



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Sciences

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

Metodika detekce patogenů přenášených klíšťaty a statistika jejich výskytu v ČR

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program: **SPECIALIZACE VE ZDRAVOTNICTVÍ**

Autor: Zdeňka Brožková

Vedoucí práce: Doc. RNDr. Ladislav Burýšek, PhD.

České Budějovice 2019

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem „Metodika detekce patogenů přenášených klíšťaty a statistika jejich výskytu v ČR“ 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/diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby bakalářské práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé bakalářské práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 3. 5. 2019

.....

Zdeňka Brožková

Poděkování

Ráda bych poděkovala mému vedoucímu bakalářské práce Doc. RNDr. Ladislavu Burýškovi, PhD. za ochotu a vstřícnost po celou dobu práce. Velké poděkování patří také pracovníkům z laboratoře Protean s.r.o. za trpělivost, poskytování rad a materiálů. Své rodině děkuji za podporu po dobu celého studia.

Metodika detekce patogenů přenášených klíšťaty a statistika jejich výskytu v ČR

Abstrakt

Bakalářská práce se zabývá patogeny přenášenými klíšťaty a klíšťaty samotnými. Obecně se zaměřuje na druh klíšťat jako takových, kterými jsou lidé ohroženi z důvodu přenosu nákazy. Práce je rozdělena na tři části, kdy cílem teoretické části je poukázat, že borelióza a klíšťová encefalitida nejsou jedinými onemocněními, jež populaci ohrožují. Infekční onemocnění jsou zde rozdělena na bakteriální, virové a protozoární. Důležitou součástí bakalářské práce je praktická část, která zahrnovala použití metody, jíž se patogeny stanovují. Při praktické části jsem detekovala patogeny v klíšťatech pomocí PCR a RT-PCR. Třetí část se zabývá statistickými údaji, kde byly porovnány výsledky testů z let 2008-2018. Porovnala jsem výsledky za 10 let testování a zároveň výsledky všech typů onemocnění. Statistické údaje laboratoře byly poté porovnány s hlášenými výsledky infekčních onemocnění ze Státního zdravotního ústavu.

Klíčová slova

Klíště obecné, patogen, bakterie, viry, protozoa, izolace, PCR, infekčnost

Methodology of detection of tick-borne pathogens and statistics of their occurrence in the Czech Republic

Abstract

This bachelor thesis deals with tick-borne transmitted pathogens and with ticks alone. In general, it focuses on ticks species, that are able to infect people. The Thesis is divided into three parts. The goal of the theoretical part is to refer that borreliosis and tick encephalitis are not unique infection diseases endangering human health. In this thesis, infection diseases are divided into bacterial, viral and protozoan. The core of my work is the empirical part, that uses the method of tick-borne pathogen diagnosis. In the practical part I have tried to detect pathogens in ticks by means of PCR and RT-PCR. The third part is based on statistical indexes, where I have compared laboratory results from years 2008-2018. I have analysed the results for a period of 10 years of testing and simultaneously the results of various infection diseases. Statistical data were compared with reports of infection diseases occurrence from the National Institute of Public Health in the time period.

Key words

Tick, pathogen, bacteria, viruses, protozoan, isolation, PCR, infectivity

Obsah

1	Teoretická část	12
1.1	Klíšťata	12
1.1.1	Klíšťata a klíšťáci	12
1.1.2	Prostředí klíšťat	13
1.1.3	Vývoj klíšťat.....	14
1.1.4	Druhy klíšťat žijící v ČR	14
1.2	Infekční onemocnění.....	17
1.2.1	Virové onemocnění	17
1.2.2	Bakteriální onemocnění.....	19
1.2.3	Protozoární onemocnění.....	25
2	Metodika	28
2.1	Izolace genomické DNA/ total RNA z klíšťat.....	28
2.1.1	Používané reagensie:	28
2.1.2	Pracovní postup:	29
2.2	Analýza klíšťat – PCR, RT-PCR	30
2.2.1	Reagensie	30
2.2.2	Analýza TBEV – klíšťová encefalitida	31
2.2.3	Analýza Bab – Babesiosa	32
2.2.4	Analýza NeoM – Neohrlichia mikurensis	32
2.2.5	Analýza Bor – Borrelie.....	33
2.2.6	Analýza HGE- Ehrlichie.....	34
2.2.7	Analýza BH – Bartonella.....	35
2.2.8	Analýza Tul- Tularemie	35
2.3	ELFO	36
3	Výsledky	39

4	Statistické zpracování laboratorních výsledků.....	42
5	Diskuze.....	59
6	Závěr	60
7	Bibliografie	61
8	SEZNAM ZKRATEK.....	65
9	SEZNAM TABULEK.....	66
10	SEZNAM OBRÁZKŮ	67

Úvod

Ve své bakalářské práci se zabývám klíšťaty jako vektory patogenů, jež ohrožují lidskou populaci. Toto téma jsem zvolila, protože je v současné době velmi medializované. Lidé jsou neustále zahlcováni varováním před klíšťaty, poučovani o očkování proti klíšťové encefalitidě. Velice často se stává, že lidé se bojí chodit do lesů i přes užití preventivních opatření, jako jsou repelenty či vhodný oděv.

Tato práce si dala za cíl poukázat na možné patogeny, které klíšťata přenášejí. Upozornit, že lymeská borelióza a klíšťová encefalitida nejsou jedinými onemocněními, kterými nás klíšťata ohrožují. V praktické části je popsán postup k detekci patogenů, kdy po vyizolování DNA/RNA z klíšťat potvrzují, či vyvracím patogenitu hodnocením výsledků díky elektroforéze po vlastní analýze metody PCR. Získané výsledky vyhodnotím a použiji pro další část, kde se zabývám statistikou výsledků. Bakalářská práce obsahuje třetí část, kde shrnu výsledky testů v období 2008-2018. Pro tuto část jsem také zpracovala data ze Státního zdravotního ústavu, který má na webových stránkách veřejně přístupné výsledky hlášených infekčních onemocnění.

Východiskem práce je můj život poblíž lesa, díky kterému jsem se rozhodla o toto téma více zajímat a přiblížit ho svému okolí. Pro teoretickou část mi podklady bude odborná literatura zaměřená nejprve na klíšťata samotná a odborné či vědecké články na jednotlivé typy patogenů.

1 Teoretická část

1.1. Klíšťata

Systematické zařazení:

Kmen: Členovci (*Arthropoda*)

Podkmen: Klepítkatci (*Chelicerata*)

Třída: Pavoukovci (*Arachnida*)

Řád: Roztoči (*Acarina*)

Podřád: Klíšťata (*Ixodides*)

Čeleď: Klíšťatovití (*Ixodidae*)

Čeleď: Klíšťákovití (*Argasidae*)

Klíšťata jsou ektoparazité, kteří spadají do řádu roztočů se zploštělým oválným tělem. Z hlediska zoologie patří k pavoukvcům, a proto ve stádiu dospělosti mají osm končetin. Dělí se do dvou skupin: klíšťáci a klíšťata (Sedlák, 2002).

1.1.1 Klíšťata a klíšťáci

Klíšťáci (Soft Ticks) jsou obecně na dotyk měkkí, neboť se jejich tělo skládá z kožovitého vaku. Na břišní straně se nalézají jejich kusadla, ta jsou na rozdíl od hypostomu uvolněnější, a proto se při sebemenším podráždění, poškrábání hostitele okamžitě pustí. Tito cizopasníci sají nepravidelně a krátkodobě, většinou přes noc. Do této skupiny patří rody *Argas* a *Ornithodoros* (Bellmann, 2003).

Z rodu *Argas* je nejznámějším zástupcem klíšťák holubí (*Argas reflexus*), který může příležitostně sát i na člověku. Jeho výskyt je pozorován na území Německa. Příčinou jeho výskytu byly poničené střechy, kdy holubi mohli snadno vniknout na půdy či do bytů. Ve střední Evropě zjevně nepřenáší žádné původce onemocnění, některé kousnutí a následné nasání krve však může způsobit podlitinu na pokožce (Bellmann, 2003).

Rod *Ornithodoros* se vyskytuje v mnoha zemích, zejména v tropických oblastech, kde jsou známými přenašeči několika druhů borelií způsobujících návratné horečky.

Příkladem je druh *Ornithodoros moubata*, jež přebývá v tropických oblastech ve svých úkrytech slaměných chatrčí (Kimmig et al, 2003).

Klíšťata neboli Hard Ticks jsou typičtí svým hřbetním štítem, který obsahuje chitin. Tento štít se liší u samiček a samců. U samců pokrývá celé tělo, zatímco u samiček pouze přední část hřbetu, aby nebránil při sání hostitelské krve. Zbytek samičího těla je tvořeno kůží, která se po nasátí krve může významně zvětšit. Klíště se skládá ze dvou částí, části hlavové a vlastního těla. Svého hostitele vyhledávají pomocí smyslového ústrojí, jež se nachází na prvním páru předních končetin, tzv. Hallerovým orgánem, pomocí kterého dokáže zachytit chemické, tepelné a mechanické podněty. Pokud se klíště dostane na hostitele, vyhledává pro sebe své působiště pomocí makadel. Nejběžnější místo přisátí je v okolí třísel nebo v podpaždí, z důvodu tenké kůže a vlhkého prostředí. Do kůže se dostává pomocí dvou zubů, které jsou na konci chelicer po stranách hypostomu. Do rány vylučuje směs látek, které tiší bolest, rozšiřuje cévy a mimo jiné také oslabuje imunitní systém. Díky tomu hostitel kousnutí nepocítí, ale nepříjemné svědění začne cítit až později, když už je klíště přisáté. Uchycení klíštěte je již pevné, díky hypostomu, což je jakýsi sosáček, jenž je opatřen zpětnými háčky. Dospělec má čtyři páry nohou, mající šest článků. Nohy bývají vybaveny trny, ostny, jež slouží k přichycení na hostitele. Do této skupiny patří rody *Ixodes*, *Dermacentor*, *Rhipicephalus* a *Amblyomma* (Bellmann, 2003).

Čeleď *Ixodidae* se zařadila mezi nejvýznamnější skupinu, díky své schopnosti adaptace. Klíšťata jsou známa jako přenašeči infekčních chorob a krev sající parazitě. Rod *Ixodes* je rozšířen po celém světě. Klíšťata tohoto druhu jsou pozoruhodná svou specifitou hostitele. Na našem území je pro člověka však nejnebezpečnější klíště obecné (*Ixodus ricinus*), jehož vývoj trvá okolo tři až pěti let. Jelikož nepohrdne žádným zdrojem výživy, stává se zásadním přenašečem chorob (Kimmig et al, 2003).

1.1.2 *Prostředí klíšťat*

Klíšťata vyžadují vysokou vlhkost vzduchu a teplo, takové prostředí se nachází v lesích a na okrajích lesů s nižším porostem, v křoviskách, v okolí rybníčků. Z tohoto důvodu jsou nejvíce aktivní v létě po dešti. Hranice nadmořské výšky v ČR, kde by se parazitě mohli eventuálně vyskytovat, neexistuje. Různý výskyt se liší podle jejich vývojového stádia. Larvy vyžadují největší vlhkost, tudíž je nalézáme u země. Nymfy vylézají vzhůru na rostliny, a proto jsou jejich častými hostiteli ježci, ale i zvěř větší

velikosti, mohou napadat i lidi. Dospělci se nacházejí nejvýše do 1 m výšky, a tak napadají zvěř, jako jsou srnci, psi, ale také člověka. Na stromech ve větších výškách se klíšťata nenalézají, tudíž tvrzení, že padají ze stromů, je nesmyslné (Hubálek a Rudolf, 2014).

1.1.3 Vývoj klíšťat

Vývoj klíštěte postupuje přes tři vývojová stádia. Nejprve se z vajíčka vylíhne larva, z ní pak vzniká nymfa a konečným stádiem je dospělec (imago). Samička po oplození naklade 500 - 10000 vajíček mimo hostitele, v úkrytu, a z nich se vylíhne šestinohá larva. U těchto parazitů je přesně daný počet hostitelů i počet jejich sání. Klíšťata dělíme na jednohostitelská, kdy celý vývoj probíhá na jednom jediném hostiteli. Pokud se nasátá nymfa odloučí od hostitele a dospělec napadá dalšího, jedná se o klíšťata dvojhospitelská. Nejčastěji se však vyskytuje trojhospitelský druh. Larva po nasátí svého napadeného jedince opouští, zbaví se svých blan a poté již jako nymfa napadá dalšího hostitele a opět ho po nasátí opouští. Mění se v dospělce, což už je pohlavně zralá samička či sameček. U dospělce může docházet k určité prodlevě mezi napadením a výskytu v přírodě. Díky schopnosti hladovění to přežijí bez újmy. Sameček poté už potravu nepřijímá, má pouze úlohu vyhledat na hostiteli samičku, aby došlo k páření (Hubálek a Rudolf, 2014).

1.1.4 Druhy klíšťat žijící v ČR

1.1.4.1 *Ixodes ricinus* – klíště obecné

Jde o nejrozšířenější druh žijící v Evropě i v části severní Afriky. Jejich výskyt je typický pro smíšené a listnaté lesy v okolí řek. Jsou schopni přežít za různých klimatických podmínek, ale nejčastěji se vyskytují ve vlhkých prostředích. Pro larvy jsou hostiteli drobní savci (myš), někteří ptáci, které napadají při hledání potravy na zemi. Druhým stádiem jsou nymfy, jejichž cílem jsou větší savci (veverky, ježci, zajíc). Dospělé samice sají na větších savcích, jako jsou jeleni, srnci, domácí zvířata (skot, pes, koza, ovce). Do oblasti jejich hostitelů spadá i další zvěř, mnoho savců, ptáků i plazů. Člověka napadají všechna vývojová stádia, jejich vývojový cyklus trvá okolo tří let. V dnešní době jsou brána za nebezpečná kvůli přenosu onemocnění jako je klíšťová encefalitida, lymeská borelióza, babezióza, ehrlichioza a další (Hubálek, 2000).

1.1.4.2 *Ixodes hexagonus* – klíště ježčí

Klíště ježčí se vyskytuje v severní Africe, v Evropě, jeho průkaz byl potvrzen i na území České republiky. Už podle názvu je zřejmé, že hostiteli jsou ježci, ale i malé lasicovité šelmy, jako například kuna lesní (Hubálek, 2000).

1.1.4.3 *Dermacentor reticulatus* – piják luční

Piják luční je charakteristický tím, že dává přednost vlhčím oblastem a v České republice se vyskytuje v okolí toku Dyje a Moravy. Lidé jsou jejich hostiteli jen zřídka, jejich hlavními cíli jsou domácí či divocí savci. Tento druh klíštěte je znám jako vektor babesie, v ČR pouze psí babeziózy *B. canis* (Hubálek, 2000).

1.1.4.4 *Haemaphysalis concinna* – klíště luční

Klíště luční je vázáno na teplé vlhčí listnaté a smíšené lesy či mokřadly s vyšším porostem. V ČR se vyskytuje především na jižní Moravě a je přenašečem viru klíšťové encefalitidy, byla popsána i izolace *Francisella tularensis*. Jejich hostiteli jsou zejména ovce, ale nepohrdne ani psem, kočkou či jiným savcem. Těmito klíšťaty mohou být napadeni i lidé (Hubálek, 2000).

1.1.5 *Prevence*

Nejen vhodné oblečení a vyhýbání se míst výskytu klíšťat je prevencí. Repelentní přípravky mají chránit před napadením. Jsou repelenty, jež pouze hmyz odpudí, ale některé repelentní přípravky hmyz i zabíjejí. Takový druh repelentu obsahuje insekticidy, akaricidy. Tito ektoparazitové se orientují podle tepla, vydechovaného oxidu uhličitého a dalších látek vylučovaných z potu. Identifikaci znemožňují repelentní látky, jako jsou DEET (N,N-dietyl-meta-toluamid), icaridin či ethyl-butyl-acetylaminopropionát. Nyní také existují repelentní látky přírodního charakteru, které jsou silně aromatizované, například citronelovým olejem, tea tree olejem, mentolem a dalšími látkami. Jejich délka působení je velmi omezená (Čechová, 2009).

Očkování je k dispozici pouze proti klíšťové encefalitidě. Obvyklé schéma očkování tvoří tři dávky, kdy je druhá dávka podávána po jednom až třech měsících a třetí dávka po půl roce od druhé dávky. Při zrychleném schématu, kdy se podávají pouze dvě dávky s odstupem dvou týdnů, se i tak doporučuje třetí dávka zhruba po roce. Tento alternativní způsob očkování, již není výrobci vakcíny uváděn (Petráš, 2007).

Očkovací látky patří mezi dobře snášenlivé a bezpečné. Nežádoucí účinky jsou popisovány pouze jako lokální reakce v místě vpichu. Pouze u 10 % očkovaných bývají shledávány nežádoucí účinky v podobě nevolnosti, necitlivosti, dušnosti či hypotenze. Očkování se nedoporučuje při horečnatém onemocnění a v těhotenství. Další kontraindikací může být přecitlivělost na určitou látku obsaženou ve vakcíně (Petráš, 2007).

1.2. Infekční onemocnění

Infekční onemocnění můžeme rozdělit na onemocnění virové, bakteriální a protozoální nákazy. Mezi nejznámější onemocnění patří nepochybně lymeská borelióza, která se řadí mezi bakteriální nákazy a klíšťová encefalitida, jež je řádným příkladem virového onemocnění. Nejsou to ale jediná onemocnění, která se na území České republiky vyskytují. Dalšími příklady jsou babesióza, tularémie, ehrlichióza, bartonelóza a neoehrlichióza (Černý, 1997).

1.2.1 Virové onemocnění

1.2.1.1 Klíšťová encefalitida (KE)

Onemocnění, které je známé nejen na území České republiky, se rozšířilo po celé Evropě. Virus je přenášen klíšťaty a postihuje centrální nervovou soustavu (CNS). U většiny nemocných jsou projevy asymptomatické či nevyvinuté, tudíž není znám přesný počet pacientů s klíšťovou encefalidou (Růžek, 2015).

1.2.1.1.1 Epidemiologie

Nejčastější příčinou je přenos z infikovaného klíštěte. Schopnost nákazy mají všechna vývojová stádia *Ixodes ricinus*. Záleží na aktivitě klíšťat, neboť s vyšší aktivitou klíštěte roste i riziko nákazy - tzn. incidence nemocí je od dubna do konce října. Závisí to ale i na aktuálním počasí. V České republice činí promořenost okolo 5 %, ale záleží na lokalitě. Nejvíce zamořené jsou jižní Čechy a území severní a jižní Moravy. Další možnou příčinou KE jsou perorální infekce. Nákaza je možná také z tepelně neupraveného kravského a kozího mléka či výrobků z nich (Vaverková, 2014).

1.2.1.1.2 Etiologie

Virus KE se nazývá TBEV (Tick-born encephalitis virus). Patří mezi arboviry z čeledi Flaviviridae, rodu Flavivirus. Tuto skupinu virů, které způsobují zánětlivé onemocnění mozkových blan, značíme jako RNA viry (Bártová, 2015).

1.2.1.1.3 Patogeneze

Při přisátí klíštěte obecného může dojít k přenosu infekce, kdy virus KE infikuje různé buňky a tím dochází k pomnožení viru. Napadeny jsou především buňky imunitního systému, Langerhansovy ostrůvky, které jsou prvními antigeny prezentujícími buňkami (APC). Informace se přenáší do spádových lymfatických uzlin, kde se může

virus pomnožit v makrofázích. Pokud se virus nemůže množit, nedojde k virémii. Jestliže se virus pomnoží, dochází k uvolňování do krevního řečiště, kdy jsou následně infikovány různé tkáně či orgány. Zde se virus dále pomnoží a zpět se uvolní do krevního řečiště a po překonání hematoencefalické bariéry vstupuje do CNS, kde mohou být postiženy všechny její části (Roháčová, 2006).

Nemocného doprovází necharakteristické obtíže podobné chřipkovým onemocněním. Symptomatická fáze zahrnuje bolesti svalstva, kloubů a hlavy za zvýšených teplot. Příznaky po několika dnech vymizí a infikovaní lidé se cítí zdraví. To vše zahrnuje primární fázi onemocnění. Pro sekundární fázi je charakteristický rychlý vzestup teploty s těžkými symptomy z první fáze, kdy se přidává i výrazná světloplachost. Časté jsou i asymptomatické průběhy onemocnění, kdy pacient nepocítí žádné obtíže (Roháčová, 2006).

1.2.1.1.4 Diagnostika

Diagnostika je serologická a dochází při ní k prokázání specifických protilátek IgM a IgG pomocí ELISY. IgM protilátky jsou prokazatelné již v časně fázi onemocnění. V sekundární fázi se vyskytují IgM protilátky společně s IgG. Stanovení protilátek probíhá buď ze séra, či z likvoru. Další možnou metodou diagnostiky je polymerázová řetězová reakce (PCR) (Goddard, 2000).

Při interpretaci výsledků se musí dbát na okolnosti. Příkladem může být očkování, při němž může dojít k falešně pozitivním výsledkům (Kimmig et al, 2003).

Krevní obraz při KE se liší podle fáze onemocnění. V první fázi se jedná o výraznou leukopenii, kterou následně vystřídá leukocytóza. Zvýšená bývá i krevní sedimentace erytrocytů (Goddard, 2000).

1.2.1.1.5 Léčba

Účinná léčba proti viru KE v dnešní době neexistuje. Proti onemocnění lze ale chránit očkováním. V České republice existují dva typy očkovacích látek, jež se skládají ze tří očkovacích dávek. Důležité je, aby podání třetí dávky proběhlo před sezónním výskytem klíšťat. Přeočkovávání probíhá po každých pěti letech, u starších osob nad 49 let každý třetí rok (Státní ústav pro kontrolu léčiv, 2012).

1.2.2 Bakteriální onemocnění

1.2.2.1 Tularémie

Bakterie, způsobující tularémii, byla poprvé objevena v Kalifornii u jezera Tulare, roku 1911. Onemocnění je označováno jako „zaječí mor“ postihující zejména zajíce a polní zvěř, ale je přenosné na člověka. Zvířata trpící na tularémii ztrácejí plachost, jsou malátní. Taktová zvěř se dá snadno chytit. Mezi přenašeče této bakterie patří komáři, klíšťata, blechy a ovádi (Macela, 2006).

1.2.2.1.1 Epidemiologie

Tularémie je typická na území Evropy, Ameriky, Asie. Případy onemocnění jsou zaznamenány ale i v severní Africe. Přenos infekce je způsoben uhynulými nebo žijícími zvířaty a nejčastějšími přenašeči jsou hlodavci, zajíci, ale především klíště obecné (Macela, 2006).

1.2.2.1.2 Etiologie

Původcem je *Francisella tularensis*, což je gramnegativní bakterie. Jde o intracelulárního patogena, který není schopen tvořit spory. Od počátku jeho objevení byly známy dva subtypy, které se označovaly A a B. Nyní je známo několik subtypů, jako například *Francisella tularensis holarctica* nebo *Francisella tularensis mediaasiatica*. Liší se zejména svým místem výskytu (Bartošová, 2005).

1.2.2.1.3 Patogeneze

Klinické příznaky se liší podle typu nákazy. Pokud infekce do těla projde kožní oděrkou, kousnutím komára, nebo přisátím klíštěte, dojde na kůži k vzniku typického vředu. Tato forma se nazývá ulceroglandulární, kdy léčba vředu může trvat až několik let. Dalším možným místem vstupu infekce jsou oční spojivky. Tato forma, okuloglandulární, je typická hnisavým zánětem spojivek. Poslední variantou, kdy dojde k požití infikovaného, málo tepelně upravovaného masa, se nazývá intestinální forma onemocnění. Při tomto typu jsou typické bolesti břicha, zvracení či průjemy (Siderovski, 2006).

1.2.2.1.4 Diagnostika

Gramnegativní bakterie je velmi náročná na kultivaci, vyžaduje specifické kultivační podmínky. Dalšími možnými metodami její diagnostiky jsou serologické

testy či pomocí PCR. Jedinou nevýhodou serologických testů je pozdější vznik prokazatelných protilátek (Chalupa, 2000).

1.2.2.1.5 Léčba

Pro léčbu jsou užity různé druhy antibiotik, jako je streptomycin, gentamycin. Pokud se tularémie neléčí, může dojít až k úmrtí pacienta. Úmrtnost se pohybuje mezi 5-15% (Havlík, 2002).

1.2.2.2 Lymeská borelióza

Původce Lymeské boreliózy (LB) je *Borelia burgdorferi*, jež byla objevena v roce 1982. Název bakterie se nese podle svého objevitele Willyho Burgdorfera (Bartůněk, 1996).

1.2.2.2.1 Epidemiologie

Onemocnění se vyskytuje téměř na všech kontinentech světa, kromě Austrálie, kde patogen doposud nebyl prokázán. LB patří mezi zoonózy, kdy je klíště obecné jedním z hlavních přenašečů bakterie. Přenos dělíme na přímý a nepřímý. Přenos přímý se nazývá podle nasátí klíštěte, kdy se bakterie dostává přímo do krve. Tento druh přenosu je ovlivněn dobou přisátí. Druhý typ, přenos nepřímý, je typem, při němž se bakterie do těla dostává pomocí kožních oděrek, při rozdrcení, rozškrábnutí klíštěte na povrchu kůže (Goddard, 2000).

Přenos je možný také z matky na plod, ale nepatří mezi onemocnění s teratogenním účinkem (Roháčová, 2006).

1.2.2.2.2 Etiologie

LB je způsobena skupinou borelií, což jsou gramnegativní bakterie tvaru tyčky, jež řadíme je mezi spirochety. Tento komplex se nazývá *Borrelia burgdorferi sensu lato*. Existuje více druhů a poddruhů této bakterie a jejich pojmenování je velmi komplikované. Mezi tři hlavní původce LB patří *Borrelia burgdorferi*, *Borrelia afzelii* a *Borrelia garinii*. Ani mezi stejnými druhy bakterií není shoda v antigenní výbavě, což se považuje za jednu z komplikací v diagnostice, či při výzkumu léčiv (Buhner, 2014).

Patogenními jsou označovány všechny borelie. Jejich průkaz je složitý z hlediska náročnosti podmínek růstu. Statistická data ukazují vzestup onemocnění

LB, což může být také zapříčiněno vývojem laboratorních metod. V přírodě se volně nevyskytují, přežívají pouze v hostitelích, kdy tím nejčastějším bývá klišťe obecné (Roháčová, 2005).

1.2.2.2.3 Patogeneze

Zpravidla mluvíme o třech stádiích (viz. Tabulka 1) LB, stádium rané, diseminované a posledním je stádium pozdní.

Tabulka 1: Klinický obraz LB

Stádium	Časové období	Symptomy
Rané	Dny, týdny po nákaze	-Erythema chronicum migrans -malátnost, bolest hlavy, zvýšená teplota
Diseminované	Rozmezí týdnů a měsíců	-Erythema migrans multiple -akutní artritida, boreliový lymfocytom, myokarditis
Pozdní	Měsíce nebo roky od nákazy	-Acrodermatitis chronica atrophicans -encefalomyelitida, artritida, meningoencefalitida

Tento klinický obraz (k. o.) je velmi zjednodušený, u každého jedince je průběh onemocnění rozdílný. Můžeme tedy mluvit o atypickém k. o., při čemž důvodem je pestrá škála symptomů, kdy se rané a diseminované období prolíná (Sedlák a Tomšíčková, 2006).

1.2.2.2.4 Diagnostika

Diagnostika u pacientů s jasnými symptomy (př. erythema chronicum migrans) není složitá, problémy nastávají u pacientů bez typických příznaků. Hlavními laboratorními metodami pro stanovení je ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) a Western blotting. Vyšetřují se specifické protilátky třídy IgG a IgM. Někdy jsou vhodné pro doplnění diagnostiky i laboratorní metody přímé, jako je kultivace, elektronová mikroskopie či PCR (Roháčová, 2006).

1.2.2.2.5 Léčba

Antibiotika (ATB) jsou lékem volby číslo jedna. Léčba se zahajuje po zhodnocení klinického obrazu, podle kterého se hodnotí, jaká skupina ATB je pro pacienta vhodná. Obvykle je používán doxycyklin, u dětí do 8 let a těhotných žen se užívají amoxyciliny.

Při druhém a třetím stádiu se užívají ATB druhu cefotaxim či ceftriaxon. Při relapsu, či nedostatečném účinku lze léčbu opakovat (Buhner, 2014).

1.2.2.3 Ehrlichioza

Rozeznáváme dva druhy patogenní pro člověka. Ehrlichiozu rozdělujeme na granulocytární a monocytární. Lidská granulocytární ehrlichioza (LGE) je způsobena druhem *E. phagocytophilum*. U druhého typu se jedná o lidskou monocytární ehrlichiozu (LME) způsobenou bakterií *E. chaffeensis*. Dalším typem je trombocytární ehrlichie, která je typická pro psy, a u člověka se zatím neprokázala (Beneš, 2009).

1.2.2.3.1 Epidemiologie

LGE je druhem typickým pro Evropu, kdežto LME je popisována v USA. Přenašečem mohou být různé druhy klíšťat, rezervoárem bakterie jsou různá zvířata: psi, lesní zvěř, ovce, hlodavci, dobytek (Havlík, 2002).

1.2.2.3.2 Etiologie

Když hovoříme o ehrlichiiích, máme na mysli malé gramnegativní, intracelulární bakterie. Již bylo pospáno mnoho druhů, které napadají teplokrevné hostitele. *Ehrlichia chaffeensis* napadající monocyty způsobuje horečnatá onemocnění, stejně jako agens LGE *Ehrlichia phagocytophila* postihující granulocyty (Havlík, 2002).

1.2.2.3.3 Patogeneze

Zásadní rolí je délka přisátí klíštěte na hostiteli, poté se bakterie v napadených buňkách mění na útvar, shluk označovaný morula. Hlavními příznaky LGE jsou horečka, zimnice, třesavka, bolest svalstva a v neposlední řadě zvracení či závratě. Mezi popisované symptomy u LME patří horečka, bolest hlavy, bolest svalů, úbytek váhy, kožní vyrážka a závratě. U obou typů po laboratorní diagnostice stanovíme trombocytopenii, leukopenii a zvýšenou transaminázu. Při včasné diagnostice a onemocnění bez komplikací trvá průběh okolo týdne. Úmrtí způsobená těmito bakteriemi jsou velmi ojedinělá (Beneš, 2009).

1.2.2.3.4 Diagnostika

Pro průkaz se využívají metody serologické, kdy je nutné vyšetřit sérum na specifické protilátky či PCR. Výsledkem krevního obrazu je typická leukopenie a trombocytopenie. Při potvrzení diagnózy je třeba dbát na anamnézu, výsledky krevního obrazu a výsledky jaterních testů, kdy je zvýšená transamináza.

Charakteristickým znakem jsou také moruly, které bakterie tvoří uvnitř leukocytů (Roháčová, 2006).

1.2.2.3.5 Léčba

Léky první volby jsou antibiotika, například doxycyklin, rifampicin či u chronického průběhu chloramfenikol. Léky jsou podávány po dobu 3 týdnů (Roháčová, 2006).

1.2.2.4 Bartonelóza

Onemocnění nazývané také jako nemoc z kočičího škrábnutí (CSD – catscratch disease) je způsobeno gramnegativní tyčkou *B. henselae*. Onemocnění není přenášeno z člověka na člověka neboli interhumánně. Hlavním rezervoárem je kočka domácí, kdy je bakterie přenášena blechami, nebo může být dalším přenašečem i klíště rodu *Ixodes ricinus* (Schmidt, 1998).

1.2.2.4.1 Etiologie

Jedná se o bakteriální onemocnění způsobené *B. henselae*, což jsou aerobní gramnegativní bakterie. Infekce se vyskytuje většinou u chovatelů koček, bezdomovců či lidí žijících ve špatných hygienických podmínkách (Máslová et al, 2014).

1.2.2.4.2 Patogeneze

Po uplynutí až deseti dní se v místě přisátí či poranění, poškrábání objevují malé bolestivé hnisavé trhlinky kůže, strupy. Mezi symptomy patří bolest hlavy, slabost, závratě, únava, bolest kloubů a svalů. U imunodeficitních pacientů mohou nastat komplikace, kdy může dojít k infekcím očí, encefalitidě, nebo se mohou také zvětšit játra (Schmidt, 1998).

1.2.2.4.3 Diagnostika

Při diagnostice je využíván serologický průkaz protilátek IgM a IgG. Dále můžeme prokázat bartonelózu pomocí metody PCR. Z krevního obrazu zjišťujeme leukocytózu, trombocytopenii nebo také hladinu anémie. Dalším znakem bývá zvýšená alkalická fosfatáza v séru (Máslová et al, 2014).

1.2.2.4.4 Léčba

K léčbě této infekce jsou důležitá antibiotika. Mnohdy se užívá kombinace doxycyklinu a aminoglykosidových ATB. Antibiotika se užívají po dobu dvou týdnů,

při komplikacích se léčba může protáhnout až na deset – dvanáct týdnů (Máslová et al, 2014).

1.2.2.5 Neoehrlichioza

Patogen způsobující neoehrlichiozu, jež patří mezi závažná horečnatá onemocnění, se nazývá *Candidatus Neoehrlichiamikurensis*. Onemocnění může být závažné pro imunodeficitní pacienty, pro lidi s vyšším věkem, nebo také pacienty s autoimunitním onemocněním, či onkologicky léčené. Závažné se může stát také špatnou diagnózou, kdy dojde k nesprávné léčbě (Wenneras, 2015).

1.2.2.5.1 Epidemiologie

Toto onemocnění lze považovat za „nově“ objevené, potvrzeno bylo zatím v oblastech Ameriky, Asie, Afriky i v Evropě. Za hlavního vektora v Evropě je považováno klíště obecné. První veřejně potvrzený výskyt pochází ze Švédska, kdy se symptomy podobaly již známé ehrlichioze. Další pacient pocházel ze Švýcarska. Oba tito pacienti měli oslabený imunitní systém. Bylo tedy poté potvrzeno, že tímto onemocněním jsou ohroženi imunopresivní pacienti (Silaghi et al, 2016).

1.2.2.5.2 Etiologie

Candidatus Neoehrlichiamikurensis je gramnegativní bakterie s intracelulární povahou a předpokládajícím tropismem endotelových buněk. Bakterie patří do čeledi Anaplasmatocae, tato čeleď zahrnuje šest rodů, mezi které patří i rod Ehrlichia. Charakteristický pro ně je tenký periplazmatický prostor, který odděluje vnitřní a vnější membránu a je to společná vlastnost pro čeleď Anaplasmatocae. V přírodě přechází v hostitelích, jako jsou potkani, myši, z nichž je klíšaty přenášena na větší savce, či na člověka (Silaghi et al, 2016).

1.2.2.5.3 Patogeneze

Lidé se domnívali, že neoehrlichioza je onemocnění především imunopresivních pacientů. S postupem času je potvrzená diagnostika i u imunokompetentních jedinců. Charakteristickými symptomy jsou zimnice, pocení, remitující vysoké horečky, bolest hlavy. Často bývají doprovázené nevolnostmi, zvracením, kožními vyrážkami. Bolest je typická migrující, postihující klouby, krk, svaly. Mezi nebezpečné příznaky patří cévní či tromboembolické příhody, jež jsou způsobeny záněty cévní výstelky (Wenneras, 2015).

1.2.2.5.4 Diagnostika

Neoehrlichiozu je velmi složité správně a včas diagnostikovat. Hlavní laboratorní metodou využívanou pro průkaz je metoda PCR. Doposud nejsou známy žádné serologické postupy vyšetření, ani se do této doby nepovedlo bakterii vykultivovat (Silaghi et al, 2016).

1.2.2.5.5 Léčba

Doporučovanými léky jsou antibiotika, druh doxycyklin. Pokud má pacient známky intolerance, či alergie, je dalším navrženým lékem rifampicin. Doporučená délka podávání antibiotik bývá okolo tří týdnů, při komplikacích až šest týdnů (Silaghi et al, 2016).

1.2.3 Protozoární onemocnění

Mezi nejznámější protozoární patogeny přenášené klíšťaty patří rody Babesia a Theileria. Theilerie jsou morfologicky podobné babesiím, ale napadají leukocyty, které jsou poté schopny transformovat. Tito původci nejsou nebezpeční pro člověka, ale dokáží způsobit nákazu mezi dobytčím (Hausmann, 2003).

1.2.3.1 Babesióza

Onemocnění patří do parazitárních nákaz způsobené přenosem z klíšťat. Babes v roce 1888 popsal dobytčí mor a jako první určil protozoa způsobující nákazu (Kimmig et al, 2003). Podle (Gelfan a Callahan, 2003) byla babesióza u člověka poprvé viděna v USA v roce 1969, kdy byla Babesia microti popsána jako příčina „malárie“ u pacienta s operovanou slezinou. U některých případů byla popsána infekce způsobená krevní transfuzí. Dobrovolní dárci mohou mít parazita v krvi ještě měsíce po vyléčení a tím ohrožují případné příjemce (Kimmig et al, 2003).

1.2.3.1.1 Epidemiologie

Druh Babesia se liší podle výskytu. Nejčastějšími původci jsou Babesia microti, kdy je vektorem Ixodes dammini vyskytující se v USA. V Evropě je typický druh Babesia divergens, jejímž přenašečem je Ixodes ricinus. Ostatní druhy jsou zatím spojovány pouze s infekcemi u zvířat, jako jsou krávy, koně, vepři, ovce či psi a kočky. Velmi vzácně dojde k onemocnění pomocí Babesii equi (Kimmig et al, 2003).

1.2.3.1.2 *Etiologie*

Příčinou infekce jsou prvoci žijící intracelulárně v červených krvinkách. Jednotlivé druhy se liší svou velikostí, která se pohybuje od 1 do 5 mikrometrů. Většinou zaujmají tvar hrušky. Životní cyklus babesie začíná v erytrocytech hlodavců, kde se bezpohlavně rozmnoží. K přenosu dochází klíštětem, kdy vzniklý prvok vstupuje do slinných žláz. Po přenosu na člověka životní cyklus končí. Jde o typickou zoonózu, kdy se vyžaduje přenos ze zvířecího rezervoáru na člověka. Jedinou výjimkou je přenos krví dárce – příjemce (Gelfan a Callahan, 2003).

1.2.3.1.3 *Patogeneze*

Infekce se značně liší, ovlivňuje ji mnoho faktorů, jako je druh parazita, věk a imunitní kompetence hostitele. Starší lidé mají oslabenou buněčnou imunitu, kdy se i mírné infekce mohou vyvinout v těžký stav onemocnění. Dále jsou ohroženi jednotlivci jakéhokoliv věku, kteří jsou imunokompromitovaní. Ačkoliv dlouhodobé účinky cirkulujících parazitů nejsou dobře známy, největší asymptomatickou infekcí je schopnost darovat krev (Gelfan a Callahan, 2003).

Patogenita jednotlivých druhů není zcela prozkoumána. Po inkubační době jednoho až čtyř týdnů se objevuje horečka, celková malátnost a slabost, často doprovázená bolestmi, pocením, bolestí hlavy. Dochází také k úbytku na váze, mnohdy jsou pozorovány recidivy. Infekce bývá mnohdy doprovázena i jinou infekcí jako je například lymeská borelióza. Asi u 10 % případů došlo k úmrtí pacientů, kteří byli před nákazou po splenektomii, nebo byli ohroženi jinými způsoby, jako je například infekce HIV (Ord a Lobo, 2015).

1.2.3.1.4 *Diagnostika*

Mikroskopické pozorování parazitů v krevních nátěrech zůstává klasickou metodou diagnózy. Onemocnění lze obtížně diagnostikovat u menší či u malé hustoty parazitů, a proto tato metoda postrádá citlivost. Serologické testy poskytují pouze některé laboratoře. PCR v reálném čase nebo kvantitativně je mnohem citlivější než mikroskopie. Dokáže detekovat přibližně 5-10 parazitů/μl (Ord a Lobo, 2015).

1.2.3.1.5 Léčba

Léčba mírného stavu se doporučuje na 7-10 dnů pomocí kombinace clindamycinu s chininem. Jelikož toxicita chininu je významná, doporučuje se alternativa intravenózně podávaného chininu. Poté bylo prokázáno, že stejně účinný, ale s méně vedlejšími účinky, je atovaquon. Jako adekvátní léčba se považuje výměna krve transfuzí, kdy se rychle odstraní parazitované erythrocyty z krevního oběhu hostitele. Tato možnost se považuje za přijatelnou při více než 50% infikovanosti (Ord a Lobo, 2015).

2 Metodika

Praktická část mé bakalářské práce spočívá ve vyšetření klíšťat, které probíhá v jednotlivých krocích. První část se zabývá izolací DNA, druhá část pak vlastní analýzou. Pro vlastní analýzu se využívá metody PCR, a RT-PCR (reverse transcription PCR). Kontrola výsledků probíhá pomocí metody ELFO (horizontální gelová elektroforéza). Testování klíšťat se provádí v rámci prevence, zájemci si klíště odstraní podle pravidel a pošlou na provedení testu. Pozitivní nález některých z infekčních původců neznamená, že došlo k přenosu na člověka. I přes negativní výsledky testů, je dobré dbát zvýšené opatrnosti na zdravotní stav a klinické příznaky takto přenosných onemocnění

2.1. Izolace genomické DNA/ total RNA z klíšťat

Izolace DNA-RNA je prvním a zároveň nepostradatelným krokem k získávání informací o DNA/ RNA, ale také počátečním krokem pro další analýzy. DNA/ RNA mohou být separovány jak z živého, tak z mrtvého, zakonzervovaného materiálu. Při izolaci DNA jde u těchto parazitů o genomovou DNA. Izolace RNA je značně komplikovanější, kvůli obsahu enzymů degradujících tuto nestabilní molekulu. Při tomto druhu separace je nutné inaktivovat ribonukleázy a vyhnout se vysokým teplotám (Chee Tan a Chin Yiap, 2009).

2.1.1 Používané reagenty:

<u>Název:</u>	<u>Složení:</u>
4M GTC	4M guanidine thiocyanate + 0,1M Tris pH=7,5
2-ME	2-mercaptoethanol
70% EtOH	70% ethylalkohol (96%EtOH + H ₂ O)
Wash buffer	60mM Acetát draselný (KoAc) + 8,3mM Tris pH=7,5 + 40uM EDTA pH=8 + 63% ethylalkohol
TE	10mM Tris pH=7,5 + 1mM EDTA pH=8
RNAsin	RiboLock RNase Inhibitor, Fermentas EO0381, 40U/μL

EDTA (0,5M, pH8, 100ml): složení: kyselina etylendiamintetraoctová + dH₂O. Chelatační činidlo, které se v molekulární biologii využívá pro inaktivaci nukleáz (LAB Guide – průvodce laboratoří).

Přesná příprava roztoků byla provedena podle laboratorního postupu P1-6, který vypracovala pí M. Burýšková.

2.1.2 Pracovní postup:

Jako první je důležité připravit lyzační roztok, který odpovídá danému množství vzorků. K počtu vzorků, připočítáváme blank plus jeden navíc, aby byl roztok připraven v nadbytku. Do zkumavky s blankem, přidáváme všechny roztoky, aby se popřípadě zjistila kontaminace roztoků. Lyzační roztok se připravuje v poměru 250μl 4M GTC + 2,5μl 2-ME na jeden vzorek.

Vzorky klíštěte jsou uchovávány v jednotlivých pospaných zkumavkách v mrazáku při -20°C. Do každé zkumavky se vzorkem přidáváme 250μl směsi GTC+2-ME. V této směsi, pomocí špičky rozmačkáme klíště, aby se uvolnil obsah střev. Poté dáme zkumavky typu eppendorf vortexovat Hard 10s a stočit v minicentrifuze na jeden cyklus: 1600rpm, 6s.

Zkumavky jednotlivě otevřeme a přidáme 250μl 70% EtOH a opět dáme vortexovat a stočit na jeden cyklus. Tento lyzát přeneseme pipetou o objemu 500μl na izolační kolonu, kterou dáme stočit na 1minutu, 16 000g, stočenou tekutinu vylejeme. Pozor se musí dát na velké napité klíště, kdy je nutné tento vzorek stočit 3minuty při 16 000g a dále se používá pouze supernatant.

Kolonu promyjeme nejméně dvakrát pomocí 500μl wash buffru, stočíme 0,5minuty na 16 000g, stočenou tekutinu vylijeme. Pro odstranění zbytků EtOH je důležité dát stočit ještě na 1 minutu při 16 000g.

Následuje eluce, kdy si předem připravíme eluční roztok. Eluční roztok připravíme pomocí 50μl roztoku TE + 0,125μl RNAsin, kdy toto množství platí pro jeden vzorek. Nesmíme tedy zapomenout na vzorky další, také musíme počítat s jedním navíc, aby nám roztok vyšel v nadbytku.

Kolonu přendáme do čisté zkumavky o objemu 1,5ml, která musí být označená číslem vzorku. Do jednotlivých kolon přidáme 50μl elučního roztoku. Stočíme na

1minutu při 16 000g. Tyto zkumavky poté uchováváme ve vychlazeném stojánku. Vyizolovanou DNA/RNA musíme co nejdříve použít, do dalšího použití je nutné zkumavky uchovávat při 4-8°C.

Tento pracovní postup je popsán podle předlohy laboratorního postupu firmy Protean s. r. o.

2.2. Analýza klíšťat – PCR, RT-PCR

Polymerázová řetězcová reakce (PCR), z anglického názvu Polymerase Chain Reaction, je metodou amplifikace zvoleného úseku DNA. Vybraný úsek DNA musí být ohraničen tzv. primery, což je zásadní podmínka pro správnou polymeraci. Jsou to fragmenty o 20-25 nukleotidech a pomocí komplementarity nasedají na vybraný úsek DNA. Syntézu daného úseku provádí DNA polymeráza. Reakční směs musí také obsahovat směs nukleotidů dNTPs. Polymerázová řetězcová reakce probíhá po cyklech geometricky (McPherson a Møller, 2006).

PCR probíhá ve třech odlišných krocích řízených teplotou v přístroji zvaném thermocycler. Prvním krokem je tzv. denaturace, kdy se dvouřetězcová templátová DNA denaturuje zahříváním, typicky na 94 °C. Annealing neboli připojení určitého úseku je druhým krokem, jež probíhá při teplotě v rozmezí 50-60 °C a je založen na principu komplementarity dusíkatých bází. Syntéza DNA probíhá typicky při teplotě 72 °C pomocí termostabilní DNA polymerázy (McPherson a Møller, 2006).

Pro diagnostiku TBEV se užívá RT-PCR neboli reverzně transkripční PCR. Tento typ je určen pro množení molekul RNA, kdy je izolovaná RNA převáděna do cDNA (complementary DNA) enzymem reverzní transkriptáza. V místě primeru reverzní transkriptáza syntetizuje komplementární řetězec, přičemž vzniká hybridní DNA (Walker a Rapley, 2009).

2.2.1 Reagencie

Tick-Taq DNA Polymerase, Protean, 5U/μl, dodávána s 10x puforem s 20mM MgCl₂

Reverzní transkriptáza RT Revert Aid Reverse Transcriptase, Fermentas EP0442/0441, 200U/μl

dNTPs: dNTP set, Fermentas R0182, 4x 100μmol

BSA: Bovine Serum Albumin, NBE B9001S, 10mg/ml

DNA markery: GeneRuler Express DNA ladder, Fermentas SM1551

GeneRuler Low range DNA ladder, Fermentas SM1192

Sekvenční primery: Generi biotech

Kontrolní standardy: Protean, koncentrace pozitivních kontrol jsou upravovány dle pokynů vedoucího laboratoře

2.2.2 Analýza TBEV – klíšťová encefalitida

Vzorky: vyizolovaná total RNA, blank, negativní kontrola (H₂O 5μl), pozitivní kontrola (standard Protean PK60 – 1ng/μl -175bp, 0,5μl DNA)

Tabulka 2 Reakční směs pro detekci TBEV pomocí RT-PCR

Složka	Objem (μl)
total RNA	5
5x RT pufr	5
BSA 10mg/ml	0,25
Primer mix TBE1 + TBE2 10pmol/μl (0,4mM)	1
dNTPs 10mM each (0,2mM)	0,5
Tick – Taq DNA polymerase (2U)	0,4
Reverse Transcriptase (60U)	0,3
H ₂ O	12,55
CELKOVÝ OBJEM	25μl

Do zkumavky s blankem pokračujeme v pipetování reagensů, jako u vzorků s vyizolovanou RNA s tím rozdílem, že žádné RNA neobsahuje. Blank se užívá pro kontrolu reagensů. Zkumavka s negativní kontrolou obsahuje pouze 5μl H₂O. Pozitivní kontrola obsahuje kromě 0,5μl DNA ještě 4,5μl H₂O. Takto připravené zkumavky můžeme vložit do cyklu od firmy eppendorf a spustit program TBEV.

Tabulka 3 Program TBEV

	60 °C	5 minut
	42 °C	45 minut
	94 °C	5 minut
40x	94 °C	15 sekund
	60 °C	15 sekund
	72 °C	30 sekund
	72 °C	2 minuty
	4 °C	∞

Produkty reakce kontrolujeme pomocí ELFO (horizontální gelová elektroforéza).

2.2.3 Analýza Bab – Babesiosa

Vzorky: vyizolovaná DNA, blank, negativní kontrola (H₂O 5μl), pozitivní kontrola (standard Protean PK56 – 100fg/μl -620 + 490bp, 1μl DNA)

Tabulka 4 Složení reakční směsi pro detekci Bab pomocí PCR

Složka	Objem (μl)
Vyizolovaná DNA	5
10x pufr (MgCl ₂ 2mM)	2,5
Primer mix Bab F+R, 10pmol/μl (0,4μM)	1
dNTPs mix 10mM (0,2mM)	0,5
Tic – Taq DNA polymerase (2U)	0,5
H ₂ O	15,6
CELKOVÝ OBJEM	25μl

Zkumavky se vzorky DNA a reagensy uzavřeme. Do zkumavky s blankem, který DNA neobsahuje také napipetujeme příslušné reagensy. Negativní kontrola obsahuje pouze 5μl H₂O. Do pozitivní kontroly napipetujeme 4,5μl H₂O s 0,5μl kontrolní DNA. Takto připravené zkumavky vkládáme do cykleru a spouštíme program babesiosa.

Tabulka 5 Program babesiosa

	94 °C	2 minuty
42x	94 °C	15 sekund
	53 °C	15 sekund
	72 °C	45 sekund
	72 °C	2 minuty
	4 °C	∞

Produkty reakce kontrolujeme pomocí ELFO (horizontální gelová elektroforéza).

2.2.4 Analýza NeoM – Neoehrlichia mikurensis

Vzorky: vyizolovaná DNA, blank, negativní kontrola (H₂O 5μl), pozitivní kontrola (standard protean PK164 – 10fg/μl -757bp, 1μl DNA)

Tabulka 6 Složení reakční směsi pro detekci NeoM pomocí PCR

Složka	Objem (μl)
DNA	5
10x pufr (MgCl ₂ – 2mM)	2,5
Primer mix NeoM943R + NeoM186F 10pmol/μl (0,4μM)	1
dNTPs mix 10mM (0,2mM)	0,5
Tic – Taq DNA polymerase (2U)	0,4
H ₂ O	15,6
CELKOVÝ OBJEM	25μl

Reakční směs každého vzorku ve zkumavce uzavřeme. Do zkumavky s blankem jsme také napipetovali reagentie, bez vzorku DNA. Negativní kontrola obsahuje pouze 5μl H₂O. Do zkumavky s 0,5μl pozitivní kontroly napipetujeme pomocí automatické pipety 4,5μl H₂O. Zkumavky vkládáme do cykleru, uzavřeme a spustíme program NeoM.

Tabulka 7 Program NeoM

	94 °C	2 minuty
40x	94 °C	15 sekund
	60 °C	15 sekund
	72 °C	45 sekund
	72 °C	2 minuty
	4 °C	∞

Produkty reakce kontrolujeme pomocí ELFO (horizontální gelová elektroforéza).

2.2.5 Analýza Bor – Borrelie

Vzorky: vyzolovaná DNA, blank, negativní kontrola (H₂O 5μl), pozitivní kontrola (standard protean PK54 – 100fg/μl -670bp, 1μl DNA)

Tabulka 8 Reakční směs pro detekci Bor pomocí PCR

Složka	Objem (μl)
DNA	5
10x pufr (MgCl ₂ – 2mM)	2,5
Primer mix BGSL1 +2 10pmol/μl (0,4μM)	1
dNTPs 10mM (0,2mM)	0,5
Tick – Taq DNA polymerase (2U)	0,4
H ₂ O	15,6
CELKOVÝ OBJEM	25μl

Takto připravená zkumavka je vhodná k vložení do cykleru. Samozřejmostí je použití pozitivní kontroly, která obsahuje kromě 0,5μl pozitivního standardu 4,5μl H₂O.

Při každé analýze se také pro kontrolu užívá negativní kontroly, jenž se skládá pouze 5μl H₂O. Od izolace také s analýzou provádíme blank, který slouží pro kontrolu reagensů, ale neobsahuje žádnou vyizolovanou DNA. Připravené zkumavky, vkládáme do cyklu a spouštíme program borel.

Tabulka 9 Program borel

	94 °C	2 minuty
40x	94 °C	15 sekund
	64 °C	15 sekund
	72 °C	45 sekund
	72 °C	2 minuty
	4 °C	∞

Produkty reakce kontrolujeme pomocí ELFO (horizontální gelová elektroforéza).

2.2.6 Analýza HGE- Ehrlichie

Vzorky: vyizolovaná DNA, blank, negativní kontrola (H₂O 5μl), pozitivní kontrola (standard protean PK11 – 10pg/μl -444bp, 1μl DNA)

Tabulka 10 Reakční směs pro detekci HGE pomocí PCR

Složka	Objem (μl)
DNA	5
10x pufr (MgCl ₂ – 2mM)	2,5
primer mix LA1 + LA6 10pmol/μl (0,4μM)	1
dNTPs 10mM (0,2mM)	0,5
Tick – Taq DNA polymerase (2U)	0,4
H ₂ O	15,6
CELKOVÝ OBJEM	25μl

Takto je reakční směs kompletní a připravená na vložení do přístroje cyklu. Společně s připravenými vzorky se také spouští negativní kontrola, pozitivní kontrola a blank. Přičemž negativní kontrolou je 5μl H₂O, pozitivní kontrola se skládá 0,5μl pozitivní DNA a 4,5μl H₂O. Výjimkou je blank, ten obsahuje všechny reagensy kromě vyizolované DNA.

Tabulka 11 Program hge

	94 °C	2 minuty
32x	94 °C	15 sekund
	52 °C	15 sekund
	72 °C	30 sekund
	72 °C	2 minuty
	4 °C	∞

Produkty reakce kontrolujeme pomocí ELFO (horizontální gelová elektroforéza).

2.2.7 Analýza BH – Bartonella

Vzorky: vyizolovaná DNA, blank, negativní kontrola (H₂O 5μl), pozitivní kontrola (standard PK55 – 100fg/μl -550bp, 1μl DNA)

Tabulka 12 Reakční směs pro detekci BH pomocí PCR

Složka	Objem (μl)
DNA	5
10x pufr (MgCl ₂ – 2mM)	2,5
primer mix BH F+R, 10 pmol/μl (0,4mM)	1
dNTPs 10mM (0,2mM)	0,5
Tick – Taq DNA polymerase (2U)	0,4
H ₂ O	15,6
CELKOVÝ OBJEM	25μl

Připravené reakční směsi všech vzorků musí být doprovázeny negativní, pozitivní kontrolou, ale také se zkumavkou obsahující blank, tzn. všechny reagenty, kromě vyizolované DNA. 5μl H₂O použijeme jako negativní kontrolu. Zkumavku s 4,5μl H₂O plus 0,5μl pozitivní DNA označujeme jako pozitivní kontrola. Takto připravené zkumavky vkládáme do cykleru na program bartonell bh.

Tabulka 13 Program barotell bh

	94 °C	2 minuty
38x	94 °C	15 sekund
	66 °C	15 sekund
	72 °C	45 sekund
	72 °C	2 minuty
	4 °C	∞

Produkty reakce kontrolujeme pomocí ELFO (horizontální gelová elektroforéza).

2.2.8 Analýza Tul- Tularemie

Vzorky: vyizolovaná DNA, blank, negativní kontrola (H₂O 5μl), pozitivní kontrola (standard PK96 – 100 fg/μl -900bp, 1μl DNA)

Tabulka 14 Reakční směs pro detekci Tul pomocí PCR

Složka	Objem (μl)
DNA	5
10x pufr (MgCl ₂ – 2mM)	2,5
primer mix Tular F+R, 10pmol/μl (0,4Mm)	1
dNTPs 10mM (0,2mM)	0,5
Tic - Taq DNA polymerase (2U)	0,4
H ₂ O	15,6
CELKOVÝ OBJEM	25μl

Do připraveného cyklu vkládáme zkumavky s napipetovanými reakčními směsmi, ale také stripy negativní a pozitivní kontroly. Pozitivní kontrola obsahuje kromě 0,5μl pozitivního standardu 4,5μl H₂O, kdežto ta negativní pouze 5μl H₂O. Blank, který je také součástí každé analýzy obsahuje reagentie reakční směsi bez vyzolované DNA. Ujistíme se, zda máme v cyklu všechny zkumavky, poté je uzavřeme a spouštíme program tular.

Tabulka 15 Program tular

	95 °C	3 minuty
35x	95 °C	15 sekund
	55 °C	15 sekund
	72 °C	1 minuta
	72 °C	2 minuty
	4 °C	∞

Produkty reakce kontrolujeme pomocí ELFO (horizontální gelová elektroforéza).

2.3.ELFO

Pro výrobu gelu potřebného k elektroforéze musíme brát zřetel na počet vyšetřovaných vzorků. Po přepočítání míst, která budeme potřebovat, zvolíme velikost gelu, jež budeme připravovat. Každá velikost má svou vaničku a hřebínek. Hřebínek určuje počet a velikost jamek v gelu. Podle typů fragmentů DNA volíme koncentraci agarozového gelu. Gel se vyrábí podle stanovených laboratorních postupů. Pro kontrolu po analýze TBEV se používá 2 % agaróza, pro ostatní analýzy je vhodné užití 1 % či 1,5 % agaru.

Tabulka 16 Malý agar 50ml

MALÝ GEL 50ml	1%	1,5%	2%
Agaróza	0,5 g	0,75 g	1 g
TAE	60 ml	60 ml	75 ml
EB	2 μ l	2 μ l	2 μ l
var	4 min	5 min	5 min
ELFO	150 V	150 V	170 V
čas	16 min	16 min	18 min

Tabulka 17 Střední gel 150ml

STŘEDNÍ GEL 150ml	1%	1,5%	2%
Agaróza	1,5 g	2,25 g	3 g
TAE	160 ml	160 ml	165 ml
EB	7 μ l	7 μ l	7 μ l
var	6 min	8 min	8 min
ELFO	200 V	200 V	200 V
čas	16 min	20 min	23 min

Tabulka 18 Velký gel 300ml

VELKÝ GEL 300ML	1%	1,5%	2%
Agaróza	3 g	4,5 g	6 g
TAE	320 ml	350 ml	350 ml
EB	14 μ l	14 μ l	14 μ l
Var	6 min	12 min	15 min
ELFO	200 V	200 V	200 V
čas	16 min	18 min	18 min

TAE (Tris-Acetate-EDTA): složení: 2M Tris base, 1M kyselina octová, 50mM EDTA, dH₂O

EB (Ethidium bromide)

Agarózu smícháme s pufrem TAE ve skleněné lahvi. Množství agaru a pufru se liší, podle velikosti, koncentrace gelu. Na láhev položíme víčko, které musí být na lahvi povolené. Agarózu v lahvi rozpustíme v mikrovlnné troubě, podle času uvedeného v jednotlivých tabulkách. Připravený gel chladíme pod tekoucí vodou tak, aby nebyl vařící, ale aby nezačal tuhnut.

Vaničku si připravíme při době varu agaru v mikrovlnné troubě. Zkontrolujeme těsnící gumičky, aby gel popřípadě nevytekl. Podle počtu vzorků, vložíme do vaničky odpovídající elektroforetický hřeben.

Do lahve s rozpuštěným, horkým gelem přidáváme ethidium bromid v množství uváděném v tabulkách výše. EB je látka označující se jako mutagen, proto s touto látkou zacházíme opatrně v digestoři. V závěrečném kroku nám umožňuje vizualizaci DNA či RNA. Takto připravený agarozový gel vlijeme do vaničky, zkontrolujeme, zda se nám netvoří kolem hřebínků bublinky, popřípadě je odstraníme a vyčkáme na jeho ztuhnutí. Po dokonalém ztuhnutí, zhruba po 15-20 minutách, vyjmeme hřebínky.

Vaničku vložíme do ELFO vany a zalijeme roztokem TAE tak, aby hladina roztoku byla těsně nad gelem. Poté si připravíme vzorky na nanášení do gelu. Ke každému vzorku, ale také ke kontrolám a k blanku přidáváme 6 μ l 6xLoading Buffer (Protean), což je tzv. nanášecí pufr. Složení tohoto pufru: bromfenolová modř, která zajišťuje obarvení vzorku a glycerol, jenž má úlohu „zatěžkáni“, aby vzorek klesl na dno jamek.

Do první jamky nanášíme 4 μ l velikostního markeru Express Ladder (EL -Thermo scientific). Pouze u analýzy TBEV se používá velikostní marker Low Express Ladder (LR- Thermo scientific). Do dalších jamek postupně pipetujeme vzorky promíchané s Loading Buffer. Další jamky patří blanku, negativní a pozitivní kontrole. ELFO vanu přikryjeme víkem, zkontrolujeme, zda máme správně vanu zapojenou. Na zdroji nastavíme čas a příslušné volty podle tabulek výše.

Gel vizualizujeme pod UV světlem, po zkontrolování výsledků gel vyfotíme pro zdokumentování do protokolů Protean. Pracovní postup je popsán podle laboratorního postupu firmy Protean s. r. o. .

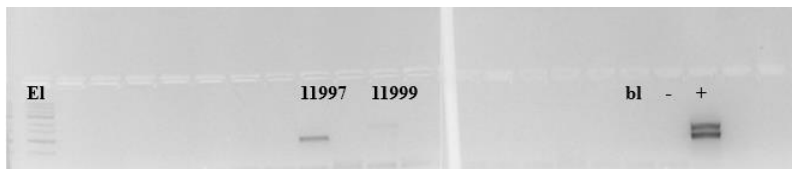
3 Výsledky

Při praktické části jsem pracovala s 65 vzorky klíšťat. Celkově jsem izolovala 60 vzorků DNA z klíšťat. Pro analýzu TBEV jsem izolovala 5 vzorků RNA. Při poruše stroje cycler jsem nedokončila 4. 9. 2018 analýzu 6 vzorků, kterou později dokončila laborantka.

U mých vzorků byla prováděna nejčastěji analýza na Borrelii a Ehrlichii. Jednou byla analyzována klíšťová encefalitida, Babesiosa, Bartonella a Tularemie. Bohužel k analýze Neoehrlichie mikurensis jsem se nedostala.

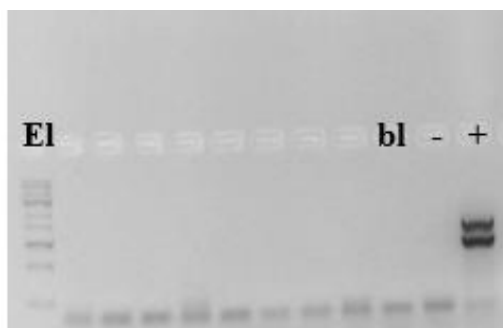
Celkem z 59 dokončených analýz byly 4 vzorky pozitivní. U 2 vzorků byl pozitivní průkaz Borrelií, jeden pozitivní výsledek u průkazu Babesiosy a jeden u analýzy Ehrlichie.

Dne 14. 8. 2018 jsem provedla izolaci a analýzu na 16 vzorcích. Po izolaci byl proveden test na Borrelii a Ehrlichii. Při kontrole výsledků byl zjištěn jeden vzorek 11999 pozitivní na Borrelii. Ehrlichie byla potvrzena také u jednoho ze vzorků 11997.



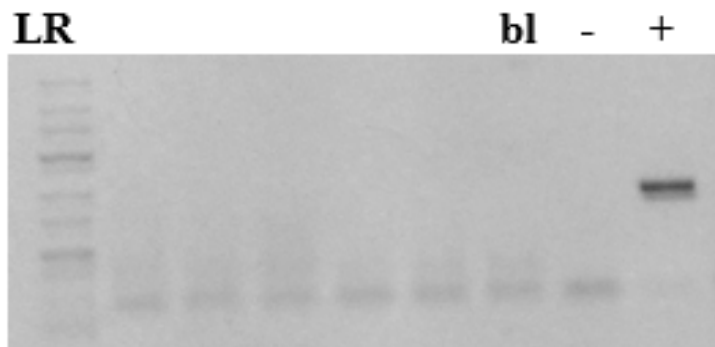
Obrázek 1 Výsledky analýzy 14.8.2018

21. 8. 2018 bylo k izolaci použito 8 vzorků na kterých jsem následně provedla analýzu na Borrelii a Ehrlichii. Všechny vzorky byly prokázány jako negativní.



Obrázek 2 Výsledky analýzy 21.8.2018

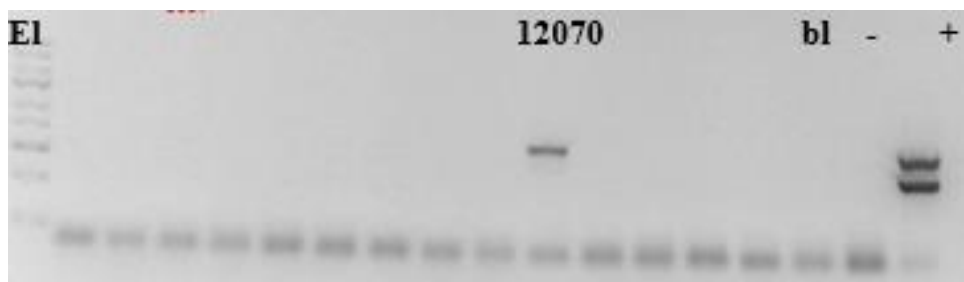
28. 8. 2018 přišlo na vyšetření 5 vzorků na analýzu klíšťové encefalitidy TBEV. Tyto vzorky jsem vyizolovala a následně použila pro analýzu. Všechny vzorky byly potvrzeny jako negativní.



Obrázek 3 Výsledky analýzy 28.8.2018

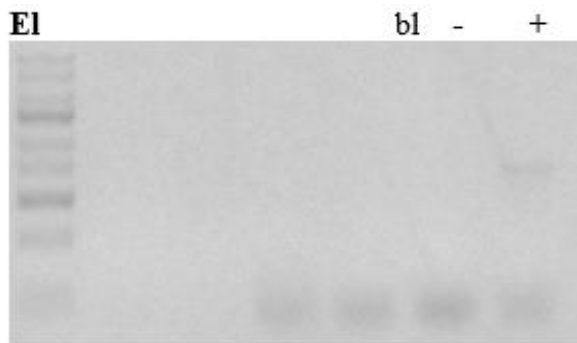
Dne 4. 9. 2018 jsem dostala k izolaci 6 vzorků klíšťat. Izolace proběhla, ale následně se zjistila porucha stroje cycler. Analýza byla dokončena po opravě cycleru pod dohledem vedoucí laboratoře.

12. 9. 2018 jsem vyizolovala 14 vzorků DNA, které byly následně podrobeny analýze Borrelie a Ehrlichie. Ehrlichie nebyla prokázána ani u jednoho ze vzorků. Na Borrelii byl potvrzen vzorek číslo 12070.



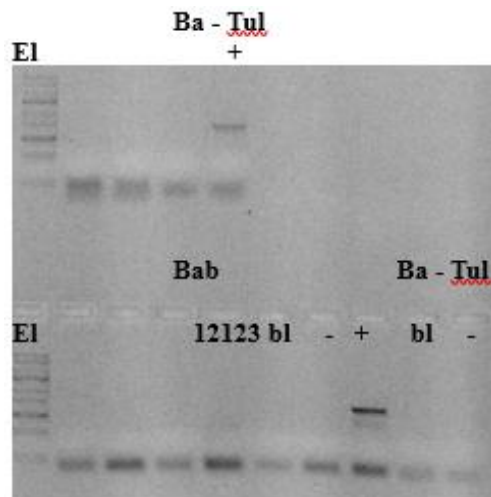
Obrázek 4 Výsledky analýzy 12.9.2018

19. 9. 2018 jsem v laboratoři Protean izolovala 3 vzorky a následně připravila na analýzu. Vzorky byly vyšetřovány na průkaz Babesiosy. U žádného ze tří vzorků nebyla Babesiósa prokázána. Při vyhodnocování vzorků po vyfocení vyšla velmi nekvalitní fotografie.



Obrázek 5 Výsledky analýzy 19.9.2018

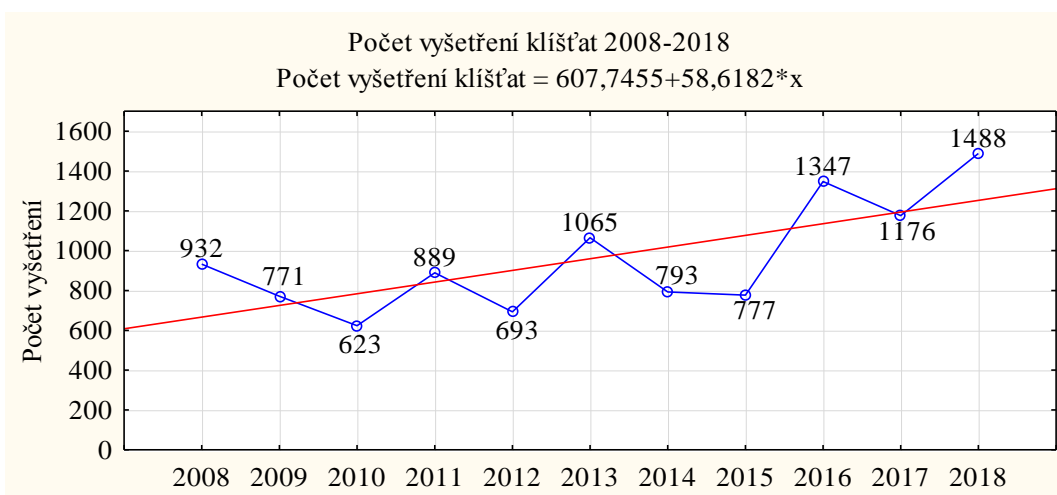
Při další praktické činnosti jsem 25. 9. 2018 vyizolovala 7 vzorků, kdy poté 4 vzorky byly testovány na Babesiósu a 3 na Bartonellu společně s Tularémií. Pozitivní byl pouze jeden vzorek, při průkazu Babesiósy 12123.



Obrázek 6 Výsledky analýzy 25.9.2018

4 Statistické zpracování laboratorních výsledků

Protean s. r. o. si vede od založení firmy data počtu vzorků, stádia klíšťat a výsledky laboratorní analýzy. Ke statistickému zpracování jsem tedy obdržela data od roku 2008 do konce roku 2018.



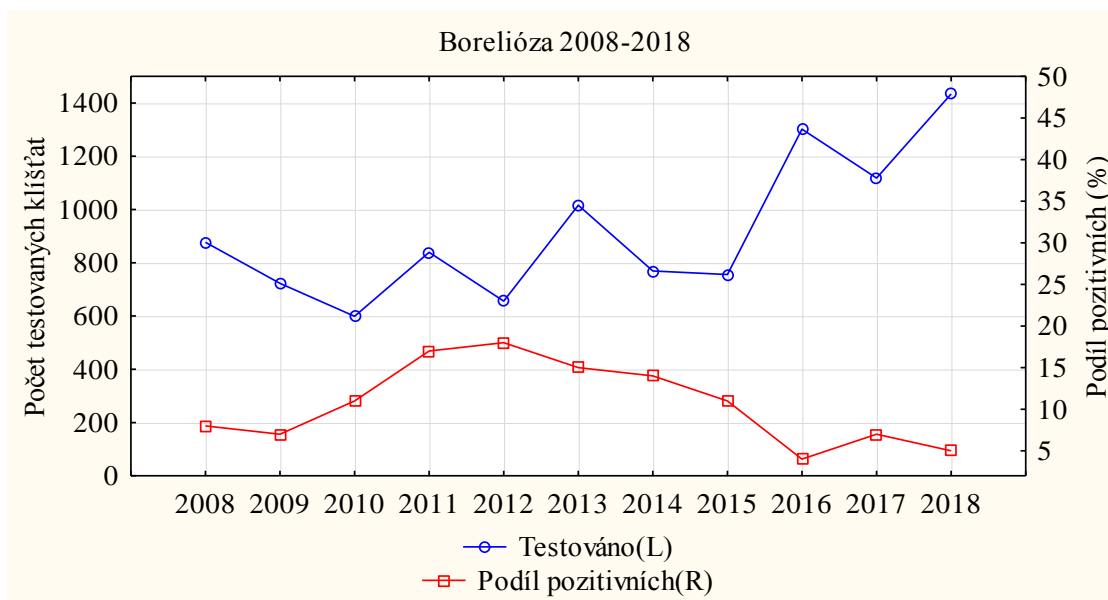
Obrázek 7 Počet vyšetření klíšťat 2008-2018

Počet vyšetřených klíšťat vykazoval v období 2008-2018 rostoucí trend s růstem dle regresní přímky o 58,6 klíštěte ročně.

Počty a podíly klíšťat testovaných, pozitivních a negativních na boreliózu jsou uvedeny v následující tabulce.

Tabulka 19 Borelióza

Rok	Borelióza						celkem záznamů
	testováno		pozitivní		negativní		
	Počet	%	počet	%	počet	%	
2008	877	94	71	8	806	92	932
2009	723	94	47	7	676	93	771
2010	599	96	63	11	536	89	623
2011	839	94	145	17	694	83	889
2012	656	95	121	18	535	82	693
2013	1016	95	151	15	865	85	1065
2014	769	97	111	14	658	86	793
2015	756	97	80	11	676	89	777
2016	1302	97	52	4	1250	96	1347
2017	1118	95	74	7	1044	93	1176
2018	1434	96	74	5	1360	95	1488
Celkem	10089	96	989	10	9100	90	10554

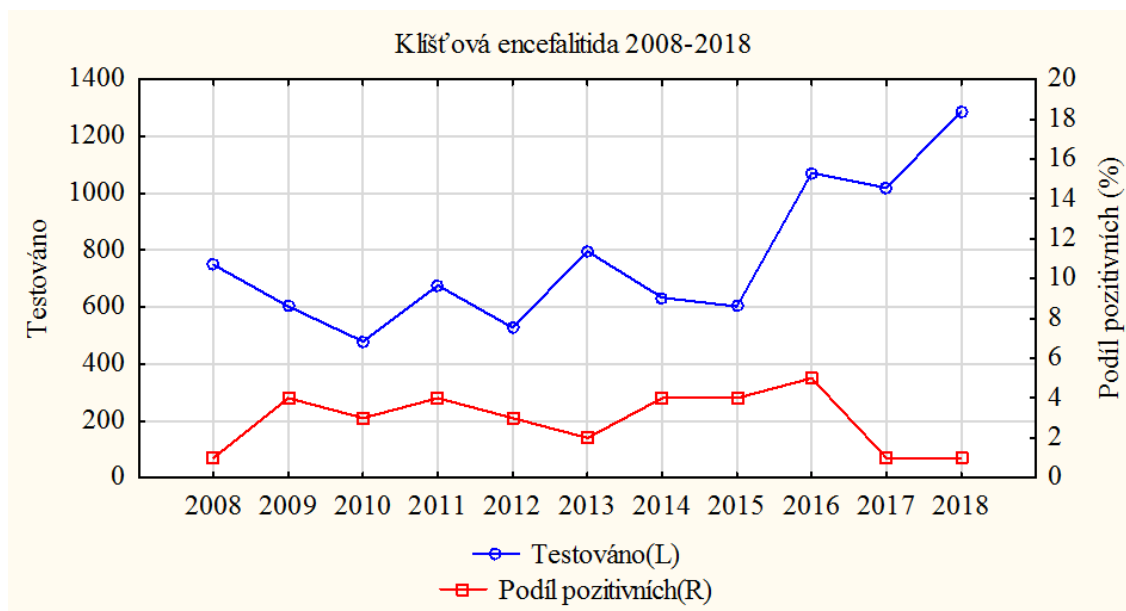


Obrázek 8 Borelióza 2008-2018

Počty a podíly klíšťat testovaných, pozitivních a negativních na klíšťovou encefalitidu jsou uvedeny v následující tabulce.

Tabulka 20 Klíšťová encefalitida

Rok	Klíšťová encefalitida						celkem záznamů
	testováno		pozitivní		negativní		
	počet	%	počet	%	počet	%	
2008	749	80	6	1	743	99	932
2009	602	78	24	4	578	96	771
2010	479	77	15	3	464	97	623
2011	676	76	29	4	647	96	889
2012	528	76	16	3	512	97	693
2013	796	75	15	2	781	98	1065
2014	633	80	24	4	609	96	793
2015	602	77	27	4	575	96	777
2016	1071	80	57	5	1014	95	1347
2017	1019	87	12	1	1007	99	1176
2018	1288	87	10	1	1278	99	1488
Celkem	8443	80	308	4	8135	96	10554

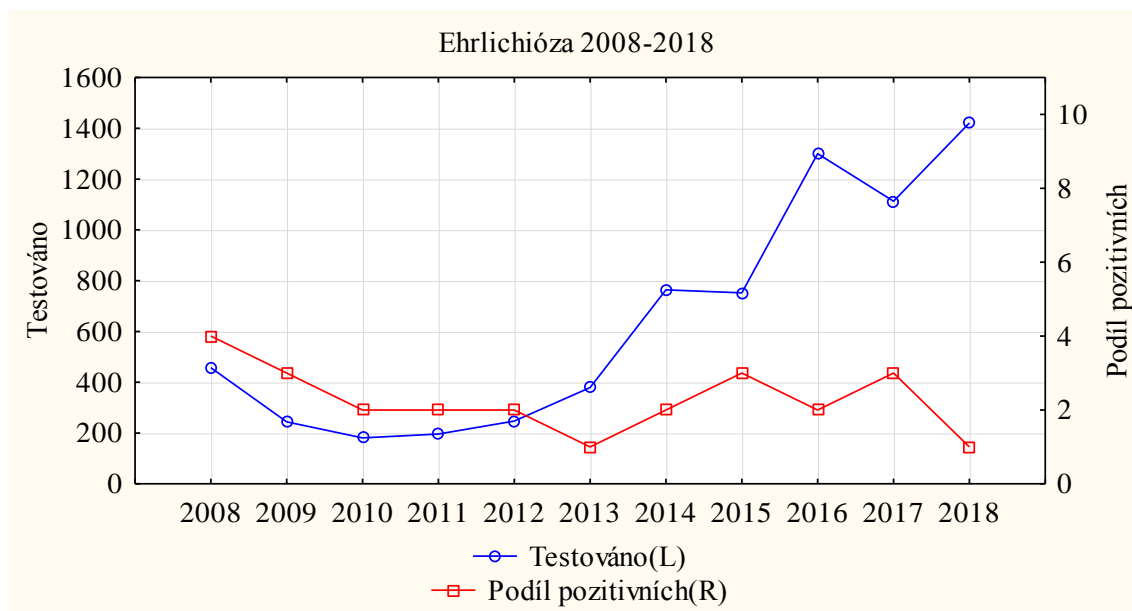


Obrázek 9 Klíšťová encefalitida 2008-2018

Počty a podíly klíšťat testovaných, pozitivních a negativních na ehrlichiozu jsou uvedeny v následující tabulce.

Tabulka 21 Ehrlichioza

Rok	Ehrlichioza						celkem záznamů
	testováno		pozitivní		negativní		
	počet	%	počet	%	počet	%	
2008	457	49	20	4	437	96	932
2009	244	32	7	3	237	97	771
2010	181	29	4	2	177	98	623
2011	196	22	4	2	192	98	889
2012	247	36	5	2	242	98	693
2013	379	36	4	1	375	99	1065
2014	764	96	16	2	748	98	793
2015	752	97	20	3	732	97	777
2016	1300	97	27	2	1273	98	1347
2017	1113	95	28	3	1085	97	1176
2018	1421	95	18	1	1403	99	1488
Celkem	7054	67	153	2	6901	98	10554

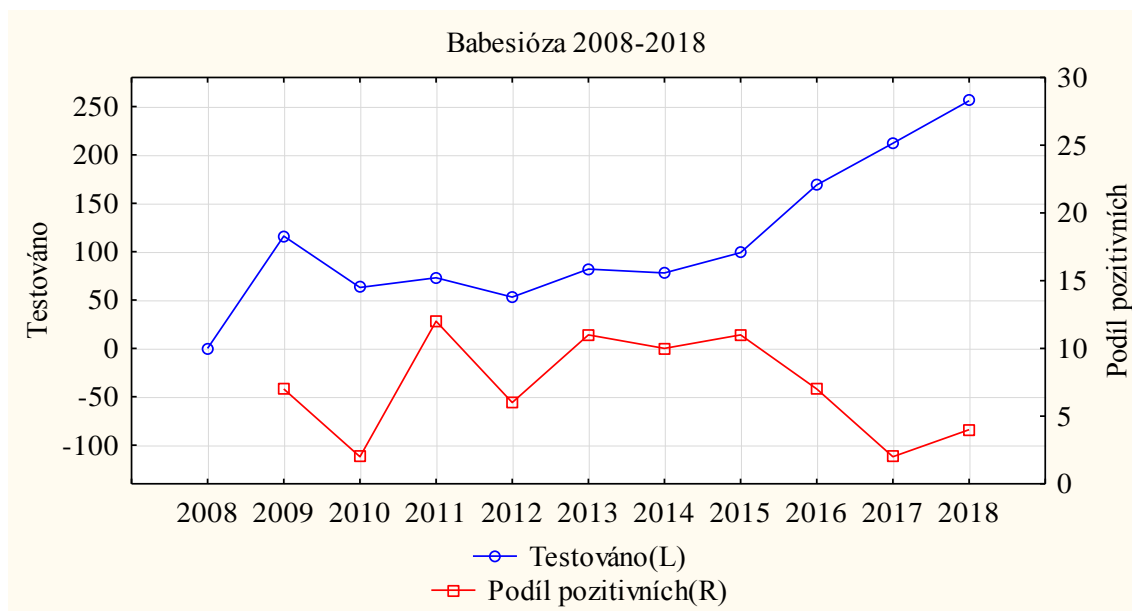


Obrázek 10 Ehrlichioza 2008-2018

Počty a podíly klíšťat testovaných, pozitivních a negativních na babeziózu jsou uvedeny v následující tabulce.

Tabulka 22 Babezióza

Rok	Babezióza						celkem záznamů
	testováno		pozitivní		negativní		
	počet	%	počet	%	počet	%	
2008	0	0	0	-	0	-	932
2009	116	15	8	7	108	93	771
2010	63	10	1	2	62	98	623
2011	73	8	9	12	64	88	889
2012	53	8	3	6	50	94	693
2013	82	8	9	11	73	89	1065
2014	78	10	8	10	70	90	793
2015	99	13	11	11	88	89	777
2016	169	13	12	7	157	93	1347
2017	212	18	5	2	207	98	1176
2018	256	17	9	4	247	96	1488
Celkem	1201	11	75	6	1126	94	10554



Obrázek 11 Babesióza 2008-2018

Počty a podíly klíšťat testovaných, pozitivních a negativních na bartonelózu jsou uvedeny v následující tabulce.

Tabulka 23 Bartonelóza

Rok	Bartonelóza						celkem záznamů
	testováno		pozitivní		negativní		
	počet	%	počet	%	počet	%	
2008	0	0	0	-	0	-	932
2009	111	14	0	0	111	100	771
2010	60	10	0	0	60	100	623
2011	72	8	0	0	72	100	889
2012	52	8	1	2	51	98	693
2013	79	7	1	1	78	99	1065
2014	66	8	2	3	64	97	793
2015	85	11	1	1	84	99	777
2016	113	8	6	5	107	95	1347
2017	103	9	0	0	103	100	1176
2018	103	7	1	1	102	99	1488
Celkem	844	8	12	1	832	99	10554

Bartonelóza byla v rámci testovaných klíšťat zjištěna pouze minimálně.

Počty a podíly klíšťat testovaných, pozitivních a negativních na tularémii jsou uvedeny v následující tabulce.

Tabulka 24 Tularémie

Rok	Tularémie						celkem záznamů
	testováno		pozitivní		negativní		
	počet	%	počet	%	počet	%	
2008	0	0	0	-	0	-	932
2009	0	0	0	-	0	-	771
2010	0	0	0	-	0	-	623
2011	0	0	0	-	0	-	889
2012	0	0	0	-	0	-	693
2013	0	0	0	-	0	-	1065
2014	56	7	0	0	56	100	793
2015	81	10	2	2	79	98	777
2016	111	8	5	5	106	95	1347
2017	98	8	0	0	98	100	1176
2018	98	7	0	0	98	100	1488
Celkem	444	4	7	2	437	98	10554

Tularémie byla v rámci testovaných klíšťat pouze u 7 vzorků.

Počty a podíly klíšťat testovaných, pozitivních a negativních na neoehrlichiozu jsou uvedeny v následující tabulce.

Tabulka 25 Neoehrlichioza

Rok	Neoehrlichioza						celkem záznamů
	testováno		pozitivní		negativní		
	počet	%	počet	%	počet	%	
2008	0	0	0	-	0	-	932
2009	0	0	0	-	0	-	771
2010	0	0	0	-	0	-	623
2011	0	0	0	-	0	-	889
2012	0	0	0	-	0	-	693
2013	0	0	0	-	0	-	1065
2014	0	0	0	-	0	-	793
2015	0	0	0	-	0	-	777
2016	0	0	0	-	0	-	1347
2017	0	0	0	-	0	-	1176
2018	103	7	6	6	97	94	1488
Celkem	103	1	6	6	97	94	10554

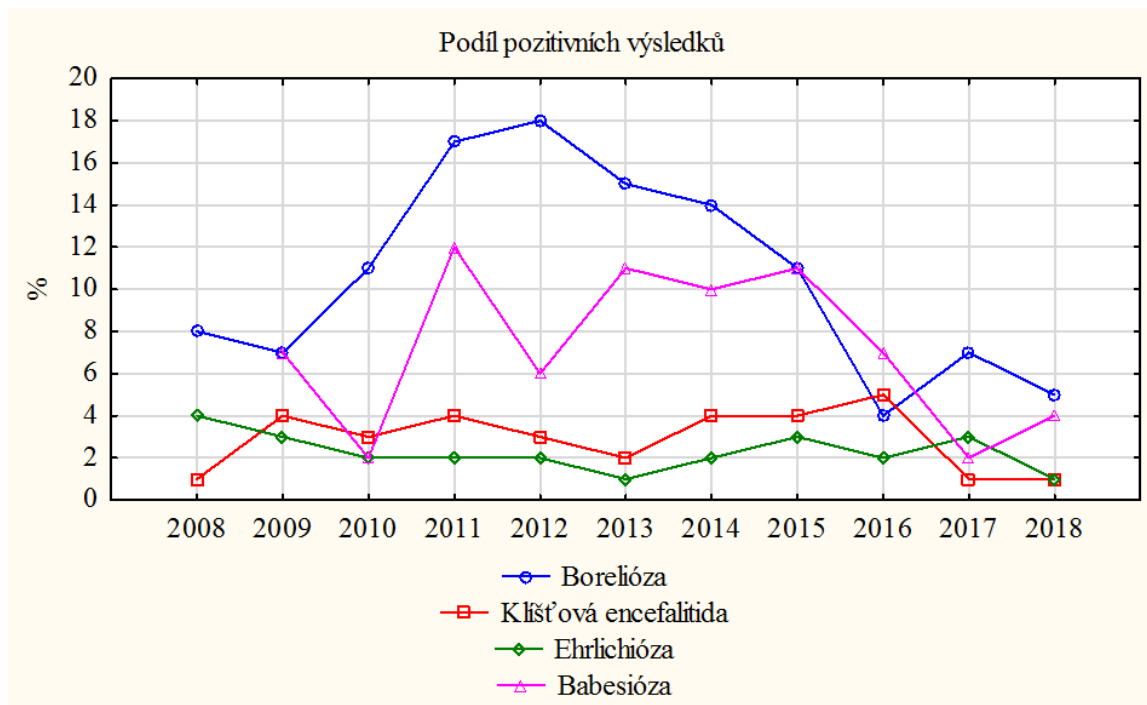
Neoehrlichioza byla testována pouze v roce 2018, kdy byla zjištěna v 6 ze 103 testovaných klíšťat, tj. v 6 % případů.

Tabulka 26 Absolutní počet pozitivních testů

Rok	Borelióza	Klíšťová encefalitida	Ehrlichioza	Babesioza	Bartonelóza	Tularémie	Neoehrlichioza
2008	71	6	20	0	0	0	0
2009	47	24	7	8	0	0	0
2010	63	15	4	1	0	0	0
2011	145	29	4	9	0	0	0
2012	121	16	5	3	1	0	0
2013	151	15	4	9	1	0	0
2014	111	24	16	8	2	0	0
2015	80	27	20	11	1	2	0
2016	52	57	27	12	6	5	0
2017	74	12	28	5	0	0	0
2018	74	10	18	9	1	0	6
Celkem	989	308	153	75	12	7	6

Tabulka 27 Podíl pozitivních v rámci testovaných

Rok	Borelióza	Klíšťová encefalitida	Ehrlichioza	Babesioza	Bartonelóza	Tularémie	Neoehrlichioza
2008	8	1	4				
2009	7	4	3	7	0		
2010	11	3	2	2	0		
2011	17	4	2	12	0		
2012	18	3	2	6	2		
2013	15	2	1	11	1		
2014	14	4	2	10	3	0	
2015	11	4	3	11	1	2	
2016	4	5	2	7	5	5	
2017	7	1	3	2	0	0	
2018	5	1	1	4	1	0	6
Celkem	10	4	2	6	1	2	6

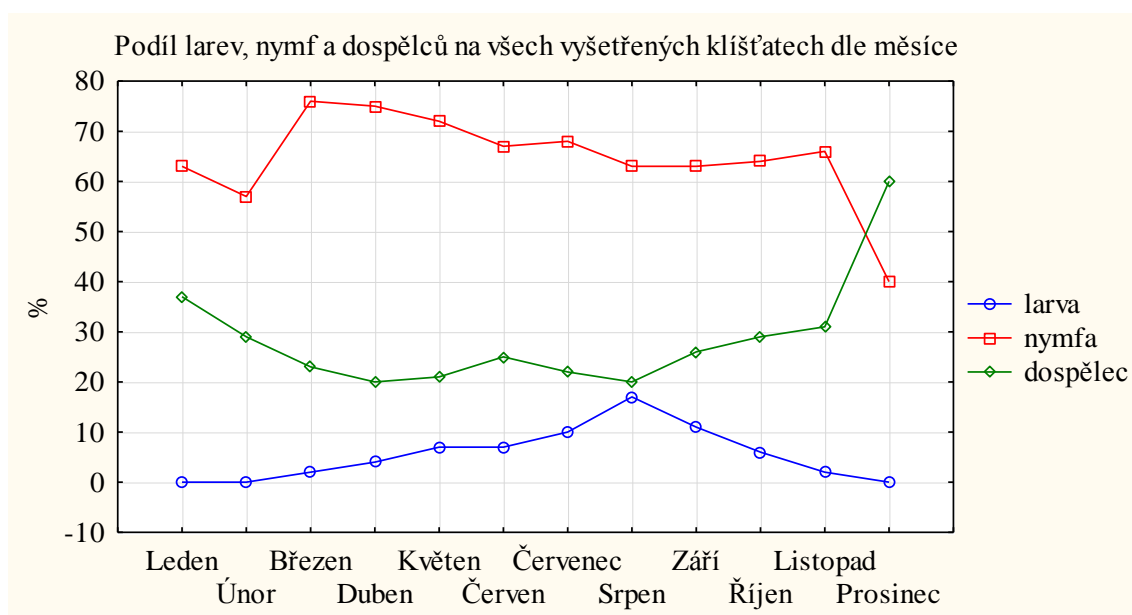


Obrázek 12 Podíl pozitivních výsledků

V rámci testovaných klíšťat na jednotlivé nemoci byl nejvyšší podíl pozitivních výsledků u boreliózy, a to především v letech 2011 a 2012. Po roce 2012 následoval pokles a v letech 2016-2018 už se podíl pozitivních výsledků na boreliózu pohyboval na úrovni podílů pozitivních výsledků u ostatních onemocnění: klíšťové encefalitidy, ehrlichiózy a babeziózy. Druhý nejvyšší podíl pozitivních výsledků měla babesióza, a to především v letech 2011-2015. V letech 2016-2018 podíl klesl na úroveň ostatních onemocnění. Klíšťová encefalitida měla v období 2008-2018 mírně vyšší podíl pozitivních výsledků než ehrlichióza.

Tabulka 28 Celkové zastoupení stádií v jednotlivých měsících

Měsíc	larva		nymfa		dospělec		neurčeno		Celkem
	počet	%	počet	%	počet	%	počet	%	
Leden	0	0	5	63	3	37	0	0	8
Únor	0	0	4	57	2	29	1	14	7
Březen	1	2	50	76	15	23	0	0	66
Duben	27	4	488	75	130	20	4	1	649
Květen	133	7	1451	72	424	21	2	0	2010
Červen	204	7	1994	67	750	25	9	0	2957
Červenec	204	10	1377	68	438	22	6	0	2025
Srpen	219	17	794	63	249	20	4	0	1266
Září	99	11	576	63	238	26	3	0	916
Říjen	33	6	356	64	162	29	1	0	552
Listopad	2	2	61	66	29	31	1	1	93
Prosinec	0	0	2	40	3	60	0	0	5
Celkem	922	9	7158	68	2443	23	31	0	10554



Obrázek 13 Jednotlivá stádia a měsíce v roce

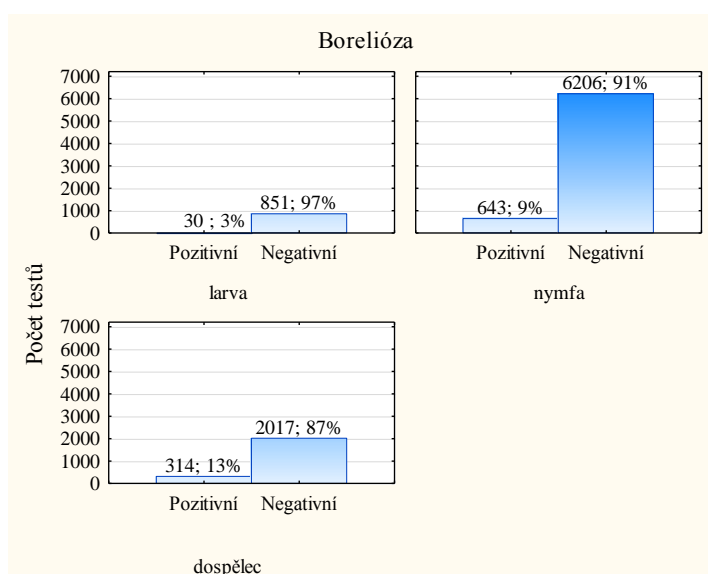
Údaje v lednu, únoru a prosinci jsou odvozeny z nízkého počtu testovaných klíšťat, nemá smysl nad nimi uvažovat.

Nejvyšší podíl mezi testovanými klíšťaty mají nymfy, jejichž podíl byl v období 2008-2018 nejvyšší v březnu, poté mírně klesal až do srpna a poté do listopadu přibližně stagnuje. Podíl dospělců v rámci testovaných klíšťat je od března do srpna přibližně konstantní, poté do listopadu mírně roste. Podíl larev od března do srpna mírně roste, poté do listopadu klesá.

Tabulka 29 Kontingenční tabulka a chí-kvadrát test - Borelióza

Chí-kvadrát test p-hodnota: 0,000		Borelióza				
		pozitivní		negativní		Celkem testováno
		n	%	n	%	
Stádium	larva	30	3	851	97	881
	nymfa	643	9	6206	91	6849
	dospělec	314	13	2017	87	2331
	celkem	987	10	9074	90	10061

P-hodnota a chí-kvadrát testu byla nižší než 0,05. Na hladině významnosti 0,05 byla prokázána závislost výsledku testu na boreliózu na stádiu klíštěte. V rámci dospělců bylo 13 % pozitivních testů, v rámci nymf 9 % pozitivních testů a v rámci larev 3 % pozitivních testů.



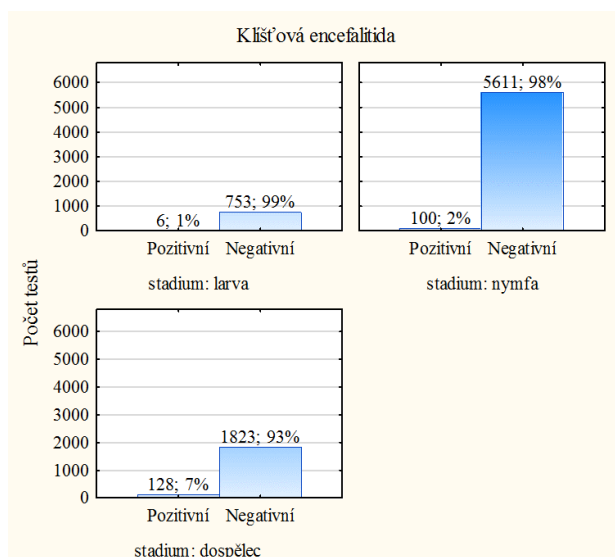
Obrázek 14 Borelióza

Tabulka 30 Kontingenční tabulka a chí-kvadrát test – Klíšťová encefalitida

Chí-kvadrát test p-hodnota: 0,000		Klíšťová encefalitida				
		pozitivní		negativní		Celkem testováno
		n	%	n	%	
Stádium	larva	6	1	753	99	759
	nymfa	100	2	5611	98	5711
	dospělec	128	7	1823	93	1951
	celkem	234	3	8187	97	8421

P-hodnota a chí-kvadrát testu byla nižší než 0,05. Na hladině významnosti 0,05 byla prokázána závislost výsledku testu na klíšťovou encefalitidu na stádiu klíštěte.

Závislost je dána především vyšším podílem pozitivních testů u dospělců (7 %) ve srovnání s larvami (1 %) a nymfami (2 %).

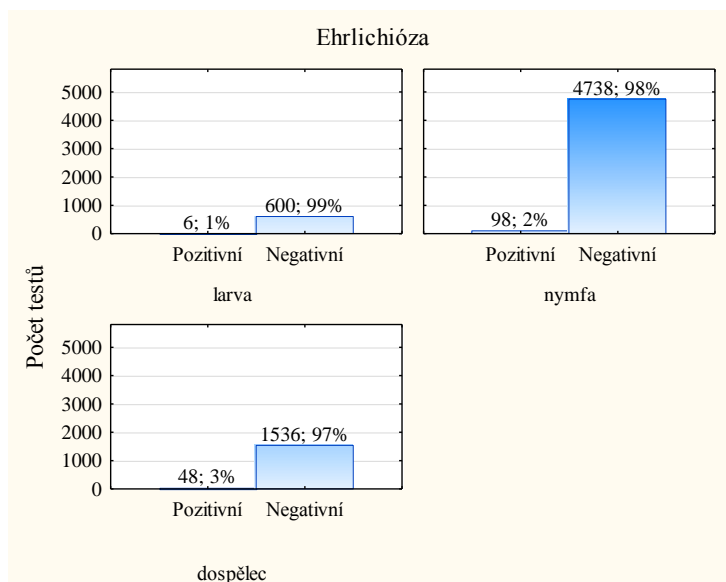


Obrázek 15 Klišťová encefalitida

Tabulka 31 Kontingenční tabulka a chí-kvadrát test - Ehrlichioza

Chí-kvadrát test p-hodnota: 0,007		Ehrlichioza				Celkem testováno
		pozitivní		negativní		
		n	%	n	%	
Stádium	larva	6	1	600	99	606
	nymfa	98	2	4738	98	4836
	dospělec	48	3	1536	97	1584
	celkem	152	2	6874	98	7026

P-hodnota a chí-kvadrát testu byla nižší než 0,05. Na hladině významnosti 0,05 byla prokázána závislost výsledku testu na ehrlichiozu na stádiu klíštěte. V rámci dospělců byly 3 % pozitivních testů, v rámci nymf 2 % pozitivních a v rámci larev 1 % pozitivních testů.

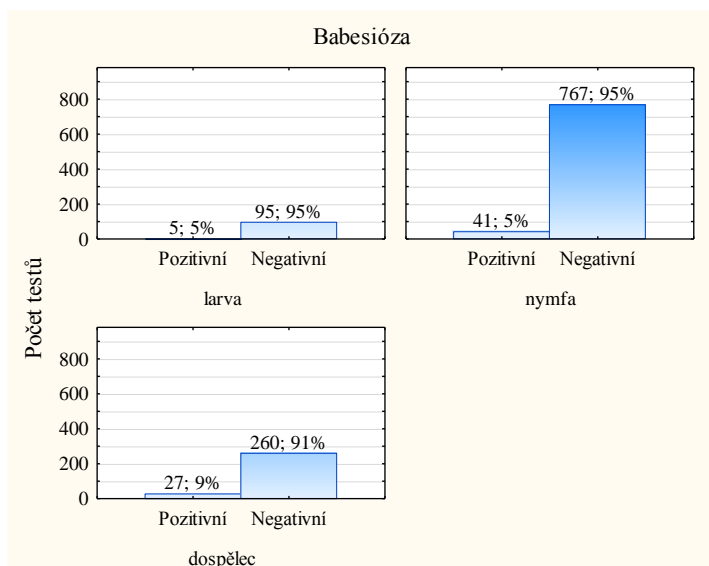


Obrázek 16 Ehrlichioza

Tabulka 32 Kontingenční tabulka a chí-kvadrát test - Babesioza

Chí-kvadrát test p-hodnota: 0,028		Babesioza				Celkem testováno
		pozitivní		negativní		
		n	%	n	%	
Stádium	larva	5	5	95	95	100
	nymfa	41	5	767	95	808
	dospělec	27	9	260	91	287
	celkem	73	6	1122	94	1195

P-hodnota chí-kvadrát testu byla nižší než 0,05. Na hladině významnosti 0,05 byla prokázána závislost výsledku testu na babeziózu na stádiu klíštěte. Závislost je dána především vyšším podílem pozitivních testů u dospělců (9 %) ve srovnání s larvami (5 %) a nymfami (5 %).

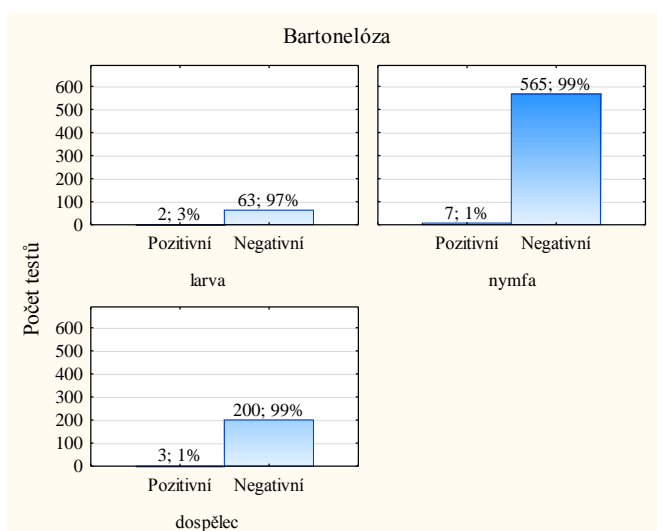


Obrázek 17 Babesióza

Tabulka 33 Kontingenční tabulka a chí-kvadrát test - Bartonelóza

Chí-kvadrát test p-hodnota: -		Bartonelóza				Celkem testováno
		pozitivní		negativní		
		n	%	n	%	
Stádium	larva	2	3	63	97	65
	nymfa	7	1	565	99	572
	dospělec	3	1	200	99	203
	celkem	12	1	828	99	840

Vzhledem k nízkému podílu pozitivních testů závislost nemohla být testována. O závislosti či nezávislosti v tomto případě nelze rozhodnout.

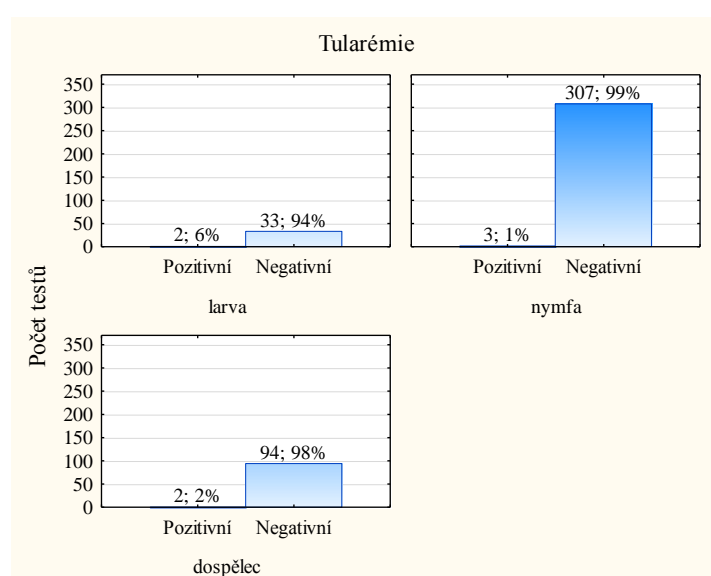


Obrázek 18 Bartonelóza

Tabulka 34 Kontingenční tabulka a chí-kvadrát test - Tularémie

Chí-kvadrát test p-hodnota: -		Tularémie				
		pozitivní		negativní		Celkem testováno
		n	%	n	%	
Stádium	larva	2	6	33	94	35
	nymfa	3	1	307	99	310
	dospělec	2	2	94	98	96
	celkem	7	2	434	98	441

Vzhledem k nízkému počtu pozitivních testů závislost nemohla být testována. O závislosti či nezávislosti nelze rozhodnout.

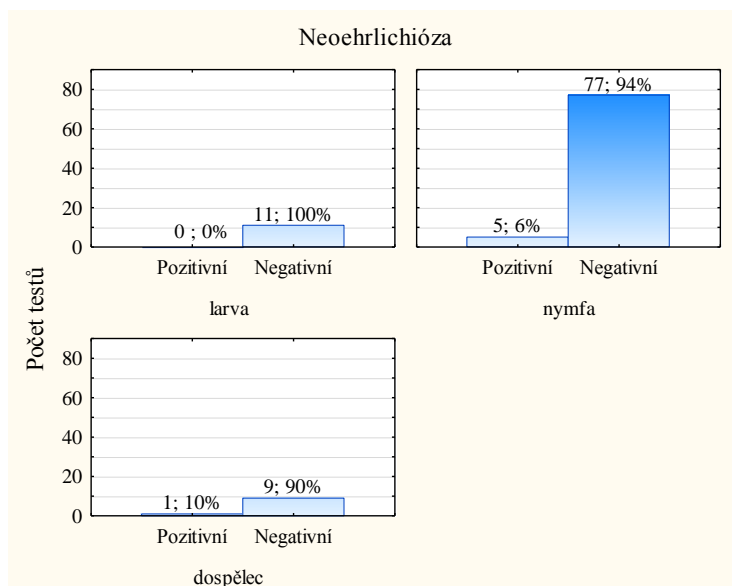


Obrázek 19 Tularémie

Tabulka 35 Kontingenční tabulka a chí-kvadrát test - Neoehrlichioza

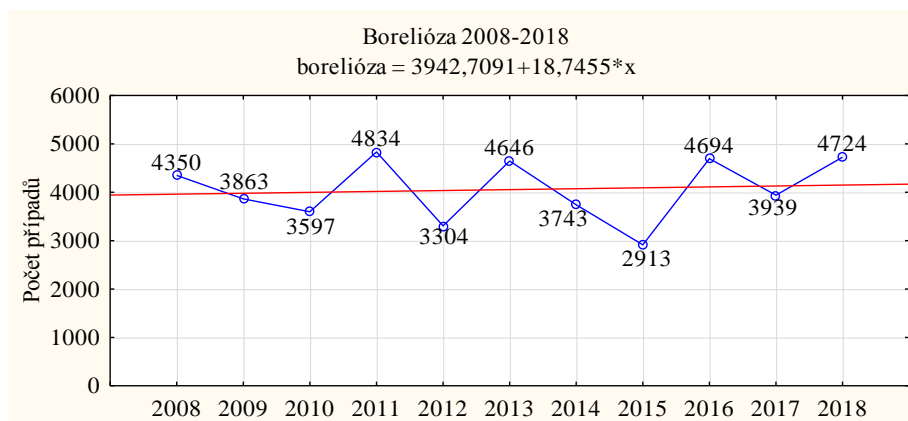
Chí-kvadrát test p-hodnota: -		Neoehrlichioza				
		pozitivní		negativní		Celkem testováno
		n	%	n	%	
Stádium	larva	0	0	11	100	11
	nymfa	5	6	77	94	82
	dospělec	1	10	9	90	10
	celkem	6	6	97	94	103

Vzhledem k nízkému podílu pozitivních výsledků závislost nemohla být testována. O závislosti či nezávislosti v tomto případě nelze rozhodnout.



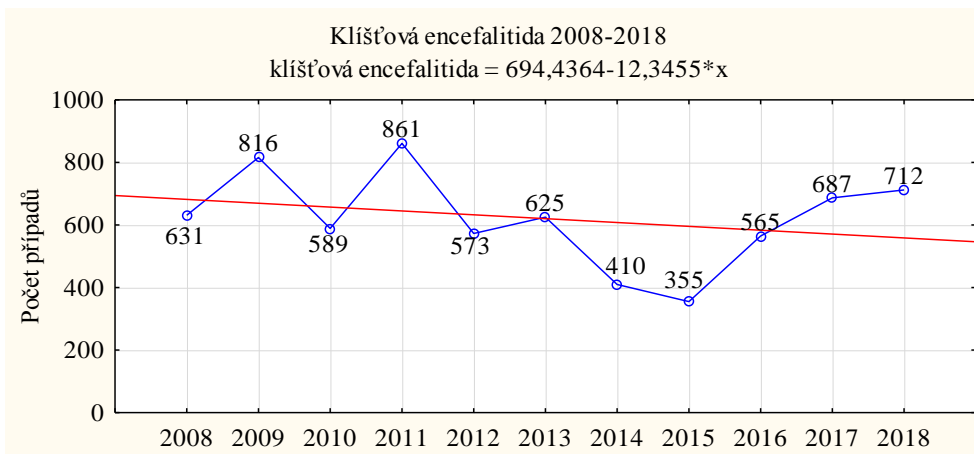
Obrázek 20 Neehrlichioza

Výsledky výskytu hlášených onemocnění jsou veřejně přístupné na internetových stránkách [SZÚ EPIDAT](#). Od 1. 1. 2018 Státní zdravotní ústav přešel na nový informační systém ISIN. Hlášení infekčních onemocnění je důležité pro kontrolu šíření infekcí v České republice. Z přenosných nemocí od klíšťat se hlásí pouze klíšťová encefalitida, borelióza a tularémie.



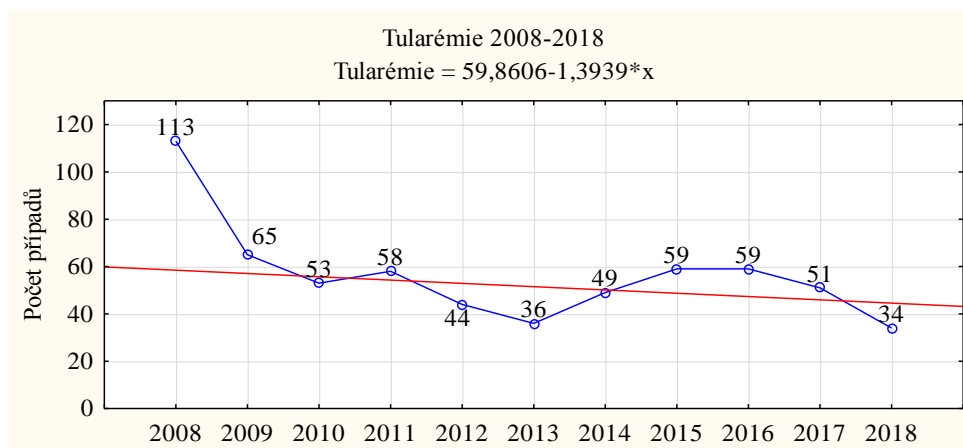
Obrázek 21 SZÚ-EPIDAT - Borelióza

Nejčastěji vyskytujícím se onemocněním je dle dat ze SZÚ borelióza. Dle proložení pomocí lineární regresní funkce nebyl zjištěn ani rostoucí, ani klesající trend. Dochází spíše ke kolísání okolo 4000 případů ročně.



Obrázek 22SZÚ-EPIDAT klíšťová encefalitida

Druhým nejčastěji se vyskytujícím onemocněním je dle dat ze SZÚ klíšťová encefalitida. Proložení pomocí lineární regresní funkce ukazuje mírný klesající trend. Toto proložení je ale potřeba vnímat pouze orientačně, neboť v letech 2014-2015 byl počet případů klíšťové encefalidity nejnižší, ale poté došlo ke zlomu v trendu, kdy v období 2015-2018 dochází k růstu, který postupně zpomaluje.



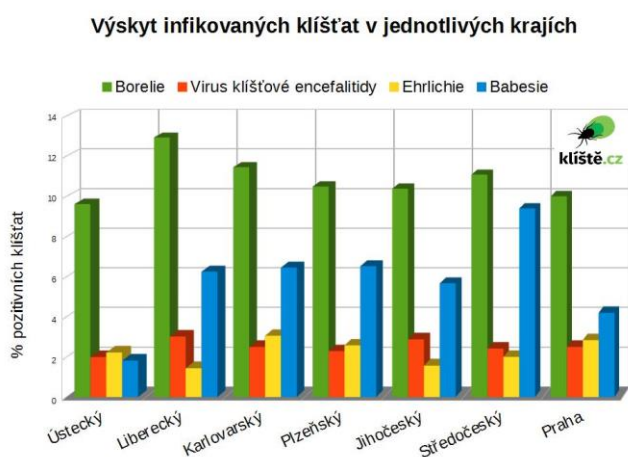
Obrázek 23 SZÚ - EPIDAT Tularémie

Výskyt tularémie lze dle lineárního trendu charakterizovat mírným poklesem. Do odhadu trendu pomocí lineární regresní funkce nebyla započítána extrémní hodnota v roce 2008.

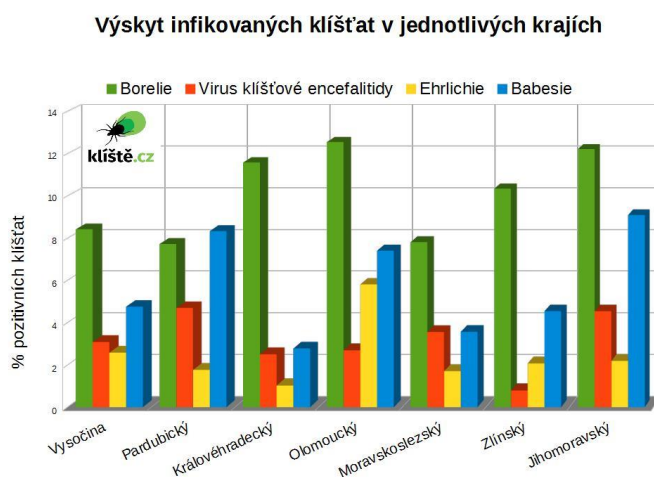
Výskyt nakažených klíšťat v jednotlivých krajích ukazují další dva grafy (Obrázek 24 Výskyt infikovaných klíšťat v jednotlivých krajích I. a Obrázek 25 Výskyt infikovaných klíšťat v jednotlivých krajích II.). Tyto statistické údaje laboratoř Protean průběžně aktualizuje na svých webových stránkách.

Na grafech je znázorněn výskyt nakažených klíšťat Lymeskou boreliózou, virem klíšťové encefalitidy, ehrlichii a babesii. Nejvyšší výskyt klíšťat přenášejících lymeskou boreliózu je prokázán v Libereckém kraji, kdežto počet klíšťat pozitivních na virus klíšťové encefalitidy byl nejvyšší v kraji Pardubickém a Jihomoravském. Rod Babesia byl prokázán nejčastěji v kraji Středočeském a Jihomoravském. Vyšší výskyt rodů Ehrlichii v kraji Olomouckém.

Podle průměrného výskytu jednotlivých patogenů v jednotlivých krajích, vyplývá, že nejvíce nakažených klíšťat je přítomno v Olomouckém kraji. S nejnižším průkazem infikovaných klíšťat se setkáváme v kraji Ústeckém.



Obrázek 24 Výskyt infikovaných klíšťat v jednotlivých krajích I.



Obrázek 25 Výskyt infikovaných klíšťat v jednotlivých krajích II.

(Grafy dostupné na klíště.cz)

5 Diskuze

Cílem praktické části byla izolace DNA či RNA a následná detekce některého z patogenů pomocí metody PCR. Při praktických činnostech jsem pracovala s 65 vzorky klíšťat. Nejprve předcházela izolace DNA, při vyšetření TBEV izolace RNA (5 vzorků). Při jedné z analýz došlo k poruše cyklieru, a analýza tudíž nebyla dokončena. Jednalo se o 6 vzorků. 59 vzorků bylo vyšetřeno metodou PCR/RT-PCR. Po těchto analýzách byla u 2 vzorků zjištěna přítomnost *Borrelia burgdorferi*, u jednoho vzorku se podařila prokázat *Babesia*. Poslední pozitivní přítomnost byla potvrzena u vzorku s *Ehrlichia phagocytophila*. 7 % klíšťat bylo tedy infikovaných některými z detekovaných patogenů.

Laboratoř za 10 let své existence provedla vyšetření u 10 554 klíšťat. Podle dat laboratoře byla provedena statistika, ze které vychází, že nepočtenějším onemocněním je borelióza. Borelióza za 10 let od založení laboratoře byla prokázána 3x častěji než klíšťová encefalitida. Podle dat SZÚ, kdy je hlášeno každoročně okolo 4000 onemocnění boreliózou a okolo 620 případů klíšťové encefalitidy, je výskyt boreliózy téměř 7 násobný.

Výskyt ehrlichiózy se výrazně zvýšil v letech 2014-2017, v roce 2018 výskyt klesl. Babesióza byla potvrzena za 9 let u 75 vzorků, největší výskyt byl v období 2015-2016.

Mezi další vyšetřované onemocnění patří bartonelóza, která se začala testovat v roce 2009, první pozitivní výsledek přinesl až rok 2012. Za 7 let z celkem 844 testovaných klíšťat byla potvrzena *Bartonella* u 12 vzorků.

V roce 2014 začala laboratoř s testy na průkaz tularémie. Mezi 444 testovanými vzorky se objevil původce u 7 z nich. Z toho 5 potvrzujících průkazů proběhlo v roce 2016.

Nově v roce 2018 byly prokázány původci neoehrlichiózy. Prokázány byly u 6 ze 103 testovaných klíšťat.

6 Závěr

Při vypracování této bakalářské práce jsem se snažila popsat onemocnění způsobené klíšťaty. Onemocnění, kterými se zabývám v teoretické části, jsou detekována v laboratoři pod vedením docenta Burýška, kde jsem vykonávala praktickou část. U metodiky jsem usilovala o zpřehlednění metody využití v praxi. Při práci v laboratoři jsem byla překvapena kolik lidí dbá na své zdraví a posílá preventivně odstraněné klíště na vyšetření. To je vidět na množství vyšetřených klíšťat, které za 10 let činí přes 10 000. Při porovnání výsledků můžeme vyhodnotit, že podíl pozitivních klíšťat se za toto období rapidně nezvyšuje ani nesnižuje. Za konzultaci při statistickém zpracování děkuji panu magistru Zdražilovi.

Zjištěné výsledky mohou být přínosem nejen pro firmu Protean. Pro stanovení četnosti výskytu v jednotlivých okresech není ještě dostatečné množství dat pro statistické zpracování. Bylo by dobré, kdyby se podařilo v dalších letech více dbát na oblasti přenosu. Takové množství výsledků a dalších výsledků, které přibudou, by si zasloužilo hlubší výzkumné šetření, jež by vzalo v úvahu i další fakta a ukazatele. Snad tato práce zaujme některé z kolegů či kolegyně a budou pokračovat v této výzkumné práci.

7 Bibliografie

BARTOŠOVÁ, Dagmar, 2005. *Infekční lékařství*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita. ISBN 80-210-3791-1.

BÁRTOVÁ, Jarmila, 2015. *Přehled patologie*. Vydání první. V Praze: Univerzita Karlova, Nakladatelství Karolinum. ISBN 978-80-246-2745-8.

BARTŮNĚK, Petr, 1996. *Lymeská borelióza*. Vyd. 1. Praha: Grada. ISBN 80-7169-242-5.

BELLMANN, Heiko, 2003. *Pavoukovci a další bezobratlí*. Vyd. 1. Ilustroval Enno KLEINERT, přeložil Antonín KŮRKA. V Praze: Knižní klub. Zoologická encyklopedie. ISBN 80-242-1114-9.

BENEŠ, Jiří, 2009. *Infekční lékařství*. 1. vyd. Praha: Galén. ISBN 978-80-7262-644-1.

BUHNER, Stephen Harrod, 2014. *Borelióza: přírodní prevence a bylinná léčba lymeské boreliózy a jejích koinfekcí*. Vyd. 1. Praha: Triton. ISBN 978-80-7387-780-4.

ČECHOVÁ, Lenka, 2009. *Ochrana před klíšťaty a obtížným hmyzem* [online]. 6 (suppl.D). Olomouc: SOLEN MEDICAL EDUCATION [cit. 2019-04-02]. ISBN 978-80-87327-14-2. Dostupné z: <http://solen.cz/pdfs/med/2009/03/16.pdf#page=6>

ČERNÝ, Zdeněk, 1997. *Infekční nemoci*. Vyd. 1. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví. ISBN isbn8070132418.

GELFAN, Jeffrey A. a Michael V. CALLAHAN, 2003. Babesiosis: An Update on Epidemiology and Treatment. *Current Infectious Disease Reports* [online]. **5**, 53-54 [cit. 2019-03-26]. ISSN 1523-3847. Dostupné z: <https://page-one.springer.com/pdf/preview/10.1007/s11908-003-0065-z>

GODDARD, Jerome, 2000. *Infectious diseases and arthropods*. Totowa, N.J.: Humana Press. ISBN 0-89603-825-4.

GODDARD, Jerome, 2000. *Infectious diseases and arthropods*. Totowa, N.J.: Humana Press. ISBN 0896038254.

HAUSMANN, Klaus a Norbert HÜLSMANN, 2003. *Protozoologie*. Vyd. 1. Praha: Academia. ISBN 8020009787.

HAVLÍK, Jiří, 2002. *Infekční nemoci*. 2., rozš. vyd. Praha: Galén. ISBN 80-7262-173-4.

HUBÁLEK, Zdeněk, 2000. *Mikrobiální zoonózy a sapronózy*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita. ISBN 80-210-2446-1.

HUBÁLEK, Zdeněk a Ivo RUDOLF, 2014. *Mikrobiální zoonózy a sapronózy*. 3., dopl. vyd. Brno: Masarykova univerzita. ISBN 978-80-210-7516-0.

HUBÁLEK, Zdeněk a Ivo RUDOLF, 2014. *Mikrobiální zoonózy a sapronózy*. 3., dopl. vyd. Brno: Masarykova univerzita. ISBN 978-80-210-7516-0.

CHALUPA, Pavel, 2000. *Infekční lékařství: nové poznatky v diagnostice a terapii infekčních chorob*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita. ISBN 80-210-2378-3.

CHEE TAN, Siun a Beow CHIN YIAP, 2009. DNA, RNA, and Protein Extraction: The Past and The Present. *Hindawi Publishing Corporation: Journal of Biomedicine and Biotechnology* [online]. 10 [cit. 2019-04-09]. DOI: 10.1155/2009/574398. Dostupné z: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2009/574398/>

GELFAN, Jeffrey A. a Michael V. CALLAHAN. Babesiosis: An Update on Epidemiology and Treatment. *Current Infectious Disease Reports* [online]. 2003, **5**, 53-54 [cit. 2019-03-26]. ISSN 1523-3847. Dostupné z: <https://page-one.springer.com/pdf/preview/10.1007/s11908-003-0065-z>

KIMMIG, Peter, Rüdiger BRAUN a Dieter HASSLER, 2003. *Klíšťata: Nepatrné kousnutí s neblahými následky*. Praha: Pragma. ISBN 80-7205-881-9.

MACELA, Aleš, 2006. *Infekční choroby a intracelulární parazitismus bakterií*. 1. vyd. Praha: Grada. Malá monografie (Grada). ISBN 80-247-0664-4.

MÁSLOVÁ, Ludmila, Irena MARTINKOVÁ a Monika VAŠUTOVÁ, 2014. Bartonelóza - nemoc z kočičího škrábnutí. *Interní medicína pro praxi* [online]. **16**(4), 167-168 [cit. 2019-03-13]. Dostupné z: https://www.internimedicina.cz/artkey/int-201404-0010_Bartoneloza-nemoc_z_kociciho_skrabnuti.php

MCPHERSON, M. J. a S. G. MØLLER, 2006. *PCR*. 2nd ed. New York: Taylor & Francis. Basics (Routledge (Firm)). ISBN 0-4153-5547-8.

ORD, Rosalynn Louise a Cheryl A. LOBO, 2015. Human Babesiosis: Pathogens, Prevalence, Diagnosis, and Treatment. *Current Clinical Microbiology Reports* [online]. 2(4), 173-181 [cit. 2019-03-26]. DOI: 10.1007/s40588-015-0025-z. Dostupné z: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fs40588-015-0025-z.pdf>

PETRÁŠ, Marek, 2007. Očkování proti klíšťové encefalitidě. *Medicína pro praxi* [online]. (3), 100-101 [cit. 2019-04-02]. Dostupné z: <http://medicinapropraxi.cz/pdfs/med/2007/03/02.pdf>

ROHÁČOVÁ, Hana, 2005. *Lymeská borelióza: průvodce ošetřujícího lékaře*. Praha: Maxdorf. Farmakoterapie pro praxi. ISBN 80-7345-071-2.

ROHÁČOVÁ, Hana, 2006. Onemocnění přenášená klíšťaty. *Interní medicína pro praxi*. 8(6), 280-283. ISSN 1212-7299.

RŮŽEK, Daniel, 2015. *Klíšťová encefalitida*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing. ISBN 978-80-247-5305-8.

SEDLÁK, Edmund, 2002. *Zoologie bezobratlých*. 2. přeprac. vyd. Brno: Masarykova univerzita. ISBN 80-210-2892-0.

SEDLÁK, Kamil a Markéta TOMŠÍČKOVÁ, 2006. *Nebezpečné infekce zvířat a člověka*. 1. vyd. Praha: Scientia. Biologie pro všední den. ISBN 80-86960-07-2.

SCHMIDT, Axel, 1998. *Bartonella and Afipia species emphasizing Bartonella henselae*. New York: Karger. ISBN 3-8055-6649-2.

SIDEROVSKI, Susan Hutton, 2006. *Tularemia*. Philadelphia: Chelsea House Publishers. ISBN 0-7910-8679-8.

SILAGHI, Cornelia, Relja BECK, José A. OTEO, Martin PFEFFER a Hein SPRONG, 2016. Neoehrlichiosis: an emerging tick-borne zoonosis caused by *Candidatus Neoehrlichia mikurensis*. *Experimental and Applied Acarology* [online]. 3(68), 279–297 [cit. 2019-03-24]. DOI: 10.1007/s10493-015-9935-y. Dostupné z: <https://www.eurnegvec.org/publications/papers/Silaghi%20et%20al.%202015.pdf>

VAVERKOVÁ, Renata, 2014. Klíšťová encefalitida pohledem epidemiologa. *Vakcinologie*. **8**(1), 31-32. ISSN 1802-3150.

WALKER, John M. a Ralph RAPLEY, 2009. *Molecular biology and biotechnology*. 5th ed. Cambridge: Royal Society of Chemistry. ISBN 978-0-85404-125-1.

WENNERAS, Christine, 2015. Infections with the tick-borne bacterium *Candidatus Neohrlichia mikurensis*. *Clinical Microbiology and Infection* [online]. **21**(7), 621-630 [cit. 2019-03-24]. DOI: 10.1016/j.cmi.2015.02.030. Dostupné z: [https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X\(15\)00324-9/pdf](https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X(15)00324-9/pdf)

8 SEZNAM ZKRATEK

APC	antigen prezentující buňka
ATB	antibiotika
cDNA	komplementární deoxyribonukleová kyselina
CNS	centrální nervová soustava
CSD	nemoc z kočičího škrábnutí – catscratch disease
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ELFO	elektroforéza
KE	klíšťová encefalitida
k. o.	klinický obraz
LB	lymeská borelióza
LGE	lidská granulocytární ehrlichioza
LME	lidská monocytární ehrlichioza
PCR	polymerázová řetězová reakce
RNA	ribonukleová kyselina
RT-PCR	reverse-transcription polymerase chain reaction

9 SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Klinický obraz LB	21
Tabulka 2 Reakční směs pro detekci TBEV pomocí RT-PCR.....	31
Tabulka 3 Program TBEV	31
Tabulka 4 Složení reakční směsi pro detekci Bab pomocí PCR.....	32
Tabulka 5 Program babesiosa	32
Tabulka 6 Složení reakční směsi pro detekci NeoM pomocí PCR.....	33
Tabulka 7 Program NeoM	33
Tabulka 8 Reakční směs pro detekci Bor pomocí PCR.....	33
Tabulka 9 Program borel	34
Tabulka 10 Reakční směs pro detekci HGE pomocí PCR.....	34
Tabulka 11 Program hge.....	34
Tabulka 12 Reakční směs pro detekci BH pomocí PCR	35
Tabulka 13 Program barotenl bh	35
Tabulka 14 Reakční směs pro detekci Tul pomocí PCR	36
Tabulka 15 Program tular	36
Tabulka 16 Malý agar 50ml.....	37
Tabulka 17 Střední gel 150ml.....	37
Tabulka 18 Velký gel 300ml	37
Tabulka 19 Borelióza.....	42
Tabulka 20 Klíšťová encefalitida	43
Tabulka 21 Ehrlichioza.....	44
Tabulka 22 Babesioza.....	45
Tabulka 23 Bartonelóza	46
Tabulka 24 Tularémie.....	47
Tabulka 25 Neoehrlichioza.....	47
Tabulka 26 Absolutní počet pozitivních testů	48
Tabulka 27 Podíl pozitivních v rámci testovaných.....	48
Tabulka 28 Celkové zastoupení stádií v jednotlivých měsících.....	50
Tabulka 29 Kontingenční tabulka a chí-kvadrát test - Borelióza	51
Tabulka 30 Kontingenční tabulka a chí-kvadrát test – Klíšťová encefalitida	51
Tabulka 31 Kontingenční tabulka a chí-kvadrát test - Ehrlichioza	52
Tabulka 32 Kontingenční tabulka a chí-kvadrát test - Babesioza	53

Tabulka 33 Kontingenční tabulka a chí-kvadrát test - Bartonelóza.....	54
Tabulka 34Kontingenční tabulka a chí-kvadrát test - Tularémie	55
Tabulka 35 Kontingenční tabulka a chí-kvadrát test - Neoehrlichióza	55

10 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1Výsledky analýzy 14.8.2018	39
Obrázek 2Výsledky analýzy 21.8.2018	39
Obrázek 3Výsledky analýzy 28.8.2018	40
Obrázek 4Výsledky analýzy 12.9.2018	40
Obrázek 5Výsledky analýzy 19.9.2018	41
Obrázek 6Výsledky analýzy 25.9.2018	41
Obrázek 7Počet vyšetření klíšťat 2008-2018.....	42
Obrázek 8Borelióza 2008-2018	43
Obrázek 9Klíšťová encefalitida 2008-2018.....	44
Obrázek 10Ehrlichióza 2008-2018	45
Obrázek 11Babesióza 2008-2018	46
Obrázek 12Podíl pozitivních výsledků	49
Obrázek 13 Jednotlivá stádia a měsíce v roce	50
Obrázek 14Borelióza	51
Obrázek 15Klíšťová encefalitida	52
Obrázek 16Ehrlichióza	53
Obrázek 17Babesióza	54
Obrázek 18Bartonelóza.....	54
Obrázek 19Tularémie	55
Obrázek 20 Neoehrlichióza	56
Obrázek 21 SZÚ-EPIDAT - Borelióza	56
Obrázek 22SZÚ-EPIDAT klíšťová encefalitida.....	57
Obrázek 23 SZÚ - EPIDAT Tularémie	57
Obrázek 24Výskyt infikovaných klíšťat v jednotlivých krajích I.	58
Obrázek 25Výskyt infikovaných klíšťat v jednotlivých krajích II.	58