



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Studies

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

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Zdravotně sociální fakulta

Katedra laboratorních metod a informačních systémů

Bakalářská práce

Diagnostický význam stanovení protilátek proti klíšťové encefalitidě

Vypracovala: Marie Chadtová

Vedoucí práce: MUDr. Dana Teislerová

České Budějovice rok 2015

Abstrakt

Diagnostický význam stanovení protilátek proti klíšťové encefalitidě

Bakalářská práce je zaměřena na sérologickou diagnostiku klíšťové encefalidity a na její význam. Data byla získána na Pracovišti virologie Laboratoře lékařské mikrobiologie, Centrální laboratoře, Nemocnice České Budějovice a.s. v období od 1. 1. 2014 do 31. 12. 2014.

Práce je členěna do dvou částí, teoretické a výzkumné.

Teoretická část zahrnuje historii onemocnění a popis výskytu a šíření viru. Jako první popsal pravidelně se opakující výskyt onemocnění, které pojmenoval „Epidemische akute Meningitis serosa“, rakouský lékař Hans Schneider v roce 1931. Ruskými vědci byl virus způsobující toto onemocnění prokázán v roce 1937. Na území Československé republiky byl virus poprvé prokázán v roce 1947 zásluhou pražských virologů MUDr. Františka Gallii a MUDr. Josefa Rampase. První záchyt viru byl z Berounska, další pak na Vyškovsku MUDr. Krejčím. V následujících letech byl virus klíšťové meningoencefalidity izolován také v dalších evropských zemích. Domněnku, že přenašečem viru na člověka je klíště, potvrdili Dr. Rampas a Dr. Gallia průkazem viru přímo z klíšťat *Ixodes ricinus* nasbíraných na Berounsku. V roce 1951 byl v okolí východoslovenského města Rožňava poprvé popsán přenos viru alimentární cestou z mléka infikovaných laktujících ovcí. K nákaze může dojít i při laboratorní práci s materiálem obsahujícím virus.

Virus klíšťové encefalidity je součástí rodu Flavivirus a řadí se do čeledi Flaviviridae. Jsou to obalené RNA viry s kubickou symetrií. Virové částice mají kulovitý tvar o velikosti 50 až 60 nm. Skládají se z nukleoidu (obsahuje nukleovou kyselinu), proteinové kapsidy a obalu. Obal tvoří lipidová dvojvrstva.

Onemocnění klíšťovou encefalidou je přenášeno klíšťaty. Přírodním rezervoárem viru ve volné přírodě jsou drobní hlodavci.

Po přisátí klíštěte virus vstupuje ze slinných žláz klíštěte do kůže a podkožního vaziva, kde dochází k jeho primárnímu pomnožení. Poté je virus přes lymfatický systém přenesen do krevního řečiště. Tento stav odpovídá první fázi onemocnění. Druhá fáze onemocnění je provázena sekundární virémií, pomnožením viru ve tkáních a napadením centrálního nervového systému.

Inkubační doba je uváděna 7 až 14 dnů. První stádium probíhá pod obrazem lehké virózy, s teplotami, bolestmi svalů a celkovou únavou. Trvá 1 až 2 dny, maximálně 6 dnů. Následuje dočasné zlepšení bez příznaků (přibližně jeden týden) a poté se může objevit druhá fáze onemocnění, která jeví jako meningitida, meningoencefalitida nebo myelitida. Léčba je symptomatická. Pro zmírnění obtíží se podávají antipyretika, analgetika, případně antiemetika, často se doporučuje antiedematozní terapie.

Základem protiepidemických opatření je zdravotní výchova obyvatelstva a očkování, od osmdesátých let minulého století je dostupná vakcína.

Laboratorní virologická diagnostika zahrnuje přímý a nepřímý průkaz. Mezi metody přímého průkazu patří izolace viru na zvířatech a tkáňových kulturách nebo průkaz virové RNA metodou PCR. Nepřímým průkazem je stanovení protilátek proti viru metodou ELISA, hemaglutinačně inhibičním testem, komplement fixační reakcí, virus neutralizačním testem, nepřímou imunofluorescencí.

Cílem bakalářské práce bylo stanovení protilátek proti klíšťové encefalitidě ve vzorcích od pacientů metodou ELISA. V předkládané práci byly zhodnoceny výsledky vyšetření vzorků zaslanych na Pracoviště virologie Nemocnice České Budějovice, a.s. během kalendářního roku 2014 a význam stanovení protilátek pro diagnostiku onemocnění a posouzení stavu imunity po vakcinaci.

Byly stanoveny tři hypotézy.

První hypotéza předpokládala, že stanovení protilátek metodou ELISA má v laboratorní diagnostice klíšťové encefalidity významnou úlohu. Na základě celkového počtu zaslanych vzorků od 1264 pacientů je možné tvrdit, že toto vyšetření má pro lékaře, indikující testování přítomnosti protilátek IgM a IgG proti viru klíšťové encefalidity, velký význam jak pro správnou diagnostiku onemocnění, tak pro posouzení stavu imunity po vakcinaci. Laboratorní metoda je relativně rychlá a podmínky vyhodnocení testu jsou výrobcem jednoznačně dané. Tato hypotéza byla potvrzena.

Druhá hypotéza předpokládala, že doplnění vyšetření o stanovení avidity IgG protilátek má vyšší výpovědní hodnotu v diagnostice sporných případů. Z celkového počtu sedmi jednotlivých případů s nejednoznačnou protilátkovou odpovědí, byl stanoven index avidity svědčící pro výskyt anamnestických protilátek, nikoliv pro akutní onemocnění. Hypotéza byla potvrzena.

Třetí hypotéza předpokládala, že většina očkované populace má IgG protilátky proti klíšťové encefalitidě. Z dosažených výsledků vyplývá, že se tato hypotéza potvrdila.

Klíčová slova:

Klíšťová encefalitida, virus klíšťové encefalidity, průkaz protilátek metodou ELISA, avidita IgG protilátek, imunita po vakcinaci

Abstract

The Diagnostic Value of the Antibody Level Testing in Tick Born Encephalitis.

This bachelor thesis is focused on the antibody testing and its diagnostic value in Tick Born Encephalitis. Data for this thesis were obtained at the laboratory of Virology, Dpt. of Medical Microbiology of the Central Laboratories, Hospital České Budějovice. The data were collected between January 1st and December 31st 2014.

The thesis is divided in two parts: the theoretical and the experimental part.

The theoretical part covers the history of the disease, its geographic distribution and the ways of the transmission of the virus.

The disease was first described by Austrian physician Hans Schneider in 1931 as a periodically occurring disease. He called it „Epidemische acute Meningitis serosa“. The virus was first described as the cause of the disease in Russia in 1937. In Czechoslovakia, the virus was described in 1947 in Prague by virologists František Galia and Josef Rampas. The first successful virus isolation in Czechoslovakia was from Beroun district, the next successful isolation was in Vyškov district made by Dr. Krejčí. The virus was later isolated in other European countries as well. The hypothesis, that the virus is transmitted by ticks, was proved by Dr. Rampas and Dr. Galia by the isolation of the virus directly from the ticks *Ixodes ricinus*, collected in the Beroun district. The transmission of the virus by alimentary route was first described in 1951 near east Slovakian town Rožňava. The virus was transmitted by drinking nonpasteurized sheep milk. The laboratory infection is possible, when laboratory staff works with the viable virus.

The Tick Borne Encephalitis virus is part of the genus *Flavivirus*, family *Flaviviridae*. It is an enveloped virus with cubic symmetry. Virus particles are round shaped, with diameter 50–60 nm. The central part is nucleus, containing viral RNA, enveloped by protein capsid and lipoprotein envelope. Lipoprotein envelope is double lined and contains important antigens - glycoprotein E and membrane protein M.

Tick Borne Encephalitis is transmitted by ticks. The incidence is therefore closely connected to the activity of the ticks in nature. The activity of the ticks depends on the season, temperature, humidity and altitude. The presence of people in focal point is also essential. Tick Borne Encephalitis is an infection with the natural focal point. Its natural reservoir are mainly small rodents and other wild animals. Human activity in nature can lead to the transmission of the disease to humans. Humans are a blind end of the transmission chain, no interhuman transmission was described.

The virus penetrates the organism via the tick bite. The virus penetrates to the skin from salivary glands of the tick through the small wound. The primary multiplication starts there. The virus is later spread by lymphatic system to the blood stream. This corresponds with the

first phase of the infection. The second phase of the infection is accompanied by secondary viremia, the virus multiplies in various tissues and spreads into the central nervous system.

The incubation period before the beginning of the first phase is 7–14 days. The first phase may proceed under the clinical picture of mild, flu-like virosis with the increased temperature, muscle pain and fatigue. This period lasts 1 to 2 days, maximum 6 days. After the first phase there is a period of approximately one week without any signs of the disease. After this period the second phase may occur, with the signs of meningitis, meningoencephalitis or myelitis. The treatment is symptomatic. To diminish the symptoms of the disease, analgetics, antipyretics, anticonvulsives and sometimes antiedematous treatment is indicated.

The epidemiological measures are based on education and vaccination. The vaccine is available since the eighties of the last century.

Laboratory diagnostic may use direct or indirect detection of the virus. The methods of direct detection are cultivation on a cell culture or on suckling mice. Recently used method is RT-PCR. Indirect virus detection is investigation of specific antibodies in blood. Various methods can be used, for example hemagglutination inhibitory test, complement binding reaction, virus neutralisation test or indirect fluorescence, but the most frequently used method is immuno assay (ELISA).

The goal of the experimental part of this bachelor thesis was to investigate the antibodies against the Tick Borne Encephalitis virus in patient's sera. The sera, used for the experimental part were sent to the virological laboratory during the whole year 2014. The diagnostic value of the test was evaluated. Small part of the sera were sent for the control of the immunity after the vaccination.

Three hypotheses were tested in the experimental part.

The first one was to prove that the serologic testing has a key role in laboratory diagnosis of the Tick Borne Encephalitis. Results of the testing of 1264 patient's sera showed that the investigation of IgG and IgM in sera and the interpretation of the results is important for the correct diagnosis of the disease and for the evaluation of the immunity after the vaccination as well. The laboratory method used in the experiment is fast and the evaluation of the results is clearly described by the producer of the diagnostic set. The first hypothesis was proved.

Second hypothesis assumed, that when the basal testing will be extended by the testing of the avidity of the IgG, the testing will have greater value for the evaluation of the indeterminate results. Seven such patients were tested, all with atypical course of the disease. The clinician was in doubt, if the disease is really TBE. In all cases, the high avidity index showed, that the antibodies were not of acute infection but they were anamnestic antibodies. The second hypothesis was proved.

Third hypothesis assumed, that most of the vaccinated people have detectable antibodies in IgG class. The results presented in the thesis show, that this hypothesis was proved.

Key words

Tick Borne Encephalitis, Tick Borne Encephalitis virus, antibody testing by ELISA method, avidity of the IgG antibodies, immunity after the vaccination

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracoval(a) samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených 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 – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných fakultou – 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 kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne DD. MM. 2015

.....

Marie Chadtová

Poděkování

Chtěla bych poděkovat MUDr. Daně Teislerové za její vedení i cenné rady a připomínky k mé bakalářské práci. Dále bych chtěla poděkovat celému kolektivu Pracoviště virologie a všem blízkým za jejich vstřícnost, trpělivost a pochopení.

OBSAH

1	Současný stav	13
1.1	Historie	13
1.2	Obecná charakteristika viru	13
1.3	Epidemiologie	15
1.3.1	Přenos na člověka	15
1.3.2	Epidemiologická data	16
1.4	Patogeneze	16
1.5	Klinický obraz onemocnění	17
1.6	Infekce u dětí	18
1.7	Infekce u seniorů	18
1.8	Léčba	18
1.9	Prevence	19
1.10	Vakcíny	19
1.11	Laboratorní virologická diagnostika	20
1.11.1	Přímý průkaz viru	21
1.11.2	Nepřímý průkaz viru	21
2	Cíl práce a hypotézy	24
2.1	Cíl práce	24
2.2	Hypotézy	24
3	Metodika	25
3.1	Charakteristika souboru	25
3.1.1	Odběr materiálu a transport vzorku	25
3.1.2	Zpracování materiálu v laboratoři	25
3.2	Diagnostický průkaz klíšťové encefalitidy	26
3.2.1	Stanovení protilátek IgG proti viru klíšťové encefalitidy	26
3.2.2	Stanovení avidity protilátek IgG proti viru klíšťové encefalitidy	31
3.2.3	Stanovení protilátek IgM proti viru klíšťové encefalitidy	32
4	Výsledky	38
4.1	Oddělení požadující vyšetření	39
4.2	Sezónní charakter onemocnění	40
4.3	Věk a pohlaví vyšetřovaných	41

4.4	Výskyt protilátek v mozkomíšním moku	42
4.5	IgM protilátky v séru.....	43
4.6	IgG protilátky v séru.....	44
4.7	Souhrnný přehled provedených testů	45
4.8	Postvakcinační výskyt protilátek IgG.....	46
4.9	Stanovení avidity IgG protilátek	47
5	Diskuse	48
6	Závěr.....	50
7	Seznam obrázků, grafů a tabulek.....	51
7.1	Seznam obrázků	51
7.2	Seznam grafů.....	51
7.3	Seznam tabulek.....	52
8	Seznam použité literatury.....	53

Seznam použitých zkratek

Ab	protilátka
Ag	antigen
CD8⁺	cytotoxické T-lymfocyty
CDC	Centrum pro kontrolu a prevenci nemocí
CNS	centrální nervový systém
cut off	hraniční zóna
ELISA	enzymem značená imunisorbentní analýza
EPIDAT	program evidence, analýzy a výskytu infekčních nemocí v ČR
HIT	hemaglutinačně inhibiční test
IF	imunofluorescence
IgG	imunoglobulin G
IgM	imunoglobulin M
KE	klíšťová encefalitida
KFR	komplement fixační reakce
KME	klíšťová meningoencefalitida
MHC	Hlavní histokompatibilní systém
NDR	Německá demokratická republika
NK	nukleová kyselina
NK buňky	velké granulární buňky imunitního systému (přirozený zabíječ)
ORF	otevřený čtecí rámeček
PCR	polymerázová řetězová reakce
RNA	ribonukleová kyselina
TBE	klíšťová encefalitida
TBEV	virus klíšťové encefalitidy
TMB	tetramethylbenzidin - chromogenní substrát
VIEU	Vídeňské ELISA jednotky - Institut virologie Vídeň
VNT	virus neutralizační test
WHO	Světová zdravotnická organizace

Úvod

Klíšťová encefalitida je infekční virové onemocnění s afinitou k centrálnímu nervovému systému, které bylo na našem území popsáno v roce 1947 jako československá encefalitida pražskými virology MUDr. Františkem Galliou a MUDr. Josefem Rampasem.

Původcem onemocnění je RNA virus z čeledi Flaviviridae. Ve vlhku a při běžné teplotě vykazuje poměrnou stálost, ale pasterizace ho ničí poměrně spolehlivě. Jeho přenašečem je v našich podmínkách klíště *Ixodes ricinus*. Virus je klíšťaty přenášen jak na člověka, tak i na teplokrevné živočichy. Výjimečně může docházet také k alimentárním nákazám. Především mlékem ovcí a koz a výrobky z nepasterizovaného mléka (sýry).

Klíšťová encefalitida je mimo Českou republiku častá i v dalších evropských zemích a v Asii. Jedná se o sezónní onemocnění s přírodní ohniskovostí.

Po přisátí klíštěte dochází k pomnožení viru v podkoží a přilehlých lymfatických uzlinách. Lymfou a krví je virus transportován do dalších orgánů a do CNS, kde dochází k jeho dalšímu pomnožení.

V první fázi onemocnění jsou příznaky málo charakteristické a vyznačují se zvýšenou teplotou. Pokud se rozvine druhá fáze onemocnění, dochází k postižení CNS, které se projeví meningitidou, meningoencefalitidou nebo myelitidou. U osob středního a vyššího věku mívá infekce těžší průběh s náročnou rehabilitací, může vést k invaliditě. U některých jedinců může onemocnění končit i smrtí.

Díky dostupnému očkování je možné incidenci onemocnění u ohrožených osob v lokalitách s endemickým výskytem infikovaných klíšťat výrazně snížit. S ohledem na nedostatečnou proočkovanost populace se výskyt klíšťové encefalidity v našich podmínkách stále nedaří výrazně omezit.

1 SOUČASNÝ STAV

1.1 Historie

První zmínky o onemocnění klíšťovou encefalitidou se vztahují k roku 1931, kdy rakouský lékař H. Schneider pozoroval a poprvé popsal pravidelně se opakující výskyt nemoci, kterou pojmenoval „Epidemische akute Meningitis serosa“ (Růžek et al., 2015).

Virus způsobující toto onemocnění byl prokázán v roce 1937 ruskými vědci ve vzorcích od nemocných lidí, ve vzorcích z myši a také ve vzorcích z klíšťat *Ixodes persulcatus* (Růžek et al., 2015).

V roce 1947 byl virus klíšťové encefalitidy prokázán na území Československé republiky zásluhou pražských virologů MUDr. Františka Gallii a MUDr. Josefa Rampase (Beneš, 2009). Izolace viru se podařila Dr. Galliovi z krve a mozkomíšního moku od zemřelých, kteří se nakazili na Berounsku a trpěli meningoencefalitidou a dále také z krve od pacientů s aseptickou meningitidou z dalších nemocnic v okolí Prahy. V roce 1948 izoloval virus z krve a z moku s pomocí Dr. Gallii také MUDr. Krejčí na Vyškovsku (Růžek et al., 2015).

Lékaři, kteří se o pacienty trpící meningoencefalitidou starali, zaznamenali skutečnost, že přibližně 75 % nemocných udávalo v nedávné době před vznikem onemocnění kousnutí klíštětem. Domněnku, že přenašečem viru je klíště, potvrdili následně Dr. Josef Rampas a Dr. František Gallia průkazem viru přímo z klíšťat *Ixodes ricinus* nasbíraných na Berounsku. Toto bylo potvrzeno i prim. Krejčím z klíšťat sebraných na Vyškovsku (Růžek et al., 2015).

V padesátých letech byl virus KME izolován i v dalších zemích Evropy – Maďarsko, Bulharsko, Polsko, Rakousko, NDR, ale také v Číně a Japonsku (Růžek et al., 2015).

V roce 1951 byl v tehdejším Československu při epidemii v okolí východoslovenského města Rožňava popsán přenos viru klíšťové encefalitidy nepasterizovaným mlékem, ke kterému došlo při poruše pasterizačního přístroje mlékárny zpracovávající kravské i kozí mléko. Onemocnělo tehdy 660 lidí a 271 z nich muselo být hospitalizováno (Růžek et al., 2015). Přenos alimentární cestou byl od té doby prokázán opakovaně, mimo Československo i v dalších evropských zemích.

1.2 Obecná charakteristika viru

Viry jsou malé mikroorganismy, které mimo hostitelskou buňku nerostou, nedělí se a nemají vlastní energetický metabolismus. Mají svoji nukleovou kyselinu k přenosu genetické informace. Podle té je rozdělujeme na RNA viry a DNA viry (Bednář et al., 1996).

Virová částice je označována jako virion. Skládá se z nukleoidu, který obsahuje stočenou nukleovou kyselinu a kapsidy, která je sestavena z pravidelně se opakujících bílkovinných

jednotek. Na základě symetrie uspořádání jednotek rozeznáváme viry se symetrií kubickou nebo spirální. Kapsida s kubickou strukturou je tvořena podjednotkami, které se nazývají kapsoméry. Kapsidu se spirální (helikální) strukturou tvoří protoméry. Některé viry mají kromě kapsidy ještě další obal (Votava et al., 2010).

Podle přítomnosti obalu viry dělíme na obalené a neobalené.

Obalené viry mají lipoproteinový obal, ze kterého vyčnívají pravidelně organizované glykoproteinové výběžky. Neobalené viry jsou tvořeny pouze nukleokapsidou a jsou relativně odolnější a stálejší než obalené, což usnadňuje přenos infekce i nepřímým kontaktem (Votava, 2003).

Virus klíšťové encefalitidy je součástí rodu Flavivirus a řadí se do čeledi Flaviviridae. Je to obalený RNA virus s kubickou symetrií. Virové částice mají kulovitý tvar o velikosti 50 – 60 nm. Skládají se z nukleoidu (obsahuje nukleovou kyselinu), proteinové kapsidy a obalu. Kapsida obsahuje bazický protein C. Obal tvoří lipidová dvojvrstva, ve které se nachází dva glykoproteiny – protein E (envelope) a protein M (membrane) (Paulus and Růžek, 2013). Glykoprotein E je hlavním povrchovým antigenem virové částice. Je zodpovědný za adhezi viru k hostitelské buňce, působí jako hemaglutinin a je hlavním cílem virus neutralizačních protilátek důležitých pro specifickou imunitní odpověď proti viru KE. Protein M se vyskytuje jen na zralých extracelulárních virionech (Heinz, 1986).

Genom je tvořen jednořetězcovou RNA s pozitivní polaritou (Mansfeld et al., 2009). Kódující část virového genomu klíšťové encefalitidy je součástí otevřeného čtecího rámce (ORF) o velikosti 11kb, který kóduje polyprotein složený z 3414 aminokyselin. Tento polyprotein je během translace štěpen buněčnými a virovými proteázami na tři strukturální proteiny – C (kapsidový), M (membránový), E (obalový) a sedm nestrukturních proteinů – NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B a NS5 (Lindquist and Vapalahti, 2008).

K infekci buňky dochází po endocytóze virové částice do cytoplazmy, kde se genetická informace viru uvolní z nukleokapsidy a za pomoci buněčných ribozomů začne probíhat replikace virového genomu. Sestavování nových virových částic je dokončeno v Golgiho komplexu. Poté jsou nové virové jednotky uvolněny do extracelulárního prostoru (Mandal, 2005).

Flaviviry jsou poměrně citlivé vůči nízkému pH, žluči, proteolytickým a lipolytickým enzymům. Jsou likvidovány běžnými dezinfekčními prostředky. I v ochranném bílkovinném prostředí, jakým je například krev, se virus úplně inaktivuje už během 30 minut při teplotě 56 °C. Ve formě aerosolu zůstává virus infekční dlouho, takže laboratorní infekce virem rozptýleným v aerosolu jsou možné a obávané (Votava, 2003).

Rod Flavivirus obsahuje asi 80 druhů a poddruhů. Viry jsou řazeny do 4 skupin. Ve skupině savčích virů přenášených klíšťaty je kromě viru klíšťové encefalitidy také virus Louping ill (virus vrtivky), virus Langat, virus Powassan, virus omské hemoragické horečky, virus horečky Kyasanurského lesa. Zástupci ostatních skupin jsou přenášeny komáry. Skupina viru dengue zahrnuje viry dengue 1 až 4, ve skupině virů japonské encefalitidy je virus

japonské encefalidity, virus West-Nile, virus saintlouiské encefalidity, virus encefalidity Údolí Murray, virus Kunjin, virus Usutu (Zelená et al., 2015a). Další skupina je tvořena virem žluté zimnice. Všichni zástupci rodu vykazují částečnou antigenní příbuznost a zkrříženě reagují v hemaglutinačních testech (Beneš, 2009, Votava, 2003).

U viru klíšťové encefalidity rozlišujeme tři antigenní subtypy, které odpovídají třem genotypům. Evropský subtyp, dříve označovaný jako „Virus středoevropské klíšťové encefalidity“ zahrnuje kmeny pocházející především z evropských zemí. Encefalitida vyvolaná těmito kmeny má dvoufázový průběh. Onemocnění probíhá většinou mírně, fatální následky nastanou u méně než 1 % pacientů. Dálnovýchodní subtyp, dříve označovaný jako „Virus ruské jaro-letní encefalidity“ zahrnuje kmeny z Ruska, Japonska, Číny a dalších euroasijských zemí. Onemocnění vyvolané zástupci tohoto subtypu je charakteristické závažným průběhem. Do sibiřského subtypu se řadí kmeny izolované v oblasti Sibíře a onemocnění jimi vyvolané má mírnější průběh (Růžek et al., 2015).

1.3 Epidemiologie

Klíšťová encefalitida se běžně vyskytuje ve střední Evropě, zejména v Rakousku a České Republice, ale i v ostatních státech Evropy jako například v Pobaltí. Toto onemocnění se řadí ke klasickým arbovirovým nákazám. Vektorem onemocnění je klíště druhu *Ixodes ricinus*. Rezervoárem viru v přírodě jsou především drobní hlodavci, dále všechna volně žijící teplokrevná zvířata a domácí zvířata chovaná venku. Pro přenos viru je důležité jeho přežívání ve slinných žlázách klíšete. Infekci mohou přenést všechna vývojová stadia infikovaného klíšete (larva, nymfa i dospělý jedinec). Mezi jednotlivými stádii se virus přenáší běžně, ale dochází i k transovariálnímu přenosu z dospělé samice na potomstvo. Prokázaný je také přenos viru mezi klíšaty sáním infikovaných a neinfikovaných klíšat současně na jednom hostiteli (co-feeding) (Růžek et al., 2010).

Výskyt KE úzce souvisí s výskytem klíšat v přírodě, který je daný ročním obdobím (obvykle od dubna do října), nadmořskou výškou, vegetací, vlhkostí a zároveň přítomností člověka v místech výskytu infikovaných klíšat. V souvislosti s celosvětovým oteplováním se prodlužuje doba aktivity klíšat (Kříž et al., 2012) a zároveň jsou klíšata nalézána ve vyšších nadmořských výškách, než tomu bylo ještě v minulých letech (Danielová et al., 2008). V Rakousku byl zaznamenán přenos v nadmořské výšce 1564 m n. m. (Holzmann et al., 2009). Nejčastěji jsou riziku onemocnění vystaveny osoby pracující v lesnictví, zemědělství a osoby věnující se volnočasovým aktivitám spojeným s pohybem ve volné přírodě (turisté, houbaři, sportovci).

1.3.1 Přenos na člověka

Člověk se nakazí prisátím infikovaného klíšete. Čím déle prisátí trvá, tím více viru se dostane s infikovanými slinami klíšete do těla člověka. K přenosu onemocnění může dojít i při konzumaci tepelně neošetřeného mléka a mléčných výrobků od infikovaných zvířat, nebo během porážky viremického zvířete (Růžek et al., 2015). Výjimečně se může uplatnit přenos

viru krevní transfúzí. Možný je také přenos při manipulaci s živým virem v laboratorních podmínkách. Mezilidský přenos nebyl prokázán (Beneš, 2009).

1.3.2 Epidemiologická data

Hlášení onemocnění klíšťovou encefalitidou v českých zemích jsou evidována od čtyřicátých let minulého století. Aktuální data jsou zveřejňována na internetových stránkách Státního zdravotního ústavu (<http://www.szu.cz/>) a vydávána tiskem v podobě tištěných časových periodik.

Počet hlášených případů klíšťové encefalitidy v České republice v EPIDATu v absolutních číslech v posledních deseti letech.

2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2012	2013	2014
643	1029	546	631	816	589	861	573	625	410

Zdroj: www.szu.cz

Souhrnná data o výskytu onemocnění v Evropě bohužel nemají dostatečnou statistickou hodnotu, protože ještě v roce 2011 byla KME povinně hlášeným onemocněním pouze v 15 zemích Evropské unie. Dalším důvodem nepřesností může být odlišná diagnostika a z toho vyplývající odlišný způsob definice pozitivních případů a jejich hlášení. Proto bylo v roce 2012 v Evropské unii rozhodnuto o použití jednotné definice onemocnění a povinnosti hlášení této infekce (Ammato-Gauci and Zeller, 2012).

1.4 Patogeneze

Většina nových poznatků o patogenезi klíšťové encefalitidy byla dosažena pomocí experimentů na tkáňových kulturách a modelových laboratorních zvířatech (myši a některé druhy primátů) (Růžek et al., 2010).

Po přisátí klíštěte se se sekretem ze slinných žláz kromě viru do hostitelského organismu dostávají kromě viru KE také látky bránící srážení krve a zároveň různé cytokiny omezující imunitní odpověď hostitele na přisátí klíštěte (Chmelař et al., 2012).

V místě sání klíštěte dochází k primární lokální virémii a k zachycení viru antigen prezentujícími dendritickými buňkami, které antigeny viru klíšťové encefalitidy prezentují T-lymfocytům a stimulují jejich diferenciaci na Th (pomocné) a Tc (cytotoxické) T lymfocyty (Růžek et al., 2009). Pomocí makrofágů se virus dostává do spádových lymfatických uzlin. Infekce a následné masivní pomnožení viru a jeho uvolnění do krevního řečiště odpovídá první fázi onemocnění.

Nedojde-li k eliminaci nákazy pomocí imunitní obrany infikovaného organismu, dochází ve tkáních k masivnímu pomnožení viru, sekundární virémii a prostupu viru přes hematoencefalickou bariéru (Růžek et al., 2011). V centrálním nervovém systému může virus napadnout všechny typy buněk. Sekundární virémie provází druhou fázi onemocnění (Růžek et al., 2011).

Uvádí se, že u pacientů s klíšťovou encefalitidou dochází k nepřiměřeně silné imunitní reakci ve srovnání s pacienty s encefalitidou vyvolanou jiným virem (kupříkladu enterovirová nebo herpetická encefalitida). V mozkové tkáni infikované virem klíšťové encefalitidy dochází k nadprodukcí různých typů cytokinů (interferony α , β , γ , interleukin 2, interleukin 5, interleukin 6, nebo interleukin 10). Cytokiny dále stimulují T-lymfocyty, NK buňky, tvorbu protilátek a expresi MHC na povrchu antigen prezentujících buněk. Všechny tyto mediátory různou měrou ovlivňují další prozánětlivé reakce. Zvýšené hladiny interleukinu 6, interleukinu 8 a interleukinu 12 byly rovněž prokázány ve vzorcích séra od pacientů v akutní fázi onemocnění. Právě zvýšené hladiny interleukinu 6 bývají dávány do spojitosti se sníženou tvorbou specifických imunoglobulinů IgG (Růžek et al., 2015).

Experimentálně bylo prokázáno, že za imunopatologické stavy při onemocnění klíšťovou encefalitidou jsou zodpovědné T-lymfocyty se znakem CD8⁺ (Růžek et al., 2009).

1.5 Klinický obraz onemocnění

Inkubační doba onemocnění je uváděna v rozsahu 7 až 14 dní, s krajním rozmezím 3 až 30 dní. Ve dvou třetinách případů probíhá onemocnění klíšťovou encefalitidou jako dvoufázové. V první fázi pacient trpí zvýšenou teplotou, bolestmi hlavy, svalů a celkovou únavou. Projevy trvají přibližně týden. Mezi první a druhou fází následuje sedmidenní bezpříznakové období, ve kterém dochází k pomnožení viru v orgánech. Nejvíce bývá zasažen retikuloendoteliální systém. Poté dochází k sekundární virémii a proniknutí viru do CNS. Tato fáze onemocnění se manifestuje projevy meningitidy až těžké encefalitidy (Paulus and Růžek, 2013).

Onemocnění probíhající bez klinických projevů je označováno jako inaparentní. I tato forma je doprovázena tvorbou specifických protektivních protilátek.

Onemocnění, u kterého proběhne jenom první fáze, odpovídající primární virémii a poté následuje úzdrava je takzvaně abortivní. Je charakteristické chřipkovými klinickými příznaky (horečky, svalová únava, bolesti hlavy). V mozkomíšním moku nejsou patrné žádné změny. Jak už bylo zmíněno, po onemocnění následuje protektivní imunitní odpověď. Tento průběh onemocnění je charakteristický přibližně pro třetinu pacientů s klíšťovou encefalitidou (Paulus and Růžek, 2013).

Pro meningitickou formu onemocnění jsou typické vysoké horečky nereagující na antipyretika, silné bolesti hlavy, světloplachost, nevolnost, zvracení, a horní i dolní meningeální příznaky (pacient nepřiloží hlavu na sternum, omezení pokrčení natažených dolních končetin, atd.). V mozkomíšním moku je patologický nález (zmnožení buněk, zvýšená celková bílkovina, zvýšený albuminový kvocient) (Růžek et al., 2015). Jedná se o druhý nejčastější obraz průběhu onemocnění (Beneš 2009).

U meningoencefalitické formy onemocnění se přidávají k již zmiňovaným poruchám ještě kvalitativní i kvantitativní poruchy vědomí různého stupně. Třes prstů, očních víček, jazyka, nepřesné pohyby, poruchy mimických nervů, občas i postižení vestibulárního systému (Beneš 2009).

Poslední formou onemocnění je obraz encefalomyelitidy, který se vyskytuje s nejmenší četností. U nemocných dochází k rozvoji chabých paréz, obvykle jedné končetiny. Nejčastěji bývá postižen ramenní pletenec. To se projevuje neschopností upažit, či zvednout paži do výše ramenního kloubu (Beneš, 2009). Příznaky zahrnují svalové křeče, zpomalení srdečního rytmu nebo krvácení do žaludku či ochrnutí. Třicet procent této formy onemocnění končí smrtí. U ostatních pacientů, zvláště ve vyšším věku, může docházet k trvalému ochrnutí. U některých pacientů se následně rozvíjí epilepsie (Paulus and Růžek, 2013).

1.6 Infekce u dětí

U dětí a mladistvých bývá nejčastějším projevem infekce způsobené virem klíšťové encefalitidy onemocnění charakteristické meningitidou. Průběh meningitidy provázejí vysoké horečky nad 38 °C, bolest hlavy a meningeální dráždění, nevolnost a zvracení. Podle dostupných údajů se onemocnění vyskytuje častěji u chlapců než u dívek. U chlapců je také častější výskyt těžších forem onemocnění včetně encefalitidy. Dětem se nevyhýbají ani postencefalitické parézy, dlouhodobé bolesti hlavy a změny v chování, poruchy paměti, soustředění, orientace, děti špatně spí, mají náhle potíže s udržením pozornosti a jsou podrážděné (Rostasy, 2012) (Fowler et al., 2013).

1.7 Infekce u seniorů

Nejrizikovější skupinou jsou v souvislosti s výskytem klíšťové meningoencefalitidy lidé ve věkové skupině nad padesát let. Proočkovanost proti klíšťové encefalitidě se v této věkové kategorii plynule snižuje. Více než polovina těchto osob trpí dalším onemocněním, které komplikuje průběh infekce virem KE. Klíšťová encefalitida pak mívá těžší a delší průběh, často s náročnou a dlouhodobou rekonvalescencí nebo s trvalými následky. U těchto osob je také statisticky dokázána vyšší úmrtnost na klíšťovou encefalitidu. Výkonnost imunitního systému u seniorů s přibývajícím věkem klesá a právě proto je u těchto osob víc než u kohokoliv jiného indikováno řádné očkování proti viru klíšťové encefalitidy, zároveň s dodržováním všech preventivních opatření, která mohou zabránit infekci tímto virem (Růžek et al., 2015).

1.8 Léčba

Terapie klíšťové meningoencefalitidy je pouze symptomatická s klidovým režimem na lůžku. Ukazuje se, že předčasná nepřiměřená zátěž může u pacienta vést k prodloužení rekonvalescence (Chmelík et al., 2004). U těžkých stavů je indikována antiedematozní terapie (Manitol, Dexamethason nebo Solumedrol) a léky na prokrvení mozku (Pentoxifyllin). Při pomalé rekonvalescenci jsou ordinovány vitaminy skupiny B a léky zlepšující schopnosti lidského myšlení. Doba hospitalizace se pohybuje v rozmezí 10 až 28 dnů. Po propuštění do

domácího ošetřování následuje další (několikatýdenní) rekonvalescence spojená s rehabilitací zajišťující postupný návrat k předchozímu způsobu života (Beneš, 2009).

1.9 Prevence

Při pohybu v rizikové oblasti se doporučuje vyšší obuv, přiléhavý oděv z hladkého materiálu a použití insekticidů a repelentů, minimálně po dobu pobytu v přírodě. Důležité je včasné odstranění klíštěte za použití speciálních kleštíček nebo pinzety. Ranku je potřeba pečlivě vydezinfikovat, nejlépe jodovým dezinfekčním prostředkem nebo alkoholem.

Mléko hospodářských zvířat (zejména ovcí a koz) z rizikových oblastí se doporučuje před konzumací pasterizovat. Riziková je rovněž i konzumace sýrů z nepasterizovaného mléka. (Růžek et al., 2010).

Očkování proti KE je dostupné v České republice od osmdesátých let minulého století. Očkovací látky patří mezi bezpečné a relativně málo reaktogenní. Informace ke kontrole proočkovanosti jsou získávány prostřednictvím cílených studií (Lexová et al., 2014).

1.10 Vakcíny

Předchůdkyně dnešní inaktivované vakcíny FSME - IMMUN byla vyvinuta v Institutu virologie ve Vídni (profesorem Kunzem) a v Mikrobiologickém výzkumném institutu v Port Down ve Velké Británii už v roce 1971 (Petráš and Lesná, 2010). V roce 1973 jí byla udělena licence. V roce 1989 byla vyrobena vakcína z kmene K23, která nese označení Encepur (Baret et al., 2003). Tato vakcína byla v roce 1991 zaregistrována v Německu (Petráš and Lesná, 2010).

V současnosti jsou v České republice dostupné obě vakcíny proti viru klíšťové encefalidity. Očkovací látka FSME-IMMUN obsahující kmen Neudörfl a je připravena pomnožením na fibroblastech kuřecích embryí. Je vyráběna také v provedení pro děti jako FSME – IMMUN Junior. Vakcína Encepur je připravena z kmene K 23 pomnožením na kulturách kuřecích fibroblastů. Dětská forma vakcíny je distribuována pod názvem Encepur K (SPC FSME IMMUN, 2014) (SPC Encepur, 2013) (Prymula et al., 2007).

Antigenní složení obou komerčních vakcín je vysoce homologní a lze je tedy považovat za imunogenně shodné. Tomu odpovídají studijní výsledky serologické imunogenity i bezpečnosti základního i posilujícího očkování provedeného záměnou jedné vakcíny za druhou (Petráš and Lesná, 2010).

U obou vakcín je nutné podání třech dávek s časovými intervaly, které jsou dány výrobcem vakcíny. Očkovací schéma FSME IMMUN má daný odstup mezi první a druhou dávkou jeden až tři měsíce a třetí dávka následuje pět až dvanáct měsíců po druhé vakcinaci. Základní očkovací schéma pro vakcínu Encepur udává odstup mezi první a druhou dávkou jeden až tři měsíce a třetí dávka následuje za devět až dvanáct měsíců po druhé dávce. Druhous dávkou je možné podat již dva týdny po první (SPC FSME IMMUN, 2014) (SPC Encepur, 2013).

V letních měsících je doporučeno postupovat podle zrychleného imunizačního schématu. Výrobce vakcíny FSME IMMUN doporučuje interval mezi první a druhou dávkou 14 dnů. Třetí dávku je třeba podat za 5 až 12 měsíců po druhé vakcinaci. Imunita trvá tři až čtyři roky a po třech letech je nutné přeočkování booster dávkou (SPC FSME IMMUN, 2014). Výrobce vakcíny Encepur uvádí u alternativního zrychleného očkování odlišné časové schéma. Interval mezi první a druhou dávkou je sedm dnů, třetí dávka je podána 21. den od zahájení očkování. Následuje dávka po 12 až 18 měsících (SPC Encepur, 2013).

Další posilující očkování je u obou vakcín doporučováno po třech až pěti letech, v závislosti na imunitním stavu a věku pacienta. Starší osoby se doporučuje očkovat v kratším intervalu. Totéž platí pro pacienty s poruchou imunity a pacienty podstupující hemodialýzu (Petráš and Lesná, 2010).

Kontraindikací vakcinace je přecitlivělost na složky vakcíny nebo akutně se vyskytující horečnaté onemocnění. Očkování je nutné zvážit u osob s autoimunním onemocněním (SPC FSME IMMUN, 2014) (SPC Encepur, 2013).

Po podání vakcíny se doporučuje přiměřený klidový režim. Jako nežádoucí účinky po vakcinaci se uvádí horečka, bolest paže v okolí vpichu, bolesti hlavy, zarudnutí a zduření přilehlých lymfatických uzlin. Nežádoucí účinky obvykle vymizí i bez léčby do 72 hodin po očkování (SPC FSME IMMUN, 2014) (SPC Encepur, 2013).

Rozsáhlá vakcinace v sousedním Rakousku, která vedla k devadesátiprocentní proočkování populace, měla pozitivní dopad na nemocnost především v endemických oblastech výskytu klíšťové encefalidity. Počty nemocných se zde počítají maximálně v desítkách případů ročně (Petráš, 2007).

Pro postexpoziční podání osobám ve zvýšeném riziku byl připraven specifický imunoglobulinový preparát. Jeho účinnost je podmíněna včasným podáním do 48 hodin po expozici. Tato látka se u nás v současné době nepoužívá (Beneš, 2009).

1.11 Laboratorní virologická diagnostika

Vzhledem k nespecifickým klinickým projevům klíšťové encefalidity je diferenciální diagnostika onemocnění založena na laboratorním vyšetření klinického materiálu. Laboratorní diagnostiku můžeme provádět metodami přímého průkazu (kultivace viru, stanovení virové RNA metodou PCR) nebo metodami nepřímého průkazu (detekce specifických protilátek).

1.11.1 Přímý průkaz viru

1.11.1.1 Izolace viru na zvířatech a tkáňových kulturách

Přímý průkaz viru klíšťové encefalitidy je možné provádět po inokulaci infekčního materiálu (krev, mozkomíšní mok), odebraného od nemocného pacienta ve viremické fázi onemocnění, na novorozená myšata. Po úmrtí pacienta na klíšťovou encefalitidu lze virus prokázat z mozku. Izolovaný kmen je potvrzen neutralizačním testem na myších (Votava, 2003). V praxi se izolace viru neprovádí (Beneš, 2009).

1.11.1.2 Průkaz virové RNA

Virová nukleová kyselina je detekovatelná během velmi rané infekce v krvi infikovaných jedinců, stanovení v mozkomíšním moku nebývá možné ani v časně fázi onemocnění. Vyšetření se provádí pomocí RT – PCR (reverzně-transkriptní polymerázovou reakcí). Post mortem je možné virus prokázat za použití RT – PCR v sekčním materiálu (Paulus and Růžek, 2013).

1.11.2 Nepřímý průkaz viru

Základem nepřímého průkazu viru jsou serologické metody sloužící ke stanovení specifických protilátek různých tříd proti původci onemocnění, které jsou produktem imunitního systému člověka po jeho kontaktu s konkrétním antigenem.

V minulosti patřila k základním virologickým serologickým metodám pro průkaz protilátek proti KE kupříkladu metoda KFR nebo metoda HIT. Nedostatkem těchto metod bylo, že nedokázaly odlišit akutní a anamnestické protilátky. Další nevýhodou bylo, že se testování provádělo z párových sér a výsledek byl k dispozici většinou až v době, kdy u pacienta docházelo k postupnému zotavování. Za signifikantní se považoval minimálně čtyřnásobný vzestup specifických protilátek v rekonvalescentním séru. Takovéto výsledky měly především epidemiologickou výpovědní hodnotu (Kunz and Hoffmann, 1971).

1.11.2.1 Hemaglutinačně inhibiční test

Základem hemaglutinačně inhibičního testu je kvantitativní stanovení přítomnosti protilátek proti virovému antigenu v patientském séru. Principem metody je skutečnost, že protilátka navázaná na hemaglutinační virus mu nedovolí přidané krvinky aglutinovat (inhibice virové hemaglutinace). Přítomnost protilátek znamená inhibici aglutinace přidaných erytrocytů a jejich sedimentaci. Nepřítomnost protilátek se projeví hemaglutinací. Tento test je možné použít pouze u hemaglutinujících virů (virus klíšťové encefalitidy, virus spalniček, virus chřipky, a další). Ze sér je při reakci nutné odstraňovat různé inhibitory simulující přítomnost protilátek. K tomu se používá kaolín. Ve srovnání s protilátkami prokázanými komplem fixační reakcí se hemaglutinačně inhibiční protilátky objevují dříve a ve vyšších titrech (Votava et al., 2010).

1.11.2.2 Komplement fixační reakce

Komplement fixační reakce je metodou mající ve virologické diagnostice dodnes své uplatnění, i když k průkazu protilátek proti KE se již běžně nepoužívá. Podstata reakce spočívá ve vazbě komplementu na komplex antigenu s protilátkou. Séra k průkazu pomocí KFR musíme před vlastní reakcí tepelně inaktivovat při teplotě 56°C ve vodní lázni k odstranění aktivity patientského komplementu. V prvním kroku se váže protilátka přítomná v patientském séru na specifický antigen, který jsme přidali do reakce. Na takto vzniklý imunokomplex se váže morčecí komplement přidáný ve vhodném ředění. Nedošlo-li v prvním kroku ke spotřebování veškerého komplementu, reaguje přebytečný komplement s přidáným hemolytickým systémem (beraní erythrocyty a amboceptor – králičí protilátka proti beraním erythrocytům) za vzniku hemolýzy krvinek. Pokud v prvním kroku dojde ke spotřebování morčecího komplementu vazbou na imunokomplex patientské protilátky s přidáným antigenem, odečítáme zábranu hemolýzy svědčící pro přítomnost specifických protilátek v patientském séru. Neobsahuje-li sérum protilátky, komplement není spotřebován vazbou na imunokomplexy a naváže se na hemolytický systém. Dochází k hemolýze amboceptorem senzibilizovaných beraních krvinek (Votava et al., 2010).

Výsledek udáváme v titru, odvozeném od nejvyššího ředění diagnostikovaného séra, ve kterém byly detekovány protilátky. Zábrana hemolýzy znamená pozitivní nález protilátek v séru. Pozitivní hemolýza svědčí pro negativní nález (protilátky v séru přítomné nebyly).

Komplement fixační reakce není vhodnou reakcí pro zjištění jednotlivých tříd protilátek a pro stanovení titru ochranných protilátek po vakcinaci (Anon, 2015).

1.11.2.3 Virus neutralizační test

Tento test se považuje za zlatý standard v serologické diagnostice flavivirů. K jeho provedení se používají tkáňové kultury. Využívá se toho, že specifické protilátky, přítomné v krvi pacienta, neutralizují virovou aktivitu. V přítomnosti protilátek jsou buňky tkáňové kultury ochráněny před cytopatickým efektem viru. Pokud ve vyšetřovaném materiálu nejsou přítomny protilátky neutralizující virus, dochází k poškození buněk tkáňové kultury. Práce je náročná na zpracování, odečítání a především s ohledem na bezpečnost zaměstnanců a na zabránění úniku viru do pracovního prostředí. V České republice provádí tento test Národní referenční laboratoř pro arboviry v Ostravě a dále výzkumná centra za účelem vědecké práce. Tento test je jedním z mála, který nevykazuje zkříženou reaktivitu s ostatními flaviviry a je proto považován za vysoce specifický (Litzba et al., 2014). Má význam při stanovení úrovně ochrany po očkování a v diagnostice „selhání očkování“ (sleduje se dynamika v párových sérech) (Zelená et al., 2015a).

1.11.2.4 Nepřímá imunofluorescence

Metoda slouží k detekci protilátek ve vyšetřovaném séru za pomoci protilátek proti lidským imunoglobulinům, které jsou značené fluoresceinem. Na podložní skličku jsou nafiloxované buňky tkáňové kultury infikované virem. Po inkubaci s vyšetřovaným sérem se přidává antiglobulin značený fluoresceinem. Výsledek reakce se hodnotí ve fluorescenčním mikroskopu (Holzmann, 2003). Komerčně tato metoda dostupná není.

1.11.2.5 ELISA (enzymem značená imunosorbentní analýza)

ELISA je jednou z nejpoužívanějších metod sloužících k detekci protilátek. Zkratka ELISA je odvozena z anglického názvu: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. Tato imunochemická metoda využívá schopnosti imunoglobulinů vázat se na povrch plastů a zároveň jejich schopnosti vazby k enzymům pomocí imunoglobulinových Fc receptorů. ELISA metodu je zároveň možné využít k průkazu antigenů. Patří do skupiny imunochemických metod označovaných zkratkou EIA (Enzyme Immunoassay) používajících enzym ke značení protilátky a tím i celého imunokomplexu. Navázání enzymu se v dalším kroku znázorní reakcí se substrátem za vzniku barevného produktu. Následná detekce je obvykle prováděna spektrofotometricky (existují i modifikace fluorimetrické nebo luminimetrické) (Votava et al., 2010). Ve virologii se metoda ELISA nejčastěji používá v rutinní praxi ke stanovení specifických protilátek. Stanovení antigenu není tak časté.

ELISA má několik možných modifikací provedení. Mezi nejčastěji používané patří průkaz protilátek sendvičovou metodou (sandwich ELISA). Na mikrotitrační destičku je navázaný antigen, na který se váže detekovaná protilátka. V dalším kroku se na navázanou detekovanou protilátku váže přidaná, enzymem značená protilátka proti lidskému imunoglobulinu. Takto vzniklý „sendvič“ je po zviditelnění enzymové aktivity komplexu detekován za pomoci ELISA readeru.

Další variantou je capture ELISA, která se používá ke specifickému stanovení protilátek ve vzorku (např. IgM), bez interference ostatních tříd protilátek. Na destičku je navázaná protilátka proti stanovované protilátce dané třídy ve vzorku. Následuje vazba specifických protilátek z testovaného vzorku. Po odmytí nenavázaných složek se přidá značený antigen, případně antigen a pak značená protilátka a dokončení probíhá detekcí barevné reakce pomocí ELISA readeru.

K detekci časně infekce lze použít stanovení avidity IgG. V průběhu onemocnění avidita (pevnost vazby) IgG protilátek na antigen stoupá. Přidáním denaturačního činidla, kterým je močovina, dojde k narušení vazby protilátky s antigenem. Zároveň je tentýž vzorek vyšetřován bez přidání činidla. Výsledné hodnocení je vyjádřeno výpočtem indexu avidity. Čím je avidita vyšší, tím delší uběhla doba od počátku tvorby protilátek. Stanovení avidity IgG protilátek je vhodným doplněním a upřesněním serologické diagnostiky klíšťové encefalitidy (Zelená et al., 2015b).

2 CÍL PRÁCE A HYPOTÉZY

2.1 Cíl práce

Cílem výzkumné části bakalářské práce bylo stanovení protilátek proti klíšťové encefalitidě ve vzorcích od pacientů, zaslaných k vyšetření na Pracoviště virologie Nemocnice České Budějovice, a.s. v období od 1. 1. 2014 do 31. 12. 2014 a jeho přínos pro diagnostiku onemocnění a posouzení stavu imunity po vakcinaci.

2.2 Hypotézy

H1: Předpokládám, že stanovení protilátek metodou ELISA v laboratorní diagnostice klíšťové encefalidity má významnou úlohu.

H2: Předpokládám, že doplnění stanovení avidity IgG protilátek má vyšší výpovědní hodnotu v diagnostice sporných případů.

H3: Předpokládám, že většina očkované populace má IgG protilátky proti klíšťové encefalitidě.

3 METODIKA

3.1 Charakteristika souboru

Vzorky pro svou bakalářskou práci jsem zpracovávala v Nemocnici České Budějovice, a.s. na Pracovišti virologie, které je součástí Laboratoře lékařské mikrobiologie Centrální laboratoře. Materiál od vyšetřovaných pacientů (krev i mozkomíšni mok) je především z českobudějovické nemocnice, ostatní vzorky jsou z okolních okresních nemocnic, od praktických lékařů a z Očkovacího centra Avenier. Pacientská séra jsem zpracovávala od začátku ledna do konce prosince roku 2014. Materiál byl zasílán do laboratoře obvykle s diagnózou virová encefalitida přenášená klíšťaty, neurčená virová encefalitida, horečka, bolest hlavy, mdloba – kolaps, kousnutí nebo štípnutí nejedovatým hmyzem či s diagnózou preventivní laboratorní vyšetření. S ohledem na různorodost klinických příznaků při onemocnění klíšťovou encefalitidou byly občas u vyšetřovaných vzorků i jiné klinické diagnózy.

Všechna séra jsem testovala na přítomnost protilátek IgG a IgM proti viru klíšťové encefalitidy metodou sandwich ELISA. Vzorky mozkomíšního moku jsem testovala stejnou metodou pouze na přítomnost IgM protilátek.

3.1.1 Odběr materiálu a transport vzorku

K vyšetření protilátek proti klíšťové encefalitidě v pacientském séru je potřeba odebrat vzorek žilní krve. Běžně se krev odebírá aseptickým způsobem do sterilní zkumavky bez protisrážlivého činidla v objemu 5 ml krve (u dětí je možné odebrat 2 až 3 ml). Zpracovává se krevní sérum. U testů, které jsem prováděla, je povoleno zpracovávat i citrátovou plazmu z odběru do protisrážlivého činidla. Ostatní protisrážlivá činidla mohou ovlivnit výsledek a pro diagnostiku tímto testem nejsou takto provedené odběry vhodné. Mozkomíšni mok se odebírá asepticky do sterilní zkumavky. Zkumavka se vzorkem musí být jednoznačně označena jménem, příjmením a rodným číslem pacienta. Odebrané vzorky se do doby transportu uchovávají v chladničkové teplotě (2 – 8 °C). Transport probíhá za stejných teplotních podmínek v označených termoboxech. Krátkodobý transport do 2 hodin při teplotě do 25 °C nemá vliv na kvalitu vzorku.

3.1.2 Zpracování materiálu v laboratoři

Vzorky jsem v laboratoři nejprve jednoznačně identifikovala, zkontrolovala jsem údaje na vzorcích i žádankách a požadavky na vyšetření na žádance. Poté jsem vzorky krve zcentrifugovala při 3000 g po dobu 3 minut, aby se oddělilo sérum od krevního koláče. U mozkomíšního moku s příměsí krve jsem postupovala stejně. Po centrifugaci jsem v laminárním boxu u všech vzorků oddělila sterilní jednorázovou pasturovou pipetou krevní sérum (plazmu, mozkomíšni mok) do označených zkumavek, které jsem do samotného zpracování metodou ELISA uložila do chladničky při teplotě 2 až 8 °C.

3.2 Diagnostický průkaz klíšťové encefalitidy

K průkazu protilátek u vyšetřovaných vzorků jsem použila komerční soupravy EIA TBE Virus IgG a EIA TBE Virus IgM od firmy TestLine Clinical Diagnostics s.r.o.

Test protilátek proti viru klíšťové encefalitidy (IgG i IgM) je založen na principu sandwich ELISA. Na pevnou fázi (jamky mikrotitrační destičky) je navázaný specifický antigen viru klíšťové encefalitidy. Po přidání naředěného séra nebo moku se váží protilátky z vyšetřovaného vzorku na antigen v jamkách. Nereagující proteiny jsou odstraněny promytím. Poté se přidá konjugát, který obsahuje značené monoklonální protilátky proti lidskému IgG nebo IgM. Peroxidázová aktivita značeného imunokomplexu se stanovuje TMB substrátem a reakce je ukončena přidáním zastavovacího roztoku. Vzniklé žluté zbarvení je úměrné množství protilátek proti klíšťové encefalitidě ve vzorku. Intenzitu zbarvení detekujeme spektrofotometricky při vlnové délce 450 nm (Litzba et al., 2013).

Stanovení avidity protilátek je založeno na principu narušení vazby mezi antigenem a protilátkou. Vyšetření se provádí metodou ELISA. Naředěný vyšetřovaný vzorek kapeme do dvou jamek. Po první inkubaci přidáme do jedné jamky aviditní roztok a do druhé pracovní ředění ředícího roztoku. Reakci dokončíme stejně jako stanovení IgG protilátek. Výsledek vypočítáme z poměru absorbance vzorku s aviditním činidlem k absorbanci vzorku s ředícím roztokem. Výsledek udáváme v procentech.

3.2.1 Stanovení protilátek IgG proti viru klíšťové encefalitidy

Ke zpracování vzorků jsem nejprve vytemperovala komerční detekční soupravu na laboratorní teplotu.

Souprava obsahuje:

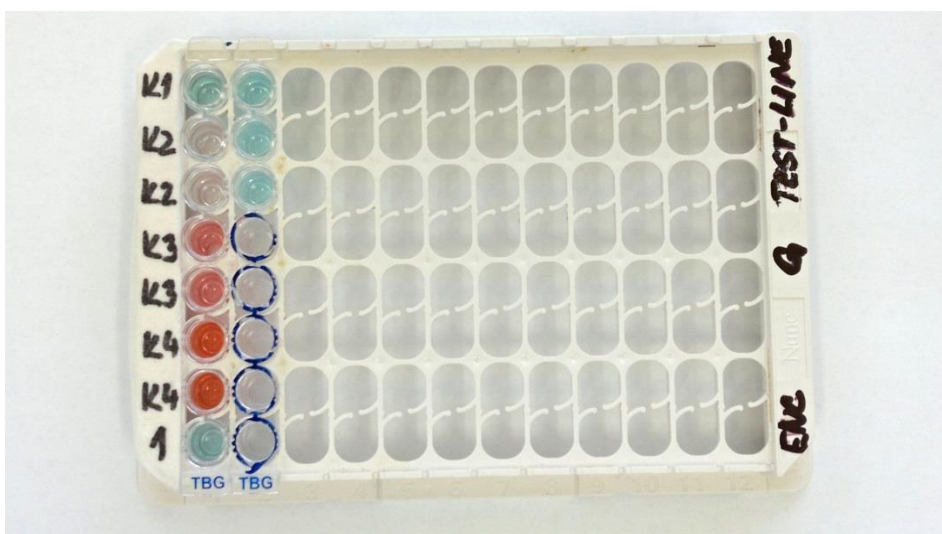
- potaženou destičku s navázaným antigenem
- negativní kontrolu (kalibrátor 1) 4 U/ml
- cut off kontrolu (kalibrátor 2) 20 U/ml
- pozitivní kontrolu (kalibrátor 3) 80 U/ml
- kalibrátor 4 (200 U/ml)
- konjugát (zvířecí imunoglobulin proti lidskému IgG značený peroxidázou) v pracovním ředění
- ředící roztok vzorků 2 (pufr se stabilizátory bílkovin) v pracovním ředění
- TMB – Complete 2 (jednosložkový substrát obsahující TMB/H₂O₂) v pracovním ředění
- promývací roztok (20x koncentrovaný pufr, který se ředí destilovanou vodou → 75 ml koncentrovaného pufru + 1425 ml destilované vody)

- zastavovací roztok (1 M roztok kyseliny sírové) v pracovním ředění
 - aviditní roztok (stabilizovaný roztok močoviny)
 - víčko na zakrytí mikrotitrační destičky
1. V prvním kroku jsem si naředila vyšetřovaná séra 1:101. Do každé sterilní zkumavky jsem napipetovala 1 ml ředícího roztoku pro vzorky 2, do kterého jsem přidala 10 μ l vyšetřovaného séra (viz obr. č. 1).



Obrázek č. 1: Ředění vzorků (foto autorka)

2. Připravila jsem si stripy (řádky jednotlivých jamek mikrotitrační destičky) a do jednotlivých jamek jsem napipetovala 100 μ l kontrol a naředěných, promíchaných sér (viz obr. č. 2).



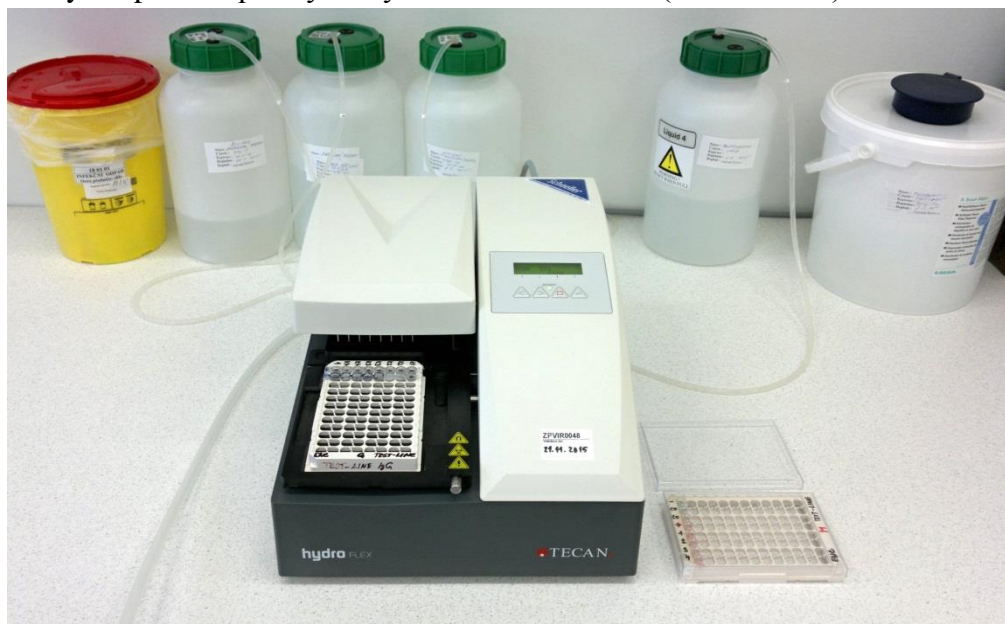
Obrázek č. 2: Destička s naředěnými vzorky (foto autorka)

3. Mikrotitrační destičku se vzorky jsem vložila na 30 minut do inkubátoru při 37 °C a zakryla ji víčkem, aby nedošlo ke ztrátě (odpaření) vzorků a kontrol (viz obr. č. 3).



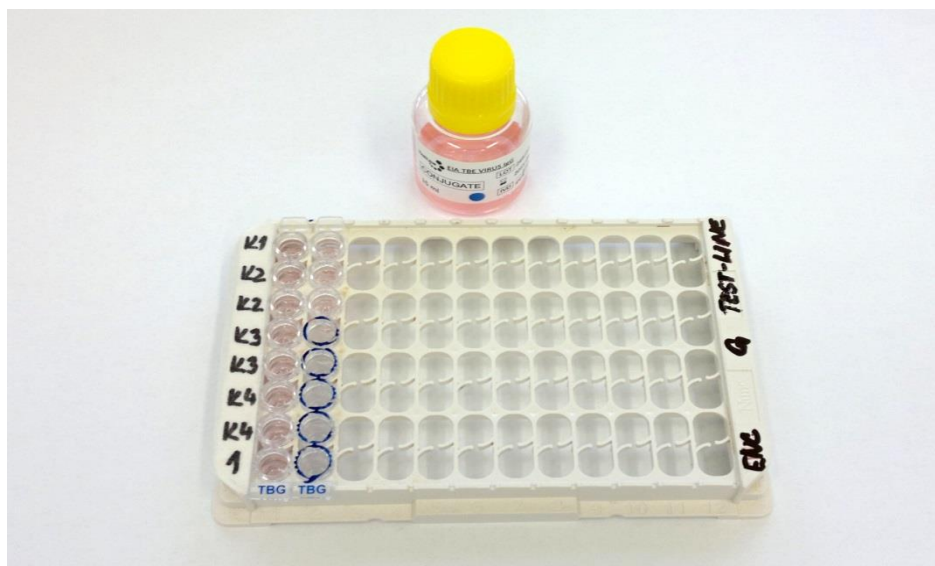
Obrázek č. 3: Inkubátor BIOSAN (foto autorka)

4. Po uplynutí doby jsem vyndala destičku z inkubátoru a jamky 5x promyla pracovním promývacím roztokem s minutovými intervaly mezi jednotlivými kroky za pomoci promývačky Columbus TECAN (viz. obr. č. 4).



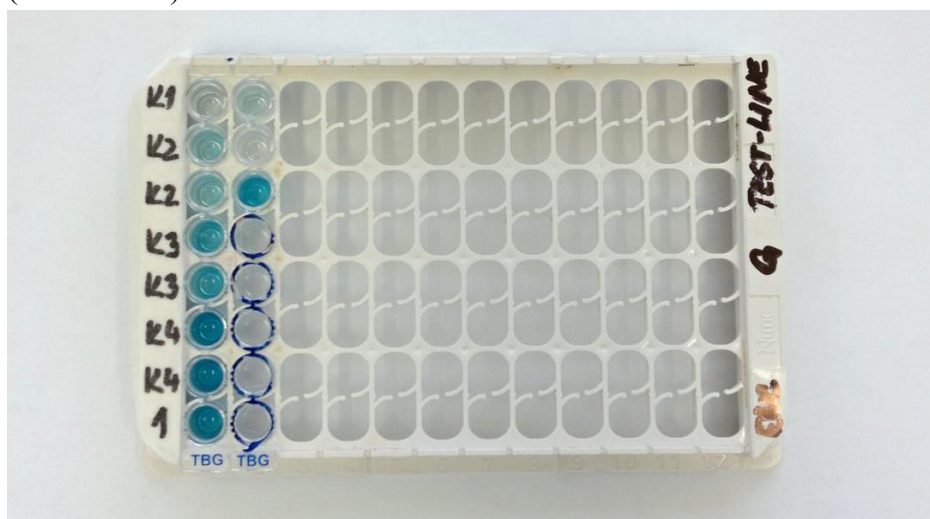
Obrázek č. 4: Promývačka Hydro Flex TECAN (foto autorka)

5. Dále jsem do každé jamky napipetovala 100 μ l konjugátu, zakryla destičku víčkem a vložila ji na 30 minut při 37 °C do inkubátoru (viz. obr. č. 5).



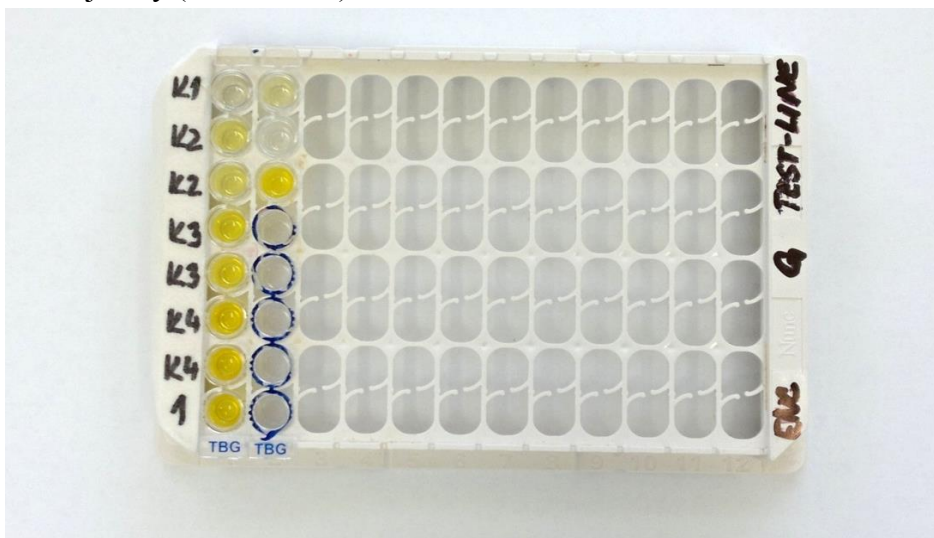
Obrázek č. 5: Destička s IgG konjugátem (foto autorka)

6. V dalším kroku jsem vyndala destičku z inkubátoru, sejmula víčko a jamky v destičce 5x promyla pracovním promývacím roztokem s minutovými intervaly mezi jednotlivými kroky. Do promytých jamek jsem napipetovala 100 μ l jednosložkového substrátu TMB-Complete.
7. Destičku jsem dala zakrytou víčkem na 15 minut inkubovat při 37 °C do inkubátoru (reakce s chromogenním substrátem musí probíhat v temnu). (viz obr. č. 6)



Obrázek č. 6: Reakce s chromogenním substrátem (foto autorka)

8. Po 15 minutách jsem zastavila reakci přidáním 100 μ l zastavovacího roztoku do každé jamky (viz obr. č. 7)



Obrázek č. 7: Zastavení reakce (foto autorka)

9. Měření absorbance jsem provedla při nastavení vlnové délky 450 nm vložím destičku do spektrofotometru (viz obr. č. 8).



Obrázek č. 8: Spektrofotometr BIOTEK (ELISA reader) (foto autorka)

3.2.2 Stanovení avidity protilátek IgG proti viru klíšťové encefalitidy

Ke zpracování vzorků jsem nejprve vytemperovala komerční detekční soupravu určenou k vyšetření IgG protilátek proti viru klíšťové encefalitidy na laboratorní teplotu.

Souprava obsahuje: viz předchozí část

1. Stejně jako u předchozího stanovení IgG protilátek jsem si v prvním kroku naředila vyšetřovaná séra 1:101. Do každé sterilní zkumavky jsem napipetovala 1 ml ředícího roztoku pro vzorky, do kterého jsem přidala 10 µl vyšetřovaného séra a naředěný obsah zkumavek jsem dobře promíchala.
2. Připravila jsem si stripy a do jednotlivých jamek jsem napipetovala 100 µl kontrol a naředěných sér. Vzorky sér jsem kapala pro stanovení avidity vždy duplicitně.
3. Zakrytou mikrotitrační destičku se vzorky jsem vložila na 30 minut do inkubátoru při 37 °C.
4. Po té jsem vyndala destičku z inkubátoru a jamky 5x promyla pracovním promývacím roztokem s intervaly mezi jednotlivými kroky 1 minuta za pomoci promývačky, jako u běžného stanovení IgG protilátek.
5. V dalším kroku jsem do všech základních jamek napipetovala 100 µl pracovního ředění promývacího roztoku a do každé druhé jamky každého vzorku jsem napipetovala 100 µl aviditního roztoku močoviny ze soupravy.
6. Zakrytou destičku jsem dala inkubovat na 15 minut při 37 °C do inkubátoru.
7. Po uplynutí této doby jsem destičku vyndala a jamky promyla 5x s jednominutovými intervaly.
8. Dále jsem do každé jamky napipetovala 100 µl konjugátu, zakryla destičku víčkem a vložila ji na 30 minut při 37 °C do inkubátoru.
9. Po inkubaci jsem vyndala destičku, sejmula víčko a jamky v destičce 5x promyla pracovním promývacím roztokem s intervaly mezi jednotlivými kroky 1 minuta. Do promytých jamek jsem napipetovala 100 µl jednosložkového substrátu TMB-Complete.
10. Destičku jsem zakryla a dala inkubovat na 15 minut při 37 °C do inkubátoru.
11. Poté jsem reakci zastavila přidáním 100 µl zastavovacího roztoku.
12. Destičku jsem dala do spektrofotometru a změřila jsem intenzitu zabarvení roztoků (absorbanci) v jamkách při nastavení vlnové délky měření na 450 nm.

3.2.3 Stanovení protilátek IgM proti viru klíšťové encefalitidy

Ke zpracování vzorků jsem nejprve vytemperovala komerční detekční soupravu na laboratorní teplotu.

Souprava obsahuje:

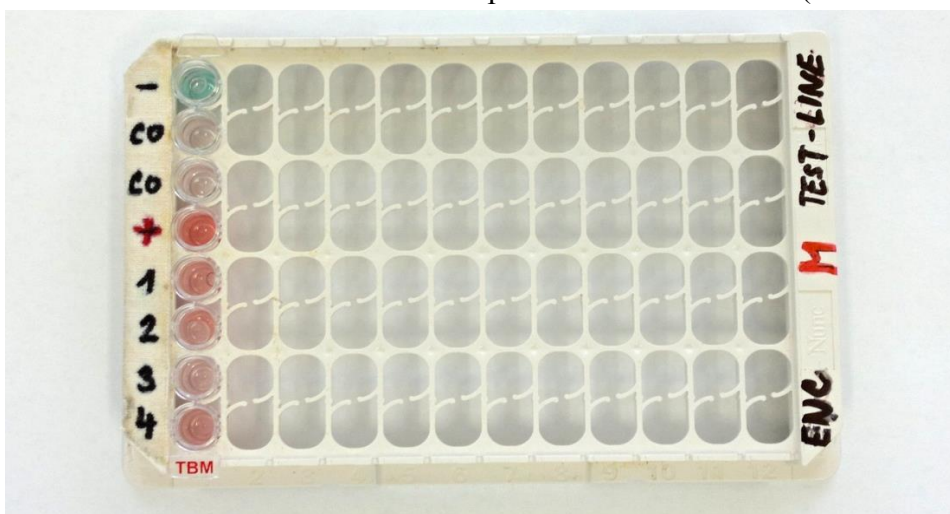
- potaženou destičku s navázaným antigenem
 - negativní kontrolu
 - cut off (roztok obsahující specifické lidské protilátky v hraniční koncentraci)
 - pozitivní kontrolu
 - konjugát (zvířecí imunoglobulin proti lidskému IgM značený peroxidázou) v pracovním ředění
 - ředící roztok vzorků 4 (pufr se stabilizátory bílkovin a IgG/RF sorbentem) v pracovním ředění
 - TMB – Complete 2 (jednosložkový substrát obsahující TMB/H₂O₂) v pracovním ředění
 - promývací roztok (20x koncentrovaný pufr, který jsem naředila destilovanou vodou → 75 ml koncentrovaného pufru + 1425 ml destilované vody)
 - zastavovací roztok (1 M roztok kyseliny sírové) v pracovním ředění
 - víčko na zakrytí mikrotitrační destičky
1. Stejně jako u stanovení protilátek IgG jsem si i u stanovení IgM nejprve naředila séra ředícím roztokem vzorků 1:101. Do každé sterilní zkumavky jsem napipetovala 1 ml ředícího roztoku pro vzorky 4 (je odlišný od soupravy pro stanovení IgG!), do kterého jsem přidala 10 µl vyšetřovaného séra.

2. Ředění vzorků mozkomíšního moku jsem provedla 1:2 ředícím roztokem vzorků
4. Do sterilní zkumavky jsem napipetovala 100 μ l ředícího roztoku a přidala jsem 100 μ l vzorku mozkomíšního moku (viz. obr. č. 9)



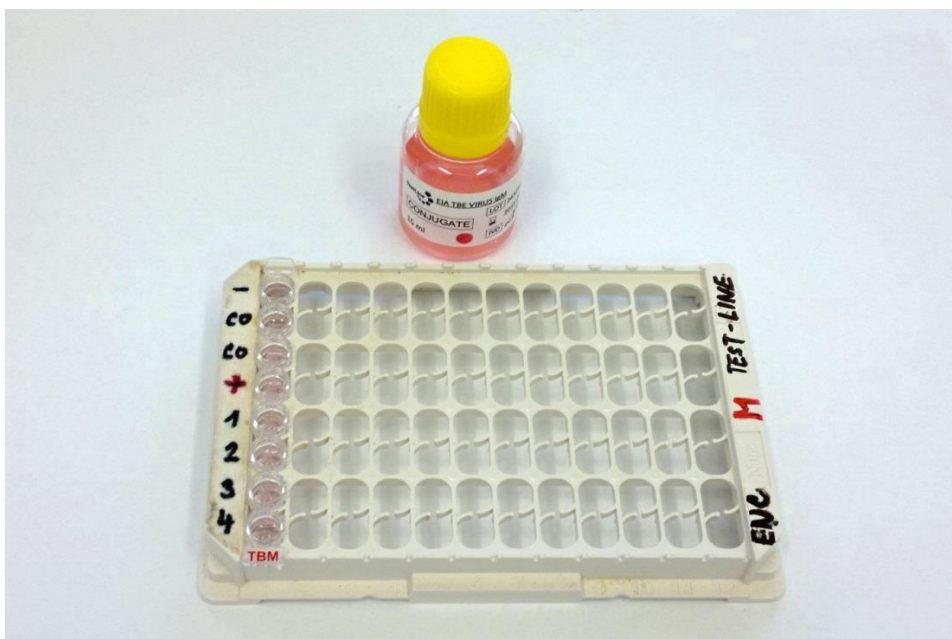
Obrázek č. 9: Naředění vzorků – mozkomíšní mok (foto autorka)

3. Do jednotlivých jamek připravené mikrotitrační destičky jsem napipetovala 100 μ l kontrol, naředěných vzorků séra a mozkomíšního moku. Destičku jsem zakryla víčkem a dala inkubovat na 30 minut při 37 °C do inkubátoru (viz obr. č. 10)



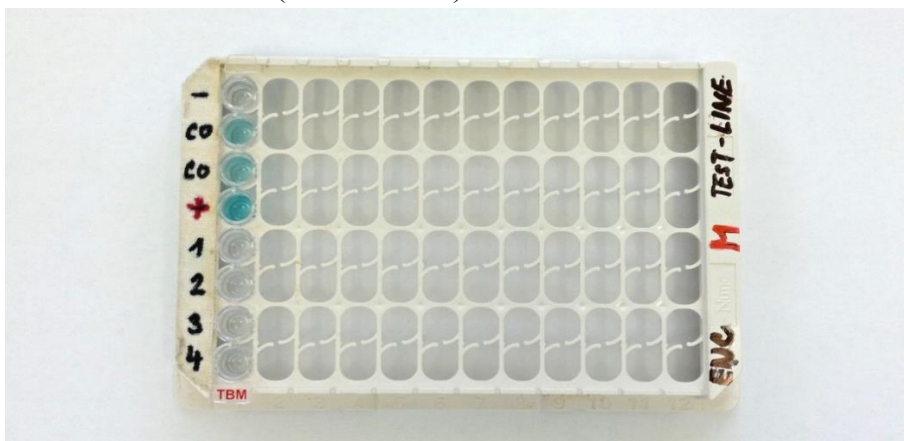
Obrázek č. 10: Vzorky a kontroly v destičce (foto autorka)

4. Po inkubaci jsem obsah jamek odsála a 5x promyla pracovním ředěním promývacího roztoku s čekacími intervaly po jedné minutě mezi jednotlivými kroky.
5. Do všech jamek jsem pipetovala 100 μ l konjugátu proti lidskému IgM značeného peroxidázou. Destičku jsem zakryla a dala na dalších 30 minut inkubovat při 37 °C do inkubátoru (viz obr. č. 11)



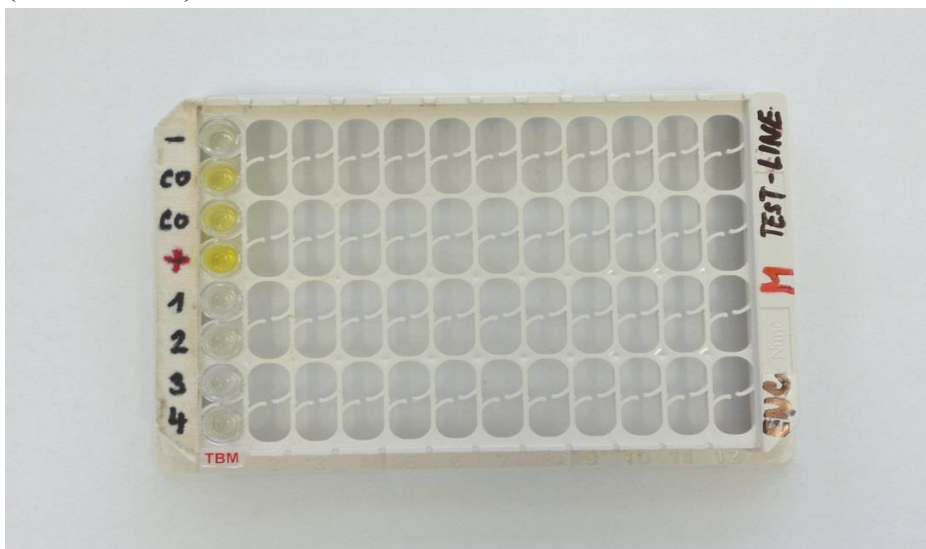
Obrázek č. 11: Přidání IgM konjugátu (foto autorka)

6. V dalším kroku jsem destičku vyndala z inkubátoru a opět ji 5x promyla s minutovými čekacími intervaly mezi jednotlivými cykly mytí.
7. Po promytí jsem do všech jamek napipetovala 100 μ l jednosložkového substrátu TMB-Complete a dala jsem zakrytou destičku inkubovat v temnu při 37 °C na 15 minut do inkubátoru (viz obr. č. 12)



Obrázek č. 12: Reakce s chromogenním substrátem (foto autorka)

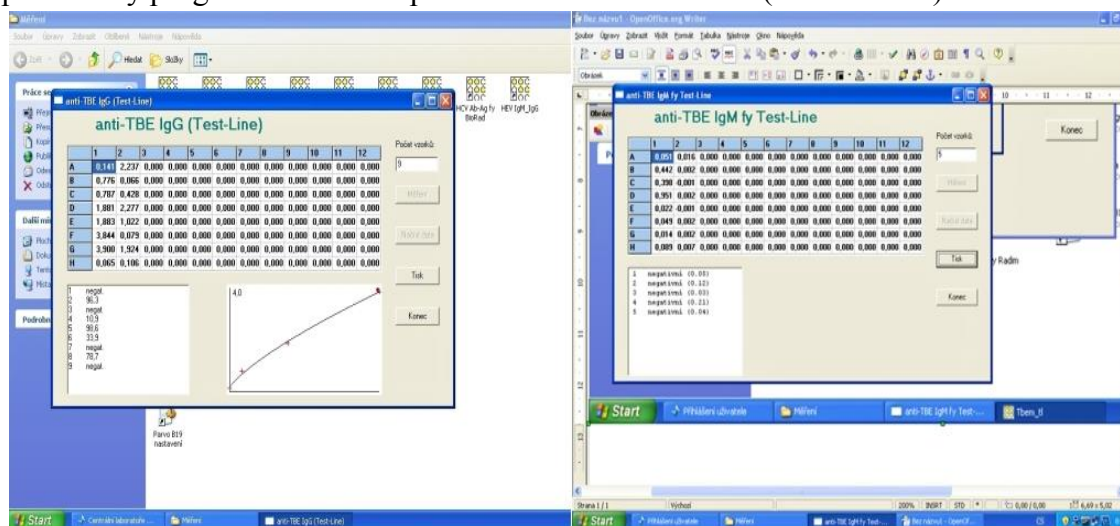
8. Probíhající reakci jsem zastavila přidáním 100 μ l zastavovacího roztoku (viz obr. č. 13)



Obrázek č. 13: Zastavení reakce (foto autorka)

9. Do 30 minut od zastavení reakce jsem provedla na spektrofotometru měření absorbance vzorků při vlnové délce 450 nm (viz obr. č. 8)

Výsledky pro stanovení protilátek IgG i IgM proti viru klíšťové encefalitidy vyhodnotil počítačový program na základě přednastaveného schématu (viz obr. č.14)



Obrázek č. 14: Vyhodnocení změřených hodnot počítačovým programem (foto autorka)

Hladiny protilátek IgG ve vzorcích jsou odečteny podle čtyřbodové kalibrační křivky, sestavené z hodnot získaných změřením absorbancí jednotlivých kalibrátorů o známé koncentraci a udávají se v jednotkách U/ml. Výsledky jsou hodnoceny v komentáři k výsledku dle doporučení výrobce. Méně než 18 jednotek je negativní nález, 18 – 22 jednotek je hraniční výsledek a více než 22 jednotek svědčí pro pozitivní nález protilátek v séru. Hraniční nálezy jsou doporučeny zopakovat z nového odběru s časovým odstupem.

Index avidity jsem vypočítávala ručně za použití vzorce doporučeného výrobcem soupravy:

$$IAv = \frac{\text{absorbance vzorku s avidním činidlem}}{\text{absorbance vzorku s diluentem}} \times 100$$

Hodnoty získané výpočtem se udávají v procentech (%).

Interpretace indexu avidity IgG dle výrobce testovací soupravy udává index menší než 30 % jako nízkou aviditu, která svědčí pro akutní, či postakutní (2–3 měsíce po začátku infekce) fázi onemocnění, případně pro první týdny po zahájení imunizace vakcínou. Výpočet indexu udávající hodnoty od 31 % do 40 % znamená hraniční nález a je doporučeno vyšetření opakovat s časovým odstupem. Pro dříve prodělanou infekci, případně pro stav po očkování svědčí index avidity IgG protilátek proti viru klíšťové encefalidity 41 % až 100 %.

Hladiny protilátek IgM vyhodnotil počítač na základě výpočtu indexu pozitivitu pro séra z poměru mezi absorbancí vzorku a průměrnou absorbancí kontroly cut off. Hladiny protilátek IgM v mozkomíšním moku jsou stanoveny podle následujícího vzorce:

$$IP = \frac{\text{absorbance vzorku}}{\text{průměrná absorbance cut off}/2}$$

Index pozitivitu menší než 0,9 jednotek znamená negativní nález, hodnoty indexu v rozmezí 0,9 až 1,1 jsou hraniční a hodnoty indexu větší než 1,1 svědčí pro pozitivní nález protilátek IgM. Vyšetření hraničních vzorků, tj. s indexem pozitivitu 0,9 až 1,1 je nutné opakovat z nového odběru za 2 až 3 týdny s ohledem na specifika daného onemocnění.

Schéma mikrotitrační destičky pro stanovení IgG protilátek proti klíš'ové encefalitidě:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Kal.1	vz.2	vz.10									
B	Kal.2	vz.3	vz.11									
C	Kal.2	vz.4										
D	Kal.3	vz.5										
E	Kal.3	vz.6										
F	Kal.4	vz.7										
G	Kal.4	vz.8										
H	vz.1	vz.9										

Schéma mikrotitrační destičky pro stanovení IgM protilátek proti klíš'ové encefalitidě:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	KO-	vz.5	vz.13									
B	C-O	vz.6	vz.14									
C	C-O	vz.7										
D	KO+	vz.8										
E	vz.1	vz.9										
F	vz.2	vz.10										
G	vz.3	vz.11										
H	vz.4	vz.12										

Kal kalibrátor, KO- negativní kontrola, KO+ pozitivní kontrola, C-O cut off kontrola,
vz. vzorek.

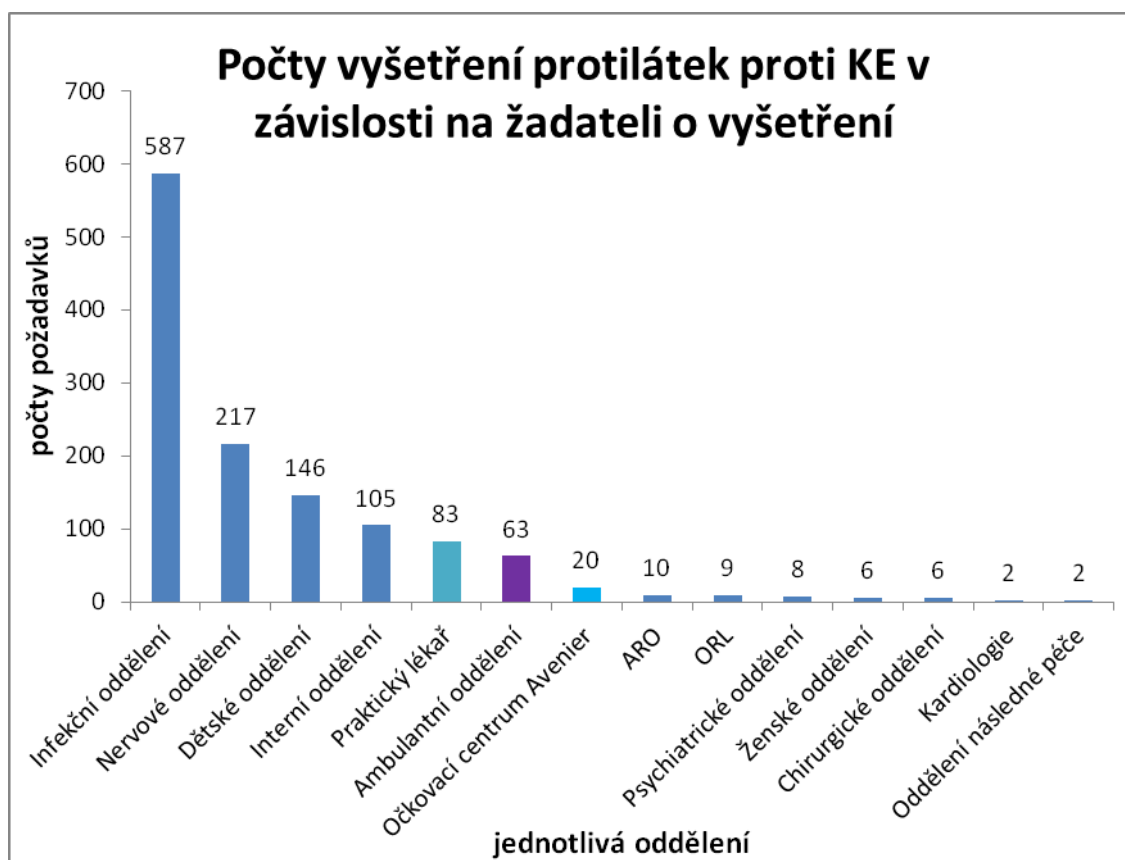
4 VÝSLEDKY

V období od začátku ledna 2014 až do konce roku 2014 jsem na Pracovišti virologie v Nemocnici České Budějovice, a.s. zpracovala celkem 1264 vzorků. Výsledky jsem zanesla do tabulek a zpracovala graficky.

Z celkového počtu vzorků 1264 se jednalo o 1075 pacientů. To znamená, že někteří pacienti byli vyšetřováni opakovaně. Důvodem bylo zaslání dvou vzorků od jednoho pacienta (krev a mozkomíšní mok) nebo nejednoznačný výsledek z primárně zaslání vzorku, kdy laboratoř požadovala opakovaný odběr s časovým odstupem k dalšímu stanovení protilátek proti klíšťové encefalitidě.

4.1 Oddělení požadující vyšetření

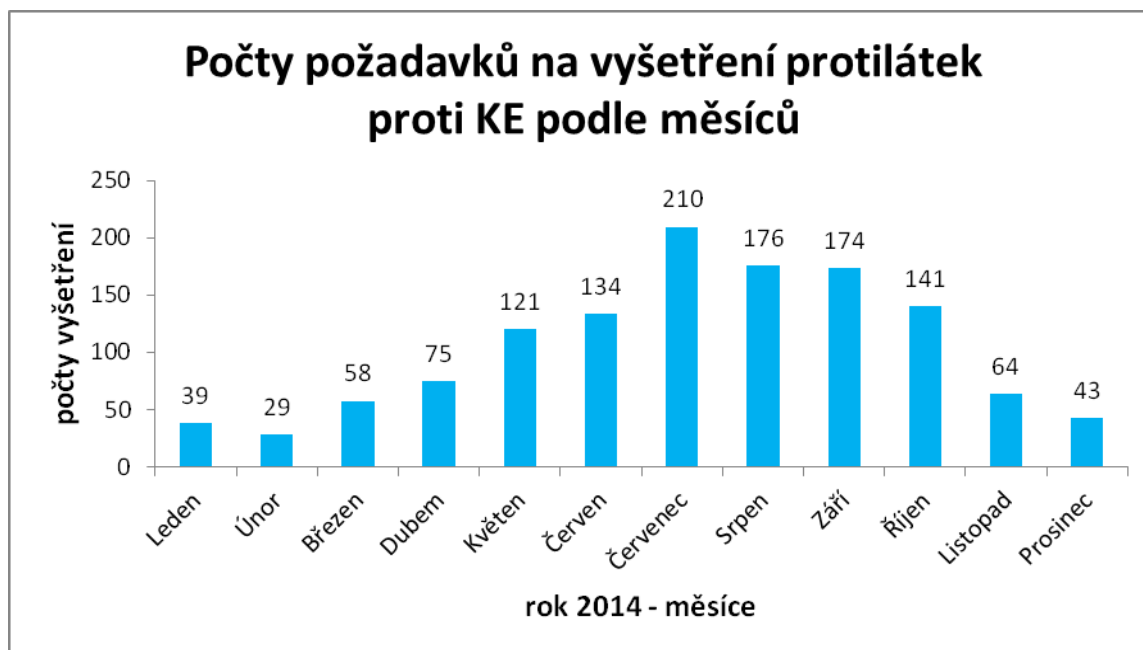
V následujícím grafu je znázorněna četnost zaslání požadavků na vyšetření protilátek proti klíšťové encefalitidě od jednotlivých žadatelů během uplynulého roku 2014. Vyšetření byla požadována zejména lůžkovými odděleními, nejvíce infekčním oddělením. Požadavky na stanovení pouze IgG protilátek s cílem posoudit stav imunity po očkování přicházely většinou od praktických lékařů a z očkovacího centra Avenir. (graf číslo 1)



Graf č. 1: Znázornění četnosti zaslání požadavků na vyšetření protilátek proti klíšťové encefalitidě od jednotlivých žadatelů za rok 2014.

4.2 Sezónní charakter onemocnění

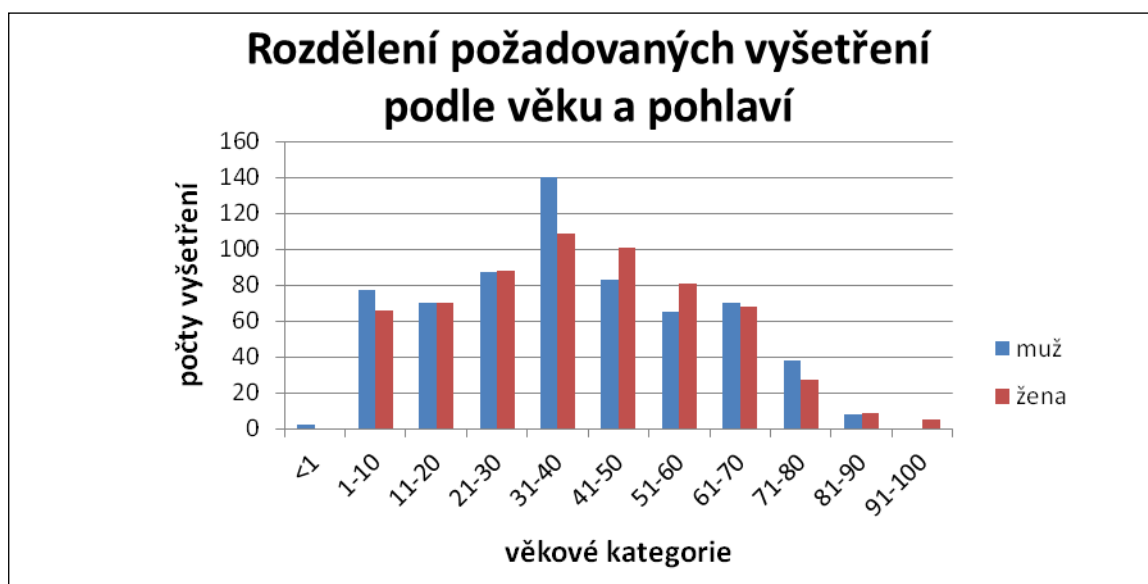
V následujícím grafu uvádím distribuci zasílaných vzorků v průběhu celého roku 2014. Maximum vzorků, 17 %, bylo vyšetřeno v červenci. Za červenec, srpen a září bylo vyšetřeno celkem 44 % vzorků. Nejméně požadavků na vyšetření hladiny protilátek, 9 %, bylo na naše oddělení přijato v zimních měsících (prosinec, leden, únor).



Graf č. 2: Sezónní charakter distribuce vzorků v průběhu roku 2014.

4.3 Věk a pohlaví vyšetřovaných

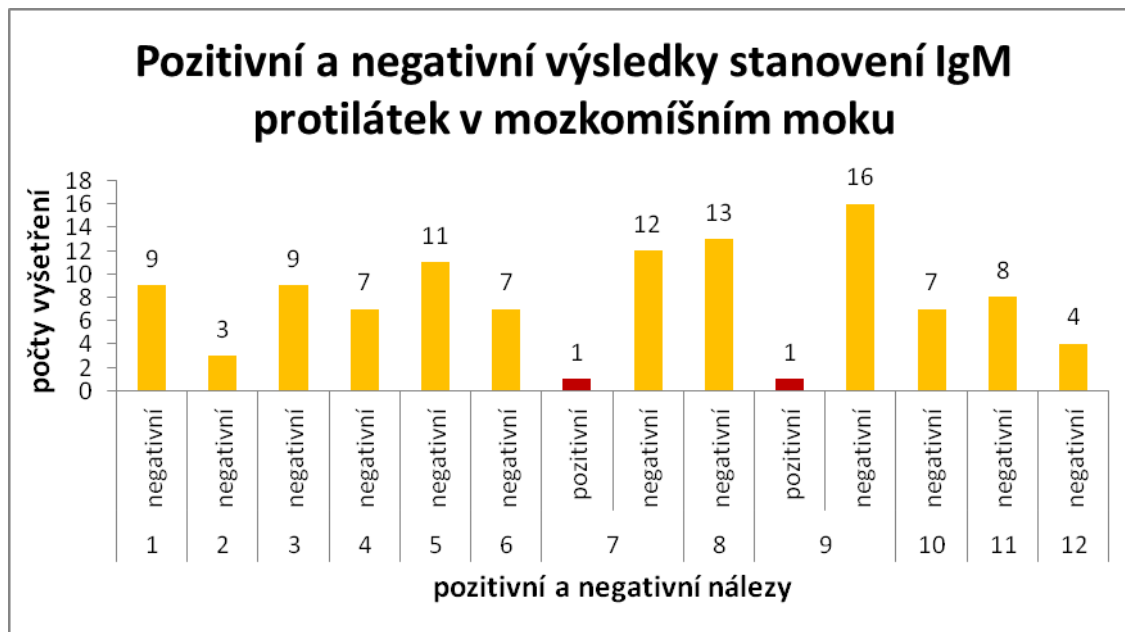
Graf znázorňuje četnost požadavků na vyšetření protilátek proti klíšťové encefalitidě v roce 2014 u mužů a u žen v závislosti na věku. Z celkového počtu 1264 požadavků bylo 640 mužů a v 624 žen. Nejčastěji byly testovány protilátky u mužů ve věku 31 až 40 let a to ve 140 případech. Protilátky u žen byly v tomto věkovém období vyšetřeny ve 109 případech. Ve věku do jednoho roku bylo požadováno vyšetření protilátek proti klíšťové encefalitidě pouze u dvou chlapců. Ve věku nad devadesát let byly vyšetřeny protilátky u pěti žen.



Graf č. 3: Počty vyšetřených mužů a žen v závislosti na jejich věku.

4.4 Výskyt protilátek v mozkomíšním moku

Na grafu č. 4 vidíme počet vzorků mozkomíšního moku, ve kterých jsem prokazovala přítomnost IgM protilátek proti viru klíšťové encefalidity. Z celkového počtu 108 vzorků byl pozitivní nález IgM pouze u jednoho vzorku v červenci a jednoho vzorku v září.



Graf č. 4: Výsledky stanovení IgM protilátek v mozkomíšním moku. Červeně – pozitivní, oranžově – negativní.

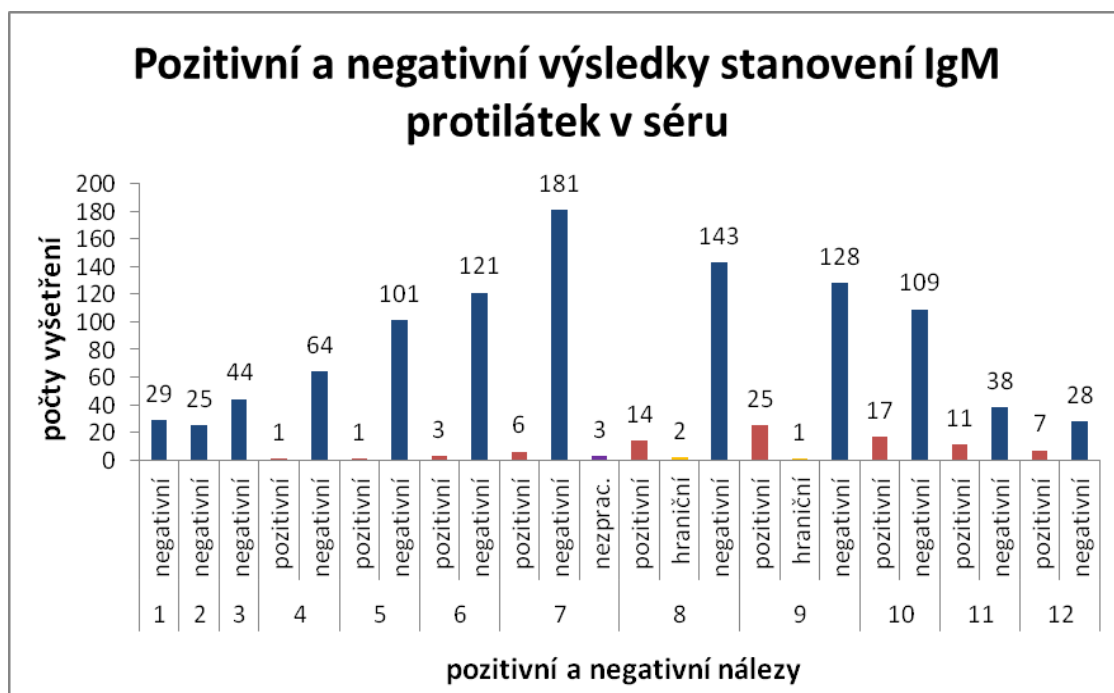
Z celkového počtu 88 sér, u kterých byla detekována pozitivita IgM protilátek, byl paralelně vyšetřen i mozkomíšní mok v sedmi případech. Pouze u dvou byla shoda v pozitivním nálezu.

	sérum IgM pozitivní, IgG pozitivní	sérum IgM negativní, IgG pozitivní	sérum IgM negativní, IgG negativní
mok IgM pozitivní	2	0	0
mok IgM negativní	5	28	55

Tabulka č. 1: Hodnocení nálezu IgM protilátek proti KE v mozkomíšním moku s ohledem na nález IgM protilátek v séru.

4.5 IgM protilátky v séru

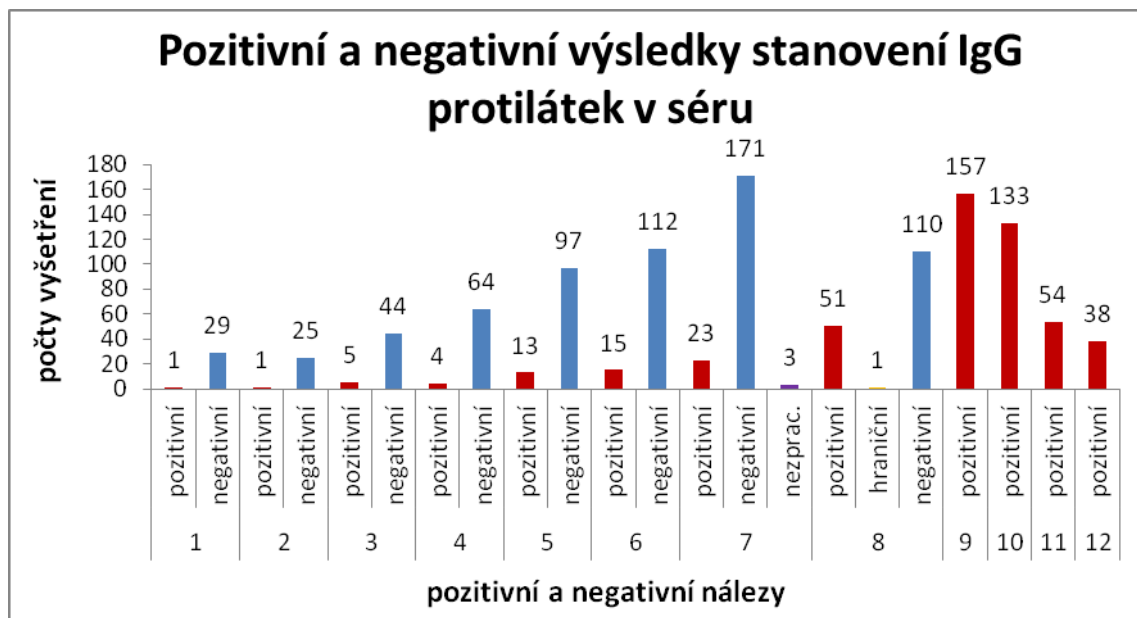
Z celkového počtu 1102 bylo jako pozitivní hodnoceno 85 vzorků, 1011 sér bylo na průkaz specifických IgM negativních. Tři vzorky byly vyhodnoceny jako hraniční a bylo požadováno vyšetření protilátek proti klíšťové encefalitidě z dalšího odběru, ve kterém byl pak pozitivní nález IgM. Tři vzorky nebyly zpracovány.



Graf č. 5: Výsledky stanovení IgM protilátek v séru. Červeně – pozitivní, modře – negativní, žlutě – hraniční, fialově – nezpracováno.

4.6 IgG protilátky v séru

Hladinu IgG protilátek jsem vyšetřila u 1148 vzorků. 495 vzorků bylo pozitivních a 652 negativních (viz graf č. 6). Jeden vzorek byl hraniční a bylo laboratoří doporučeno opakované vyšetření z nového vzorku odebraného s časovým odstupem.



Graf č. 6: Výsledky stanovení IgG protilátek v séru. Červeně – pozitivní, modře – negativní, žlutě – hraniční, fialově – nezpracováno.

4.7 Souhrnný přehled provedených testů

V následující tabulce jsou uvedena souhrnná data o počtech všech provedených testů stanovení protilátek proti klíšťové encefalitidě za kalendářní rok 2014. Data jsou rozdělena podle jednotlivých kalendářních měsíců a dále členěna dle získaného nálezu na pozitivní, negativní, hraniční a nezpracováno. V pravém sloupečku jsou jednotlivé součty za každý měsíc a v posledním řádku součty provedených testů za celý rok (viz tabulka č.2).

Měsíc	Hodnota	mok IgM	sérum IgG	sérum IgM	Celkový počet testů
Leden	pozitivní	0	1	0	1
	negativní	9	29	29	67
Únor	pozitivní	0	1	0	1
	negativní	3	25	25	53
Březen	pozitivní	0	5	0	5
	negativní	9	44	44	97
Duben	pozitivní	0	4	1	5
	negativní	7	64	64	135
Květen	pozitivní	0	13	1	14
	negativní	11	97	101	209
Červen	pozitivní	0	15	3	18
	negativní	7	112	121	240
Červenec	pozitivní	1	23	6	30
	negativní	12	171	181	364
	nezpracováno	0	3	3	6
Srpen	pozitivní	0	51	14	65
	hraniční	0	1	2	3
	negativní	13	110	143	266
Září	pozitivní	1	157	25	183
	hraniční	0	0	1	1
	negativní	16	0	128	144
Říjen	pozitivní	0	133	17	150
	negativní	7	0	109	116
Listopad	pozitivní	0	54	11	65
	negativní	8	0	38	46
Prosinec	pozitivní	0	38	7	45
	negativní	4	0	28	32
Celkový počet testů		108	1151	1102	2361

Tabulka č. 2: Souhrnný přehled provedených testů v průběhu roku 2014.

4.8 Postvakcinační výskyt protilátek IgG

V roce 2014 jsem provedla vyšetření celkem 54 vzorků na průkaz IgG protilátek pro posouzení stavu protektivní imunity proti KE. Testovaný soubor obsahoval materiál od pacientů ve věkovém rozmezí 5 až 74 let. (viz tabulka č. 3).

2014	Leden	Únor	Březen	Duben	Květen	Červen	Červenec	Srpen	Září	Říjen	Listopad	Prosinec	celkem
Testů	1	2	6	2	8	5	5	4	4	7	7	3	54

Tabulka č. 3: Postvakcinační výskyt protilátek IgG.

V následující tabulce uvádím podrobný přehled naměřených hladin IgG protilátek. Méně než 18 jednotek (negativní hodnocení) bylo prokázáno u 9 pacientů. Hraniční hodnota (18 – 22 jednotek) vyšla ve dvou případech a pozitivní nález protilátek proti viru klíšťové encefalitidy byl zaznamenán ve vzorcích séra od 43 pacientů.

titr U/ml	0-17	18-22	23-30	31-50	51-70	71-90	91-110	111-130	131-150	151-170	171-200	celkem
počet pacientů	9	2	2	8	1	4	4	2	6	6	10	54

Tabulka č. 4: Postvakcinační výskyt protilátek IgG. Počty pacientů rozdělené podle hladiny protilátek. 0 – 17 U/ml negativní nález, 18 – 22 U/ml hraniční hodnoty, 23 – 200 U/ml pozitivní nález IgG protilátek proti KE.

4.9 Stanovení avidity IgG protilátek

V průběhu roku 2014 jsem provedla test na stanovení avidity IgG protilátek proti viru klíšťové encefalitidy u sedmi vzorků. Podrobnosti k dosaženým výsledkům uvádím v následující tabulce č. 5.

Měsíc kdy jsem provedla vyšetření	Pohlaví pacienta	Věk pacienta	Klinická diagnóza	Předchozí stanovení IgG protilátek (U/ml)	Předchozí stanovení IgM protilátek (U/ml)	Index avidity IgG protilátek
Květen	žena	11 let	R509	200/160	8,6/1,8	92 %
Červen	žena	73 let	A879	180/180/170	1,5/1,2/1,5	74 %
Červen	muž	41 let	A879	200/180	1,8/1,8	94 %
Srpen	muž	67 let	R51	negativní/140	negativní/negativní	70 %
Srpen	žena	33 let	R51	150	1,2	67 %
Září	žena	11 let	R51	200	1,9	93 %
Říjen	žena	45 let	R509	170/200	1,5/1,6	100 %

Tabulka č. 5: Stanovení avidity IgG protilátek u jednotlivých pacientů. Procentuální vyjádření pevnosti vazby IgG. Méně než 30% nízká avidita, 31 – 40 % nejednoznačný nález, 41 – 100 % vysoká avidita.

Diagnózy: R509 Horečka NS, A879 Virová meningitida NS, R51 Bolest hlavy NS.

5 DISKUSE

Ve své bakalářské práci jsem zpracovala vzorky sér a moků, které byly zaslány ke stanovení protilátek proti klíšťové encefalitidě metodou ELISA na Pracoviště virologie Nemocnice České Budějovice, a.s. v období od ledna do prosince roku 2014. Následně jsem vyhodnotila získané výsledky.

Distribuce vzorků v průběhu roku je zřejmá z dat v grafu číslo 2. Nejvíce požadavků na průkaz protilátek proti klíšťové encefalitidě bylo zasláno ke zpracování v měsících červenci (210 požadavků), srpnu (176 požadavků), září (174 požadavků) a říjnu (141 požadavků). Z toho vyplývá, že onemocnění má sezónní charakter, což potvrzují i publikované poznatky. Na tuto skutečnost poukazují i výsledky práce autorů Daniela a kolektivu z roku 2009, jejichž výzkum je zaměřen na změny meteorologických faktorů, zejména pak na analýzu vlivu krátkodobých meteorologických změn během vegetačního období a na výskyt klíšťové encefalidity v České republice (Daniel et al., 2009).

Na Slovensku se podobnému problému věnoval kolektiv Lukan, Bullova a Petko, kteří ve svém článku o oteplování klimatu a klíšťové encefalitidě na Slovensku publikovali poznatky o výskytu onemocnění KE v závislosti na nadmořské výšce, teplotě, a vlhkosti (Lukan et al., 2010). Z dostupných informací je zřejmé, že toto onemocnění přímo souvisí s aktivitou klíšťat, která je závislá na teplotě a vlhkosti prostředí. Obvykle se jedná o dvouvrcholovou křivku v průběhu léta. Podle získaných výsledků v naší laboratoři byla v roce 2014 křivka výskytu jednovrcholová, což by mohlo souviset s chladnými letními měsíci na začátku léta.

Z celkového počtu 1264 vzorků bylo testováno 51 % mužů a 49 % žen (graf číslo 3). Věku nad 50 let dosáhlo 371 pacientů, což představuje přibližně 30 % testovaných osob. Tato data ukazují celkový počet testovaných osob, které vyhledaly lékaře s klinickými příznaky onemocnění, s podezřením na onemocnění klíšťovou encefalidou po přísátí klíštěte nebo z epidemiologických důvodů (posouzení imunity po očkování). Podle dostupných informací bylo v roce 2014 v České republice hlášeno 410 případů onemocnění KE [zdroj www.szu.cz]. Jihočeský kraj se na tomto čísle podílel 15 %.

Stanovení IgM protilátek ve vzorcích sér bylo provedeno u celkem 1099 vzorků z celkového počtu 1102 požadavků (3 vzorky byly z testování vyřazeny po telefonické domluvě s požadujícím oddělením z důvodu duplicity odběru). Z tohoto souboru bylo 1011 sér negativních na přítomnost IgM protilátek proti viru klíšťové encefalidity, tři vzorky měly hraniční hodnotu a u 85 vzorků byla prokázána pozitivní hladina protilátek. Následně byly vzorky s hraničním výsledkem vyšetřeny opakovaně z nového odběru. U těchto pacientů byla potvrzena přítomnost infekce, byla detekována významná hladina IgM protilátek. Ve věkové kategorii nad 55 let tvořil záchyt 25 % (21 osob). Jedná se pravděpodobně o dočasnou nebo lokální situaci, protože v dlouhodobém přehledu od roku 2004 do roku 2013 je uváděno vyšší procentuální starší generace (Lexová et al., 2014), než vyplynulo z dat získaných na našem pracovišti.

K průkazu protilátek IgM proti viru klíšťové encefalitidy v mozkomíšním moku bylo zasláno 108 vzorků. Paralelně bylo vyšetřeno i 90 sér. Osmnáct moků bylo zasláno bez požadavku na vyšetření séra. Sedm vzorků moku mělo paralelně pozitivní serologii (IgM, IgG), 28 pacientů mělo v paralelně vyšetřeném moku a séru pozitivní pouze IgG protilátky v séru a 55 pacientů mělo zároveň negativní průkaz protilátek proti KE v moku i v séru. Pozitivní nález protilátek v moku byl průkazný pouze u dvou testovaných vzorků (viz tabulka č. 1). Bohužel z takto malého počtu vyšetřených moků se serologickým nálezem odpovídajícím akutní infekci nelze vyvozovat jednoznačné závěry. I když se v odborné literatuře uvádí, že protilátky proti klíšťové encefalitidě, vyskytující se v časně fázi infekce v mozkomíšním moku, mohou být produktem intrathekální syntézy, mohou pocházet z krve při jejím průniku přes porušenou hematoencefalickou bariéru, nebo mohou případně pocházet z krve, která kontaminuje mozkomíšní mok při odběru (Günther et al., 1997). Domnívám se, že vyšetření většího souboru moků od pacientů se serologickým obrazem akutní KE v krvi by přineslo jistě zajímavé a pro klinickou praxi důležité poznatky.

Ke zhodnocení postvaccinační imunity bylo v průběhu roku 2014 na naše pracoviště zasláno 54 vzorků krve, u kterých bylo požadováno pouze stanovení IgG protilátek proti viru klíšťové encefalitidy (viz tabulka číslo 3). Nejčastěji byla séra zasílána v květnu a v říjnu. Tato skutečnost zobrazuje zájem populace o očkování a obecnou povědomost o sezónním charakteru onemocnění. Z celkového počtu 54 testovaných vzorků od osob ve věkovém rozmezí 5 až 74 let bylo pouze 8 vzorků (15 %) od osob starších než 55 let. To odráží obecně nedostatečně aktivní přístup k vlastnímu zdraví u starší populace (Kříž and Šebestová, 2014). Pro letní měsíce je indikováno zrychlené očkovací schéma. Dle doporučení výrobce diagnostické soupravy bylo 9 vzorků hodnoceno jako negativní a dva výsledky prokázaly hraniční nález protilátek. Ve 43 vzorcích byla prokázána sérokonverze protektivních protilátek s různou hladinou IgG (viz tabulka číslo 4). Tyto hodnoty jsou orientační a výrobce vakcíny neuznává výsledek vyšetření jako důvod ke změně daného očkovacího schématu. V tomto smyslu laboratoř informuje i ošetřujícího lékaře a záleží na něm a na pacientovi, k jakému postupu se přikloní.

Stanovení avidity IgG protilátek bylo ve sledovaném období provedeno pro infekční oddělení (6x) a pro nervové oddělení (1x). Test slouží k diagnostice onemocnění v případě, že laboratorní testy neodpovídají klinickému stavu pacienta. Většinou jde o nález vysokých hladin IgG a nízkých hladin IgM bez známek vývoje v čase při přetrvávání klinických obtíží pacienta (viz tabulka číslo 5). U všech pacientů jsem po provedeném testu vypočítala vysoký index avidity IgG protilátek proti viru klíšťové encefalitidy, svědčící pro stav po prodělaném onemocnění nebo po vakcinaci proti klíšťové encefalitidě. Interpretace výsledku vyšetření doplněného o stanovení avidity má vyšší validitu. Má velký význam zejména u atypického průběhu infekce, atypické protilátkové odpovědi a v diagnostice onemocnění u očkovaných (Zelená et al., 2015b). Toto vyšetření ve sledovaném období pomohlo upřesnit sérologickou diagnostiku klíšťové encefalitidy.

6 ZÁVĚR

Cílem bakalářské práce bylo stanovení jednotlivých tříd protilátek proti klíšťové encefalitidě metodou ELISA ve vzorcích od pacientů zaslanych k vyšetření na Pracoviště virologie Nemocnice České Budějovice, a. s. v průběhu kalendářního roku 2014 a zhodnocení jeho přínosu pro diagnostiku onemocnění a posouzení stavu imunity po vakcinaci.

Hypotéza H1 předpokládala významnou úlohu metody ELISA v laboratorním stanovení protilátek proti klíšťové encefalitidě a tím v diagnostice onemocnění. Na základě výsledků mohu tvrdit, že toto vyšetření má pro lékaře indikující testování přítomnosti protilátek IgM a IgG význam, jak pro správnou diagnostiku onemocnění, tak pro posouzení stavu imunity po vakcinaci. Laboratorní metoda je relativně rychlá a podmínky vyhodnocení testu jsou výrobcem jednoznačně dané. Částečná automatizace za použití laboratorních přístrojů metodu dále zjednodušuje. Tato hypotéza byla potvrzena.

Hypotéza H2 předpokládala, že doplnění diagnostiky o stanovení avidity IgG protilátek má vyšší výpovědní hodnotu v diagnostice sporných případů než vyšetření hladiny těchto protilátek bez stanovení jejich avidity. Z celkového počtu sedmi jednotlivých vzorků se vždy jednalo o pacienty s nejednoznačnou protilátkovou odpovědí, kdy indikující lékař požadoval vyšetření, které by určilo, zda se jedná o akutní onemocnění, nebo o protilátky přetrvávající po již dříve prodělanou infekci či po vakcinaci. Ve všech případech byl výpočtem stanoven index avidity svědčící pro výskyt anamnestických protilátek, nikoliv pro akutní onemocnění. Hypotéza H2 byla tímto potvrzena.

Hypotéza H3 předpokládala, že většina očkované populace má IgG protilátky proti klíšťové encefalitidě. Z námi vyšetřené skupiny bylo 80 % osob pozitivních, 17 % negativních a 3 % s hraničním nálezem. Z dosažených výsledků vyplývá, že tato hypotéza se potvrdila.

7 SEZNAM OBRÁZKŮ, GRAFŮ A TABULEK

7.1 Seznam obrázků

Obrázek č. 1: Ředění vzorků.....	27
Obrázek č. 2: Destička s naředěnými vzorky.....	27
Obrázek č. 3: Inkubátor BIOSAN.....	28
Obrázek č. 4: Promývačka Hydro Flex TECAN.....	28
Obrázek č. 5: Destička s nakapaným IgG konjugátem.....	29
Obrázek č. 6: Reakce s chromogenním substrátem.....	29
Obrázek č. 7: Zastavení reakce.....	30
Obrázek č. 8: Spektrofotometr BIOTEK (ELISA reader).....	30
Obrázek č. 9: Naředění vzorků – mozkomíšní mok.....	32
Obrázek č. 10: Vzorky a kontroly v destičce.....	32
Obrázek č. 11: Přidání IgM konjugátu.....	34
Obrázek č. 12: Reakce s chromogenním substrátem.....	34
Obrázek č. 13: Zastavení reakce.....	35
Obrázek č. 14: Vyhodnocení změřených hodnot počítačovým programem.....	35

7.2 Seznam grafů

Graf č. 1: Počty vyšetření protilátek proti KE v závislosti na žadateli o vyšetření....	39
Graf č. 2: Počty požadavků na vyšetření protilátek proti KE podle měsíců.....	40
Graf č. 3: Rozdělení požadovaných vyšetření podle věku a pohlaví.....	41
Graf č. 4: Pozitivní a negativní výsledky stanovení anti-IgM protilátek v mozkomíšním moku.....	42
Graf č. 5: Pozitivní a negativní výsledky stanovení anti-IgM v séru.....	43
Graf č. 6: Pozitivní a negativní výsledky stanovení anti-IgG protilátek v séru.....	44

7.3 Seznam tabulek

Tabulka č. 1: Hodnocení nálezu IgM protilátek proti KE v mozkomíšním moku s ohledem na nález IgM protilátek v séru.....	42
Tabulka č. 2: Souhrnný počet provedených testů.....	45
Tabulka č. 3: Postvakcinační výskyt protilátek IgG – měsíčně.....	46
Tabulka č. 4: Postvakcinační výskyt protilátek IgG – hodnoty.....	46
Tabulka č. 5: Stanovení avidity IgG protilátek.....	47

8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- ANON, 2015. *KFR (komplement fixační reakce)* [cit.2015-03-26]. Dostupné z: <http://labmet.zshk.cz/vyuka/KFR-komplement-fixacni-reakce.aspx>
- AMATO-GAUCI, Andrew and Herve ZELLER, 2012. Tick-borne encephalitis joins the diseases under surveillance in the European Union. *Eurosurveillance*. 17(42):20299. Dostupné z: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20299>
- BARRET, Noel P., Susanne SCHOBER-BENDIXEN and Hartmut J. EHRLICH, 2003. History of TBE vaccines. *Vaccine*. 21(suppl 1): 41-49. DOI: 10.1016 / S0264-410X (02) 00814-9.
- BEDNÁŘ, Marek et al., 1996. *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie*. Vyd. 1. Praha: Marvil, 558 s. ISBN 80-238-0297-6.
- BENEŠ, Jiří, 2009. *Infekční lékařství*. 1. vyd. Praha: Galén. ISBN: 978-80-7262-644-1.
- DANIEL, Milan et al., 2009. Changes of meteorological factors and tick-borne encephalitis incidence in the Czech Republic. *Epidemiologie, mikrobiologie, imunologie*. 58(4):179-187. ISSN 1210 – 7913.
- DANIELOVÁ, Vlasta et al., 2008. Influence of climate warming on tickborne encephalitis expansion to higher altitudes over the last decade (1997-2006) in the Highland Region (Czech Republic). *Central European Journal of Public Health*. 16(1):4-11.
- EPIDAT, *Informační systém*. [cit.2015-03-26]. Dostupné z: <http://www.szu.cz/publikace/data/infekce-v-cr>
- FOWLER, Asa et al., 2013. Tick-borne encephalitis carries a high risk of incomplete recovery in children. *Journal of Pediatrics*. 163(2): 555-560. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpeds.2013.01.037>.
- GÜNTHER, Göran et al., 1997. Intrathecal IgM, IgA and IgG antibody response in tick-borne encephalitis. Long-term follow-up related to clinical course and outcome. *Clinical and Diagnostic Virology*. 8(1):17-29. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0928-0197\(97\)00273-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0928-0197(97)00273-0)
- HEINZ, Franz X., 1986. Epitope mapping of flavivirus glycoproteins. *Advances In Virus Research Impact Factor*. 31:103-68.

- HOLZMANN, Heidemarie. Diagnosis of tick-borne encephalitis. *Vaccine*. 2003;21 Suppl 1:S36-40. DOI: 10,1016 / S0264-410X (02) 00819-8.
- HOLZMANN, Heidemarie et al., 2009. Tick-borne encephalitis from eating goat cheese in a mountain region of Austria. *Emerging Infectious Disease journal*. 15(10):1671-1673. DOI: 10,3201 / eid1510.090743.
- CHMELAŘ, Jindřich et al., 2012. Tick salivary secretion as a source of antihemostatics. *Journal of Proteomics*. 16;75(13):3842-54. DOI: 10,1016 / j.jprot.2012.04.026.
- CHMELÍK, Váckav et al., 2004. Quality of Life after Tick Borne Encephalitis. ECCMID Praha 1.- 4.5.2004 P1418 abstract in *Clinical Microbiology and Infection*. 10, Supplement 3, 2004, p. 397.
- KŘÍŽ, Bohumír et al., 2012. Epidemiology of tick-borne encephalitis in the Czech Republic 1970-2008. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. 12(11):994-999. DOI: 10,1089 / vbz.2011.0900.
- KŘÍŽ, Bohumír and Helena ŠEBESTOVÁ, 2014. Tick-borne encephalitis, 2013 EPIDAT data analysis. *Zprávy CEM (SZÚ, Praha)* 23(7):254-258. ISSN 1804 – 8668.
- KUNZ, C. and H. HOFMANN, 1971. Early diagnosis of tick-borne encephalitis in the hemagglutination-inhibition-test by treatment of serum with 2 mercaptoethanol. *Zentralblatt für bakteriologie*. Orig A. 218(3):273-9.
- LEXOVÁ, Pavla et al., 2014. The incidence of transmissible infections in the Czech Republic in 2013 and its trend in the last decade. *Zprávy CEM (SZÚ, Praha)* 23(7):248-245. ISSN 1804 – 8668.
- LINDQUIST, Lars and Olli VAPALAHTI, 2008. Tick-borne encephalitis. *The Lancet*. 317(9627):1861-71. DOI: 10,1016 / S0140-6736 (08) 60800-4.
- LITZBA, 2014. Nadine et al. Evaluation of different serological diagnostic methods for tick-borne encephalitis virus: enzyme-linked immunosorbent, immunofluorescence, and neutralization assay. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. 14.2: 149-159. DOI: 10,1089 / vbz.2012.1287.
- LUKAN, Martin, Eva Bullova and Branislav Petko, 2010. Climate warming and tick-borne encephalitis, Slovakia. *Emerging Infectious Diseases*. 16(3):524-526. DOI: 10,3201 / eid1603.081364.
- MANDAL, Christian, W., 2005. Steps of the tick-borne encephalitis virus replication cycle that affect neuropathogenesis. *Virus Research*. 111(2):161-74. DOI: 10,1016 / j.virusres.2005.04.007

- MANSFIELD, Karen L. et al., 2009. Tick-borne encephalitis virus - a review of an emerging zoonosis. *Journal of General Virology*. 90(Pt 8):1781-94. DOI: 10,1099 / vir.0.011437-0.
- PAULUS, Martin and Daniel RŮŽEK, 2013. Klíšťová encefalitida – stále více otazníků než jasných odpovědí. *Vakcinologie* 4/2013 158 s. ISSN 1802-3150.
- PETRÁŠ, Marek, 2007 Očkování proti klíšťové encefalitidě. *Medicina pro praxi*. 3:100-101.
- PETRÁŠ, Marek and Ivana K. LESNÁ, 2010. *Manuál očkování 2010*, 3. vydání, leden 2010 ©Marek Petráš, pp 311-332
- PRYMULA, Roman, et al., 2007. Klíšťová meningoencefalitida a současné možnosti očkování. *Vakcinologie*. 1:18-27.
- ROSTASY, Kevin, 2012. Tick-borne encephalitis in children. *Wiener Klinische Wochenschrift*. 162 (11-12): 244-247. DOI: 10,1007 / s10354-012-0101-4.
- RŮŽEK, Daniel et al., 2009. CD8+ T-cells mediate immunopathology in tick-borne encephalitis. *Virology*. 384(1):1-6. DOI: 10,1016 / j.virol.2008.11.023
- RŮŽEK, Daniel, Gerhard DOBLER and Oliver Donoso MANTAKE, 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.
- RŮŽEK, Daniel et al., 2011. Breakdown of the blood-brain barrier during tick-borne encephalitis in mice is not dependent on CD8+ T-cells. *PLoS One*. 6(5):e20472. DOI: 10,1371 / journal.pone.0020472
- RŮŽEK, Daniel et al. *Klíšťová encefalitida*. [v tisku 2015]
- SPC FSME IMMUN, datum poslední revize textu: 27. 1 .2014
- SPC Encepur, datum poslední revize textu: 20. 3. 2013
- Votava, Miroslav et al., ©2010. *Lékařská mikrobiologie - vyšetřovací metody*. Brno: Neptun, 495 s. ISBN 978-80-86850-04-7.
- VOTAVA, Miroslav, 2003. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun, 495 s. ISBN 80-902896-6-5.
- ZELENÁ, Hana, Jan RASZKA and Jiří JANUŠKA, 2015a. *Laboratorní diagnostika klíšťové encefalidity a dalších flavivirových neuroinfekcí*. Zdravotní ústav se sídlem v Ostravě. [cit. 2015-04-29]. Dostupné z: http://www.vidia.cz/images/stories/ke_stazeni/lab_%20diagn_%20kl_encef_%20a_dal_sich_flavivirov_inf.pdf

- ZELENÁ, Hana, Jiří JANUŠKA and Jan RASZKA, 2015b. *Stanovení avidity IgG protilátek v diagnostice klíšťové encefalitidy*. Zdravotní ústav se sídlem v Ostravě. [cit. 2015-04-29]. Dostupné z:
http://www.zuova.cz/Content/files/nrl/arboviry/stanoveni_avidity_igg_protilatek_v_diagnostice_klistove_encefalitidy.pdf