jako optická densita vzorku, je přímo úměrná koncentraci cílových protilátek ve vzorku a měří se spektrofotometricky při vlnové délce 450 nm (TestLine Clinical Diagnostics: Návod pro použití EIA EBV EBNA-1 IgM, 2019; EIA EBV EBNA-1 IgG, 2019).



Obrázek č. 9: Sendvičová ELISA metoda (zdroj: TestLine Clinical Diagnostics s.r.o., n.d.).

5.3.2 Složení soupravy a další potřebné vybavení

ELISA souprava obsahuje sadu reagensií a spotřebního materiálu připraveného k okamžitému použití. Součástí balení je 96jamková dělená mikrotitrační destička s navázaným specifickým antigenem, kontrolní vzorky (CUT-OFF, pozitivní a negativní kontrola), kalibrátor, konjugát, substrát TMB a promývací roztok v ředění 1:20 (1 díl roztoku a 19 dílů destilované vody), ředící a zastavovací roztok (TestLine Clinical Diagnostics: Návod pro použití EIA EBV EBNA-1 IgM, 2019; EIA EBV EBNA-1 IgG, 2019).

Mezi další potřebné vybavení patřily pipety, jednorázové špičky, promývací zařízení, termostat nastavený na teplotu 37 °C a fotometr určený pro mikrotitrační destičky.

5.3.3 Pracovní postup

Metoda ELISA byly provedena manuálně v jedenácti po sobě následujících krocích vedoucích k detekci specifických protilátek EBNA-1 IgM a EBNA-1 IgG ve vzorku, které jsou přehledně znázorněny na obrázku č. 12.

Krok	Kroky testu
	1. Ředění vzorků – séra/plazmy 1:101 (10 µl + 1 ml)
	Dávkování kontrol a ředěných vzorků 2. 100 µl – blank = prázdná jamka
	3. Inkubace 30 min. při 37 °C
	4. Odsátí a promytí jamek 5 krát
	Dávkování Konjugátu 100 µl 5. – blank = prázdná jamka
	6. Inkubace 30 min. při 37 °C
	7. Odsátí a promytí jamek 5 krát
	Dávkování substrátu (TMB-Complete) 8. 100 µl – včetně blanku
	9. Inkubace 30 min. při 37 °C
	Dávkování Zastavovacího 10. roztoku 100 µl – včetně blanku
	11. Fotometrické měření při 450 nm

Obrázek č. 10: Pracovní postup metody ELISA (zdroj: *Imunoenzymatické soupravy k diagnostice infekční mononukleózy*, 2022).

5.3.4 Interpretace výsledků

Celková doba analýzy vzorku metodou ELISA trvá přibližně 1,5 hodiny, po dokončení následuje vyhodnocení výsledků. Kvantitativní interpretace výsledků je prováděna analyzátozem, který změří absorbanci a dle kalibrační křivky odečte výslednou koncentraci protilátky ve vzorku. Výsledná hodnota se udává v jednotkách U/ml. Kvantitativní vyhodnocení metody ELISA je znázorněna v tabulce č. 8.

Tabulka č. 8: Kvantitativní interpretace hladiny protilátek v jednotkách (U/ml).

Hladina protilátek (U/ml)	Hodnocení
menší než 18	negativní
18 až 22	hraniční
větší než 18	pozitivní

Zdroj: TestLine Clinical Diagnostics: Návod pro použití EIA EBV EBNA-1 IgM, 2019; EIA EBV EBNA-1 IgG, 2019.

Druhým způsobem interpretace, který využívala laboratoř NEMCB, je semikvantitativní vyhodnocení pomocí indexu positivity (IP). Tento index vyjadřuje poměr mezi absorbancí testovaného vzorku a průměrnou hodnotou absorbance CUT-OFF v rámci jednoho měření. Výsledek indexu positivity je hodnocen dle stanovených mezních hodnot uvedených v tabulce č. 9 (TestLine Clinical Diagnostics: Návod pro použití EIA EBV EBNA-1 IgM, 2019; EIA EBV EBNA-1 IgG, 2019).

Tabulka č. 9: Semikvantitativní vyhodnocení.

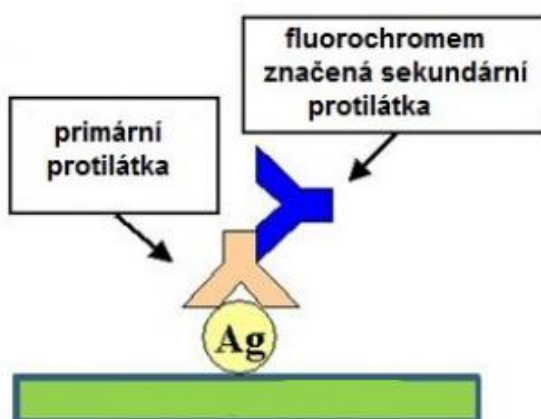
Index positivity (IP)	Hodnocení	Hodnocení v NEMCB
menší než 0,9	negativní	negativní
0,9 až 1,1	hraniční	hraniční
větší než 1,1	pozitivní	+, ++, +++

Převzato a upraveno dle TestLine Clinical Diagnostics: Návod pro použití EIA EBV EBNA-1 IgM, 2019; EIA EBV EBNA-1 IgG, 2019.

5.4 IFA

5.4.1 Princip metody

Nepřímá imunofluorescence (IFA) je metoda založená na detekci specifických protilátek proti virovým antigenům exprimovaným v infikovaných buňkách za využití fluorescenční mikroskopie. Metoda IFA byla využita k průkazu protilátek proti EBV ze vzorků krevního séra, a to konkrétně k průkazu protilátek třídy IgG a IgM proti antigenům VCA a protilátek IgG proti antigenu EA(D). Antigeny jsou exprimovány ve zvýšeném počtu v infikovaných buňkách, z nichž se pak připravují nátěry, které jsou následně fixovány na podložní sklíčka. V přítomnosti antigenu v séru se na antigen naváže primární protilátka a vznikne imunokomplex. Na tento imunokomplex se následně váže sekundární protilátka značená fluorescenčním barvivem, konkrétně FITC. Schéma principu nepřímé imunofluorescence je znázorněno na obrázku č. 11. Výsledný fluorescenční signál je detekován pomocí fluorescenční mikroskopie, což umožňuje zviditelnění reakce a potvrzení přítomnosti cílových protilátek ve vzorku (VIDIA spol.: Návod pro použití IF-VIDITEST anti-VCA EBV IgG, 2019; Návod pro použití IF-VIDITEST anti-VCA EBV IgM, 2021; Návod pro použití IF-VIDITEST anti-EA EBV IgG, 2020).



Obrázek č. 11: Nepřímá imunofluorescence (zdroj: Lochmanová, 2014).

5.4.2 IFA souprava a další potřebné vybavení

Ke stanovení specifických protilátek VCA IgG, VCA IgM a EA(D) IgG se využívá diagnostická souprava určená pro nepřímou imunofluorescenci. Tato souprava obsahuje dvě rastrovaná podložní sklíčka, pozitivní a negativní kontroly s protilátkami třídy IgG a IgM proti uvedeným antigenům, konjugát značený FITC a montovací roztok pro přípravu preparátů k mikroskopování. Kromě samotné soupravy je potřeba i dalšího základního laboratorního vybavení a pomůcek, jako jsou PBS roztok (fosfáty pufovaný fyziologický roztok), destilovaná voda, vlhká komůrka, zkumavky a pipety k ředění a aplikaci reagensů, kyvety, krycí sklíčka a fluorescenční mikroskop (VIDIA spol.: Návod pro použití IF-VIDITEST anti-VCA EBV IgG, 2019; Návod pro použití IF-VIDITEST anti-VCA EBV IgM, 2021; Návod pro použití IF-VIDITEST anti-EA EBV IgG, 2020).

5.4.3 Pracovní postup

Tabulka č. 10: Pracovní postup metody IFA.

Krok	Kroky testu
1.	Naředit kontrolní a testovací séra dle doporučení.
2.	Aplikovat 30 µl naředěných sér do jednotlivých jamek rastrového sklíčka.
3.	Do první jamky přidat pozitivní kontrolu, do druhé jamky negativní kontrolu, do zbývajících jamek testovací séra.
4.	Inkubovat sklíčka 60 min při 37 °C.
5.	Odsát séra a promýt sklíčka v PBS 3krát po 5 min
6.	Nakapat na jamky FITC konjugát.
7.	Opět inkubovat sklíčka 60 min při 37 °C.
8.	Odsát konjugát a promýt sklíčka v čerstvém PBS 3krát po 5 min.
9.	Promýt sklíčka v destilované vodě a nechat uschnout při 37 °C.
10.	Zamontovat a přikrýt jamky krycím sklíčkem.
11.	Odečíst výsledky pomocí fluorescenčního mikroskopu.

Převzato a upraveno dle citace VIDIA spol.: Návod pro použití IF-VIDITEST anti-VCA EBV IgG, 2019; Návod pro použití IF-VIDITEST anti-VCA EBV IgM, 2021; Návod pro použití IF-VIDITEST anti-EA EBV IgG, 2020).

5.4.4 Interpretace výsledků

Hodnocení výsledků se provádí pomocí fluorescenčního mikroskopu v modrém excitačním světle. V případě pozitivní reakce dochází v buňkách k výskytu zelené fluorescence, která může být lokalizována v cytoplazmě, v buněčném jádře nebo na buněčné membráně. Výskyt fluorescence závisí na typu zjišťovaných protilátek proti cílovému antigenu. Při negativním nálezu nejsou přítomné žádné specifické protilátky, a proto buňky vykazují tmavě zelené až načervenalé zbarvení.

Při orientačním neboli kvalitativním vyšetření se zjišťuje pouze přítomnost či nepřítomnost protilátek ve vyšetřovaném séru. Výsledek je pak hodnocen jako pozitivní nebo negativní. V rámci titračního (semikvantitativního) vyšetření se stanovuje titr protilátek, tedy nejvyšší ředění séra, při ještě vykazuje pozitivní reakci s cílovým antigenem (VIDIA spol.: Návod pro použití IF-VIDITEST anti-VCA EBV IgG, 2019; Návod pro použití IF-VIDITEST anti-VCA EBV IgM, 2021; Návod pro použití IF-VIDITEST anti-EA EBV IgG, 2020).

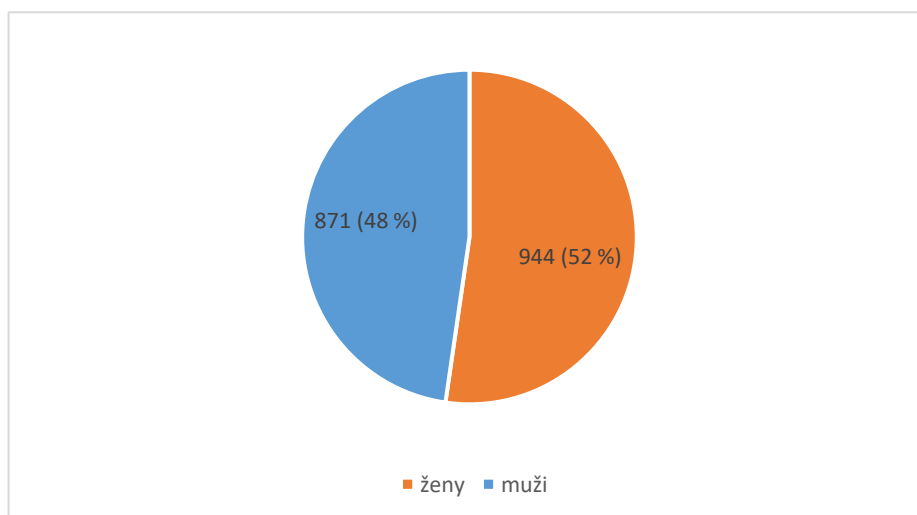
Hodnotící laboratoř NEMCB používala stanovení titru specifických protilátek proti antigenům EBV. Jako pozitivní reakce byl hodnocen titr větší než 20.

6 VÝSLEDKY

Původní práce, která hodnotila výsledky získané v imunologické laboratoři EUC Praha, kde byla provedena také praktická část této práce, byla doplněna a přepracována o následující soubor. Nový sledovaný soubor zahrnoval celkově 1815 (140 vzorků EUC Praha, 1675 PVIR NEMCB) vyšetřených pacientů v období leden-prosinec 2024. Jednalo se o krevní séra, která byla vyšetřena pomocí chemiluminiscenční imunoanalytické metody CLIA. Při přechodu laboratoře PVIR NEMCB na metodu CLIA bylo provedeno srovnání stávajících metod EIA a IFA s metodou CLIA u 19 vzorků vyšetřovaných krevních sér za účelem orientačního porovnání a zhodnocení efektivity metod při průkazu infekce virem Epstein-Barrové.

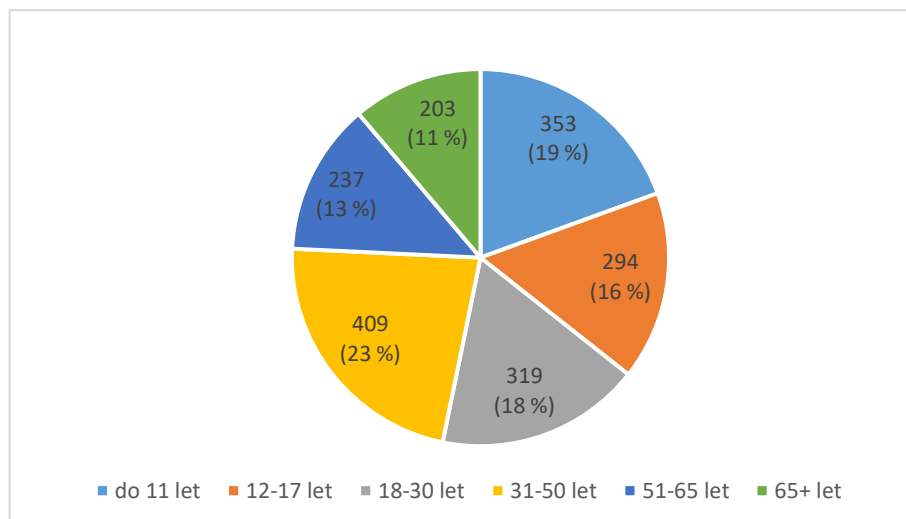
6.1 Počet vyšetřovaných pacientů metodou CLIA

V rámci sledovaného období roku 2024 bylo metodou CLIA analyzováno celkem 1815 vzorků krevního séra. Graf č. 1 znázorňuje poměrné zastoupení žen a mužů mezi vyšetřovanými pacienty. Z grafu vyplývá, že zastoupení obou pohlaví bylo téměř vyrovnané.



Graf č. 1: Zastoupení žen a mužů (zdroj: vlastní).

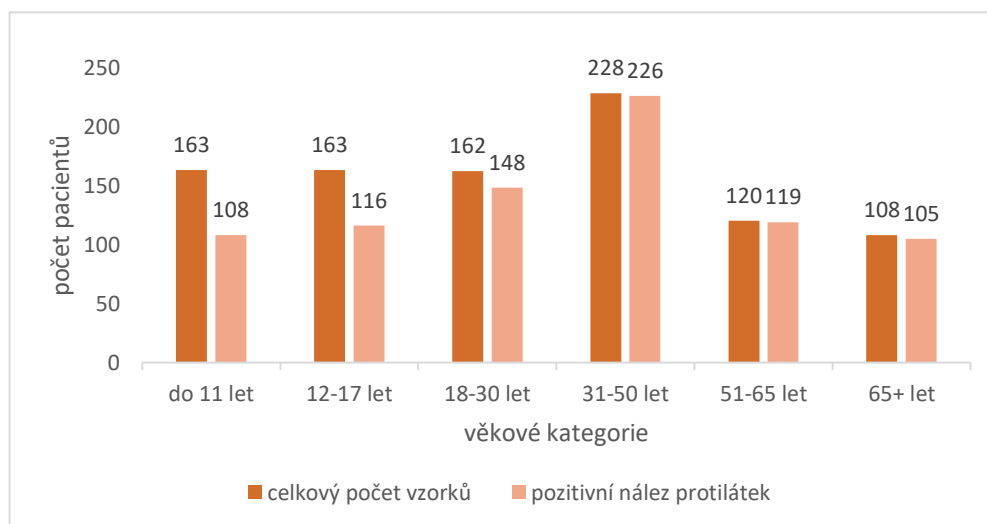
V následujícím grafu č. 2 je znázorněno zastoupení jednotlivých věkových kategorií ve sledovaném souboru vyšetřovaných pacientů. Nejpočetnější skupinu tvořily dospělé osoby ve věku 31–50 let, kterých bylo celkem 409 osob (23 %). Druhou nejčastěji zastoupenou skupinou byly děti do 11 let, kterých bylo vyšetřených 353 (19 %).



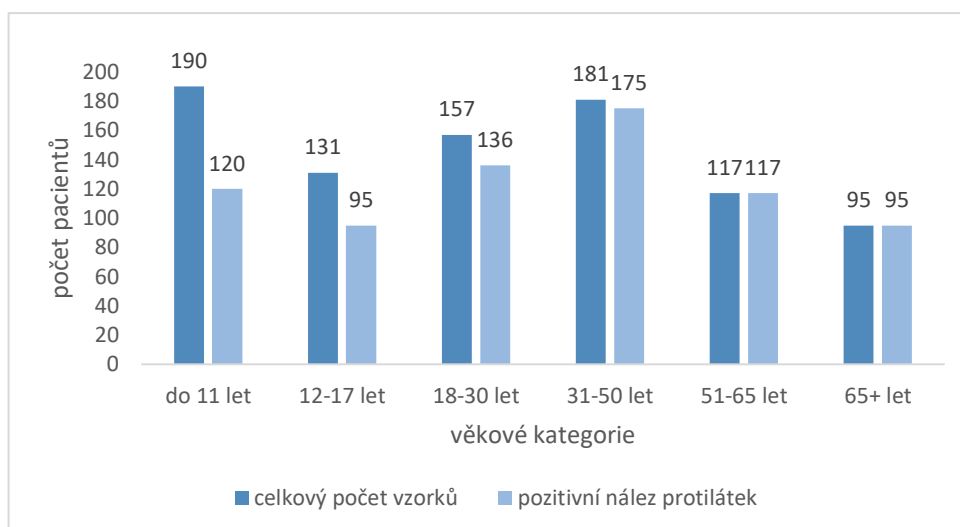
Graf č. 2: Počet pacientů v jednotlivých věkových kategoriích (zdroj: vlastní).

6.2 Zastoupení pozitivního nálezu protilátek

V následujících dvou grafech č. 3 a č. 4 je vyjádřeno zastoupení pozitivního nálezu specifických protilátek bez hodnocení fáze infekce EBV, a to samostatně u žen a mužů v jednotlivých věkových kategoriích. Nejvyšší počet pozitivních nálezů byl zaznamenán ve věkové kategorii 31-50 let. U žen v této kategorii bylo zaznamenáno 226 pozitivních nálezů z 228 vyšetřených vzorků, jak ukazuje graf. č. 3, zatímco u mužů bylo pozitivních 175 vzorků ze 181 vyšetřených vzorků, jak ukazuje graf č. 4.

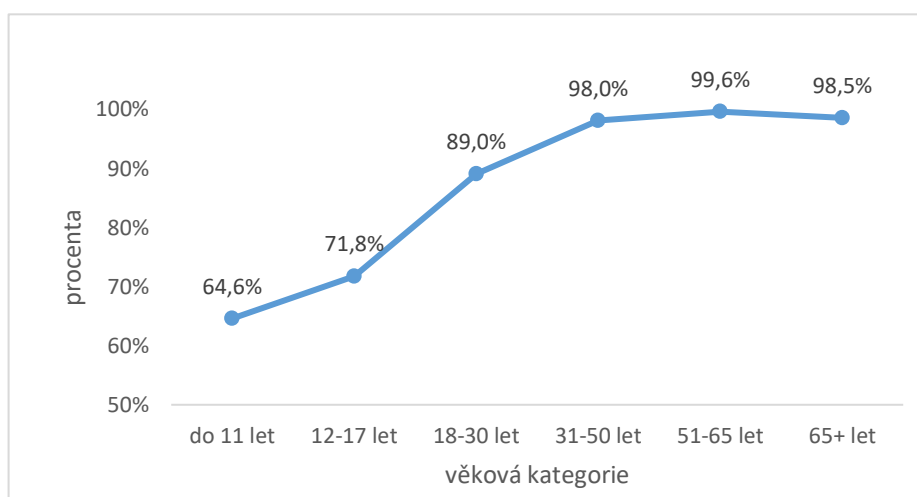


Graf č. 3: Pozitivní nález u žen (zdroj: vlastní).



Graf č. 4: Pozitivní nález u mužů (zdroj: vlastní).

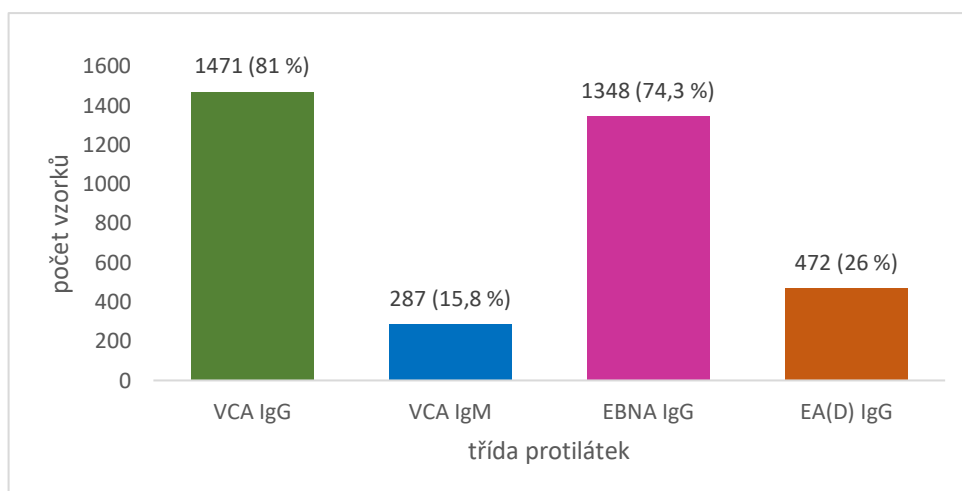
Z výsledků vyplývá, že se zvyšujícím se věkem osob dochází k nárůstu výskytu specifických protilátek proti EBV, přičemž ve vyšších věkových kategoriích je jejich výskyt téměř 100 %. Graf č. 5 znázorňuje celkovou promořenost osob s pozitivním nálezem protilátek proti EBV. U dětí do 17 let se výskyt pozitivního nálezu pohybuje přibližně kolem 69 %, zatímco u dospělých nad 31 let dosahuje přibližně 98-99 %.



Graf č. 5: Celková promořenost osob s výskytem protilátek proti EBV (zdroj: vlastní).

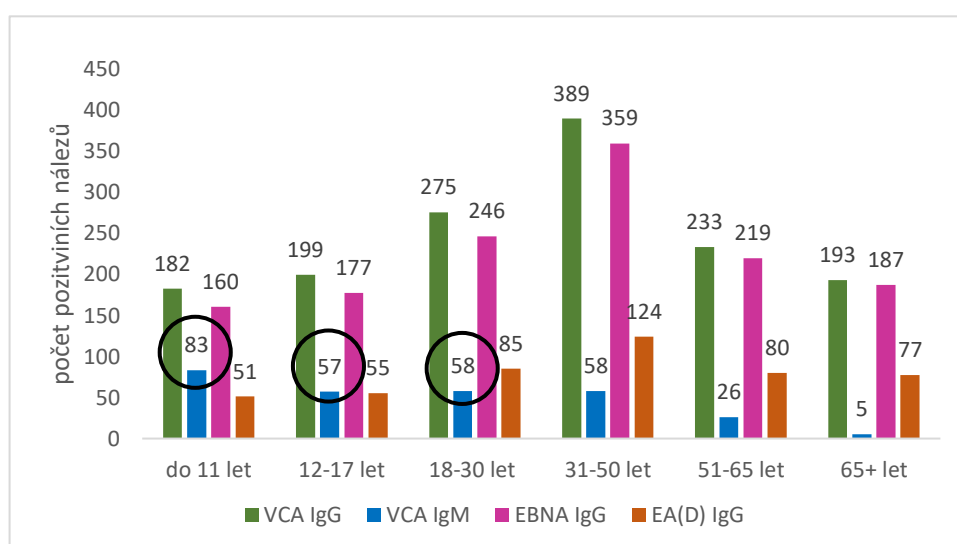
6.3 Výskyt specifických protilátek proti jednotlivým antigenům EBV

Ve sledovaném souboru byly zjišťovány specifické protilátky proti antigenům EBV, a to VCA IgG, VCA IgM, EBNA-1 IgG a EA(D) IgG, jak znázorňuje graf č. 6. Nejvíce se vyskytovaly protilátky VCA IgG, které byly zjištěny ve 1471 případech (81 %), a dále protilátky EBNA-1 IgG s celkovým počtem 1348 pozitivních vzorků (74,3 %).



Graf č. 6: Výskyt specifických protilátek proti antigenům EBV (zdroj: vlastní).

Specifické protilátky třídy IgM byly detekovány u celkem 287 (15,8 %) pacientů a nejvíce v mladších věkových kategoriích do 30 let, kde bylo celkem zjištěno 198 pozitivních nálezů, což představuje přibližně 69 % z celkové počtu všech zjištěných protilátek VCA IgM. Graf č. 7 znázorňuje dynamiku výskytu všech specifických protilátek proti EBV v různých věkových kategoriích.



Graf č. 7: Dynamika výskytu specifických protilátek proti EBV (zdroj: vlastní).

6.4 Interpretace nálezů dle výskytu specifických protilátek proti antigenům EBV

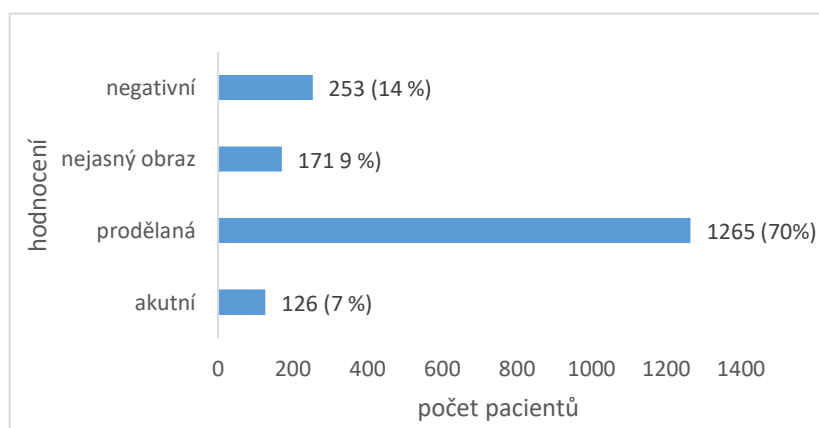
Poslední graf č. 8 shrnuje interpretaci získaných výsledků, a to na základě sledovaných laboratorních parametrů dle definovaných hodnotících kritérií uvedených v tabulce č. 11, do čtyř skupin (akutní, prodělaná, nejasný obraz a negativní). Anamnéza a klinický stav pacienta nebyly k dispozici.

Tabulka č. 11: Hodnotící kritéria fází infekce EBV.

Fáze	VCA IgM	VCA IgG	EBNA-1 IgG	EA(D) IgG
negativní bez infekce EBV	NEG	NEG	NEG	NEG
primoinfekce preklinická	POZ	POZ/NEG	NEG	NEG
primoinfekce klinická	POZ	POZ	NEG	POZ/NEG
primoinfekce pozdní fáze	POZ/NEG	POZ	POZ/NEG	POZ
reaktivace	NEG	POZ	POZ	POZ
chronická infekce	NEG	POZ	POZ	POZ
pozdní fáze infekce	NEG	NEG	POZ	POZ

Převzato a upraveno dle *Stanovení protilátek proti antigenům viru Epstein-Barrové metodou CLIA, 2025.*

Z celkové počtu 1815 vzorků krevních sér byly u 1265 pacientů (70 %) zjištěny současně zvýšené hladiny protilátek VCA IgG a EBNA-1 IgG bez přítomnosti dalších protilátek, což ukazuje na anamnestické protilátky, a tedy již prodělanou infekci EBV. Akutní fáze infekce EBV, která je charakterizována převážně zvýšenými hladinami protilátek VCA IgM v kombinaci s VCA IgG, popřípadě EA(D) IgG, byla zjištěna u 126 pacientů (7 %) z celkového počtu 287 pacientů s pozitivitou protilátek VCA IgM. U 253 pacientů (14 %) nebyly zjištěny žádné specifické protilátky proti EBV, což svědčí o nepřítomnosti infekce EBV.



Graf č. 8: Interpretace výsledků dle výskytu protilátek proti EBV (zdroj: vlastní).

6.5 Tabulka pozitivních nálezů v souvislosti s diagnózou

V tabulce č.12 jsou pacienti ve sledovaném souboru rozděleni do jednotlivých základních diagnostických skupin. Je patrné, že vyšetření na přítomnost specifických protilátek proti antigenům EBV bylo indikováno u širokého spektra diagnóz. Sloupec označující přítomnost specifických protilátek zahrnuje pouze ty pacienty, u nichž byla prokázána akutní nebo prodělaná fáze infekce EBV. Barevně jsou pak v tabulce č. 12 označeny diagnostické skupiny zahrnující onemocnění sledovaná v této práci, konkrétně autoimunitní nebo onkohematologická (lymfomová) onemocnění.

Tabulka č. 12: Počty pacientů v základních diagnostických skupinách ve vyšetřovaném souboru.

Diagnóza	celkem pacientů	přítomnost specifických protilátek
Infekční a parazitární nemoci: A, B	73	58
Novotvary: C-D48	64	57
Nemoci krve a krvetvorných orgánů a poruchy imunity: D50-D89	151	124
Nemoci endokrinní a metabolické: E	20	16
Nemoci duševní a poruchy chování: F	22	19
Nemoci nervové soustavy: G	27	21
Nemoci oka a očních adnex, nemoci ucha a bradavkového výběžku: H	13	8
Nemoci oběhové soustavy: I	31	26
Nemoci dýchací soustavy: J	173	120
Nemoci trávicí soustavy: K	169	138
Nemoci kůže a podkožního vaziva: L	178	143
Nemoci svalové a kosterní soustavy a pojivové tkáně: M	94	78
Nemoci močové a pohlavní soustavy: N	48	42
Těhotenství, porod, šestinedělí; perinatální stavy; vrozené vady, deformace, chromozomální abnormality: O, P, Q	12	9
Příznaky, znaky a abnormální nálezy nezařazené jinde: R	553	398
Poranění, otravy, následky působení vnějších příčin: S, T	8	5
Kódy pro speciální účely: U	2	2
Vnější příčiny nemocnosti a úmrtnosti: V, W, X, Y	0	0
Faktory ovlivňující zdravotní stav: Z	177	127
celkem	1815	1391

Převzato a upraveno dle: Mediately, n.d.

V následujících tabulkách č. 13 a č. 14 jsou shrnuty počty pacientů s diagnózou autoimunitního či onkohematologického (lymfomového) onemocnění, ze kterých vyplývá, že tyto diagnózy byly zastoupeny v našem souboru pouze minoritně. Jednalo se pouze o jednotky pacientů se SLE, RA a dalších autoimunit, a několik málo pacientů s lymfomovým onemocněním v diagnóze.

Tabulka č. 13: Počty pacientů s diagnózou autoimunitního onemocnění.

Autoimunitní onemocnění	počet
SLE (M321, M329)	4
RA (M059, M060, M068, M069)	8
ostatní (SS, systémové postižení, HA) (M350, M359, D591)	5
celkem	17

Zdroj: vlastní.

Tabulka č. 14: Počty pacientů s diagnózou onkohematologického onemocnění.

Lymfomy	počet
Hodgkinův lymfom (C811)	1
typ non-Hodgkinova lymfomu (C851, C857)	3
celkem	4

Zdroj: vlastní

6.6 Srovnání použitých laboratorních metod

Při přechodu laboratoře PVIR NEMCB na novou metodu vyšetřování specifických protilátek proti antigenům EBV bylo provedeno srovnání stávajících metod EIA a IFA s metodou CLIA u souboru 19 vzorků krevních sér. Získané výsledky a informace (princip, cíle stanovení, typ diagnostické metody, doba analýzy, způsob hodnocení výsledků, výhody a nevýhody) k jednotlivým metodám byly srovnány a vyhodnoceny v tabulce č. 15. Porovnání získaných výsledků z jednotlivých metod EIA, CLIA a IFA v souboru 19 pacientů vedlo ke srovnatelným laboratorním závěrům, resp. jejich interpretaci.

Tabulka č. 15: Srovnání použitých laboratorních metod.

Metoda	CLIA	ELISA	IFA
Princip	Chemiluminiscenční reakce	Barevná změna enzymatickou reakcí	Barevná změna fluorescenčním barvivem
Stanovení	Protilátky IgG, IgM	Protilátky IgG, IgM	Protilátky IgG, IgM
Průkaz	Ab IgM a IgG proti antigenům VCA, EBNA-1 a EA(D)	Ab IgM a IgG proti antigenům EBNA-1	Ab IgG a IgG proti antigenům VCA a EA(D)
Typ diagnostické metody	Nepřímá specifická	Nepřímá specifická	Nepřímá specifická
Doba analýzy	do 30 minut	1,5 hodiny	2-3 hodiny
Hodnocení	Kvantitativní	Kvantitativní Semikvantitativní	Kvalitativní Semikvantitativní
Výhody	Vysoká citlivost, rychlost, moderní metoda, automatizovatelnost.	Dobrá dostupnost, nízké náklady, automatizovatelnost, možnost standardizace.	Vysoká specifická a citlivost, nízké náklady.
Nevýhody	Vysoké náklady, potřeba specializovaného vybavení.	Delší doba stanovení	Manuální provedení, subjektivní vyhodnocení, potřeba specializovaného vybavení.

Zdroj: vlastní.

7 DISKUZE

Laboratorní diagnostika viru Epstein-Barrové byla v této práci postavena na detekci specifických protilátek proti antigenům EBV, konkrétně protilátek VCA IgG, VCA IgM, EBNA-1 IgG a EA(D) IgG, pomocí chemiluminiscenční imunoanalytické metody (CLIA) v imunologické laboratoři EUC Praha a na Pracovišti virologie NEMCB. Průkaz infekce EBV vyžaduje znalost významu specifických protilátek proti jednotlivým antigenům EBV, a to v závislosti na věku osoby a jeho klinickém stavu.

V rámci této práce bylo analyzováno 1815 vzorků krevního séra od různých jedinců. Nejčastěji vyšetřovanými skupinami byly dospělé osoby ve věkové kategorii 31-50 let a děti do 11 let. Z hlediska celkové positivity protilátek proti antigenům EBV bylo prokázáno převažující množství pozitivních vzorků (77 %) nad negativními či nejednoznačnými vzorky. Další analýza ukázala, že protilátky se nejčastěji vyskytují u dospělých osob ve věku 31 až 50 let. Nejvyšší hladiny byly zaznamenány u protilátek třídy IgG proti antigenům VCA a EBNA-1, což svědčí o přítomnosti tzv. anamnestických protilátek a poukazuje na dříve prodělanou infekci EBV (Atefi, 2023). Tyto výsledky naznačují, že výskyt specifických protilátek proti EBV je u dospělých osob výrazně vyšší než u dětí a dospívajících do 17 let. V námi sledovaném souboru byla jejich prevalence u dospělých přibližně 96,2 %, zatímco u osob mladších 17 let dosahovala přibližně 69 %. Tím byla potvrzena první hypotéza, že věk jedince má vliv na přítomnost protilátek proti EBV. Tato informace je také v souladu s literaturou, která uvádí, že v dospělé populaci je výskyt anamnestických protilátek až 95 % a u dětí a dospívajících kolem 66,5 % (Hoover & Higginbotham, 2023).

Virus Epstein-Barrové je často spojován s řadou komplikací a autoimunitními a nádorovými onemocněními (Fugl & Andersen, 2019), což ukazuje na jeho variabilitu a schopnost ovlivňovat různé patologické procesy. Asociace EBV k autoimunitním onemocněním je výraznější, přestože virus Epstein-Barrové se spíše jen podílí na jejich rozvoji jako přispívající faktor, než aby byl jejich přímou příčinou. Naproti tomu vztah EBV k nádorovým onemocněním je slabší. Přesto může být EBV přítomen přímo v nádorových buňkách, zejména v B-lymfocytech, které jsou nejčastějším typem lymfoproliferací (Damania et al., 2022). Výsledky detekce protilátek proti antigenům EBV metodou CLIA v našem souboru ukázaly, že většina pozitivních nálezů souvisí se

dříve prodělanou infekcí EBV, potvrzenou přítomností tzv. anamnestických protilátek, které se mohou běžně vyskytovat i u jiných onemocněních nesouvisejících s infekcí EBV. Samotný laboratorní průkaz protilátek proti antigenům EBV bez znalosti klinického stavu jedince v námi sledovaném souboru však neukazuje jednoznačně na žádné konkrétní onemocnění, resp. autoimunitní nebo lymfomové onemocnění. Nebyla tedy prokázána žádná významná souvislost mezi pozitivitou EBV a autoimunitním nebo lymfomovým onemocněním, a to také z důvodu sledovaného souboru, ve kterém bylo testováno na EBV pouze velmi malé procento osob s diagnostikovanými autoimunitními nebo onkohematologickými onemocněními. Je zřejmé, že diagnostika EBV není součástí rutinního vyšetření u těchto pacientů. Na základě našich získaných výsledků proto nelze jednoznačně určit, že pozitivita specifických protilátek proti EBV je častější ukazatel těchto onemocnění, čímž nelze druhou hypotézu potvrdit. V literatuře jsou však popisována některá autoimunitní onemocnění jako roztroušená skleróza, systémový lupus erythematoses, Sjögrenův syndrom, revmatoidní artritida, systémová sklerodermie a autoimunitní onemocnění štítné žlázy s jasným spojením s infekcí EBV (Trier et al., 2018; Rzymiski & Szuster-Ciesielska, 2023). Podobně je tomu také v případě výskytu některých lymfomů jako například Burkittův lymfom, Hodgkinův lymfom a non-Hodgkinův lymfom jako difúzní velkobuněčný B-lymfom (DLBCL) (Ward et al., 2022; Huang et al., 2023).

Srovnání použitých laboratorních metod CLIA, EIA a IFA pro průkaz specifických protilátek proti antigenům EBV ukázalo, že všechny tyto metody jsou vhodné k danému účelu. Nově zavedená metoda CLIA využívá podobný princip jako EIA, avšak s využitím chemiluminiscence k detekci protilátek proti EBV. Ačkoli je tato metoda finančně náročnější a vyžaduje specializované vybavení, její hlavní výhodou je vysoká citlivost, možnost zpracování velkého počtu vzorků, krátká doba analýzy, a tedy i rychlý výsledek ve srovnání s metodou EIA či IFA. Na základě tohoto srovnání byla třetí hypotéza, která předpokládala větší vhodnost metody ELISA (EIA), vyvrácena. Lze tedy konstatovat, že výsledky jsou z těchto metod srovnatelné a záleží na pracovišti, jeho finančních a prostorových možnostech a počtu vyšetřovaných vzorků, kterou metodu zvolí. Je-li laboratorní diagnostika doplněna také o přímou detekci viru PCR a odpověď buněčné imunity, která výrazně reaguje na virovou infekci, jsou laboratoří poskytnuty komplexní

informace pro hodnocení fáze infekce a také sledování průběhu onemocnění a hodnocení případné léčby.

8 ZÁVĚR

V teoretické části této bakalářské práce byl podrobně popsán virus Epstein-Barrové, jeho charakteristika a zařazení do skupiny herpetických virů. Dále byly shrnuty informace o onemocněních, které může virus vyvolávat, a popsány dostupné možnosti laboratorního průkazu viru Epstein-Barrové.

Praktická část byla zaměřena na průkaz výskytu protilátek proti antigenům viru Epstein-Barrové pomocí chemiluminiscenční imunoanalytické metody (CLIA). Celkem bylo analyzováno 1815 vzorků krevního séra odebraných od různých jedinců v imunologické laboratoři EUC Praha a na Pracovišti virologie NEMCB. Na základě poskytnutých dat a jejich zpracování bylo zjištěno, že pozitivita protilátek byla zaznamenána u 77 % vzorků. Z celkového počtu pozitivních výsledků byl nejvyšší výskyt protilátek zaznamenán ve věkové kategorii od 31 do 50 let, tedy ve skupině dospělých osob středního věku.

Dále byl zkoumán vztah mezi přítomností protilátek proti antigenům viru Epstein-Barrové a výskytem onemocnění. Z výsledků bylo zjištěno, že nejčastěji byly detekovány anamnestické protilátky VCA IgG a EBNA-1 IgG, které obvykle ukazují na dříve prodělanou infekci EBV, nikoliv na akutně probíhající onemocnění.

V závěru práce bylo provedeno porovnání vybraných analytických metod CLIA, EIA a IFA. Na základě srovnání byla metoda CLIA vyhodnocena jako vhodná pro detekci protilátek proti viru Epstein-Barrové, především díky své vysoké citlivosti a schopnosti rychlé analýzy většího množství vzorků v kratším čase. Dnes se už s touto metodou, díky stále větší tendenci automatizace laboratorního provozu, setkáváme častěji.

Diagnostika infekce EBV může být vedle průkazu specifických protilátek také rozšířena o další laboratorní metody, zejména o přímý průkaz viru pomocí PCR či vyšetření buněčné imunity průtokovou cytometrií.

9 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- Abdelmonem, M., Abdullah, C. A. C., Bastawecy, I. M., Raof, A. M. A., Afify, A. F., El Naggat, R. F., Rohaim, M. A., & Munir, M. (2024). Antiviral Nanomedicine-Based Approaches against Epstein-Barr Virus Infection. *Current Treatment Options in Infectious Diseases*, 16(2), 58-71. <https://doi.org/10.1007/s40506-024-00271-4>
- Abusalah, M. A. H., Gan, S. H., Al-Hatamleh, M. A. I., Irekeola, A. A., Shueb, R. H., & Yean Yean, C. (2020). Recent Advances in Diagnostic Approaches for Epstein-Barr Virus. *Pathogens*, 9(3), 1-17. <https://doi.org/10.3390/pathogens9030226>
- Artenstein, A. W. (2012). The discovery of viruses: advancing science and medicine by challenging dogma. *International Journal of Infectious Diseases*, 16(7), e471. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2012.03.005>
- Atefi, A. (2023). Perspective Chapter: Epstein-Barr Virus – Emphasis on Diagnostic Approaches. In H. Puerta-Guardo, G. Ayora Talavera, & L. Conde Ferraez (Eds.), *Viral Replication Cycle - From Pathogenesis and Immune Response to Diagnosis and Therapy* (pp. 1-18). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.1003271>
- Beadar, N., Kolarić, B., Slaćanac, D., Tabain, I., & Vilibić-Čavlek, T. (2018). Seroepidemiological Study of Epstein-Barr Virus in Different Population Groups in Croatia. *The Israel Medical Association journal : IMAJ*, 20(2), 86–90.
- Beilstein, F., Cohen, G. H., Eisenberg, R. J., Nicolas, V., Esclatine, A., Padeloup, D., & Mori, Y. (2019). Dynamic organization of Herpesvirus glycoproteins on the viral envelope revealed by super-resolution microscopy. *PLOS Pathogens*, 15(12), 1-21. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008209>
- Correia, S., Bridges, R., Wegner, F., Venturini, C., Palser, A., Middeldorp, J. M., Cohen, J. I., Lorenzetti, M. A., Bassano, I., White, R. E., Kellam, P., Breuer, J., Farrell, P. J., & Longnecker, R. M. (2018). Sequence Variation of Epstein-Barr Virus: Viral Types, Geography, Codon Usage, and Diseases. *Journal of Virology*, 92(22), e01132-18. <https://doi.org/10.1128/JVI.01132-18>
- CUSABIO. (c2007-2025). *Epstein-Barr virus*. CUSABIO. Retrieved March 26, 2025, from <https://www.cusabio.com/infectious-diseases/epstein-barr-virus.html>
- Damania, B., Kenney, S. C., & Raab-Traub, N. (2022). Epstein-Barr virus: Biology and clinical disease. *Cell*, 185(20), 3652-3670. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.08.026>
- de la Higuera, I., & Lázaro, E. (2022). Viruses in astrobology. *Frontiers in Microbiology*, 13, 3-4. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1032918>
- DiaSorin S.p.A. (2023). *Návod pro použití LIAISON® VCA IgM* (07 ed.). CS-200/007-837
- DiaSorin S.p.A. (2023). *Průručka uživatele: Liaison® XL* (česká verze). CS-200/008-936
- DiaSorin S.p.A. (2024). *Návod pro použití LIAISON® EA(D) IgG* (03 ed.). CS-200/007-853

- DiaSorin S.p.A. (2025). *Návod pro použití LIAISON® EBNA-1 IgG* (09 ed.). CS-200/007-839
- DiaSorin S.p.A. (2025). *Návod pro použití LIAISON® VCA IgG* (12 ed.). CS-200/007-878
- DiaSorin S.p.A. (n.d.). *Advanced immunodiagnostic testing tools*. Diasorin. Retrieved July 23, 2025, from <https://int.diasorin.com/en/immunodiagnostics/tools/liaison-xl?f%5B0%5D=sapl%3A38>
- Drnková, B. (2019). *Mikrobiologie, imunologie, epidemiologie a hygiena: pro zdravotnické obory*. Grada. <https://www.bookport.cz/kniha/mikrobiologie-imunologie-epidemiologie-a-hygiena-6037/>
- Elísková, K. (2022). *Průkaz EBV viru v tkáňovém materiálu* [Bakalářská práce]. Masarykova univerzita, Lékařská fakulta.
- Escalante, G. M., Mutsvunguma, L. Z., Muniraju, M., Rodriguez, E., & Ogembo, J. G. (2022). Four Decades of Prophylactic EBV Vaccine Research: A Systematic Review and Historical Perspective. *Frontiers in Immunology*, 13, 1-44. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.867918>
- EUC Laboratoře s.r.o. (2023). *Laboratorní příručka Imunologie* (verze č.: 01). EUC Laboratoře. https://www.euclaboratore.cz/media/va3lan32/sm_euclab_00201-laboratorn%C3%AD-p%C5%99%C3%ADru%C4%8Dka-imu.pdf
- Fugl, A., & Andersen, C. L. (2019). Epstein-Barr virus and its association with disease - a review of relevance to general practice. *BMC Family Practice*, 20(1), 1-8. <https://doi.org/10.1186/s12875-019-0954-3>
- Hoover, K., & Higginbotham, K. (2023). Epstein-Barr Virus. In StatPearls. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559285/>
- Houen, G., & Trier, N. H. (2021). Epstein-Barr Virus and Systemic Autoimmune Diseases. *Frontiers in Immunology*, 11(587380), 1-13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.587380>
- Hristova, N., & Galabov, A. S. (2022). Genus Simplex Virus: Classification, Morphology and Genome Organization. *Acta Microbiologica Bulgarica*, 35(4), 280-288.
- Huang, W., Bai, L., & Tang, H. (2023). Epstein-Barr virus infection: the micro and macro worlds. *Virology Journal*, 20(1), 1-13. <https://doi.org/10.1186/s12985-023-02187-9>
- Hurych, J., & Štícha, R. (2021). *Lékařská mikrobiologie: repetitorium* (3. vydání). Stanislav Juhaňák - Triton.
- Chaloupková, L. (2020). *Laboratorní vyšetření herpetických infekcí (EBV, CMV) u pacientů Nemocnice České Budějovice, a.s.* [Diplomová práce]. Jihočeská univerzita, Zemědělská fakulta.
- Imunoenzymatické soupravy k diagnostice infekční mononukleózy*. (2022) (V07). TestLine Clinical Diagnostics.
- Jha, H. C., Pei, Y., & Robertson, E. S. (2016). Epstein–Barr Virus: Diseases Linked to Infection and Transformation. *Frontiers in Microbiology*, 7(1602), 1-16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01602>

- Krejsek, J., Andrýs, C., & Krčmová, I. (2016). *Imunologie člověka*. Garamon.
- Krug, R.M., Wagner, R.R. (2025, February 14). virus. Encyclopedia Britannica. <https://www.britannica.com/science/virus>
- Laboratorní příručka LKCHI*. (2019) (verze D). Nemocnice České Budějovice. https://www.nemcb.cz/upload/files/laboratore/lkchi/NCB_LKCHI_SME_15_001_D_Laboratorni_prirucka_LKCHI.pdf
- Li, Z., & Yu, X. (2020). Progress towards revealing the mechanism of herpesvirus capsid maturation and genome packaging. *Protein & Cell*, 11(5), 316-317. <https://doi.org/10.1007/s13238-020-00716-8>
- Lochmanová, A. (2014). *Úvod do klinické imunologie*. Ostravská univerzita.
- Louten, J. (2016). Virus Structure and Classification. In *Essential Human Virology* (pp. 19-29). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800947-5.00002-8>
- MA, F., FA, C., AJ, N., AA, S., IA, P. -F., LJ, C., & PA, G. (2023). Contribution of carbohydrate-related metabolism in Herpesvirus infections. *Current Research in Microbial Sciences*, 4(100192), 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2023.100192>
- Malpica, L., Marques-Piubelli, M. L., Beltran, B. E., Chavez, J. C., Miranda, R. N., & Castillo, J. J. (2022). EBV -positive diffuse large B-cell lymphoma, not otherwise specified: 2022 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *American Journal of Hematology*, 97(7), 951-965. <https://doi.org/10.1002/ajh.26579>
- Mediatelly. (n.d.). *Mezinárodní statistická klasifikace nemocí a přidružených zdravotních problémů*. (B. Triglav & N. Tomšič), Mediatelly - Treat better. Retrieved July 24, 2025, from <https://mediatelly.co/cz/icd>
- Mihál, V., & Michalková, K. (2022). Infectious mononucleosis is most common in adolescents and young adults. *Pediatric pro praxi*, 23(2), 137-140. <https://doi.org/10.36290/ped.2022.030>
- Prono, L. (2025, January 1). Martinus W. Beijerinck. Encyclopedia Britannica. <https://www.britannica.com/biography/Martinus-W-Beijerinck>
- Rickinson, A. (2024). Anthony Epstein (1921–2024), discoverer of virus causing cancer in humans. *Nature*, 627(8005), 729. <https://doi.org/10.1038/d41586-024-00763-9>
- Rozman, M., Korać, P., Jambrosic, K., & Židovec Lepej, S. (2022). Progress in Prophylactic and Therapeutic EBV Vaccine Development Based on Molecular Characteristics of EBV Target Antigens. *Pathogens*, 11(8), 864. <https://doi.org/10.3390/pathogens11080864>
- Rozsypal, H. (2015). *Základy infekčního lékařství*. Karolinum. <https://www.bookport.cz/kniha/zaklady-infekcniho-lekarstvi-5573/>
- Rzyski, P., Szuster-Ciesielska, A. (2023). Epstein-Barr virus and autoimmunity: effective preventive and therapeutic strategies are urgently needed. *Rheumatology*, 61(5), 327-330. <https://doi.org/10.5114/reum/171506>

- Sattarnezhad, N., Kockum, I., Thomas, OG, Liu, Y., Ho, PP, Barrett, AK, Comanescu, AI, Wijeratne, TU, Utz, PJ, Alfredsson, L., Steinman, L., Robinson, WH, Olsson, T., & Lanz, TV (2025). Reaktivita protilátek proti EBNA1 a GlialCAM odlišuje pacienty s roztroušenou sklerózou od zdravých kontrol. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 122 (11), 1-10. <https://doi.org/10.1073/pnas.2424986122>
- Schindler, J. (2014). *Mikrobiologie: Pro studenty zdravotnických oborů, 2., doplněné a přepracované vydání*. Grada. <https://www.bookport.cz/kniha/mikrobiologie-2292/>
- Slanina, P. (2020). *Imunofluorescence* [Prezentace ve formátu PDF]. Masarykova univerzita. https://is.muni.cz/el/med/jaro2021/MBKI081p/magistri_-_prednasky_ze_cviceni/Imunofluorescence_-_magistri_2020.pdf
- Smatti, M. K., Al-Sadeq, D. W., Ali, N. H., Pintus, G., Abou-Saleh, H., & Nasrallah, G. K. (2018). Epstein–Barr Virus Epidemiology, Serology, and Genetic Variability of LMP-1 Oncogene Among Healthy Population: An Update. *Frontiers in Oncology*, 8(211), 1-16. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00211>
- Stuempfig ND, Seroy J. Monospot Test. [Updated 2023 Aug 14]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK539739/>
- Sucharita, S., Krishnagopal, A., & van Drunen Littel-van den Hurk, S. (2023). Comprehensive Analysis of the Tegument Proteins Involved in Capsid Transport and Virion Morphogenesis of Alpha, Beta and Gamma Herpesviruses. *Viruses*, 15(10), 1-17. <https://doi.org/10.3390/v15102058>
- Sun, C., Chen, X. -chun, Kang, Y. -feng, & Zeng, M. -sheng. (2021). The Status and Prospects of Epstein–Barr Virus Prophylactic Vaccine Development. *Frontiers in Immunology*, 12(677027), 1-16. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.677027>
- TestLine Clinical Diagnostics s.r.o. (2019). *Návod pro použití EIA EBV EBNA-1 IgM* (29 ed.)
- TestLine Clinical Diagnostics s.r.o. (2019). *Návod pro použití EIA EBV EBNA-1 IgG* (29 ed.)
- TestLine Clinical Diagnostics s.r.o. (n.d.). *ELISA*. Bridging science and diagnostic, TestLine®. Retrieved April 22, 2025, from <https://www.testlinecd.cz/elisa>
- The Editors of Encyclopaedia Britannica (2024, November 5). Dmitry Ivanovsky. Encyclopedia Britannica. <https://www.britannica.com/biography/Dmitry-Ivanovsky>
- Tinavská, P. (2020). *Sekundární imunodeficiencie* [Prezentace], Jihočeská univerzita, Zdravotně sociální fakulta.
- Trier, N. H., Draborg, A. H., Sternbæk, L., Troelsen, L., Larsen, J. L., Jacobsen, S., & Houen, G. (2019). EBNA1 IgM-Based Discrimination Between Rheumatoid Arthritis Patients, Systemic Lupus Erythematosus Patients and Healthy Controls. *Antibodies* (Basel, Switzerland), 8(2), 35. <https://doi.org/10.3390/antib8020035>

- Trier, N., Izarzugaza, J., Chailyan, A., Marcatili, P., & Houen, G. (2018). Human MHC-II with Shared Epitope Motifs Are Optimal Epstein-Barr Virus Glycoprotein 42 Ligands-Relation to Rheumatoid Arthritis. *International journal of molecular sciences*, 19(1), 317. <https://doi.org/10.3390/ijms19010317>
- Trier, N., Izarzugaza, J., Chailyan, A., Marcatili, P., & Houen, G. (2018). Human MHC-II with Shared Epitope Motifs Are Optimal Epstein-Barr Virus Glycoprotein 42 Ligands-Relation to Rheumatoid Arthritis. *International journal of molecular sciences*, 19(1), 317. <https://doi.org/10.3390/ijms19010317>
- VIDIA spol. s r.o. (2019). *Návod pro použití IF-VIDITEST anti-VCA EBV IgG*. OD-035
- VIDIA spol. s r.o. (2020). *Návod pro použití IF-VIDITEST anti-EA EBV IgG*. OD-030
- VIDIA spol. s r.o. (2021). *Návod pro použití IF-VIDITEST anti-VCA EBV IgM*. OD-036
- VIDIA-DIAGNOSTIKA, spol. s r. o. (2018). *Katalog produktů 2018*.
- Ward, B. J. H., Schaal, D. L., Nkadi, E. H., & Scott, R. S. (2022). EBV Association with Lymphomas and Carcinomas in the Oral Compartment. *Viruses*, 14(12), 1-24. <https://doi.org/10.3390/v14122700>
- Weidner-Glunde, M., Kruminis-Kaszkiel, E., & Savanagounder, M. (2020). Herpesviral Latency—Common Themes. *Pathogens*, 9(2), 1-26. <https://doi.org/10.3390/pathogens9020125>
- Yakushina, S. A., & Kisteneva, L. B. (2020). Epstein-Barr virus (iHerpesviridae: Gammaherpesvirinae: Lymphocryptovirus: Human gammaherpesvirus 4/i): replication strategies. *Problems of Virology*, 65(4), 191-202. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-4-191-202>
- Zmasek, C. M., Knipe, D. M., Pellett, P. E., & Scheuermann, R. H. (2019). Classification of human Herpesviridae proteins using Domain-architecture Aware Inference of Orthologs (DAIO). *Virology*, 529(5), 29-42. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2019.01.005>

10 SEZNAM ZKRATEK

$\alpha v\beta 1$	Alpha-v beta-5 integrin
$\alpha v\beta 5$	Alpha-v beta-5 integrin
$\alpha v\beta 6$	Alpha-v beta-6 integrin
$\alpha v\beta 8$	Alpha-v beta-6 integrin
$\beta 1$	Beta-1 integrin
ABC	Aktivované B-lymfocyty
ACPA	Citrulinový protein
AE	Acridinium ester
AID	Aktivací indukovaná deamináza
ALT	Alaninaminotransferáza
ANO2	Anoktamin-2
AST	Aspartátaminotransferáza
BAL	Bronchoalveolární laváž
BCR	B-buněčný receptor
BUFA	Pufr A
CAL	Kalibrátor
CD21	Povrchový znak 21
CD35	Povrchový znak 35
CD4+ T-lymfocyty	Pomocné T-lymfocyty
CD8+ T-lymfocyty	Cytotoxické T-lymfocyty
CD16+	Receptor s nižší afinitou k Fc fragmentu IgG
CD64	Receptor s vysokou afinitou k Fc fragmentu IgG
CLIA	Chemiluminiscenční imunoanalýza
CMV	Cytomegalovirus
CNS	Centrální nervový systém
CONJ	Konjugát
CSF-1	Kolonie stimulující faktor 1
CRYAB	Alfa-B-krystalin
DIL/SPE	Speciální diluent
DLBCL	Difúzní velkobuněčný B-lymfom
DNA	Deoxyribonukleová kyselina

dsRNA	Dvouvláknová ribonukleová kyselina
E46	Kyselina glutamová
EA	Časný gen EBV
EA(D)	Difúzní časný gen EBV
EA(R)	Restricted časný gen EBV
EBERs	Malé RNA kódované virem Epstein–Barrové
EBER-ISH	<i>In situ</i> hybridizace na transkripty RNA kódované EBV
EBNA	EB-nukleární antigen
EBV	Epstein-Barrové virus
EDTA	Kyselina ethylendiaminotetraoctová
EIA (ELISA)	Enzymová imunoanalýza
EphA2	Ephrin-A2
FAM	Karboxyfluorescein
FITC	Fluorescein-5-isothiokyanát
gB	Glykoprotein B
gC	Glykoprotein C
GCB	Germinální centrum B-lymfocytů
gD	Glykoprotein D
gH	Glykoprotein H
gH/gL	Komplex glykoproteinů H a L
gL	Glykoprotein L
GlialCAM	Adhezivní molekula gliových buněk
gM	Glykoprotein M
gN	Glykoprotein N
gp350/220	Obalový glykoprotein 350/220
gp42	Glykoprotein 42
HEX	Hexachlorfluorescein
HHV-6 (6A a 6B)	Lidský herpesvirus 6 (A, B)
HHV-7	Lidský herpesvirus 7
HHV-8 (KSHV)	Lidský herpesvirus 8 spojený s Kaposiho sarkomem
HLA	Hlavní histokompatibilní komplex
HRS	Buňky Reedové-Sternberga
HSV-1	Herpes simplex virus 1

HSV-2	Herpes simplex virus 2
ICTV	Mezinárodní výbor pro taxonomii virů
IFA	Nepřímá imunofluorescence
IgA	Imunoglobulin A
IgG	Imunoglobulin G
IgM	Imunoglobulin M
IM	Infekční mononukleóza
IP	Index positivity
IRI	Imunoregulační index
IS	Interní standard
JOE	Dichlor karboxyflorescein
LIS	Laboratorní informační systém
LMP	Latentní membránový protein
MA	Membránový antigen
miRNA	Mikro RNA
miRNA BART	Mikro RNA <i>Bam</i> HI-A pravých transkriptů
mRNA	Messengerová RNA
NEG	Negativní
NEMCB	Nemocnice České Budějovice, a.s.
NRP-1	Neuropilin 1
p18	Virový kapsidový antigen p18
p23	Virový kapsidový antigen p23
PBS	Fosfáty pufovaný fyziologický roztok
PCR	Polymerázová řetězová reakce
POZ	Pozitivní
PVIR NEMCB	Pracoviště virologie Nemocnice České Budějovice, a.s.
qPCR	Kvantitativní PCR / Real-time PCR
R72	Arginin
RA	Revmatoidní artritida
RFID	Radiofrekvenční identifikační transpondér
RF	Revmatoidní faktor
RLU	Relativní světelná jednotka
RNA	Ribonukleová kyselina

RS	Roztroušená skleróza
RTA (Rta)	Replikační a transkripční aktivátor
SLE	Systémový lupus erythematoses
ssDNA	Jednovláknová deoxyribonukleová kyselina
ssRNA	Jednovláknová ribonukleová kyselina
SORB	Sérum/reagencie
Th-lymfocyty	Pomocné T-lymfocyty
TMB	Tetramethylbenzidin
UV	Ultrafialové záření
VCA	Virový kapsidový antigen
VCA-p18	Syntetický peptid p18
VCA-p23	Syntetický peptid p18
VIC	2'-chlor-7'-fenyl-1,4-dichlor-6-karboxyfluorescein
VZV	Varicella-zoster virus
WB	Western blotting
ZEBRA (Zta)	Z Epstein-Barrové replikační aktivátor

11 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek č. 1: Struktura herpetického viru (převzato a upraveno dle Chen et al., 2020).	12
Obrázek č. 2: Struktura EBV se zobrazenými glykoproteiny a hostitelskými proteiny (převzato a upraveno dle Abdelmonem et al., 2024).	15
Obrázek č. 3: Vstup EBV do cílových buněk (převzato a upraveno dle Escalante et al., 2022).	17
Obrázek č. 4: Dynamika výskytu specifických protilátek proti antigenům EBV v různých fázích infekce (převzato a upraveno dle katalogu: VIDIA-DIAGNOSTIKA, 2018).	24
Obrázek č. 5: Imunopatogeneze infekce virem Epstein-Barrové (zdroj: Tinavská, 2020).	29
Obrázek č. 6: Princip metody CLIA (převzato a upraveno dle https://www.testlinecd.cz/clia).	33
Obrázek č. 7: Analyzátor Liaison® XL (zdroj: vlastní).	33
Obrázek č. 8: Diagnostická souprava Liaison® XL VCA IgM (zdroj: vlastní).	35
Obrázek č. 9: Sendvičová ELISA metoda (zdroj: TestLine Clinical Diagnostics s.r.o., n.d.).	39
Obrázek č. 10: Pracovní postup metody ELISA (zdroj: <i>Imunoenzymatické soupravy k diagnostice infekční mononukleózy</i> , 2022).	40
Obrázek č. 11: Nepřímá imunofluorescence (zdroj: Lochmanová, 2014).	42

12 SEZNAM PŘÍLOH

TABULKY

Tabulka č. 1: Klasifikace lidských herpetických virů.....	12
Tabulka č. 2: Klíčové antigeny EBV.	15
Tabulka č. 3: Typy zkumavek.....	32
Tabulka č. 4: Souhrn reagensií diagnostické soupravy	35
Tabulka č. 5: Kvantitativní interpretace hladiny protilátek v jednotkách (U/ml).....	37
Tabulka č. 6: Rozsah měřících souprav.	37
Tabulka č. 7: Jednotlivé fáze infekce EBV.....	38
Tabulka č. 8: Kvantitativní interpretace hladiny protilátek v jednotkách (U/ml).....	41
Tabulka č. 9: Semikvantitativní vyhodnocení.	41
Tabulka č. 10: Pracovní postup metody IFA.	43
Tabulka č. 11: Hodnotící kritéria fází infekce EBV.	49
Tabulka č. 12: Počty pacientů v základních diagnostických skupinách ve vyšetřovaném souboru.....	50
Tabulka č. 13: Počty pacientů s diagnózou autoimunitního onemocnění.....	51
Tabulka č. 14: Počty pacientů s diagnózou onkohematologického onemocnění.....	51
Tabulka č. 15: Srovnání použitých laboratorních metod.	52

GRAFY

Graf č. 1: Zastoupení žen a mužů (zdroj: vlastní).....	45
Graf č. 2: Počet pacientů v jednotlivých věkových kategoriích (zdroj: vlastní).....	46
Graf č. 3: Pozitivní nález u žen (zdroj: vlastní).	46
Graf č. 4: Pozitivní nález u mužů (zdroj: vlastní).	47
Graf č. 5: Celková promořenost osob s výskytem protilátek proti EBV (zdroj: vlastní).	47
Graf č. 6: Výskyt specifických protilátek proti antigenům EBV (zdroj: vlastní).	48
Graf č. 7: Dynamika výskytu specifických protilátek proti EBV (zdroj: vlastní).	48
Graf č. 8: Interpretace výsledků dle výskytu protilátek proti EBV (zdroj: vlastní).....	49