



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Sciences

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

**Problematika statimové diagnostiky klíčové
encefalitidy**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program:

ZDRAVOTNÍ LABORANT

Autor: Lenka Myslivcová

Vedoucí práce: MVDr. Václav Fejt

České Budějovice 2019

Prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci s názvem „*Problematika statimové diagnostiky klíšťové encefalidity*“ jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů v seznamu citované literatury.

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

V Českých Budějovicích dne

.....

Poděkování

Děkuji vedoucímu své bakalářské práce MVDr. Václavu Fejtovi za cenné rady, čas, ochotu a trpělivost, se kterou se mi věnoval. Dále děkuji celé své rodině a přátelům za pomoc a podporu, kterou mi poskytovali po celou dobu mého studia.

Problematika statimové diagnostiky klíšťové encefalitidy

Abstrakt

Ve své bakalářské práci jsem se zabývala statimovou diagnostikou klíšťové encefalitidy v nemocnici Havlíčkův Brod. Praktická část byla prováděna v imunologické laboratoři na Oddělení společných laboratoří v nemocnici Havlíčkův Brod, do které byl ke konci roku 2018 zakoupen přístroj ChorusTrio, který urychlil diagnostiku vzorků od pacientů s podezřením na klíšťovou encefalitidu. Tento přístroj je bohužel vhodný pouze pro vyšetřování sér, a proto se využívá převážně ke kontrole protilátek před nebo po očkování. V roce 2019 byl zakoupen nový přístroj, ReaScan rapid test, který je využíván ke statimové diagnostice. Je to jednoduchý a rychlý imunochromatografický test, díky kterému jsme schopni potvrdit nebo vyvrátit diagnózu klíšťové encefalitidy během 30 minut.

V teoretické části jsem zpracovala odbornou literaturu týkající se klíšťové encefalitidy, viru klíšťové encefalitidy, její diagnostiky a dalších příbuzných témat.

V praktické části jsem se zabývala metodami, jejichž princip je popsán v teoretické části, v kapitole Laboratorní diagnostika klíšťové encefalitidy v nemocnici Havlíčkův Brod, a jejichž pracovní postupy jsou popsány v kapitole Metodika. Ze získaných dat a z dat z LISu (laboratorní informační systém) jsem vypracovala statistiku, kde jsem zhodnotila rychlost návratu výsledku laboratorního vyšetření.

Cílem mé práce bylo zhodnotit stávající statimovou diagnostiku klíšťové encefalitidy, se zvláštním důrazem na TAT (dobu návratu výsledku vyšetření), a nalézt případné cesty ke zlepšení této diagnostiky.

Klíčová slova

klíšťová encefalitida; statimová diagnostika; statim; ELISA; imunologie

The Issue of Urgent Diagnostics of Tick-borne Encephalitis

Abstract

In my bachelor thesis I dealt with urgent diagnostics of tick-borne encephalitis in the hospital of Havlíčkův Brod. The practical part was carried out in the immunology laboratory in the Joint Laboratories Unit in the hospital of Havlíčkův Brod, where the ChorusTrio device was purchased at the end of 2018. This device accelerated the diagnosis of samples from patients with suspected tick-borne encephalitis. Unfortunately, this device is only suitable for screening sera and is therefore mainly used to control antibodies before or after vaccination. In 2019 a new device, the ReaScan rapid test, was purchased and used for statim diagnostics. It is a simple and fast immunochromatographic test that allows us to confirm or refute the diagnosis of tick-borne encephalitis within 30 minutes.

In the theoretical part I elaborated professional literature about tick-borne encephalitis, tick-borne encephalitis virus, its diagnostics and other related topics.

In the practical part I dealt with methods whose principles are described in the theoretical part, in the chapter Laboratory diagnostics of tick-borne encephalitis in the hospital of Havlíčkův Brod, and whose working procedures are described in the chapter Methodology. From the obtained data and from the data from the LIS (Laboratory Information System) I compiled statistics, in which I evaluated the rate of return of the results from the laboratory examination.

The aim of my bachelor thesis was to evaluate the existing statim diagnostics of tick-borne encephalitis with special emphasis on TAT (time of return of the examination results) and to find possible ways how to improve the diagnostics.

Key words

tick-borne encephalitis; urgent diagnostics; statim, ELISA; immunology

Obsah

1. Úvod.....	8
2. Teoretický úvod.....	9
2.1 Klíšťová encefalitida.....	9
2.1.1 Faktory ovlivňující průběh klíšťové encefalitidy.....	10
2.1.2 Terapie.....	10
2.1.3 Vakcinace.....	10
2.2 Ixodidae (klíšťatovití).....	11
2.2.1 Proces vývoje klíšťat.....	12
2.2.2 Klíště obecné (<i>Ixodes ricinus</i>).....	12
2.3 Onemocnění přenášená klíšťaty.....	13
2.3.1 Bakteriální infekce.....	13
2.3.2 Virové infekce.....	14
2.3.3 Parazitární infekce.....	15
2.4 Historie objevu nemoci.....	15
2.4.1 Objev viru na území ČR.....	16
2.5 Taxonomie viru.....	16
2.5.1 Stavba virové částice.....	17
2.5.2 Komplex virů klíšťové encefalitidy.....	17
2.6 Infekce hostitelské buňky.....	19
2.6.1 Efekt virové infekce na hostitelskou buňku.....	20
2.6.2 Působení interferonů.....	20
2.7 Patogeneze klíšťové encefalitidy.....	20
2.7.1 Vstup viru do organismu.....	20
2.7.2 Šíření viru v organismu.....	21
2.8 Obraz imunitního systému při klíšťové encefalitidě.....	22
2.8.1 Buněčná imunitní odpověď.....	22

2.8.2 Humorální imunitní odpověď	23
2.9 Diagnostika klíšťové encefalitidy	23
2.9.1 Klinická diagnostika	23
2.9.2 Laboratorní diagnostika	23
2.9.3 Laboratorní diagnostika klíšťové encefalitidy v nemocnici Havlíčkův Brod	26
3. Cíle práce	28
4. Metodika	29
4.1 Úvod do metodiky	29
4.2 Cytologické vyšetření mozkomíšního moku	29
4.2.1 Nativní preparát	29
4.2.2 Trvalý preparát	30
4.3 ELISA	31
4.4 Chorus Trio antiTBE IgM	33
4.5 ReaScan TBE IgM	34
4.6 Zpracování dat	36
5. Výsledky	37
5.1 Cytologické vyšetření likvoru	37
5.2 Stanovení protilátek metodou ELISA	39
5.3 Stanovení protilátek metodou ChorusTrio	42
5.4 Stanovení protilátek pomocí ReaScan	43
5.5 Porovnání použitých metod	44
6. Diskuze	45
7. Závěr	47
8. Seznam literatury	48
9. Přílohy	53
10. Seznam zkratk	60

1. Úvod

Klíšťová encefalitida je typická arboviróza (infekce přenášená členovci). Vektorem přenosu jsou klíšťata rodu *Ixodes* (v České republice nejčastěji *Ixodes ricinus*). Virus se do klíštěte dostává během sání na infikovaném zvířeti a přebývá v jeho slinných žlázách. (Beneš, 2009) Jedná se o infekční onemocnění centrálního nervového systému s typickým dvoufázovým průběhem. (Beauté et al. 2018)

U klíšťové encefalidity, stejně jako u dalších neuroinfekcí, je důležitá včasná a rychlá diagnostika. Například lymská borelióza má prvotní příznaky stejné jako klíšťová encefalitida, ale následující léčba je odlišná. Aby nedocházelo k poškození pacienta, je nutné zajistit dobře fungující personál, a to jak na oddělení, na kterém je pacient hospitalizován, tak v laboratoři, kde je vzorek zpracováván.

Laboratorní diagnostika je založená na cytologickém vyšetření likvoru (jak vyšetření počtu buněk, tak vyšetření typu buněk) a na průkazu specifických protilátek (IgM a IgG).

2. Teoretický úvod

2.1 Klíšťová encefalitida

Klíšťová encefalitida (KE) je nejvýznamnější arbovirovou infekcí, napadající lidskou centrální nervovou soustavu (CNS) v Evropě a severní Asii. (Ruzek et al., 2019) Onemocnění způsobuje virus KE a má charakteristický dvojfázový průběh (pozorován přibližně v 51–87 % případů). (Mickiene et al., 2005) Po uplynutí inkubační doby (10–14 dní po přisátí klíštěte) se objevují první nespecifické chřipkové příznaky – především zvýšená teplota. (Průša, 2012) Dalšími příznaky této fáze jsou celková únava a slabost, bolest hlavy, zad a končetin, mohou se objevit i gastrointestinální obtíže. Tato počáteční fáze trvá obvykle méně než týden, po ní následuje asymptomatické období, trvající obvykle kolem osmi dní. (Mickiene et al., 2005) Po uplynutí tohoto období zdánlivé úzdravy dochází k propuknutí neuroinfekce. (Průša, 2012)

Projevy KE mohou skončit už po první fázi nemoci a dále se nerozvinout. Tomuto typu onemocnění se říká abortivní. Abortivní forma KE může být buďto naprosto asymptomatická, nebo se může projevovat pouze lehkým horečnatým onemocněním, zahrnujícím horečku, bolest hlavy, zvracení apod. Neprojeví se zde žádná forma encefalitidy. (Ruzek et al., 2019)

Nejméně třetinu pacientů postihne i druhá fáze s neurologickými příznaky. Tato druhá fáze je zastoupena ve většině endemických zemích. Druhá fáze nemoci může být rozdělena do meningeální a lokalizované formy. Lokalizovaná forma, která se může dělit na meningoencefalitidu, meningoencefalomyelitidu a encefaloradiculitidu, je charakteristická lézemi v CNS. (Ruzek et al., 2019)

U některých pacientů s KE může dojít ke vzniku chronické podoby nemoci. Infekční proces zůstává nezměněný. Aktivní virus KE po dlouhou dobu přebývá v CNS. (Ruzek, et al., 2019)

Asymptomatické období mezi první a druhou fází trvá od 1 do 20 dnů (obvykle 8). Druhá neurologická fáze začíná tím, že je tělesná teplota vyšší o 1–2 °C, než tomu bylo v první fázi. Klinické příznaky druhé fáze můžeme rozdělit na mírné, středně závažné nebo závažné. (Ruzek, et al., 2019)

Meningitida je spojována s bolestí hlavy, nevolností, zvracením, bolestí očí, fotofóbií apod. Pacienti se cítí slabí a mají ztuhlé krční svaly. V mozkomíšním moku je detekován mírně zvýšený počet lymfocytů a zvýšená koncentrace proteinů. (Ruzek, et al., 2019) Pacienti s meningitidou stráví v nemocnici 5–38 dní. (Kaiser, 2012)

Meningoencefalitida je pozorována u 50 % dospělých trpících KE. Tato forma KE má ve srovnání s meningitidou závažnější průběh a vyšší úmrtnost. Pacienti se cítí slabí, unavení, stěžují si na těžké bolesti hlavy a zvracení. Mohou trpět bludy, halucinacemi, ztrátou orientace v čase a místě apod., může dojít až ke kómatu. Difúzní forma meningoencefalitidy se projevuje širokou škálou výše popsaných příznaků, lokalizovaná forma se projevuje lokálním poškozením mozku. (Ruzek, et al., 2019)

Pacienti s **meningoencefalomyelitidou** mají zkušenosti s parézou zad, rukou, nohou a dalších částí těla. Charakteristickým příznakem je, že pacienti nejsou schopni udržet hlavu ve vertikální pozici. (Ruzek, et al., 2019)

2.1.1 Faktory ovlivňující průběh klíšťové encefalitidy

Průběh celého onemocnění KE je ovlivněn řadou faktorů. V rámci viru se jedná o virulenci daného kmene a také jeho dávku v organismu. U pacienta patří mezi důležité faktory pohlaví, věk (u starších osob je onemocnění vážnější s horšími následky), stav imunity i jeho genotyp. (Kindberg, et al., 2008)

2.1.2 Terapie

V současné době nemáme žádnou dostupnou specifickou léčbu KE, ale existuje několik způsobů, jak můžeme pozitivně ovlivnit vážnost onemocnění v jakékoli jeho fázi. (Ruzek, et al., 2019) Léčí se pouze symptomy; dosud nebyla objevena antivirotika specifická pro tuto nemoc. (Pruša, 2012)

2.1.3 Vakcinace

První vakcína byla vyvinuta v roce 1937 v tehdejší Sovětské svazu. Tato první vakcína byla efektivní, ale měla mnoho dalších účinků. (World Health Organization, 2011)

V roce 1971 profesor Christian Kunz inicioval spolupráci Virologického institutu ve Vídni s Mikrobiologickým výzkumným ústavem v Porton Down, která vedla ke vzniku inaktivované vakcíny, která byla vhodná pro komerční velkovýrobu. Vakcína byla připravena za použití rakouského klíšťového viru, pomnoženého v kuřecím embryu. Po

dalších úpravách byl inaktivován formalinem a stabilizován lidským albuminem a hydroxidem hlinitým, který byl přidán jako adjuvans. V Rakousku bylo očkováno přes 400 000 lidí a sérologické testy vycházely velice uspokojivě u více než 90 % očkovaných. Nicméně, protilátky měly po druhé vakcíně tendenci klesat, a proto se zjistilo, že po uplynutí 9–12 měsíců je potřeba třetí vakcíny. Navzdory spokojenosti s touto vakcínou se začaly projevovat vedlejší příznaky, a to jak lokální, tak systémové (jako jsou bolesti hlavy, malátnost atd.). Předpokládalo se, že jsou tyto vedlejší příznaky způsobeny kontaminací buněčnými proteiny, a proto se přešlo k jinému procesu čištění vakcíny. Pokusy na dobrovolnících ukázaly, že tyto čistší vakcíny jsou vysoce účinné a míra vedlejších účinků byla značně zredukována. Tato vakcína se nazývá FSME-IMMUN a je používána pro očkování rizikových skupin od roku 1976. V následujících letech se rozšířila do dalších Evropských zemí. (Barrett, et al., 2003)

V současné době jsou rozšířeny čtyři kvalitní vakcíny – FSME-Immun a Encepur, které jsou vyráběny v Rakousku a Německu (jsou zaměřeny na evropský kmen viru), a dále TBE-Moscow a EnceVir, které jsou vyráběny v Rusku (jsou zaměřeny proti dálně-východnímu kmenu – proti němu je také zaměřena čínská vakcína, používaná v severní oblasti u hranic s Čínou). (World Health Organization, 2011)

Imunogenicita vakcín je hodnocena za použití metod ELISA, neutralizačních testů a hemaglutinačních testů. Přítomnost cirkulujících protilátek v dohodnuté nebo nad dohodnutou koncentrací je obvykle považováno za náhradní znak ochrany. (World Health Organization, 2011)

Vakcinace na Vysočině

Podle šetření, které provedla pro vlastní potřebu firma GlaxoSmithKline v roce 2015, bylo na Vysočině vakcinováno 27 % obyvatel. Jiná data nejsou k dispozici. (ústní sdělení KHS Vysočina, Územní pracoviště Havlíčkův Brod)

2.2 Ixodidae (klíšťatovití)

Čeled' zahrnuje nejběžnější klíšťata na našem území. Ústní ústrojí mají tvořené válcovitým chobotem (tzv. hypostomem), který má na spodní straně nazpět zahnuté háčky. Díky tomuto ústrojí je klíšťe schopno narušit pokožku hostitele a zachytit se v ráně, z toho důvodu je těžké klíšťe vytáhnout ven. Při sání klíšťata vypouští do rány sliny, obsahující ixodin, enzym, který brání srážení krve. (Votava, 2003)

2.2.1 Proces vývoje klíšťat

Klíště se vyvíjí přes vajíčko, larvu a nymfu v dospělého jedince (imago). Všechna vývojová stadia musí sát krev, aby se mohla dál vyvíjet. (Votava, 2003)

2.2.2 Klíště obecné (*Ixodes ricinus*)

U klíšťat se objevuje pohlavní dimorfismus – samička je větší než sameček. Sameček má černý lesklý hřbetní štítek, který utváří pevnou schránku těla, což způsobuje, že nemůže sát krev, a proto se nemůže zvětšovat. Zatímco samička má štítek jen na přední polovině hřbetu, zbytek těla má cihlovou barvu a je pružný, což umožňuje samičce zvětšovat své tělo při sání krve. (Votava, 2003)

Životní cyklus klíštěte trvá průměrně až tři roky, ale za příznivých podmínek se může zkrátit pouze na jeden rok. Během cyklu prochází klíště vývojovými stádii (dohromady jsou tři – larva, nymfa a dospělec) a v každém stádiu má jiného hostitele. Dospělá samička klade několik tisíc vajíček, ze kterých se (v závislosti na příznivosti podmínek) vylíhnou za 25–400 dnů larvy. Larvy nejsou velké ani jeden milimetr a mají šest nohou. Na dobu několika dnů se přichytí na drobné savce, nejčastěji drobné hlodavce nebo ptáky, a po nasátí odpadnou z hostitele na zem a mění se v nymfu. Nymfy, stejně jako dospělí jedinci, mají osm nohou, dosahují velikosti kolem jednoho milimetru a několik dnů parazitují na hostiteli (např. ježci, zajíci). Další přeměnou vzniká dospělý jedinec, tzv. imago, který se od nymfy liší přítomností pohlavního otvoru. Dospělci napadají převážně velká zvířata (dobytek, jeleny, psy atd.). Všechna vývojová stadia mohou sát lidskou krev. Po páření, které se odehrává buďto na hostiteli, nebo na vegetaci, a po jednom dlouhém sání krve (6–14 dní) zvětší samička až 200krát svůj objem a padá na zem. Po 8–30 dnech klade vajíčka (nebo přečká zimu a klade je až další rok na jaře) a hyne. (Votava, 2003)

Na našem území (a v celé střední Evropě) se v přírodě vyskytují klíšťata od dubna do října, v příznivých letech od března do listopadu. Charakteristickým místem jejich výskytu jsou hlavně okraje listnatých a smíšených lesů, křovinaté podrosty s dostatečnou vlhkostí, do nadmořské výšky 800 m. n. m. (výjimečně do 1000 m. n. m.). V České republice dosahuje sezóna klíšťat dvou vrcholů. Prvním z nich je období dubna až června, pak nastávají letní sucha a klíšťata zmenší svou aktivitu, druhým vrcholem je období září až říjen. S koncem listopadu se klíšťata stahují z vegetace do vrchní vrstvy půdy nebo do hrabanky, kde přečkávají zimu. Přezimovat mohou všechna vývojová stadia. (Votava, 2003)

2.3 Onemocnění přenášená klíšťaty

Klíšťata jsou nejvýznamnějším vektorem pro onemocnění přenášená členovci, a to jak pro člověka, tak pro zvířata. Klíšťata jsou zodpovědná za přenos mnoha infekčních agens (i. a.): bakterií, virů a také parazitů. Onemocnění spojovaná s těmito i. a. jsou většinou zoonózy. Lidé jsou posledními hostiteli tohoto patogenu. Přenos obvykle probíhá při sání klíštěte. Patogen může v klíštěti dlouhodobě přebývat a být přenášen z jednoho vývojového stadia na druhé (tzv. transstadiální přenos), ze samiček na vajíčko (vertikální přenos), nebo z klíštěte na klíště pomocí hostitele (horizontální přenos). (Boulanger et al., 2019)

Klíšťata mohou hostit různé mikroorganismy, které jsou detekovatelné pomocí jejich DNA, jejich přítomnost v klíšťatech není nutně spojená s infekčním rizikem pro člověka z několika důvodů: detekce patogenního DNA nemusí znamenat přítomnost živého patogenu, a také přítomnost živého patogenu nemusí znamenat, že je klíště schopno jeho přenosu. Klíšťata infikovaná bakterií, virem nebo parazitem nejsou schopna okamžitého přenosu i. a., protože i. a. musí nejprve dospět anebo migrovat do slinných žláz, a pak teprve může být přenesen na obratlovce. Tento proces může trvat až 24 hodin. (Boulanger et al. 2019)

Klíšťata jsou známá tisíce let a nemoci jimi způsobené byly objeveny před dlouhou dobou, nicméně nejvíce lékařských záznamů je datováno do dvacátého století. Je to způsobeno také tím, že lidé začali mít vliv na ekosystém klíšťat (zalesňování, odlesňování atd.). (Boulanger et al., 2019)

2.3.1 Bakteriální infekce

2.3.1.1 Lymská borelióza

Bakterie způsobující lymskou boreliózu patří do skupiny *Borrelia burgdorferi* sensu lato. (Boulanger et al., 2019) Jedná se o gramnegativní bakterii spirálovitého tvaru s bičíky na koncích těla. (Bednář, 1999)

Na severní polokouli je lymská borelióza nejčastějším onemocněním přenášeným klíšťaty. V Evropě je pozorováno pět druhů s patologickým účinkem na člověka. Tři z nich jsou pozorovány často: *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii*, *B. afzelii*; a další dva druhy se objevují zřídka: *B. spielmanii* a *B. bavariensis*. Hlavním vektorem v Evropě je *Ixodes ricinus*, v jižní Evropě a v Asii je to *I. persulcatus*, v USA *I. pacificus*. Zvířecí

rezervoár se značně liší podle druhu bakterie – u *B. afzelii* a *B. bavariensis* jsou těmito rezervoáry hlodavci, u *B. garinii* jsou to ptáci. U lidí je nejčastějším klinickým projevem typický kožní zánět, zvaný erythema migrans. V případě absence antibiotické léčby se může onemocnění rozvinout v diseminovanou formu a následně v pozdní diseminovanou formu se srdečním, kloubním, kožním nebo neurologickým postižením v závislosti na druhu i. a. Diagnostika je založena na metodě ELISA, jakýkoli pozitivní výsledek by měl být potvrzen westernblotem. (Boulanger et al., 2019)

2.3.1.2 Onemocnění vyvolané Rickettsií

Rickettsie jsou přenášeny různými členovci, včetně klíšťat. Tento rod zahrnuje malé intracelulární gramnegativní bakterie. Tyto bakterie interagují s endoteliálními buňkami, což zvýší permeabilitu cév, a to je příčinou klinických příznaků. Dohromady bylo identifikováno 25 patogenních druhů, rozdělených do tří skupin – tyfová skupina (bakterie jsou přenášeny přes vši a blechy), skupina skvrnitých horeček (20 z 21 druhů bakterií jsou přenášeny klíšťaty) a přechodná skupina. (Boulanger et al., 2019)

2.3.1.3 Tularémie

Francisella tularensis je gramnegativní intracelulární bakterie. Její prevalence je nízká, ale je velice virulentní a nakažlivá díky snadnému přenosu aerosolem. Jedná se převážně o zoonózu, nejcitlivějším druhem jsou hlodavci a zajáci. Klíšťata jsou schopna tuto nemoc přenášet, nicméně přímý přenos je častější (přímý kontakt – škrábnutí, kousnutí; orální cesta – konzumace nedostatečně připraveného masa, inhalace infekčního aerosolu). Klinické příznaky jsou odlišné, závisí na cestě vstupu do organismu. Nástup nemoci je náhlý, s chřipkovými příznaky. (Boulanger et al., 2019)

2.3.1.4 Bartonelóza

Bakterie z rodu *Bartonella* jsou gramnegativní, hemotropické bakterie, jejichž vektory jsou členovci. Během posledních dvaceti let bylo identifikováno 13 druhů této bakterie jako potencionálních patogenů pro člověka. (Boulanger et al., 2019)

2.3.2 Virové infekce

Na člověka i zvíře může být za pomoci klíštěte přeneseno nespočet virů. Většina jich patří do skupiny virů přenášných tzv. tvrdými klíšťaty – Bunyviridae, Flaviviridae a Reoviridae. Nejdůležitější infekcí přenášenou klíšťaty je klíšťová encefalitida a krymsko-konžská hemoragická horečka. (Boulanger et al., 2019)

2.3.2.1 Krymsko-konžská hemoragická horečka

Onemocnění bylo poprvé popsáno při epidemii těžké hemoragické horečky na Krymu ve 40. letech. Po izolaci antigeně totožného konžského viru, byl virus pojmenován jako virus krymsko-konžské hemoragické horečky. Vir patří do rodu Nairovirů z rodiny Bunyaviridae. Jedná se o velký obalený DNA virus. Geografické rozmístění viru závisí na rozmístění klíštěte, které ho přenáší. Virus cirkuluje v enzootickém cyklu, který zahrnuje velký počet obratlovců, pro které je onemocnění asymptomatické a projevuje se pouze u lidí. Velkou roli v cirkulaci viru hrají také ptáci migrující z Afriky. Mezi hlavní hostitele patří zajíci, ježci, drobní hlodavci a domestikované druhy zvířat (krávy, ovce, prasata). Pro člověka je hlavní infekční cestou kousnutí klíštěte, ale ke kontaminaci může také vést kontakt s infekčními tělními tekutinami nebo masem z infikovaného zvířete. Klinickými příznaky jsou charakteristické horečky, které přibližně v 50 % vedou k fatálnímu hemoragickému syndromu. Výskyt viru mezi klíšťaty je v Evropě poměrně nízký. (Boulanger et al., 2019)

2.3.3 Parazitární infekce

Klíšťata mohou přenášet i parazity. Pro člověka jsou nejpatogennější členové rodu *Babesia*. Rod *Babesia* je podobný rodu *Plasmodium* (zodpovědnému za malárii), ale jejich sporozoity jsou přítomny ve slinných žlázách klíšťat a přímo pronikají do erytrocytů. Nejvíce patogenním druhem pro člověka jsou *B. microti* a *B. divergens*. Klíšťata rodu *Ixodes* jsou vektorem těchto druhů. K přenosu parazita v jeho sporozoitické fázi dochází pouze několik dní po napadení hostitele, parazit musí nejprve dozrát ve slinných žlázách. Přírodními hostiteli tohoto druhu, sloužící jako rezervoár, jsou hlodavci, skot a jeleni. Případy lidské babesiózy jsou ojedinělé, ale vážné, a jsou pozorovány hlavně u imunodeficitních jedinců (40 % případů končí smrtí). Lidé i zvířata mohou být kontaminováni také krevní transfúzí. Klinické příznaky závisí na imunitním stavu hostitele. Hlavními příznaky jsou horečka, žloutenka, anémie a hemoglobinurie. Léčba závisí na stavu pacientova imunitního systému a na vážnosti infekce. (Boulanger et al., 2019)

2.4 Historie objevu nemoci

Klíšťová encefalitida byla poprvé diagnostikována ve třicátých letech dvacátého století mezi dělníky a pracovníky těžařského průmyslu. Předpokládalo se, že nemoc je virového původu a je přenášena komáry. V roce 1937 byla vyslána expedice z Moskvy pod

vedením profesora Lva Zilbera. Této expedice se účastnilo mnoho specialistů – virologové, mikrobiologové, fyzici a také tamější lékaři, kteří přišli s nemocí do přímého kontaktu. Expedice potvrdila virový původ onemocnění, byly izolovány první kultury viru klíšťové encefalidity, také byla určena i role přirozeného přenašeče – tajgové klíště *Ixodes persulcatus* – a bylo dokázáno, že virus cirkuluje mezi divokými obratlovci a klíšťaty. Expedice také popsala klinické projevy a patologické změny v organismu nakažených osob, navíc byla vyprodukována první experimentální inaktivovaná vakcína. (Ryzantseva et al., 2005)

K získání důkazů o virovém původu onemocnění a roli klíšťového vektora, zahájili vědci testování na nich samotných v extrémně obtížných podmínkách tajgy (bez základního vybavení, materiálů a léků). Tři vědci zahynuli na následky encefalidity a několik jich po těžké formě infekce zůstalo invalidních. (Ryzantseva, et al., 2005)

2.4.1 Objev viru na území ČR

Na našem území byly zjištěny první případy infekcí CNS způsobených klíšťaty poprvé v roce 1948. (Hloucal a Rampas, 1953) V roce 1949 se podařilo dr. Františku Galliovi izolovat virus – jednalo se o první izolaci viru klíšťové encefalidity na území střední Evropy. (Gallia et al., 1949) Nedlouho po této izolaci se sám dr. Gallia nakazil, prodělal těžkou neuroinfekci, a následně zemřel na následky jiné laboratorní infekce. (Růžek, 2015)

Paralelně izoloval virus z mozkomíšního moku a krve za asistence dr. Galii i primář Krejčí. Lékaři se tehdy správně domnívali, že onemocnění přenáší klíšťata (75 % pacientů udávalo přisáté klíště). Tato jejich domněnka byla zanedlouho potvrzena díky izolaci viru z různých stadií *Ixodes ricinus* na několika místech České republiky. Tak bylo dokázáno, že vektorem jsou klíšťata a pojmenovali virus jako „virus klíšťové encefalidity“. (Růžek, 2015)

Během následujících deseti let (od roku 1952) byl virus klíšťové encefalidity izolován v dalších evropských zemích. (Růžek, 2015)

2.5 Taxonomie viru

Rod *Flavivirus* je tvořen převážně viry, které přenáší komáři – virem žluté zimnice, virem dengue, virem japonské klíšťové encefalidity. Dále do tohoto rodu patří klíšťaty přenášené viry, viry množící se výhradně v členovcích a viry bez vektoru (nemají ho,

nebo není znám). Virus KE je v rámci rodu *Flavivirus* nejvýznamnějším zástupcem séroskupiny KE. (Růžek, 2015)

2.5.1 Stavba virové částice

Částice viru KE má oválný až kulovitý tvar s průměrem 50–60 nm. (Mansfield et al., 2009) Je obalená membránou, do které je vnořený glykoprotein E. Součástí obalu je také glykoprotein M. Virová RNA je uložena v kapsidě složené z bazického polypeptidu C. Glykoproteiny E tvoří u zralé částice dimer, na jehož hrotě se nachází hydrofobní fúzní peptid, díky kterému je virus schopen penetrovat do vnímavé buňky. (Rajčáni a Čiampor, 2006)

2.5.2 Komplex virů klíšťové encefalitidy

Do komplexu virů klíšťové encefalitidy patří antigeně příbuzné viry, které přenášejí klíšťata (na rozdíl od dalších flavivirů). Nejvýznamnější je virus klíšťové encefalitidy, který se dělí do dvou podtypů – evropský (virus klíšťové encefalitidy) a dálnévýchodní (virus ruské jaro-letní encefalitidy). Dalšími důležitými viry jsou virus Langat, louping ill, virus nemoci kyasanurského hvozdů, virus omské hemoragické horečky a virus powasan. (Votava, 2003) Vnitrodruhové rozdíly mezi viry komplexu klíšťové encefalitidy se projevují v jejich biologických vlastnostech, délce RNA a druhu klíštěte, které je přenášejí. (Rajčáni a Čiampor 2006)

2.5.2.1 Virus evropské klíšťové encefalitidy

Jedná se o nejvýznamnější virus rodu Flavivirů, z čeledi Flaviviridae. Jeho vlastnosti jsou srovnatelné s ostatními flaviviry. (Růžek, 2015)

Virus evropské klíšťové encefalitidy je nejdůležitějším virem rodu Flavivirů z čeledi Flaviviridae. Jeho vlastnosti jsou srovnatelné s vlastnostmi ostatních flavivirů (strukturním proteinem je mimo jiné bazický protein C, který tvoří nukleokapsidu a dva obalové proteiny E a M). Citlivost flavivirů obvykle zabraňuje perorální infekci (např. citlivost na nízké pH, lipolytickým a proteolytickým enzymům a žluči). I přes ochranné bílkovinné prostředí se virus zcela inaktivuje při 56 °C za 30 minut. Ve formě aerosolu je virus schopen zůstat dlouhodobě infekčním (aerosol je častou příčinou laboratorní infekce). (Votava, 2003)

V přírodním ohnisku nákazy cirkuluje virus mezi drobnými obratlovci (netýká se to pouze hlodavců, ale i hmyzožravců) a přenášejí ho klíště *Ixodes ricinus* ve svých různých

vývojových stádiích. Infekcí je ohrožen i dobytek pasoucí se v ohnisku, a to hlavně kozy (vylučují virus mlékem). (Votava, 2003)

Člověk je nejčastěji infikován po přisátí klíštěte *Ixodes ricinus*, které bylo infikované. Ohniska se nejčastěji nachází na okrajích lesů, převážně smíšených a listnatých. Klíšťata jsou nejaktivnější v období od pozdního jara až do podzimu. Mezi rizika patří i pití nesvařeného kozího mléka. (Votava, 2003)

2.5.2.2 Virus ruské jaro-letní encefalidity

Od viru evropské klíšťové encefalidity se liší malými rozdíly v antigenní stavbě proteinu E. Dalším rozdílem je jiný vektor a onemocnění způsobené tímto virem má těžší klinický průběh. Je přenášen klíštětem *Ixodes persulcatus*, s největším ohniskem v Rusku. Tento virus způsobuje těžké infekce, které mají většinou za následek obrnu. Smrtnost je okolo 20 %. (Votava, 2003)

2.5.2.3 Virus vrtivky (louping ill)

Virus vyskytující se na Britských ostrovech je blízkým příbuzným evropského typu klíšťové encefalidity. (Jeffries et al., 2014) Šíří se především mezi ovci a tetřevy. Infekce člověka je vzácná a vyvolává benigní onemocnění CNS. Nakaženi jsou především chovatelé ovcí. (Votava, 2003) Byla vyvinuta očkovací látka s inaktivovaným virem, pouze pro veterinární účely. (Jeffries et al., 2014)

2.5.2.4 Virus nemoci kyanurského hvozdu

Virus postihuje indické opice. (Votava, 2003) Je přenášen klíšťaty *Haemophysalis spinigera*. (Růžek, 2015) U lidí infekce probíhá jako hemorrhagická horečka s meningoencefalitidou. (Votava, 2003)

2.5.2.5 Virus omské hemorrhagické horečky

Vyvolává obdobné onemocnění jako virus nemoci kyanurského hvozdu, avšak vyskytuje se jenom na západní Sibiři. K nakažení člověka může také dojít po kontaktu s infikovanými ondatrami. (Votava, 2003)

2.5.2.6 Virus powssan

Tento virus je ostatním virům z komplexu KE antigenně nejvzdálenější. (Votava, 2003) Vyskytuje se v Rusku a Severní Americe. Přenáší ho různé druhy klíšťat. *Ixodes cookei* je hlavním přenašečem na severovýchodě USA a v Kanadě. Dalším z klíšťat, která přenáší virus v USA je *Ixodes scapularis* (dominantní ve státech Minnesota a Wisconsin).

Z klíšťat *Ixodes persulcatus*, *Haemaphysalis concinna* a *Haemaphysalis longicornis*, *Dermacentor silvarum* byl tento virus izolován v Rusku. (Ebel, 2010)

Přenos na člověka je velmi vzácný, ale pokud k němu dojde, vyvolává virus závažné encefalitidy provázené komplikacemi a vysokou mírou úmrtnosti. (Ebel, 2010)

2.6 Infekce hostitelské buňky

Napadení buňky virem začíná vazbou virové částice a specifického buněčného receptoru na povrchu buňky. Receptor se dosud nepodařilo objevit, ale předpokládá se, že se bude jednat o evolučně konzervovanou molekulu – např. heparansulfát (jedná se o mukopolysacharid, vyskytující se u velkého počtu buněk – to dává viru schopnost množit v buňkách různých živočišných druhů). (Růžek, 2015)

Po navázání viru na receptor virus proniká do buňky pomocí endocytózy (proces absorbování materiálu do buňky). Kolem absorbované látky se utvoří váček (vytvořený membránou buňky), později je pohlcovaná částice celá obklopená membránou buňky – vzniká endozom a částice prostupuje dovnitř buňky. Dojde k okyselení vnitřku endozomu, což vede ke konformačním změnám obalového virového glykoproteinu E, a dojde k splynutí virové membrány a membrány endozomu, díky tomu se uvolní nukleokapsida viru do buněčné cytoplazmy. Následně se nukleokapsida rozloží a uvolní se virová RNA. Protože je virová RNA pozitivně polární, může být přímo využita jako templát pro syntézu virového polyproteinu. (Mandl, 2005)

Existují dvě možné cesty tvorby nových virionů a jejich vyzrání. Tyto dva způsoby se označují jako *cis* a *trans*:

- *cis* maturace – viriony jsou kompletovány v cytoplazmě, pokračují k buněčné membráně, pučí, a získávají tak svůj obal;
- *trans* maturace – obalené viriony se hromadí v měchýřcích endoplazmatického retikula (ER), pokračují do Golgiho komplexu (GK) a za pomoci transportních váčků se dostávají k buněčné membráně, kde váčky splývají s buněčnou membránou a viriony se uvolní z buňky. (Šenigl et al., 2006)

Pokud virus KE infikuje buňky obratlovce, objeví se u nich maturace *trans*, u buněk klíšťat se vyskytuje maturace *cis*. (Šenigl et al., 2006)

2.6.1 Efekt virové infekce na hostitelskou buňku

Efekt infekce na hostitelskou buňku se liší podle organismu, který virus napadl:

- klíšťata – v jejich buňkách vyvolává virus produktivní perzistentní infekci, virus přebývá v buňce, množí se, ale samotná buňka není infekcí nijak narušená (Růžek et al., 2008);
- obratlovci – v buňkách obratlovců probíhá z důvodu infekce spousta fyziologických i morfologických změn, některé z nich mohou způsobit až smrt buňky (pomocí nekrózy nebo apoptózy). (Palus et al., 2014, Ruzek et al., 2009)

Buňky, které jsou infikovány virem začnou produkovat interferony (INF) I. typu. U zdravých (neinfikovaných) buněk navozují antivirový stav působením parakrinním, anebo působí autokrinním způsobem, a tak způsobují programovanou buněčnou smrt. (Best et al., 2005)

2.6.2 Působení interferonů

Poté, co se naváže molekula INF na specifický buněčný receptor, je spuštěna kaskádová reakce, jejímž cílem je stimulace INF-inducibilních genů. Antivirový stav může být navozen některými enzymy, které mohou katalyzovat syntézu nezvyklého oligonukleotidu z ATP. Ten poté aktivuje endoribonukleázu, působící destruktivně na mRNA, a to vede k omezení syntézy virových bílkovin. Jiný z enzymů, společně s dalším faktorem, zastaví syntézu všech proteinů v hostitelské buňce, včetně proteinů virových. (Best et al., 2005)

Virus KE je sice vysoce citlivý k působení INF, má ale schopnost inhibovat INF-iniciovanou kaskádovou reakci. (Best et al., 2005)

2.7 Patogeneze klíšťové encefalitidy

2.7.1 Vstup viru do organismu

Virus se do organismu dostává třemi způsoby:

1. přenos během sání infikovaného klíštěte – nejčastější způsob přenosu;
2. infekce během konzumace nakaženého nepasterizovaného mléka a dalších mléčných výrobků (především ovčích a kozích);
3. laboratorní nákaza (kontaminovaný aerosol, injekční jehla apod. – zejména v době před očkováním). (Růžek et al., 2010)

V našich podmínkách je virus nejčastěji přenesen na člověka přisátím klíštěte *Ixodes ricinus*. Jeho ústní ústrojí proniká při sání hluboko do hostitele; jeho sliny obsahují mnoho látek, díky kterým dokáže virus překonat obranu hostitele. Kromě látek, které brzdí koagulační kaskádu, se zde objevují i složky, bránící vzniku zánětlivého procesu. Dále obsahují složky, potlačující imunitní odpověď na přisání (např. prostaglandiny a cytokiny). (Chmelar et al., 2012) V okolí ústního ústrojí klíštěte se v důsledku zmnožení vaziva tvoří mohutný útvar tvaru kužele, kolem něj vzniká hustý zánětlivý infiltrát, který je tvořený převážně lymfocyty. (Anderson a Magnarelli, 2008)

2.7.2 Šíření viru v organismu

Virus musí překonat několik bariér, které chrání hostitele. Hlavní bariérou je kůže. (Ruzek et al., 2019) Po kousnutí klíštětem virus společně se slinami putuje do podkoží hostitele. Další bariérou je imunitní odpověď hostitele. (Ruzek et al., 2019) Může tak dojít ke krátkodobé virémii. (Labuda et al., 1996) Tato prvotní virémie není příčinou budoucího onemocnění. (Rajčáni a Čiampor 2006) V místě sání dochází k primárnímu pomnožení viru v různých typech buněk kůže a podkoží. (Labuda et al., 1996) Mezi první buňky prezentující antigen (APC) patří Langerhansovy buňky (vystavují virus KE T-lymfocytům). Kromě funkce APC, slouží Langerhansovy buňky jako přenašeči viru do spádových lymfatických uzlin. (Málková a Filip, 1968) Lymfatické uzliny mají významnou roli v patogenezi KE. Uvnitř lymfatických uzlin se virus pomnožuje v makrofázích; tato schopnost (infikovat makrofágy), je zcela zásadní pro další rozvoj infekce. Virus, který se nedokáže množit uvnitř makrofágů, nemůže vyvolat virémii, a dosáhnout tak CNS a způsobit neuroinfekci. (Ahantarig et al., 2009)

Po masivním pomnožení viru v lymfatických uzlinách, následuje uvolňování viru do krevního oběhu. Nastává tzv. primární virémie. (Málková a Fraňková, 1959) Během ní je v krvi přítomno poměrně málo viru, který je ale zanesen do mnoha různých tkání a orgánů. V nich se virus množí, uvolňuje se zpět do krevního řečiště a objevuje se sekundární virémie. Projevem infekce jsou v tomto období nespecifické prodromální příznaky. V případě ne zcela vyvinuté infekce jsou prodromy jedinými příznaky. (Růžek, 2015)

Primární virémie bývá krátkodobá, sekundární přetrvává několik dnů. Virus během ní překonává hematoencefalickou bariéru (HEB), vytváří tak přechod mezi krevními kapilárami a mozkovou tkání. Endotel mozkových kapilár je odlišný od endotelu v jiných

oblastech. Zde jsou endotelové buňky spojeny těsnými kontakty (tzv. tight junction). Není dosud zcela objasněno, jak virus překonává HEB. Tím virus překonal třetí bariéru chránící hostitele. (Ruzek et al., 2019) Je známo několik možných mechanismů, kterými může virus do CNS pronikat:

1. virus putuje po nervových zakončeních;
2. mechanismus „trojského koně“ – infikované imunitní buňky migrují do CNS;
3. jako následek infekce endotel vystylajících buněk;
4. virus se difúzně šíří mezi endoteliálními buňkami v důsledku zvýšené permeability HEB. (Růžek, 2015)

Pokusy na laboratorních myších naznačily, že rozrušení HEB není nutné pro pronikání viru KE do mozku, protože permeabilita HEB byla zvýšena až po dosažení velkého množství virů v mozku. (Růžek et al. 2011)

2.8 Obraz imunitního systému při klíšťové encefalitidě

Úkolem imunitního systému je zničit virovou infekci a zároveň minimálně poškodit vlastní organismus. Protivirovou imunitní odpověď můžeme rozdělit do čtyř fází:

1. zabránění penetrace viru – účinný způsob je nepřítomnost receptorů pro vir, dále i dobře funkční slizniční imunitní systém;
2. zabránění replikace viru – to je zabezpečováno interferony;
3. eliminace volných virionů;
4. eliminace virem infikovaných buněk. (Krejsek a Kopecký, 2004)

Viry se běžně skrývají imunitnímu systému uvnitř virem infikovaných buněk. Takto infikované buňky mají na svém povrchu virové antigeny, které rozpoznávají cytotoxické T_c-lymfocyty, anebo mají pozměněný povrch tak, aby je rozpoznávaly a ničily NK (natural killers) buňky. (Krejsek a Kopecký, 2004)

2.8.1 Buněčná imunitní odpověď

Lytické působení NK buněk zajišťují membránově vázané i nitrobuněčné molekuly. Uvnitř NK buněk jsou přítomna granula, která obsahují perforiny. Perforiny jsou bílkoviny, které se v průběhu kontaktu s infikovanou buňkou uvolňují z granul, vmezeří se do cytoplazmatické membrány infikované buňky, a vytvoří pór, kterým se do buňky dostávají granzymy, které dále napomáhají lýze buňky. (Krejsek a Kopecký, 2004)

2.8.2 Humorální imunitní odpověď

Během infekce virem KE vznikají specifické protilátky, které reagují s virovými antigeny, a to zejména ve třídě imunoglobulinů M (IgM) a imunoglobulinů G (IgG). Imunitní systém napadeného organismu během raného stádia infekce začíná nejprve s tvorbou IgM protilátek, která je provázena nespecifickými příznaky infekce. Později se také začínají tvořit protilátky IgG. Oba tyto typy protilátek lze detekovat v séru i likvoru. V mozkomíšním moku narůstá množství protilátek IgM od prvního dne od objevení nespecifických symptomů až po šestý den infekce, kdy se začínají objevovat encefalitické příznaky. IgM dosahuje nejvyšších hodnot přibližně po dvou týdnech od objevení nespecifických příznaků a v séru infikovaných pacientů přetrvávají po dobu 6–7 týdnů. Protilátky IgG jsme schopni detekovat po dobu 11–13 měsíců; jejich přítomnost je dlouhodobá, což zapříčiňuje dlouhodobou, někdy až celoživotní imunitu proti KE po onemocnění. (Günther et al., 1996; Růžek, 2015)

2.9 Diagnostika klíšťové encefalitidy

2.9.1 Klinická diagnostika

KE nemá typický klinický průběh, není možné stanovit diagnózu pouze na základě klinického vyšetření, proto je nutné doplnit klinické vyšetření o laboratorní diagnostiku. (Růžek, 2015)

Důležité jsou informace pojednávající o době před začátkem klinických příznaků (zda měl pacient v posledních týdnech prisáté klíšťe, zda se pohyboval v zasažených oblastech, zda konzumoval nepasterizované výrobky z kozího mléka apod.). Je důležité si pamatovat, že infikovaná klíšťata se nenacházejí pouze ve volné přírodě, ale i v městských zeleních (např. parcích). Někteří z postižených pacientů neudávají prisátí klíšťete. (Růžek, 2015) Prisáté klíšťe udává pouze 50–60 % postižených. (Mickiene et al. 2005)

Proto je důležité si uvědomit, že tato data jsou pouze pomocnou informací a nelze z nich vyvozovat konečnou diagnózu. (Růžek, 2015)

2.9.2 Laboratorní diagnostika

Vzhledem k tomu, že klinické příznaky onemocnění nejsou specifické, musí být skutečná diagnóza stanovená v laboratoři. V zásadě lze virus izolovat z krve během první

viremické fáze, dále lze izolovat virově specifickou RNA za pomoci RT-PCR (Holzmann, 2003)

Ve vzácných případech může být virus identifikován z CNS za pomoci elektronové mikroskopie nebo detekován pomocí RT-PCR z mozku a dalších orgánů. (Holzmann, 2003)

Nicméně tyto postupy nemají velký význam pro pacienty přijaté do nemocnice ve druhé fázi onemocnění, kdy se projevují neurologické příznaky. V této fázi je virus „vyčištěn“ z krve (i mozkomíšního moku), a je započata humorální imunitní odpověď. (Holzmann, 2003)

2.9.2.1 Sérologická diagnostika

Diagnostika KE je založena na průkazu specifických protilátek, které jsou obvykle detekovatelné na počátku druhé fáze, a kterým rapidně vzrůstá titr. V dnešní době je metodou volby pro rychlou detekci KE-specifických IgM a IgG protilátek ELISA. A to jak ze séra, tak mozkomíšního moku. U většiny pacientů, kteří jsou v manifestní fázi nemoci KE-specifické IgM a IgG protilátky detekovatelné už v prvním vzorku. V likvoru jsou specifické protilátky detekovatelné pouze u 50 % těchto pacientů, deset dnů po nástupu nemoci se stávají detekovatelnými. (Holzmann, 2003)

Protilátky IgM mohou být detekovatelné několik měsíců po infekci, protilátky IgG přetrvávají po celý život, a zabraňují tak reinfekci. (Holzmann, 2003)

Interpretace výsledků není u neočkovaných pacientů tak složitá jako u očkovaných pacientů. Od počátku neurologické fáze je v séru obvyklá přítomnost IgM i IgG protilátek. Je nutné opakovat vyšetření, pokud se pacient v minulosti podrobil očkování a sérologické výsledky jsou nejasné. (Průša, 2012)

Možné výsledky sérologických testů:

- a) specifické IgM i IgG protilátky jsou ve vzorku přítomny – dokazují infekci KE nebo nedávné očkování;
- b) specifické IgM i IgG protilátky nejsou ve vzorku přítomny – je nutné otestovat kontrolní vzorky (při podezření na akutní infekci);
- c) specifické IgM jsou ve vzorku přítomny, IgG protilátky nejsou ve vzorku přítomny – podezření na KE, nutno vyšetřit kontrolní séra;

- d) specifické IgM protilátky nejsou ve vzorku přítomny, specifické IgG protilátky jsou ve vzorku přítomny – tento výsledek značí prodělanou infekci nebo očkování. (Holzmann, 2003)

2.9.2.2 Zobrazovací metody

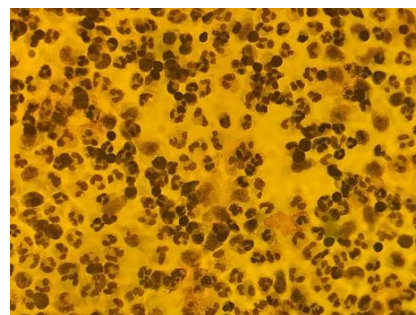
Intracerebrální poškození mozku při KE je vzácně dokázáno magnetickou rezonancí. Podle studie byly abnormální výsledky detekovány pouze u 17,5 % z testovaných pacientů. (Kaiser, 2012) Stejně tak výpočetní tomografie nemá specifickou hodnotu při diagnostice KE, protože nikdy neodhalila žádné patologické nálezy. (Mickiene et al. 2005)

2.9.2.3 Vyšetření krve

- a) Krevní obraz – vyšetření krevního obrazu neposkytuje žádné specifické informace, nález odpovídá běžnému virovému onemocnění. (Růžek, 2015) Během první fáze onemocnění se u přibližně 20 % pacientů vyskytuje neutropenie, trombopenie a abnormální hodnota jaterních enzymů. Ve druhé fázi nemoci odhalí krevní obraz vzestup počtu bílých krvinek (přibližně u 75 % pacientů), dále se vyskytuje zvýšená sedimentace erytrocytů (přibližně u 80 % pacientů). (Mickiene et al., 2005)
- b) Biochemické vyšetření – přibližně u 90 % pacientů se vyskytují se zvýšené hodnoty C-reaktivního proteinu. (Kaiser, 2012)
- Přítomnost zánětlivých markerů v séru je běžně sdružená s horečkou, bolestmi hlavy a dalšími příznaky svědčícími pro bakteriální meningitidu, což je jeden z důvodů, proč jsou někteří pacienti zpočátku onemocnění léčeni antibiotiky, dokud sérologie neprokáže KE. (Mickiene et al., 2005)

2.9.2.4 Vyšetření mozkomíšního moku

V průběhu meningoencefalitidy jsou hladiny glukózy a laktátu v normě, dále bývají lehce zvýšené proteiny (albumin), a také bývá přítomna pleocytóza. Na počátku nemoci je v mozkomíšním moku počet bílých krvinek zvýšený až na hodnoty 1000 buněk/mm³ (průměrný počet bílých krvinek je okolo 60 buněk/μl krve),



Obrázek 1: Mikroskopický obraz likvoru s dominancí neutrofilů (zdroj: vlastní)

s dominancí neutrofilů (což může vést k prvotnímu podezření na bakteriální meningitidu) (obr.1). (Kaiser, 2012)

2.9.2.5 Kultivace viru

Tato metoda se k běžné diagnostice nepoužívá. (Průša, 2012)

2.9.2.6 PCR

Praktické využití přímé izolace virové RNA je téměř nulové. Tato metoda se používá převážně k výzkumu. (Růžek, 2015) K tomu, aby mohla být izolována RNA viru, je potřeba, aby se onemocnění nacházelo ve viremické (první) fázi. Problémem je, že nemocní vyhledají lékaře až po objevu neurologických příznaků (druhá fáze), tehdy již v těle probíhá imunitní reakce na vir a jeho hladina v těle klesá. (Mészárosová, 2016)

2.9.3 *Laboratorní diagnostika klíšťové encefalitidy v nemocnici Havlíčkův Brod*

2.9.3.1 Vyšetření mozkomíšního moku

- a) **Stanovení počtu elementů mozkomíšního moku za pomoci Fuchs-Rosenthalovy komůrky** – v tomto případě se jedná o nativní preparát barvený směsí ledové kyseliny octové, fenolu a fuchsinu. Principem reakce je, že díky kyselině octové zhemolyzují erythrocyty, a tím jsou nám lépe viditelné buňky jaderné. Fuchsin tyto jaderné buňky obarví. Buňky počítáme při zvětšení 200krát, nehledíme na typy buněk, pouze na jejich počet (příloha 2). (Adam, 2000)
- b) **Stanovení typu buněk v mozkomíšním moku** – po přípravě suchého cytologického preparátu se vzorek obarví podle Pappenheima. Nejprve se sklíčko přelije barvivem May-Grünwald, které díky obsaženému methanolu vzorek zároveň fixuje. Poté se převrství destilovanou vodou, aby nedošlo k zaschnutí preparátu. Po slítí destilované vody se sklíčko převrství roztokem Giemsa-Romanowski (zvýrazní jádra buněk). Po skončení barvení a zaschnutí preparátu se sklíčko montuje za pomoci vhodného montovacího média (příloha 2). (Adam, 2000)

2.9.3.2 Sérologická diagnostika

- a) **Klasická ELISA** (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) – jedná se o metodu, detekující množství specifických protilátek v odebraném vzorku. Na mikrotitrační destičce je navázán specifický antigen, na který se po přidání vzorku naváží specifické protilátky. Na navázané protilátky se dále naváže konjugát (jedná se o značenou zvířecí anti-lidskou protilátku s křenovou peroxidázou). Aktivita

enzymu se zjišťuje přidáním substrátu, v případě positivity dojde ke změně barvy (roztok zmodrá). Reakce je zastavena ukončovacím roztokem. Modré zbarvení se změní na žluté a celá destička se fotometricky změří. Vzniklé zbarvení je přímoúměrné množství specifických protilátek ve vzorku. (TestLine, 2018)

- b) Chorus Trio** – jedná se o imunoenzymatickou metodu pro kvalitativní stanovení protilátek pro KE ve vzorcích séra nebo citrátové plazmy, založené na principu metody ELISA. Antigen je navázán na pevné fázi, specifické protilátky se navazují během inkubace s ředěným patientským sérem. Po promytí je přidán konjugát, složený z anti-lidských protilátek konjugovaných na křenové peroxidáze. Nenavázaný konjugát je odstraněn, a je přidán peroxidázový substrát. Vzniklé zbarvení je přímoúměrné koncentraci specifických protilátek ve vzorku. (příloha 3) (Diesse, 2018)
- c) ReaScan rapid test** – jedná se o kvalitativní imunochromatografický laterální průtokový test. IgM protilátky ve vzorku jsou zachyceny na testovací lince s anti-lidskými IgM protilátkami. Specifické protilátky jsou detekovány pomocí rekombinantního zlatého komplexu. Intenzita vzniklého červeného proužku je přímoúměrná množství specifických KE-protilátek ve vzorku. Intenzita je převedena na číselnou hodnotu pomocí ReaScan rapid test readeru. Konečný výsledek je dosažen porovnáním hodnoty z readeru s cut-off hodnotami specifickými pro danou šarži. (příloha 4) (Reagena, 2017)

3. Cíle práce

Cílem mé práce bylo zhodnocení stávajícího stavu diagnostiky klíšťové encefalitidy se zvláštním důrazem na TAT (doba návratu výsledků vyšetření).

Výstupem pro praxi bylo nalezení případných cest pro zlepšení této diagnostiky.

4. Metodika

4.1 Úvod do metodiky

Praktickou část své bakalářské práce jsem prováděla v imunologické laboratoři oddělení společných laboratoří nemocnice Havlíčkův Brod. Zde mi také byly poskytnuty vzorky sér a likvorů a všechno potřebné vybavení pro práci.

V nemocnici Havlíčkův Brod se KE (ze vzorků sér i likvorů) rutinně i statimově vyšetřovala pouze jednou týdně (obvykle v úterý), a to metodou ELISA. Výjimkou bylo cytologické vyšetření likvoru, které mělo statut statimu, a vyšetřovalo se neprodleně po příjmu do laboratoře. Pacientům se pomocí cytologického vyšetření likvoru diagnostikovala neuroinfekce, ale na diagnostiku přesného onemocnění se muselo počkat někdy i více než týden. Specifické protilátky proti KE jsou v séru stabilní týden (při skladování v ledničce mezi 2–8 °C).

Ke změně došlo ke konci roku 2017, kdy byl do laboratoře pořízen přístroj Chorus Trio, který umožnil rychlejší diagnostiku KE, ale pouze ze sér pacientů. I z tohoto důvodu se nejčastěji využívá ke kontrole protilátek po vakcinaci.

K další změně došlo v roce 2018. Do imunologické laboratoře byl pořízen statimový přístroj ReaScan rapid test, který zkrátil dobu čekání na výsledek vyšetření. Lze na něm testovat jak séra, tak likvory. Díky němu jsme schopni potvrdit nebo vyvrátit diagnózu klíšťové encefalitidy během 30 minut.

4.2 Cytologické vyšetření mozkomíšního moku

4.2.1 Nativní preparát

Laboratorní vybavení

- mikropipety (100 µl a 10 µl)
- zkumavky eppendorf
- barvicí roztok (směs ledové kyseliny octové, fenolu a fuchsinu)
- Fuchs-Rosenthalova komůrka + krycí sklíčko
- časovač
- světelný mikroskop

Postup přípravy nativního preparátu

1. Do zkumavky eppendorf jsem napipetovala 100 μ l mozkomíšního moku, společně s 10 μ l barvicího roztoku, a takto vzniklou směs jsem promíchala a nechala stát 5–10 minut.
2. Pomocí pipety jsem roztok nanasla do komůrky pod sklíčko a pozorovala pod mikroskopem při zvětšení 100krát.

4.2.2 Trvalý preparát

Laboratorní vybavení

- Pasteurova pipeta
- podložní + krycí sklo
- cytocentrifuga s příslušenstvím
- barvicí stojánek
- barvicí roztoky (May-Grünwald, Giemsa-Romanowski)
- destilovaná voda
- krycí sklíčko
- kanadský balzám
- časovač

Postup přípravy trvalého preparátu

a) Příprava preparátu na sklíčku

1. Vzorek likvoru jsem pomocí Pasteurovy pipety napipetovala do nástavce upevněného na podložní sklíčko (jedná se vlastně o zkumavku bez dna, kde podložní sklíčko tvoří dno tohoto držáku).
2. Takto připravené sklíčko se vloží do cytocentrifugy a stáčí se 5 min při 1000 otáčkách, dojde k sedimentaci buněčných elementů v likvoru. Po odstranění držáku se sklíčko nechá volně uschnout.

b) Barvení preparátu

1. Zaschlý preparát jsem přelila barvivem May-Grünwald, které díky obsaženému metanolu preparát i zafixuje. Barvivo jsem nechala působit po dobu 4 minut.
2. Sklíčko jsem podvrstvila na krátkou dobu destilovanou vodou tak, aby tekutina nepřetekla.
3. Sklíčko jsem převrstvila roztokem Giemsa-Romanowski.

4. Sklíčko jsem opláchla destilovanou vodou a nechala zaschnout.
5. Suchý preparát jsem zamontovala pomocí kanadského balzámu a pozorovala pod mikroskopem při zvětšení 20krát až 40krát.

4.3 ELISA

Složení soupravy

- potažená destička (jamky s navázaným antigenem)
- negativní kontrola (zředěný roztok neobsahující specifické protilátky)
- pozitivní kontrola (zředěný roztok obsahující specifické protilátky)
- cut-off (zředěný roztok, obsahující specifické protilátky v hraniční koncentraci)
- konjugát (zředěný roztok obsahující zvířecí imunoglobulin proti lidskému IgM značený peroxidázou)
- ředící roztok vzorků
- substrát TMB-Complete 2 (jednosložkový substrát obsahující TMB/H₂O₂)
- promývací roztok (20krát koncentrovaný pufr)
- zastavovací roztok (zředěný roztok kyseliny)
- pracovní návod

Laboratorní vybavení a přístroje

- mikropipety + jednorázové špičky
- zkumavky eppendorf
- mikrodestičky s odpovídajícím počtem stripů
- termostat
- promývací zařízení
- časovač
- reagentie
- fotometr

Příprava pracovních roztoků

Nejprve jsem si připravila promývací roztok, který jsem naředila v poměru 1:20 – 75 ml koncentrovaného promývacího roztoku a 1 425 ml destilované vody (promývacího roztoku musí být dostatečné množství, protože se destička promývá několikrát za sebou).

Kontroly, konjugát a ředící roztok byly připraveny k použití, pouze jsem je vyndala z lednice a nechala vytemperovat na laboratorní teplotu.

Ředění vzorků

- Ředění vzorků séra (plazmy) – vzorky séra jsem ředila v poměru 1:101 (10 μ l vzorku a 1 ml ředícího roztoku) ředícím roztokem. Promíchala jsem je a inkubovala 10 minut při laboratorní teplotě.
- Ředění vzorků mozkomíšního moku – vzorky likvoru jsem zředila ředícím roztokem (110 μ l vzorku a 110 μ l ředícího roztoku). Promíchala jsem je a inkubovala 10 minut při laboratorní teplotě.

Pracovní postup

- Nejprve jsem vyndala všechny reagenty z lednice, nechala je vytemperovat na laboratorní teplotu a důkladně jsem je promíchala. Vyndala jsem odpovídající počet stripů.

- Do jamek stripů jsem napipetovala kontroly a ředěné vzorky podle pipetovacího schéma (obr. 2):

- jamku 1A jsem ponechala prázdnou pro blank;

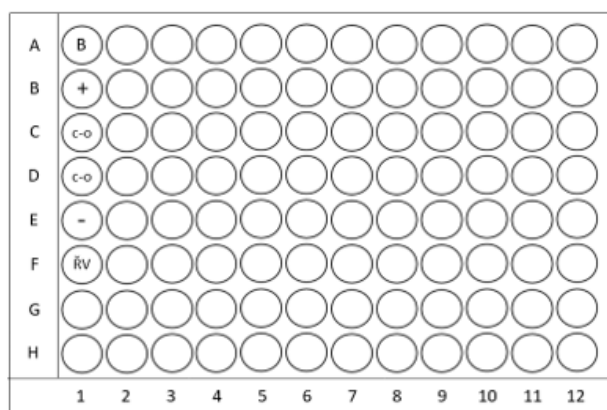
- do jamky 1B jsem pipetovala 100 μ l negativní kontroly;

- do jamky 1C a 1D jsem pipetovala po 100 μ l CUT-OFF;

- do jamky 1E jsem pipetovala pozitivní kontrolu;

- do následujících jamek jsem napipetovala 100 μ l naředěných vzorků.

- Destičku jsem překryla víkem a inkubovala 30 minut v termostatu při 37 °C.
- Obsah jamek jsem odsála a promyla pomocí promývacího zařízení.
- Do všech jamek (kromě jamky 0) jsem pipetovala 100 μ l konjugátu.
- Destičku jsem znovu inkubovala 30 minut při 37 °C a znovu promyla.



B	blank
+	pozitivní kontrola
c-o	cut-off
-	negativní kontrola
řv	ředěný vzorek

Obrázek 2: Pipetovací schéma (zdroj: vlastní)

7. Do všech jamek jsem napipetovala 100 μ l jednosložkového substrátu. Destičku jsem 15 minut inkubovala v temnu při 37 °C. Po inkubaci jsem do všech jamek přidala 100 μ l zastavovacího roztoku.
8. Destičku jsem vložila do fotometru a měřila při vlnové délce 450 nm intenzitu zbarvení roztoku v jamkách proti blanku (jamka A1).

Validita testu

Test je platný, pokud:

- je naměřená absorbance blanku $<0,150$
- je naměřená absorbance negativní kontroly menší než polovina průměru absorbance cut-off (negativní kontrola $<0,5 \times \text{cut-off}$)
- je průměrná absorbance cut-off je v rozmezí 0,200–0,800 ($0,200 < \text{cut-off} > 0,800$)
- je absorbance pozitivní kontroly větší než 1,5násobek průměrné absorbance cut-off (pozitivní kontrola $>1,5 \times \text{cut-off}$)

Hodnocení vzorků

Vzorke se hodnotí podle indexu pozitivity.

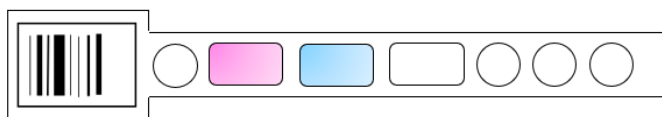
Výpočet indexu pozitivity:

- u vzorků séra (plazmy) se dělí absorbance ředěného vzorku průměrnou absorbancí cut-off (získanou ze stejné série měření)
- u vzorků mozkomíšního moku se dělí absorbance ředěného vzorku dvakrát průměrnou absorbancí cut-off (získanou ze stejné série měření)

4.4 Chorus Trio antiTBE IgM

Složení soupravy

- testovací stripy
- kalibrátor
- pozitivní kontrola



Obrázek 3: Schéma testovacího stripu

Laboratorní vybavení a přístroje

- mikropipeta (50 μ l) + špičky

- přístroj ChorusTrio s příslušenstvím

Pracovní postup

1. Stripy jsem vyndala z chladničky a nechala je temperovat na laboratorní teplotu.
2. Do první jamky jsem přidala 50 µl séra pacienta a zkontrolovala jsem přítomnost reagensů v dalších jamkách stripu.
3. Strip (obr. 3) jsem vložila do přístroje, pomocí čtečky čárových kódů jsem načetla čárový kód pacienta a čárový kód stripu.
4. Pokud bylo nutné doplnit v přístroji některou z reagensů (např. washing buffer), přístroj to sám ohlásil. Případné roztoky jsem doplnila.
5. Spustila jsem přístroj, který celé testování prováděl automaticky.
6. Po uplynutí testovací doby vytiskl přístroj výsledky, podle kterých se mohla vyhodnotit pozitivita/negativita vzorku.

Validita testu

Test je validní, pokud pozitivní kontrola vyjde v daných mezích.

4.5 ReaScan TBE IgM

Složení soupravy

- 10 kusů ReaScan TBE IgM testovacích kazet
- 10 kusů lahviček dilučního pufu

10 kusů lahviček konjugátu

Laboratorní vybavení

- mikropipety + jednorázové špičky
- reagensie
- časovač
- testovací kazeta
- ReaScan reader

Pracovní postup pro testování vzorků séra

1. Napipetovala jsem 5 µl séra do nádobky s diluentem a lahvičku jsem promíchala tak, že jsem ji 10–20krát otočila.

2. Napipetovala jsem 100 μ l naředěného vzorku do konjugátové lahvičky a dostatečně zamíchala, aby se všechny lyofilizovaný konjugát rozpustil.
3. Vyjmula jsem testovací kazetu z obalu, položila ji na rovnou plochu a označila jsem ji pro pozdější možnou identifikaci.
4. Přepipetovala jsem 80 μ l reakční směsi (konjugát se vzorkem) do vzorkového políčka kazety a inkubovala 20 minut při laboratorní teplotě.

Pracovní postup pro testování vzorků mozkomíšního moku

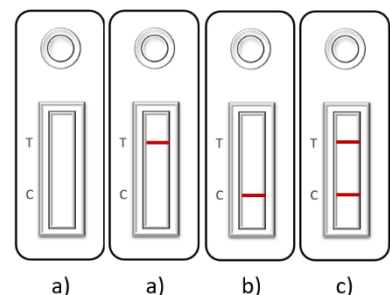
1. Do konjugátové lahvičky jsem napipetovala 90 μ l diluačního pufru a 10 μ l mozkomíšního moku. Dostatečně jsem jej promíchala.
2. Vyjmula jsem testovací kazetu z obalu, položila ji na rovnou plochu a označila jsem ji pro pozdější možnou identifikaci.
3. Přepipetovala jsem 80 μ l reakční směsi do vzorkového políčka kazety a inkubovala 20 minut při laboratorní teplotě.

Odečítání výsledků na ReaScan Rapid test readeru

1. Zapnula jsem přístroj, po chvíli se na displeji objevila ikona (šipka značící vysunutí nosiče).
2. Vysunula jsem nosič a vložila kazetu se vzorkem, nosič jsem zasunula zpět do přístroje. Měření probíhalo 5 sekund.
3. Vysunula jsem nosič a vyjmula kazetu. Po dalších 5 sekundách se na displeji objevila naměřená hodnota, kterou jsem zapsala.
4. Výsledek jsem vyhodnotila dle přiložených údajů.

Možné výsledky imunochromatografického testu

- a) Testovací kazeta je poškozená a je nutné test opakovat s novou testovací kazetou (obr.4).
- b) Testovací kazeta je v pořádku (zobrazil se kontrolní proužek), výsledek testu je negativní (obr. 4).
- c) Výsledek testu je pozitivní (obr.4).



Obrázek 4: Schéma testovacích kazet (zdroj: vlastní)

Validita testu

Test je validní, pokud je po inkubaci pozitivní kontrolní proužek.

Test je validní, pokud je výsledek kontrolní kazety v deklarovaném rozmezí.

4.6 Zpracování dat

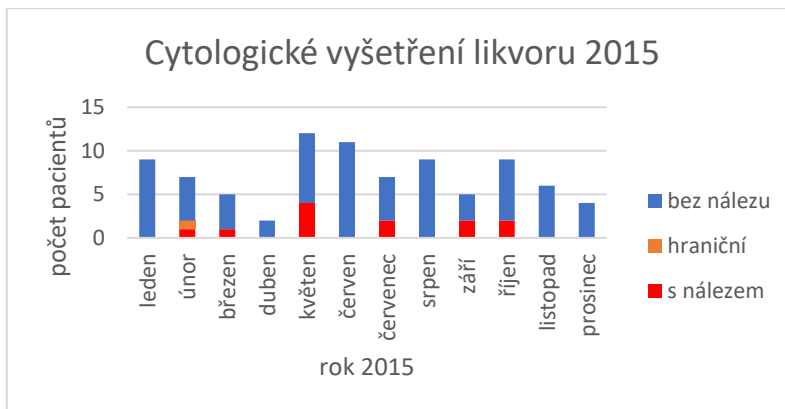
Data jsem zpracovávala v laboratorním informačním systému (LIS) a textovém editoru Excel. Nejprve jsem v LISu filtrovala jednotlivé metody v odpovídajících letech. Díky tomuto filtru jsem si mohla opsat rodná čísla pacientů, u kterých byla metoda prováděna. Rodná čísla jsem zadala do LISu v části hledání výsledků, a tak jsem se dozvěděla potřebné informace pro vypočítání doby TAT (čas příjmu vzorku a čas lékařské kontroly) u všech zvolených metod.

Takto nalezená data jsem zpracovala v Excelu. Vypočítala jsem rozdíly mezi časem příjmu vzorku a časem lékařské kontroly. Z vypočítaných hodnot jsem zhotovila tabulky a z nich následně grafy.

5. Výsledky

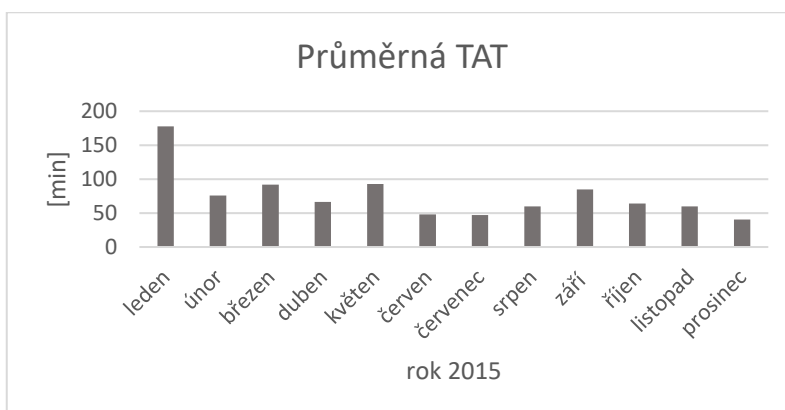
5.1 Cytologické vyšetření likvoru

Za rok 2015 bylo v nemocnici Havlíčkův Brod cytologicky vyšetřeno celkem 87 statimových vzorků od pacientů s podezřením na klíšťovou encefalitidu. Z toho 12 jich mělo patologický nálezu (13,8 %), jeden z nich měl nálezu v hraničních hodnotách (1,15 %) a 74 vzorků bylo bez nálezu (85,05 %). Výsledky jsou zobrazeny v grafu Cytologické vyšetření likvoru 2015 (obr. 5).



Obrázek 5: Cytologického vyšetření likvoru za rok 2015

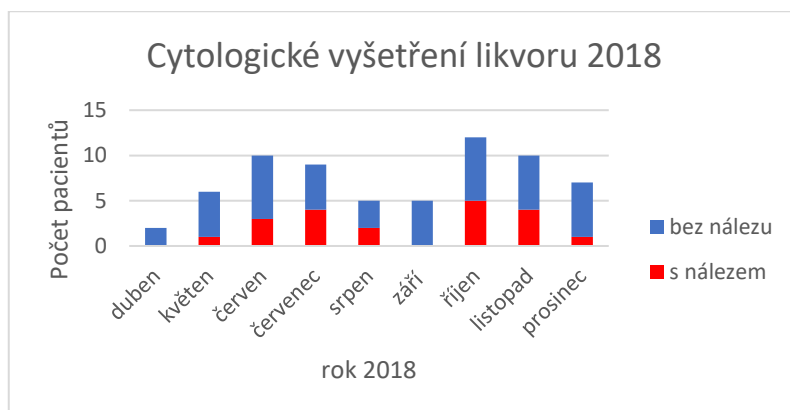
Průměrná doba návratu výsledků vyšetření v roce 2015 byla téměř 64 minut. Nejkratší průměrná doba návratu výsledku byla v prosinci 2015 (40 minut), nejdelší byla v lednu 2015 (177 minut). Hodnoty jsou zobrazeny v grafu Průměrná TAT (obr. 6).



Obrázek 6: Průměrná doba návratu výsledků cytologického vyšetření za rok 2015

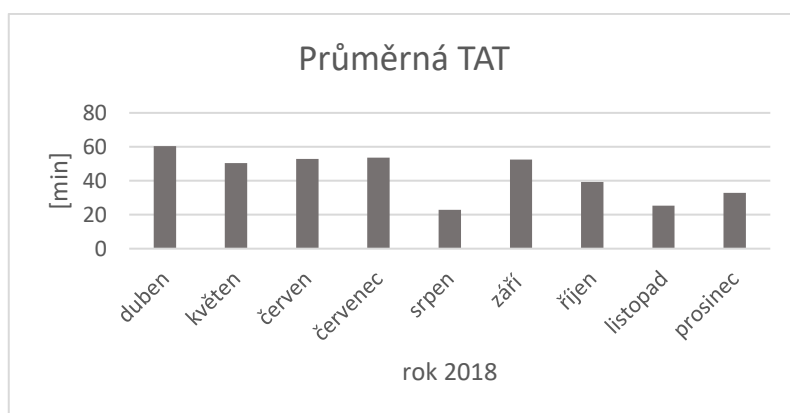
V roce 2018 se v nemocnici Havlíčkův Brod cytologicky vyšetřilo 66 statimových vzorků od pacientů s podezřením na klíšťovou encefalitidu. 20 jich mělo patologický nálezu

(30,30 %), u zbylých 46 vzorků bylo bez patologického nálezu (69,69 %). Výsledky jsou zobrazeny v grafu Cytologické vyšetření likvoru 2018 (obr. 7).



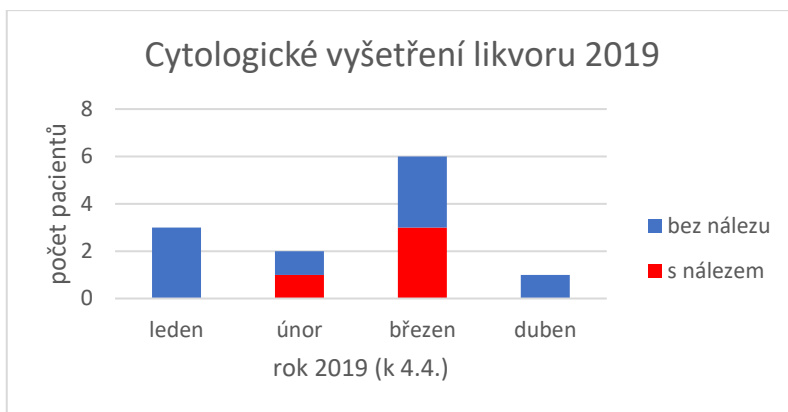
Obrázek 7: Cytologické vyšetření likvoru za rok 2018

V roce 2018 byl mozkomíšní mok v souvislosti s podezřením na KE vyšetřován až od dubna. Průměrná doba návratu výsledků měření byla 42 minut. Nejkratší průměrná doba návratu výsledku byla v srpnu 2018 (23 minut), nejdelší byla v dubnu 2018 (60 minut). Hodnoty jsou zobrazeny v grafu Průměrná TAT (obr. 8).



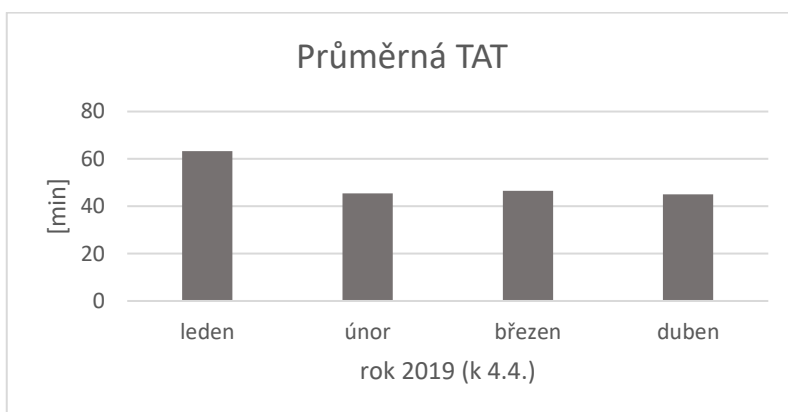
Obrázek 8: Průměrná doba návratu výsledků cytologického vyšetření za rok 2015

V roce 2019 (k 4.4.2019) se v nemocnici Havlíčkův Brod cytologicky vyšetřilo 12 statimových vzorků mozkomíšního moku u pacientů s podezřením na klíšťovou encefalitu. 4 vzorky měly patologický nálezu (33,33 %), zbylých 8 vzorků bylo bez nálezu (66,67 %). Výsledky jsou zobrazeny v grafu Cytologické vyšetření likvoru 2019 (obr. 9).



Obrázek 9: Výsledky cytologického vyšetření likvoru za rok 2019

Průměrná doba návratů výsledků vyšetření byla v první části roku 2019 50 minut. Nejkratší průměrná doba návratu výsledků byla v únoru (45,5 minuty) a nejdelší v lednu (63 minut). Hodnoty jsou zobrazeny v grafu Průměrná TAT (obr. 10).



Obrázek 10: Průměrná doba návratu výsledků cytologického vyšetření za rok 2019

Pokud se v mozkomíšním moku prokáže přítomnost buněčných elementů, které nejsou fyziologické, postupuje se k dalšímu kroku, a to ke zjištění přítomnosti specifických protilátek v již odebraném likvoru.

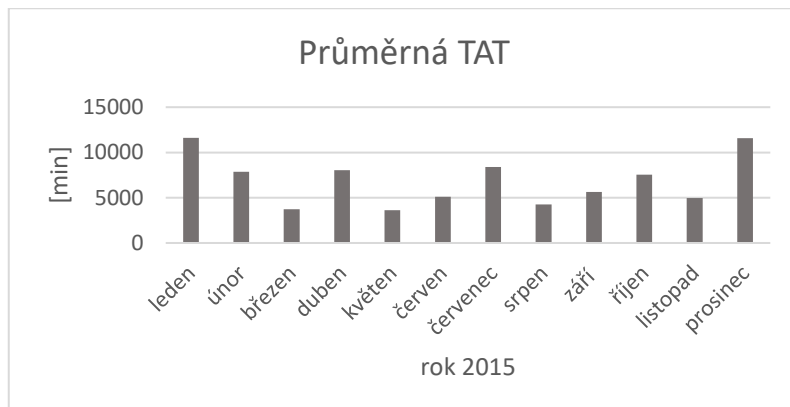
5.2 Stanovení protilátek metodou ELISA

Stanovení protilátek v likvoru

Metodou ELISA bylo v roce 2015 vyšetřeno celkem 89 vzorků mozkomíšního moku. Nejvíce vzorků bylo vyšetřeno v červnu (12 vzorků), nejméně v dubnu (2 vzorky).

Průměrná doba návratu výsledků vyšetření byla u této metody 4 dny, 14 hodin a 57 minut. Nejkratší průměrná doba návratu byla v květnu (2 dny, 12 hodin a 8 minut), nejdelší byla

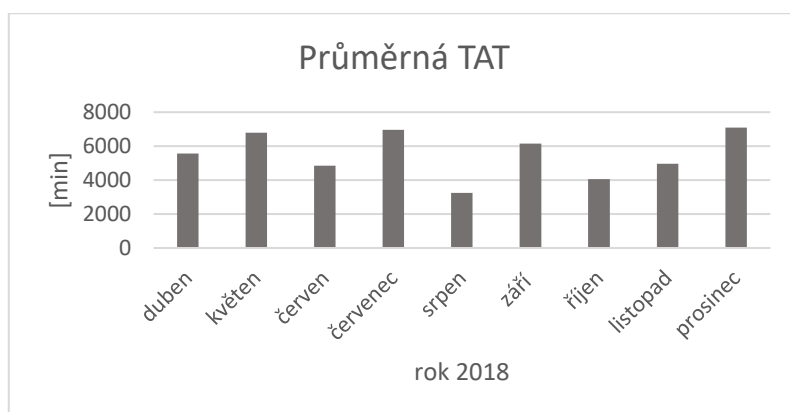
v lednu (8 dnů, 1 hodina a 50 minut). Hodnoty jsou zobrazeny v grafu Průměrná TAT (obr. 11).



Obrázek 11: Průměrná doba návratu výsledků vyšetření likvoru metodou ELISA v roce 2015

V roce 2018 bylo metodou ELISA vyšetřeno 68 vzorků mozkomíšního moku. Nejvíce vzorků bylo vyšetřeno v říjnu (14 vzorků), nejméně v dubnu (2 vzorky).

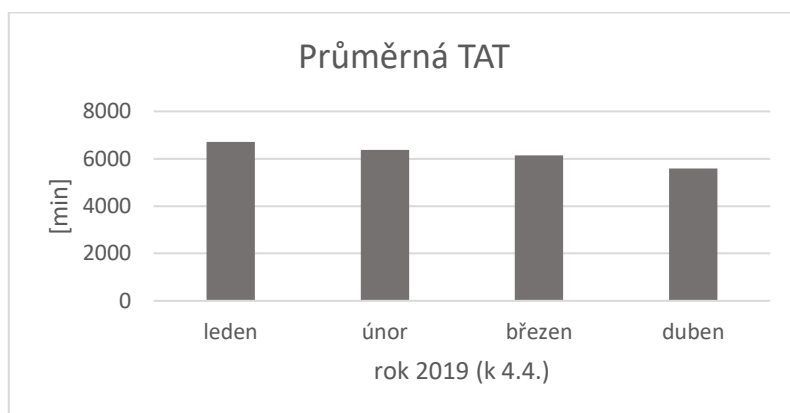
Průměrná doba návratu výsledků byla v roce 2018 3 dny, 17 hodin a 42 minut. Nejdelší průměrná doba návratu byla v prosinci (4 dny, 22 hodin a 16 minut), nejkratší v srpnu (2 dny, 6 hodin a 6 minut). Hodnoty jsou zobrazeny v grafu Průměrná TAT (obr. 12).



Obrázek 12: Průměrná doba návratu výsledků vyšetření likvoru metodou ELISA v roce 2018

V roce 2019 (k 4.4.2019) bylo metodou ELISA otestováno 10 vzorků mozkomíšního moku.

Průměrná délka TAT byla 4 dny, 9 hodin a 4 minuty. Nejkratší průměrná doba návratu byla v dubnu (3 dny, 21 hodin a 4 minuty), nejdelší byla v lednu (4 dny, 15 hodin a 57 minut). Hodnoty jsou zobrazeny v grafu Průměrná TAT (obr. 13).

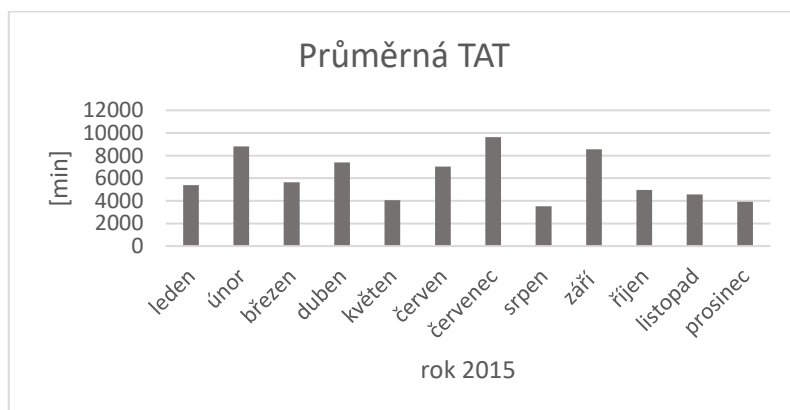


Obrázek 13: Průměrná doba návratu výsledků vyšetření likvoru metodou ELISA v roce 2019 (k 4.4.)

Stanovení protilátek v séru

V roce 2015 bylo na specifické protilátky proti KE vyšetřeno celkem 59 sér. Nejvíce vzorků bylo vyšetřeno v červnu (8 vzorků), nejméně v dubnu (1 vzorek).

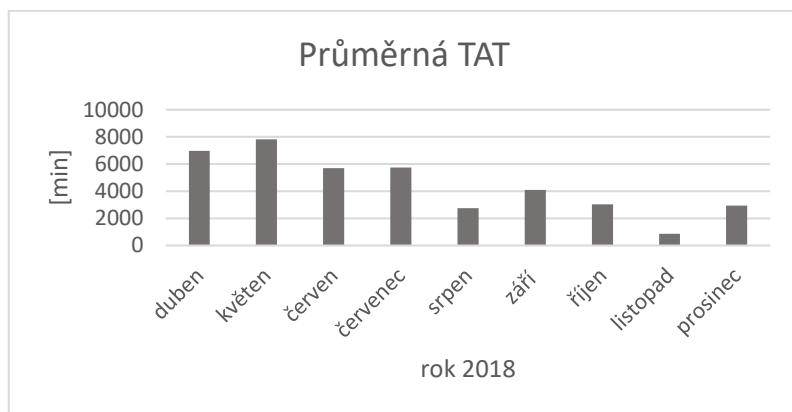
Průměrná doba návratu výsledků vyšetření byla v roce 2015 4 dny, 1 hodina 37 minuta. Nejdelší průměrná doba návratu výsledků byla v červenci (6 dní, 16 hodin a 35 minut), nejkratší byla v srpnu (2 dny, 10 hodin a 40 minut). Hodnoty jsou zobrazeny v grafu Průměrná TAT (obr. 14).



Obrázek 14: Průměrná doba návratu výsledků vyšetření sér metodou ELISA v roce 2015

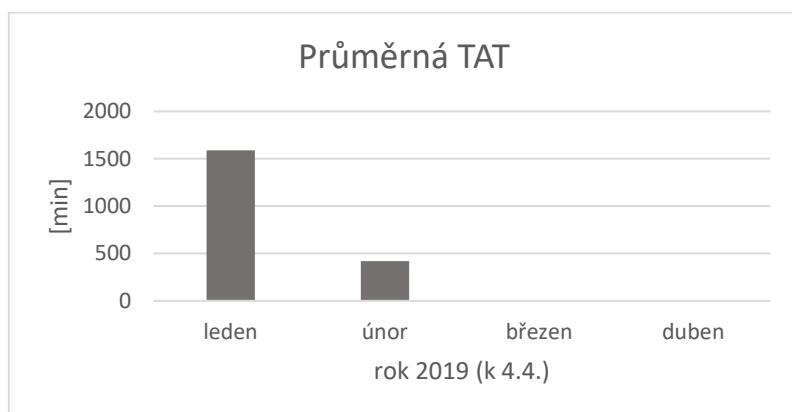
V roce 2018 bylo vyšetřeno 55 vzorků sér. Nejvíce vzorků bylo vyšetřeno v říjnu (13 vzorků), nejméně v dubnu (1 vzorek).

Průměrná doba návratu výsledků vyšetření byla v roce 2018 2 dny, 21 hodin a 56 minut. Nejdelší doba odezvy byla v květnu (5 dní, 10 hodin a 13 minut), nejkratší byla v listopadu (14 hodin a 21 minut). Hodnoty jsou zobrazeny v grafu Průměrná TAT (obr. 15).



Obrázek 15: Průměrná doba návratu výsledků vyšetření sér metodou ELISA v roce 2018

V první části roku 2019 (od 1. 1. do 4. 4. 2019) bylo metodou ELISA vyšetřeno celkem 5 vzorků sér. 3 vzorky byly vyšetřeny v lednu, zbylé dva v únoru. Nejdelší průměrná doba návratu výsledků byla v lednu (1 den, 2 hodiny a 30 minut), nejkratší byla v únoru (6 hodin a 58 minut). Hodnoty jsou zobrazeny v grafu Průměrná TAT (obr. 16).

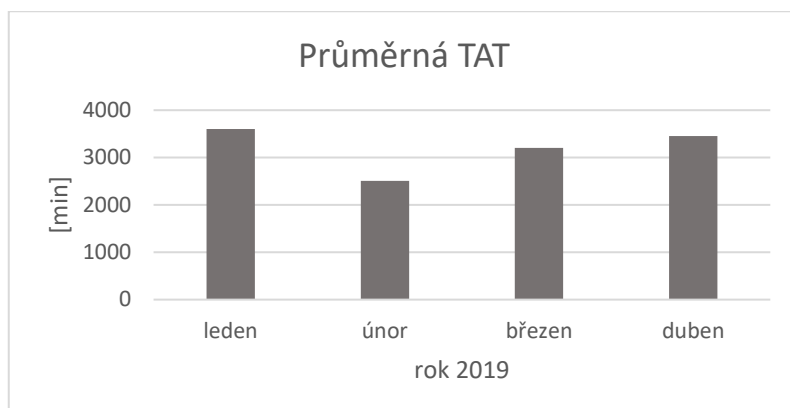


Obrázek 16: Průměrná doba návratu výsledků vyšetření sér metodou ELISA v roce 2019

5.3 Stanovení protilátek metodou ChorusTrio

Pomocí přístroje ChorusTrio bylo na počátku roku 2019 (1.1.–4.4.2019) vyšetřeno 51 vzorků sér. Nejdelší doba odezvy byla v lednu (2 dny, 12 hodin a 1 minuta), nejkratší

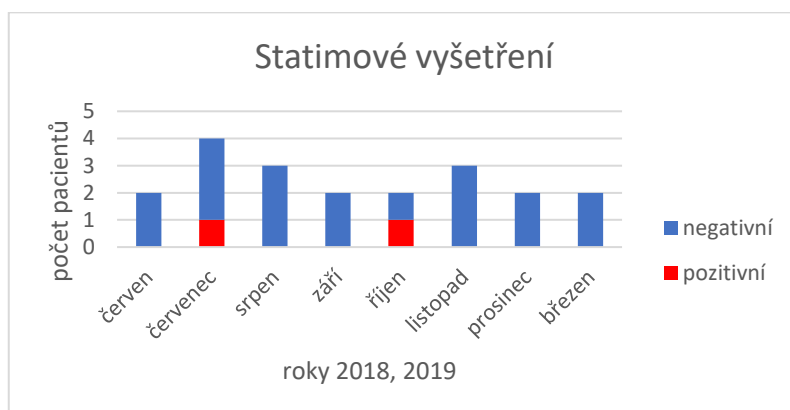
doba odezvy byla v únoru (1 den, 14 hodin a 47 minut). Výsledky jsou zobrazeny v grafu Průměrná TAT (obr. 17).



Obrázek 17: Průměrná doba návratu výsledků vyšetření sér metodou ChorusTrio v roce 2019

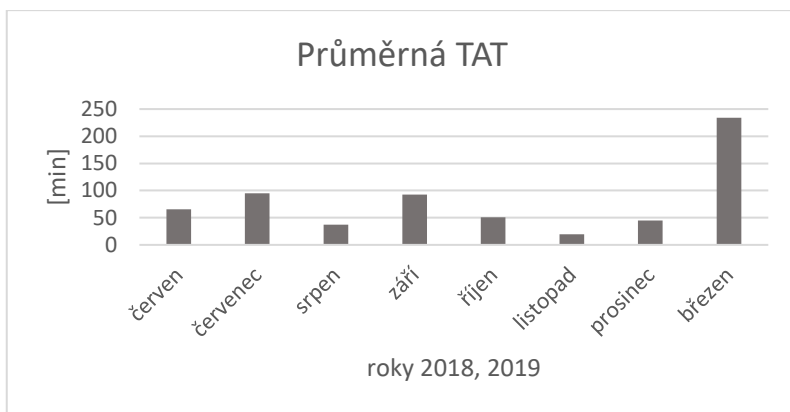
5.4 Stanovení protilátek pomocí ReaScan

Od června 2018 do dubna 2019 bylo touto metodou vyšetřeno 20 vzorků. Nejvíce vzorků bylo vyšetřeno v červenci 2018 (4 vzorky), nejméně v měsících červnu, září, říjnu 2018 a březnu 2019 (v každém měsíci 2 vzorky). 5 jich bylo pozitivních (25 %), zbytek negativních (75 %). Hodnoty jsou zobrazeny v grafu Statimové vyšetření (obr. 18).



Obrázek 18: Statimové vyšetření protilátek pomocí ReaScan

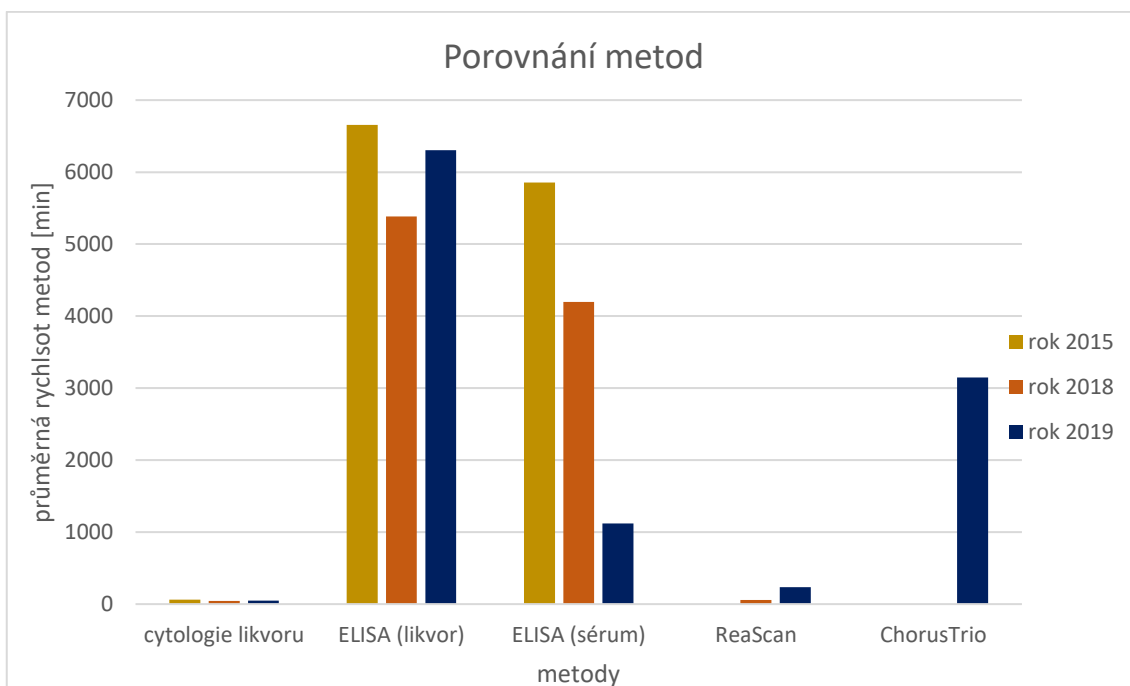
Průměrná doba odezvy byla u tohoto statimového vyšetření 1 hodina a 16 minut. Nejdelší doba odezvy byla v březnu (3 hodiny a 54 minut) a nejkratší v listopadu (19 a půl minuty). Výsledky jsou zobrazeny v grafu Průměrná TAT (obr. 19).



Obrázek 19: Průměrná doba návratu výsledků vyšetření vzorků pomocí ReaScan rapid test

5.5 Porovnání použitých metod

Porovnání metod je zobrazeno v grafu Porovnání metod (obr. 20) a popsáno v kapitole Diskuze.



Obrázek 20: Porovnání průměrné doby odezvy u jednotlivých metod za jednotlivé roky

6. Diskuze

Vzorky mozkomíšního moku odebrané kvůli podezření na KE jsou v nemocnici Havlíčkův Brod nejprve vyšetřovány mikroskopicky, a to jak za pomoci nativního, tak trvalého preparátu, tím se potvrdí či vyvrátí možná neuroinfekce a určí se postup dalších vyšetření. Doba TAT je ovlivněna jak pracovníky na příjmu vzorků, tak pracovníky v imunologické laboratoři. Průměrná doba odezvy za všechny sledované roky je 52,16 minut. Nejdelší čas odezvy byl v roce 2015 (64 minut), nejrychlejší byla v roce 2018 (42 minut). Za rok 2019 (k 4. 4. 2019) je průměrná TAT 50,5 minuty. Možná příčina tohoto opětovného prodloužení doby je ta, že víme, že v zimním období je nepravděpodobná akutní infekce KE a počítáme spíše s chronickými onemocněními (jako je například roztroušená skleróza), proto se tolik nespěchá (např. při barvení preparátu se všechny barvicí roztoky nechávají působit předepsanou dobu namísto zkráceného času působení). Je tedy možné, že průměrná hodnota TAT celého roku 2019 bude opět o něco menší než TAT v roce 2018.

Při patologickém nálezů při mikroskopii mozkomíšního moku následuje sérologická diagnostika daného vzorku a dále se stanovují také protilátky v séru příslušného pacienta. V nemocnici Havlíčkův Brod byla ze sérologických metod po dlouhou dobu využívána pouze metoda ELISA, která byla prováděna pouze jednou týdně. To mělo za následek velice dlouhou dobu odezvy – v průměru 4 dny, 5 hodin a 54 minut pro mozkomíšní mok, a 2 dny, 14 hodin a 47 minut pro séra. Bylo nutné tuto dobu zkrátit, a tak byl na konci roku 2017 zakoupen přístroj ChorusTrio.

Výhodou tohoto přístroje je, že je rychlejší oproti klasické, ručně dělané metodě ELISA. Nevýhodou je, že je na něm možné stanovovat pouze vzorky sér, nikoli likvorů, takže je nevhodný pro stanovení protilátek, které následují po mikroskopii mozkomíšního moku. I to je jeden z důvodů, proč se ChorusTrio používá spíše pro rutinní diagnostiku než statimovou, a to převážně pro kontrolu hladiny protilátek před nebo po očkování. Tato metoda zkrátila dobu TAT průměrně o 1 den, 5 hodin a 30 minut. V roce 2018 došlo k další změně statimové diagnostiky KE, byl zakoupen přístroj ReaScan rapid test, který výrazně zkrátil dobu mezi příjmem vzorku a návratem výsledku.

Stanovení protilátek pomocí přístroje ReaScan rapid test zkrátilo dobu TAT ze dnů na minuty (pouze ve dvou výjimkách na hodiny – jednou na 1 hodinu a 5,5 minut a podruhé na 3 hodiny a 54 minut). Jeho výhodou je, že s jeho pomocí můžeme stanovovat protilátky

jak ve vzorku likvoru (který jsme získali díky indikaci cytologického vyšetření mozkomíšního moku), tak ve vzorku séra.

Jasně nejrychlejší, ale nejméně specifickou metodou je cytologické vyšetření likvoru. Díky němu odhalíme neuroinfekci, ale nerozeznáme i. a., které infekci způsobilo, a nemůžeme tak zahájit specifickou léčbu. Druhou nejrychlejší metodou je imunochromatografický přístroj ReaScan. Podle mého názoru je dobře, že právě tento přístroj je využíván pro statimovou diagnostiku, protože výrazně urychlí stanovení množství protilátek proti KE ve vzorku. Další v řadě je stanovení protilátek přístrojem ChorusTrio, který je sice rychlejší než ELISA, ale jeho velkou nevýhodou je již zmíněná nemožnost stanovovat protilátky z mozkomíšního moku. Na posledním místě, co se týče rychlosti TAT, je stanovení protilátek metodou ELISA.

7. Závěr

V teoretické části své bakalářské práce jsem shrnula informace o klíšťové encefalitidě (a příbuzných tématech), o její diagnostice apod. V praktické části jsem si osvojila metody diagnostiky klíšťové encefalidity, a to cytologické vyšetření likvoru, metodu ELISA, práci s přístrojem ChorusTrio a imunochromatografickým testem ReaScan rapid test. Díky mému pobytu na Oddělení společných laboratoří v nemocnici Havlíčkův Brod jsem si prošla celým procesem od přijetí vzorku až po lékařskou kontrolu a uvolnění výsledků.

Cílem mé práce bylo zhodnotit stávající stav diagnostiky klíšťové encefalidity s důrazem na TAT (dobu návratu výsledku vyšetření), výstupem pro praxi bylo nalezení případných cest ke zlepšení této diagnostiky, obě tyto informace jsou shrnuty v kapitole Diskuze.

Výstupem pro praxi z mé práce bylo nalezení možných cest ke zlepšení této diagnostiky:

- Pokud pacient v anamnéze udává prisáté klíště, klinické příznaky jsou typické pro KE a jeho vzorek je zadán jako statim jsem pro to, aby se vzorek primárně testoval pomocí ReaScan rapid testu, a pokud vyjde negativně, teprve potom bych vyšetřovala vzorky např. na protilátky proti lymfské borelióze.
- Pokud by v budoucnu přibývalo žádostí o vyšetření protilátek proti KE, myslím si, že by bylo vhodné zvážit možnost, že by se vzorky metodou ELISA vyšetřovaly častěji než jednou týdně. Anebo aby byl do laboratoře pořízen jiný automatický systém detekce protilátek.

8. Seznam literatury

1. ADAM, P., et al., 2000. *Cytologie mozkomíšního moku*, Praha: SEKK.
2. AHANTARIG, A., RŮŽEK, D., VANCOVÁ, M., JANOWITZ, A., ŠT'ASTNÁ, H., TESAŘOVÁ M., GRUBHOFFER, L., 2009. Tick-Borne Encephalitis Virus Infection of Cultured Mouse Macrophages. *Intervirolgy*. **52**(5), 283-290. DOI: 10.1159/000235741. ISSN 1423-0100. Dostupné také z: <https://www.karger.com/Article/FullText/235741>
3. ANDERSON, J. F., MAGNARELLI, L. A., 2008. Biology of Ticks. *Infectious Disease Clinics of North America*. **22**(2), 195-215. DOI: 10.1016/j.idc.2007.12.006. ISSN 08915520. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0891552007001237>
4. BARRETT, P. N., SCHOBBER-BENDIXEN, S., EHRLICH, H. J., 2003. History of TBE vaccines. *Vaccine*. **21**, 41-S49. DOI: 10.1016/S0264-410X(02)00814-9. ISSN 0264410X. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0264410X02008149>
5. BEAUTÉ, J., SPITERI, G., WARNS-PETIT, E., ZELLER, H., 2018. Tick-borne encephalitis in Europe, 2012 to 2016. *Eurosurveillance*. **23**(45). DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2018.23.45.1800201. ISSN 1560-7917. Dostupné také z: <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.45.1800201>
6. BEDNÁŘ, M., 1996. Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie. Praha: Marvil. ISBN 9788023802979.
7. BENEŠ, J., 2009. Infekční lékařství. Praha: Galén, 651 s. ISBN 978-80-7262-644-1.
8. BEST, S. M., MORRIS, K. L., SHANNON, J. G., et al., 2005. Inhibition of Interferon-Stimulated JAK-STAT Signaling by a Tick-Borne Flavivirus and Identification of NS5 as an Interferon Antagonist. *Journal of Virology*. **79**(20), 12828-12839. DOI: 10.1128/JVI.79.20.12828-12839.2005. ISSN 0022-538X. Dostupné také z: <http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.79.20.12828-12839.2005>
9. BOULANGER, N., BOYER, P., TALAGRAND-REBOUL, E., HANSMANN, Y., 2019. Ticks and tick-borne diseases. *Médecine et Maladies Infectieuses*. DOI: 10.1016/j.medmal.2019.01.007. ISSN 0399077X. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0399077X18307194>

10. DIESSE, *Tick-Borne Encephalitis Virus IgM*, 2018. Siena: DIESSE Diagnostica Sense S.p.A.
11. EBEL, G. D., 2010. Update on Powassan Virus: Emergence of a North American Tick-Borne Flavivirus. *Annual Review of Entomology*. **55**(1), 95-110. DOI: 10.1146/annurev-ento-112408-085446. ISSN 0066-4170. Dostupné také z: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-ento-112408-085446>
12. GALLIA, F., J. RAMPAS a L. HOLLENDER, 1949. Laboratorní infekce encefalitickým virem. *Časopis lékařů českých*. **88**(9), 224-229. ISSN 0008-7335.
13. GÜNTHER, G., HAGLUND, M., LINDQUIST, L., SKÖLDENBERG, B., FORSGREN, M., 1996. Intrathecal Production of Neopterin and β 2 Microglobulin in Tick-borne Encephalitis (TBE) Compared to Meningoencephalitis of other Etiology. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*. **28**(2), 131-138. DOI: 10.3109/00365549609049063. ISSN 0036-5548. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/00365549609049063>
14. HLOUCAL, L., RAMPAS, J., 1953. Klíšťové neuroinfekce na Strakonicku v r. 1952. *Časopis lékařů českých*. **92**(18), 496-500. ISSN 0008-7335.
15. HOLZMANN, H., 2003. Diagnosis of tick-borne encephalitis. *Vaccine*. **21**, 36-S40. DOI: 10.1016/S0264-410X(02)00819-8. ISSN 0264410X. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0264410X02008198>
16. CHMELAR, J., CALVO, E., PEDRA, J. H. F., FRANCISCHETTI, I. M. B., KOTSYFAKIS, M., 2012. Tick salivary secretion as a source of antihemostatics. *Journal of Proteomics*. **75**(13), 3842-3854. DOI: 10.1016/j.jprot.2012.04.026. ISSN 18743919. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S187439191200245X>
17. JEFFRIES, C. L., MANSFIELD, K. L., PHIPPS, L. P., et al., 2014. Louping ill virus: an endemic tick-borne disease of Great Britain. *Journal of General Virology*. **95**(5), 1005-1014. DOI: 10.1099/vir.0.062356-0. ISSN 0022-1317. Dostupné také z: <http://jgv.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/vir.0.062356-0>
18. KAISER, R., 2012. Tick-borne encephalitis: Clinical findings and prognosis in adults. *Wiener Medizinische Wochenschrift*. **162**(11-12), 239-243. DOI: 10.1007/s10354-012-0105-0. ISSN 0043-5341. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s10354-012-0105-0>
19. KINDBERG, E., MICKIENĚ, A., AX, C., ÅKERLIND, B., VENE, S., LINDQUIST, L., LUNDKVIST, Å., SVENSSON, L., 2008. A Deletion in the Chemokine Receptor

- 5 (CCR5) Gene Is Associated with Tickborne Encephalitis. *The Journal of Infectious Diseases*. **197**(2), 266-269. DOI: 10.1086/524709. ISSN 0022-1899. Dostupné také z: <https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1086/524709>
20. KREJSEK, J., KOPECKÝ, O., 2004. *Klinická imunologie*. Hradec Králové: Nucleus HK, 941 s. ISBN 80-862-2550-X.
21. LABUDA, M., AUSTYN, J. M., ZUFFOVA, E., KOZUCH, O., FUCHSBERGER, N., LYSY, J., NUTTALL, P. A., 1996. Importance of Localized Skin Infection in Tick-Borne Encephalitis Virus Transmission. *Virology*. **219**(2). DOI: 10.1006/viro.1996.0261. ISSN 00426822. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0042682296902615>
22. MÁLKOVÁ, D., FILIP, O., 1968. Histological picture in the place of inoculation and in lymph nodes of mice after subcutaneous infection with tick-borne encephalitis virus. *Acta virologica*. **12**(4), 355-360. ISSN 0001-723X.
23. MÁLKOVÁ, D., FRAŇKOVÁ, E., 1959. The lymphatic system in the development of experimental tickborne encephalitis in mice. *Acta virologica*. **3**, 210-214. ISSN 323-0864.
24. MANDL, Ch. W., 2005. Steps of the tick-borne encephalitis virus replication cycle that affect neuropathogenesis. *Virus Research*. **111**(2), 161-174. DOI: 10.1016/j.virusres.2005.04.007. ISSN 01681702. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168170205001218>
25. MANSFIELD, K. L., JOHNSON, N., PHIPPS, L. P., STEPHENSON, J. R., FOOKS, A. R., SOLOMON, T., 2009. Tick-borne encephalitis virus - a review of an emerging zoonosis. *Journal of General Virology*. **90**(8), 1781-1794. DOI: 10.1099/vir.0.011437-0. ISSN 0022-1317. Dostupné také z: <http://jgv.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/vir.0.011437-0>
26. MÉSZÁROSOVÁ, N., 2016. Klíšťová encefalitida. *Synlabianer* [online]. **16**(03), 7-9 [cit. 2019-04-21]. Dostupné z: http://www.synlabianer.cz/clanky/klisťova-encefalitida_5
27. MICKIENE, A., LINDQUIST, L., LAIŠKONIS, A., 2005. Tick-borne encephalitis – clinical course and outcome. Review of the literature. EBERT, Ryan, A. *Progress in encephalitis research*. New York: Nova Biomedical Books, s. 1-30. ISBN 9791594543455.
28. PALUS, M., BILY, T., ELSTEROVA, J., LANGHANSOVA H., SALAT, J., 2014. *Journal of General Virology*. 95(Pt_11). DOI: 10.1099/vir.0.068411-0. ISSN

- 0022-1317. Dostupné také z:
<http://jgv.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/vir.0.068411-0>
29. PILAŘOVÁ, L., ústní sdělení, KHS Vysočina, Územní pracoviště Havlíčkův Brod. 12. února 2019.
30. PRŮŠA, R., 2012. *Průvodce laboratorními nálezy*. Praha: Raabe, 1740 s. ISBN 978-80-87553-68-8.
31. RAJČÁNI, J., ČIAMPOR, F., 2006. *Lekárska virológia*. Bratislava: Veda, 580 s. ISBN 80-224-0911-1.
32. REAGENA, *ReaScan TBE IgM: Instructions for use*, 2017. Toivala: Oy Reagena.
33. RŮŽEK, D., 2015. *Klíšťová encefalitida*. Praha: Grada Publishing, 196 s. ISBN 978-80-247-5305-8.
34. RUZEK, D., AVŠIČ ŽUPANC, T., BORDE, J., et al., 2019. Tick-borne encephalitis in Europe and Russia: Review of pathogenesis, clinical features, therapy, and vaccines. *Antiviral Research*. **164**, 23-51. DOI: 10.1016/j.antiviral.2019.01.014. ISSN 01663542. Dostupné také z:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166354218304479>
35. RŮŽEK, D., DOBLER, G., MANTKE, O. D., 2010. Tick-borne encephalitis: Pathogenesis and clinical implications. *Travel Medicine and Infectious Disease*. **8**(4), 223-232. DOI: 10.1016/j.tmaid.2010.06.004. ISSN 14778939. Dostupné také z:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1477893910001018>
36. RŮŽEK, D. et al., 2008. Growth of tick-borne encephalitis virus (European subtype) in cell lines from vector and non-vector ticks. *Virus Research*, 137(1), pp.142-146. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168170208002104>.
37. RUZEK, D., VANCOVA, M., TESAROVA, M., AHANTARIG, A., KOPECKY J., GRUBHOFFER, L., 2009. Morphological changes in human neural cells following tick-borne encephalitis virus infection. *Journal of General Virology*. 90(7), 1649-1658. DOI: 10.1099/vir.0.010058-0. ISSN 0022-1317. Dostupné také z:
<http://jgv.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/vir.0.010058-0>
38. RŮŽEK, D., SALÁT, J., SINGH, S. K., KOPECKÝ, J., FOOKS, A. R., 2011. Breakdown of the Blood-Brain Barrier during Tick-Borne Encephalitis in Mice Is Not Dependent on CD8 T-Cells. *PLoS ONE*. **6**(5). DOI: 10.1371/journal.pone.0020472. ISSN 1932-6203. Dostupné také z: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0020472>
39. RYANZANTSEVA, N. V., NOVITSKY, V. V., ZHUKOVA, N. G., VERKHOZINA, M. M., LEHEPIN, A. V., MIKHEEV, S. L., 2005. Tick-borne

- encephalitis. EBERT, Ryan A. *Progress in encephalitis research*. New York: Nova Biomedical Books, s. 31-57. ISBN 9791594543455.
40. ŠENIGL, F., GRUBHOFFER, L., KOPECKY, J., 2006. Differences in Maturation of Tick-Borne Encephalitis Virus in Mammalian and Tick Cell Line. *Intervirology*. **49**(4), 239-248. DOI: 10.1159/000091471. ISSN 0300-5526. Dostupné také z: <https://www.karger.com/Article/FullText/91471>
41. TestLine. *EIA TBE Virus IgM: Souprava pro profesionální použití*, 2018. Brno: TestLine Clinical Diagnostics s.r.o.
42. VOTAVA, M. a kol., 2003. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun, 495 s. ISBN 80-902-896-6-5.
43. *World Health Organization: Weekly epidemiological record*, 2011. **86**(24), 16 s. ISSN 0049-8114.

9. Přílohy

Příloha 1: Tabulky ke grafům

Tabulka 1: Cytologické vyšetření likvoru v roce 2015

průměrná TAT		počty pacientů		
rok 2015	doba odezvy [min]	s nálezem	hraniční	bez nálezu
leden	177,8	0	0	9
únor	75,7	1	1	5
březen	92	1	0	4
duben	66,5	0	0	2
květen	93	4	0	8
červen	48	0	0	11
červenec	47	2	0	5
srpen	60	0	0	9
září	84,8	2	0	3
říjen	64,2	2	0	7
listopad	59,6	0	0	6
prosinec	40,7	0	0	4

Tabulka 2: Cytologické vyšetření likvoru v roce 2018

průměrná TAT		počty pacientů		
rok 2018	doba odezvy [min]	s nálezem	hraniční	bez nálezu
duben	60,5	0	0	2
květen	50,5	1	0	5
červen	52,9	3	0	7
červenec	53,6	4	0	5
srpen	22,8	2	0	3
září	52,4	0	0	5
říjen	39,3	5	0	7
listopad	25,3	4	0	6
prosinec	32,8	1	0	6

Tabulka 3: Cytologické vyšetření likvoru v roce 2019

průměrná TAT		počet pacientů		
rok 2019	doba odezvy [min]	s nálezem	hraniční	bez nálezu
leden	63,3	0	0	3
únor	45,5	1	0	1
březen	46,5	3	0	3

duben	45	0	0	1
-------	----	---	---	---

Tabulka 4: Stanovení protilátek v likvoru metodou ELISA v roce 2015

průměrná TAT	
rok 2015	doba odezvy [min]
leden	11630,1
únor	7850,5
březen	3729,8
duben	8051,5
květen	3608,18
červen	5101,917
červenec	8410,88
srpen	4269,22
září	5621,6
říjen	7529,44
listopad	4956,67
prosinec	11592,5

Tabulka 5: Stanovení protilátek v likvoru metodou ELISA v roce 2018

průměrná TAT	
rok 2018	doba odezvy [min]
duben	5558
květen	6794,67
červen	4839,7
červenec	6959,22
srpen	3246,6
září	6154,8
říjen	4055,5
listopad	4963,3
prosinec	7096,57

Tabulka 6: Stanovení protilátek v likvoru metodou ELISA v roce 2019

průměrná TAT	
rok 2019	doba odezvy [min]
leden	6717,33
únor	6375
březen	6138,75
duben	5584

Tabulka 7: Stanovení protilátek v séru metodou ELISA v roce 2015

průměrná TAT	
rok 2015	doba odezvy [min]
leden	5397,33
únor	8813
březen	5641,33
duben	7406
květen	4062
červen	7041,62
červenec	9635,67
srpen	3520
září	8560
říjen	4948,28
listopad	4566,25
prosinec	3917,33

Tabulka 8: Stanovení protilátek v séru metodou ELISA v roce 2018

průměrná TAT	
rok 2018	doba odezvy [min]
duben	6978
květen	7813,17
červen	5702,4
červenec	5735,3
srpen	2754,67
září	4100,8
říjen	3036,54
listopad	852,67
prosinec	2947,83

Tabulka 9: Stanovení protilátek v séru metodou ELISA v roce 2019

průměrná TAT	
rok 2019	doba odezvy [min]
leden	1590,33
únor	418,5
březen	0
duben	0

Tabulka 10: Stanovení protilátek metodou ChorusTrio

průměrná TAT	
rok	doba odezvy [min]
2019	
leden	3601
únor	2 507
březen	3 206
duben	3 456

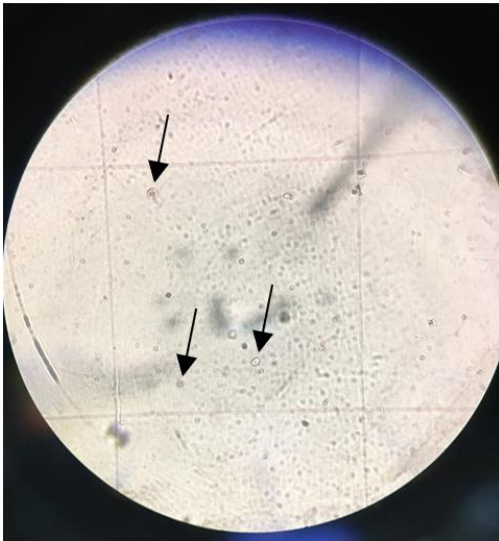
Tabulka 11: Stanovení protilátek metodou ReaScan

průměrná TAT		počet pacientů		
rok	doba odezvy [min]	pozitivní	hraniční	negativní
2018,2019				
červen	65,5	0	0	2
červenec	95	1	0	3
srpen	37,33	0	0	3
září	92,5	0	0	2
říjen	51	1	0	1
listopad	19,67	0	0	3
prosinec	45	0	0	2
březen	234	0	0	2

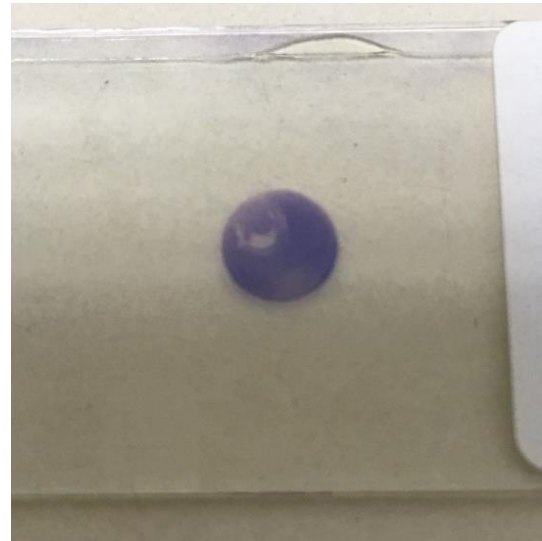
Tabulka 12: Porovnání průměrných dob odezvy použitých metod

	použité metody				
	<i>cytologie likvoru</i>	<i>ELISA (likvor)</i>	<i>ELISA (sérum)</i>	<i>ReaScan</i>	<i>ChorusTrio</i>
rok 2015	64	6657	5857	-	-
rok 2018	42	5382,5	4196	272	-
rok 2019	50,5	6304	1121	268	3147

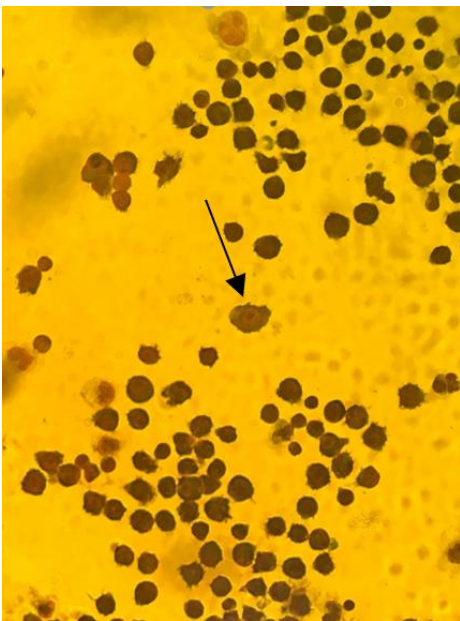
Příloha 2: Cytologie likvoru



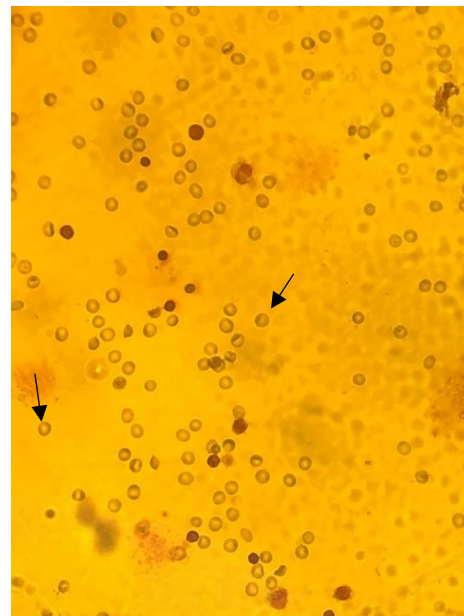
Obrázek 21: Patologický nález ve vzorku likvoru ve Fuchs-Rosenthalově komůrce (zdroj: vlastní)



Obrázek 22: Trvalý cytologický preparát (zdroj: vlastní)



Obrázek 23: Patologický nález ve vzorku likvoru s plazmatickou buňkou (zdroj: vlastní)



Obrázek 24: Patologický nález ve vzorku likvoru s příměsí erytrocytů (zdroj: vlastní)

Příloha 3:



Obrázek 25: Příklad ChorusTrio (TestLine) (zdroj: vlastní)



Obrázek 26: ChorusTrio testovací stripy (zdroj: vlastní)

Příloha 4: ReaScan rapid test



Obrázek 27: Testovací kazeta (negativní) (zdroj: vlastní)



Obrázek 28: ReaScan rapid test reader (zdroj: vlastní)

10. Seznam zkratek

APC – buňka prezentující antigen

CNS – centrální nervová soustava

ELISA – Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

HEB – hematoencefalická bariéra

i.a. – infekční agens

IgG – imunoglobuliny G

IgM – imunoglobuliny M

KE – klíš'ová encefalitida

LIS – laboratorní informační systém

NK – natural killers – přirozený zabíječ

TAT – time around time