

UNIVERZITA PARDUBICE

FAKULTA CHEMICKO – TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2023

Kateřina Uždilová

Univerzita Pardubice
Fakulta Chemicko – Technologická

Stanovení RNA virů CNS metodami molekulární biologie
Bakalářská práce

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2022/2023

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Kateřina Uždilová**
Osobní číslo: **C20396**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Téma práce: **Stanovení RNA virů CNS – metodami molekulární biologie**
Téma práce anglicky: **RNA Virus of CNS – Determination by Molecular Biology Methods**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

1. Rešerše na téma RNA virů centrálního nervového systému metoda molekulární biologie
 - a) Třídění RNA virů
 - b) Metody stanovení – přehled metod
 - c) Nové trendy v diagnostice

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Vojtěch Vejvoda, Ph.D.**
Herbacos Recordati s.r.o.

Datum zadání bakalářské práce: **23. prosince 2022**

Termín odevzdání bakalářské práce: **30. června 2023**

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D. v.r.
děkan

L.S.

doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2023

Prohlašuji:

Práci s názvem Stanovení RNA virů CNS – metodami molekulární biologie jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 18.6.2023

Kateřina Uždilová

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych touto cestou poděkovala svému vedoucímu bakalářské práce Mgr. Vojtěchu Vejvodovi, Ph.D., za trpělivost, vstřícnost a cenné rady při psaní této práce. Dále bych chtěla poděkovat své rodině a přátelům za podporu ve studiu.

ANOTACE

Bakalářská práce se zabývá RNA viry, které postihují centrální nervovou soustavu. Nejdůležitější z těchto virů jsou taxonomicky rozděleny a popsány. Dále je zde poukázáno na metody sloužící k jejich detekci, zejména RT-PCR. Poslední kapitola pojednává o možnosti nových detekčních metod.

KLÍČOVÁ SLOVA

RNA viry, centrální nervová soustava, RT – PCR, imunochemické metody

TITLE

RNA virus of CNS – determination by molecular biology methods

ANNOTATION

Bachelor's thesis deals with RNA viruses, which affect the central nervous system. The most important of these viruses are taxonomically classified and described. Furthermore, the thesis is about methods used for their detection, especially RT-PCR. The last chapter discusses the possibilities of new detection methods.

KEYWORDS

RNA viruses, central nervous system, RT – PCR, immunochemistry methods

OBSAH

1. Obsah

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK.....	10
SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK	11
ÚVOD.....	12
1. RNA virus.....	13
1.1. Genetická informace virů.....	13
1.1.1. RdRp – virální RNA dependentní polymeráza.....	15
1.2. Kapsida a obal.....	16
1.3. Množení.....	17
2. RNA viry v CNS a nemoci, které vyvolávají	18
2.1. Picornaviridae	18
2.1.1. Enterovirus.....	18
2.1.2. Parechovirus (HPeV)	19
2.2. Arboviry	20
2.2.1. Flaviviridae	22
2.3. Rhabdoviry	23
3. Molekulární diagnostika – současnost.....	25
3.1. Reverzně transkriptázová polymerázová řetězová reakce – RT PCR.....	25
3.1.1. Jednokrová a dvoukrová RT – PCR	27
3.1.2. RT – qPCR.....	28
3.1.3. Kapková digitální PCR (ddPCR).....	29
3.2. DNA mikročipy a mikroarray	30
3.3. Imunochemické metody	31
3.3.1. Enzymo – analytické metody.....	31
3.3.2. Imunochromatografické testy (ICT)	33
4. Využití molekulární diagnostika – budoucnost	34

4.1. Identifikace virů pomocí nanotechnologií	34
4.1.1. DNA nanonávnady – nanobait.....	34
4.2. CRISPR - Cas.....	34
ZÁVĚR	36
POUŽITÁ LITERATURA	37
ZDROJE OBRÁZKŮ	42

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1-Rozdělení virů na základě polaroty řetězce (Velthuis, 2014).....	15
Obrázek 2 - Struktura RdRp spolu se subdoménami palm (dlaň), finger (prst) a thumb (palec) (Pathania, 2022).....	16
Obrázek 3- virus arboviru je savým hmyzem vnesen do organismu a dále postupuje přes lymfatické buňky do krve (Conway, 2014)	21
Obrázek 4- Jednotlivé oblasti genomu viru Rhabdoviridae kódující proteiny (Rhabdoviridae, 2017).....	24
Obrázek 5- rozdílný průběh RT-PCR oproti PCR (Overview PCR, 2014).....	26
Obrázek 6-jedno-kroková a dvou-kroková reverzně transkriptázová PCR (RT – PCR, 2023)	28
Obrázek 7- Příprava a zpracování vzorků pro tzv. digitální PCR (ddPCR). Reakce probíhají v malých kapičkách emulze – droplets, kdy je vyhodnocován signál v každé jednotlivé kapičce (Nyaruaba, 2021)	30
Obrázek 8- Pracovní postup přípravy tištěných mikročipů a zpracování vzorků, kdy jeden ze vzorků je značen zeleně a druhý červeně. Pokud je na spotu s cílovou sekvencí detekován pouze jeden vzorek projeví se zeleno nebo červenou barvou. Pokud jsou současně detekovány oba, projeví se barvou žlutou. Toto uspořádání umožňuje současnou detekci dvou vzorků (testovaného a referenčního) (Miller, 2009).	31
Obrázek 9- Schématický obrázek ELISA metody, které je následující – reakce antigenu s primární protilátkou, reakce sekundární protilátky s chromogenem, barevná reakce (Gan, 2013).....	32
Tabulka 1- Počet nukleotidů pro kódování proteinů v závislosti na druhu Lyssaviru (Greenwood 2012, str. 594)	24

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

BBB – blood brain barrier – hematoencefalická bariéra

CNS – centrální nervová soustava

CRISPR – Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

CSF – cerebrospinal fluid – mozkomíšní mok

ddPCR – drop digital PCR – kapková digitální PCR

ELISA – enzyme – linked immunosorbent assay – enzymatická imunoanalýza

HFMD – hand – food – and – mouth disease – onemocnění postihující ruce, nohy a ústa

HPeV – human parechovirus – lidský parechovirus

HSV 1,2 – herpes simplex virus 1,2

ICT – immunochromatographic test – imunochromatografický test

IRES – internal ribosome entry site – vnitřní místo vstupu

NTP – nucleoside triphosphate – nukleosidtrifosfát

PCR – polymerase chain reaction – polymerázová řetězcová reakce

qPCR – quantitative PCR – kvantitativní PCR

RdRp – virální RNA dependentní polymeráza

RRM – RNA Recognition Motif – motiv rozpoznání RNA

RT – PCR – reverzně transkriptázová polymerázová řetězová reakce

SARS-CoV-2 – severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 – zvýšený akutní respirační syndrom způsobený koronavirem 2

TBE – tick-borne encephalitis – klíšťová encefalitida

TBEV – tick-borne encephalitis virus – virus klíšťové encefalidity

UTR – untranslated region – nepřeložitelná oblast

VP – viral proteases – virové proteázy

WHO ScG – World Health Organization Science Group

ÚVOD

Bakalářskou práci na téma Stanovení RNA virů metodami molekulární biologie jsem si vybrala, z důvodu důležitosti včasné diagnostiky těchto virů. Včasná a rychlá diagnostika předchází např. vzniku meningitid, meningoencefalitid a encefalitid u napadení organismu jako je např. virus klíšťové encefalitidy. Diagnózu dále komplikují i nespecifické příznaky v první fázi. V této fázi se onemocnění jeví jako chřipkové. Myslím si, že téma RNA virus a jeho diagnostika, je díky nedávné pandemii lépe prozkoumáno než dříve. Spoustu metod používaných k diagnostice SARS CoV-2 by bylo možno použít i na jiné RNA viry včetně virů napadající CNS (centrální nervovou soustavu).

Bakalářská práce je pouze teoretická, skládá se ze čtyř kapitol. V první kapitole jsem se zaměřila na popis RNA virů. Tato kapitola má sloužit pro pochopení, na jaké části, se v práci zaměřuji, zda se popisovaná metoda týká nukleotidového řetězce, proteinu na kapsidě atd. Druhá kapitola pojednává o, z mého pohledu nejdůležitějších, jednotlivých skupinách virů, které napadají centrální nervovou soustavu. Tyto viry jsou taxonomicky rozděleny a stručně popsány včetně příznaků onemocnění, které vyvolávají.

Ve třetí kapitole shrnuji laboratorní diagnostiku pro průkaz virů napadající centrální nervovou soustavu, kterou využíváme v současnosti z hlediska molekulárního, tak i imunochemického. Dále v této kapitole řeším kladné a záporné aspekty tohoto využití. V poslední kapitole se zaměřuji na nové trendy v molekulární diagnostice.

1. RNA virus

RNA virus je tvořen genetickou informací v podobě jednovláknové (ss) i dvouvláknové (ds) RNA. Dále je složen z kapsidy, což je proteinový obal chránící nukleovou kyselinu. V kapsidě mohou být přítomny další enzymy a peptidy. Některé RNA viry obsahují další povrchový protein, glykoprotein, který pokrývá virový obal nebo kapsidu. Genom typické virové RNA produkuje virový protein. Tento protein zodpovídá za genetické úložiště. Zajišťuje mRNA pro translaci, slouží jako šablona pro replikaci a napomáhá sestavení viru (Chauhan, 2020).

1.1. Genetická informace virů

Genetická informace je tvořena pouze jedním typem nukleové kyseliny. Tímto typem kyseliny je buď DNA nebo RNA. Všechny virové genomy jsou haploidní. Viry, které obsahují genetickou informaci v podobě RNA vykazují vysoký stupeň mutací, což je pravděpodobně způsobeno absencí kontrolního mechanismu (Celer, 2010, str.10).

Viry s genetickou informací tvořenou RNA mohou být rozděleny do skupin na základě polarity této nukleové kyseliny, která slouží jako genom. Tedy na RNA viry s pozitivním a negativním smyslem. Pozitivní RNA je také známa jako plus-vláknó nebo sense vláknó, negativní smysl RNA nebo též mínus-vláknó či antisense vláknó. Dále existují ambisense a dvouvláknové RNA viry (Payne, 2017).

Hlavním rozdílem mezi virem RNA s pozitivním a negativním smyslem je, že se virus RNA s pozitivním smyslem skládá z virové, tedy funkční mRNA. Při vstupu do hostitelské buňky se ribozomy shlukují na genomu k syntéze virových proteinů. Během replikačního cyklu pozitivních RNA virů jsou mezi prvními tvořeny proteiny potřebné k syntéze dalších genomů a mRNA. Pozitivní řetězec má dvě funkce. Je to již zmiňované mRNA a slouží také jako templát pro syntézu dalších virových RNA. Aktivně modifikuje membrány hostitelských buněk a konstrukce virových replikačních scaffold proteinů. Scaffold proteiny patří do skupiny modulačních proteinů, které vážou nejméně dvě komponenty dohromady. Jsou určeny k přiblížení těchto komponent. RNA viry s pozitivním smyslem jsou v extrahované formě infekční (Payne, 2017; Bráborec, 2012).

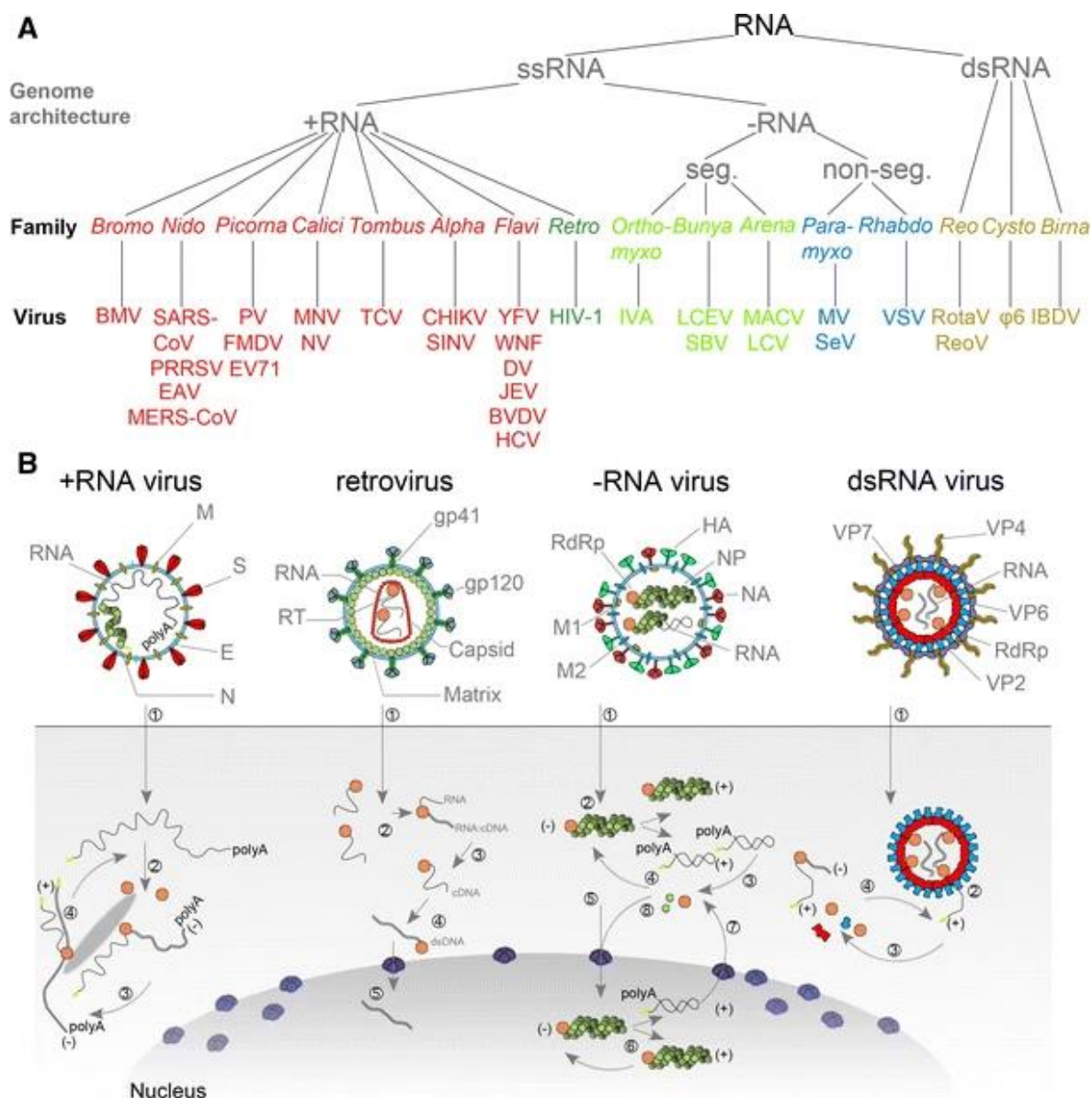
Existují tři další skupiny RNA virů jejichž genom není mRNA. Těmito skupinami jsou negativní nebo též mínus vláknové RNA viry, blízké příbuzné ambisense RNA viry a dvouvláknové RNA viry. U těchto skupin virů je první událostí po penetraci genomu transkripce, tvorba mRNA. Toho je dosaženo virovými proteiny, které vstupují do buňky s genomem. Replikační komplexy transkripce obvykle obsahují mezi dvěma a čtyřmi proteiny. Spojují se s genomem viru prostřednictvím interakcí s RNA-vazebnou nukleokapsidou nebo

kapsidovými proteiny. Proto nahá (očistěná od proteinu) genomová RNA není infekční, nelze ji tedy transkribovat. V případě blokace transkripce je degradována (Payne, 2017).

Replikace genomu viru může pokračovat po vstupu do buňky, virová mRNA musí být přepsána a přeložena. Virion RNA viru s negativním řetězcem obsahuje RdRp (virální RNA dependentní polymeráza), proto je možné syntetizovat virové mRNA ve zkumavce, čehož se využívá u některých stanovení. RdRp je více popsána v následující podkapitole (Payne, 2017; Wu, 2015).

Genomy negativního vlákna RNA virů jsou často znázorněny v diagramech s 3' koncem vlevo, na rozdíl od obvyklé konvence ilustrující řetězec nukleové kyseliny. RNA viry s negativním vláknem používají genomový řetězec jako templát pro syntézu všech mRNA. Naproti tomu viry, které používají ambisense kódovací strategii, přepisují některé mRNA z kopie genomu. Existují virové rodiny, ve kterých jsou někteří členové považovány za viry RNA s negativním řetězcem, zatímco jiné používají strategii ambisense. Tedy tyto dvě strategie spolu úzce souvisí. Skupina některých virů ambisense je schopna kopírovat genomy, které mohou být použity jako templáty pro transkripci, takže úplný komplement virových genů může být transkribován brzy po infekci (Payne, 2017).

Dvouvláknový RNA genom se vyskytuje u čeledi *Reoviridae*. Jednotlivé segmenty, kterých je u *Reoviridae* 10–12, jsou transkribovány z negativního vlákna mRNA do částečně otevřené kapsidy pomocí polymerázy zabalené do virionu. Informační RNA (mRNA) má u dvouvláknových virů dvě funkce. Za prvé, poskytnutí virových proteinů po přeložení mRNA. Za druhé, seskupení RNA v prekurzorové částici. V této částici slouží jako templát pro syntézu komplementárního vlákna poskytujícího dvouřetězcové segmenty genomu (Roizman, 1996; Bednář, 1999, str. 366).

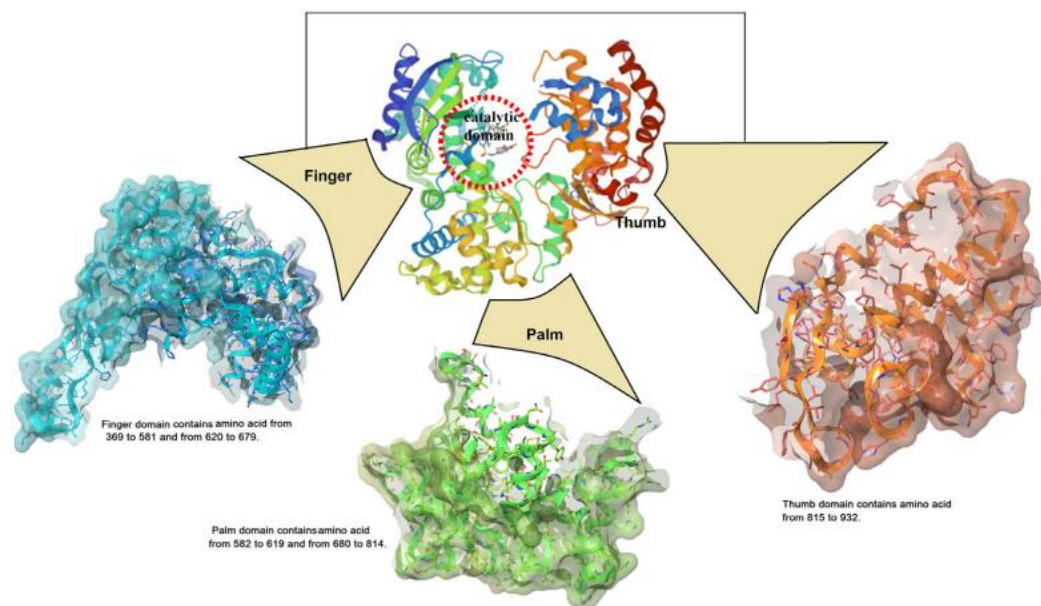


Obrázek 1-Rozdělení virů na základě polarity řetězce (Velthuis, 2014)

1.1.1. RdRp – virální RNA dependentní polymeráza

RdRp zkratka je interpretována jako virální RNA dependentní polymeráza. Jádru domény RdRp, je tvořeno třemi typy subdomén. Těmito typy jsou finger (prst), thumb (palec) a palm (dlaň). Subdomény plní především katalytickou funkci, zahrnující vazbu templátu, vstup nukleosidtrifosfátu (NTP), a polymeraci. Subdoména palm se nachází na průsečíku subdomén finger a thumb, což je zobrazeno na obrázku číslo 2. V palm subdoméně je přítomen motiv rozpoznávání RNA (RRM) obsahující tři řetězce a katalytické aspartáty (Pathania, 2022; Kiriwan, 2021; Wu, 2015).

Některé RdRp proteiny, které patří k různým RNA virům, se přeskupují v sekvenci katalytické subdomény, což vede k neobvyklé topologii. Toto přeskupení uvnitř viru poskytuje strukturální základ pro racionální návrh aktivního místa. S ohledem na iniciační mechanismus syntézy RNA, lze virové RdRp rozdělit do dvou hlavních tříd. Jádru polymerázy *Flaviviridae* představuje de novo RdRp, které využívá dva iniciační NTP k vytvoření první fosfodiesterové vazby produktu řetězce. Druhou třídu představují *Picornaviridae* (např. Poliovirus, PV) RdRp využívá výhody primeru (virově kódovaného peptidu v PV) v raných stádiích syntézy RNA (Pathania 2022; Wu 2015).



Obrázek 2 - Struktura RdRp spolu se subdoménami palm (dlaň), finger (prst) a thumb (palec) (Pathania, 2022)

1.2. Kapsida a obal

Kapsida je proteinový ochranný obal virového genomu. Obal je tvořen několika málo druhy proteinů, z důvodu krátké genomové informace. Zpravidla se jedná o několik druhů polypeptidů, které se seskupují podle fyzikálních a chemických afinit a autoregulací. Pro vznik virového obalu je využívána buněčná stěna napadené buňky. U RNA virů se vyskytují dva typy symetrie kapsidy, a to spirální a kubická (Celer, 2010, str. 10; Bednář, 1999, str. 368).

Kapsida virů se spirální symetrií je tvořena jednotlivými polypeptidy seřazenými za sebou v podobě šroubovice. Kubická symetrie je ve tvaru pravidelného dvacetistěnu se třemi osami symetrie. Tento dvacetistěn vzniká spojením pěti jednotek polypeptidů do kruhu, pentomer, a šesti jednotek polypeptidů, tedy hexomer. Souhrnně jsou tato kruhová spojení nazývána jako kapsomery. Pro jednotlivé čeledi virů je počet kapsomer utvářející kapsidu charakteristický (Bednář, 1999, str. 368).

Některé neobalené druhy virů jsou tvořeny pouze kapsidou. Obalené viry mají další lipoproteinový obal. Tento obal je tvořen lipidovou dvouvrstvou hostitelské buňky, která je kódována virovými geny. V obalu se mohou nacházet dva typy proteinů, v závislosti na typu viru. Těmito proteiny jsou matrix proteiny a glykoproteiny (peplomery) (Celer, 2010, str.10; Walker, 1998, str. 325).

1.3. Množení

Množení virů probíhá pouze v konkrétní hostitelské buňce. Virus je schopen infikovat určitou buňku, pokud je vnímavá a permisivní k danému druhu viru. Vnímavost zabezpečují vhodné receptory na povrchu buňky. Permisivní buňka je metabolicky vybavena k úplné replikaci viru. V hostitelské buňce musí být splněny podmínky pro reprodukci virových genomů a syntézu proteinů (Bednář 1999, str. 370–371).

Splnění podmínek vede ke kaskádě nutných reakcí v buňce.

Těmito kroky jsou:

1. ovlivnění buněčného metabolismu pomocí syntézy nestrukturálních regulačních proteinů
2. tvorba enzymů potřebných pro syntézu virových nukleových kyselin
3. syntéza strukturálních proteinů

Replikace u RNA virů probíhá většinou v cytoplazmě (Bednář 1999, str. 371).

Klíčovým prvkem pro všechny tyto procesy je RdRp. RdRp ve spojení s dalšími proteiny potřebnými pro syntézu virového genomu je často nazývána jako replikázový komplex. Replikázový komplex se skládá ze sady proteinů potřebných k produkci infekčních genomů. Kromě RdRp, replikázový komplex může obsahovat RNA-helikázu. Tento enzym je určen pro rozvinutí oblasti genomu RNA spárované s bázemi. A dále může zahrnovat ATPázu sloužící k dodání energie pro polymeraci. Během replikace existují minimálně tři typy RNA, které musí být v hostitelské buňce syntetizovány. Těmito typy RNA jsou genom, kopie genomu a mRNA. Některé RNA viry syntetizují navíc kopie subgenomové RNA. Počet proteinů v replikáze se mezi rodinami virů liší (Payne, 2017).

2. RNA viry v CNS a nemoci, které vyvolávají

Viry vstupují do CNS dvěma hlavními cestami. První cesta vede přes krevní zásobení do Langerhansových buněk. Tohoto způsobu transportu využívají například spalničky, příušnice a arboviry. Druhou hlavní cestou pro vstup virů do CNS jsou periferní nervy. Do této skupiny lze zařadit virus vztekliny (*Rhabdovirus*), který zpočátku infikuje myocyty. Poté virus využije motorické neurony (Swanson, 2015).

Existují i viry, které mohou využívat obě tyto popsané metody vstupu. Jakmile se viry dostanou do CNS, nastane virový tropismus a následná imunitní reakce se spojí a vzniká onemocnění. Viry, které zůstávají v buňkách meningy nebo na mozkových blanách často vyvolávají meningitidu, zatímco ty, které infikují parenchym CNS, vyvolávají vznik meningoencefalitidy, encefalitidy nebo myelitidy (Swanson 2015).

2.1. Picornaviridae

Skupina *Picornaviridae* se vyznačuje zejména různorodostí druhů, které jsou do ní zahrnuty. Latinsky *pico* znamená malý, tyto viry měří v průměru 27–30 nm. *Picornaviridae* mají jednovláknový pozitivní řetězec. Velikost genomu je okolo 4700 nukleotidů. Tvar kapsidy této skupiny je ikosaedrický. Je sem zařazeno celkem 12 rodů. Na člověka přenosné jsou z nich pouze tři, a to *Enterovirus* (zahrnující *Rhinovirus*, původce chřipky), *Parvovirus* a *Hepatovirus* (původce žloutenky). Tato skupina virů způsobuje velké množství onemocnění, v závislosti na rodu. V centrální nervové soustavě, může vzniknout aseptická meningitida a encefalitida (Greenwood, 2012, str. 488; Chen 2020).

2.1.1. Enterovirus

Do podskupiny *Enterovirus* je zařazeno 15 typů virů, kterými jsou Enterovirus A–L a Rhinovirus A - C. Většina infekcí probíhá u lidí asymptomaticky, ale mohou způsobovat horečku, bolest hlavy, respirační onemocnění atd. Některé enteroviry jsou dokonce neurotropní patogeny způsobující příznaky od aseptické meningitidy po těžké encefalidity (Chen 2020).

Nejznámějším sérotypem s neurotropními účinky je poliovirus (PV), náležící do Enteroviru C. Mezi základní vlastnosti poliovirů patří afinita k nervové tkáni a úzký výběr hostitelů. Mezi vnímavé řadíme člověka, a i některé primáty. Sérotyp poliovirus se díky očkování podařilo eradikovat (Chen 2020).

Do skupiny Enterovirů jsou řazeny i sérotypy non – polioviru, do kterých spadá sérotyp EV – A71 a *Coxsackieviruses*. Sérotyp EV – A71 je hlavní příčinou HFMD (hand – food – and – mouth – diseases, onemocnění postihující ruce, nohy a ústa). Onemocnění je obvykle mírné a má stejné příznaky jako nákaza chřipkou, a to zejména bolest končetin, bolest v krku, vysokou

teplotou. Odlišností je objevení puchýřků na rukou, nohou a v ústech. Ale mohou vzniknout i závažné a život ohrožující neurologické komplikace, jako např. mozková encefalitida, meningitida a ochrnutí podobné obrně (Baggen, 2018).

Životní rozmnožovací cyklus všech enterovirů začíná vazbou na jeden nebo více buněčných povrchových receptorů. Buněčné receptory jsou speciální pro jednotlivé sérotypy enterovirů. V důsledku této vazby je zprostředkována endocytóza dovnitř buňky. To vede k vypuzení virového genomu z kapsidy do cytoplazmy (Chen, 2020; Baggen, 2018).

V cytoplazmě hostitelské buňky je zahájena translace z vnitřní ribozomální sekvence, tedy od 5' UTR konce (untranslated region, nepřekládaná oblast). UTR je tzv. vnitřním místem vstupu (IRES – internal ribosome entry site). IRES je cis – působící RNA prvek, který tvoří sekundární a terciární struktury umožňující iniciaci translace nezávislou na čepičce (Chen, 2020; Baggen, 2018).

Při translaci virové RNA vzniká jeden polyprotein, který je proteolyticky zpracován virovými proteázami za vzniku čtyř kapsidových proteinů, a to VP4, VP2, VP3 a VP1. Tyto kapsidové proteiny vznikají z bílkovinného prekurzoru VP0 pomocí proteolytického štěpení. Průběh proteolytického štěpení pro vznik virových peptidů je následující. Nejprve ss+RNA genom působí jako mRNA pro translaci polypeptidového proteinu. Tento protein je štěpen na specifických místech endoproteázovou aktivitou. A to vede ke vzniku virových proteinů včetně virové RdRp polymerázy a jednotlivých proteáz potřebných pro další reakce (Chen, 2020; Baggen, 2018; Greenwood, 2012, str. 488).

Replikace virové RNA probíhá za přítomnosti virové RdRp polymerázy, která působí jako katalyzátor reakce, což bylo popsáno v podkapitole 1.1.1. RNA dependentní polymeráza je v tomto případě nazývána primerem, tedy spouštěčem replikace. Důsledkem replikace je vznik dvouřetězcového replikativního intermediátu. Negativní vlákno slouží jako šablona pro syntézu nových pozitivních vláken. Nově syntetizované virové RNA slouží buď jako předloha pro další translaci a replikaci, nebo jsou zabaleny do nových infekčních virionů. Konec replikace je signalizován lýzou hostitelské buňky (Chen, 2020; Baggen, 2018; Greenwood, 2012, str. 489).

2.1.2. Parechovirus (HPeV)

Do parechovirů řadíme 19 typů, napadajících člověka. Tyto typy se od sebe navzájem liší VP1 geny. Dva z těchto typů byli zařazeny do *Enteroviridae*, a to echovirus 22 a 23. Toto nesprávné zařazení bylo způsobeno podobností klinických příznaků s již zmiňovanými enteroviry. Tyto viry mají ubikvitární výskyt. Infekce se vyskytuje v raném věku, přičemž se většina dětí nakazila parechoviry do 5 let života. Parechoviry u malých dětí v závislosti na typu viru

způsobují gastrointestinální a respirační potíže, ale také mohou být příčinou vzniku aseptické meningitidy, encefalitidy nebo myokarditidy či mohou být zcela asymptomatické. Pro diagnostiku se používá RT-PCR, která je popsána ve 3. kapitole (Greenwood, 2012, str. 492; Forman, 2019).

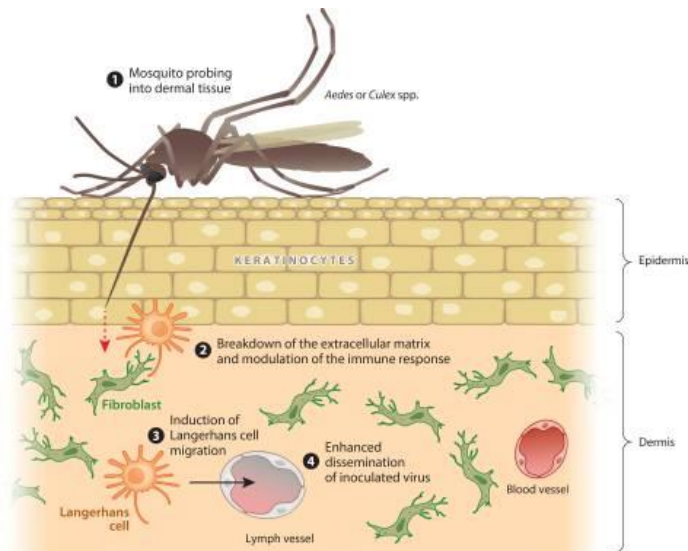
2.2. Arboviry

Jméno této skupiny pochází z anglického výrazu „arthropod – borne“. Název se dá volně přeložit jako viry přenášené hmyzem. *Arboviridae* nezahrnují geneticky podobné viry, ale viry přenášené stejným způsobem. Arboviry byly definovány podle organizace WHO ScG (World Health Organization Science Group) jako viry, které především přežívají v přírodě, buď přenosem na vnímavých obratlovcích, tedy hostiteli, a krev sajících členovcích jako je komár, klíště a moucha z čeledi *Phlebotomidae*. U zmíněných členovců je virus replikován bez jakýchkoli zjevných škodlivých účinků na vektor předtím, než je infikován vnímavý obratlovec. U tohoto vnímavého obratlovce způsobují virémie. V současné době skupina arbovirů zahrnuje více než 600 známých virů, přes 80 z nich je lidských (Greenwood, 2012, s.520; Juarez, 2022; Conway, 2014).

Skupina *Arboviridae* je stále rozšiřována, kvůli již zmíněné definici WHO ScG. Nárůst a vznik odlišných arbovirů může být ovlivněn mnoha faktory. Tyto faktory souvisí s životním prostředím jako je klima, teplota a srážky. To působí zejména na životní cyklus vektorů. Dalšími proměnnými jsou změny ve veřejném zdraví, genetické odlišnosti virů a také demografické, společenské a zemědělské změny. Nemalým problémem je též globalizace a rezistence vektorů vůči tradičně používaným insekticidům (Duarte, 2021).

Do skupiny *Arboviridae* jsou řazeny 4 rody přenášené členovci, které infikují člověka a zvířata. Těmito rody jsou *Togaviridae*, *Flaviviridae*, *Bunyaviridae* a *Reoviridae*. Zástupci těchto virů jsou spojovány s velkým počtem lidských nemocí, jako je hemoragická horečka, encefalitida, žlutá zimnice atd. (Juarez, 2022).

Virová nákaza probíhá následujícím způsobem, který je znázorněn na obrázku číslo 3. První je vstup viru do těla přes kožní bariéru díky krev sajícímu hmyzu. Dále jsou viry zachyceny Langerhansovými buňkami. Společně s buňkami dále putují do lymfatických uzlin. Jakmile je virus v sekundární lymfatické tkáni, tak proniká do krevního oběhu. Projde přes bariéry do CNS pomocí různých mechanismů nebo přes oblasti CNS jako je choroidální plexus a endoteliální buňky. Tyto oblasti nejsou zcela chráněny BBB (blood brain barrier, hematoencefalická bariéra). Dalším z mechanismů vstupu je infikování hematopoetických buněk. Tyto buňky virus přenesou do CNS a opět vzniká infekce (Swanson, 2015).



Obrázek 3- Virus arboviru je savým hmyzem vnesen do organismu a dále postupuje přes lymfatické buňky do krve (Conway, 2014)

Protilátky se objevují během 5–10 dnů po infekci a zůstávají v těle několik let. Arboviry způsobují nejrozumnější spektrum onemocnění od inaparentní infekce až po akutní encefalitidu. V CNS se arboviry množí a vyvolávají nekrozu neuronů. Neurony jsou následně obklopeny mikroglie a tvoří gliové uzly (Greenwood, 2012, s.523).

Mnoho arbovirů vyvolává encefalitidu u dětí a starších osob. Onemocnění se vyznačuje náhlým nástupem do jednoho týdne. Je provázeno příznaky jako je bolest hlavy, vysoká teplota, svalové křeče, dysestezie, což je porucha vnímání vjemů, která se projevuje jako mravenčení nebo pálení. Dalšími příznaky mohou v některých případech být letargie, zmatenost, nauzea...Po několika dnech příznaky odezní. Mohou se však znovu objevit. Postup k encefalitidě může být rychlý nebo prodromální, který trvá déle než 1 týden (Greenwood 2012, s. 523).

Těžká onemocnění CNS jsou doprovázena příznaky typickými pro encefalitidu, jako je ztuhlost šíje, slabost a paralýza, meningismus, ospalost (somnia) vedoucí až ke kómatu. Tuhost a slabost končetin je spojena s redukcí reflexů. V mozkomíšním moku se mohou objevit bílé krvinky, zejména lymfocyty, a zvýšená hladina glukózy.

Během propuknutí arbovirové encefalitidy se u části pacientů rozvine samotná aseptická meningitida bez významného postižení nervů. 50 % pacientů po zotavení z akutní encefalitidy trpí neuropsychiatrickými následky, které se různí od psychického poškození až po duševní poruchu, která může trvat měsíc až rok (Greenwood, 2012 s. 524).

2.2.1. Flaviviridae

Flaviviry jsou 50 nm v průměru velké viry. Tyto viry jsou tvořeny třemi strukturními proteiny (kapsida, prekurzorová membrána a obálka) a sedmi nestrukturními proteiny (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B a NS5). Strukturní proteiny se účastní virového připojení, vstupu, fúze, sestavení viru a sekrece virionu. Nestrukturní proteiny jsou důležité pro replikaci virové RNA (např. při tvorbě membránového replikačního komplexu), sestavení a uvolnění virionů a obraně proti přirozené imunitě (Wang, 2022).

2.2.1.1. Klíšťová encefalitida (TBE)

Klíšťová encefalitida je popisována jako sérokomplex viru, který je přenášen klíšťaty. Byli popsány i infekce, které se objevily po konzumaci syrových, nepasterizovaných mléčných výrobků z infikovaných zvířat. Těmito zdroji jsou kozy, ovce a krávy. Virus TBE (TBEV) se dělí na pět podtypů, podle lokality působení. A to na Dálný východ, sibiřský, bajkalský, himálajský a evropský podtyp. Evropský podtyp je jediným převládajícím podtypem v západní a střední Evropě (Hennechart-Collette, 2022).

Genom TBEV o 11 kb kóduje jeden polypeptid, který je zpracován na 11 strukturních a nestrukturních bílkovin. Nukleokapsida TBEV je obklopena dvouvrstvým obalem tvořeným lipidy pocházející z hostitele, ve kterých jsou zabudovány heterodimery tvořené obalovým glykoproteinem a membránovým proteinem (Chmielewska, 2022).

V současné době je TBEV endemická ve 27 evropských zemích s tisíci případy nákazy člověka každý rok. Odhadovaná incidence je vyšší, z důvodu nediodagnostikování této nákazy, kvůli skrytým příznakům. Mezi pacienty se symptomy typickými pro virovou nákazu způsobenou *Arboviridae*, je 33 % infikováno TBEV. Z tohoto počtu se u 50 % vyskytuje aseptický zánět mozkových blan (meningitida), ve 40 % případů zánět mozkových blan a mozku (meningoencefalitida) popřípadě zánět mozkových blan, mozku a míchy (meningoencefalomyelitida) ve zbývajících 10 % (Riccardi, 2019).

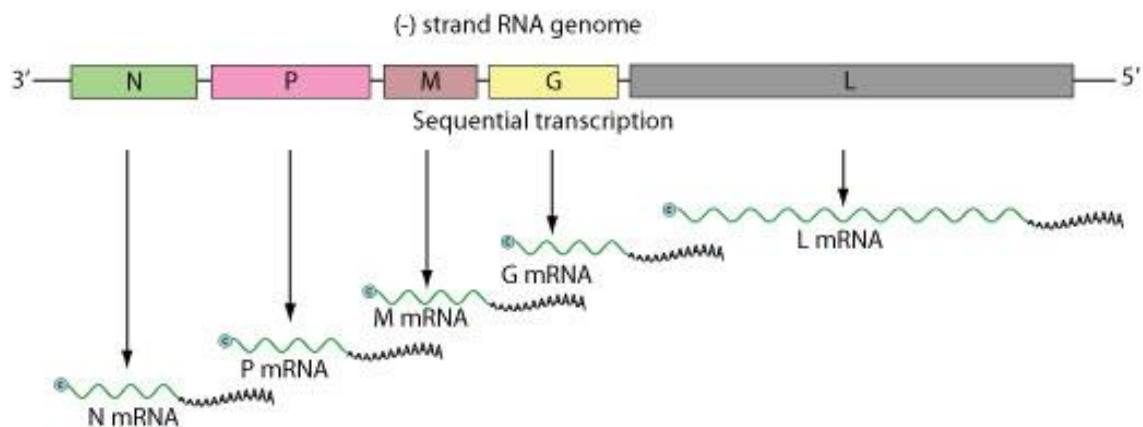
Encefalitida evropského podtypu je méně závažná než podtypy Dálného východu či sibiřský. To je pravděpodobně způsobeno menší agresivní neurovirulencí nebo též neurotropismem. Evropský podtyp tvoří fatální infekce v 1–2 % (Riccardi, 2019).

2.3. Rhabdoviry

Rhabdoviridae jsou součástí skupiny *Mononegavirales*. Jejich genetická informace je tvořena jednovláknovou nesegmentovanou nepolární RNA. Skupina zahrnuje 150 virů, rozdělených do 6 rodů napadajících savce, ptáky, ryby, hmyz a rostliny. Člověk a zvířata jsou vnímavá pro dva z těchto rodů, kterými jsou *Lyssaviruses*, *Vesiculoviruses*. Lyssavirus zahrnuje virus vztekliny a deset dalších druhů, které se odlišují rozložením řetězce v závislosti na kódující oblasti pro proteiny. Virus *Vesiculoviridae* způsobuje infekci koní, vepřů a krav. Vektorem přenosu je hmyz. Nákaza člověka má podobné příznaky jako chřipka. Je to často profesní onemocnění (Greenwood, 2012, s.594; Bednář 1996, s. 455).

Genom viru vztekliny je tvořen asi 12 000 nukleotidy. Tato oblast obsahuje informace pro kódování celkem pěti proteinů. Těmito proteiny jsou nukleoprotein (N), fosfoprotein (P), protein matrix (M), glykoprotein (G) a polymerázový protein (L). Nukleoprotein, virální RNA polymeráza a fosfoprotein tvoří ribonukleoprotein (RNP). Protein matrix a glykoprotein jsou spojeny s lipidovým obalem. Tyto úseky mohou samovolně měnit svou délku, jak je naznačeno v tabulce 1 a obrázku 4, což bývá komplikace při diagnostice (Kiriwan 2021).

Infekce probíhá nejprve ve svalových buňkách. Na začátku je virus adsorbován hostitelskou buňkou. Oblast kódující protein G je navázána na buněčnou stěnu a pomocí pinocytózy vstoupí do cytoplazmy. Obal splyne s buněčnou membránou a změní se na neopouzdrěnou RNP, zde probíhá replikace viru. Nově vytvořené viriony odcházejí z buňky pomocí pučením cytoplazmatické membrány a získávají obal. Po té dále postupují do CNS přes nervová vlákna (Bednář 1996, s. 455; Kiriwan 2021).



Obrázek 4- Jednotlivé oblasti genomu viru Rhabdoviridae kódující proteiny (Rhabdoviridae, 2017)

Tabulka 1- Počet nukleotidů pro kódování proteinů v závislosti na druhu Lyssaviru (Greenwood 2012, str. 594)

Druhy Lyssaviru	Nukleoprotein (N)	Fosfoprotein (P)	Protein matrix (M)	Glykoprotein (G)	Polymerázový protein (L)
1	1353	894	609	1575	6428
2	1353	918	609	1569	6384
3	1353	897	609	1602	6384
4	1356	894	609	1575	6384
5	1356	897	609	1575	6384
6	1356	894	609	1575	6384
7	1353	894	609	1578–81	6384–87

3. Molekulární diagnostika – současnost

Pro diagnostiku RNA virů je v dnešní době využívána zejména RT – PCR (reverzně transkriptázová polymerázová řetězová reakce), která je založena na detekci virové informace, a její modifikace. Dále jsou využívány imunologické či imunochemické metody. Tyto metody zaznamenávají zejména přítomnost protilátek a virů v tělních tekutinách jako je krev, mozkomíšni mok (CSF)... Jednotlivá stanovení jsou dále rozvedena a popsána v jednotlivých podkapitolách této kapitoly.

3.1. Reverzně transkriptázová polymerázová řetězová reakce – RT PCR

RT PCR, nebo též reverse transcriptase PCR je založena na využití PCR. Metoda PCR (polymerase chain reaction) je široce využívána z důvodu uživatelské jednoduchosti reakce (v současnosti existují komerčně dostupné soupravy, kde se smíchá pouze vyšetřovaný vzorek s jedinou reakční komponentou). Dále je tato metoda velmi citlivá a její transfer nebývá složitý. Z těchto důvodů je PCR možné využívat i v laboratořích, které nejsou původně zaměřeny na molekulárně – biologické metody (Rapley, 2015, str. 16).

Reverse transcriptase PCR se používá zejména v případech, kdy se daná sekvence nachází v buňce ve velmi malém množství. Tato technika je vhodnější než např. imunochemické metody, které sledují tvorbu protilátek (Bartůňková, 2005). Také je tato metoda vhodná pro časný průkaz viru, kdy imunologické metody selhávají, právě kvůli nedostatku detekovatelného virového proteinu. Nebo též u stanovení specifických protilátek, z důvodu protilátkové produkce se značným časovým odstupem.

Princip RT – PCR spočívá v extrakci celkové RNA studovaného materiálu a jejich zkopírování in vitro do jednovláknové cDNA (komplementární DNA) pomocí reverzní transkriptázy (RT). Získané molekuly cDNA pak slouží jako templát pro PCR reakci, která probíhá díky páru specifických primerů cílové sekvence (Tagu, 2006, str. 105).

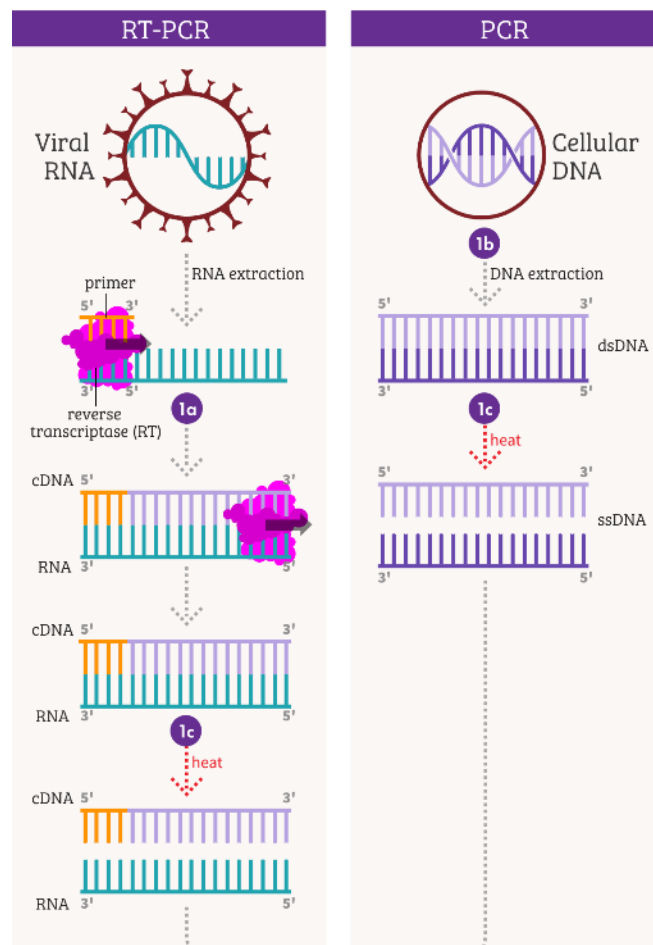
Samotná reakce PCR je založena na třech krocích definovaných časem a teplotou. Těmito kroky jsou denaturace za vysokých teplot, nasednutí (annealing) primeru a prodloužení za přítomnosti termostabilní DNA polymerázy (Rapley, 2015, str. 17; Johsi, 2010).

Zmíněnou polymerázou může být například Taq polymeráza, která zprostředkovává prodloužování DNA řetězce podle cDNA templátu ve směru 5'→3'. Taq polymeráza je izolovaná z termofilní bakterie *Thermus aquaticus*, z důvodu zachování její funkce i při vysokých teplotách (Rapley, 2015, str. 17; Maheaswari, 2016).

Primer je malá molekula, nejčastěji krátký oligonukleotidový fragment, který je komplementární k templátové DNA. Tato molekula je potřebná k zahájení syntézy makromolekuly DNA (Hniličková, 2019, str. 34; Vokurka, 2005; str. 735).

Tyto již dříve zmíněné tři kroky reakce PCR se cyklicky opakují. V laboratoři se k tomuto tzv. cyklování využívá termocykléru. Typická PCR reakce je složena ze 30–40 cyklů. Na konci PCR reakce je pomocí elektroforézy provedena vizualizace výsledného produktu (Rapley, 2015, str. 17; Hniličková, 2019, str. 34–35; Top-bio, 2023).

Reakce RT – PCR probíhá následovně (obrázek č. 5):



Obrázek 5- rozdílný průběh RT-PCR oproti PCR (Overview PCR, 2014)

Proces reverzní transkripce probíhá stejně jako PCR v termocykléru. Tento děj trvá asi 15 minut, při teplotě 55°C. Výsledným produktem je vytvoření komplementární DNA (cDNA). Následně probíhá PCR, která vede ke vzniku dsDNA (Surovcová, 2021, str. 24; Rapley, 2015, str. 21).

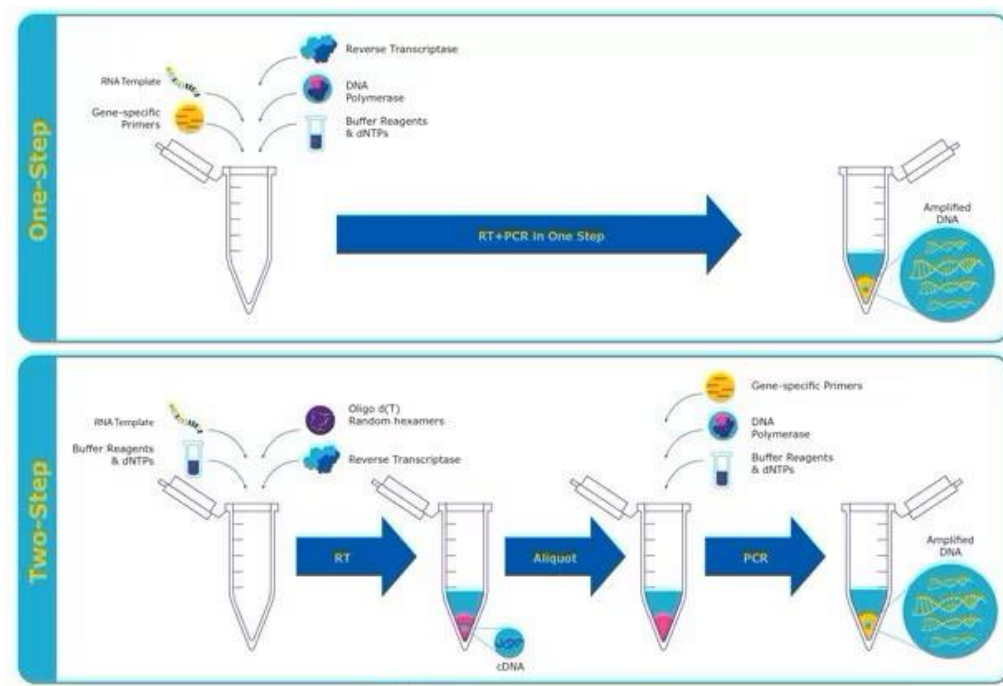
Použití mRNA při replikaci s sebou nese riziko nákazy z infekčního agens RNA virů s pozitivním smyslem vlákna, které je popsáno v první kapitole. Z tohoto důvodu byly pro detekci vytvořeny tzv. mini genomy. Vytvoření těchto genomů vede i ke zjednodušení procesu při replikaci vlákna. Těmto tzv. mini genomům chybí některé virově kódované proteiny. Pro replikaci však musí být dodána RdRp (virální RNA dependentní polymeráza). RdRp může být zakódována v mini genomu nebo mohou být dodány ve smyslu trans, což znamená např. pomocí buněčné linie, která stabilně prezentuje virové RdRp. Sekvence potřebné k přímé replikaci RNA jsou často poměrně jednoduché a lze je propojit prakticky se všemi RNA sekvencemi k řízení její replikace (Payne, 2017).

3.1.1. Jednokrová a dvoukrová RT – PCR

Na obrázku číslo 6 jsou znázorněny dva způsoby provedení RT – PCR. Tato metoda je používána buď jako jednokroková nebo dvoukroková. Výběr metody záleží na různých faktorech jako je například vhodnost metody pro analyzované vzorky, nebo například cena provedení. Jednokroková metoda zahrnuje přidání RT do stejné zkumavky, kde probíhá reakce PCR. Druhý způsob zahrnuje vytvoření cDNA nejprve pomocí samostatné reverzní transkripční reakce a poté přidání cDNA do PCR reakce.

Oba způsoby provedení mají své výhody a nevýhody. Výhodou jednokrokové RT-PCR v reálném čase je, rychlost na nastavení, menší peněžní nákladnost na použití a vyžadování menší manipulace se vzorky. Tím se snižuje počet chyb při pipetování, tedy i možnost kontaminace a dalších zdrojů chyb. U jednokrokové metody se používají genově specifické primery a RT i PCR probíhají v jedné reakční zkumavce. Z tohoto důvodu nemohou být amplifikovány další geny pro pozdější analýzu (Godard, 2005).

Hlavní výhodou dvoukrokové RT-PCR je to, že se používají náhodné hexamerní nebo oligo dT primery v RT reakci v samostatné zkumavce. To umožňuje schopnost převést všechny genetické informace ve vzorku RNA na cDNA, což umožňuje archivaci vzorků a možnost budoucího testování dalších genů z analyzovaného vzorku. Jak již bylo zmíněno v předchozím odstavci, je zde větší riziko vzniku chyb a kontaminace, díky opětovnému pipetování (Godard, 2005).



Obrázek 6-jedno-kroková a dvou-kroková reverzně transkriptázová PCR (RT – PCR, 2023)

3.1.1.1. Virová souprava CNS Flow Chip

Molekulární test (Viral CNS Flow Chip kit) slouží k detekci akutní meningitidy a encefalitidy způsobené osmi DNA/RNA viry jako je například již popsany lidský parechovirus a lidský enterovirus. Tato detekce je založena jednokrokové RT – PCR. Test je využíván zejména k odlišení virové infekce od bakteriální. A s tím související nasazení správné léčby (Pérez – Ruiz, 2018; DSS inspired by technology, 2023).

3.1.2. RT – qPCR

RT – qPCR znamená kvantitativně reverzně transkriptázové PCR v reálném čase (RT – qPCR). Metoda RT – qPCR slouží zejména ke kvantifikaci, zjišťování množství nebo průkazu virové nukleové kyseliny, případně ale i pro kvalitativní detekci viru (Hniličková, 2019, str. 34).

Molekulární diagnostika se posunula s vývojem kvantitativní PCR (qPCR). Tato metoda je oproti klasické PCR rychlejší a má nižší limit detekce. Rozdíl a také výhodou je možnost hned vidět, jak real-time reakce probíhá a její kvantifikace bez nutnosti manipulace s PCR produktem. U této metody se nejčastěji využívá fluorescenční detekce signálu, na rozdíl od klasické metody, kdy je produkt detekován na konci pomocí gelové elektroforézy, jak bylo již zmíněno v kapitole o klasické RT – PCR (Rapley, 2015, str. 23; Navarro, 2015).

U této metody stanovení je k měření amplifikace využita fluorescenční sonda např. SYBR green, která je navázána v konečném kroku reakce na dsDNA. V každém cyklu PCR je detekována fluorescence, jenž následuje po excitaci. Reakce s navázáním fluorescenčního

barviva SYBR green je nespecifická, tedy je zde nejistota. Nevíтанá je tvorba nespecifických produktů, např. dimerů. Z důvodu emitace fluorescenčního záření v přítomnosti kterékoliv dsDNA, pro ověření specifity může následovat vyhodnocení křivky tání (tzv. melting analýza), kdy je pomocí teploty tání referenčního amplikonu závislého na fluorescenci možno ověřit shodu teplot tání. Je nutno podotknout, že specifita qPCR využívající barvivo SYBR je jako u každé PCR metody dána primárně použitými primery (Rapley, 2015, str. 22; Hnilíčková, 2019, str. 36).

Kvantitativní PCR v reálném čase je nejčastěji využívána při detekci virové nákazy, s nízkou koncentrací v mozkomíšním moku a séru. Její přesnost, citlivost a opakovatelnost stále nejsou uspokojivé pro rutinní používání. Tato metoda qPCR je citlivá na inhibitory, dále se spoléhá na standardní kalibrační látky, které jsou rozdílné mezi jednotlivými laboratořemi. To vede k odlišným kvalitativním a kvantitativním výsledkům. Z těchto důvodů je zde riziko špatného posouzení virové infekce a pozdní nasazení antivirové terapie. Dalším problémem je velké množství pravděpodobných virových infekcí CNS, které nejsou skutečně potvrzeny nebo již proběhly (Zhu, 2022).

3.1.3. Kapková digitální PCR (ddPCR)

Speciální aplikací je digitální PCR, resp. digitální RT-qPCR. Někdy také označována jako kapková digitální PCR (digital droplet PCR, ddPCR). Metoda spočívá v rozdělení vzorku pomocí malých kapiček olejové emulze, kdy v každé kapičce je maximálně jedna kopie nukleové kyseliny. Jednotlivé kapičky jsou podrobeny PCR. PCR reakce je poté interpretována jako pozitivní nebo negativní výsledek. Výsledek je kvantitativní, kvůli způsobu vyhodnocení, které je založeno na Poissonově statistice. Výhodou oproti kvantitativní PCR je, že není nutné používat standardní materiál, metoda je tzv. absolutní – bez nutnosti kalibrace (Zhu, 2022; Rapley, 2015, str. 21; Godard, 2005).

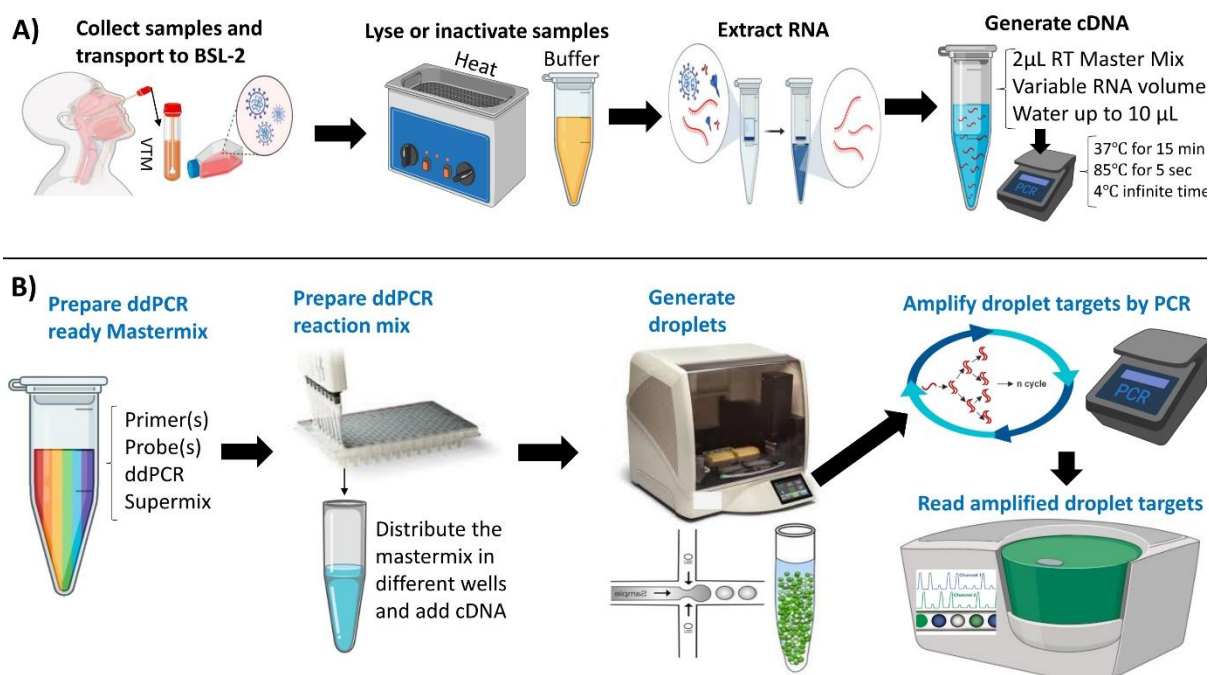
Metoda digitální kapkové PCR byla díky svým výhodám, tedy vyšší přesnosti a citlivějšího měření virového onemocnění, využívána již pro diagnostiku HIV a žloutenky typu B a C, které byly detekovány v CSF. Podobně jako u qPCR lze i u ddPCR vyvinout multiplexní testy, které snižují náklady, pracnost, čas, spotřebu vzorků, a i nepřesnost v pipetování (Zhu, 2022).

3.1.3.1. Multiplexní ddPCR test

Multiplexní ddPCR testy vychází z tzv. termínu multiplexování vyššího řádu, které popisuje schopnost dPCR přesného měření více cílů v jedné souběžné reakci s více specifickými primery, v případě kvadruplexové reakce, to jsou čtyři. V klinické praxi byl tento test použit detekci RNA viru jako je chřipka a SARS-CoV-2. Což je zobrazeno na obrázku č. 7. Touto

metodou lze analyzovat rozsah od 2 do 2000 kopií nukleových kyselin na reakci, tedy vzorku, kdy pro reakci stačí kapičku v řádu nano-litrů (Zhu, 2022).

V popisované metodě jsou využity velice specifické primery v páru a fluorochromem značené sondy, které vychází z již v minulosti popsáných sond na herpes simplex virus 1,2 (HSV1,2) a parechoviry (HPeV). Použité primery jsou zaměřeny na UTR oblast. Dále je v reakci použit templát s vhodnou koncentrací a pozitivní a negativní kontroly (Zhu, 2022).

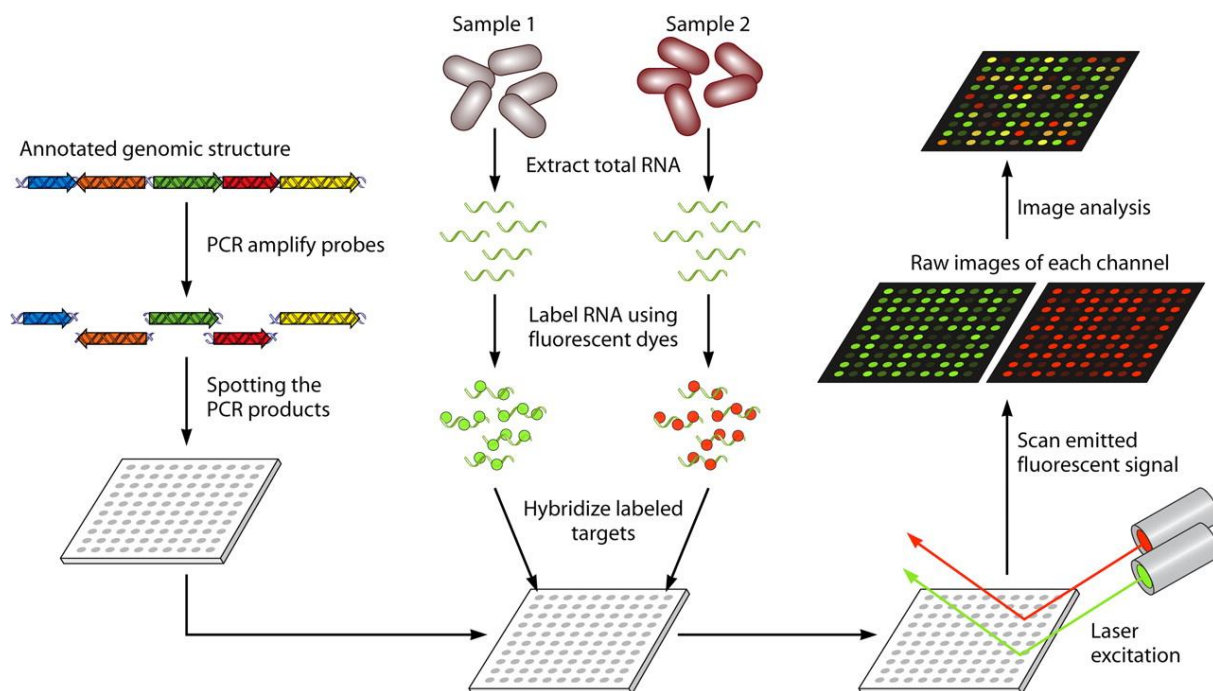


Obrázek 7- Příprava a zpracování vzorků pro tzv. digitální PCR (ddPCR). Reakce probíhají v malých kapičkách emulze – droplets, kdy je vyhodnocován signál v každé jednotlivé kapičce (Nyaruaba, 2021)

3.2. DNA mikročipy a mikroarray

Technika DNA mikročipů byla vyvinuta v 90. letech a v dnešní době je standardním nástrojem pro výzkum v molekulárně – biologických a klinických laboratořích. Technologie DNA čipů je řazena do multidisciplinárního stanovení. Mikročipy jsou spojeny s mikro – elektronikou pomocí chemických a nukleových kyselin. Diagnostika se u této metody zabývá analýzou obrazu a bioinformatikou (Tagu, 2005, str. 77).

Na obrázku číslo 7 je znázorněn postup pro zpracování tištěných mikročipů. Na začátku je amplifikace sond pomocí PCR, nebo syntéza s oligonukleotidy, a následně je amplifikát nanášen na podložní sklíčko. Na obrázku jsou zobrazeny dva vzorky, které mají být porovnány. Vzorky jsou nejprve podrobeny extrakci RNA, potom přepisu do cDNA a současně diferenciatnímu fluorescenčnímu značení (každý vzorek jinou barvou). Poté následuje hybridizace značených cDNA na čipu. Hybridizované molekuly jsou detekovány, což umožňuje fluorescenční skenování pro poskytnutí dat pro analýzu (Miller, 2009).



Obrázek 8- Pracovní postup přípravy tištěných mikročipů a zpracování vzorků, kdy jeden ze vzorků je značen zeleně a druhý červeně. Pokud je na spotu s cílovou sekvencí detekován pouze jeden vzorek projeví se zelenou nebo červenou barvou. Pokud jsou současně detekovány oba, projeví se barvou žlutou. Toto uspořádání umožňuje současnou detekci dvou vzorků (testovaného a referenčního) (Miller, 2009).

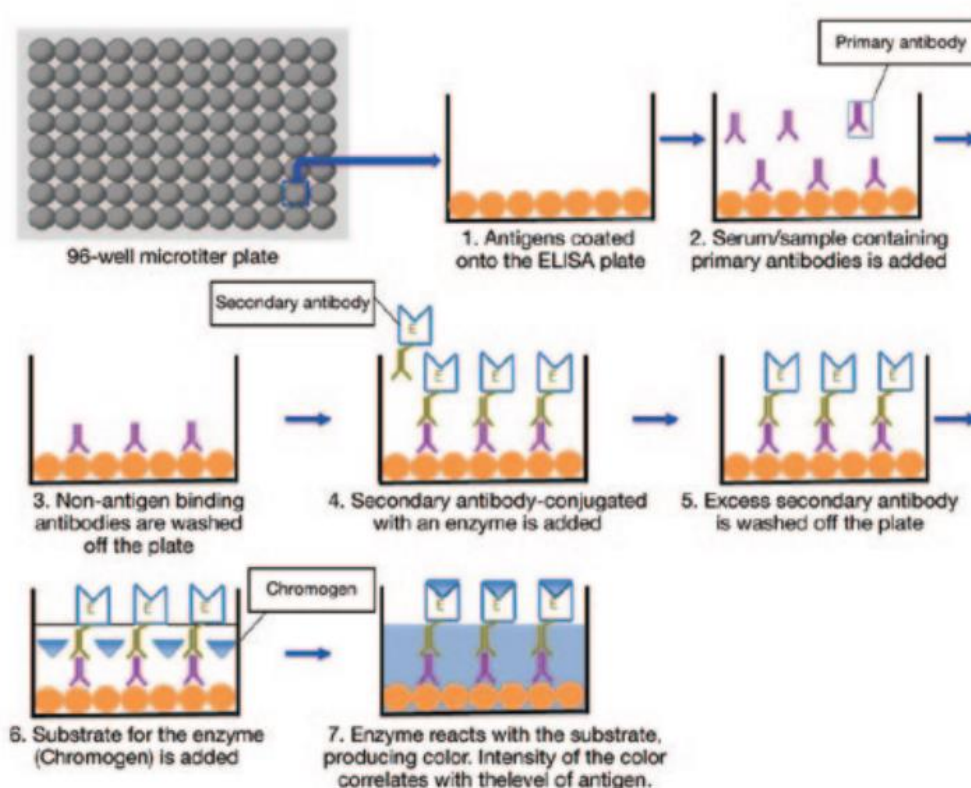
3.3. Imunochemické metody

Stanovení imunochemickými metodami patří mezi tzv. zlaté standardy mikrobiologického a virologického stanovení. Cena těchto stanovení závisí na použité protilátce a jejich následné výrobě. Čím složitější proces výroby a specifitější protilátka je, tím je cena vyšší. Průkaz infekcí je založen na detekci imunoglobulinových protilátek, vytvořených v těle po průniku viru do organismu, s antigenem. Analyzována může být protilátka nebo i antigen. Odečtení reakce probíhá podle typu reakce nefelometricky, turbidimetricky a nebo spektrofotometricky (Bartůňková, 2005, str. 53).

3.3.1. Enzymo – analytické metody

Enzymo – analytické metody jsou odvozeny od radioimunologických metod, které byli používány dříve. Od těchto stanovení se v dnešní době upouští, kvůli manipulaci s radioaktivními látkami, speciálním požadavkům na pracovníky a prostory, kde se s těmito látkami pracuje. Je nutno podotknout, že radioimunologické metody jsou stále využívány např. pro stanovení hormonů štítné žlázy. Z důvodu radioaktivity byl radioizotop nahrazen enzymem, čímž vznikly moderní metody EIA (enzymatická imunoanalýza) a ELISA (enzymem vázaný imunosorbentní test) (Gan, 2013; Bartůňková, 2005, str. 53).

EIA/ELISA využívají základní imunologický koncept antigenu, a to vazbu na specifickou protilátku, což umožňuje detekci velmi specifických antigenů. Detekovány jsou vzorky s malým množstvím antigenů, jako jsou proteiny, peptidy, hormony nebo protilátky, ve vzorku tekutiny. EIA a ELISA k tomu využívají enzymaticky značené antigeny a protilátky k detekci biologických molekul, přičemž nejčastěji používané enzymy jsou alkalická fosfatáza, křenová peroxidáza a glukózooxidáza. Antigen v kapalně fázi je imobilizován, což probíhá obvykle ve formě 96 jamkové mikrotitrační destičky. Imobilizovaný antigen je navázán na specifickou protilátkou, která je následně detekována pomocí sekundární protilátky, vázané na enzym (Gan, 2013).



Obrázek 9- Schématický obrázek ELISA metody, které je následující – reakce antigenu s primární protilátkou, reakce sekundární protilátky s chromogenem, barevná reakce (Gan, 2013).

Průběh ELISA metody k detekci antigenu v daném vzorku je znázorněn na obrázku číslo 8 a probíhá následovně:

1. Antigen (v kapalně fázi) je přidán do jamek, kde ulpí na stěnách.
2. Primární protilátka se specificky váže k antigenu.
3. Přidá se sekundární protilátka vázaná enzymem.
4. Sekundární protilátka reaguje s chromogenem,
5. To způsobí barevnou změnu a kvantitativně nebo kvalitativní detekci antigenu

3.3.2. Imunochromatografické testy (ICT)

Imunochromatografické testy jsou postaveny na nekovalentních interakcích stanoveného analytu a protilátek. Tyto testy se využívají zejména k detekci nízkomolekulárních a vysokomolekulárních látek. Imunochromatografické metody poskytují rychlou a levnou detekci, ke které využívají malé množství kapalného vzorku. Test se skládá ze stripového proužku a dalších funkčních komponent, které se podílí na správné aplikaci vzorku a celkového provedení testu včetně odečtení výsledků. Testovací proužek zahrnuje membránu a tři podložky vyrobené z porézních materiálů (Boudný, 2018, str. 14).

Mezi nevýhody ICT a důvody, proč se testy nepoužívají pro viry působící na CNS, patří nízká citlivost ve srovnání s jinými diagnostickými metodami, jako je např. již zmíněné PCR nebo EIA metody. Různorodost sérotypů a antigenních variant virů, které byly popsány ve druhé kapitole. Způsob odebrání vzorku pro diagnózu, kdy je využívána zejména CSF a s tím související malé množství této tekutiny. A posledním důvodem je časová náročnost zpracování a výroby specifických protilátek používaných pro diagnostiku (Blyth, 2011; Hurych, 2021, str. 237).

4. Využití molekulární diagnostika – budoucnost

Diagnostika virů je stále zkoumanou a vyvíjející se vědní disciplínou, z již popsaných důvodů ve druhé a třetí kapitole. V této kapitole jsou popsány dvě metody stanovení, které se využily pro stanovení onemocnění SARS – CoV – 2 a dalších onemocnění způsobených zejména RNA virem.

4.1. Identifikace virů pomocí nanotechnologií

Nanotechnologické využití je v posledním desetiletí na vzestupu. Díky tomu byla vyvinuta jedna z mnoha nanotechnologických aplikací v biomedicínské a farmaceutické oblasti, což vedlo k účinnějším a levnějším diagnostickým přístrojům a také k bezpečnějším a účinnějším lékům (Jonatas, 2021).

Pokroky v digitálních zdravotnických systémech dnes usnadňují citlivé a přenosné detekční technologie. S tím souvisí i již dříve zmíněná nanotechnologická aplikace a s tím spojený vývoj biosenzorů, které jsou schopny detekovat infekci ve včasném stádiu. Biosenzory se oproti jiným metodám vyznačují snadnou přípravou vzorku, nízkými náklady a vysokou citlivostí (Jonatas, 2021).

4.1.1. DNA nanonávny – nanobait

Pro diagnostiku viru SARS – CoV – 2, který je také řazen do RNA virů, byla vyvinuta metoda pro identifikaci virů pomocí nanonávny nebo též nanobait. Nanonávny byly nejdříve využity pro identifikaci DNA virů. Tato technologie spočívá v navázání konkrétní nanonávny na virus a následné detekci. Přístup nanonávny do viru závisí na konkrétní cílové části (Bošković, 2023).

4.2. CRISPR - Cas

CRISPR je zkratka pro Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats. Metoda CRISPR je nástrojem genomového inženýrství, které slouží zejména k usnadnění nálezu místa specifické mutace, jako je např. delece a inserce (Shui, 2016).

Systém CRISPR byl poprvé objeven u bakterií jako tzv. adaptivní imunitní systém proti fágovým nálezům, ale i plasmidům. Tento tzv. paměťový systém může zničit DNA nebo RNA, pokud dojde k reinfekci u stejné bakterie, nebo u nových jedinců vzniklých z bakterie. Technologie CRISPR – Cas u in vivo a vitro modelů umožňuje účinný způsob indukce úplného vyřazení genové exprese, tedy potlačení produkce proteinu (Shui, 2016; Kirby, 2021).

Kromě toho byly k cílení na virové genomy také použity přístupy založené na CRISPR přímo s cílem virové eliminace. Tato metoda byla využita např. u viru hepatitidy B (HBV) a viru HIV.

Tento způsob diagnostiky je úspěšný v obou způsobech, in vivo a in vitro. Tato metoda stanovení je ve fázi vývoje. V důsledku toho je CRISPR vysoce používaným nástrojem ve virologii k pochopení molekul interakce mezi viry a jejich hostitelem (Kirby, 2021).

ZÁVĚR

V předložené práci jsem se zabývala RNA viry a jejich detekcí. RNA viry jsou organismy, které jsou schopné napadnout i CNS. Včasná diagnostika virové infekce je velmi důležitá, pro rychlé zahájení terapie.

V případě virů, včetně RNA virů, se velmi osvědčily metody detekce nukleových kyselin, které jsou schopné detekovat přítomnost viru již ve velmi malých množstvích. O tom jsme se přesvědčili v posledních letech, kdy těmto metodám byl kladen vysoký důraz, hlavně ve spojení s detekcí viru SARS – CoV-2. Tyto metody jsou spolehlivé, citlivé a relativně dobře dostupné. Imunodetekční metody detekující protilátky, prokazující infekci, jsou schopny virus detekovat až s časovým zpožděním několika dní až týdnů v porovnání s metodami molekulárně biologickými.

Na základě rešerše jsem zjistila, že imunochemické metody jsou pro diagnostiku virů využívány více než metody molekulárně – biologické, a to i přes výše uvedené důvody. Hojně využívána je metoda ELISA. Pro tuto detekci jsou používány specifické protilátky, které se vážou na antigenní struktury specifického viru, což umožňuje identifikaci konkrétního viru. Důvodem je nejspíš jednoduchost provedení, kdy nejsou potřeba specializované laboratorní techniky.

Určitou nevýhodou molekulárně – diagnostických metod oproti imunochemickým je průkaz genetického materiálu, který může přetrvávat i po vymizení infekce, to ovšem platí pouze v případech, kdy není správně navrhnutá a provedena detekce virového mRNA, což jsou 2 reakce, které komplikují stanovení. Imunochemické metody jsou zaměřeny na detekci přítomnosti antigenu, poskytují tedy přímou indikaci probíhající infekce.

Výhody spojené s použitím molekulárně – biologických metod jsou identifikace virálního genetického materiálu v raných stádiích, která je u onemocnění CNS velmi podstatná. Další výhodou je již zmíněná detekce nízkých hladin viru.

Každá metoda má své specifické vlastnosti a použití a volba mezi imunochemickými a molekulárně – biologickými metodami závisí na konkrétních požadavcích diagnostického stanovení.

POUŽITÁ LITERATURA

ALBERTS, Bruce, Alexander JOHNSON, Julian LEWIS, Martin RAFF, Keith ROBERTS a Peter WALTER, 2002. *Molecular Biology of cell* [online]. New York: Garland Science, 4. vydání [cit. 2023-05-02]. ISBN 10 0815332181. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26818/figure/A1634/>

ANDREANI, Julien, Julien LUPO, Benjamin NEMOZ, Aurelie TRUFFOT, Sylvie LARRAT, Patrice MORAND a Raphael GERMI, 2022. Use of RT-PCR thermocycling program for the quantification of DNA viruses in a single run with RNA viruses: Example of Altona RealStar (R) HSV or VZV PCR kits. *Infectious diseases now*. 52(8), 453-455. ISSN 2666-9927. Dostupné z: doi:10.1016/j.idnow.2022.09.005

BAGGEN, Jim, Hendrik Jan THIBAUT, Jeroen R. P. M. STRATING a Frank J. M. van KUPPEVELD, 2018. The life cycle of non-polio enteroviruses and how to target it. *Nature reviews Microbiology*. 2018(16), 368-381. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1038/s41579-018-0005-4>

BARTUŇKOVÁ, Jiřina a Milan PAULÍK. *Vyšetřovací metody v imunologii*. Praha: Grada, 2005. ISBN 80-247-0691-1.

BEDNÁŘ, Marek, Věra FRANĚKOVÁ, Jiří SCHINDLER, Andrej SOUČEK a Jiří VÁVRA. *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie*. 2. vydání. Praha: Marvil, 1996. 558 s.

BLYTH, Christopher C, Robert BOOY a Dominic E DWYER, 2011. Point of care testing: diagnosis outside the virology laboratory. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.). 2011(665), 415-433. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-60761-817-1_22

BOŠKOVIĆ, Filip, Jinbo ZHU, Ran TIVONY, et al., 2023. Současná identifikace virů a virových variant pomocí programovatelné DNA nanonávady. *Nature nanotechnology*. 2023(18), 290-298. ISSN 748-3395. Dostupné z: doi:doi.org/10.1038/s41565-022-01287-x

BOUDNÝ, Petr, 2018. *Imunochromatografické metody pro rychlý průkaz antigenů nebo specifických protilátek*. Pardubice. Bakalářská práce. Univerzita Pardubice. Vedoucí práce Zuzana Bílková.

BRÁBOREC, Vojtěch, 2012. *Regulace signální dráhy ERK prostřednictvím scaffold proteinu RACK*. Praha. Diplomová práce. Univerzita Karlova. Vedoucí práce Tomáš Vomastek

CELER, Vladimír. *Obecná virologie*. Hradec Králové: Nucleus HK, 2010. ISBN 978-80-87009-70-3. 143 s.

CONWAY, Michael J., Tonya M. COLPITTS a Erol FIKRIG, 2014. Role of the Vector in Arbovirus Transmission. In: *Annual review* [online]. Maryland: Review in Advance, 2014 [cit. 2022-12-23]. Dostupné z: <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-virology-031413-085513>

DSS inspired by technology: Viral CNS flow Chip, 2023. *Dssimage.com* [online]. Indie [cit. 2023-06-01]. Dostupné z: <https://www.dssimage.com/viral-cns-flow-chip.html#readMoreHPV>

DUARTE, Jonatas Lobato, Leonardo Delello Di Filippo, Leonardo Delello DI FILIPPO, Victor Hugo SOUSA ARAUJO, Anna Eliza Maciel de FARIA MOTA OLIVEIRA, Jennifer Thayanne CAVALCANTE DE ARAÚJO, Flávia Benini da ROCHA SILVA a Mara Cristina PINTO, 2021. Nanotechnology as a tool for detection and treatment of arbovirus infections. *Acta Tropica* [online]. 2021(216), 105848 [cit. 2023-06-02]. ISSN 0001-706X. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2021.105848>

FORMAN, Michael, Alexandra VALSAMAKIS a Baoming LIU, 2019. Optimization and evaluation of a novel real-time RT-PCR test for detection of parechovirus in cerebrospinal fluid. *Journal of Virological Method.* 2019(272). ISSN 0166-0934. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2019.113690>

GAN, Stephanie D. a Kruti R. PATEL, 2013. Enzyme Immunoassay and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Journal of Investigative Dermatology.* 133(e12). Dostupné z: doi:[10.1038/jid.2013.287](https://doi.org/10.1038/jid.2013.287)

GODARD, Michael a Michael WACKER. 2005. Analysis of one-step and two-step real-time RT-PCR using SuperScript III. *J Biomol Tech* [online]. 2005, 16(3), 266-271 [cit. 2023-05-02]. Dostupné z: doi:PMID: 16461951

GREENWOOD, David, ed. *Medical microbiology: a guide to microbial infections : pathogenesis, immunity, laboratory investigation and control.* 20. vydání. Edinburgh: Churchill Livingstone, c2012. ISBN 978-0-7020-4089-4.

GREENWOOD, David, Richard C. B. SLACK, John F. PEUTHERER a Jiří SCHINDLER. *Lékařská mikrobiologie: přehled infekčních onemocnění: patogeneze, imunita, laboratorní diagnostika a epidemiologie.* Praha: Grada, 1999. ISBN 80-7169-365-0.

HENNECHART-COLLETTE, Catherine, Gaëlle GONZALEZ, Lisa FOURNIOL, Audrey FRAISSE, Cécile BECK a Sara MOUTAILLER et al 2022. Method for tick-borne encephalitis virus detection in raw milk products. *Food microbiology* [online]. (104), 6 [cit. 2022-12-24]. ISSN 0740-0020. Dostupné z: doi:[org/10.1016/j.fm.2022.104003](https://doi.org/10.1016/j.fm.2022.104003)

- HNILIČKOVÁ, Iveta, 2019. Detekce cizorodé DNA v materiálech pro genovou terapii. Pardubice. Diplomová práce. Univerzita Pardubice. Vedoucí práce Vojtěch Vejvoda.
- HURYCH, Jakub a Roman ŠTÍCHA. Lékařská mikrobiologie: repetitorium. 3. vydání. Praha: Stanislav Juhaňák - Triton, 2021. ISBN 978-80-7553-976-2.
- CHAUHAN, Nar Singh, Tarun KUMAR, Pinki SHARMA, Khusboo GOYAL a MONIKA, 2020. RNA beyond humans. V: *Rna-Based Regulation in Human Health and Disease*. 19. Indie: Academic press, s. 117 -138. ISBN 9780128171936.
- CHEN, Bo-Shiun, Hou-Chen LEE, Kuo-Ming LEE, Yu-Nong GONG a Shin-Ru SHIH, 2020. Enterovirus and Encephalitis. *Frontiers in Microbiology* [online]. 20. února 2020, **11**(261), 1-15 [cit. 2023-03-19]. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi.org/10.3389/fmicb.2020.00261
- CHMIELEWSKA, Alicja M, Maria GÓMEZ-HERRANZ, Paulina GACH, et al., 2022. The Role of IFITM Proteins in Tick-Borne Encephalitis Virus Infection. *Journal of Virology*. 96(1). ISSN 0022-538X. Dostupné z: [doi:10.1128/JVI.01130-21](https://doi.org/10.1128/JVI.01130-21)
- Immunoassays for the 80s, 1981. In: BOLTON, A. E. Radioimmunoassay [online]. 1. Dordrecht: Springer, s. 69 -83 [cit. 2023-04-18]. ISBN 978-94-009-8054-9. Dostupné z: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-009-8054-9_6
- JOSHI, Mohini a J. D. DESHPANDE. Polymerase chain reaction: methods, principles and application. *International Journal of Biomedical Research*. 2010, (5), 81-97.
- JUAREZ, Moises Leon, Julio GARCÍA-CORDERO, Mauricio COMAS-GARCIA, Leticia CEDILLO – BARRÓN, José GONZÁLEZ-SANTAMARÍA a Gaurav SHRIVASTAVA, 2022. Editorial: Cellular, molecular and immunological aspects in arboviruses infection. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology: Virus and Host*. 2022(12). Dostupné z: [doi:https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.973953](https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.973953)
- KIRBY, Emily N., Byron SHUE, Paul Q. THOMAS a Michael R. BEARD, 2021. CRISPR Tackles Emerging Viral Pathogens. *Viruses*. 2021(13). Dostupné z: [doi:10.3390/v13112157](https://doi.org/10.3390/v13112157)
- KIRIWAN, Duangnapa a Kiattawee CHOOWONGKOMON, 2021. In silico structural elucidation of the rabies RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) toward the identification of potential rabies virus inhibitors. *Journal of Molecular Modeling*. 27(183), 183-184. Dostupné z: [doi:org/10.1007/s00894-021-04798-x](https://doi.org/10.1007/s00894-021-04798-x)

- MAHEASWARI, Rajendran, Jaishree Tukaram KSHIRSAGAR a Nallasivam LAVANYA, 2016. Polymerase chain reaction: A molecular diagnostic tool in periodontology. *Journal of Indian Society of Periodontology*. 20(2), 128-135. Dostupné z: doi:10.4103/0972-124X.176391
- MORI, Isamu, Yukihiro NISHIYAMA, Takashi YOKOCHI a Yoshinobu KIMURA, 2005. Olfactory transmission of neurotropic viruses. *Journal of NeuroVirology*. (11), 129–137. ISSN 1355-0284 print / 1538-2443 online. Dostupné z: doi:10.1080/13550280590922793
- NAVARRO, E., M., J. CASTAÑO a J. SOLERA, 2015. Real-time PCR detection chemistry. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2015(439), 231-250. Dostupné z: doi:10.1016/j.cca.2014.10.017.
- PATHANIA, Shelly, Ravindra K. RAWAL a Pankaj KUMAR SINGH, 2022. RdRp (RNA-dependent RNA polymerase): A key target providing anti-virals for the management of various viral diseases. *Journal of Molecular Structure*. 2022(1250). ISSN 0022-2860. Dostupné z: doi:org/10.1016/j.molstruc.2021.131756
- PAYNE, Susane, 2017. Introduction to RNA viruses. In: *Viruses* [online]. Texas: Texas A&M University, s. 97-105 [cit. 2023-02-08]. ISBN 9780128031094. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128031094000106>
- PÉREZ-RUIZ, Mercedes, José María NAVARRO-MARÍ, Irene PEDROSA-CORRAL, Sara SANBONMATSU-GÁMEZ a Cristina GÓMEZ-CAMARASA, 2018. Analytical validation of viral CNS Flow Chip kit for detection of acute meningitis and encephalitis. *Journal of Virological Methods* [online]. 2018(259), 54-59 [cit. 2023-06-01]. ISSN 0166-0934. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2018.06.006>
- RAPLEY, Ralph a David WHITEHOUSE, ed. *Molecular biology and biotechnology*. 6th edition. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2015. ISBN 978-1-84973-795-1.
- RICCARDI, Niccolò, Roberta Maria ANTONELLO AND, Roberto LUZZATI, and Joanna ZAJKOWSKA, and Stefano DI BELLA a Daniele Roberto GIACOBBE, 2019. Tick-borne encephalitis in Europe: a brief update on epidemiology, diagnosis, prevention, and treatment. *European Journal of Internal Medicine*. 2019(62), 1-6. ISSN 0953-6205. Dostupné z: doi:org/10.1016/j.ejim.2019.01.004
- ROIZMAN, Bernard, 1996. 42. kapitola – Multiplication. In: BARON, Samuel. *Medical Microbiology*. 4. Texas: Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston, s. 1-51. ISBN -10: 0-9631172-1-1.

- SHUI, Bing, Liz Hernandez MATIAS, Yi GUO a Ying PENG, 2016. The Rise of CRISPR/Cas for Genome Editing in Stem Cells. Hindawi Publishing Corporation: tem Cells International. USA, 2016, 1-17. Dostupné z: doi:org/10.1155/2016/8140168
- Schoch CL, a spol. NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. Database (Oxford). 2020: [baaa062](#). PubMed: [32761142](#) PMC: [PMC7408187](#)
- SUROVCOVÁ, Michaela, 2021. Možnosti detekce SARS-CoV-2 viru pomocí metody RT-qPCR. Pardubice. Bakalářská práce. Univerzita Pardubice. Vedoucí práce Barbora Jankovičová.
- SWANSON, Phillip A a Dorian B MCGAVERN, 2015. Viral diseases of the central nervous system: Current Opinion in Virology, Volume 11. *Viral pathogenesis Preventive and therapeutic vaccines*. 2015(11), 44-54. ISSN 1879-6257. Dostupné z: doi:org/10.1016/j.coviro.2014.12.009.
- TAGU, D. a C. MOUSSARD. Techniques for molecular biology. Enfield: Science Publishers, c2006. ISBN 1-57808-361-3.
- Top-Bio [online], Taq DNA polymeráza, [cit. 2023-17-5]. Dostupné z: <http://www.top-bio.cz/dna-polymerazy-a-pufry-13.html?taq-dna-polymeraza>
- VOKURKA, Martin a Jan HUGO. Velký lékařský slovník. 5., aktualiz. vyd. Praha: Maxdorf, c2005. ISBN 80-7345-058-5.
- WALKER, T. Stuart. Microbiology. Philadelphia: Saunders, 1998. Saunders text and review series. ISBN 0-7216-4641-7.
- WANG, Yan, Xuping XIE a Pei-Yong SHI, 2022. Flavivirus NS4B protein: Structure, function, and antiviral discovery. Antiviral Research [online]. 2022, (207) [cit. 2022-12-23]. ISSN 0166-3542. Dostupné z: doi: org/10.1016/j.antiviral.2022.105423
- WU, Jiqin, Weichi LIU a Peng GONG, 2015. A Structural Overview of RNA-Dependent RNA Polymerases from the Flaviviridae Family. International Journal of Molecular Sciences. 2015(16), 12944–12957. Dostupné z: doi:10.3390/ijms160612943
- ZHU, Xunhua, Jianyue SUN, Pengcheng LIU, et al., 2022. Development of a multiplex droplet digital PCR assay for detection of enterovirus, parechovirus, herpes simplex virus 1 and 2 simultaneously for diagnosis of viral CNS infections. Virology journal. 19(70). Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1186/s12985-022-01798-y

ZDROJE OBRÁZKŮ

CONWAY, Michael J., Tonya M. COLPITTS a Erol FIKRIG, 2014. Role of the Vector in Arbovirus Transmission. In: *Annual review* [online]. Maryland: Review in Advance, 2014 [cit. 2022-12-23]. Dostupné z: <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-virology-031413-085513> [obrázek]

GAN, Stephanie D. a Kruti R. PATEL, 2013. Enzyme Immunoassay and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Journal of Investigative Dermatology*. 133(e12). Dostupné z: doi:10.1038/jid.2013.287 [obrázek]

MILLER, Melissa B. a Yi-Wei TANG, 2009. Basic Concepts of Microarrays and Potential Applications in Clinical Microbiology. *CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS*. 19(10), 611-633. Dostupné z: doi:10.1128/CMR.00019-09 [obrázek]

NYARUABA, Raphael, Caroline MUEMA, Elishiba MUTURI, et al., 2021. Two-Step Reverse Transcription Droplet Digital PCR Protocols for SARS-CoV-2 Detection and Quantification. In: *JoVE* [online]. Čína: *JoVE* [cit. 2023-06-05]. Dostupné z: <https://www.jove.com/t/62295/two-step-reverse-transcription-droplet-digital-pcr-protocols-for-sars> [obrázek]

Overview of PCR and RT-PCR, 2014. In: *Omega Optical* [online]. USA: Omega optical, 2014 [cit. 2023-04-11]. Dostupné z: https://www.omegafilters.com/life_science/PCR_and_RT-PCR_overview [obrázek]

PATHANIA, Shelly, Ravindra K. RAWAL a Pankaj KUMAR SINGH, 2022. RdRp (RNA-dependent RNA polymerase): A key target providing anti-virals for the management of various viral diseases. *Journal of Molecular Structure*. 1250(2022). ISSN 0022-2860. Dostupné z: doi.org/10.1016/j.molstruc.2021.131756 [obrázek]

Rhabdoviridae: Genome, 2017. In: *ViralZone* [online]. Swiss Institute of Bioinformatic: NCBI [cit. 2023-02-20]. Dostupné z: <https://viralzone.expasy.org/2> [obrázek]

RT-qPCR – Quantitative Reverse Transcription PCR, 2023. In: *Merck KGaA* [online]. Německo: Merck [cit. 2023-03-30]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/technical-documents/technical-article/genomics/qpcr/rt-qpcr> [obrázek]

TE VELTHUIS, Aartjan J.W., 2014. Common and unique features of viral RNA-dependent polymerases. *Cell. Mol. Life Sci*. 71(22), 4403-4420. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1695-z> [obrázek]