



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Sciences

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

PCR diagnostika *Neoehrlichia mikurensis*

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program:

**SPECIALIZACE VE ZDRAVOTNICTVÍ / ZDRAVOTNÍ
LABORANT**

Autor: Pavlína Čížková

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

České Budějovice 2019

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou/diplomovou práci s názvem „PCR diagnostika *Neoehrlichia mikurensis*“ jsem vypracoval/a 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/diplomové práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé bakalářské/diplomové práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 16.4.2019

.....

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat paní Ing. Miroslavě Burýškové, PhD., za trpělivý přístup při provádění praktické části mé bakalářské práce a za velikou podporu, panu Doc. RNDr. Ladislavu Burýškovi, PhD., za výběr zajímavého tématu, obětavost při častých konzultacích a umožnění provádět výzkum v jeho laboratoři Protean s.r.o. V poslední řadě chci poděkovat rodině a příteli za podporu a trpělivost.

PCR diagnostika *Neoehrlichia mikurensis*

Abstrakt

Tato bakalářská práce se zabývá vývojem nové diagnostické metody na stanovení bakterie *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* v klíšťatech. Nová metoda byla vyvinuta na základě nedostupnosti vhodné diagnostické metody *N. mikurensis*, a také z důvodu nedostatečně přesných údajů o promořenosti klíšťat patogenem *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* v odborné literatuře. V teoretické části se zabývám obecnými informacemi o klíšťatech a jimi přenášenými chorobami, které mohou být bakteriálního, virového či protozoálního původu. Onemocnění, která jsou v této práci popsána, jsou borelióza, klíšťová encefalitida, ehrlichioza, bartonelóza, tularémie a babesióza. Zvláštní pozornost je věnována nově detekovanému původci neoehrlichiozy. Při vývoji nové diagnostické metody bylo využito velké množství laboratorních technik, jako je polymerázová řetězová reakce (PCR), klonování, sekvenování a elektroforéza v agarózovém gelu (ELFO). Tyto metody jsou doplněny velkým množstvím rozdílných laboratorních postupů, jako je izolace DNA, minipreparace plazmidové DNA, přečištění DNA z gelu a příprava bakteriálního zásobního roztoku. Statistické vyhodnocení bylo provedeno na základě analýzy směsných vzorků po 10 klíšťatech, pomocí metody PCR. Testování proběhlo celkem z 1390 klíšťat v průběhu roku 2018.

Klíčová slova

klíště, infekční choroby, *Candidatus Neoehrlichia mikurensis*, PCR, neoehrlichioza, promořenost klíšťat, výskyt klíšťat

PCR diagnostics *Neoehrlichia mikurensis*

Abstract

This bachelor thesis focuses on the development of a new diagnostic method for the detection of *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* in ticks. The new method was developed based on the unavailability of a suitable diagnostic method of *N. mikurensis* as well as the lack of accurate data about infection frequency of ticks by the pathogen *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* in the scientific literature. In the theoretical part, I deal with general information about ticks and their transmitted diseases, which can be bacterial, viral or protozoal. The diseases described in my bachelor thesis are borreliosis, tick-borne encephalitis, ehrlichiosis, bartonellosis, tularemia and babesiosis. Special attention is dedicated to newly detected causative agents of neoehrlichiosis. Various type of techniques have been used during the development of the new diagnostic method, such as polymerase-chain-reaction (PCR), cloning, sequencing and agarose gel electrophoresis (ELFO). These methods are complemented by a large number of different laboratory procedures, such as DNA isolation, minipreparation of plasmid DNA, gel purification of DNA, and bacterial stock solution preparation. Statistical evaluation was performed based on the analysis of mixed samples of 10 ticks, using the PCR method. A total of 1 390 ticks were tested during 2018.

Key words

tick, infectious diseases, *Candidatus Neoehrlichia mikurensis*, PCR, neoehrlichiosis, tick scale, occurrence of ticks

Obsah

1	Úvod.....	8
2	Cíle práce	8
3	Základní informace o klíšťatech	9
3.1	Vývoj klíšťat	9
3.2	Druhy klíšťat.....	9
3.3	Příjem potravy a způsob přenosu nemocí.....	10
4	Přenášené nemoci.....	11
4.1	Borelióza	11
4.2	Klíšťová encefalitida.....	12
4.3	Ehrlichioza	14
4.4	Babesioza	16
4.5	Tularémie	17
4.6	Bartonelóza	18
4.7	Neohrlichioza.....	20
5	Metodika	23
5.1	Vzorky	23
5.2	Izolace DNA a RNA	23
5.2.1	Postup izolace DNA a RNA.....	24
5.3	PCR diagnostika	25
5.3.1	Příprava vzorku k PCR.....	25
5.3.2	Program v cykleru	26
5.4	Gelová elektroforéza.....	26
5.5	Přechištění DNA z gelu	27
5.6	Sekvence	28
5.7	Kontrola specifčnosti	28
5.8	Klonování standardu	29
5.9	Minipreparace plasmidové DNA	31
5.10	Restrikční analýza	32
5.11	Příprava standardu	33

5.12	Příprava bakteriálního stocku	33
6	Výsledky	34
6.1	Návrh specifických primerů pro <i>Candidatus Neoehrlichia mikurensis</i>	34
6.2	Screening vzorků klíšťat	34
6.2.1	Sekvenace.....	35
6.3	Příprava standardu	37
6.4	Kontrola specifčnosti primerů	37
6.5	Screening vzorků a statistické vyhodnocení promořenosti klíšťat patogenem <i>Candidatus Neoehrlichia mikurensis</i> za rok 2018.....	38
7	Diskuze.....	41
8	Závěr	43
9	Zdroje	44
9.1	Internetové zdroje	48

1 Úvod

Klíšťaty přenášených onemocnění je celá řada. Mezi nejvíce se vyskytující patogeny patří borelie a virus klíšťové encefalitidy. V poslední době se však ukazuje, že klíšťata přenáší spoustu dalších patogenů, které mohou způsobit vážné zdravotní komplikace. Nejvíce ohroženi jsou lidé se sníženou imunitou, ať už se jedná o autoimunitní onemocnění, léčbu při onkologickém onemocnění, po transplantacích, nebo s jinými důvody oslabení imunity.

Nově objevené onemocnění neehrlichioza je způsobeno bakterií *Candidatus Neoehrlichia mikurensis*. Bakterie způsobuje komplikace hlavně pacientům s oslabenou imunitou, a pokud není včas správně diagnostikována a léčena, onemocnění může skončit až smrtí pacienta. Protože toto onemocnění není dosud příliš známo, pacient je často léčen na hematologické problémy, což prodlužuje dobu léčby a léky nezabírají. Údaje o promořenosti infikovaných klíšťat v Evropě se v odborné literatuře velmi liší, pohybuje se mezi 0,1-24,3%.

Z důvodu poměrně vysokého výskytu tohoto onemocnění a nedostatečné diagnostiky se laboratoř Protean rozhodla vyvinout diagnostickou metodu na bakterie *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* v klíšťatech pomocí PCR. V této práci se zabývám vývojem nové diagnostické metody a následně testováním klíšťat na patogen *C. N. mikurensis* pro přesnější stanovení promořenosti klíšťat na území České republiky.

2 Cíle práce

Cílem této bakalářské práce je vývoj diagnostického postupu pro stanovení *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* pomocí PCR. Po vyvinutí metody následuje testování klíšťat na území České republiky v roce 2018 a jejich statistické vyhodnocení promořenosti.

3 Základní informace o klíšťatech

3.1 Vývoj klíšťat

Vývoj klíšťat probíhá ve třech stádiích. Z vajíčka se vylíhne larva, která má 3 páry končetin a je nejprve bezbarvá, poté ztmavne a má barvu jako pozdější stádia. Po prvním sání se larva zahrabe do země, kde dojde k přeměně na nymfu, která má 4 páry končetin a je větší. Nymfa se také jednou nakrmí a opět probíhá přeměna, nyní na dospělého jedince. Samec vyhledá partnerku, oplodní ji a umírá. Úlohou samičky je dostatečně se nakrmit, přičemž zmnohonásobí svoji velikost a naklade až dva tisíce vajíček. (Kimming, c2003)

U klíšťat rodu *Ixodes* je jen jeden gonadotropní cyklus. Samice se jednou nakrmí a poté produkuje vajíčka. Samec krmení ke spermatogenezi nepotřebuje. (Sonenshine, 2014)

3.2 Druhy klíšťat

Klíšťata zařazujeme do říše živočichové, kmene členovci, podkmene klepítkatci, třídy pavoukovci, podrobněji roztoči, čeledi klíšťatovití. (Bednář, 1994), (Kimming, c2003), (Burnie, 2002)

Dnes je celosvětově známo zhruba 860 druhů klíšťat, z toho na území České republiky 11. Většina druhů nepříjde do styku s člověkem, vyskytují se například ve zvířecích norách. Klíšťata mohou přenášet až 80 původců různých onemocnění, což se liší místem výskytu. (Kerles, 2015)

Na území České republiky se nejčastěji vyskytují 3 druhy klíšťat. Nejhojněji je rozšířen druh *Ixodes ricinus* (klíště obecné), který se vyskytuje na celém území, kromě horských oblastí. Dalšími druhy jsou *Dermacentor sp.* a *Haemaphysalis sp.*, které se vyskytují především na jižní Moravě. (Bednář, 1994)



Obrázek číslo 1.A - *Dermacentor sp.*, Obrázek číslo 1.B (URL 1) - *Ixodes ricinus*

3.3 Příjem potravy a způsob přenosu nemocí

Klíšťata si velmi důkladně vybírají místo přisátí. Nejvhodnější místo je v prostředí, kde je vlhko a tenká kůže, například oblast třísel nebo podpaží. Pokožku naruší pomocí tzv. chelicer, které tkáň naříznou. Po umožnění vstupu do pokožky klíště do ranky zabodne tzv. hypostom, který má na svém povrchu mnoho zpětných háčků a slouží tedy k uchycení klíštěte v rance. Při přichycení se začínají slinami vypouštět látky, které tlumí zánětlivou reakci organismu a působí anesteticky, zabraňují krvácení a uvolňují tkáň. Délka sání klíšťat se pohybuje mezi třemi až sedmi dny, délka se liší i momentálním stadiem. Příjem potravy plní dvě funkce. Při vývoji je potřeba krev pro výživu, růst a svlékání. Pro dospělou a oplodněnou samičku je však nezbytná pro tvorbu vajíček, ne pro vlastní růst. (Kerles, 2015), (Kimming, c2003)

K přenosu patogenů na hostitele dochází pomocí slin klíštěte. Vědecké studie nepotvrdily přesný čas, kdy k přenosu od přisátí dochází. U viru klíšťové encefalitidy by mělo k přenosu dojít téměř ihned, virus se ve slinách nachází stále. U bakterií a prvoků dochází k přenosu pravděpodobně déle. Patogen se po přisátí musí dostat nejprve ze střev do slin, poté až do organismu hostitele. Z toho důvodu je přenos infekce odhadován až po několika hodinách či dnech. (Kerles, 2015)

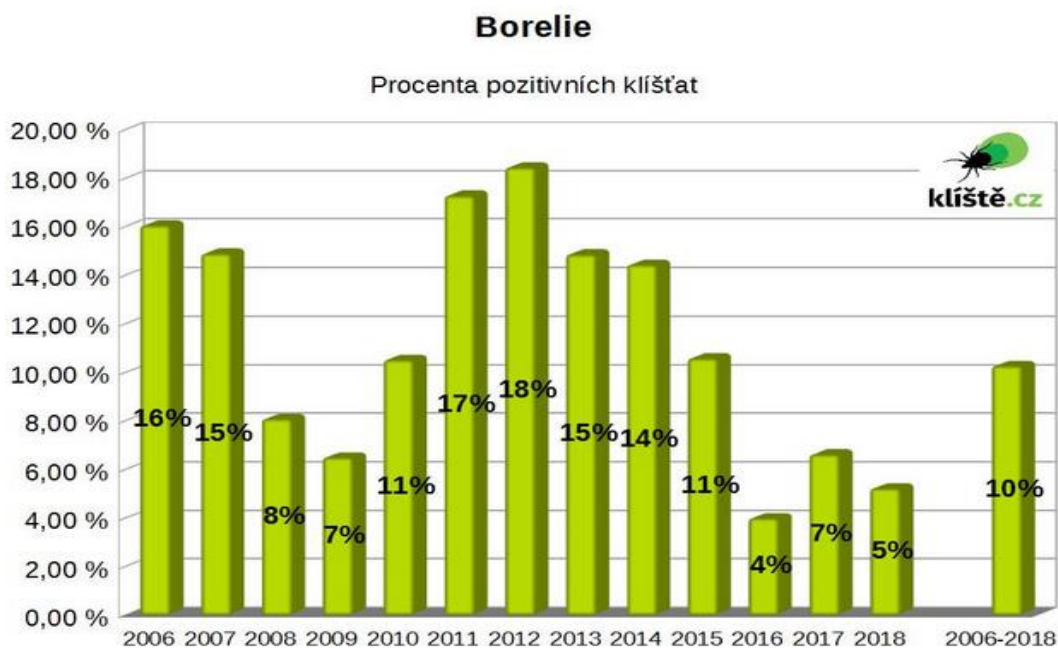
4 Přenášené nemoci

4.1 Borelióza

Patogen

Bakteriální onemocnění s názvem Lymfská borelióza je vyvoláno mikroaerofilní, gramnegativní spirochétou *Borrelia burgdorferi*. Vyznačuje se tenkým, spirálovitě vinutým tvarem o rozměrech 0,2um x 4-30um. Buňky se pohybují rotací kolem své osy, smršťováním či natahováním a pomocí bičíků. Borelie rostou a prodělávají vývoj ve střevě infikovaného klíštěte podle toho, jak hostitel přijímá potravu. Vývoj borelií závisí i na druhu hostitele. Buňky patogenu pronikají skrze střevní stěnu a šíří se krevním oběhem do všech orgánů včetně slinných žláz. Odtud mohou být slinami přeneseny na dalšího hostitele. Pravděpodobnost přenosu onemocnění stoupá s dobou přísátí klíštěte. (Bartůněk, 1996)

Únik borelií před imunitním systémem je zajištěn díky expresi povrchových antigenů Osp. Borelie exprimují i adhezivní molekuly DbpA a B, díky nimž se uchytí v pojivové tkáni. (Křupka, 2009)



Graf číslo 1. (URL 2)

Promořenost na území České republiky v letech 2006-2018 je v průměru 10%.

Příznaky a léčba

Onemocnění probíhá ve třech fázích. V první fázi vzniká zánětlivá reakce, spojená s tvorbou INF-gama. U 70 % případů se tato fáze projeví ve formě erythema migrans, což je červená skvrna na kůži šířící se do okolí. V další fázi dochází k výskytu protilátek třídy IgM specifických k antigenu OspC. Pokud borelie nejsou zničeny imunitním systémem, onemocnění přechází do další fáze. Borelie se šíří z kůže do dalších orgánů, kde způsobují postižení nervového systému, postižení kloubů či kožní projevy. (Křupka, 2009)

Léčba je zahájena pomocí antibiotik, v současnosti se doporučuje doxycyklin v dávce 200 mg denně po dobu 3 týdnů. U některých pacientů mohou potíže přetrvávat i po léčbě antibiotiky. V těchto případech onemocnění přechází do chronické fáze, kdy se začínají objevovat autoimunitní reakce, například artritida, které dále komplikují průběh onemocnění a léčbu. (Křupka, 2009)

Očkovací látka proti borelióze neexistuje. Z tohoto důvodu je důležitá včasná diagnóza a léčba antibiotiky. K diagnostice boreliózy lze využít přímé i nepřímé metody. Mezi přímé metody patří mikroskopie, kultivační metody, PCR analýza z tkáňové biopsie či z krve. Nepřímé metody využívají imunologické metody, založené na principu vazby antigenu a protilátky. Nejčastějším nepřímým testem je metoda ELISA (Roháčová, 2012), která stanovuje protilátky vytvořené proti boreliovým antigenům. V pokročilejší fázi onemocnění se protilátky stanovují v mozkomíšním moku nebo z kloubního punktátu.

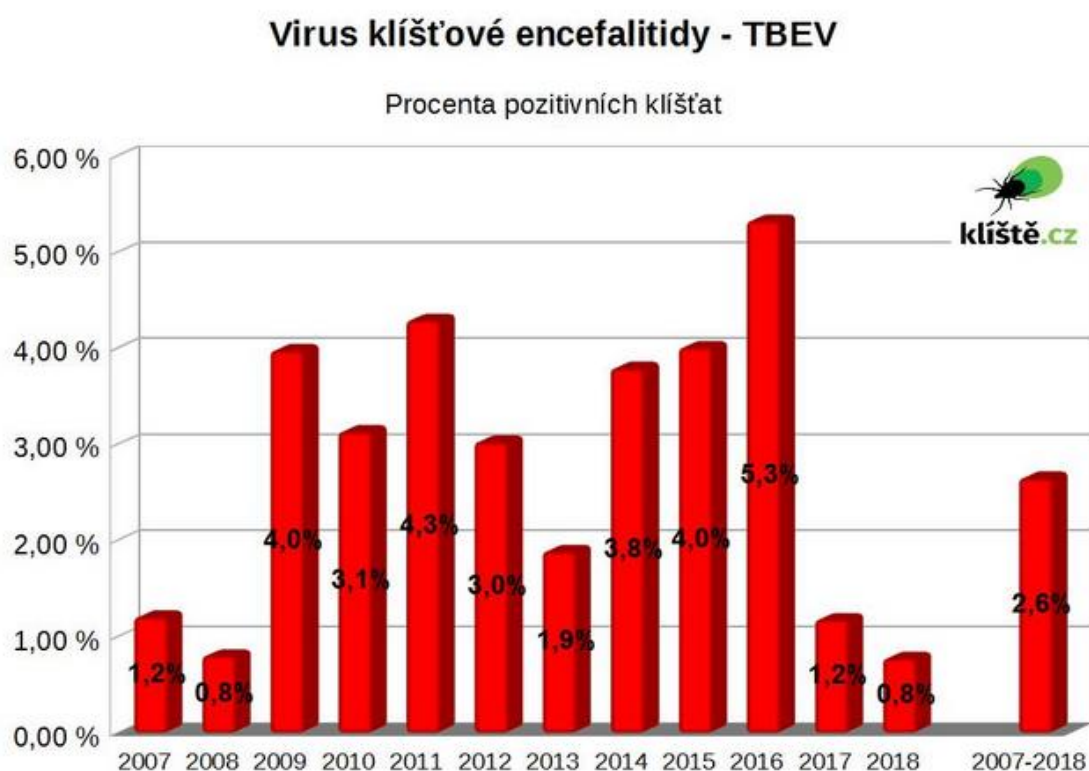
4.2 Klíšťová encefalitida

Patogen

Onemocnění klíšťovou encefalitou bylo prvně popsáno v roce 1931 v Rakousku, virus klíšťové encefalidity (TBEV) byl popsán roku 1937 ruskými vědci. Prvně izolován byl v roce 1948 v tehdejší Československu. TBEV taxonomicky patří do

rodu Flavivirus, čeledi Flaviviridae. Virus je dále členěn na 3 antigenní subtypy: evropský, dálnovýchodní a sibiřský. (Růžek, 2015)

Pacient může být infikován třemi způsoby. Nejčastějším způsobem přenosu infekce je napadení klíštětem, kdy dochází k přenosu viru ze slin klíštěte do podkoží hostitele. Méně časté přenosy jsou při konzumaci infikovaného, tepelně nezpracovaného mléka a mléčných výrobků. Hlavním cílem viru TBEV jsou buňky nervové soustavy, kde dochází k jeho pomnožení.



Graf číslo 2. (URL 2)

Promořenost na území České republiky v letech 2007-2018 je v průměru 2,6%.

Příznaky a léčba

Klíšťová encefalitida má dvoufázový průběh. První, tzv. viremická fáze, připomíná lehkou chřipku. U pacienta se objevují bolesti hlavy, nucení na zvracení, slabost, zvýšení teploty. První fáze trvá zhruba 7-14 dní. Průběh onemocnění bývá mírný, poté

nastává chvíle bez příznaků. V druhé fázi se rozvíjí meningitida, meningoencefalitida či encefalomyelitida. Pacient pociťuje bolest hlavy, zvracení, světloplachost, závratě a vysokou horečku. Může dojít ke komplikacím, a to k zástavě dýchání a srdeční činnosti. Při encefalomyelitické formě může dojít k postižení pažního pletence, které pak vede k obrně. (Růžek, 2015)

K diagnostice TBEV v krvi se využívají sérologické testy. Objevují se IgM protilátky, které lze stanovit pomocí metody ELISA. Protilátky lze detekovat již v druhém týdnu onemocnění. Následně jsou tvořeny protilátky IgG, které přetrvávají u pacienta několik let, zato však doživotně. Pacient, který prodělal klíšťovou encefalitidu, je tedy imunní proti opětovnému napadení. Protilátky lze stanovit i z mozkomíšního moku, ovšem průkaz ze séra je dostačující. Terapie je pouze symptomatická. Pacientovi jsou podávána antipyretika, analgetika, přípravky zaměřené na otok mozku a další. (Roháčová, 2006)

Jako prevenci lze využít očkování proti klíšťové encefalitidě. Očkování probíhá ve třech fázích, poté je nutné každých 3-5 let přeočkování. Hladinu protilátek lze nechat stanovit a podle toho může být přeočkování oddáleno.

4.3 Ehrlichioza

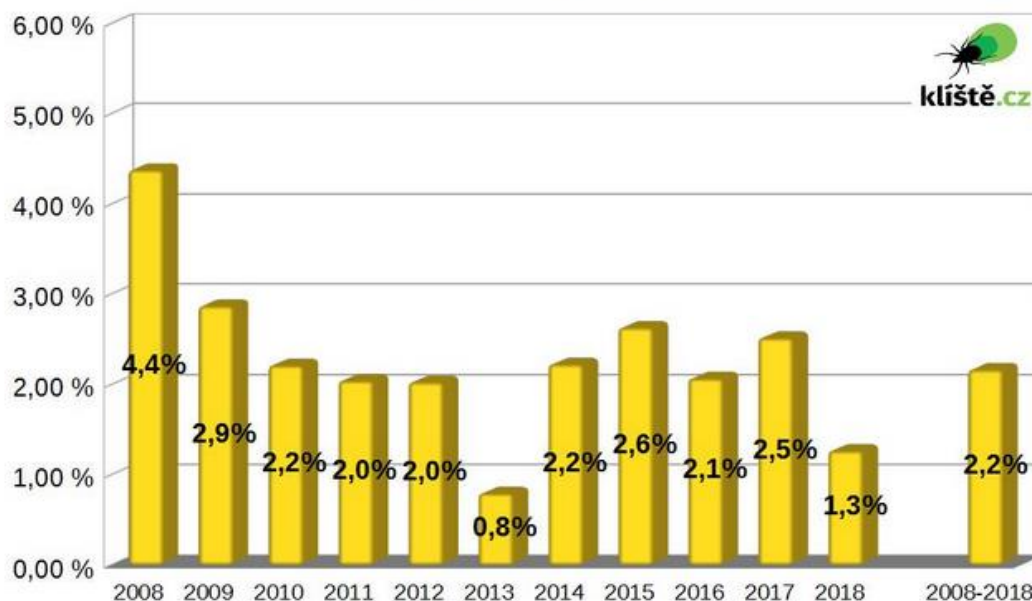
Patogen

Patogen *Anaplasma phagocytophilum* je gramnegativní bakterie, která napadá granulocytární leukocyty. V granulocytech dochází k dělení a tvorbě morul, což jsou kulovité shluky buněk vznikající ve fázi embryogeneze. Dříve byla díky vlastnostem zaměňována s *Ehrlichia equi*. Díky sekvenaci byla *Anaplasma phagocytophilum* v roce 2001 zařazena do řádu Rickettsiales. Rezervoárem pro tuto bakterii jsou hlodavci, člověk je pouze náhodným hostitelem. (Balátová, 2013)

Promořenost na území České republiky v letech 2008-2018 je v průměru 2,2%. (URL 2)

Ehrlichie (*Anaplasma phagocytophila*)

Procenta pozitivních klíšťat



Graf číslo 3. (URL 2)

Příznaky a léčba

První případ ehrlichiozy byl diagnostikován u člověka v roce 1994 v USA.

Klinickými příznaky jsou horečka, bolest svalů a hlavy, postižení trávicího traktu nebo kožní projevy. Z orgánů může bakterie napadat slezinu, lymfatické uzliny, plíce, kostní dřeň, ledviny nebo nervový systém. Onemocnění často probíhá asymptomaticky.

V USA je hlášeno úmrtí pacienta, kdy bylo onemocnění spojeno s oportunní infekcí. (Balátová, 2003), (Mokrejšová, 2013)

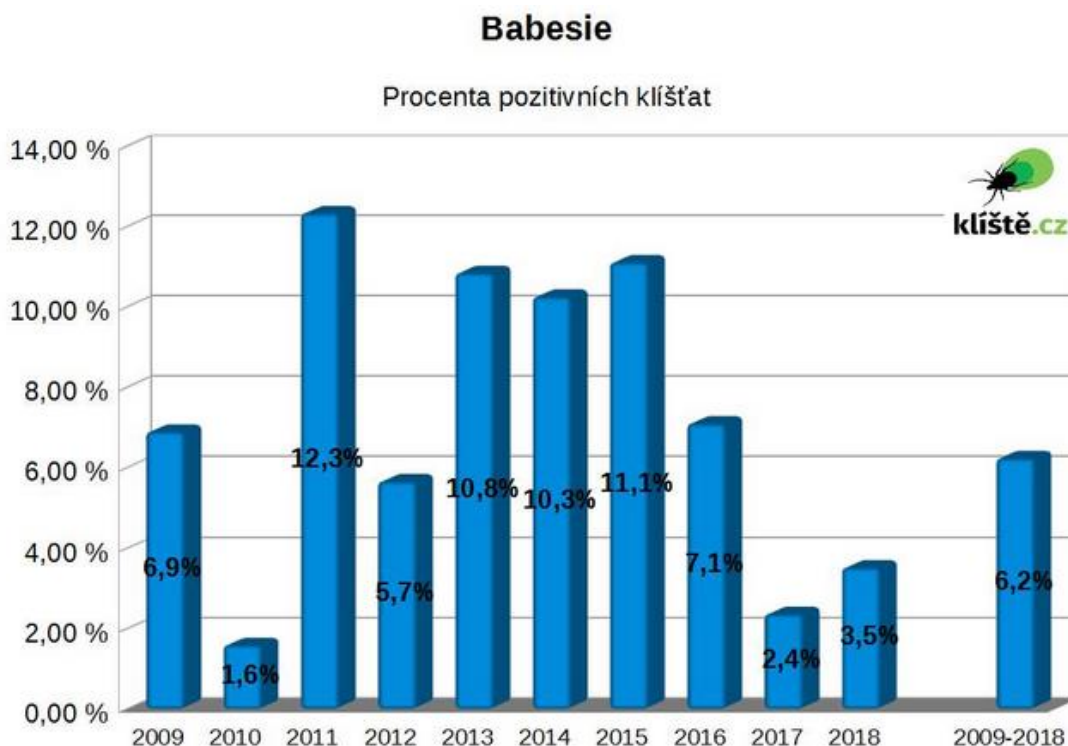
K diagnostice lze využít přímé i nepřímé metody. Nejvíce se využívá metoda na průkaz protilátek IgM a IgG a to nepřímá fluorescence. Další často využívanou metodou k průkazu bakteriální DNA je RT-PCR. (Balátová, 2003)

K terapii se využívají antibiotika Doxycyklin, Rifampin či chloramfenikol. (Balátová, 2003)

4.4 Babesióza

Patogen

Původcem onemocnění jsou *Babesia divergens* a *Babesia microti*. Jedná se o jednobuněčné intracelulární parazity žijící v erythrocytech. Poprvé byla babesie prokázána v roce 1888 u hovězího dobytka. (Bednář, 1994 - str. 200), (Sedlák 2006)



Graf číslo 4. (URL 2)

Promořenost na území České republiky v letech 2009-2018 je v průměru 6,2%.

Příznaky a léčba

Onemocnění se projeví po inkubační době 1-4 týdnů. U pacientů se rozvine systémový průběh s vyčerpaností, úbytkem hmotnosti, teplotou, zimnicí, bolestí svalů, končetin a hlavy. Časté je i zvětšení sleziny. Během babeziózy dochází k hemoglobinurii, anémii a selhání ledvin. U pacientů, kteří měli babeziózu zároveň

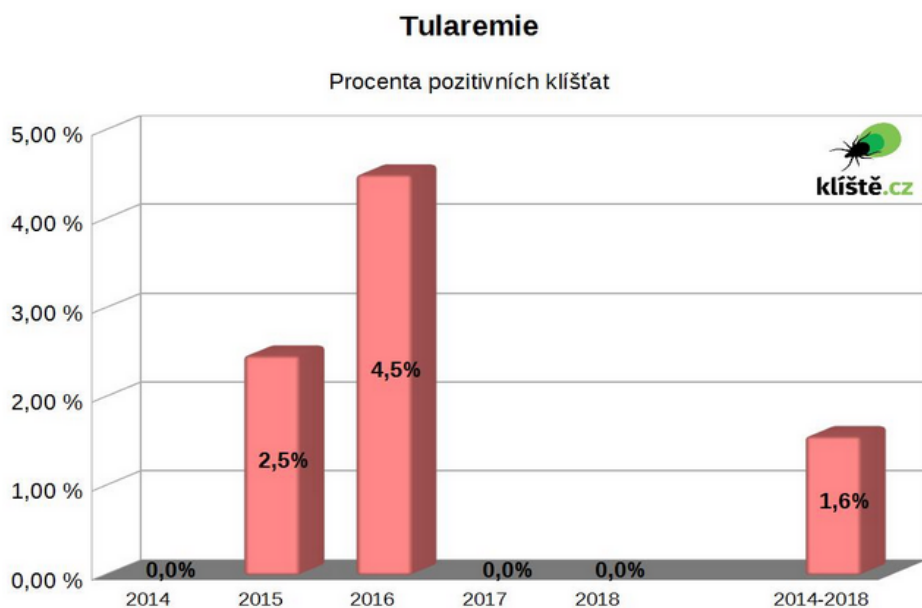
s boreliózou, byl pozorován těžší průběh onemocnění, který v některých případech vedl až k úmrtí. (Roháčová, 2006), (Kimming, 2003 - str. 40-45)

Babeziózu můžeme stanovit z krevního nátěru obarveného metodou Giemsa, kde parazity lze pozorovat v napadených erythrocytech ve stadiu trofozoitů, které mají prstencový až hruškovitý tvar. (Tápal, 2016) K terapii se užívají antibiotika clindamycin společně s chininem. Patogen může v těle přetrvávat až několik měsíců či let i po léčbě antibiotiky, aniž by se projevovaly klinické příznaky.

4.5 Tularémie

Patogen

Tularémii způsobuje patogen *Francisella tularensis*. Jedná se o gramnegativní bakterii, která je velice infekční. Na člověka může být přenesena různými způsoby, například manipulací s nakaženými zvířaty, požitím kontaminovaných potravin nebo kousnutím klíštětem. Prvně byla *Francisella tularensis* objevena v roce 1911 v USA. Hlavními hostiteli jsou hlodavci, králíci a zajáci. V klíštěti se bakterie nachází ve střevě, odkud je pomocí krevního oběhu transportována i do slin. (Petersen, 2009)



Graf číslo 5. (URL 2)

Promořenost na území České republiky v letech 2014-2018 je v průměru 1,6%.

Příznaky a léčba

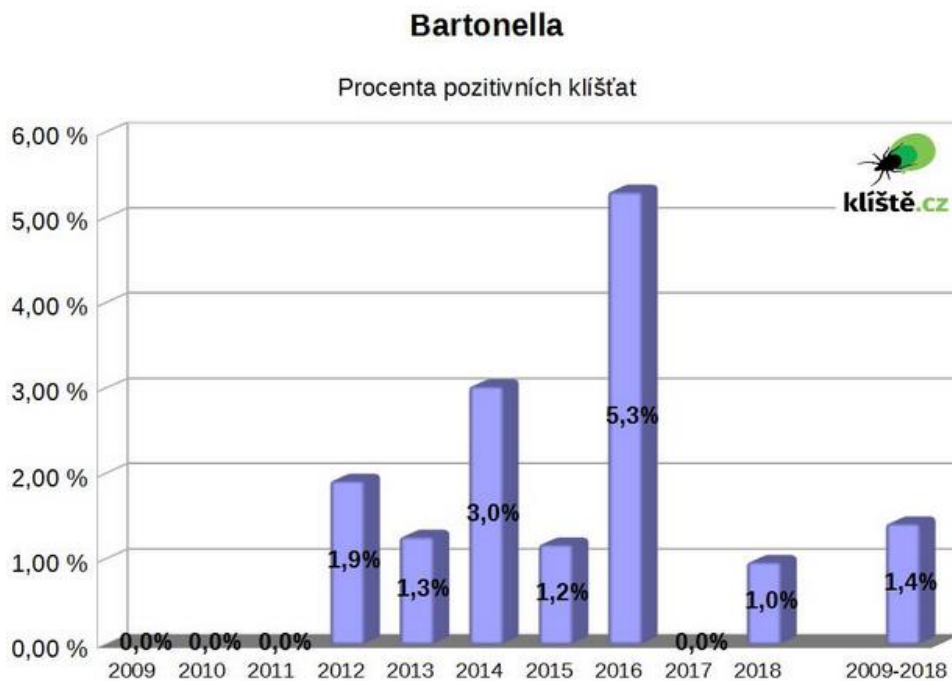
Klinické projevy tohoto onemocnění mohou být různé, liší se podle způsobu nakažení. Po kousnutí klíštětem dochází často v místě vpichu k vytvoření malého, špatně se hojícího vředu. Při vdechnutí bakterie jsou nejprve postiženy plíce, při nákaze kontaminovanou potravou střeva. Následně se bakterie šíří pomocí lymfy a dochází k otokům mízních uzlin. Klinické projevy mohou být velmi vážné, jedná se o vysoké teploty, zduření uzlin, nekrózy jater a sleziny. V případě pozdní léčby může onemocnění přejít do chronické fáze a skončit až smrtí pacienta. Inkubační doba je 4 dny – 3 týdny. (Roháčová, 2006), (URL 3)

Terapie spočívá v podání vhodných antibiotik. Nejúčinnější antibiotika jsou doxycyklin, ciprofloxacin, gentamicin nebo streptomycin. Většina kmenů *Francisella tularensis* je rezistentních k beta-laktamovým antibiotikům.

4.6 Bartonelóza

Patogen

Onemocnění způsobuje patogen rodu *Bartonella*, u nás druh *Bartonella henselae*, což je fakultativní, intracelulární bakterie. (Boulouis, 2005) Může vyvolat onemocnění u lidí i zvířat. Hlavním rezervoárem je kočka. Mezi zvířaty se bakterie přenáší pomocí blech. Hlavním způsobem přenosu na lidi je škrábnutí kočky či přisátí klíštěte. První případ přenosu klíštětem byl prokázán roku 1926. (Cotté, 2008)



Graf číslo 6. (URL 2)

Promořenost na území České republiky v letech 2009-2018 je v průměru 1,4%.

Příznaky a léčba

Onemocnění postihuje většinou osoby se sníženou obranyschopností, pacienti bez sleziny či pacienti žijící ve špatných hygienických podmínkách. První příznaky se objeví za 5-10 dní, v místě vstupu patogenu vznikne charakteristický tmavý útvar podobný strupu. Poté dochází ke zduření okolních uzlin a zvýšení teploty. Dalšími příznaky jsou bolest hlavy, svalů, kloubů, zad a očí. (Beneš, c2009)

Bartonelóza je diagnostikována pomocí vyšetření krevního obrazu, kde je patrný zvýšený počet leukocytů, snížený počet trombocytů, anémie, a v séru zvýšená alkalická fosfatáza. K potvrzení jsou třeba další vyšetření a to průkaz specifických protilátek IgM a IgG, kultivace bakterie z krve, PCR analýza nebo histologické vyšetření. (URL 4)

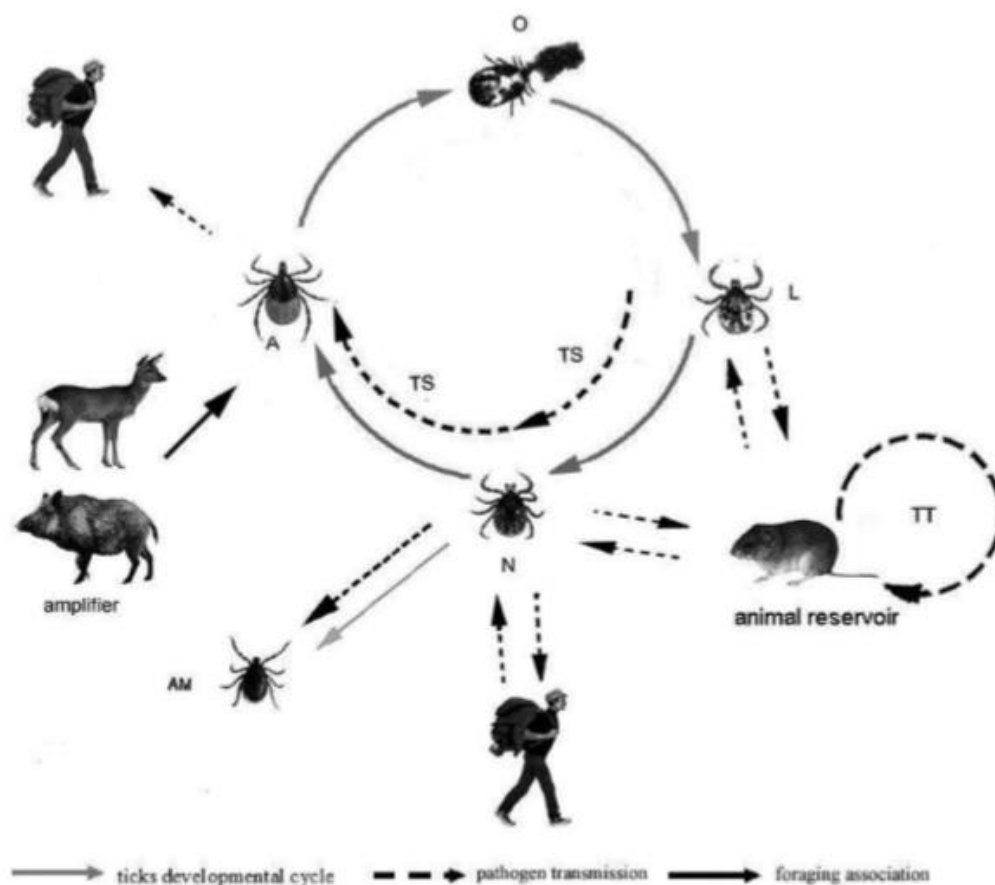
U včasného zachytu nemoci jsou nasazena antibiotika ciprofloxacín, doxycyklin či clarithromycin na 14 dní a je velmi vysoká šance na uzdravení. Léčba se ale může u

imunosuprimovaných pacientů protáhnout až na 12 týdnů. Pokud není včas a správně léčena, může skončit i fatálně. (Beneš, c2009)

4.7 Neohrlichioza

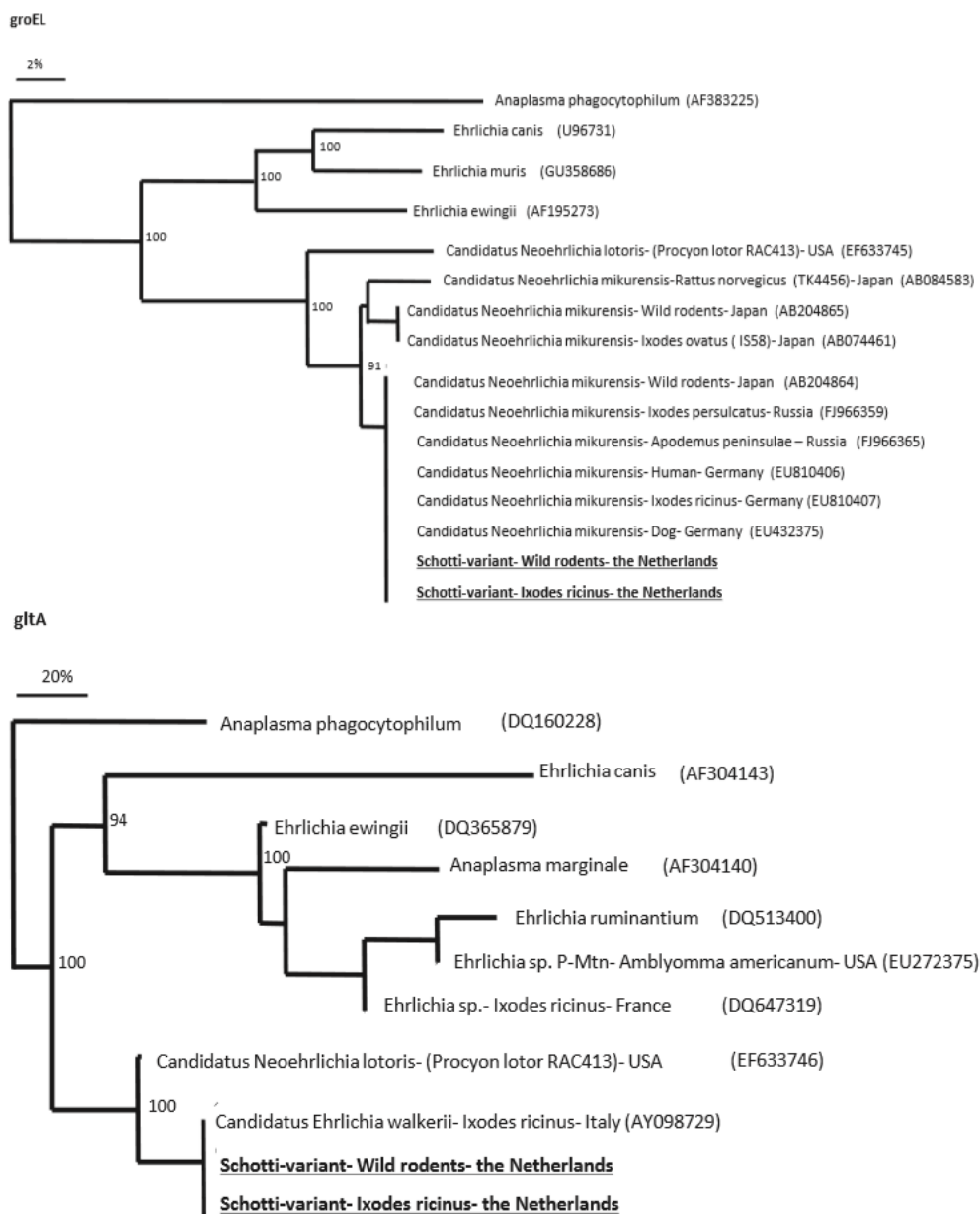
Patogen

Neohrlichioza je nově objevené zoonotické onemocnění přenášené klíšťaty, jehož původcem je *Candidatus Neohrlichia mikurensis* patřící do kmene Proteobacteria, řádu Rickettsiales, čeledi Anaplasmataceae. Podle fylogenetických nálezů je úzce příbuzná s organismem Ehrlichie. (Derdáková, 2014), (Jahfari, 2012)



Obrázek číslo 2. - Možný zoonotický přenos *Candidatus Neohrlichia mikurensis* (Karbowski, 2016)

Rezervoárem pro *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* jsou hlodavci. Z těch je prostřednictvím larev a nymf klíšťat bakterie přenesena na větší zvířata. Z infikovaných hlodavců a následně i savců je opět možný přenos pomocí klíštěte. Klíště bakterie přenáší při sání, které potřebuje pro přeměnu v následující stadium. Člověk tedy může být nakažen od nymfy či dospělé.



Obrázek číslo 3. - Genetická příbuznost *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* a *Anaplasma phagocytophilum* (Jahfari, 2012)

Fylogenetický strom znázorňuje příbuznost jednotlivých druhů.

Candidatus N. mikurensis je gramnegativní intracelulární bakterie o velikosti 0,5-1,5 μm , která napadá endoteliální buňky hostitele. Prvně byla identifikována v roce 2004 v myších na japonském ostrově Mikura. (Kawahara, 2004) Onemocnění bylo popsáno v roce 2010 ve Švédsku, kde onemocněl 77 letý muž s leukémií. (Welinder-Olsson, 2010) V roce 2011 byly zaznamenány dva případy onemocnění v České Republice. Jednalo se o pacienty s hematologickými onemocněními. (Pekova, 2011)

Příznaky a léčba

Nejčastější příznaky neohrličiozy jsou horečka, zimnice, bolest svalů a kloubů, tromboembolické příhody. (Grankvist, 2014) Mezi typické laboratorní výsledky patří zvýšené CRP, leukocytóza a anémie. Definitivní stanovení probíhá pomocí PCR, sérologické testy do dnešní doby nebyly vyvinuty.

Komplikace způsobuje nesprávná diagnóza, kdy je pacient léčen na hematologické onemocnění. V případě podání správných antibiotik dochází k odeznění příznaků velice rychle. V současnosti se pacientovi podává doxycyklin po dobu 3-6 týdnů, optimální délka léčby prozatím nebyla stanovena. (Jahfari, 2017 - str. 57-72)

5 Metodika

Praktickou část své bakalářské práce jsem prováděla v laboratoři Protean s.r.o. v Českých Budějovicích. Pracovala jsem pod odborným dohledem vedoucí laboratoře paní Ing. Miroslavy Burýškové, PhD.

5.1 Vzorky

Klíšťata jsou posílána zákazníky k laboratorní analýze, která prokáže přítomnost infekčních patogenů přímo v klíštěti, jež na člověku sálo. K současnému datu (konec roku 2018) bylo analyzováno cca 12 000 vzorků. Klíšťata jsou před zpracováním uložena v -15 až -20 °C.

5.2 Izolace DNA a RNA

Základním předpokladem analýzy je získání čisté DNA a RNA ze vzorku. Nejprve díky fyzikálním a chemickým podmínkám dojde k lýze tkání klíštěte pomocí lyzačního roztoku. Poté se do vzorku přidá ethylalkohol, díky němuž se nukleové kyseliny naváží na siliku a při proplachování nejsou odplaveny. Ze vzorku je poté pomocí promývacího pufru odplavena krev a nečistoty, které by při analýze PCR mohly vadit. Kolonka je následně stočena, aby se odstranil zbývající promývací roztok. Z kolonky je poté pomocí elučního roztoku uvolněna DNA, která je připravena k analýze.

Reagencie

4M GTC: 4M guanidine thiocyanate

0,1M Tris pH 7,5

- skladováno při pokojové teplotě

2-ME: 2-mercaptoethanol

- skladováno při chladničkové teplotě

70% EtOH: 70% ethylalkohol

- skladováno při pokojové teplotě

Odmývací roztok: 60mM Acetát dracelný

8,3mM Tris pH 7,5

40uM EDTA pH 8,0

63% ethylalkohol

- skladováno při pokojové teplotě

Roztok TE: 10mM Tris pH 7,5

1mM EDTA pH 8,0

RNAse inhibitor (Thermo Scientific)

- skladován při teplotě -15 až -20°C

5.2.1 Postup izolace DNA a RNA

Jako první se připravil mix roztoků v poměru 250μl 4M GTC a 2,5μl 2-ME. Vzniklý roztok byl přidán ke klíštěti vyndanému z -20 °C. Klíště je třeba v lyzačním roztoku rozmačkat, aby došlo k uvolnění DNA ze vzorku. Poté se zkumavka stočila v Multi- Spin minicentrifuze (1 cyklus: 1600rpm 6s, vortex Hard 10s, 1600rpm 6s). Ke vzorku bylo přidáno 250μl 70% ethylalkoholu a opět stočeno v Multi- Spin minicentrifuze při stejných podmínkách. Poté se lyzát přenesl na kolonu Promega a stočil 1min při 16000g. Stočená tekutina se slila a kolonka se promyla přidáním 500ul promývacího pufru a znovu se stočila 0,5min při 16000g. Tento krok se provedl ještě jednou. Kolonku je třeba zbavit zbylého ethylalkoholu, proto byla stočena 1min při 16000g. Eluce se provedla pomocí mixu roztoků TE a RNAse inhibitor v poměru 50μl TE a 0,125μl RNAse inhibitor. Vzorky se stočily 1min při 16000g. Vyizolovaná DNA

se skladovala do provedení reakce při 4°C, pokud je vzorek zpracován déle, je skladován při -20 °C.

5.3 PCR diagnostika

Polymerase Chain Reaction je polymerázová řetězová reakce, která byla koncipována v roce 1983 v laboratořích Cetus Corporation v Kalifornii. Pomocí metody se množí specifická sekvence DNA. PCR se skládá ze třech fází. První je denaturace, kdy při teplotě 90°C dojde k rozdělení řetězců DNA. Druhá fáze je hybridizace, kdy dochází k nasedání specifických primerů na vlákno DNA při specifické teplotě. Ve třetí fázi, tzv. elongaci, dochází k syntéze nových řetězců díky DNA polymeráze. Tento cyklus se opakuje, dokud se nenamnoží dostatečný počet molekul DNA. Při PCR dochází k exponenciálnímu množení daného úseku DNA, který je pak možné detekovat pomocí horizontální gelové elektroforézy.

Při vývoji nové detekce byly použity směsné vzorky (1 vzorek z 10 různých klíšťat). Jako zkušební byly použity primery podle odborného článku – P-F: AAG GAA TTA GTA TTA GAA TCT T a P-R: TTA ACT TCT ACT TCA CTT GAA) (Grankvist, 2015). Velikost výsledného produktu je 800 pb.

5.3.1 Příprava vzorku k PCR

Při přípravě vzorků k PCR je vždy připraven stejný mix pro všechny testované vzorky spolu s negativní kontrolou.

Tabulka číslo 1.

Chemikálie, výrobce	Konečná koncentrace	Množství (μl)
Sterilizovaná H ₂ O		15,6
Tick-Taq pufr (Protean)	2mM	2,5
Primery forward a reverse	0,4uM	0,5 each
dNTPs (Fermentas)	0,2uM	0,5

Tick-Taq DNA polymerase (Protean)	2U	0,4
--------------------------------------	----	-----

Po přípravě mixu je na každý vzorek odebráno 20 μ l, ke kterým je následně vzorek v množství 5 μ l přidán. Do negativní kontroly je místo 5 μ l vzorku přidáno 5 μ l sterilní H₂O.

5.3.2 Program v cyklu

Prvním krokem je počáteční denaturace, která trvá 2 min při teplotě 94 °C. Následuje 40 cyklických opakování, kdy nejprve dochází k denuraci při teplotě 94 °C 15s, následuje hybridizace při 60°C po dobu 15s. Třetím krokem je elongace, která probíhá při 72°C 45s. Po ukončení 40 cyklů následuje konečná elongace při 72°C 2min. PCR program končí zchlazením vzorků na 4°C.

5.4 Gelová elektroforéza

Elektroforéza je separační metoda, založená na rozdílné pohyblivosti složek vzorku v elektrickém poli. Rychlost pohybu je závislá na velikosti a množství složek ve vzorku, hustotě gelu, velikosti vstupního napětí v roztoku, ve kterém je umístěn gel.

Reagencie:

- Agaróza (AppliChem)
- TAE: 40mM Tris
 - o 1mM EDTA
 - o 20mM kyselina octová
- LB buffer 6x: 50% glycerol
 - o Bromfenolová modř
- Ethidium bromide (Fluka)

Ke vzorku amplifikovaném při PCR reakci bylo přidáno 6 μ l 6x Loading Buffer (Protean) a celý tento mix byl puštěn na gel. Pro kontrolu velikosti produktu byl použit

marker Express Ladderu (Thermo Scientific). Agarózový gel (1,5%, tj. 2,25g agarózy + 160 ml roztoku 1x TAE) byl puštěn při 200V 20min. Pozitivní vzorky byly vyříznuty z gelu a přečištěny přes kolonku.

5.5 Přečištění DNA z gelu

Při rozpuštění gelu v roztoku GTC dojde k uvolnění DNA. K navázání DNA je použit isopropylalkohol v roztoku chaotropní soli, díky němuž se DNA naváže na kolonku a neuvolní se při promývání. Promývání se provádí promývacím roztokem, který ze vzorku odplaví nečistoty a zbytky z gelu. Eluce je provedena pomocí roztoku EB, který uvolní DNA z kolonky.

Reagencie:

6M GTC: 6M guanidine thiocyanate

0,1M Tris pH 7

Isopropanol

Promývací roztok: 60mM Acetát draselný

8,3mM Tris pH 7,5

40uM EDTA pH 8,0

63% ethylalkohol

EB: 10mM Tris pH 8,5

Do zkumavky s vyříznutým gelem bylo přidáno trojnásobné množství 6M GTC, což je cca 450 μ l. Zkumavka se inkubovala při 55°C 5min (Major Science - Dry Bath Incubator), aby se gel v roztoku rozpustil. Vzorek se opatrně promíchal a bylo přidáno 150 μ l isopropanolu a opět promícháno. Roztok se přenesl na kolonku, která se stočila 1min při 16000g. Stočená tekutina byla slita a do kolonky přidáno 500 μ l promývacího roztoku na promytí. Kolonka se stočila 0,5min při 16000g a stočená tekutina byla slita. Pro vysušení a zbavení zbylého alkoholu se kolonka stočila 1min při 16000g. Pro eluci bylo přidáno 40 μ l EB, 1min inkubace a poté stočeno 1min při 16000g.

Vzorky se odeslaly na sekvenování u společnosti Eurofins.

5.6 Sekvence

Při sekvenování jsou do vzorku přidány čtyři různé fluorescenční značky, které se naváží na adenin, guanin, cytosin a thymín. Poté jsou pomocí kapilární elektroforézy rozděleny podle velikosti a na konci kapiláry detekovány pomocí laseru. Detektor podle vyzařované barvy určí nukleotidy. Výsledkem je chromatogram s peaky, který se analyzuje na počítači ve vhodném programu.

Výsledky byly porovnány s veřejně dostupnou databází na stránkách <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Sekvenování vzorků potvrdilo sekvenci *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* ve vzorcích s více než 95% shodou.

5.7 Kontrola specifičnosti

Vzorky pozitivní na *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* byly testovány s primery na *Anaplasma phagocytophila* a daným programem.

Tabulka číslo 2.

Chemikálie, výrobce	Konečná koncentrace	Množství (μl)
Sterilizovaná H ₂ O		15,6
Tick-Taq pufr (Protean)	2mM	2,5
Primery forward a reverse	0,4uM	0,5 each
dNTPs (Fermentas)	0,2uM	0,5
Tick-Taq DNA polymerase (Protean)	2U	0,4

Po přípravě mixu je na každý vzorek odebráno 20μl, ke kterým je následně vzorek v množství 5μl přidán. Do negativní kontroly je místo 5μl vzorku přidáno 5μl sterilní H₂O a do pozitivní kontroly 0,5μl DNA *Anaplasma phagocytophila* a 4,5 μl H₂O.

Počáteční denaturace probíhala 2min při 94°C. Poté se opakovalo 32 cyklů, obsahujících denuraci 15s při 94°C, hybridizace 15s při 52°C a elongaci 30s 72°C. Konečná elongace proběhla 2min při 72°C a následovala ochlazení na 4°C. Následovala gelová elektroforéza na 1% gelu (tj. 1,5g agarózy + 160 ml roztoku 1x TAE).

5.8 Klonování standardu

Molekulární klonování umožní namnožení úseku DNA z jedné kopie na obrovská kvanta kopií. K tomu slouží replikační aparát, například bakterie či kvasinky. Do hostitelské buňky se vloží úsek DNA zaklonovaný do plazmidu, poté probíhá kultivace bakterií, tím namnožení vloženého úseku, a následuje izolování klonované DNA. Díky snadné kultivaci se obvykle využívají bakterie *Escherichia coli*.

Nejprve dojde k namnožení specifického úseku DNA s použitím High-Fidelity DNA polymerázy pomocí PCR.

Tabulka číslo 3.

Reagencie	Množství (μl)
DNA	2,5
Q5 Hight-Fidelity 5x buffer (NEB)	5
Primer mix forward + revers	1
dNTPs (Thermo Scientific)	0,5
Hight-Fidelity polymerase	0,25
H ₂ O	15,75

Vzorky byly puštěny na elektroforézu s 6μl 6x Loading Buffrem. Gel byl 1,5% a metoda běžela 150V 15min.

Po proběhnutí elektroforézy se vyřízla DNA z gelu a přečistila podle výše uvedeného protokolu. Následovala ligace fragmentu do vektoru pCR II-Blunt-TOPO s tupými konci s použitím Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit (Introgene).

Tabulka číslo 4.

Reagencie	Množství (μl)
Salt Solution	1
H ₂ O	1,5
pCR II-Blunt-TOPO	1
PCR produkt	2,5

Reakce se inkubovala 10 min při pokojové teplotě.

Transformace byla provedena do 100μl kompetenčních buněk GTX10B (Protean). Ligační směs a buňky byly inkubovány 30 min na ledu, poté byl proveden heat shock 1min při 42°C a nakonec byla celá směs dána opět na dvě min na led. Ke směsi bylo přidáno 800μl předeřátého LB media bez antibiotik a vše bylo inkubováno 45min při 37°C. Zkumavka byla před výsevem na plotny stočena na 3000g 1,5 min a sediment byl rozetřen na plotny s kanamycinem, které byly potom umístěny do termostatu (Innova 42 - Incubator Shaker Series) dnem vzhůru, a inkubovány v 37°C přes noc.

Vybrané pozitivní kolonie byly přeočkovány do media s kanamycinem a inkubovány při 37°C a 250 RMP. Z narostlých kultur byly vyizolovány plasmidy. Kontrola pozitivních kolonií byla provedena izolací plasmidové DNA a stříhem restriční enzymem EcoRI (Fermentas). Výsledky byly ověřeny pomocí gelové elektroforézy. Pozitivní plasmidy byly pro ověření sekvenovány ve společnosti Eurofins.

5.9 Minipreparace plasmidové DNA

Získání plasmidové DNA z narostlé bakteriální kultury. Vzniklý produkt lze využít k dalším analýzám.

Reagencie:

P1: 50mM Tris-Cl pH8,0

10mM EDTA

100ug/ml RNase A

P2: 200mM Tris-Cl pH 8,0

1% SDS

N3 (Neutralization Buffer): originální roztok od Qiagen

Promývací roztok: 60mM Acetát draselný

8,3mM Tris pH 7,5

40uM EDTA pH 8,0

63% ethylalkohol

EB: 10mM Tris pH 8,5

1,5 ml narostlé bakteriální kultury bylo stočeno 1 min při 3000g. Medium bylo slito a k sedimentu přidáno 250 μ l roztoku P1. Sediment byl důkladně rozmíchán. K této směsi bylo přidáno 250 μ l P2, lehce promícháno a necháno 3 min stát. Dále bylo do zkumavky přidáno 350 μ l N3 a řádně promícháno. Celá směs byla stočena 10min při 16000g. Supernatant byl přenesen na kolonu (Promega) a stočen 1min při 16000g. Kolonka byla promyta pomocí promývacího roztoku (750 μ l) a stočena 0,5 min při 16000g, pro zbavení se ethylalkoholu stočena ještě jednou 1min při 16000g. Eluce byla provedena v 50 μ l EB.

Poté byla změřena koncentrace DNA pomocí přístroje (BOECO Germany S-30 Spectrophotometer) (199,6 µl/ml). Takto připravený standard byl zapsán do interní databáze a uložen v -20°C.

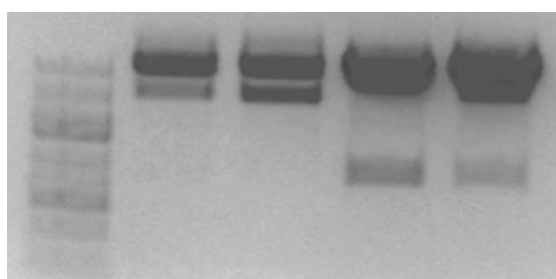
5.10 Restrikční analýza

Při restrikční analýze dochází k štěpení DNA pomocí restrikčních enzymů, v mém případě EcoRI. Při správném štěpení jsou na gelu viditelné 2 pruhy dále od sebe, což je znázorněno na obrázku číslo 4.

Tabulka číslo 5.

Reagencie	Množství (µl)
Buffer EcoRI (Fermentas)	2
Enzym EcoRI	0,5
H ₂ O	7,5
Plasmidová DNA z miniprepu	10

Celá reakce byla inkubována 1h při 37°C a poté zkontrolována pomocí gelové horizontální elektroforézy.



El 1 2 3 4

Obrázek číslo 4. - Foto gelové elektroforézy s restrikční analýzou. Na první pozici Express leader, následují 4 vzorky, z nichž byl vzorek číslo 3 vybrán pro osekvenování a následné další zpracování. U vzorků 1 a 2 zřejmě nedošlo k zaklonování správného úseku DNA.

5.11 Příprava standardu

Z klonu, který byl osekvenován a byla potvrzena *C. Neoehrlichia mikurensis*, byl připraven miniprep. Ten dále v laboratoři slouží jako zdroj pozitivní kontroly při dalších analýzách. Standard byl i kontrolou při testování klíšťat z roku 2018 na přítomnost *Candidatus Neoehrlichia mikurensis*.

5.12 Příprava bakteriálního stocku

Bakteriální kultura obsahující plasmid s DNA z *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* v 60% glycerolu slouží k uskladnění pro případné další použití.

Do označené kryozkumavky jsem přenesla 675 µl čerstvě narostlé bakteriální kultury a 450 µl sterilního 60% glycerolu. Pro jistotu při skladování se připravují vždy 2 kryozkumavky. Obsah zkumavek se promíchal a ihned zmrazil v -20°C a teprve poté byl přemístěn do -80°C (New Brunswick - Premium HEF 410).

6 Výsledky

6.1 Návrh specifických primerů pro *Candidatus Neoehrlichia mikurensis*

Pro vývoj nové diagnostiky na detekci *Candidatus Neoehrlichie mikurensis* vhodné detekční primery pro PCR byly nejprve hledány v odborné literatuře. Testy prokázaly nízkou specificitu, tím byly pro detekci nevhodné, a proto se laboratoř rozhodla navrhnout primery vlastní. S novými primery, navrženými v programu Geneious v 1.1.4., metoda funguje správně a dochází k zachycení pouze specifického produktu. Navrhování primerů v programu Geneious je znázorněno na obrázku číslo 4. Velikost výsledného produktu je 757 pb. Aby byla analýza specifická, zvyšovala se teplota při annealingu z 50°C na 60°C.

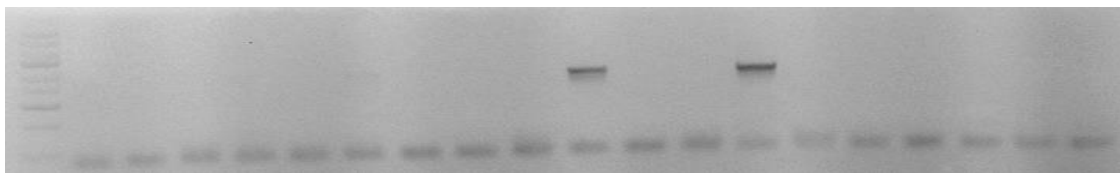


Obrázek číslo 5. - *Navrhování specifických primerů pro Candidatus Neoehrlichia mikurensis v programu Geneious. Na obrázku jsou primery znázorněny trojúhelníčky, kdy zelené trojúhelníčky odpovídají primerům z odborné literatury a modré jsou nově navržené. Tmavší barvy představují forward primery a světlejší reverse primery. Navrhování proběhlo na alignmentu 10 sekvencí Candidatus Neoehrlichia mikurensis.*

6.2 Screening vzorků klišťat

Testování nově navržených primerů proběhlo na směsných vzorcích. Navržené primery byly testovány na specifický záchyt *C. N. mikurensis* ve směsných vzorcích. Výsledný gel je znázorněn na obrázku číslo 6. Produkty byly z gelu vyříznuty a přečištěny, pomocí metody uvedené výše, a poslány na sekvenování do firmy Eurofins.

Při sekvenování byla potvrzena přítomnost bakterie *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* v zaslaných vzorcích.



E1

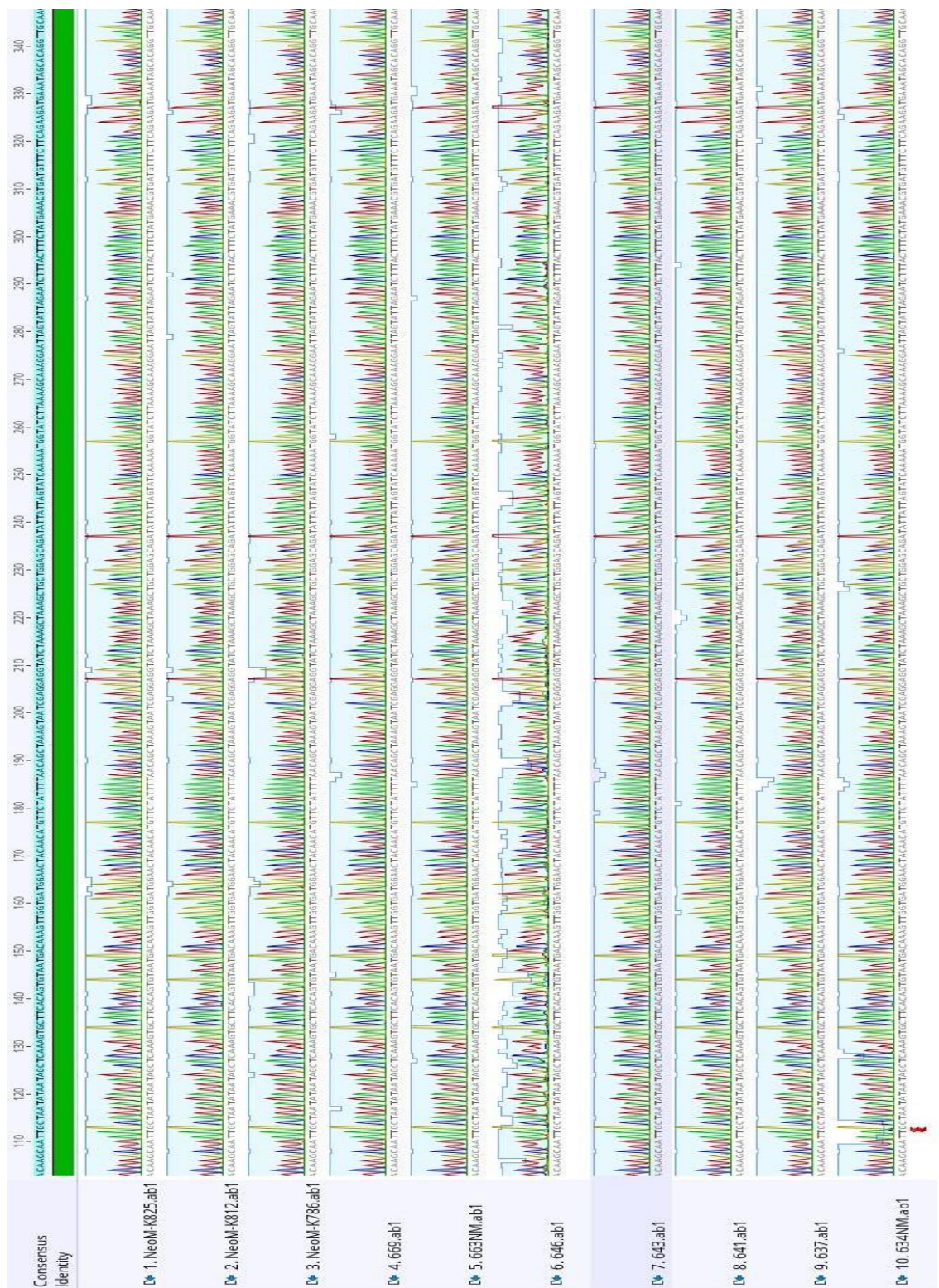


E1

Obrázek číslo 6.A a 6.B - Foto gelu po horizontální gelové elektroforéze. Na gelu je vždy v každé řadě na prvním místě Express ladder, následují testované vzorky (19 a 19). Pozitivní vzorky (číslo 6, 10, 13 v první řadě a 2, 19 v druhé řadě) byly z gelu vyříznuty.

6.2.1 Sekvence

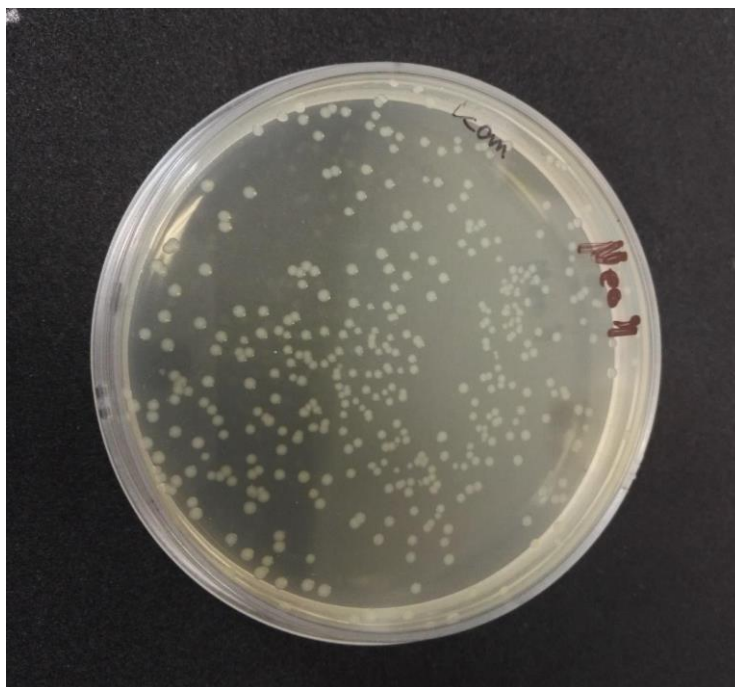
Sekvence - alignment 10 vzorků. Všechny vzorky jsou z klíšťat chycených na území České republiky. Ukázka sekvence od 100 do 350 pb na obrázku číslo 7. Alignment slouží k porovnání vzorků podle sekvence specifického úseku DNA a je zde možné zachytit drobné odchylky v genu různých druhů či mutace.



Obrázek číslo 7. - Alignment 10 sekvencí pozitivních vzorků na C.N.m. v rozmezí 100-350 pb. Všechny uvedené vzorky byly sekvenovány v rámci této práce.

6.3 Příprava standardu

Při klonování standardu dochází k zabudování namnoženého specifického úseku DNA do plazmidové DNA (vektor), ta je poté transformována do kompetentních bakterií (schopny přijmout cizí DNA, plotna na obrázku číslo 8.), z nichž je následně provedena minipreparace DNA a ta je používána jako pozitivní kontrola u PCR. Postupy jednotlivých metod jsou uvedeny v metodice této práce.

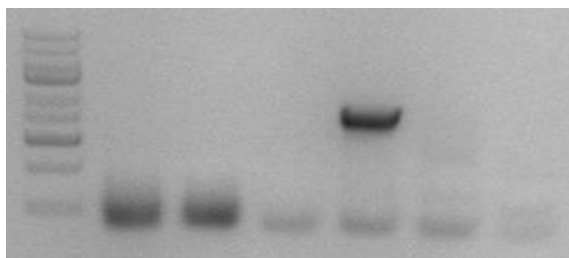


Obrázek číslo 8. - Foto plotny po nanesení ligační reakce se zaklonovanou DNA z *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* a inkubaci přes noc v 37°C. Na plotně je vidět cca 150 kolonií.

6.4 Kontrola specifčnosti primerů

Vzorky, které byly pozitivní na *Candidatus Neoehrlichia mikurensis*, což bylo potvrzeno sekvenací, byly otestovány s primery a programem na *Anaplasma phagocytophyla*. Testování potvrdilo specifčnost primerů na *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* a nedochází ke skřížené reaktivitě se vzorky pozitivními na příbuzný

patogen ani k falešně pozitivním výsledkům. Jeden testovaný vzorek byl ovšem pozitivní, proto byl opět vyříznut z gelu, přečištěn a poslán na sekvenaci. Sekvence potvrdila přítomnost *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* i *Anaplasma phagocytophyla* ve stejném vzorku.



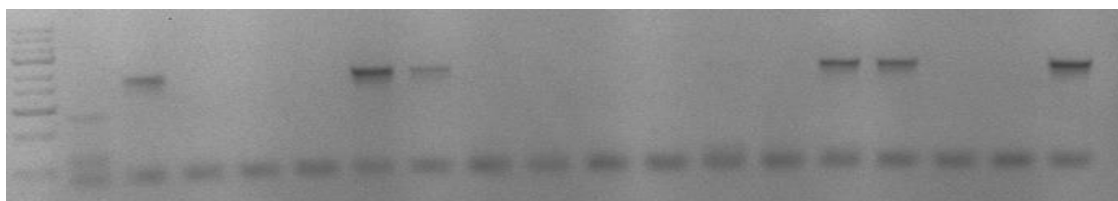
EL 1 2 3 4 5 -

Obrázek číslo 9. - Na prvním místě v gelu se nachází Express ladder, následuje 5 vzorků, z nichž je vzorek číslo 4 pozitivní na *Anaplasma phagocytophyla*. Poslední místo zaujímá negativní kontrola ($5\mu H_2O$).

6.5 Screening vzorků a statistické vyhodnocení promořenosti klíšťat patogenem *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* za rok 2018

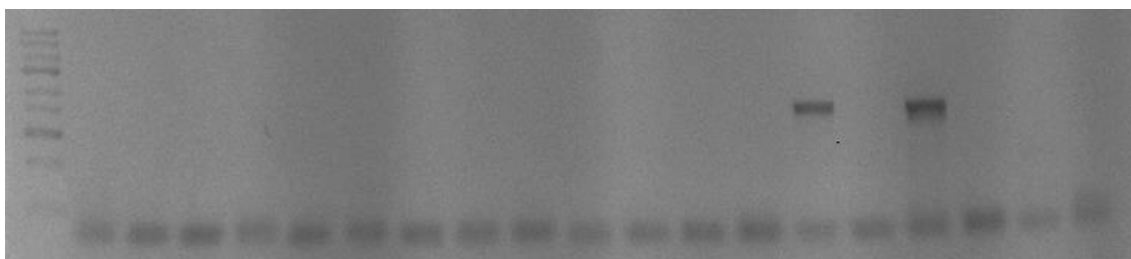
Otestovány byly všechny směšné vzorky z roku 2018. Jeden směšný vzorek obsahuje DNA a RNA z 10 různých klíšťat. Testování proběhlo ve 4 skupinách. První skupina je znázorněna na obrázku číslo 10. Při každém testu byla se vzorky analyzována jedna pozitivní a jedna negativní kontrola. Express leader pro kontrolu velikostí produktů je vždy na první pozici v gelu.

1. Skupina vzorků



El

- +

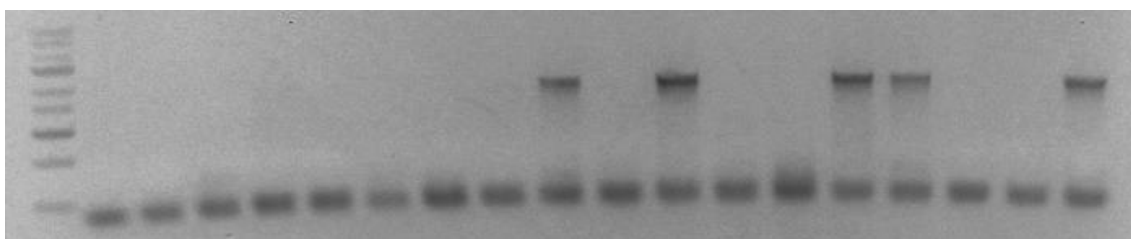


EI

Obrázek číslo 10.A a 10.B - Foto gelu při screeningu klíšťat z roku 2018. V každé řadě je na prvním místě Express ladder, poslední dva vzorky v horní řadě jsou nejprve negativní a poté pozitivní kontrola.

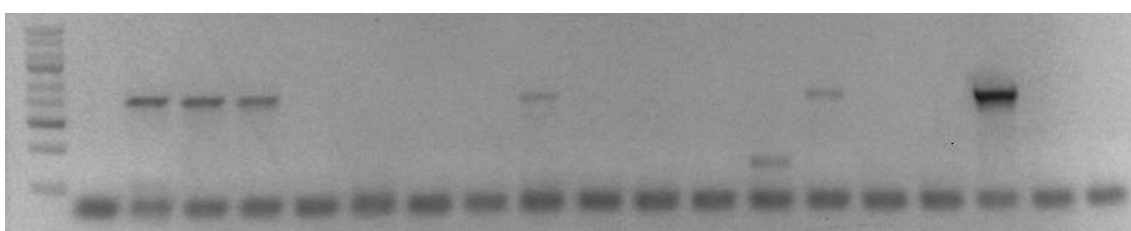
Počet směsných vzorků v první sérii vzorků je 35, z toho je 7 pozitivních.

2. Skupina vzorků



EI

- +



EI

Obrázek číslo 11.A a 11.B - Foto gelu při screeningu klíšťat z roku 2018. V každé řadě je na prvním místě Express ladder, poslední dva vzorky v horní řadě jsou nejprve negativní a poté pozitivní kontrola.

Počet směsných vzorků je 32, z toho je 7 pozitivních. U opakovaných 4 vzorků potvrzena *C. Neoehrlichia mikurensis* u 3 (na gelu první 4 vzorky)

3. Skupina vzorků

Počet směsných vzorků je 36, z toho je 6 pozitivních.

4. Skupina vzorků

Počet směsných vzorků je 36, z toho je 12 pozitivních. 4 vzorky pro kontrolu puštěny ještě jednou v jiné sérii.

Při testování směsných vzorků za rok 2018 bylo testováno celkem 139 směsných vzorků, tedy 1390 klíčů. Pozitivních vzorků bylo celkem 31. Screening proběhl ve 4 skupinách. Procentuální výsledek a shrnutí jsou uvedeny v tabulce číslo 6.

Tabulka číslo 6.

Celkový počet vzorků (směsné vzorky= *10)	Pozitivní	Negativní
139 (1390)	31	108
	2,23 %	

7 Diskuze

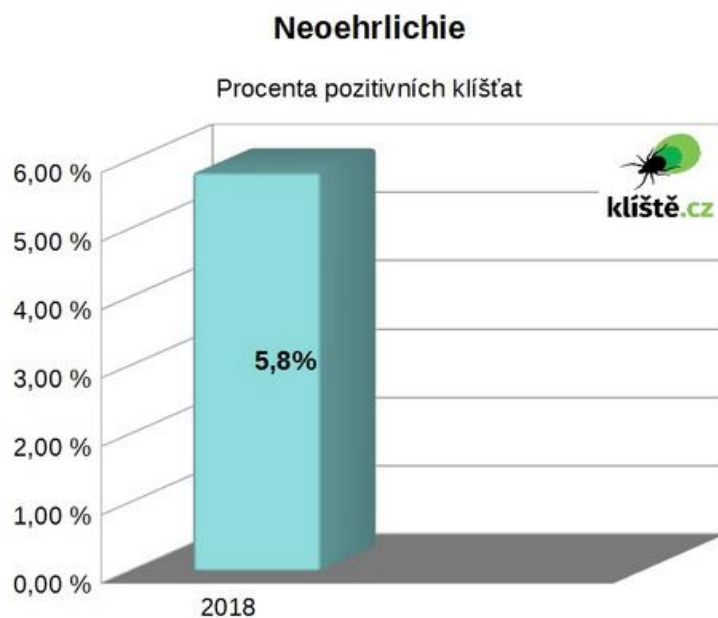
Vyšetření infekčnosti klíšťat u napadených lidí považují za přínosné opatření z hlediska prevence nákazy. U mnoha onemocnění, jak přenášených klíšťaty, tak klíšťaty nepřenášených, jsou příznaky velice nespecifické. Pacient by měl svému lékaři vždy sdělit, že měl v nedávné době prisáté klíště. Když pacient navíc ví, jaké patogeny dané klíště přenášelo, může to představovat významné vodítko pro lékaře, který tak snadněji určí správnou diagnózu a léčbu, čímž se zároveň zkrátí doba případné pracovní neschopnosti pacienta. V současnosti se běžně pomocí serologických testů většina přenášených patogenů klíštětem netestuje. Na průkaz *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* serologické testy prozatím vyvinuty nebyly. Tato informace byla podnětem pro vývoj diagnostiky pomocí PCR.

Neoehrlichioza byla nejčastěji pozorována u lidí s oslabenou imunitou, ovšem známa jsou i onemocnění u naprosto zdravých lidí, například v Německu. Z toho důvodu je důležité, aby lékaři byli informováni o šíření se této nově objevené nemoci. Při dobré informovanosti nebude docházet k tomu, že bude pacient mylně léčen na jiné onemocnění, ale dostane antibiotika cílená na léčbu neoehrlichiozy.

Při testování klíšťat v průběhu roku 2018 bylo zachyceno několik klíšťat, která neobsahovala jen *Candidatus Neoehrlichia mikurensis*, ale i dalšího patogena. Jedno klíště obsahovalo vedle *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* také *Anaplasma phagocytophyla* a dvě klíšťata Borelie. Kombinace přenášených patogenů způsobuje těžší průběh akutní fáze nemoci a méně specifické příznaky, které se kombinují dle přenášených patogenů. Často se tedy stane, že pacient zcela nereaguje na léčbu, což je způsobeno léčbou pouze jednoho patogena, přičemž druhý přetrvává. Proto je důležité správné stanovení všech patogenů v klíštěti a zahájení účinné léčby kombinací cílených léků.

V této práci probíhalo stanovení promořenosti klíšťat ze směsných vzorků, kdy promořenost vycházela na 2,23 %. Během roku 2018 však byla testována v laboratoři i klíšťata jednotlivě, při objednané analýze. Celkově bylo vyšetřeno přes 100 klíšťat a výskyt pozitivních vzorků byl stanoven na 5,8 %. Toto porovnání ukazuje na zkrácené

výsledky při testování směsných vzorků. Při testování směsných vzorků se předpokládá, že v každém vzorku (10ks klíšťat) je jen jedno klíště pozitivní. V jednotlivých letech se proměňovat klíšťat výrazně liší, což lze vidět u grafů výskytu ostatních patogenů.



Graf číslo 7. (URL 2)

Z výsledků analýz v laboratoři Protean za rok 2018 vyplývá, že rozšíření *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* je třetí nejvyšší v pořadí za Borelií (10%) a Babesii (6%).

8 Závěr

Cílem mé bakalářské práce bylo vyvinout diagnostiku na stanovení bakterií *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* v klíšťatech. Při mé práci bylo potřeba navrhnout vhodné specifické primery, testováním vzorků DNA z klíšťat nalézt klíště pozitivní na *Candidatus Neoehrlichia mikurensis*, specifický úsek DNA zaklonovat do plazmidového vektoru a připravit DNA standard pro pozitivní kontrolu při diagnostice pomocí PCR. Po vyvinutí metody bylo testováno celkem 1390 klíšťat ve směsných vzorcích po 10 kusech. K detekci a screeningu byla využita metoda PCR s následnou elektroforézou a odečtením vzorků. Metoda byla úspěšně vyvinuta a je nadále v laboratoři Protean rutinně používána pro spolehlivou detekci patogenu ve vzorcích klíšťat. Z mých výsledků vyplývá, že promořenost na území České republiky se pohybuje kolem 2%, což není zanedbatelné.

V budoucnu by mělo být provedeno plošné testování pro získání přesnějších statistických údajů. Jelikož do této doby nebyly vyvinuty sérologické diagnostické testy, věda by se touto problematikou měla zabývat. Za důležité považuji informovat při zdravotních problémech lékaře o tom, že pacient měl prisáté klíště. Mnoho příznaků je nespecifických a informace o přítomnosti patogenů v klíštěti by měla lékaři pomoci k rychlejší a správné diagnóze.

9 Zdroje

BARTŮNĚK, Petr, 1996. *Lymeská borelióza*. Grada. ISBN 8071692425.

BEDNÁŘ, Marek, Andrej SOUČEK a Jiří VÁVRA, 1994. *Lékařská speciální mikrobiologie a parazitologie*. Triton. ISBN 8090152147.

BENEŠ, Jiří, 2009. *Infekční lékařství*. Galén. ISBN 9788072626441.

BOULOUIS, Henri-Jean, Chang CHAO-CHIN, Jennifer B. HENN, Rickie W. KASTEN a Bruno B. CHOMEL, 2005. Factors associated with the rapid emergence of zoonotic Bartonella infections. *Veterinary Research*. 36(3), 383-410. DOI: 10.1051/vetres:2005009.

BURNIE, David a Jiří ŠMAHA, 2002. *Zvíře: [obrazová encyklopedie živočichů všech kontinentů]: [obrazová encyklopedie živočichů všech kontinentů]*. Euromedia Group - Knižní klub. ISBN 8024208628.

COTTÉ, Violaine, Sarah BONNET, Danielle LE RHUN, et al., 2008. Transmission of *Bartonella henselae* by *Ixodes ricinus*. *Emerging Infectious Diseases*. 14(7), 1074-1080. DOI: 10.3201/eid1407.071110.

DERDÁKOVÁ Markéta, Václav RADOVAN, PANGRÁCOVÁ Lucia, SELYEMOVÁ Diana, ŠPITALSKÁ Eva, WALDER G., STANKO Michal, *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* - vynárajúci sa kliešťami prenášaný patogén na Slovensku a jeho cirkulácia s *Anaplasma phagocytophilum*.

DERDÁKOVÁ, Markéta, Radovan VÁCLAV, Lucia PANGRÁCOVA-BLAŇÁROVÁ, Diana SELYEMOVÁ, Juraj KOČI, Gernot WALDER a Eva ŠPITALSKÁ, 2014. Candidatus Neoehrlichia mikurensis and its co-circulation with Anaplasma phagocytophilum in Ixodes ricinus ticks across ecologically different habitats of Central Europe. *Parasites & Vectors*. **7**(1), 160-160. DOI: 10.1186/1756-3305-7-160.

GRANKVIST, A., P.-O. ANDERSSON, M. MATTSSON, et al., 2014. Infections With the Tick-Borne Bacterium "Candidatus Neoehrlichia mikurensis" Mimic Noninfectious Conditions in Patients With B Cell Malignancies or Autoimmune Diseases. *Clinical Infectious Diseases*. **58**(12), 1716-1722. DOI: 10.1093/cid/ciu189.

GRANKVIST, Anna, Edward R B MOORE, Liselott SVENSSON STADLER, et al., 2015. Multilocus Sequence Analysis of Clinical "Candidatus Neoehrlichia mikurensis" Strains from Europe. *Journal of clinical microbiology*. American Society for Microbiology (ASM), **53**(10), 3126-32. DOI: 10.1128/JCM.00880-15.

JAHFARI, Setareh, Manoj FONVILLE, Paul HENGEVELD, et al., 2012. Prevalence of Neoehrlichia mikurensis in ticks and rodents from North-west Europe. *Parasites & Vectors*. **5**(1), 74-74. DOI: 10.1186/1756-3305-5-74

JAHFARI, Setareh, M. P. G. Prof. dr KOOPMANS, J. W. Prof. dr HOVIUS a H. Dr. Co-promotor. SPRONG, 2017. *Tick-borne diseases: opening Pandora's BoxTeken-overdraagbare ziekten: het openen van de doos van Pandora: opening Pandora's BoxTeken-overdraagbare ziekten*. s. -240, 240 s. ISBN 9789462957282.

KARBOWIAK, Grzegorz, Beata BIERNAT, Joanna STAŃCZAK, Joanna WERSZKO, Piotr WRÓBLEWSKI, Tomasz SZEWCZYK a Hubert SYTYKIEWICZ, The role of particular ticks developmental stages in the circulation of tick-borne pathogens in Central Europe. 4. Anaplasmataceae. *Annals of parasitology*. 62(4), 267-284. DOI: 10.17420/ap6204.62.

KAWAHARA, M., 2004. Ultrastructure and phylogenetic analysis of 'Candidatus Neoehrlichia mikurensis' in the family Anaplasmataceae, isolated from wild rats and found in Ixodes ovatus ticks. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY*. 54(5), 1837-1843. DOI: 10.1099/ij.s.0.63260-0.

KERLES, Marek, *Člověk a klišťe*. ISBN 9788073945152.

KIMMIG, Peter., Dieter. HASSLER a Rüdiger. BRAUN, 2003. *Klišťata: nepatrné kousnutí s neblahými následky: nepatrné kousnutí s neblahými následky*. Pragma. ISBN 8072058819.

KŘUPKA Michal, RAŠKA Milan, WEIGL Evžen, 2009. *Lymská borelióza - biologie, patogeneze, diagnostika a léčba: Lyme disease - biology, pathogenesis, diagnostics and treatment: Lyme disease - biology, pathogenesis, diagnostics and treatment*.

MOKREJŠOVÁ, MUDr. Magdaléna a MUDr. Jiří ŽABKA, 2013. Akutní renální postižení u pacienta s ehrlichiózou. *Interní medicína pro praxi*. Interní medicína pro praxi, 15(1), 22-24.

BALÁTOVÁ Pavla, Dagmar BERENOVÁ, Petr KODYM, 2013. *Anaplasma phagocytophilum* jako původce humánní granulocytární ehrlichiozy (HGA). s. -63, 61 s.

PEKOVA, Sona, Jan VYDRA, Hana KABICKOVA, et al., 2011. Candidatus Neoehrlichia mikurensis infection identified in 2 hematooncologic patients: benefit of molecular techniques for rare pathogen detection: benefit of molecular techniques for rare pathogen detection. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 69(3), 266-270. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2010.10.004.

PETERSEN, Jeannine M., Paul S. MEAD a Martin E. SCHRIEFER, 2009. Francisella tularensis/i: an arthropod-borne pathogen: an arthropod-borne pathogen. *Veterinary Research*. 40(2), 07-07. DOI: 10.1051/vetres:2008045.

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

ROHÁČOVÁ, MUDR.Hana, 2012. Lymeská borrelióza. *Interní medicína pro praxi*. Interní medicína pro praxi, 14(5), 203-205.

RŮŽEK, Daniel, *Klíšťová encefalitida*. ISBN 9788024753058.

SEDLÁK, Kamil a Markéta TOMŠÍČKOVÁ, 2006. *Nebezpečné infekce zvířat a člověka*. Scientia. ISBN 8086960072.

SONENSHINE, Daniel E. a R. Michael. ROE, 2014. *Biology of ticks*. Oxford University Press. ISBN 0199744068.

ŤÁPAL, Jiří, 2016. *Optimalizace přenosového modelu Babesia microti*. JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH.

WELINDER-OLSSON, C., E. KJELLIN, K. VAHT, S. JACOBSSON a C.

WENNERAS, 2010. First Case of Human "Candidatus Neoehrlichia mikurensis" Infection in a Febrile Patient with Chronic Lymphocytic Leukemia. *Journal of Clinical Microbiology*. 48(5), 1956-1959. DOI: 10.1128/JCM.02423-09.

9.1 Internetové zdroje

URL 1

Klíště.cz – Životní cyklus klíšťat. Klíště.cz – Vyšetřit klíště – borelióza, encefalitida a další nemoci [online]. Copyright © 2008 [cit. 06.04.2019]. Dostupné z: <https://www.kliste.cz/cz/vse-o-klistatech/clanek/zivotni-cyklus-klisat>

URL 2

Klíště.cz – Výskyt infikovaných klíšťat v jednotlivých letech. Klíště.cz – Vyšetřit klíště – borelióza, encefalitida a další nemoci [online]. Copyright © 2008 [cit. 15.04.2019]. Dostupné z: <https://www.kliste.cz/cz/vse-o-klistatech/clanek/vyskyt-infikovanych-klisat-v-jednotlivych-letech>

URL 3

Klíště.cz – Tularémie. Klíště.cz – Vyšetřit klíště – borelióza, encefalitida a další nemoci [online]. Copyright © 2008 [cit. 06.04.2019]. Dostupné z: <https://www.kliste.cz/cz/vse-o-klistatech/clanek/tularemie>

URL 4

Onemocnění přenášená klíšťaty v České republice, SZÚ. SZÚ [online]. Copyright © 2007 [cit. 15.04.2019]. Dostupné z: <http://www.szu.cz/tema/prevence/onemocneni-prenasena-klistaty-v-ceske-republice>