

Vytvořil:  
SÚJCHBO, v.v.i.

Certifikovaná metodika

Označení metodiky:  
B2/MOLB/050

**Průkaz přítomnosti genetického materiálu viru *Chikungunya* pro potřeby kontroly zákazu biologických zbraní pomocí real time PCR**

**Ing. Karel Bílek, Ph.D.; Mgr. Jiřina Procházková, Ph.D.;**

**prom. biol. Oldřich Kubíček, CSc.**

Realizační výstup projektu MV ČR „Výzkum moderních metod detekce a identifikace nebezpečných CBRN látek a materiálů, metod snížení jejich nebezpečnosti a dekontaminace; výzkum moderních prostředků ochrany osob a prvků kritické infrastruktury“ číslo VF20112015013“.

Oponenti: doc. RNDr. Vladislava Růžičková, CSc.  
Mgr. Martin Hubálek, Ph.D.

prosinec 2012

## Obsah

1. CÍL METODIKY .....	3
2. VLASTNÍ POPIS METODIKY .....	3
2.1 Charakteristika viru <i>Chikungunya</i> .....	3
2.2 Laboratorní diagnostika viru <i>Chikungunya</i> .....	4
2.3 Vlastní metoda .....	5
2.3.1 Referenční vzorek viru <i>Chikungunya</i> .....	5
2.3.2 Izolace RNA ze vzorku.....	5
2.3.3 Reverzní transkripce .....	6
2.3.4 qPCR.....	6
2.3.5 Pracovní postup a opatření pro manipulaci s materiálem a kitem.....	7
2.3.6 Vyhodnocení analýzy .....	8
3. INOVAČNÍ ASPEKTY, NOVOST POSTUPŮ.....	13
4. POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY .....	14
5. POUŽITÁ LITERATURA .....	14

## 1. CÍL METODIKY

Hlavním cílem metodiky je poskytnout zejména inspektorům Státního úřadu pro jadernou bezpečnost (SÚJB) vhodnou metodu pro průkaz přítomnosti genetického materiálu viru *Chikungunya* (dále jen *CHIKV*) ve vzorcích získaných při kontrole dodržování zákazu biologických zbraní.

Metodika se cíleně zaměřuje na:

- možnost detekce a identifikace *CHIKV* např. v neznámých terénních vzorcích;
- použitelnost pro široký rozsah vzorků;
- rychlou analýzu s jasnou interpretací výsledků pro zaškolený personál;
- možnost ověření positivity reakce sekvenací amplifikačních produktů (v případě nejasných výsledků primárního vyšetření).

## 2. VLASTNÍ POPIS METODIKY

### 2.1 Charakteristika viru *Chikungunya*

*CHIKV* je taxonomicky zařazen do rodu *Alphavirus*, čeledi *Togaviridae*. Zástupci tohoto rodu náleží zejména do skupiny arbovirů tj. virů přenášených členovci. Strukturně jsou viry čeledi *Togaviridae* charakterizovány jako malé obalené částice o velikosti 40-70 nm a jejich virová RNA se skládá z jednořetězcové RNA pozitivní orientace tzv. ss(+)-RNA.

Replikační cyklus rodu probíhá poměrně krátce, cytopatické změny lze pozorovat jen cca 24 hodin. Viriony *CHIKV* jsou přenášeny komáry (skupina virů Semliki forest), kde dochází k jejich pomnožení ve slinných žlázách a žaludku. Komáři pak virus deponují do kůže, kde se viry pomocí glykoproteinového komplexu adsorbují na buněčný povrch. Následuje pohlcení viru přes cytoplazmatickou membránu do buňky. Virový genom se skládá z přibližně 10 tisíc nukleotidů a obsahuje na 5-konci čtecí rámeček, který kóduje 4 nestrukturní proteiny *nsP1-4*. Tyto proteiny se podílejí jak na syntéze nového obalu viru (glykoproteiny obalu C a E1-3), tak vlastní virové RNA.

Patogeneze viru *CHIKV* klasickou cestou zahrnuje zejména šíření poškozeným epitelem, které se projevuje drobnými petechiemi. V případě infekce dýchacími cestami, ale i kožní formou se virémie projevuje generalizovaným horečnatým onemocněním, bolestí kloubů a vyrážkou. Po inkubaci nastupuje opět prudká horečka a bolest kloubů a svalů.

Kultivace viru v laboratorních podmínkách není náročná, *CHIKV* se dobře pomnožuje na Vero nebo BHK buňkách, ale i v kuřecích embryích. Snadná záměna klinických příznaků

s jinými viry, možná záměna identifikace viru pomocí serologických vyšetření a možnost rozptylu aerosolem činí z viru *CHIKV* agens, které je zařazeno dle vyhlášky 474/2002 Sb.<sup>1</sup> do skupiny vysoce rizikových agens.

## 2.2 Laboratorní diagnostika viru *Chikungunya*

Pro diagnostikování viru *CHIKV* jsou používány tři hlavní laboratorní testy: izolace viru, serologické testy pro průkaz virově-specifických protilátek a detekce genomu založená na PCR metodách.

Izolace viru je založena na inokulaci biologického vzorku (např. plazma, sérum) do buněčné kultury, odvozené buď z komára nebo savců. Alternativně může být vzorek pro detekci *CHIKV* inokulován do sajících myší. Naposledy zmíněná metoda je ale pracná a časově náročná.

Serologická diagnostika viru *CHIKV* je založena na průkazu čtyřnásobného zvýšení titru IgG protilátek proti viru *CHIKV* mezi séry odebranými v akutní a rekonvalescentní fázi. Nicméně získání párových sér je obvykle neproveditelné. Alternativně je možné použít průkaz IgM protilátek specifických pro *CHIKV* v sérech odebraných v akutní fázi infekce u případů, kde nelze získat párová séra. IgM a IgG protilátky specifické pro *CHIKV* je možné detekovat pomocí následujících serologických metod: inhibice hemaglutinace, komplement fixační reakce, imunofluorescence (IIF) a imunoenzymatické eseje (ELISA) (Hundekar *et al.*, 2002). Výše zmíněné serologické metody jsou vysoce citlivé, ale jen mírně specifické: tento fenomén je způsoben hlavně antigenní zkříženou reaktivitou mezi *CHIKV* a dalšími arboviry jako je virus Dengue, O'nyong-nyong, virus Sindbis a mnoho dalších (Blackburn *et al.*, 1995). Existuje několik komerčně dostupných serologických esejí, včetně IIF a ELISA, u nichž byla stanovena a vyhodnocena citlivost a specifčnost (Litzba *et al.*, 2008).

Výše zmíněné postupy není vždy praktické adaptovat pro rutinní použití, proto bylo vyvinuto několik metodik, které jsou založené na reverzně transkripčních RT-qPCR technologiích. Existující RT-qPCR metody pro detekci viru *CHIKV* využívají páry primerů amplifikující specifické oblasti 3 strukturálních genů (kapsidový, obalový E1 a obalový E2) a 1 nestrukturního genu (*nsp1*) (Hasebe *et al.*, 2002). Molekulární testy jsou schopny detekovat virovou RNA jen během virémické fáze, která obvykle trvá 0 až 6 dní po začátku klinických příznaků (Pastorino a spol., 2005).

---

<sup>1</sup> Vyhláška, kterou se provádí zákon č. 281/2002 Sb., o některých opatřeních souvisejících se zákazem bakteriologických (biologických) a toxinových zbraní a o změně živnostenského zákona.

## 2.3 Vlastní metoda

Pomocí reverzní transkripce je proveden přepis virové pozitivní RNA viru do struktury komplementární DNA (dále jen cDNA z ang. complementary DNA). Metoda je vyvinuta pro zpracování vzorku cDNA z vyšetřovaného vzorku. Metoda je založena na průkazu přítomnosti specifické sekvence genu *nsP1* kódujícího nestrukturní protein P1.

Pro specifickou detekci přítomnosti virové RNA jsou využity semi-specifické primery v kombinaci s Universal ProbeLibrary sondou (dále jen UPL) číslo 15 (Roche Diagnostic GmbH, Německo). Paralelně je reakce prováděna v kombinaci s interkalačním barvivem druhé generace patřící do skupiny tzv. HRM barviv, konkrétně SYTO 61 (Invitrogen, Oregon, USA). Vzhledem ke skutečnosti, že je detekce prováděna ve dvou oddělených fluorescenčních spektrech, byl pro analýzu zvolen cycler Rotor-Gene 6000 (CorbettResearch, Qiagen GmbH, Německo). Jak bylo již výše uvedeno, detekce pro oba kanály probíhá paralelně resp. za shodných podmínek, a v jedné zkumavce.

Materiál a zařízení nutné k provedení reakcí: vlastní provedení qPCR reakce bylo ověřeno na real-time PCR cykleru Rotor-Gene 6000, další spotřební materiál je PCR voda, 1,5; 0,5 0,2 ml zkumavky popř. mikrozukavk, mraznička, vortex, centrifuga, lednice, chladičí bločky, dvě sady pipet (jedna sada pro izolaci a pipetování izolované RNA a jedna sada pipet pro pipetování reakční směsi). Metodika je zpracována dle požadavků publikace Bustin *et al.*, 2009 *The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments*.

### 2.3.1 Referenční vzorek viru Chikungunya

Jako referenční vzorek pro vývoj detekce viru *CHIKV* sloužil vzorek *Chikungunya* katalogové číslo kmene v době nákupu: NCPV636, označení: S27 Petersfield (The National Collection of Pathogenic Viruses, Porton Down, Anglie). Virus byl kultivován na VERO buňkách při 37 °C po 72 hod, následoval odběr suspenze, která byla použita pro izolaci viru.

### 2.3.2 Izolace RNA ze vzorku

K izolaci virové RNA ze vzorku lze použít komerčně dostupné izolační kity. Metodika byla ověřena s použitím izolačního kitu RTP DNA/RNA Virus Mini Kit (Invitex, STRATEC Molecular GmbH, Německo). Izolace dle návodu od výrobců. Izolovaná RNA je v případě potřeby uchována při teplotě – 80 °C. V závislosti na charakteru vzorku byla výše uvedeným

kitem dosahována koncentrace RNA v řádech desítek až stovek ng/ul, poměr absorbance 260/280 nm byla 2,1±2.

### 2.3.3 Reverzní transkripce

Reverzní transkripce slouží k převedení virové RNA do cDNA. Metodika byla ověřena na kitu M-MLV reverzní transkriptáza PN: M 023 (Top-Bio, Praha, ČR), koncentrace templátové RNA byla jako primery pro reakci jsou ověřeny náhodné hexamery (Invitrogen, Oregon, USA), v Tab. I jsou uvedeny veškeré složky reakce. Reverzní transkripce je prováděna v 10 µl při 37 °C po dobu 1 hod – pro provedení reakce je možno použít termální blok nebo lépe PCR cykler.

Tab. I: Složky reakční směsi pro provedení reverzní transkripce, kalkulace provedena pro přípravu jedné reakce.

Složky reakční směsi	Množství (µl)
PCR voda	1,5
5x M-MLV reakční pufr	2
DDT (100 mM)	1
dNTP (5 mM)	1
náhodné hexamery (50 µM)	0,5
M-MLV reverzní transkriptáza (25 U)	1
Izolované RNA	3
Celkový objem	10

### 2.3.4 qPCR

Pro provedení reakce je použit qPCR 2x Blue Master mix (Top-Bio, Praha, ČR) PN: P 521 až P 523. Jedná se o kompletní mix reagentů nutných pro PCR. Mix se dlouhodobě skladuje při -20 °C, ale je možné i krátkodobé skladování maximálně však dva týdny při 4 °C.

Sekvence primerů použitých v protokolu pro *nsPI* gen:

Toga\_UPL15F: 5'-GTCACACCGAATGACCATGC-3'

Toga\_UPL15R: 5'-ATGAACGGGGTTGTGTCAAA-3'

Sekvence použité UPL sondy č. 15:

5'-GAGCAGGA-3'

### 2.3.5 Pracovní postup a opatření pro manipulaci s materiálem a kitem

Při pracovních operacích vždy používat ochranné rukavice. Provádět veškeré operace při přípravě PCR mixu ve speciálním (PCR) boxu. Pro každé vyšetření využívat systému pozitivní kontroly (cílová cDNA), negativních kontrol tj. jiná než cílová RNA/DNA a NTC (z angl. No Template Control) tj. vzorek bez nukleových kyselin.

- a) Přemístit potřebné roztoky, případně vzorek cDNA z mrazicího boxu (cca 10-15 min. před započítím práce) do lednice (pozdvolné rozmražení v temnu), vyhnout se opakovanému rozmrazování, které může vést ke snížené senzitivě.
- b) Připravit pro detekci potřebné množství PCR mixu (násobky objemu) ve složení ze zásobních roztoků dle Tab. II a vložit roztoky do chladicího stojánku. Zásobní roztoky vrátit zpět do mrazicího boxu nebo lednice.

Tab. II: Složky reakční směsi včetně příkladu kalkulace pro jednu reakci.

Složky reakční směsi	Množství (μl)
PCR voda	2,55
qPCR 2x Blue Master Mix	7,5
Toga_UPL15F (10 μM)	0,6
Toga_UPL15R (10 μM)	0,6
Universal ProbeLibrary sonda #15	0,15
SYTO 61 (50 μM)	0,6
Vzorek nebo + nebo - kontrola a nebo NTC (viz výše)	3
Celkový objem	15

- c) Mix promíchat pipetováním. Následně rozpipetovat po 12 μl do potřebného množství zkumavek.
- d) Do zkumavek s PCR mixem označených „studovaný vzorek“ přidat 3 μl zkoumané cDNA.
- e) Do zkumavky s PCR mixem označené „pozitivní kontrola“ přidat 3 μl cDNA typového kmene *CHIKV*.

- f) Do zkumavky s PCR mixem označené „negativní kontrola“ přidat 3 µl jiného vzorku (jiného agens než je *CHIKV*).
- g) Do zkumavky s PCR mixem označené „NTC“ přidat 3 µl PCR vody.
- h) Zkumavky uzavřít víčky (pracovat sterilně) a vložit do přístroje a spustit program, reakční podmínky zadat pro kanály Green a Red viz Tab. III.
- i) Výsledky uložit a zálohovat do patřičného adresáře. Název souboru a cestu k souboru zapsat do protokolu.
- j) Použité laboratorní pomůcky (pipety) ponechat v pracovním boxu pro následnou dekontaminaci, použitý spotřební materiál odložit do plastového boxu a následně likvidovat odpovídajícím způsobem (spalovna).

Tab. III: Popis nastavení cykleru a podmínek PCR reakce.

Program		Teplota	Čas	Počet cyklů	Měření fluorescence
Denaturace		94 °C	1 min.	1	
Amplifikace	Denaturace	94 °C	10 s	40	každý cyklus: G, R*
	Annealing	55 °C	30 s		
Stabilizace		60 °C	90 s	1	
Melting		po 0,2 °C	2 s	60-90 °C	kontinuálně: R*
Chlazení		40 °C	1 min.		

\* nastavení fluorescenčního kanálu, G = Green, R = Red spektrum

### 2.3.6 Vyhodnocení analýzy

Za průkaz přítomnosti cDNA druhu *CHIKV* ve vzorku je považován prokazatelný nárůst fluorescenčního signálu v obou fluorescenčních kanálech Obr. 1. a specifická „melting“ teplota (tj. teplota tání) při melting analýze viz Tab. IV a Obr. č. 2.

Tab. IV: Specifická melting teplota pro *nsP1* gen.

Detekovaný gen	Specifická melting teplota PCR produktu
<i>nsP1</i>	86,5 ± 0,5 °C

### 2.4 Validace a limity reakce

Ověření výsledků bylo provedeno na gelové elektroforéze, odečtením délky specifických PCR produktů dle velikostního markeru O'GeneRuler 50 bp DNA Ladder (Fermentas). Pro vyloučení falešně pozitivního výsledku byla provedena kontrola

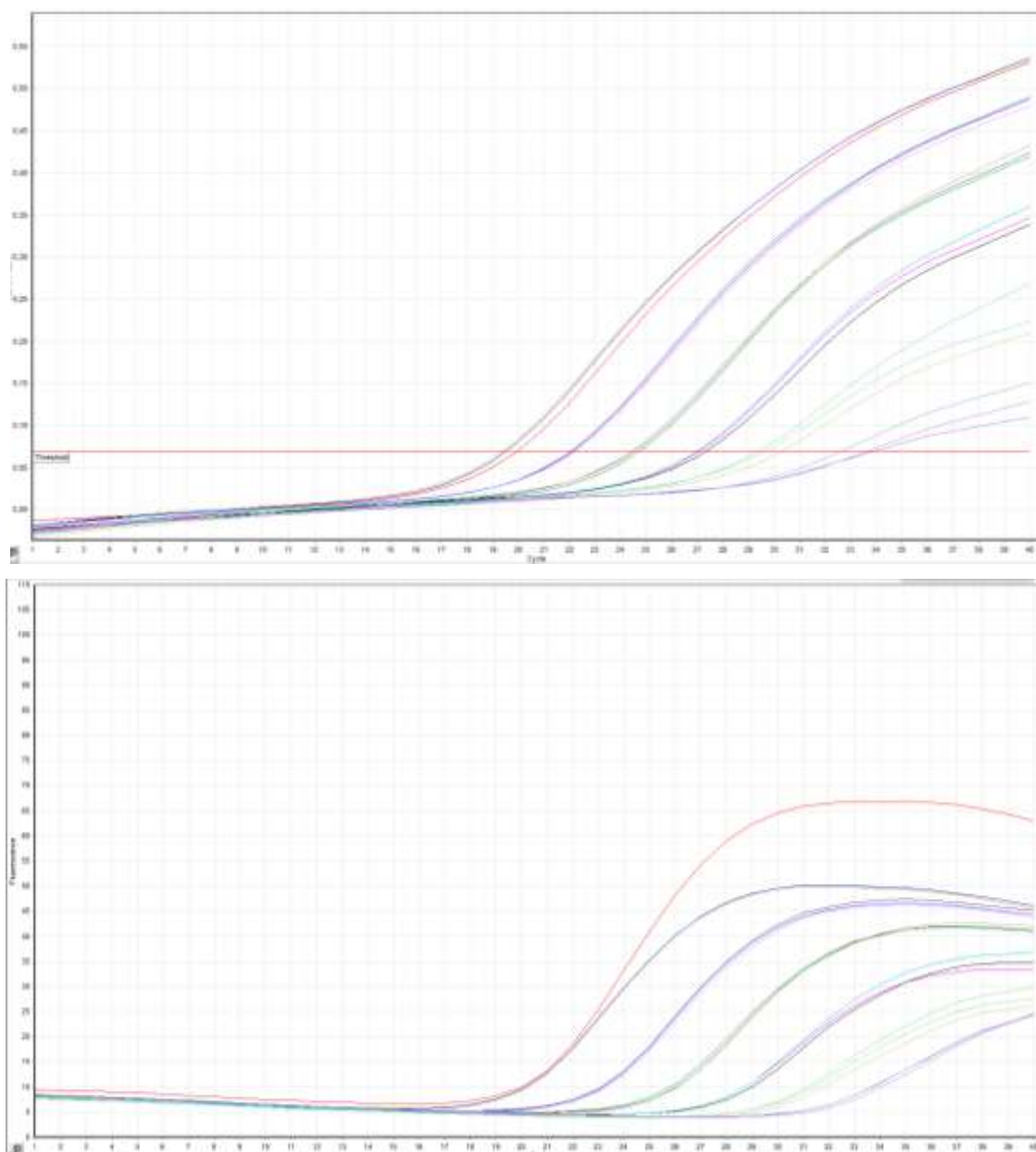


s vybranými mikroorganismy. Test neodhalil žádnou zkříženou reaktivitu u žádného ze sledovaných agens – seznam testovaných agens viz Tab. V.

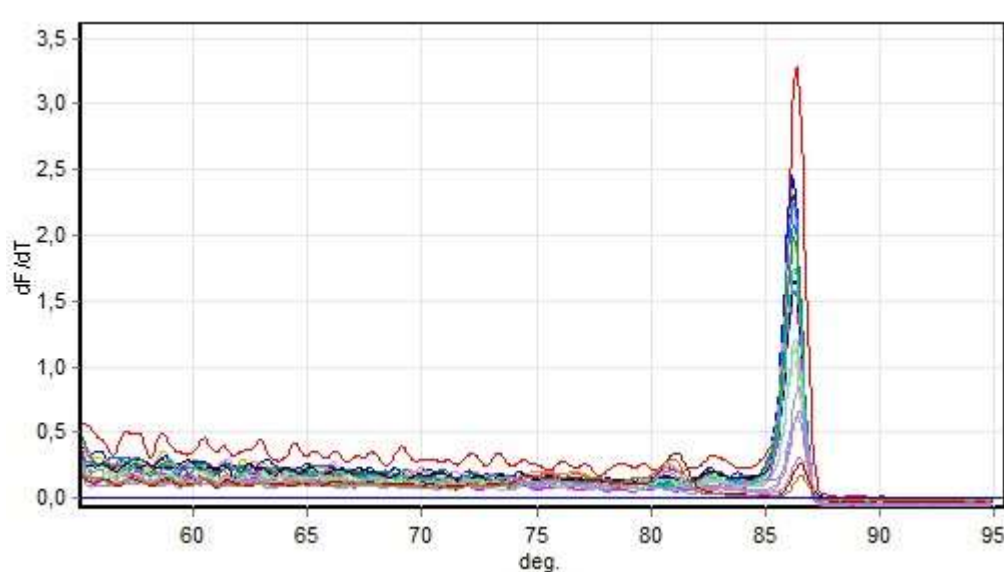
Dále byla specifita a robustnost reakce ověřena na směsných a na simulovaných terénních vzorcích (sušené mléko, pšeničná mouka, prášek do pečiva, moučkový cukr, prach, prací prášek, křída, pyl, motorový olej a nafta). Práškové vzorky byly připraveny v koncentraci 10 mg/ml a před reakcí byly smíchány v poměru 1:1 s kontrolním vzorkem *CHIKV* v závislosti na použitém objemu reakce. Reakce byla pozitivní u všech simulací s výjimkou směsného vzorku kypřicího prášku, motorového oleje a nafty.

Tab. V: Seznam testovaných patogenů v rámci ověření specifity metody.

<b>Patogen</b>	<b>Kmen</b>	<b>Patogen</b>	<b>Kmen</b>
Virus influenzy drůbeže	H5N1, 239	Bacillus anthracis	NCTC 10340T
Virus newcastleské choroby drůbeže	210 (Komarov)	Escherichia coli	3954
Virus žluté zimnice	D17	Staphylococcus haemolyticus	2737
Camelpox virus	538	Enterobacter cloacae	1903
Virus Vaccinia	SU016	Francisella tularensis	5540
Virus kravských neštovic	V-158 3723	Kytococcus sedentarius	2699
Virus australské encefalidity	506	Pseudomonas aeruginosa	1960
Virus Dengue	189 TYP-1	Yersinia enterocolitica	CCM 5671
Virus encefalidity St.Louis	607	Salmonella enterica subsp. enterica , ser. typhimurium)	3808
Virus horečky Kyasanurského lesa	SU028	Schigella sonnei	4421
Virus klíšťové encefalidity	521	Brucella melitensis (biovar canis)	1/74
Virus Powassan	M5	Clostridium tetani	18/50
Virus západní nilské horečky	31124	Brucella melitensis	5520 (abortus)
Virus žluté zimnice	D17	Burkholderia mallei	10248
Virus Chikungunya	636	Burkholderia pseudomallei	10274
Virus venezuelské koňské encefalomyelity	690 (H12/93)	Clostridium botulinum	5950
Virus Sindbis	SU014	Salmonella typhi	115/39
Virus Seoul	203 (R22)	Shigella dysenteriae I.	13/41
Virus Hazara	530	Vibrio cholerae	71/89
Bovinní respirační syncytiální virus	V-362	Yersinia pestis	5923



Obr. č. 1: Výsledky ověření skutečné citlivosti metodiky, pro ověření byl využit směsný vzorek cDNA, který byl ředěn  $5 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^3$ ,  $5 \times 10^2$ ,  $1 \times 10^2$ . Pro UPL sondu č. 15 měřenou v kanálu Green je výsledek uveden nahoře, pro Red kanál a barvu SYTO 61 je výsledek uveden níže.



Obr. č. 2: Grafické znázornění specifické melting teploty pro různě koncentrované vzorky. Na ose y je uveden poměr fluorescence pozadí a generovaného signálu, osa x je teplota ve °C.

Citlivost reakce byla stanovena až do koncentrace jednotek kopií cílové sekvence na reakci. Citlivost reakce byla zjištěna detekcí nukleové kyseliny *CHIKV* o spektrometricky změřené koncentraci a přepočítané na počet kopií v koncentračním rozpětí  $1 \times 10^6$  až  $1 \times 10^2$  kopií genomu v reakci, koeficient korelace byl větší než 0,97 a efektivita reakce dosahovala hodnotu 90 %.

Specifita reakce je ověřena kombinací dvou, popř. tří systémů viz výše. Jako pozitivní vzorek je označen ten, který generuje nárůst fluorescenčního signálu jak v kanálu Green, tak v kanálu Red. Navíc vzorek musí být charakterizován specifickou melting teplotou.

### 3. INOVAČNÍ ASPEKTY, NOVOST POSTUPŮ

Do doby zavedení této metodiky detekce a identifikace sledovaného biologického agens byly v Laboratoři biologického monitorování a ochrany (dále jen LBMO) Státního ústavu jaderné, chemické a biologické ochrany, v.v.i. (dále jen SÚJCHBO, v.v.i.) využívány jen serologické testy pro skupinu specifických protilátek. Tyto testy mají často falešně negativní výsledky a protilátky mají relativně krátkou expiraci.

Vzhledem ke skutečnosti, že na pracovišti nebyla dosud zavedena detekce viru na základě nukleové sekvence, neexistovala zde ani možnost ověřit reakce sekvenací amplifikovaných produktů. V neposlední řadě bylo používání komerčních setů poměrně finančně náročné. Na základě těchto skutečností bylo rozhodnuto o vývoji a zavedení nové vlastní metodiky detekce a identifikace agens *CHKV* do laboratorní praxe LBMO SÚJCHBO, v.v.i.

Pro detekci byly navrženy, optimalizovány a ověřeny dosud nepublikované sekvence primerů, které byly vybírány se snahou zabránit případným falešně pozitivním a negativním výsledkům. Pro zajištění správnosti výsledků byla pro hodnocení reakce zahrnuta kombinace dvou rozdílných detekčních systémů. První z nich byl založen na využití modifikované TaqMan sondy, kterou lze díky semi-specifické sekvenci využít i pro další metodiky. Sonda obsahuje tzv. uzamčené nukleotidy (Letorra *et al.*, 2003), které umožňují syntézu krátkého oligonukleotidu, který má ovšem stejnou melting teplotu, jako konvenční TaqMan sonda. Druhý systém využíval pro vlastní detekci výsledků interkalační barvu SYTO 61 patřící do tzv. druhé generace interkalačních barviv, která umožňuje oproti první generaci interkalačních barviv daleko přesnější a průkaznější odlišení falešně pozitivních výsledků (Bustin *et Nolan*, 2004). Využití semi-specifické sondy v kombinaci s interkalační barvou a ověřením ampikonu melting analýzou je zajištěna kvalitní verifikace výsledků. Navíc, jak bylo již uvedeno výše, lze jak semi-specifickou sondu, tak i interkalační barvu použít v kombinaci s jiným párem primerů pro detekci jiných agens nebo další PCR analýzy. Používáním co možná nejvíce jednotného chemismu v laboratoři je zajištěna obnova chemikálií.

Reakční podmínky pro diagnostický proces jsou navrženy tak, aby bylo možné provádět detekci většího počtu biologických agens uvedených na seznamech příloh vyhlášky č. 474/2002 Sb.<sup>2</sup> současně a tím výrazně zkrátit čas potřebný pro detekci těchto agens.

---

<sup>2</sup> Vyhláška, kterou se provádí zákon č. 281/2002 Sb., o některých opatřeních souvisejících se zákazem bakteriologických (biologických) a toxinových zbraní a o změně živnostenského zákona.

V porovnání s komerčními soupravami lze u této metody detekce a identifikace *CHIKV* provést dodatečnou kontrolu výsledků amplifikace sekvenací amplifikovaných produktů a tím dodatečně ověřit jejich správnost.

#### 4. POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY

Metodika byla vyvinuta jako hlavní analytický postup metodicko-odborné podpory laboratoře LBMO SÚJCHBO, v.v.i při plnění úkolů státního dozoru SÚJB v oblasti zákazu biologických zbraní pro zmíněné agens.

Metodika bude využívána pro potřeby dozoru nad dodržováním zákona č. 281/2002 Sb.<sup>3</sup>, konkrétně bude sloužit k průkazu přítomnosti genetického materiálu *CHIKV* ve vzorcích získaných při dozorové činnosti pracovníků SÚJB. Lze předpokládat, že by metodika mohla být rovněž využita k detekci a identifikaci agens *CHIKV* pro potřeby integrovaného záchranného systému v případech, kdy existuje podezření na přítomnost uvedeného agens v neznámých vzorcích (biologické tkáně, stěry, tzv. bílé prášky neznámého původu apod.).

#### 5. POUŽITÁ LITERATURA

Blackburn, N.K., Besselaar, T.G., Gibson, G. (1995). Antigenic relationship between chikungunya virus strain and o'nyong nyong virus using monoclonal antibodies. *Res. Virol.* 146. 69-73.

Bustin S.A., Nolan T. (2004). Pitfalls of Quantitative Real-Time Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction. *J Biomol Tech.*, 2004, 15, 155-166 p.

Bustin S.A., Benes V., Garson J.A., Hellems J., Huggett J., Kubista M., Mueller R., Nolan T., Pfaffl M.W., Shipley G.L., Vandesompele J., Wittwer C.T. (2009). The MIQE Guidelines: Minimum Information for publication of quantitative Real-Time PCR experiments. *Clinical Chemistry* 55:4

Hasebe F, Parquet MC, Pandey BD, Mathenge EG, Morita K, Balasubramaniam V, Saat Z, Yusop A, Sinniah M, Natkunam S, Igarashi A. (2002). Combined detection and genotyping of Chikungunya virus by a specific reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Med Virol.* 2002 Jul;67(3):370-4.

Khan, A.H., Morita, K., Parquet, C.M. et al. (2002). Complete nucleotide sequence of Chikungunya virus and evidence for an internal polyadenylation site. *J. Gen. Virol.* 83. 3075-3084.

---

<sup>3</sup> Zákon o některých opatřeních souvisejících se zákazem bakteriologických (biologických) a toxinových zbraní a o změně živnostenského zákona.

Latorra D., Arar K., Hurley J.M. (2003): Design considerations and effects of LNA in PCR primers. *Mol Cell Probes*. 2003 Oct;17(5):253-9.

Litzba, N., Schuffenecker, I., Zeller, H., Drosten, C., Emmerich, P., Charrel, R., Kreher, P., Niedrig, M. (2008). Evaluation of the first commercial chikungunya virus indirect immunofluorescence test. *J. Virol. Methods*. 149. 175-179.

Pastorino, B., Bessaud, M., Grandadam, M., Murri, S., Tolou, H.J., Peyrefitte, C.N. (2005). Development of a TaqMan RT-PCR assay without RNA extraction step for the detection and quantification of African chikungunya viruses. *J. Virol. Methods*. 124. 65-71.

Ruskova L., Raclavsky V. (2011). The potential of high resolution melting analysis (hrma) to streamline, facilitate and enrich routine diagnostics in medical microbiology. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 155(3):239-52.