



FUNKČNÍ VZOREK

**ELISA test pro detekci protilátek proti L725 proteinu
Acanthamoeba polyphaga mimiviru v séru ryb**

**Mgr. Zuzana Úlehlová
Prof. MVDr. Vladimír Celer, Ph.D.
MVDr. Lubomír Pojezdal, Ph.D.
Ing. Kateřina Matějíčková, Ph.D.
MVDr. Martin Faldyna, Ph.D.**

Funkční vzorek 3141/2023

**ELISA test pro detekci protilátek proti L725 proteinu *Acanthamoeba polyphaga*
mimiviru v séru ryb**

Mgr. Zuzana Úlehlová^{1,2}

Prof. MVDr. Vladimír Celer, Ph.D.²

MVDr. Eubomír Pojezdal, Ph.D.¹

Ing. Kateřina Matějíčková, Ph.D.¹

MVDr. Martin Faldyna, Ph.D.¹

¹ Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i., Brno

² Veterinární univerzita Brno

ISBN 978-80-7672-033-6

Vydal: Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i.

2023

Funkční vzorek byl vyvinut v rámci projektů PROFISH (reg. číslo CZ.02.1.01/0.0/16_0000869) financovaného z Evropského fondu pro regionální rozvoj v rámci operačního programu Věda, výzkum a vzdělávání MŠMT a Ministerstva zemědělství ČR (číslo grantu RO0523).

Obsah

1. Úvod	3
2. Cíl metodiky funkčního vzorku	4
3. Vlastní popis metodiky	4
3.1. Příprava rekombinantního L725 proteinu APMV viru.....	4
3.2. Provedení ELISA testu	6
3.3. Validace metody	7
3.4. Standardizace ELISA testu.....	8
3.4.1. Homogenita potažené destičky	8
3.4.2. Stanovení cut off hodnoty	9
3.4.3. Cohenovo kappa	10
3.4.4. Opakovatelnost – intra-assay	10
3.4.5. Opakovatelnost – inter-assay.....	11
4. Srovnání „novosti postupů“	12
5. Uplatnění funkčního vzorku	12
6. Ekonomické aspekty	12
7. Seznam použité literatury	12
8. Dedikace	14

1. Úvod

V roce 1992 výzkumný tým v Bradfordu (Velká Británie) izoloval z vody z chladicí věže mikroorganismus, který pod světelným mikroskopem vypadal jako grampozitivní koková bakterie. Po dobu deseti let byl nově izolovaný mikrob infikující prvoky rodu *Acanthamoeba* neúspěšně zkoumán jako intracelulární parazitická bakterie, jelikož se vymykal svými vlastnostmi, které byly do té doby považovány pro viry za charakteristické. (Abergel et al., 2015). Velikostně byl na úrovni malých bakterií a na rozdíl od dříve identifikovaných virů ho bylo možné vidět za pomoci světelného mikroskopu. Ve skutečnosti však vědci objevili pro tu dobu největší virus na světě – *Acanthamoeba polyphaga* mimivirus (APMV).

Po objevu APMV byly, s ohledem na neobvyklé vlastnosti objeveného viru, upraveny detekční metody, což způsobilo průlom na poli izolace nových mimivirů z nejrůznějších typů prostředí. Většina z nich byla izolována z vodního prostředí – z vod sladkých, brakických, i slaných (Wommack and Colwell, 2000), ale také z půdy (Schulz et al. 2018), z široké škály druhů fytoplanktonu (Claverie and Abergel, 2018), či byla objevena ve spojení s mikrobioty mnohobuněčných organismů (Abeles and Pride, 2014). Během následujících let tak byla izolována celá řada příbuzných virů a vytvořila z čeledi *Mimiviridae* jednu z největších a nejrozmanitějších rodin eukaryotických virů. Řadí se mezi tzv. „obří viry“, které jsou součástí skupiny nukleocytoplazmatických velkých virů (NCLVD), jejichž velikost, struktura, délka genomu a komplexita virových částic jsou větší než u standardní rodiny virů. Viry, které do této skupiny spadají, obsahují rozsáhlé genomy dvouřetězcové DNA a zcela se replikují uvnitř hostitelské cytoplazmy.

Kapsida APMV je ikosahedrální kromě jednoho vrcholu, který je pokryt jedinečnou strukturou ve tvaru hvězdice s pěti větvemi (nazývanou „stargate“) (Zauberman et al., 2008). APMV má dvouvláknitý genom DNA (dsDNA) o délce 1,2 Mb a obsahuje 979 genů (Raoult et al., 2004). Genom je z 28 % složený z nukleobáz GC (Silva et al., 2015). Kapsida APMV má velikost ~ 500 nm a téměř celý ho pokrývají fibrily, které jsou dlouhé ~ 120–140 nm a o průměru 1,4 nm. V oblasti „stargate“ fibrily chybí. Tyto vláknité útvary jsou mezi viry morfologicky jedinečné, a ačkoliv jejich struktury nebyly zcela objasněny, tvoří hustou vrstvu, jsou značně glykosylované a umožňují připojení APMV k amébám, bakteriím, členovcům, a houbám prostřednictvím glykanů (Rodrigues et al., 2015).

Na základě dosavadních studií je pokládáno za možné, že se APMV může podílet na vzniku pneumonie u lidí (La Scola et al., 2005). Protilátky proti APMV byly v minulosti detekovány jak v lidských krevních sérech (La Scola et al., 2005; Berger et al., 2006), tak byla z lidského materiálu izolována i samotná DNA (Saadi et al., 2013). Studie také prokázaly asociaci mezi obřími viry a některými obratlovci (Dornas et al., 2014) a bezobratlými (Andrade et al., 2015). Vliv mimivirů na organismus živočichů však doposud není zcela objasněn.

Do jisté míry není znám také vzájemný vztah jednobuněčných řas, měňavkovitých prvoků z rodu *Acanthamoeba* a virů, jež je infikují. Pro vegetativní stádium acanthamoeby řasy představují zdroj výživy. Lze tak předpokládat, že mimiviry představují další skupinu mikroorganismů, která potenciálně ovlivňuje biodiverzitu ve vodním prostředí a dostává se do potravního řetězce ryb a jiných živočichů.

2. Cíl metodiky funkčního vzorku

Cílem bylo připravit všechny nezbytné komponenty pro sestavení a následnou validaci ELISA testu, který bude umožňovat detekci protilátek proti L725 proteinu APMV v séru ryb, ale i jiných obratlovců. Výsledky monitoringu pak osvětlí nálezovou situaci APMV napříč různými živočišnými skupinami a umožní podrobnější výzkum těchto virů a míry případného vlivu infekce na organismus vybraných druhů živočichů.

3. Vlastní popis metodiky

3.1. Příprava rekombinantního L725 proteinu APMV viru

- Extrakce virové DNA
 - Použitý kmen viru: izolát *Acanthamoeba polyphaga* mimivirus (GeneBank číslo: AY653733.1). Izolát byl získán z univerzity Aix-Marseille Université, Francie.
 - Kultivace izolátu na kultivačním modelu *Acanthamoeba polyphaga* (Puschkarew) (ATCC® 30871TM).
 - Extrakce virové DNA byla provedena pomocí kitu NucleoSpin Blood kit (Macherey-Nagel) dle instrukcí výrobce.
 - Amplifikace pomocí specifických primerů, které byly navrženy tak, aby umožňovaly klonování do pCR™8/GW/TOPO plazmidového vektoru (Invitrogen).
 - Sekvence primerů použitá k amplifikaci genu L725 byla:

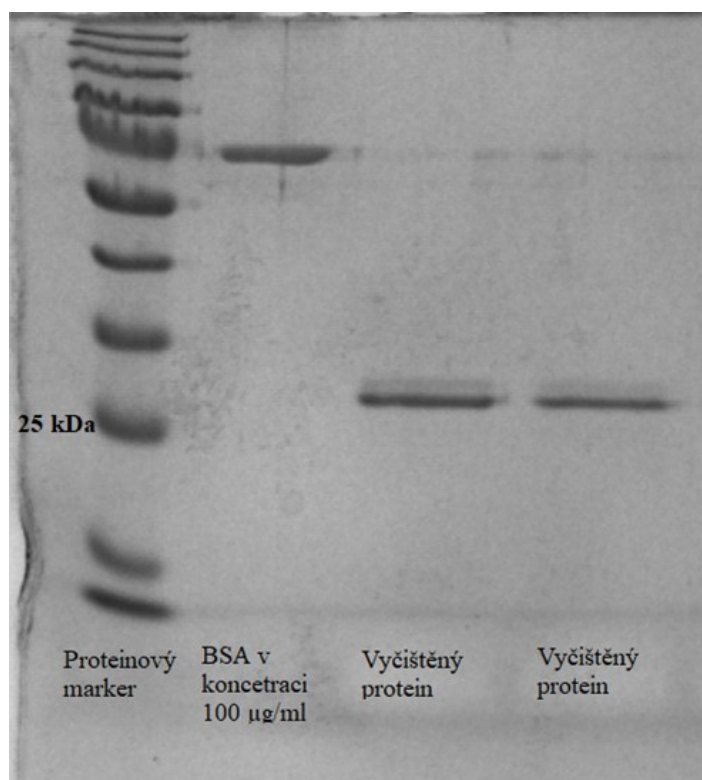
Primer	Sekvence	Poloha v genomu
Forward	GCAAATAATTTGGTGCAACTTATCT	959877

Reverse	ATGAGCACAATTACATTTCTTGAT	959233
---------	--------------------------	--------

- Klonování genu do plazmidového vektoru
 - Provedeno dle instrukcí výrobce (Invitrogen).
 - Transformace vzniklé DNA konstrukce do kompetentních buněk *Escherichia coli*, kmen TOP10 (Invitrogen).
 - Následné klonování genového fragmentu rekombinanční reakcí zprostředkované enzymem LR Clonase™ II Enzyme Mix (Invitrogen). DNA inzert byl umístěn v kontextu T7 transkripčních a translačních signálů a specifické sekvence kódující N-terminální polyhistidin.
- Exprese rekombinantního proteinu L725
 - Použity bakteriální buňky *E. coli* pLysS (Invitrogen).
 - Noční kultura byla naředěna 1:50 ve 2 l LB média obohaceného ampicilinem (100 µg/ml) a kultivována při teplotě 27 °C za neustálého míchání (250 rpm) až do dosažení denzity OD₆₀₀ 0,5.
 - Indukce exprese proteinu byla uskutečněna přidáním 0,1 mM IPTG (Izopropyl β-D-1-tiogalaktopyranozid) a následné kultivace při 37 °C po dobu 3 hodin.
- Purifikace rekombinantního proteinu
 - Použita chromatografie IMAC (Immobilized metal affinity chromatography)
 - K buněčnému peletu z předchozího kroku bylo přidáno 20 ml navazujícího roztoku (20mM fosfát sodný, 300mM chlorid sodný, 0,1 % Tween 20, 10mM Imidazol, 8M močovina, pH 7,8) a následně byl pelet pomocí sonikace při teplotě 4 °C rozrušen.
 - Rekombinantní protein byl oddělen od kontaminujících proteinů metalochelatační afinitní chromatografií s Ni²⁺.
 - Kolona s 1 ml Ni-NTA agarózy (Qiagen) byla ekvilibrována navazovacím roztokem.
 - Kolona byla zatížena průtokem 1 ml/min po dobu 1 h a promyta stejným fosfátovým pufrům obsahujícím 10 mM Imidazol.
 - K eluaci navázaného proteinu byl použit vytěšňovací roztok (20mM fosfátový pufr pH 7, 300mM chlorid sodný, 0,1 % Tween 20, 8M močovina a 250 mM Imidazol) v celkovém objemu 15 ml.

- Alikvóty frakcí byly podrobeny 12 % SDS-PAGE a obarveny Coomassie brilantní modří pro analýzu jejich čistoty. Koncentrace rekombinantního proteinu byla stanovena spektrofotometricky (OD).

Obrázek č. 1. SDS-PAGE analýza rekombinantního proteinu



3.2. Provedení ELISA testu

- Vazba antigenu
 - Purifikovaný rekombinantní L725 protein naředěný na koncentraci 20 µg/ml ve vazném pufru o pH 9,6 byl napipetován do jamek mikrotitrační destiček Maxisorp II® Immunoplates (Nunc) v objemu 100 µl na jamku.
 - Vazba přes noc při 4 °C
 - 1x promytí v roztoku PBS (fosfátový pufr)
- Blokování nespecifických vazebných míst
 - Roztok PBS + 2 % BSA v objemu 300 µl na jamku
 - 60 min inkubace při 37 °C
 - 1x promytí roztokem PBS
- Aplikace vyšetřovaného vzorku sér
 - Naředění sér 1:100 (roztok fosfátového pufru + 0,4 M chlorid sodný + 0,1 % Tween 20 + 2 % hovězí sérový albumin) aplikace 100 µl na jamku (v duplikátech)

- Inkubace 60 min při 37 °C
- 3x promytí v roztoku PBS
- Aplikace sekundární protilátky
 - Aplikace králičí protilátky proti IgG protilátce pstruha ředěné 10 000 x v roztoku 0,4 M chlorid sodný + 0,1 % Tween 20 + 2 % BSA
 - Aplikace 100 µl na jamku
 - 3x promytí v roztoku PBS + 0,4 M chlorid sodný + 0,1 % Tween 20
 - 1x promytí v roztoku PBS
- Vizualizace reakce
 - Aplikace substrátu TMB-Complete (TestLine) v objemu 100 µl na jamku
 - Doba působení 5-7 min při laboratorní teplotě
 - Zastavení reakce přidáním zastavovacího roztoku pro ELISA (TestLine) v objemu 100 µl na jamku
 - Měření výsledné absorbance při 450 nm pomocí ELISA readeru Infinite® M200 PRO (Tecan)

3.3. Validace metody

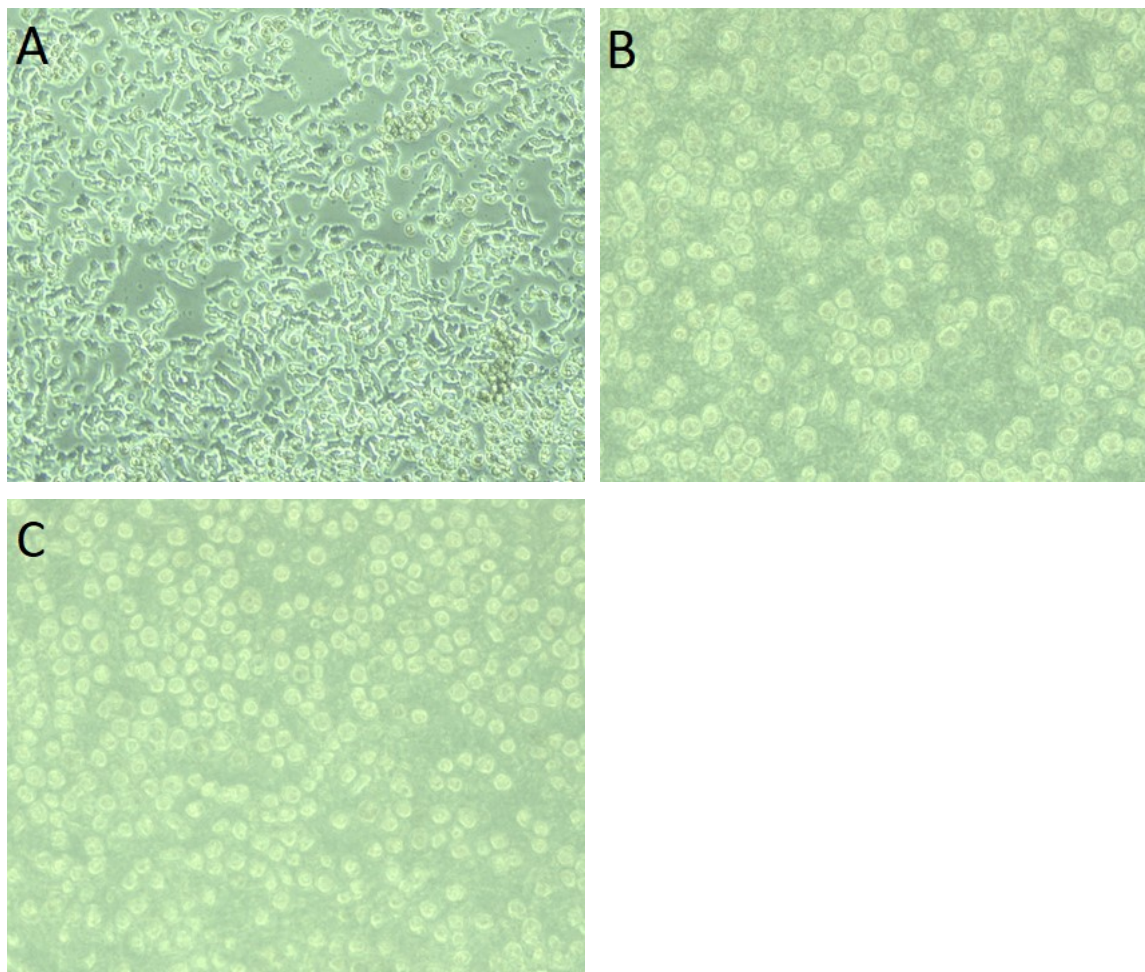
- Virus neutralizační test

Jednou z použitých validačních metod byl virus neutralizační test. Protokol byl převzat od Dornas et al. (2014). Vzhledem k absenci předem známých pozitivních a negativních APMV sér bylo pro pokus použito 50 náhodně vybraných pstružích sér. Jako kultivační model byly použity *Acanthamoeba polyphaga* (ATCC® 30871™). K infekci améb byl použit izolát *Acanthamoeba polyphaga* mimivirus (GeneBank: AY653733.1), získaný z univerzity Aix-Marseille Université, Francie.

Výsledky VNT prokázaly přítomnost virus neutralizačních protilátek u 25 sér. U zbylých krevních sér a dvou negativních kontrol (ddH₂O) pak docházelo k množení APMV a cytopatickému efektu – k vakuolizaci a postupnému rozpadu acanthamoeb.

Obrázek č. 2. Výsledky Virus neutralizačního testu 72 hodin po infekci.

A – vzorek s prokázanými virus neutralizačními protilátkami; B – negativní kontrola; C – vzorek bez virus neutralizačních protilátek



3.4. Standardizace ELISA testu

3.4.1. Homogenita potažené destičky

Homogenita byla provedena na jedné mikrotitrační destičce v 96 jamkách s jedním sérem v ředění 1:100. Byl proveden standardní test podle pracovního postupu uvedeného výše a byly vypočteny hodnoty průměru absorbancí, směrodatné výběrové odchylky a variačního koeficientu.

Výpočet:

- Průměrná hodnota absorbance vzorec č. 1

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}$$

kde x ... hodnota absorbance vzorku
 n ... počet vzorků

- směrodatná výběrová odchylka – vzorec č. 2

$$SD = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

kde x ... hodnota absorbance vzorku
 \bar{x} ... průměrná hodnota absorbance
 n ... počet vzorků

- variační koeficient – vzorec č. 3

$$CV (\%) = \frac{SD}{\bar{x}} \cdot 100$$

kde SD ... směrodatná výběrová odchylka
 \bar{x} ... průměrná hodnota absorbance

Tabulka č. 2. Výsledky měření absorbance. Pro výpočet byly vynechány hodnoty z jamek na okraji destičky a bylo tak počítáno pouze s hodnotami z 60 jamek.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,192	0,185	0,179	0,183	0,198	0,181	0,178	0,173	0,182	0,190	0,192	0,192
B	0,197	0,192	0,184	0,183	0,190	0,191	0,185	0,162	0,168	0,197	0,207	0,197
C	0,183	0,181	0,179	0,180	0,176	0,197	0,208	0,179	0,162	0,181	0,219	0,183
D	0,189	0,189	0,184	0,189	0,172	0,178	0,225	0,184	0,174	0,186	0,204	0,187
E	0,171	0,180	0,172	0,171	0,179	0,182	0,198	0,172	0,178	0,199	0,196	0,190
F	0,175	0,176	0,179	0,185	0,198	0,193	0,192	0,179	0,160	0,183	0,191	0,171
G	0,180	0,172	0,181	0,191	0,191	0,221	0,194	0,188	0,182	0,179	0,208	0,176
H	0,196	0,183	0,198	0,197	0,212	0,201	0,200	0,178	0,181	0,175	0,195	0,180

Vypočtené hodnoty:

- průměrná hodnota absorbance 0,1863
- směrodatná výběrová odchylka 0,0135
- variační koeficient (%) 7,25

3.4.2. Stanovení cut off hodnoty

Hodnota cut off pro ELISA test byla určena definováním horní hranice distribuce OD negativních sér při hladině významnosti 99,5 %. Tato hodnota byla vypočtena podle následujícího vzorce:

$$\text{cut off} = X + 3 \times SD$$

kde X je průměr OD negativních kontrolních sér a SD je směrodatná odchylka tohoto souboru negativních sér.

Vzhledem k absenci předem známých negativních sér bylo pro toto stanovení použito 25 krevních sér pstruha, která dle výsledků Virus neutralizačního testu nevykazovala přítomnost neutralizačních protilátek. Pro ELISA test založený na L725 proteinu byla

stanovena cut off hodnota 0,117. Pozitivní vzorek s absorbcí odpovídající vypočtené cut off hodnotě byl zahrnut jako kontrola ke každému ELISA testu.

3.4.3. Cohenovo kappa

Pro výpočet shody hodnot získaných z ELISA testu a Virus neutralizačního testu, který v tomto případě plnil validační funkci, byla použita Cohenovo kappa hodnota.

- Cohenovo kappa – vzorec č. 5

$$K = \frac{\text{Pr (a)} - \text{Pr (e)}}{1 - \text{Pr (e)}}$$

Výpočet ukázal maximální možnou hodnotu 1, který vyjadřuje perfektní shodu mezi výsledky obou testů.

3.4.4. Opakovatelnost – intra-assay

Prováděla se na jedné mikrotitrační destičce minimálně se 4 vzorky v zastoupení 2 vzorky s nízkou absorbcí a 2 vzorky s vysokou absorbcí v 16 jamkách od každého vzorku. Pro každý vzorek byla vypočtena průměrná hodnota absorbance, směrodatná odchylka a variační koeficient (viz. vzorec č. 1, 2, 3). Pro celý rozsah byla následně vypočtena směrodatná odchylka a variační koeficient, které vyjadřují přesnost a relativní přesnost pro celý rozsah.

- Přesnost pro celý rozsah – vzorec č. 6

$$SD = \sqrt{\frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2 \dots (n_k - 1)s_k^2}{(n_1 - 1) + (n_2 - 1) \dots (n_k - 1)}}$$

kde s ... směrodatná výběrová odchylka vzorku
 n ... počet vzorků

- Relativní přesnost pro celý rozsah – vzorec č. 7

$$CV = \sqrt{\frac{(n_1 - 1)v_1^2 + (n_2 - 1)v_2^2 \dots (n_k - 1)v_k^2}{(n_1 - 1) + (n_2 - 1) \dots (n_k - 1)}}$$

kde v ... variační koeficient vzorku
 n ... počet vzorků

Tabulka č. 3. Výsledky měření absorbance.

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	0,056	0,070	0,071	0,078	0,178	0,195	0,213	0,253
B	0,058	0,057	0,068	0,064	0,152	0,164	0,200	0,289
C	0,050	0,055	0,056	0,060	0,143	0,171	0,221	0,271
D	0,053	0,065	0,061	0,064	0,151	0,184	0,223	0,254
E	0,055	0,061	0,063	0,069	0,171	0,192	0,297	0,214
F	0,065	0,059	0,072	0,065	0,164	0,223	0,277	0,185
G	0,069	0,051	0,075	0,070	0,201	0,240	0,250	0,275
H	0,052	0,063	0,079	0,073	0,211	0,252	0,280	0,261

Vypočtené hodnoty:

- přesnost pro celý rozsah: 0,024
- relativní přesnost pro celý rozsah (%): 13,049

3.4.5. Opakovatelnost – inter-assay

Prováděla se jako 10 samostatných analýz. Testovaly se 4 vzorky – 2 s nízkou a 2 s vysokou absorbancí, každý vzorek ve 4 jamkách. Pro každý vzorek byla vypočtena průměrná hodnota absorbance, směrodatná výběrová odchylka a variační koeficient a pro celý rozsah soupravy přesnost a relativní přesnost (viz vzorce č. 1, 2, 3, 4 a 5).

Tabulka č. 5. Hodnoty absorbance dvou vzorků s nízkou absorbancí (A a B) a dvou vzorků s vysokou absorbancí (C a D).

A	B	C	D
0,053	0,078	0,171	0,245
0,063	0,082	0,162	0,204
0,059	0,085	0,160	0,232
0,058	0,069	0,145	0,243
0,067	0,079	0,194	0,293
0,070	0,079	0,136	0,285
0,068	0,068	0,137	0,265
0,061	0,074	0,148	0,274
0,052	0,071	0,131	0,236
0,054	0,090	0,154	0,256
0,057	0,089	0,163	0,227
0,058	0,078	0,167	0,261
0,056	0,083	0,145	0,230
0,075	0,089	0,147	0,225
0,073	0,087	0,162	0,219
0,062	0,074	0,159	0,198
0,059	0,089	0,210	0,191
0,049	0,065	0,194	0,246
0,057	0,092	0,198	0,282
0,052	0,096	0,201	0,241
0,058	0,088	0,174	0,262
0,069	0,075	0,180	0,247
0,063	0,096	0,192	0,239
0,062	0,093	0,187	0,198
0,067	0,098	0,183	0,187
0,080	0,074	0,165	0,199
0,079	0,072	0,163	0,214
0,071	0,069	0,193	0,251
0,065	0,089	0,221	0,211
0,066	0,076	0,211	0,201
0,062	0,073	0,196	0,271
0,072	0,080	0,198	0,243
0,072	0,086	0,175	0,271

0,052	0,079	0,174	0,201
0,053	0,067	0,189	0,201
0,058	0,061	0,181	0,235
0,067	0,078	0,188	0,242
0,066	0,085	0,195	0,251
0,068	0,082	0,193	0,247
0,071	0,074	0,181	0,242

Vypočtené hodnoty:

- přesnost pro celý rozsah: 0,019
- relativní přesnost pro celý rozsah (%): 12,098

4. Srovnání „novosti postupů“

ELISA metoda pro detekci specifických protilátek proti *Acanthamoeba polyphaga* mimiviru není komerčně dostupná.

5. Uplatnění funkčního vzorku

ELISA test pro detekci protilátek proti L725 proteinu APMV je možno využít v diagnostických laboratořích k analýze nálezové situace v chovech ryb, ale i jiných živočichů. Další uplatnění funkčního vzorku je ve výzkumné oblasti.

6. Ekonomické aspekty

Komerční využití metody závisí na zájmu diagnostických laboratoří. Metoda je využívána na pracovišti autorů pro účely rutinních vyšetření, ale i za účelem vědeckých experimentů. Podle současného stupně poznání není možné ekonomické aspekty určit.

7. Seznam použité literatury

- Abeles, S. R., Robles-Sikisaka, R., Ly, M., Lum, A. G., Salzman, J., Boehm, T. K., & Pride, D. T. (2014). Human oral viruses are personal, persistent and gender-consistent. *The ISME Journal*, 8(9), 1753–1767. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.31>
- Abergel, C., Legendre, M., & Claverie, J.-M. (2015). The rapidly expanding universe of giant viruses: Mimivirus, Pandoravirus, Pithovirus and Mollivirus. *FEMS Microbiology Reviews*, 39(6), 779–796. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuv037>
- Andrade, K. R., Boratto, P. P. V. M., Rodrigues, F. P., Silva, L. C. F., Dornas, F. P., Pilotto, M. R., La Scola, B., Almeida, G. M. F., Kroon, E. G., & Abrahão, J. S. (2015). Oysters as hot spots for mimivirus isolation. *Archives of Virology*, 160(2), 477–482. <https://doi.org/10.1007/s00705-014-2257-2>

- Berger, P., Papazian, L., Drancourt, M., La Scola, B., Auffray, J.-P., & Raoult, D. (2006). Ameba-associated Microorganisms and Diagnosis of Nosocomial Pneumonia. *Emerging Infectious Diseases*, *12*(2), 248–255. <https://doi.org/10.3201/eid1202.050434>
- Claverie, J.-M., & Abergel, C. (2018). Mimiviridae: An Expanding Family of Highly Diverse Large dsDNA Viruses Infecting a Wide Phylogenetic Range of Aquatic Eukaryotes. *Viruses*, *10*(9), 506. <https://doi.org/10.3390/v10090506>
- Dornas, F. P., Rodrigues, F. P., Boratto, P. V. M., Silva, L. C. F., Ferreira, P. C. P., Bonjardim, C. A., Trindade, G. S., Kroon, E. G., La Scola, B., & Abrahão, J. S. (2014). Mimivirus Circulation among Wild and Domestic Mammals, Amazon Region, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, *20*(3), 469–472. <https://doi.org/10.3201/eid2003.131050>
- dos Santos Silva, L. K., Arantes, T. S., Andrade, K. R., Lima Rodrigues, R. A., Miranda Boratto, P. V., de Freitas Almeida, G. M., Kroon, E. G., Scola, B. L., Clemente, W. T., & Santos Abrahão, J. (2015). High positivity of mimivirus in inanimate surfaces of a hospital respiratory-isolation facility, Brazil. *Journal of Clinical Virology*, *66*, 62–65. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2015.03.008>
- La Scola, B., Marrie, T. J., Auffray, J.-P., & Raoult, D. (2005). Mimivirus in Pneumonia Patients. *Emerging Infectious Diseases*, *11*(3), 449–452. <https://doi.org/10.3201/eid1103.040538>
- Raoult, D., Audic, S., Robert, C., Abergel, C., Renesto, P., Ogata, H., La Scola, B., Suzan, M., & Claverie, J.-M. (2004). The 1.2-Megabase Genome Sequence of Mimivirus. *Science*, *306*(5700), 1344–1350. <https://doi.org/10.1126/science.1101485>
- Rodrigues, R. A. L., dos Santos Silva, L. K., Dornas, F. P., de Oliveira, D. B., Magalhães, T. F. F., Santos, D. A., Costa, A. O., de Macêdo Farias, L., Magalhães, P. P., Bonjardim, C. A., Kroon, E. G., La Scola, B., Cortines, J. R., & Abrahão, J. S. (2015). Mimivirus Fibrils Are Important for Viral Attachment to the Microbial World by a Diverse Glycoside Interaction Repertoire. *Journal of Virology*, *89*(23), 11812–11819. <https://doi.org/10.1128/JVI.01976-15>
- Saadi, H., Pagnier, I., Colson, P., Cherif, J. K., Beji, M., Boughalmi, M., Azza, S., Armstrong, N., Robert, C., Fournous, G., La Scola, B., & Raoult, D. (2013). First Isolation of Mimivirus in a Patient With Pneumonia. *Clinical Infectious Diseases*, *57*(4), e127–e134. <https://doi.org/10.1093/cid/cit354>

Schulz, F., Alteio, L., Goudeau, D., Ryan, E. M., Yu, F. B., Malmstrom, R. R., Blanchard, J., & Woyke, T. (2018). Hidden diversity of soil giant viruses. *Nature Communications*, 9(1), 4881. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07335-2>

Wommack, K. E., & Colwell, R. R. (2000). Virioplankton: Viruses in Aquatic Ecosystems. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(1), 69–114. <https://doi.org/10.1128/MMBR.64.1.69-114.2000>

Zauberman, N., Mutsafi, Y., Halevy, D. B., Shimoni, E., Klein, E., Xiao, C., Sun, S., & Minsky, A. (2008). Distinct DNA Exit and Packaging Portals in the Virus *Acanthamoeba polyphaga* mimivirus. *PLoS Biology*, 6(5), e114. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060114>

8. Dedikace

Funkční vzorek *ELISA test pro detekci protilátek proti L725 proteinu Acanthamoeba polyphaga mimiviru v séru ryb* byl vytvořen v rámci projektu PROFISH CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000869 financován ERDF v operačním programu VVV MŠMT.

VÚVeL 

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.
Hudcova 296/70
621 00 Brno
Czech Republic
Tel.: +420 5 3333 1111; www.vri.cz; e-mail: vri@vri.cz