



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 28. 4. 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.

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 nádorových 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 76 % analyzovaných vzorků bylo pozitivních a nejvyšší výskyt protilátek byl zaznamenán u dospělých osob ve věku 31 až 60 let. Přítomnost protilátek ale nesouvisela s konkrétním onemocněním. Dalším cílem práce bylo provést srovnání vybraných analytických metod CLIA, ELISA a qPCR využívaných k diagnostice EBV. Na základě výsledků bylo vyhodnoceno, že nejvhodnější metoda k průkazu EBV je metoda CLIA.

Klíčová slova

Epstein-Barrové virus (EBV); infekční mononukleóza (IM); EBV-asociovaná onemocnění; laboratorní diagnostika; VCA IgG; VCA IgM; EBNA IgG; EA IgG; ELISA; CLIA

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 cancerous 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 76 % of the analyzed samples were positive and the highest presence of antibodies was detected in adults at the age from 31 to 60 years. The presence of antibodies was not related to the specific disease. Another aim of this thesis was to make a comparison of selected analytical methods CLIA, ELISA and qPCR used for diagnostics of EBV. From the results, it was evaluated that the most appropriate methods for detection of EBV is CLIA.

Key words

Epstein-Barr virus (EBV); infectious mononucleosis (IM); EBV-associated diseases; laboratory diagnostics; VCA IgG; VCA IgM; EBNA IgG; EA IgG; ELISA; CLIA

Obsah

Úvod.....	8
1 VIRY	10
1.1 Historie a původ virů	10
1.2 Charakteristika virů.....	10
1.3 Replikační cyklus virů	11
1.4 Patogeneze virů.....	12
1.5 Klasifikace virů.....	12
2 HERPETICKÉ VIRY	14
2.1 Charakteristika herpetických virů	14
2.2 Klasifikace herpetických virů	15
3 EPSTEIN-BARROVÉ VIRUS.....	17
3.1 Anthony Epstein a objev EBV	17
3.2 Struktura EBV.....	17
3.3 Virové antigeny.....	18
3.4 Virové glykoproteiny	19
3.5 Vstup EBV do hostitelské buňky	20
3.6 Replikační cyklus.....	21
3.6.1 Lytická fáze.....	21
3.6.2 Latentní fáze	22
3.7 Onemocnění spojená s EBV	23
3.7.1 Infekční onemocnění.....	23
3.7.2 Nádorová onemocnění	23
3.7.3 Autoimunitní onemocnění	24
3.8 Laboratorní diagnostika EBV	25
3.8.1 Klasické metody	25
3.8.2 Molekulární metody.....	27
4 CÍLE PRÁCE A HYPOTÉZY	28
5 METODIKA.....	29
5.1 Úvod do metodiky	29
5.2 Chemiluminiscenční imunoanalytická metoda (CLIA)	29
5.2.1 Vyšetřovaný materiál.....	29
5.2.2 Princip metody	30
5.2.3 Přístrojové vybavení	31

5.2.4	Reagencie.....	32
5.2.5	Pracovní postup.....	34
5.2.6	Interpretace výsledků.....	35
5.3	ELISA	36
5.3.1	Princip metody	36
5.3.2	ELISA souprava a technologie	37
5.3.3	Pracovní postup.....	38
5.3.4	Interpretace výsledků.....	39
5.4	Real-time PCR (qPCR).....	39
5.4.1	Princip metody	39
5.4.2	Diagnostické soupravy a přístrojové vybavení	40
5.4.3	Pracovní postup.....	40
5.4.4	Interpretace výsledků.....	41
6	VÝSLEDKY.....	43
6.1	Četnost vyšetřovaných osob	43
6.2	Četnost positivity protilátek proti antigenům EBV	44
6.3	Četnost výskytu positivity protilátek v závislosti na věkové kategorii	44
6.4	Četnost výskytu jednotlivých protilátek	45
6.5	Četnost stádia infekce EBV	46
6.6	Četnost výskytu protilátek v souvislosti s různými onemocněními	46
6.7	Srovnání vybraných analytických metod.....	47
7	DISKUZE	49
8	ZÁVĚR.....	51
9	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ.....	52
10	SEZNAM ZKRATEK	58
11	SEZNAM OBRÁZKŮ	61
12	SEZNAM PŘÍLOH	62

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 buňky humorální imunity, jako jsou 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, Hodgkinova choroba 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 nespecifických a specifických testů, jejichž cílem je zajistit komplexní a diferenciální diagnostiku. Diagnostické metody jsou zaměřené na průkaz protilátek proti antigenům EBV (VCA IgG, VCA IgM, EBNA IgG, EA IgG) pomocí sérologických metod (např. ELISA, CLIA), nebo přímou detekci virové DNA pomocí molekulárních metod, jako je PCR. Nejčastěji využívanou metodou je ELISA, ale v současnosti je však čím dál častěji využívána i chemiluminiscenční imunoanalytická metoda (CLIA) (Smatti et al., 2018; Atefi, 2023).

Předkládaná práce je na základě analýzy poskytnutých dat a jejich statistického zpracování doplněna o výskyt positivity protilátek proti antigenům EBV v závislosti na věku osob a různých onemocněních. Dále má podrobněji popsat a porovnat vybrané analytické metody CLIA, ELISA a qPCR využívané k diagnostice EBV a na základě provedeného srovnání vyhodnotit nejvhodnější metodu k tomuto účelu.

1 VIRY

1.1 Historie a původ virů

První zmínky o termínu virus pocházejí z 19. století a začínají u německého zemědělského biologa A.E. Mayera, který se zabýval studiem mozaikovitě nemoci tabáku. V té době ale ještě nevěděl, čím bylo toto onemocnění doopravdy způsobeno. (Artenstein, 2012). Až další dva mikrobiologové, kteří také zkoumali mozaikovitou nemoc tabáku, zjistili, že tím pravým původcem nemoci je velmi malá infekční částice. K tomuto zjištění dospěl ruský mikrobiolog Dmitrij I. Ivanovský v roce 1892 (The Editors of Encyclopaedia Britannica, 2024) a o šest let později nizozemský mikrobiolog Martinus W. Beijerinck nazval tuto infekční částici termínem virus a označil ji za původce infekčních onemocnění. (Prono, 2025).

S původem virů není svět dosud zcela přesně obeznámen. Existují tři možné hypotézy, které mohou vysvětlovat vznik virů. První hypotéza je založená na domněnce, že viry pocházejí z molekul s replikační schopností, objevených ještě před buněčným životem. Druhá, tzv. hypotéza úniková, je postavená na myšlence, že viry vznikly až po objevení existence buněk, ze kterých se uvolňovaly a přeměňovaly v infekční částice schopné se replikovat. Poslední, nejméně pravděpodobná, je hypotéza redukční neboli degenerativní. Ta je postavená na teorii, že viry vznikly z původních buněk, které postupně ztratily své funkce, a staly se parazity jiných zdravých buněk, které si své funkce zachovaly (de la Higuera & Lázaro, 2022).

1.2 Charakteristika virů

Viry jsou velmi malé obligatorní intracelulární infekční částice, kterými se zabývá obor virologie. Jedná se o částice, které se nacházejí na hranici živého a neživého organismu. Stejně jako ostatní živé organismy jsou tvořené organickými molekulami, účastní se metabolických procesů a mají schopnost replikace. Rozdíl je ale v tom, že viry se nedokážou samy množit ani přežít bez hostitele. Aby se mohly rozmnožovat, musí navázat kontakt s hostitelskou buňkou. Tento proces se nazývá biotropismus. Díky vzniklému vztahu mezi virem a buňkou se pak virus množí, působí negativně na organismus a vyvolává infekční onemocnění. Infekci může způsobit řada specifických virů podle spektra hostitelských buněk. Rozdělují se do tří skupin: na viry bakteriální

napadající pouze bakterie, rostlinné, infikující rostliny, a živočišné napadající jak zvířata, tak i osoby (Schindler, 2014; Drnková, 2019).

Základní částice viru se nazývá virion. Genetická informace je uložena v nukleových kyselinách, buď v DNA nebo v RNA. Kolem ní se nachází ochranná kapsida, která je tvořena alespoň jedním proteinem. Komplex nukleové kyseliny a kapsidy se nazývá nukleokapsida, složená z kapsomer. Díky jejich uspořádání lze určit přesnou strukturu viru. U některých virů se mohou kromě proteinů vyskytovat i enzymy, které jsou důležité pro syntézu nukleových kyselin. Viry nejsou schopny vytvářet energii potřebnou k metabolickým pochodům, a proto si ji musí brát z hostitelských buněk. Kapsida viru má významnou roli. Nese zodpovědnost za ochranu genetické informace před enzymatickou degradací, za poskytování vazebného místa pro receptory hostitelských buněk, a za pronikání viru do buněk s cílem vyvolání infekce (Wagner & Krug, 2025).

1.3 Replikační cyklus virů

Interakce viru s hostitelskou buňkou je klíčová pro zahájení replikačního cyklu, který zahrnuje několik plynule navazujících fází.

V první fázi musí dojít k adsorpci viru na hostitelskou buňku. Následuje proniknutí viru do buňky, přímým průnikem přes cytoplazmatickou membránu, fúzí s kapsidou, nebo endocytózou. Ve třetí fázi dochází k odstranění obalu viru a k aktivaci virového genomu (Schindler, 2014). Nastupuje čtvrtá fáze zahrnující proces replikace virového genomu v různých replikačních organelách, jako jsou membránové organely nebo bezmembránové kapalně organely. Tato fáze také zahrnuje proces transkripce virové RNA na virovou mRNA, následně přeloženou do proteinů a enzymů viru (Hoenen & Groeth, 2022). V páté fázi se z nově vytvořeného virového genomu s proteiny vytvoří virion, který musí dozrát.

Aby nové viriony mohly napadat další buňky, je zapotřebí posledního kroku, aby opustily hostitelskou buňku. Tato fáze probíhá prostřednictvím dvou možných mechanismů skrz buněčnou membránu. Neobalené viry se uvolňují přímou lýzou a okamžitě usmrcují hostitelskou buňku. Naopak obalené viry se uvolňují způsobem zvaným budding (pučení), a to pomaleji, postupně a bez okamžitého zničení buňky. Celý replikační cyklus se opakuje, když nové viry opět napadnou další buňky, čímž dochází k šíření infekce (Schindler, 2014; Wagner & Krug, 2025).

1.4 Patogeneze virů

Virová onemocnění mohou být vyvolána různými způsoby, například průnikem virů do organismu, oslabením imunitního systému nebo poškozením cílových tkání a orgánů, což může vést k rozvoji infekce. Patogenezi virových onemocněních lze rozdělit do tří hlavních úrovní, přičemž každá z nich má vliv na celkový průběh a závažnost infekce.

První úroveň, nazývaná jako úroveň buněčná (intracelulární) probíhá v hostitelské buňce. Je závislá na interakci viru s hostitelskou buňkou, v níž probíhají procesy vedoucí až k jejímu usmrcení. Na této úrovni tak může dojít ke vzniku několika možných typů infekcí. K infekci lytické, perzistentní, latentní nebo transformující, anebo k transdukcí viru.

Na druhé úrovni, virus postupuje z hostitelské buňky dále do organismu a napadá především tkáně a orgány. Nejčastější branou vstupu viru do organismu jsou dýchací a trávicí trakt, dále přímý kontakt s tělními tekutinami, nebo přenos z matky na dítě perinatální či transplacentární cestou. Nejdříve dojde k primárnímu pomnožení a ke vzniku počáteční infekce. Následně se virus rozšíří do dalších cílových oblastí a infekce přechází do infekce konečné, která se projevuje specifickými příznaky pro dané virové onemocnění a oslabením organismu. Virus je nakonec z organismu odstraněn tělními tekutinami, například stolicí, močí, krví, slinami, spermatem či vaginálním sekretem.

Třetí úroveň patogeneze se vztahuje k šíření infekčních onemocnění mezi populacemi, kdy ke vzniku infekce dojde podobným způsobem jako ve druhé úrovni. Tato úroveň se také zaměřuje na identifikaci virových faktorů a samotných virů a na zamezení šíření infekcí pomocí očkovacích vakcín (Hurych & Štícha, 2021).

1.5 Klasifikace virů

Dnes existují tisíce druhů virů, z nichž některé jsou již známé, zatímco jiné dosud ještě nebyly objeveny. Každý virus má své specifické vlastnosti a podmínky pro vznik infekce. Viry se dělí do několika skupin na základě různých kritérií. Využívají se k tomu dva hlavní klasifikační systémy, z nichž každý se zaměřuje na jiný způsob dělení. Jedním z těchto systémů je Baltimorský klasifikační systém, který byl vyvinut ve 20. století Davidem Baltimorem. Tento systém klasifikuje viry podle genetické výbavy a replikačního cyklu do sedmi tříd, jak je uvedeno v tabulce č. 1 (Louten, 2016).

Tabulka č. 1: Baltimorský klasifikační systém.

Číslo třídy	Třída	Příklady
I.	dsDNA viry	<i>Poxviridae</i> <i>Adenoviridae</i> <i>Herpesviridae</i>
II.	ssDNA viry	<i>Parvoviridae</i>
III.	dsRNA viry	<i>Reoviridae</i>
IV.	ssRNA viry s pozitivním vláknem	<i>Picornaviridae</i> <i>Caliciviridae</i> <i>Coronaviridae</i>
V.	ssRNA viry s negativním vláknem	<i>Orthomyxoviridae</i>
VI.	RNA viry schopny reverzní transkripce	<i>Retroviridae</i>
VII.	DNA viry schopny reverzní transkripce	<i>Hepadnaviridae</i>

Převzato a upraveno dle Louten, 2016.

Druhý způsob dělení virů poskytuje Mezinárodní výbor pro taxonomii virů (ICTV), který je odpovědný za oficiální klasifikaci virů. Tento systém rozdělení je založen na informacích poskytnutých od studijních skupin, na jejichž základě bylo vytvořeno tzv. univerzální taxonomické dělení virů. Klasifikace podle ICTV je založena na společných nebo podobných vlastnostech virů, které jsou rozděleny do až 15 různých taxonů (Gorbalenya et al., 2020).

2 HERPETICKÉ VIRY

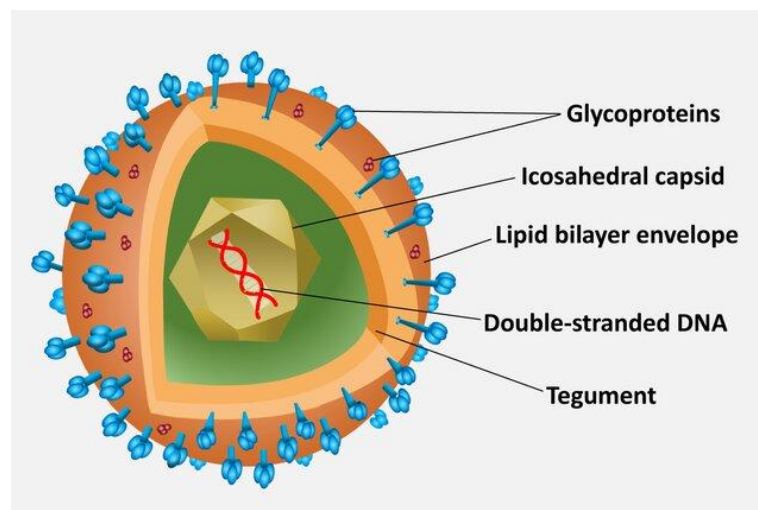
2.1 Charakteristika herpetických virů

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 ikosaedrickou 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 (zdroj: 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. 2 (Zmasek et al., 2019).

Tabulka č. 2: 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 epiteliální buňky, fibroblasty, monocyty a T-lymfocyty, zejména Th-lymfocyty.

Třetí skupinou herpetických virů je podčeleď *Gammapherpesvirinae*, která zahrnuje virus Epstein-Barrové (EBV) a lidský herpesvirus 8 spojený s Kaposiho sarkomem (KSHV). Tyto viry primárně napadají B-lymfocyty, epiteliální buňky, monocyty a dendritické buňky. 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 Anthony Epstein a objev EBV

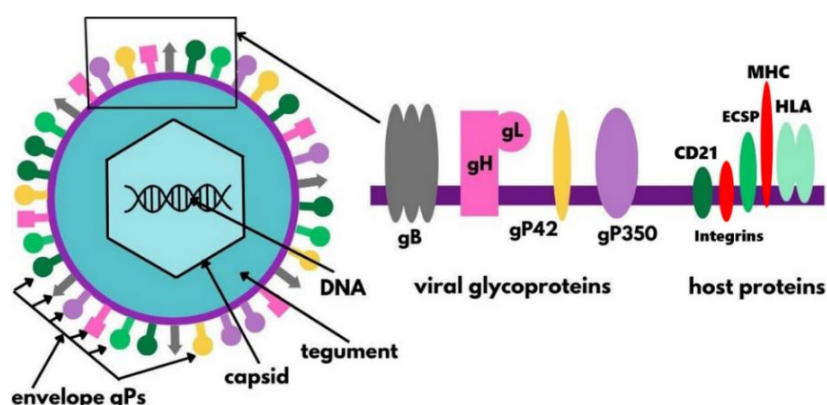
Název viru nese jména britského patologa Anthonyho Epsteina a jeho výzkumné asistentky a viroložky Yvonne Barr. V roce 1961 se Epstein účastnil přednášky o dětské rakovině v Africe, kterou vedl britský chirurg Denis Parsons Burkitt, se kterým později začal spolupracovat. Epstein analyzoval vzorky nádorových 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, buňky specifické humorální imunity, 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 (zdroj: 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. 3 (Houen & Trier, 2021; Elísková, 2022).

Tabulka č. 3: 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.

3.4 Virové glykoproteiny

Genom EBV kóduje 13 glykoproteinů, které jsou uvedeny v tabulce č. 4. 11 z nich je součástí lipidového obalu virionu a zbývající dva nejsou součástí struktury vůbec. Názvy jednotlivých glykoproteinů jsou odvozené od jejich molekulové hmotnosti (např. gp42), genového názvu (např. BMRF-2), nebo homologů v jiných herpetických virech (např. gB). Podle funkce se dělí do tří skupin: glykoproteiny, pomocí kterých se může virus připojit k buňce a vstoupit do ní, glykoproteiny důležité pro sestavení a výstup virionu, a glykoproteiny ovlivňující hostitelskou buňku nepřímo souvisejících s replikací (Hutt-Fletcher, 2015).

Tabulka č. 4: Rozdělení glykoproteinů EBV.

Název proteinu	Název genu	Funkce
gp350/220	BLLF-1	vstup a připojení do buňky
gB	BALF-4	konečný vykonavatel fúze
gH	BXLF-2	regulátor fúze
gL	BKRF-2	regulátor fúze
g42	BZLF-2	iniciátor a regulátor fúze, imunitní odpověď
gM	BBRF-3	výstup viru a správné obalení virionu
gN	BLRF-2	asociace s gM
BMRF-2	BMRF-2	mezibuněčné šíření
BDLF-2	BDLF-2	asociace s BMRF-2
BDLF-3	BDLF-3	nejasná funkce

Název proteinu	Název genu	Funkce
BILF-2	BILF-2	nejasná funkce
BILF-1	BILF-1	imunitní únik
BARF-1	BARF-1	blokace signalizace CSF-1, perzistence viru

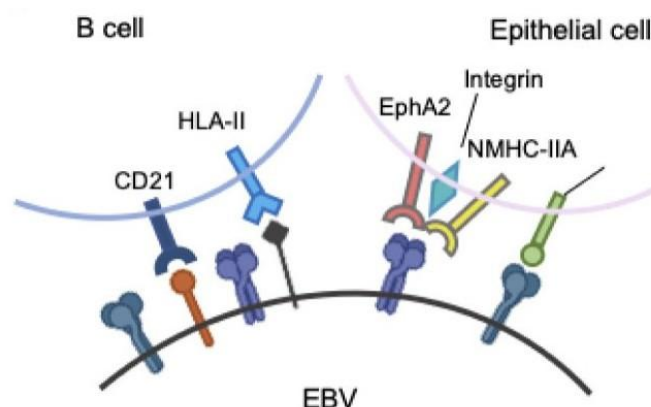
Převzato a upraveno dle Hutt-Fletcher, 2015.

3.5 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).

Dalším důležitým 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 (zdroj: Escalante et al., 2022).

3.6 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).

3.6.1 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).

3.6.2 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 se 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 (Damania et al., 2022).

3.7 Onemocnění spojená s EBV

3.7.1 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).

3.7.2 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 lymfomu, Hodgkinovy choroby a non-Hodgkinského 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 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).

Hodgkinova choroba 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 EBV s diagnostikovanou infekční mononukleózou je také zvýšené riziko vzniku Hodgkinovy choroby (Damania et al., 2022).

Difúzní velkobuněčný B-lymfom (DLBCL) je nejčastějším typem non-Hodgkinského 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).

3.7.3 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. Indukce

autoimunit vyvolaná infekcí EBV může být způsobena několika mechanismy. Jedním z nich je tzv. molekulární mimikry, kdy jsou lidské antigeny napodobovány virovými antigeny. Dalším mechanismem je vedlejší aktivace B- a 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 erythematosus, Sjögrenův syndrom, revmatoidní artritida, systémová sklerodermie a autoimunitní onemocnění štítné žlázy (Houen & Trier, 2021; Rzymiski & Szuster-Ciesielska, 2023).

3.8 Laboratorní diagnostika EBV

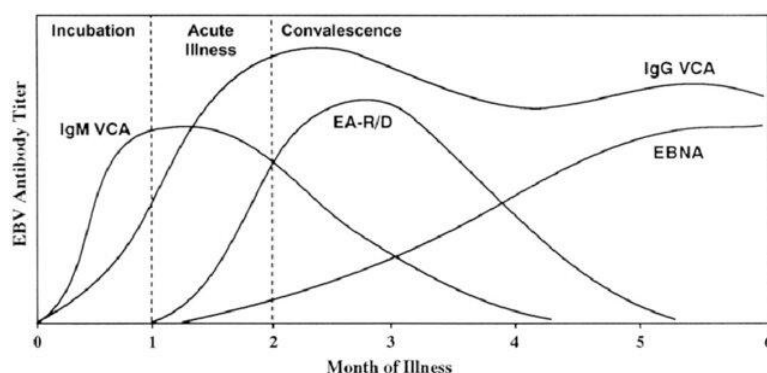
Laboratorní diagnostika viru Epstein-Barrové zahrnuje široké spektrum nespecifických a specifických testů. Tyto metody lze rozdělit do dvou hlavních skupin, klasické metody a molekulární metody. Cílem metod je zajistit komplexní a diferenciální diagnostiku EBV (Smatti et al., 2018; Atefi, 2023). Každá metoda má své výhody i omezení a liší se mírou citlivosti, specifity a praktického využití.

3.8.1 Klasické metody

Klasické metody jsou běžně dostupné v klinických laboratořích. Zahrnují morfologické, virologické, imunologické a imunohistochemické, a sérologické metody. Morfologické metody hodnotí morfolonii a etiologii buněk. Virologické metody prokazují virus na buněčných kulturách. Imunologické a imunohistochemické metody jsou zaměřené na buněčné a tkáňové změny, a slouží zejména k rozlišení autoimunitních nebo nádorových onemocnění souvisejících s EBV. Například in situ hybridizace (EBER-ISH) je metoda, která se nejčastěji využívá k histologickému průkazu latentní fáze EBV v nádorových buňkách (Abusalah et al., 2020; Atefi, 2023).

Nejčastěji prováděnými klasickými metodami při diagnostice infekce EBV jsou sérologické testy, které detekují specifické protilátky proti EBV antigenům (Atefi, 2023). Na základě přítomnosti a kombinace protilátek, lze pomocí těchto testů rozlišit jednotlivé fáze infekce EBV, jako je akutní, prodělaná a reaktivovaná infekce, jak ukazuje obrázek č. 4. Sérologické testy detekují především protilátky ENBA IgG, VCA IgG, VCA IgM, a dva typy EA IgG, difúzní (EA(D)) a restricted (EA(R)) (Smatti et al., 2018).

Přítomnost protilátek VCA IgM ukazuje na časnou akutní fázi infekce. Objevují se brzy po infekci a obvykle mizí do 6 týdnů. Sérokonverze protilátek VCA IgG může být detekovaná již v akutní fázi, ale jejich přítomnost ve vysokých titrech je typická u prodělané infekce. Protilátky VCA IgG, na rozdíl od IgM, přetrvávají po celý život. Protilátky EA IgG značí akutní infekci nebo reaktivaci viru do lytické fáze. Zároveň vysoké hladiny protilátek EA IgG jsou spojovány s EBV-asociovanými nádorovými onemocněními. Difúzní anti-EA(D) IgG protilátky se objevují obvykle 3-4 týdny po infekci a přetrvávají přibližně 3-4 měsíce, někdy i déle. Spolu s protilátkami anti-EA(D) IgA jsou asociovány s nasofaryngeálním karcinomem. Restricted anti-EA(R) IgG se objevují později a mohou přetrvávat až roky. Tyto protilátky se vyskytují ve vysokých titrech u pacientů s EBV asociovaných Burkittovým lymfomem. Protilátky EBNA IgG se objevují několik týdnů po infekci a přetrvávají po celý život a zároveň ukazují na prodělanou infekci. U imunosuprimovaných jedinců se ale nemusí tvořit vůbec (Abusalah et al., 2020; Atefi, 2023).



Obrázek č. 4: Specifické protilátky proti EBV antigenům a stádium infekce (zdroj: Werler et al., 2016).

K rychlému průkazu protilátek proti EBV antigenům, konkrétně heterofilních protilátek, se využívá Monospot test. Jedná se o typ rychlého diagnostického testu (tzv. rapid test), který se používá při podezření na infekční mononukleózu. Při pozitivní reakci dojde k aglutinaci zvířecích erytrocytů se sérem nebo plazmou pacienta. Monospot test je snadno proveditelný a výsledek poskytuje během několika minut. Jeho nevýhodou je nízká citlivost a specifičnost, a riziko falešně negativních a falešně pozitivních výsledků, zejména u dětí a jedinců s autoimunitním nebo nádorovým onemocněním (Smatti et al., 2018; Stuempfig & Seroy, 2023).

Specifické protilátky proti EBV antigenům jsou detekovány nejčastěji pomocí následujících metod. Imunofluorescenční metoda (IFA) detekuje protilátky třídy IgG proti VCA a EBNA v infikovaných buňkách pomocí fluorescenční mikroskopie. Metoda je vysoce specifická a citlivá, ale náročná na provedení a vyhodnocení

ELISA je běžně dostupnou, rychlou a snadno automatizovatelnou metodou, která je citlivější než IFA. Využívá se převážně k detekci protilátek třídy IgG a IgM proti EBNA, ale zahrnuje riziko falešně pozitivních výsledků. Metody IFA ani ELISA nedokážou přesně určit, zda se jedná o akutně probíhající infekci.

Chemiluminiscenční imunoanalytická metoda (CLIA) je moderní, vysoce specifická a citlivá metoda, která využívá emisi světla k detekci protilátek EBNA IgG, VCA IgG, VCA IgM a EA(D) IgG. Zároveň je bezpečnější díky absenci radioaktivních látek, avšak finančně náročnější a vyžadující specializované vybavení (Park et al., 2018; Abusalah et al., 2020; Atefi, 2023).

Pro potvrzení konkrétní fáze infekce EBV lze využít také doplňkové diagnostické metody, jako je například Western blotting, test avidity nebo in situ hybridizace.

3.8.2 Molekulární metody

Molekulární metody jsou založené na přímé identifikaci a amplifikaci nukleových kyselin cílového viru. Nejvýznamnější metodou pro identifikaci DNA EBV je polymerázová řetězová reakce (PCR). PCR je vysoce citlivá, rychlá a specifická metoda, která umožňuje sledovat průběh onemocnění, účinnost léčby a případnou reaktivaci infekce, a to především u imunokompromitovaných jedinců a pacientů s lymfoproliferativním nebo nádorovým onemocněním souvisejícím s EBV. Nejčastěji využívanou variantou této metody je real-time PCR (qPCR), která dokáže na základě kvantifikace virové nálože včas detekovat přítomnost viru a rozlišit onemocnění související s EBV. Výhodou qPCR je její 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).

4 CÍLE PRÁCE A HYPOTÉZY

Cíle:

1. Teoretická část bude složená z odborné rešerše na dané téma, zahrnující informovanost viru Epsteina-Barrové 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 práce je zaměřena na teoretický popis a porovnání vybraných analytických metod využívaných k detekci viru Epstein-Barrové. Konkrétně se jedná o chemiluminiscenční imunoanalytické metody (CLIA), imunoenzymatické metody (ELISA) a metody real-time PCR (qPCR). Metoda CLIA byla prakticky provedena v imunologické laboratoři společnosti EUC Praha. Její postup a princip jsou detailně popsány v dalších kapitolách. Metody ELISA a qPCR jsou popsány pouze teoreticky na základě dostupné odborné literatury.

Cílem praktické části je analyzovat výskyt hladiny protilátek proti antigenům EBV mezi různými věkovými kategoriemi prostřednictvím metody CLIA, a to na základě dat získaných z EUC Laboratoře Praha. Zároveň bude zhodnocen klinický význam pozitivního nálezu infekce EBV v rámci diagnózy.

Dalším cílem práce je porovnat výše uvedené analytické metody z hlediska principu, provedení, specifity a časové náročnosti. Na základě tohoto srovnání bude vyhodnocena metoda, která je pro daný laboratorní účel nejvhodnější.

5.2 Chemiluminiscenční imunoanalytická metoda (CLIA)

5.2.1 *Vyšetřovaný materiál*

Pro stanovení protilátek proti antigenům EBV se využívá lidské sérum nebo citrátová plazma, získaná z venózní nebo arteriální krve. V EUC Laboratoři Praha se nejčastěji provádí stanovení z venózní srážlivé krve, která je odebírána do zkumavky s červenou nebo žlutou zátkou obsahující akcelerátor srážení (viz obrázek č. 5). Po odběru je zkumavka ponechána při pokojové teplotě po dobu přibližně 30 minut, aby proběhl proces srážení. Následně je krev centrifugována při 2500 otáčkách po dobu 10 minut, tím dojde k úplnému oddělení séra, které je následně použito pro laboratorní vyšetření.

Barva víčka	Typ	Objem odebrané krve/ml	Počet promíchání	Použití
	sérum STT™ II Advance akcelerátor srážení + gel	5 8,5	5 - 6	Sérologie a alergologická vyšetření
	Sérum akcelerátor srážení	6 4	5 - 6	Sérologie a alergologická vyšetření
	natrium/lithium heparin	4	8 - 10	buněčná imunita (fagocytóza , BAT)
	EDTA	2	8 - 10	buněčná imunita fenotyp

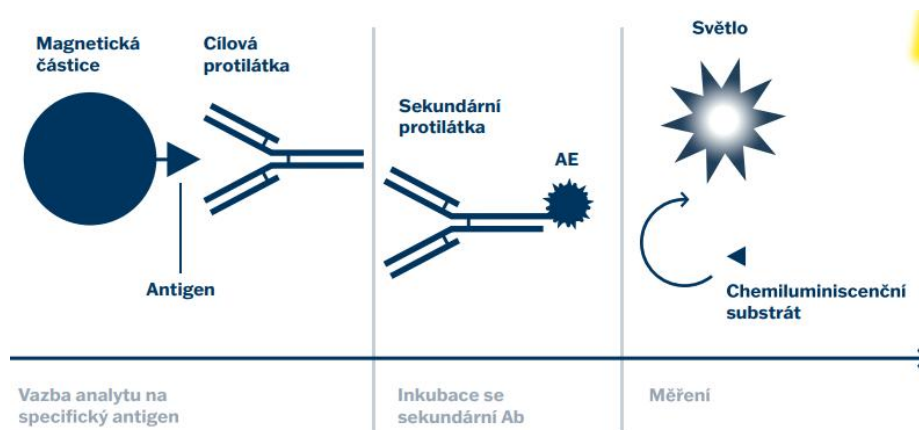
Obrázek č. 5: Barevné značení odběrových zkumavek (zdroj: *Laboratorní příručka Imunologie EUC Laboratoře s.r.o.*, 2023).

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.

Pro odběry je využíván odběrový systém BD Vacutainer, což je uzavřený odběrový systém, který umožňuje odběr pouze pomocí vakua v odběrové zkumavce (*Laboratorní příručka Imunologie EUC Laboratoře s.r.o.*, 2023).

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 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 chemiluminiscenční látkou acridinium ester (AE). Tento ester reaguje s peroxidem vodíku, přičemž dochází k oxidaci AE a vzniku intenzivního světelného záblesku. Intenzita světelného záblesku je měřena 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 EA(D), EBNA-1 a VCA.



Obrázek č. 6: Princip metody CLIA (zdroj: <https://www.testlinecd.cz/clia>).

5.2.3 Přístrojové vybavení

Testované vzorky byly analyzovány pomocí přístroje KleeYa®, který představuje plně automatizovaný analyzátor určený pro nepřímou detekci specifických protilátek metodou CLIA (viz obrázek č. 7). Tento moderní analyzátor umožňuje zpracovat až 120 vzorků za hodinu, čímž výrazně zkracuje dobu pro vyhodnocení výsledků.



Obrázek č. 7: Analyzátor KleeYa®, EUC Laboratoře Praha (zdroj: vlastní).

Analyzátor KleeYa® je řízen prostřednictvím dotykového monitoru, který je propojen s laboratorním informačním systémem (LIS). Vzorky se vkládají do speciálních stojánek, které se následně zasunují do prostoru pro stojánky v pravé části analyzátoru, konkrétně do jedné z šesti kolejnic. Celková kapacita přístroje pro umístění vzorků je 72 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 rameno, tzv. automatický pipetor, zajišťuje manipulaci s reagensy pomocí ocelové jehly. Druhé rameno využívá jednorázové plastové špičky Anchor® Tips a je určeno 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 (viz obrázek č. 9) a stohovatelné kyvety (viz obrázek č. 8), nádoba na tekutý odpad a vak na pevný odpad.



Obrázek č. 9: Špičky Anchor® Tip, 300 µl – Stratec Consumables GmbH (zdroj: vlastní).



Obrázek č. 8: Kyvety Stackable Cuvette, 1000 µl –

Stratec Consumables GmbH (zdroj:

<https://www.clia.biovendor.group/cz/technologie?tab=funkce#tabs>).

5.2.4 Reagencie

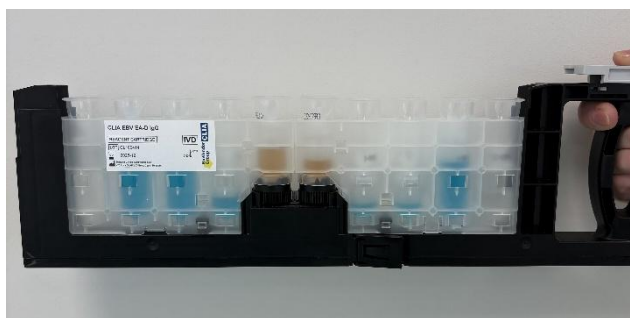
Ke stanovení protilátek proti specifickým antigenům EBV se využívají diagnostické CLIA soupravy, které jsou určeny pro automatické zpracování na analytickém přístroji KleeYa®. Každá CLIA souprava je specificky navržena pro detekci protilátek proti jednomu určitému antigenu EBV a obsahuje všechny potřebné reagencie připravené k okamžitému použití (viz obrázek č. 10, č. 11 a č. 12). 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), nukleární antigen EBNA-1 a kombinaci rekombinantních kapsidových antigenů p18 a p23 (EBV VCA). Pro stanovení protilátek třídy IgM se používá souprava s rekombinantním kapsidovým antigenem p18 (EBV VCA).

REAGENT CARTRIDGE	Magnetické částice s navázaným antigenem, suspenze v pracovním ředění	1 × 5 ml
	Ředící roztok vzorků Pufr se stabilizátory bílkovin, v pracovním ředění	3 × 10 ml
	Konjugát Roztok obsahující zvířecí protilátku proti lidskému imunoglobulinu značený akridinium esterem, v pracovním ředění	1 × 10 ml
CAL 1	Kalibrátor 1 Roztok obsahující specifické lidské protilátky, v pracovním ředění	3 × 1 ml
CAL 2	Kalibrátor 2 Roztok obsahující specifické lidské protilátky, v pracovním ředění	3 × 1 ml
	Kalibrační karta Identifikační karta kalibrátoru obsahující kalibrační (master) křivku	1 ks

Obrázek č. 10: Souhrn reagentů diagnostické soupravy (zdroj: *Návod pro použití CLIA EBV EA(D) IgG*, 2023).



Obrázek č. 12: Diagnostická souprava CLIA EBV EA(D) IgG (zdroj: vlastní).



Obrázek č. 11: Dvě diagnostické soupravy (zdroj: vlastní).

Pro zajištění správnosti výsledků získaných pomocí diagnostických CLIA souprav je zapotřebí použít sady kontrolních sér, která slouží jako interní kontrola kvality. Ověření správné funkce přístroje KleeYa® 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 jsou pracovní roztoky ze sady KleeYa Trigger Pack (Trigger Solution 1 a Trigger Solution 2) od výrobce Diatron MI Plc., které slouží k oxidaci akridiniumu esteru, čímž dochází k emisi světla (viz obrázek č. 13). K odstranění přebytečných konjugátů a molekul, které by mohly negativně ovlivnit výsledky, se používá promývací roztok KleeYa Wash buffer od výrobce Diatron MI Plc. Tento roztok

V rámci pravidelné denní údržby přístroje KleeYa® se po ukončení měření provádí závěrečná údržba přístroje, ke které se používá speciální čistící roztok KleeYa Maintenance Cartridge. Tato závěrečná údržba je nezbytná pro zachování správné funkčnosti přístroje.



5.2.5 Pracovní postup

Po dokončení výše uvedených kontrol reagensů a materiálu následuje interní kontrola kvality, která je provedena pomocí kontrolních sér. Následně se do stojanu na reagentie vloží příslušné diagnostické CLIA 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 reagentů. Po úspěšném naskenování kódů se spustí vlastní analýza. Přístroj KleeYa® zanalyzuje testované vzorky a vypočítá hladinu protilátek přítomných ve vzorku. Výsledky jsou poté přístrojem automaticky odeslány do laboratorního informačního systému (LIS).

5.2.6 Interpretace výsledků

Prostřednictvím přístroje KleeYa® 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. Hodnotící rozmezí je jednotné 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).

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

Převzato a upraveno dle *Návod pro použití CLIA EBV EA(D) IgG*.

Každá diagnostická CLIA souprava využívaná v přístroji KleeYa® má určený specifický rozsah měření a interval linearity. Rozsah měřících souprav vymezují mezní hodnoty, ve kterých je přístroj schopen stanovit hladinu protilátek. Interval linearity označuje rozmezí, ve kterém je měření nejpresnější a výsledky ukazují nejvyšší míru opakovatelnosti. Přehled parametrů jednotlivých diagnostických CLIA souprav je uveden v tabulce č. 6. (*Návody pro použití CLIA EBV EA(D) IgG, CLIA EBV EBNA-1 IgG, CLIA EBV VCA IgG, CLIA EBV VCA IgM, 2023*).

Tabulka č. 6: Rozsah měřících souprav a interval linearity.

Protilátka	Rozsah měřící soupravy (U/ml)	Interval linearity (U/ml)
EA(D) IgG	5,00–160,00	19,93–37,17
EBNA-1 IgG	3,00–320,00	6,78–36,72
VCA IgG	3,00–320,00	13,03–137,94
VCA IgM	3,00–160,00	14,90–110,65

Převzato a upraveno dle *Návody pro použití CLIA EBV EA(D) IgG, CLIA EBV EBNA-1 IgG, CLIA EBV VCA IgG, CLIA EBV VCA IgM*, 2023.

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

Tabulka č. 7: Jednotlivá stádia infekce EBV.

	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.

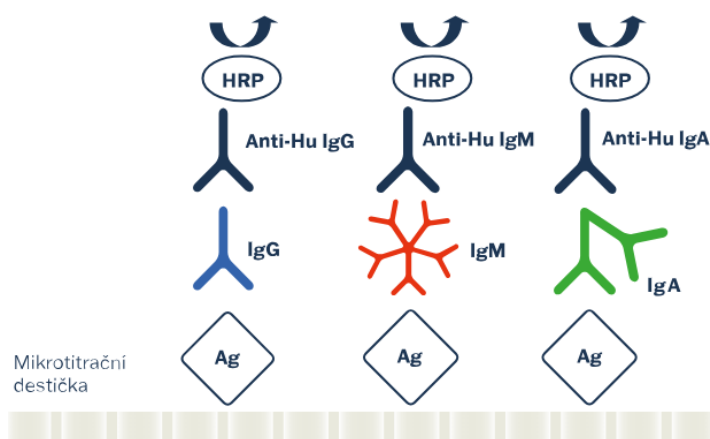
5.3 ELISA

5.3.1 Princip metody

Metoda ELISA představuje nepřímou imunoenzymatickou metodu určenou k detekci specifických protilátek v lidském séru nebo plazmě, včetně protilátek proti antigenům EBV. Tato metoda se využívá především k diagnostice onemocnění spojených s infekcí EBV. Metoda ELISA 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. Podrobnější informace o metodě ELISA byly čerpány ze zdrojů společnosti TestLine Clinical Diagnostics s.r.o..

Nejčastěji používaným typem je tzv. sendvičová ELISA (viz obrázek č. 14). Tato metoda zahrnuje mikrotitrační destičku s jamkami, ve kterých jsou obsaženy rekombinantní antigeny EBV. 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, které se vážou na imunokomplex. Po přidání substrátu dojde k barevné změně. Reakce je ukončena zastavovacím kyselým roztokem, který stabilizuje její zabarvení. Výsledná intenzita zbarvení je přímo úměrná koncentraci cílových protilátek ve vzorku a měří se spektrofotometricky při vlnové délce 450 nm (TestLine Clinical Diagnostics s.r.o., n.d.).



Obrázek č. 14: Sendvičová ELISA metoda (zdroj: TestLine Clinical Diagnostics s.r.o., n.d.).

5.3.2 ELISA souprava a technologie

K detekci protilátek metodou ELISA lze využívat soupravu od společnosti TestLine Clinical Diagnostics s.r.o., která je určená pro manuální zpracování nebo automatizované zpracování na přístrojích. Existují dvě soupravy, kdy klasickou EIA soupravu lze využít pro manuální i automatizované zpracování. Je navržena pro analyzátory DYNEX DS2 nebo DYNEX DSX od výrobce DYNEX® Technologies nebo analyzátor Gemini od výrobce STRATEC SE, Germany. SmartEIA soustava využívá TestLine SmartKits®,

která je speciálně určena pro analyzátor DYNEX Agility® systém od výrobce DYNEX® Technologies, USA (TestLine Clinical Diagnostics s.r.o., n.d.; *ELISA Zlatý standard v laboratorní diagnostice*, 2022).

Každá 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), konjugát, substrát TMB a promývací roztok, ředící a zastavovací roztok (TestLine Clinical Diagnostics s.r.o., n.d.).

5.3.3 Pracovní postup

Pracovní postup metody ELISA je přehledně znázorněn na obrázku č. 15, který zahrnuje jedenáct po sobě následujících kroků vedoucích k detekci specifických protilátek ve vzorku.

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 roztoku 100 µl 10. – včetně blanku
	11. Fotometrické měření při 450 nm

Obrázek č. 15: 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.

Druhým způsobem interpretace je semikvantitativní interpretace pomocí indexu pozitivity (IP). Tento index vyjadřuje poměr mezi absorbancí testovaného vzorku a průměrnou hodnotou absorbance CUT-OFF v rámci jednoho měření. Výsledek indexu pozitivity je hodnocen dle stanovených mezních hodnot: <0,9 negativní, 0,9–1,1 hraniční, >1,1 pozitivní (TestLine Clinical Diagnostics s.r.o., n.d).

5.4 Real-time PCR (qPCR)

5.4.1 Princip metody

Metoda real-time PCR (qPCR) je moderní molekulární metoda umožňující přímou detekci a kvantifikaci nukleových kyselin cílového viru. Metoda qPCR představuje přímou kvantitativní diagnostickou metodu, využívanou k identifikaci DNA EBV v různých typech biologického materiálu, jako je mozkomíšní mok, krevní plazma, sérum, plná krev (odebraná do zkumavky s antikoagulačním činidlem EDTA), bronchoalveolární laváž (BAL) nebo jiné klinické vzorky dle indikace vyšetření.

Metoda je založena na amplifikaci cílové DNA EBV pomocí fluorescenčního značení. S narůstajícím množstvím amplifikované DNA se zvyšuje intenzita fluorescenčního signálu, který je přímo úměrný koncentraci virové DNA ve vzorku. Fluorescenční signál je detekován pomocí specifických fluorescenčních sond nebo barviv, které se vážou na nově vzniklou DNA viru. Výsledný signál je měřen ve fluorescenčním kanálu dle použitého fluoroforu FAM, HEX, JOE nebo VIC. Cílovým detekovaným genem v rámci identifikace DNA viru Epstein-Barrové je nukleární antigen EBNA-1 (Čepin, 2017; *Instructions for use GeneProof Epstein-Barr Virus (EBV) PCR Kit*, 2023).

Veškeré další informace o identifikaci DNA viru Epstein-Barrové metodou qPCR byly čerpány ze zdrojů společnosti GeneProof a.s..

5.4.2 Diagnostické soupravy a přístrojové vybavení

Pro detekci DNA viru Epstein-Barrové pomocí metody qPCR lze využít například diagnostickou soupravu GeneProof Epstein-Barr Virus (EBV) PCR Kit od společnosti GeneProof a.s.. Tato souprava je navržena pro několik typů qPCR přístrojů, například croBEETM Real-Time PCR Systém, BioQuant-96 Real-Time PCR Systém nebo Montania 4896 Real-Time PCR termocykler.

Součástí každé diagnostické PCR soupravy je Master Mix, obsahující směs enzymů, cílových primerů a TaqMan sondy v pufru, čtyři kalibrátory s různými koncentracemi DNA oligonukleotidů v pufru, a interní standard ve formě DNA plazmidu v pufru. Kromě PCR soupravy je pro úspěšné provedení qPCR metody důležité provést extrakci nukleové kyseliny, ke které se využívá extrakční souprava.

Dále je kromě těchto souprav také zapotřebí laboratorní vybavení, jako je centrifuga, vortex, chladnička a mrazák, chladicí stojan pro udržení stability vzorků a reagensií (*CroBEE201A Nucleic Acid Extraction Kit*, 2017; *Instructions for use GeneProof Epstein-Barr Virus (EBV) PCR Kit*, 2023).

5.4.3 Pracovní postup

Pracovní postup metody qPCR zahrnuje několik kroků vedoucích k amplifikaci a detekci virové DNA viru Epstein-Barrové. Tato metoda využívá specifické fluorescenční sondy k detekci fluorescenčního signálu v kanálech pro fluorofor FAM nebo HEX/JOE/VIC. Přehled jednotlivých kroků je uveden v tabulce č. 8.

Tabulka č. 8: Pracovní postup metody qPCR.

Krok	Popis testovacího kroku
1.	Připravit extrahovanou DNA ze vzorku dle typu biologického materiálu.
2.	Zapnout a připravit qPCR analyzátor.
3.	Rozmrazit lahvičky s interním standardem a potřebné reagentie.
4.	Jemně vortexovat a krátce centrifugovat lahvičky.
5.	Napipetovat 30 µl Master Mixu do PCR zkumavek.
6.	Přidat 10 µl extrahované DNA nebo 10 µl kalibrátoru, a poté promíchat.

Krok	Popis testovacího kroku
7.	Uzavřít zkumavky a krátce centrifugovat.
8.	Vložit zkumavky do qPCR analyzátoru.
9.	Spustit amplifikaci dle amplifikačního profilu uvedeného v tabulce č. 9.

Převzato a upraveno dle *Instructions for use GeneProof Epstein-Barr Virus (EBV) PCR Kit*, 2023).

Tabulka č. 9: Amplifikační profil PCR reakce

Fáze	Proces	Teplota (°C)	Doba	Cyklus	Fluorescenční kanál
1.	Dekontaminace	37	2 min	1	/
2.	Počáteční denaturace	95	10 min	1	/
3.	Denaturace	95	5 s	45	/
	Annealing	60	40 s		FAM, HEX/JOE/VIC
	Extenze/Elongace	72	20 s		/

Převzato a upraveno dle *Instructions for use GeneProof Epstein-Barr Virus (EBV) PCR Kit*, 2023).

5.4.4 Interpretace výsledků

Výsledky získané metodou qPCR mohou být interpretovány na základě přítomnosti fluorescenčního signálu ve fluorescenčních kanálech. Výsledek je hodnocen jako pozitivní, pokud je ve vzorku identifikována cílová DNA EBV. Naopak za negativní je považován takový výsledek, kdy přítomnost EBV ve vzorku prokázána není. Pro přehlednější hodnocení výsledků slouží tabulka č. 10., která znázorňuje možné kombinace fluorescenčních signálů ve fluorescenčních kanálech a jejich interpretaci.

Kromě předchozí interpretace lze výsledky interpretovat také kvantitativně, a to výpočtem koncentrace virové nálože ve vzorku, vyjádřené v jednotkách cp/ml. Výsledná koncentrace se určí na základě známé koncentrace vzorku (cp/ml), elučního objemu pufru a izolačního objemu původního biologického vzorku (μl). Výpočetní vzorec je uveden na obrázku č. 16 (*Instructions for use GeneProof Epstein-Barr Virus (EBV) PCR Kit*, 2023).

Detekce cílové DNA EBV pomocí qPCR má význam pro sledování průběhu onemocnění spojeného s infekcí EBV, hodnocení účinnosti léčby a také pro výzkumné účely.

Tabulka č. 10: Interpretace výsledků ve fluorescenčních kanálech.

FAM (EBV)	HEX/JOE/VIC (IS)	Výsledek	Interpretace
POZ	POZ	Validní	EBV pozitivní
POZ	/	Validní	EBV pozitivní
/	POZ (<38)	Validní	EBV negativní
/	POZ (>38)	Nevalidní	/
/	/	Nevalidní	/

Převzato a upraveno dle *Instructions for use GeneProof Epstein-Barr Virus (EBV) PCR Kit*, 2023).

$$VLC = \frac{SC \times EV \times 10^3}{IV}$$

Obrázek č. 16: Výpočetní vzorec koncentrace virové nálože (zdroj: *Instructions for use GeneProof Epstein-Barr Virus (EBV) PCR Kit*, 2023).

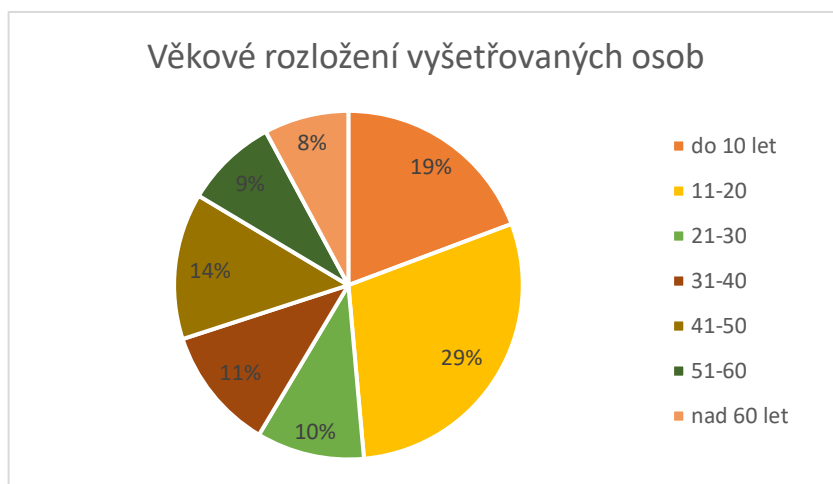
6 VÝSLEDKY

Tato kapitola, týkající se vyhodnocování výsledků, je rozdělena do několika částí. Nejprve je analyzována četnost výskytu specifických protilátek proti antigenům viru Epstein-Barrové v závislosti na věkových kategoriích vyšetřovaných osob. Následuje hodnocení výskytu jednotlivých typů protilátek a jejich hodnocení v rámci různých stádií infekce EBV a jednotlivých typů onemocnění. Poslední část je zaměřená na srovnání vybraných analytických metod použitých k průkazu viru Epstein-Barrové.

Laboratorní vyšetření protilátek proti antigenům EBV bylo provedeno v imunologické laboratoři společnosti EUC Praha za využití chemiluminiscenční imunoanalytické metody (CLIA). Celkem bylo vyšetřeno 140 vzorků krevního séra odebraných od různých jedinců. Na základě získaných výsledků byla provedena statistická analýza dat a vytvořeny grafy znázorňující četnost výskytu protilátek.

6.1 Četnost vyšetřovaných osob

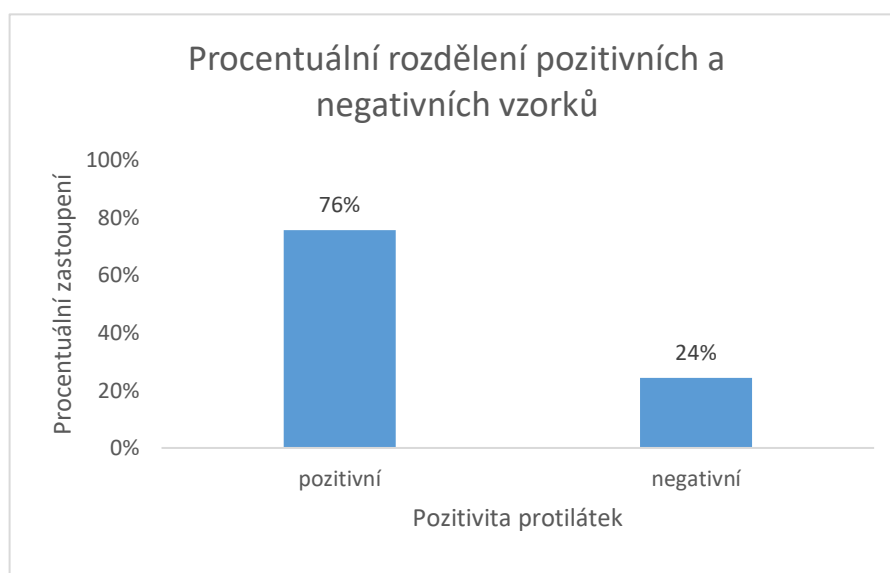
V rámci studie bylo analyzováno celkem 140 vzorků krevního séra. Výsledky byly rozděleny do několika věkových kategorií s cílem posoudit zastoupení vyšetřovaných osob v jednotlivých kategoriích. Nejvyšší počet vyšetřovaných osob byl zaznamenán v kategorii dospívajících ve věku 11 až 20 let, která představuje přibližně 29 % z celkového počtu, což odpovídá 41 osobám. Graf č. 1 znázorňuje procentuální zastoupení vyšetřovaných osob v jednotlivých věkových kategoriích po desetiletých intervalech.



Graf č. 1: Věkové rozložení vyšetřovaných osob (zdroj: vlastní).

6.2 Četnost positivity protilátek proti antigenům EBV

Z celkového počtu 140 analyzovaných vzorků byla u většiny z nich prokázána přítomnost specifických protilátek proti antigenům EBV. Pozitivní výsledek byl zaznamenán u 106 vzorků, což představuje přibližně 76 % všech vyšetřovaných osob. Tito jedinci měli zvýšené hladiny alespoň jedné ze sledovaných specifických protilátek. Naopak u 34 osob (24 %) nebyla detekována žádná zvýšená hladina specifických protilátek, což ukazuje na negativní výsledek. Procentuální rozdělení pozitivních a negativních vzorků je znázorněno v grafu č. 2.



Graf č. 2: Procentuální rozdělení pozitivních a negativních vzorků (zdroj: vlastní).

6.3 Četnost výskytu positivity protilátek v závislosti na věkové kategorii

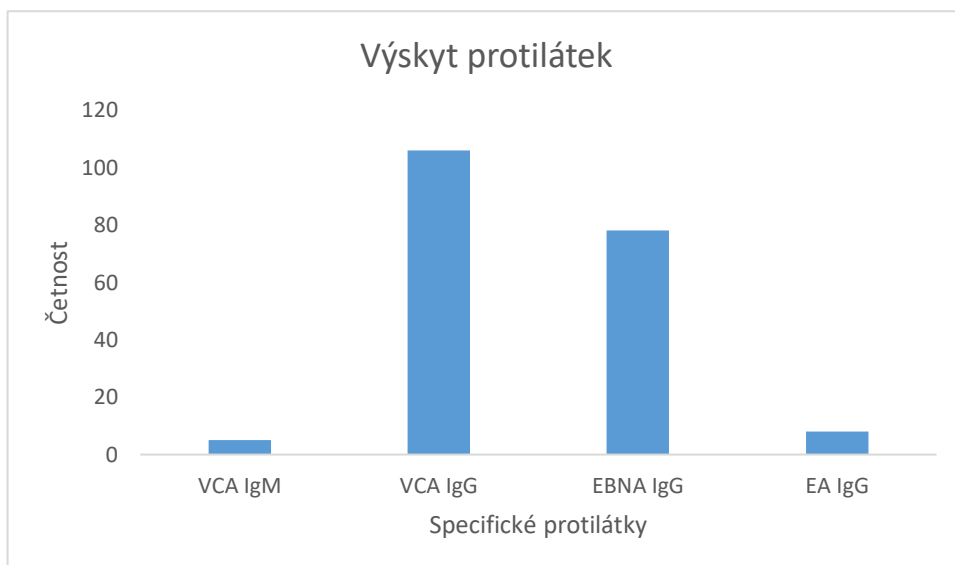
Z celkového počtu 106 pozitivních vzorků byla nejvyšší četnost výskytu protilátek proti antigenům EBV prokázána u dospělých osob ve věku 31 až 60 let, kde bylo identifikováno celkem 46 pozitivních případů. V ostatních věkových kategoriích byl výskyt rovnoměrnější a pozitivita se pohybovala přibližně kolem 14 % z celkového počtu pozitivních vzorků. Četnost výskytu protilátek ve vztahu k věku je znázorněna v grafu č. 3.



Graf č. 3: Četnost pozitivních vzorků v závislosti na věku (zdroj: vlastní).

6.4 Četnost výskytu jednotlivých protilátek

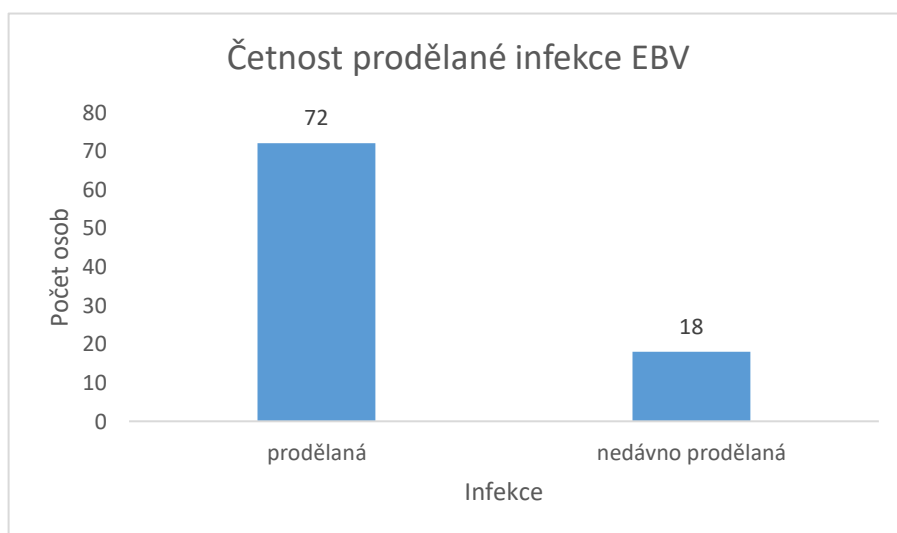
Z celkového počtu 140 analyzovaných vzorků byly nejčastěji detekovány protilátkami VCA IgG a EBNA IgG. Protilátky VCA IgG byly přítomny u 76 % případů (106 vzorků) a EBNA IgG u 56 % (78 vzorků), jak je znázorněno v grafu č. 4. Naopak protilátky VCA IgM a EA IgG byly zaznamenány pouze v 4-6 % analyzovaných vzorků, což ukazuje na jejich nižší výskyt.



Graf č. 4: Výskyt protilátek (zdroj: vlastní).

6.5 Četnost stádia infekce EBV

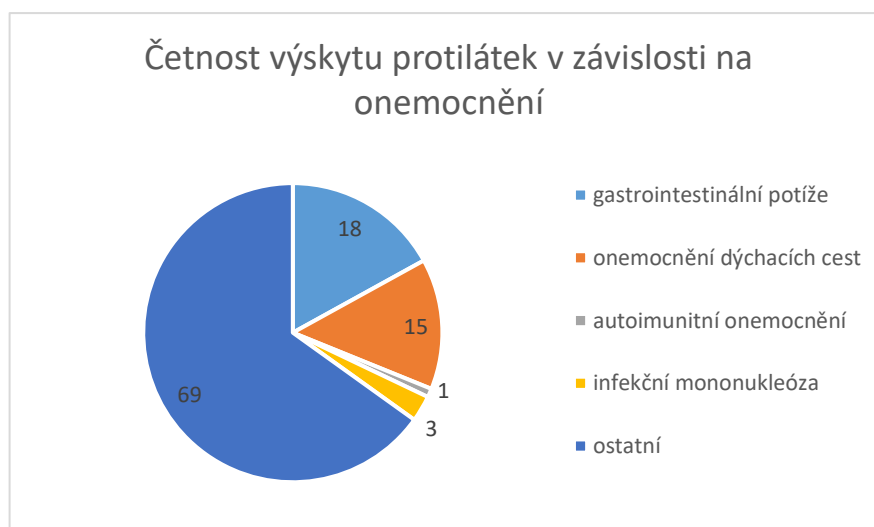
Z celkového počtu 106 pozitivních vzorků bylo u více než poloviny zjištěno zvýšení hladin protilátek třídy IgG proti antigenům VCA a EBNA, což ukazuje, že vyšetřované osoby již prodělaly infekci EBV v minulosti a mají přítomné tzv. anamnestické protilátky. Na základě těchto kritérií byla prodělaná infekce EBV potvrzena u 72 osob z celkového počtu 140 vyšetřovaných osob. U dalších 18 pozitivních osob byly zjištěny pouze zvýšené hladiny protilátky VCA IgG bez přítomnosti EBNA IgG, což ukazuje na nedávno prodělanou infekci. Přehled četnosti jednotlivých stádií prodělané infekce EBV je znázorněna v grafu č. 5.



Graf č. 5: Četnost prodělané infekce EBV (zdroj: vlastní).

6.6 Četnost výskytu protilátek v souvislosti s různými onemocněními

Z celkového počtu 106 pozitivních vzorků byly specifické protilátky proti antigenům EBV prokázány u 18 osob s gastrointestinálními potížemi a 15 osob s onemocněním dýchacích cest. U tří osob byly protilátky prokázány v souvislosti s infekční mononukleózou. Pouze jeden pozitivní případ byl zjištěn u osoby s autoimunitním onemocněním. Přehled četnosti výskytu protilátek v jednotlivých kategoriích onemocnění je znázorněn v grafu č. 6.



Graf č. 6: Četnost výskytu protilátek v závislosti na onemocnění (zdroj: vlastní).

6.7 Srovnání vybraných analytických metod

Na základě údajů získaných z imunologické laboratoře společnosti EUC Praha a informací dostupných z odborné literatury byla vytvořena srovnávací tabulka vybraných analytických metod využívaných ke stanovení protilátek nebo přímé detekci viru Epstein-Barrové. V tabulce č. 11 je uvedeno porovnání metod CLIA, ELISA a qPCR z hlediska jejich principu, cíle stanovení, typu diagnostické metody, doby analýzy, způsobu hodnocení, výhod a nevýhod.

Tabulka č. 11: Srovnání vybraných analytických metod.

faktor	CLIA	ELISA	qPCR
Princip	Chemiluminiscenční reakce	Barevná změna enzymatickou reakcí	Amplifikace virové DNA
Stanovení	Protilátky (IgG, IgM)	Protilátky	Virová nukleová kyselina
Průkaz	Ab IgM a IgG proti antigenům VCA, EBNA a EA(D)	Ab proti antigenům EBV	Přítomnost EBV
Typ diagnostické metody	Nepřímá	Nepřímá	Přímá

faktor	CLIA	ELISA	qPCR
Doba analýzy	30 minut	1,5 hodiny	2-4 hodiny
Hodnocení	Kvantitativní	Kvantitativní Semikvantitativní	Kvantitativní
Výhody	Vysoká citlivost, rychlost, moderní metoda.	Dobrá dostupnost, nízké náklady.	Molekulární detekce viru
Nevýhody	Vysoké náklady, potřeba specializovaného vybavení.	Delší doba stanovení	Dlouhá doba stanovení, detekce pouze přítomnosti viru, vysoké náklady, 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 VCA IgG, VCA IgM, EBNA IgG a EA IgG, pomocí chemiluminiscenční imunoanalytické metody (CLIA) v imunologické laboratoři EUC Praha. Průkaz infekce EBV vyžaduje znalost významu jednotlivých specifických protilátek, a to v závislosti na věku osoby a jeho klinickém stavu.

V rámci této práce bylo analyzováno 140 vzorků krevního séra od různých jedinců. Nejčastěji vyšetřovanou skupinou byli jedinci ve věkové kategorii 11 až 20 let, což odpovídá období dospívání. Jelikož je virus Epstein-Barrové nejčastěji spojován s onemocněním infekční mononukleóza, která se typicky vyskytuje právě u dětí a mladých dospělých, jsou tato zjištění v souladu s dostupnou literaturou (Mihál & Michalková, 2022).

Z hlediska celkové positivity protilátek proti antigenům EBV bylo prokázáno převažující množství pozitivních vzorků (76 %) nad negativními (24 %). Další analýza ukázala, že protilátky se nejhojněji vyskytují u dospělých osob ve věku 31 až 60 let. Nejvyšší hladiny byly zaznamenány u protilátek třídy IgG proti antigenům VCA a EBNA, což ukazuje na již prodělanou infekci EBV v minulosti (Atefi, 2023). Tyto výsledky poukazují na to, že u dospělých osob je výskyt protilátek hojnější než u dětí a mladých dospělých, čímž byla potvrzena první hypotéza, že věk jedince má vliv na přítomnost protilátek proti EBV.

Virus Epstein-Barrové je často spojován s řadou komplikací a autoimunitními a národovými onemocněními (Fugl & Andersen, 2019), což ukazuje na jeho variabilitu a schopnost ovlivňovat různé patologické procesy. Asociace EBV s nádorovými onemocněními je silnější, protože virus se může vyskytovat přímo v nádorových buňkách. Naproti tomu k autoimunitním onemocněním EBV spíše jen přispívá, než aby byl jejich příčinou. Výsledky detekce protilátek proti antigenům EBV metodou CLIA ukázaly, že většina pozitivních nálezů souvisí s prodělanou infekcí EBV v minulosti, potvrzenou přítomností tzv. anamnestických protilátek, které se mohou běžně vyskytovat u různých onemocnění. Samotný laboratorní průkaz protilátek proti antigenům EBV bez informací o klinickém stavu jedince však neukazuje na žádné konkrétní onemocnění.

Nebyla tedy prokázána žádná významná souvislost mezi pozitivitou EBV a autoimunitním nebo nádorovým onemocněním. Z výsledků vyplývá, že pozitivita EBV tedy není častějším ukazatelem ani autoimunitních onemocnění, ani lymfomů, a druhá hypotéza tak nebyla potvrzena. Pro stanovení přesné diagnózy je potřeba znát i klinický stav jedince a provést další doplňující diagnostické metody.

Pro vyhodnocení nejvhodnější a nejspecifičtější metody průkazu protilátek proti EBV byla vypracována srovnávací tabulka vybraných analytických metod CLIA, ELISA a qPCR. Přestože je metoda ELISA považována za zlatý standard pro detekci protilátek proti EBV a jiných virových agens, a to především díky své jednoduchosti a dostupnosti, výsledky provedeného srovnání ukázaly, že za nejvhodnější metodu lze považovat chemiluminiscenční imunoanalytickou metodu (CLIA).

Metoda CLIA využívá podobný princip jako ELISA, 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, rychlá doba analýzy a schopnost zpracovat větší počet vzorků v kratším čase ve srovnání s metodou ELISA. Na základě tohoto srovnání byla třetí hypotéza, která předpokládala vyšší vhodnost metody ELISA, vyvrácena.

Metoda real-time PCR (qPCR) byla ve srovnání s metodou ELISA a CLIA vyhodnocena jako nejméně vhodná pro detekci protilátek proti EBV. Tato metoda je primárně určena k detekci virové DNA ve vzorku, nikoliv k průkazu specifických protilátek. Její využití by však bylo užitečné pro diagnostiku akutní fáze infekce EBV nebo pro monitorování reaktivace viru zpět do lytické fáze.

Na základě získaných informací o metodách CLIA, ELISA a qPCR by bylo nejideálnější zkombinovat sérologickou metodu (CLIA, ELISA) s molekulární metodou (qPCR). Tato kombinace metod by umožnila detekci specifických protilátek proti antigenům EBV a přímou identifikaci DNA EBV, což by umožnilo přesné určení stádia infekce, ale 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 140 vzorků krevního séra odebraných od různých jedinců v imunologické laboratoři EUC Praha. Na základě poskytnutých dat a jejich statistického zpracování bylo zjištěno, že pozitivita protilátek byla zaznamenána u 76 % vzorků. Z celkového počtu pozitivních výsledků byl nejvyšší výskyt protilátek zaznamenán ve věkové kategorii 31 až 60 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 protilátky VCA IgG a EBNA IgG, které obvykle ukazují na již prodělanou infekci EBV, nikoliv na akutně probíhající onemocnění.

V závěru práce bylo provedeno porovnání vybraných analytických metod CLIA, ELISA a qPCR. Na základě srovnání byla metoda CLIA vyhodnocena jako nejvhodnější 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. Přesto metoda ELISA díky své jednoduchosti, dostupnosti a nižším nákladům, zůstává častěji využívanou metodou k detekci protilátek proti EBV než metoda CLIA. Metoda qPCR je zaměřena na přímý průkaz viru, a to na základě detekce jeho virové DNA. Její rutinní využití k diagnostice EBV je spíše výjimečné, a tak stále nejvíce využívanými metodami pro detekci EBV v současné době jsou metody sérologické.

9 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- Abdelmonem, M., Abdullah, C. A. C., Bastawecy, I. M., Raof, A. M. A., Afify, A. F., El Naggar, 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>
- 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>
- CroBEE201A Nucleic Acid Extraction Kit. (2017) (04 ed.). GeneProof a.s. <https://triomed.com.tr/wp-content/uploads/2019/05/crobee-201a-nucleic-acid-extraction-kit-en.pdf>
- CUSABIO. (c2007-2025). *Epstein-Barr virus*. CUSABIO. Retrieved March 26, 2025, from <https://www.cusabio.com/infectious-diseases/epstein-barr-virus.html>

- Čepin, U. (2017). *How Does qPCR Work? (Technology Basics)*. BioSistemika. Retrieved April 24, 2025, from <https://biosistemika.com/blog/qpcr-technology-basics/>
- 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 astrobiology. *Frontiers in Microbiology*, 13, 3-4. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1032918>
- Drnková, B. (2019). *Mikrobiologie, imunologie, epidemiologie a hygiena: pro zdravotnické obory*. Grada. <https://www.bookport.cz/kniha/mikrobiologie-imunologie-epidemiologie-a-hygiena-6037/>
- ELISA Zlatý standard v laboratorní diagnostice*. (2022) (V11). TestLine Clinical Diagnostics. https://www.testlinecd.cz/data/05/microsite/elisa/Elisa_CZ.pdf
- Elísková, K. (2022). *Průkaz EBV viru v tkáňovém materiálu* [Bakalářská práce]. Masarykova univerzita, Lékařská fakulta.
- Escalante, G. M., Mutsunguma, 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>

- Gorbalenya, A. E., Krupovic, M., Mushegian, A., Kropinski, A. M., Siddell, S. G., Varsani, A., Adams, M. J., Davison, A. J., Dutilh, B. E., Harrach, B., Harrison, R. L., Junglen, S., King, A. M. Q., Knowles, N. J., & Lefkowitz, E. J. (2020). The new scope of virus taxonomy: partitioning the virosphere into 15 hierarchical ranks. *Nature Microbiology*, 5(5), 668-674. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0709-x>
- Hoenen, T., & Groeth, A. (2022). Virus–Host Cell Interactions. *Cells*, 11(5), 1-3. <https://doi.org/10.3390/cells11050804>
- 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>
- 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.
- Hutt-Fletcher, L. M. (2015). EBV Glycoproteins: Where are we now? *Future Virology*, 10(10), 1155-1162. <https://doi.org/10.2217/fvl.15.80>
- Imunoenzymatické soupravy k diagnostice infekční mononukleózy.* (2022) (V07). TestLine Clinical Diagnostics.
- Instructions for use GeneProof Epstein-Barr Virus (EBV) PCR Kit.* (2023) (3.0rd ed.). GeneProof a.s. https://static.viaaurea.eu/d/geneproofcom/files/13031.pdf/s-a99aab1482b2?fn=GP_EBV_Instructions_for_Use_EN.pdf
- 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>
- Krug, R.M., Wagner, R.R. (2025, February 14). virus. Encyclopedia Britannica. <https://www.britannica.com/science/virus>

- 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>
- 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>
- Mihál, V., & Michalková, K. (2022). Infectious mononucleosis is most common in adolescents and young adults. *Pediatrerie 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/>
- Rzymiski, 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>

- Schindler, J. (2014). *Mikrobiologie: Pro studenty zdravotnických oborů, 2., doplněné a přepracované vydání*. Grada. <https://www.bookport.cz/kniha/mikrobiologie-2292/>
- 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>
- Stanovení protilátek proti antigenům viru Epstein-Barrové metodou CLIA*. (2025) (02nd ed.). EUC Laboratoře.
- 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. (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>
- 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>

- Werler, M. M., Parker, S. E., Hedman, K., Gissler, M., Ritvanen, A., & Surcel, H. -M. (2016). Maternal Antibodies to Herpes Virus Antigens and Risk of Gastroschisis in Offspring. *American Journal of Epidemiology*, 184(12), 902-912. <https://doi.org/10.1093/aje/kww114>
- 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
AE	Acridinium ester
AID	Aktivací indukovaná deamináza
ALT	Alaninaminotransferáza
AST	Aspartátaminotransferáza
BAL	Bronchoalveolární laváž
BCR	B-buněčný receptor
CD21	Povrchový znak 21
CD35	Povrchový znak 35
CD4+ T-lymfocyty	Pomocné T-lymfocyty
CD8+ T-lymfocyty	Cytotoxické T-lymfocyty
CLIA	Chemiluminiscenční imunoanalýza
CMV	Cytomegalovirus
CSF-1	Kolonie stimulující faktor 1
DLBCL	Difúzní velkobuněčný B-lymfom
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
dsRNA	Dvouvláknová ribonukleová kyselina
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	In situ hybridizace na transkripty RNA kódované EBV
EBNA	EB-nukleární antigen
EBV	Epstein-Barrové virus
EDTA	Kyselina ethylendiaminotetraoctová
ELISA (EIA)	Enzymová imunoanalýza

EphA2	Ephrin-A2
FAM	Karboxyfluorescein
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
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	Imunofluorescenční metoda
IgG	Imunoglobulin G
IgM	Imunoglobulin M
IM	Infekční mononukleóza
IP	Index pozitivity
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
NRP-1	Neuropilin 1
p18	Virový kapsidový antigen p18
p23	Virový kapsidový antigen p23
PCR	Polymerázová řetězová reakce
POZ	Pozitivní
qPCR	Kvantitativní PCR / Real-time PCR
RFID	Radiofrekvenční identifikační transpondér
RLU	Relativní světelná jednotka
RNA	Ribonukleová kyselina
RTA (Rta)	Replikační a transkripční aktivátor
ssDNA	Jednovláknová deoxyribonukleová kyselina
ssRNA	Jednovláknová ribonukleová kyselina
Th-lymfocyty	Pomocné T-lymfocyty
TMB	Tetramethylbenzidin
VCA	Virový kapsidový antigen
VIC	2'-chlor-7'-fenyl-1,4-dichlor-6-karboxyfluorescein
VZV	Varicella-zoster virus
ZEBRA (Zta)	Z Epstein-Barrové replikační aktivátor

11 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek č. 1: Struktura herpetického viru (zdroj: Chen et al., 2020).....	15
Obrázek č. 2: Struktura EBV se zobrazenými glykoproteiny a hostitelskými proteiny (zdroj: Abdelmonem et al., 2024).....	18
Obrázek č. 3: Vstup EBV do cílových buněk (zdroj: Escalante et al., 2022).....	21
Obrázek č. 4: Specifické protilátky proti EBV antigenům a stádium infekce (zdroj: Werler et al., 2016).....	26
Obrázek č. 5: Barevné značení odběrových zkumavek (zdroj: <i>Laboratorní příručka Imunologie</i> EUC Laboratoře s.r.o., 2023).	30
Obrázek č. 6: Princip metody CLIA (zdroj: https://www.testlinecd.cz/clia).....	31
Obrázek č. 7: Analyzátor KleeYa®, EUC Laboratoře Praha (zdroj: vlastní).....	31
Obrázek č. 8: Kyvety Stackable Cuvette, 1000 µl – Stratec Consumables GmbH (zdroj: https://www.clia.biovendor.group/cz/technologie?tab=funkce#tabs).	32
Obrázek č. 9: Špičky Anchor® Tip, 300 µl – Stratec Consumables GmbH (zdroj: vlastní).	32
Obrázek č. 10: Souhrn reagensií diagnostické soupravy (zdroj: <i>Návod pro použití CLIA EBV EA(D) IgG</i> , 2023).	33
Obrázek č. 11: Dvě diagnostické soupravy (zdroj: vlastní).....	33
Obrázek č. 12: Diagnostická souprava CLIA EBV EA(D) IgG (zdroj: vlastní).	33
Obrázek č. 13: Pracovní roztoky Trigger Solution 1 a Trigger Solution 2 (zdroj: vlastní).	34
Obrázek č. 14: Sendvičová ELISA metoda (zdroj: TestLine Clinical Diagnostics s.r.o., n.d.).	37
Obrázek č. 15: Pracovní postup metody ELISA (zdroj: <i>Imunoenzymatické soupravy k diagnostice infekční mononukleózy</i> , 2022).	38
Obrázek č. 16: Výpočetní vzorec koncentrace virové nálože (zdroj: <i>Instructions for use GeneProof Epstein-Barr Virus (EBV) PCR Kit</i> , 2023).....	42

12 SEZNAM PŘÍLOH

TABULKY

Tabulka č. 1: Baltimorský klasifikační systém.	13
Tabulka č. 2: Klasifikace lidských herpetických virů.	15
Tabulka č. 3: Klíčové antigeny EBV.	18
Tabulka č. 4: Rozdělení glykoproteinů EBV.	19
Tabulka č. 5: Kvantitativní interpretace hladiny protilátek v jednotkách (U/ml).	35
Tabulka č. 6: Rozsah měřících souprav a interval linearity.	36
Tabulka č. 7: Jednotlivá stadia infekce EBV.	36
Tabulka č. 8: Pracovní postup metody qPCR.	40
Tabulka č. 9: Amplifikační profil PCR reakce.	41
Tabulka č. 10: Interpretace výsledků ve fluorescenčních kanálech.	42
Tabulka č. 11: Srovnání vybraných analytických metod.	47

GRAFY

Graf č. 1: Věkové rozložení vyšetřovaných osob (zdroj: vlastní).	43
Graf č. 2: Procentuální rozdělení pozitivních a negativních vzorků (zdroj: vlastní).	44
Graf č. 3: Četnost pozitivních vzorků v závislosti na věku (zdroj: vlastní).	45
Graf č. 4: Výskyt protilátek (zdroj: vlastní).	45
Graf č. 5: Četnost prodělané infekce EBV (zdroj: vlastní).	46
Graf č. 6: Četnost výskytu protilátek v závislosti na onemocnění (zdroj: vlastní).	47