



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Sciences

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

Problematika laboratorního vyšetření u onemocnění Lymeskou boreliózou

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program:

SPECIALIZACE VE ZDRAVOTNICTVÍ

Autor: Lucie Havleová

Vedoucí práce: doc. MUDr. Lidmila Hamplová, Ph.D.

České Budějovice 2020

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou/diplomovou práci s názvem „Problematika laboratorního vyšetření u onemocnění Lymeskou boreliózou“ 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 2.6. 2020

.....

Poděkování

Ráda bych poděkovala mé vedoucí doc. MUDr. Lidmile Hamplové, Ph.D. za vstřícné a ochotné vedení této bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat laborantkám v laboratoři Stafila k.s. v Českých Budějovicích za trpělivost a ochotný přístup. Děkuji i svým blízkým, kteří mi byli po celou dobu oporou.

Problematika laboratorního vyšetření u onemocnění Lymeskou boreliózou

Abstrakt

Lymeská borelióza je multisystémové infekční onemocnění přenášené nejčastěji klíšťaty rodu *Ixodes*. V České republice pak konkrétně klíšťaty *Ixodes ricinus*. Původcem tohoto onemocnění je komplex spirochetálních bakterií *Borrelia burgdorferi sensu lato*. Incidence onemocnění je poměrně vysoká a každoročně je v České republice hlášeno několik tisíc případů. Přestože jsou poznatky o lymeské borelióze v současné době poměrně rozsáhlé a nadále probíhá intenzivní výzkum, tak se názory odborníků na tuto problematiku stále vyvíjejí. Diagnostikovat lymeskou boreliózu je též poněkud obtížné. Zejména kvůli různorodým, někdy i nespecifickým klinickým příznakům, které často způsobují lékařům potíže ve stanovení správné diagnózy. Protože není doposud k dispozici účinná vakcína, jedinou možností, jak omezit riziko nákazy, je důsledná ochrana před klíšťaty.

Tato práce se snaží shrnout současné poznatky o historii, etiologii, epidemiologii, patogenezí, klinickém průběhu, prevenci, terapii, a diagnostice lymeské boreliózy. Pacienti s podezřením na lymeskou boreliózu byli testováni pomocí dvoustupňového testu. Nejprve metodou ELISA a následně u pozitivních a hraničních pacientů konfirmační metodou Western blot. Výsledky mé práce potvrdily obecně známou skutečnost, že lymeská borelióza je infekce sezónního charakteru. Vyšší počet pozitivních vzorků v letních měsících souvisí se zvýšenou aktivitou klíšťat v tomto období. Velmi zajímavé jsou ale výsledky odkazující na složení pacientů podle věkových skupin a také rozdíly počtu nakažených podle pohlaví. Konkrétněji pak vyšší počet pozitivních vzorků u ženské populace.

Klíčová slova

Lymeská borelióza; *erythema migrans*; *Ixodes ricinus*; *Borrelia burgdorferi sensu lato*; ELISA; Western blot

Problems of laboratory examination in Lyme disease

Abstract

Lyme borreliosis is a multisystem infectious disease most often transmitted by ticks of the genus *Ixodes*. In the Czech Republic, specifically by ticks *Ixodes ricinus*. The initiator of this disease is a complex of spirochetal bacteria *Borrelia burgdorferi sensu lato*. The incidence of the disease is relatively often as several thousand cases are reported in the Czech Republic every year. However the knowledge about Lyme borreliosis is relatively extensive and simultaneously an intensive research is constantly ongoing, the opinions of experts on this issue are still unfolding accordingly. So far, it is still rather difficult to diagnose Lyme disease, especially because of the various and sometimes non-specific clinical symptoms that might often lead to failure in diagnosis. As no effective vaccine has yet been developed, the only way to reduce the risk of infection is prevention and protection against the ticks.

This work investigates and summarizes current knowledge about the history, etiology, epidemiology, pathogenesis, clinical course, prevention, therapy, and diagnosis of Lyme disease. Patients suspected of having contracted Lyme disease were tested using a two-level screening, firstly by applying ELISA method in order to select either positive patients or patients with uncertain results so that a confirmation Western blot method could follow subsequently.

The outcome of my work confirmed the well-known fact that Lyme disease is seasonal. The higher number of positive samples in the summer months is related to the increased activity of ticks during this period. However, the results of positive patients who are divided into groups by age or gender represent very interesting findings. Particularly the higher incidence of the positive samples can be found among women.

Key words

Lyme disease; *erythema migrans*; *Ixodes ricinus*; *Borrelia burgdorferi sensu lato*;
ELISA; Western blot

Obsah

1. TEORETIKÁ ČÁST	9
1.1 Historie	9
1.2 Etiologie onemocnění	9
1.2.1 Mikrobiologie	10
1.2.2 Epidemiologie	11
1.3 Patogeneze	12
1.3.1 Přenos borelií do organismu	12
1.3.2 Imunitní odpověď organismu.....	14
1.4 Klinické příznaky	14
1.4.1 Časné lokalizované stadium.....	15
1.4.2 Časné diseminované stadium	16
1.4.3 Pozdní diseminované stadium.....	16
1.5 Postižení jednotlivých systémů	16
1.5.1 Postižení kůže	16
1.5.1.1 Erythema migrans.....	17
1.5.1.2 Boreliový lymfocytom.....	18
1.5.1.3 Acrodermatitis chronica atropicans (ACA).....	19
1.5.2 Postižení kloubů-lymeská artritida	19
1.5.3 Postižení nervového systému	20
1.5.3.1 Časná neuroborelióza	20
1.5.3.2 Pozdní neuroborelióza	20
1.5.4 Postižení srdce	21
1.5.5 Zrakové postižení.....	21
1.5.6 Postboreliový syndrom	21
1.6 Prevence.....	22
1.7 Léčba	22

1.8	Laboratorní diagnostika	23
1.8.1	Přímé laboratorní metody	23
1.8.2	Nepřímé laboratorní metody	24
2.	CÍLE PRÁCE	25
3.	METODIKA	26
3.1	Biologický materiál.....	26
3.2	ELISA	26
3.2.1	Princip testu EIA	26
3.2.2	Laboratorní vybavení.....	27
3.2.3	Reagencie a příprava vzorků	28
3.2.4	Pracovní postup	30
3.2.5	Hodnocení výsledků	32
3.3	Western blot.....	33
3.3.1	Princip testu Western blot	34
3.3.2	Laboratorní vybavení.....	34
3.3.3	Reagencie a příprava vzorků	35
3.3.4	Pracovní postup	36
3.3.5	Vyhodnocení testu	37
3.3.5.1	Vyhodnocení pro třídu IgM.....	38
3.3.5.2	Vyhodnocení pro třídu IgG	39
4.	VLASTNÍ VÝSLEDKY	41
5.	DISKUZE.....	48
6.	ZÁVĚR	51
7.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	52

Úvod

Lymeská borelióza je multisystémové infekční onemocnění, které je způsobené komplexem gramnegativních spirochetálních bakterií *Borrelia burgdorferi sensu lato*. Zdrojem infekce pro toto onemocnění jsou bakterie přenášené nejčastěji klíšťaty rodu *Ixodes*, u nás je přenašečem klíště obecné, tedy *Ixodes ricinus*. Rezervoárem LB jsou především drobní hlodavci, ale i vysoká zvěř a ptáci. U člověka se infekce vyznačuje celou širí klinických manifestací od lehkých kožních forem, až po závažné postižení orgánů a nervové soustavy. Na základě klinických projevů rozlišujeme časnou a pozdní fázi. Léčba je zahájena neprodleně po zhodnocení klinického stavu a laboratorní diagnostice pacienta, a to podáním vhodných ATB. Laboratorní diagnostika pro toto onemocnění je založena na klinickém obraze, anamnéze a laboratorních testech. Pro laboratorní diagnostiku lymeské boreliózy jsou využívány přímé a nepřímé metody. Mezi přímé diagnostické metody patří například kultivace borelií, hybridizace, imunoelektronová mikroskopie a metoda PCR. Mezi metody nepřímé pak řadíme metodu nepřímé imunofluorescence, metodu ELISA a Western blot. Nejběžnější diagnostickou metodou je screeningové stanovení hladiny specifických protilátek třídy IgG a IgM metodou ELISA a následná confirmace pomocí imunoblotu. V současné době je lymeská borelióza označována jako nejčastější diagnostikovaná antropozoonóza na území Evropy a Severní Ameriky. V České republice je každoročně hlášeno několik tisíc případů tohoto onemocnění (Bartůněk, 2013).

1. TEORETIKÁ ČÁST

1.1 Historie

První zmínky o lymeské borelióze byly v literatuře popsány roku 1883 německým dermatologem Alfredem Buchwaldem, který publikoval popis kožních změn a označil je jako *acrodermatitis chronica atrophicans* (ACA). O několik let později byly popsány *erythema migrans* (EM) po přisátí klíštěte a kožní projev označovaný jako boreliový lymfocytom. Později byly vedle kožních projevů popsány i jiné projevy, a to postižení dalších orgánů (Bartůněk, 2013).

Erytém, který se dále rozšiřoval, nazývaný *erythema chronicum migrans* (ECM), byl popsán v roce 1913 dermatologem z Rakouska Benjaminem Lipschützem. Obrat ve výzkumu nastal roku 1975, když se profesor A. Steere a W. Burgdorfer spolu s dalšími výzkumníky zaměřili na epidemický výskyt zánětlivé artropatie u 39 dětí a 12 dospělých, která propukla v oblasti poblíž městečka Old Lyme v Connecticutu v USA (Krejsek et al., 2016).

Klinický obraz se velmi podobal juvenilní revmatoidní artritidě, ovšem nápadný byl jejich sezónní výskyt a přítomný erytém. Dalším pozorováním bylo zjištěno, že v této oblasti je zvýšený výskyt klíšťat typu *Ixodes dammini*. Díky těmto studiím a následným poznatkům byla popsána lymeská nemoc. Roku 1982 byla objevena spirocheta řazená mezi borelie. Podle svého původce byla pojmenována jako *Borrelia burgdorferi*. Později roku 1987 bylo toto onemocnění označeno jako lymeská borelióza (Bartůněk, 2013).

1.2 Etiologie onemocnění

Původce LB zařazujeme do čeledi spirochet – *Borrelia burgdorferi*. Dříve nazývána též jako patogen *Borrelia burgdorferi sensu lato* zahrnuje přes více než 10 genotypů, které jsou definovány geneticky podle jejich bakteriálních genomů tzv. genomospecies. Později byly popsány také další blízké příbuzné druhy. Z celosvětového

hlediska se na etiologii LB podílí nejčastěji *Borrelia burgdorferi sensu stricto* napadající zejména kloubní a nervový systém (Křupka et al., 2008).

V České republice pak převažují jiné druhy, zejména *Borrelia afzelii* (častěji kožní manifestace) a *Borrelia garinii* (častěji neurologické projevy). Dalšími dnes již známými druhy borelií, patogenními pro člověka, jsou například *B. lusitaniae*, *B. valaisiana*, *B. spielmanii*, *B. bavariensis*, *B. kurtenbachii*. Některé druhy byly ale objeveny pouze v klíšťatech – *B. japonica*, *B. sinica*, *B. tanuki*, *B. bissetii* a mnoho dalších. Borelie na svém povrchu nesou antigeny OspA-G, ale pouze u A-C jsou objasněny funkce jako jsou faktor virulence, faktor přenosu a následného přežití v klíštěti (Prokeš, 2015a).

1.2.1 Mikrobiologie

Borelie ze skupiny *Borrelia burgdorferi s.l.* jsou gramnegativní, mikroaerofilní bakterie ze skupiny spirochet, pro které je typický protáhlý, spirálovitě stočený tvar o rozměrech 4-30 μm x 0,2 μm . Buněčná stěna sestává ze tří vrstev, vnitřní peptidoglykanové, střední lipopolysacharidové a vnější lipoproteinové. Bakterie se také vyznačují bičíky na obou koncích svého těla, které jim umožňují se pohybovat šroubovitým pohybem. Počet bičíků je 7-9, tím se výrazně liší od ostatních patogenních borelií, které mají 15-20 bičíků (Bartůněk, 2013).

Borelie dokážou vyvinout rychlost přesahující 2 mm/minutu. Tímto způsobem pohybu je boreliím umožněno překonat epiteliální bariéru a také vysoce účinnou hematoencefalitickou bariéru. Mají také schopnost pronikat do buněk, například do fibroblastů, makrofágů a dendritických buněk a tam posléze přežívat. Díky své nekompletní metabolické výbavě (ve které chybí enzymy pro syntézu AMK, MK a nukleotidů) jsou borelie odkázané na hostitelský organismus a nejsou proto schopny růst ve vnějším prostředí. Borelie jsou přizpůsobené na nízké hladiny železa, jejichž aktivní snižování v tělních tekutinách je hlavním mechanismem nespecifické protibakteriální obrany hostitele. Zajímavou a doposud ne zcela objasněnou vlastností borelie je schopnost tvořit různé, „non-spirální“ formy. Při tomto jevu můžeme u klasické spinální formy borelie pozorovat tvorbu cystických forem a odškrabovaných váčků obsahujících cytoplazmatické složky například v důsledku vystavení nízkému

pH, nedostatku nutričních hodnot, nebo nízkému osmotickému tlaku. Tento jev můžou borelie využít při ukryvání před nepříznivými faktory (ATB, působení imunitního systému), ale také při mikroskopickém průkazu borelií. Při změnách vnějších podmínek se borelie umějí transformovat zpět do pohyblivých spirochet (Křupka et al., 2008).

Mikroaerofilní borelie se množí a rostou ve vysoce obohacené komplexní půdě (BSK-H Sigma) a jejich generační doba růstu je přibližně 12-18 hodin (Bartůněk, 2013).

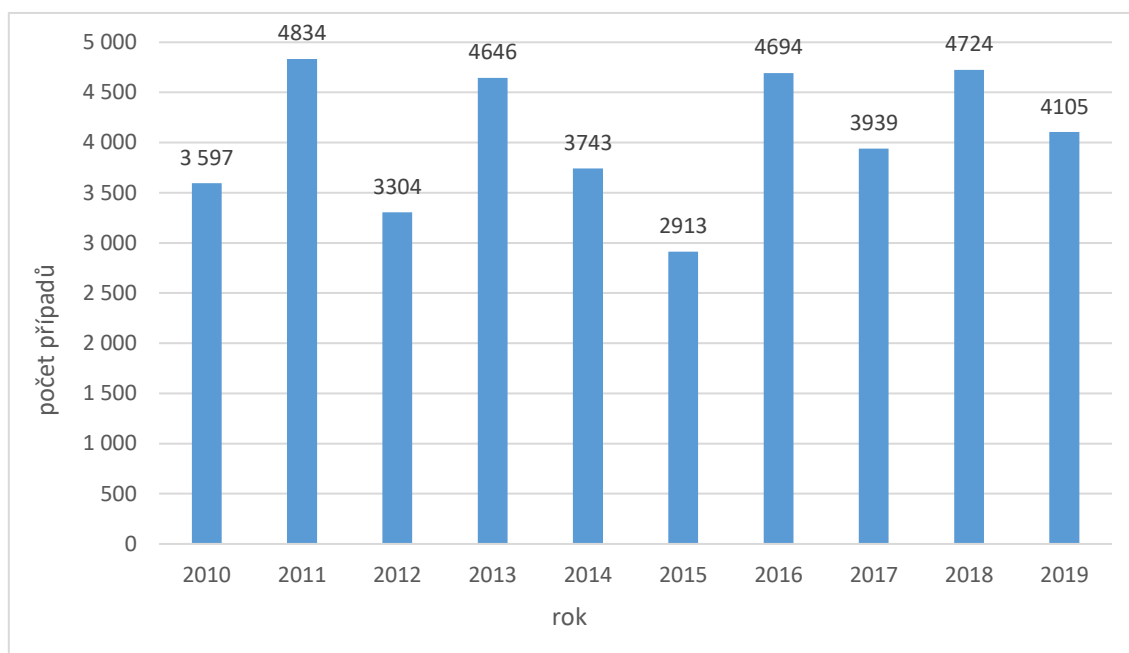
1.2.2 Epidemiologie

Lymeská borelióza je v Evropě a ve Spojených státech nejčastěji se vyskytující onemocnění s přírodní ohniskovostí, které je přenášeno vektorem (Shor et al., 2019).

Rezervoárem LB je přes 200 druhů savců, ptáků (zejména drobných pěvců) a plazů. Typickými zástupci jsou některé druhy drobných hlodavců-v Evropě a Asii zejména myšice (*Apodemus spp.*). Borelie byly izolované také u domestikovaných a divoce žijících zvířat. Člověk je však pouze náhodným hostitelem. Nejvýznamnějším vektorem jsou klíšťata rodu *Ixodes* a všechna jejich vývojová stadia (larva, nymfa). V Evropě se jedná o klíště obecné *Ixodes ricinus*, v USA o *I. dammini* a *I. pacificus* a v Asii o *I. persulcatus*, nebo *I. ovatus*. Velmi důležitý je transstadiální přenos –larva-nymfa-dospělec. V ČR je uváděno 6 % infikovaných larev, 4–15 % nymf a 9–43 % dospělců. Borelie byly také prokázány v některých druzích hematofágního hmyzu, avšak přenos na člověka nebyl dosud prokázán. Předpokládá se, že *B. burgdorferii* není plně adaptována na vnitřní prostředí těchto druhů hmyzu a přežívá zde jen několik dnů. Dalšími možnými přenosy jsou přenos transovariální, který není epidemiologicky významný, a potřísnění kůže tělním obsahem klíštěte v místě kožních mikrotraumat (rozmačkání klíštěte mezi prsty), ale i neporušenou kůží. Popisuje se také transplacentární přenos, ale nejsou zde popsány žádné z teratogenních účinků. V ČR má toto onemocnění zejména sezónní charakter, který souvisí s aktivitou klíšťat, zejména pak v letních měsících (Prokeš, 2015b).

V České republice je ročně hlášeno několik tisíc případů onemocnění LB. V roce 2019 se onemocnění objevilo u 4105 osob. Incidence tohoto onemocnění má za

poslední roky setrvalý trend s lehkými meziročními výkyvy. Vývoj nemocnosti LB v letech 2010-2019 znázorňuje graf 1. Největší počet infekcí bývá hlášen v 26. až 31. týdnu roku, což je způsobeno dlouhou inkubační dobou. Infekce nejvíce ohrožuje děti ve věku 5 až 9 let a dospělé osoby nad 55 let. Nejvíce infikovaných osob bývá hlášeno v kraji Vysočina, dále pak v Jihočeském, Libereckém, Olomouckém a Zlínském kraji. (SZÚ, © [2019]).



Graf 1: Vývoj nemocnosti LB v letech 2010-2019 (Zdroj: SZÚ, © 2019)

1.2 Patogeneze

1.3.1 Přenos borelií do organismu

Aby byly borelie schopné osídlit trávicí trakt klíštěte, musí se během svého vývojového cyklu vyrovnat s velmi odlišnými podmínkami okolního prostředí. Přesunutí borelií z trávicího traktu (střední části střeva) do slin klíštěte je dáno změnou pH a změnou teploty. Po nasátí krve se pomocí slinných žláz dostanou do krevního oběhu hostitele, kde musí uniknout imunitním mechanismům a následně se rozšířit do cílových orgánů. Tento děj trvá obvykle několik hodin. Pro vznik infekce je rozhodující také dávka mikrobů, která je závislá na délce sání. Pod 6 hodin je přenos méně pravděpodobný, ale se vzrůstající dobou přísátí nebezpečí nákazy roste. V jediném klíštěti může být totiž až půl milionů infekčních zárodků. Rizikovým zdrojem nákazy

mohou být také přisátá vývojová stádia (larva, nymfa), protože je vzhledem k jejich velikosti můžeme snadno přehlédnout. Velmi významná je u borelií přesná regulace exprese povrchových proteinů, tzv. Outer surface proteins (Osp). Na povrchu borelií v trávicím traktu klíštěte jsou exprimovány zejména proteiny OspA a OspB, které zde zastupují funkci adhezivních molekul. Při sání krve je exprese těchto proteinů snížena a zvýší se naopak exprese proteinu OspC. Ten umožňuje boreliím přechod z trávicího traktu do slinných žláz. Schopnost antigenu OspC je vázat imunoregulační protein Salp15, který je obsažený ve slinách klíštěte, čímž pomáhá bakteriím odolat imunitní reakci hostitele v iniciální fázi infekce. V diseminované fázi choroby se značně snižuje exprese proteinu OspC a začíná se objevovat protein VisE. VisE je významným lipoproteinem na povrchu borelie, vyznačující se vysokou antigenní variabilitou podmíněnou genovou rekombinací multidoménového VisE genu. Expresí VisE borelie aktivně omezují specifickou imunitní odpověď hostitele a mohou tak přejít do chronické fáze infekce, kde borelie dále exprimují molekuly vázající H-faktor. Ten je zapojený do regulace aktivace komplementu a pomáhá tak uniknout mechanismům nespecifické imunity. Zařazujeme sem povrchové proteiny Erp (OspE/F related proteins). Borelie také exprimují adhezivní molekuly, které jim umožní uchycení v pojivové tkáni. Nejvýznamnější z nich jsou tzv. Decorin binding protein (Dbp) A a B, Borrelia glycosaminoglycans binding protein (Bgp) se na povrchu borelií opět objevovat adhezivní proteiny OspA a OspB (Křupka et al., 2008).

„Borelie jsou nespecifické a naprosto výjimečné organizací svého genomu. Na rozdíl od jiných bakterií, u borelií tvoří extrachromozomální informace třetinu kódovaných genů. Borelie nesou lineární chromozom, který je netypický pro bakteriální buňku. Další zajímavou a velmi netypickou vlastností je, že nesou celou řadu jak cirkulujících, tak lineárních plazmidů, na kterých je kódována celá řada genů nutných pro přežití a infekciozitu. Například bez plazmidu cp32 je borelie neinfekční.“
(Křupka, 2019)

1.3.2 Imunitní odpověď organismu

V obraně organismu před boreliemi se uplatňují faktory buněčné a protilátkové odpovědi. K nejdůležitějším imunogenům, které vyvolávají specifickou imunitní odpověď organismu, patří povrchové proteiny Osp (OspA, OspB, OspC) a flageliny (bičíkové antigeny). Povrchové antigeny (Osp) mají celou řadu funkcí. Jednou z nich je, že váží plazminogen, díky kterému se borelie mohou diseminovat do krve. Patogenní borelie poté stimulují monocyty ke zvýšené sekreci urokinázy potřebné k aktivaci plazminu, který pomáhá boreliím pronikat do endotelu. Dalším imunogenem je flagelin (bičíkový protein). Protilátky proti flagelinu *B. burgdorferi* mohou reagovat zkříženě s bílkovinami CNS a podílet se tak na poškození tkání a orgánů. Hostitel si proto tvoří v časně fázi infekce proti tomuto proteinu protilátky třídy IgM (Bartůněk, 2013).

Protilátky proti LB se začínají objevovat poměrně pozdně, tj. několik týdnů po nákaze. Tvorba protilátek třídy IgM začíná po 2–4 týdnech a je následována tvorbou protilátek třídy IgG, které jsou detekovatelné od 4. až 8. týdne (Steere, 2010).

Přetrvávají dlouhodobě a jejich samotný nálezný po onemocnění je fyziologický a sám o sobě není důvodem k opakování antibiotické léčby. Protilátky třídy IgM mohou přetrvávat v organismu dlouho po infekci, uvádí se i roky (Madigan et al., 2015).

Obecně se pozitivita v séru u osob v ČR pohybuje v rozmezí 10–15 %. V některých profesích, např. u lesních dělníků, je však séropozitivita vyšší. U všech osob není příčinou aktivní onemocnění LB, ale pouze přítomnost paměťových protilátek. Paměťové protilátky organismus většinou vytvoří jako reakci na antigenní podnět, aniž by došlo ke klinické formě tohoto onemocnění. Dalším důvodem positivity protilátek může být zkřížená protilátková odpověď na jiné spirochetální bakterie (Roháčová, 2013).

1.4. Klinické příznaky

Klinické příznaky jsou u onemocnění LB velmi rozmanité. Onemocnění se rozděluje do 3 stadií. Prvním stadiem je časné lokalizované stadium, jehož nejtypičtějším projevem je *erythema migrans* (EM). Nutné je však zdůraznit, že ne u

všech nemocných, u kterých posléze dojde k projevům dalších stadií, je migrující erytém v anamnéze (Hildenbrand et al., 2009).

U prvního stadia se mohou projevovat i další nespecifické potíže, kterými jsou chřipkové příznaky či lymfadenitida. Během následujících týdnů až měsíců přechází infekce do druhého časné diseminovaného stadia s možnými projevy akutní neuroboreliózy, postižením muskuloskeletálního aparátu a kůže tzv. boreliového lymfocytomu, nebo sekundárního EM. Vzácné jsou také kardiální či oční formy postižení. Ve třetím stadiu pozdní diseminace je charakteristická zvýšená únava, může být postižena rovněž nervová soustava, dále může dojít ke kožním projevům ve formě *acrodermatitis chronica atropicans* (ACA) i k chronickým zánětlivým postižením kloubů (lymeská artritida). Postižení nervové soustavy při LB je poměrně časté. Uvádí se, že nervová soustava je postižena v 10–15 % všech případů onemocnění LB (Beneš, 2009).

Bylo zjištěno, že se u pacientů mohou vyskytovat symptomy více stadií zároveň, nebo se může onemocnění již od počátku manifestovat symptomy dalších stadií. V některých případech mohou příznaky vymizet spontánně bez léčby a nepřecházet do chronické formy. Průběh onemocnění bývá tedy vždy individuální a velmi variabilní. Infekce nejčastěji postihuje kůži, ale také muskuloskeletální a nervový systém. Inkubační doba se liší dle jednotlivých forem průběhu onemocnění. V chronickém stadiu se může jednat o týdny až roky (Roháčová, 2005).

1.4.1 Časné lokalizované stadium

Časné lokalizované stadium je první fází onemocnění LB. Toto stadium infekce se vyskytuje u 30–80 % infikovaných a má klinicky velmi charakteristický vzhled. V místě přisátí se objevuje erytém v podobě růžové či červené skvrny nazývaný *erythema migrans* (EM). Dalším projevem může být také boreliový lymfocytom (BL) (Lacina et al., 2011).

1.4.2 Časně diseminované stadium

Pro toto stadium je charakteristický hematogenní výsev borelií do celého organismu, který se vyskytuje v průběhu několika dnů až týdnů po infikování organismu (Votava, 2003).

Typickým kožním projevem je *erythema multiple*, vyznačující se přítomností dvou a více EM. Pravděpodobně jde o důsledek diseminace borelií z primárního ložiska, přičemž sekundární léze jsou bledší, menší a objevují se po několika dnech po primárním EM. Obvyklé bývá také postižení neurologického, revmatologického, dermatologického a kardiálního rozsahu. Další orgánové manifestace jsou již vzácnější, například u postižení oka. Kromě postižení konkrétních orgánů bývá LB doprovázena často také nespecifickými projevy (únava, subfebrilie, bolesti hlavy, svalů, kloubů, lymfadenitida...), které se mohou objevovat také v časně lokalizovaném stadiu (Prokeš, 2015a)

1.4.3 Pozdní diseminované stadium

Projevy tohoto stádia se objevují v řádu měsíců až let. Typickým znakem je chronické postižení kůže, označované jako chronická atrofická akrodermatitida (ACA). ACA představuje přibližně 1 % všech kožních manifestací. Rozlišujeme zánětlivou a atrofickou fázi. Zánětlivá fáze později přechází do fáze atrofické, kde je postižená kůže přirovnávána k cigaretovému papíru a prosvítá žilní kresba. Kromě kožních manifestací se mohou vyskytovat i jiné projevy, například lymeská artritida, lymeská karditida, polyneuropatie nebo chronická uveitida (Prokeš, 2015b)

1.5 Postižení jednotlivých systémů

1.5.1 Postižení kůže

Kožní formy LB jsou ve srovnání s ostatními manifestacemi onemocnění nejčastější a vyskytují se ve všech stádiích onemocnění. Jsou reprezentovány dermatózami, u kterých je jediným původcem Bb, a dermatózami u kterých je kromě etiologického agens Bb i nějaká další příčina. Do první skupiny dermatóz řadíme

erythema migrans (EM), boreliový lymfocytom (BL) a *acrodermatitis chronica atrophicans* (ACA). Do druhé skupiny můžeme zařadit *lichen sclerosus et atrophicus*, nebo některé druhy sklerodermie (cirkumskriptní). Z kožních bioptických vzorků jsou nejčastěji izolovány druhy *Borelie afzelii* (až 75 %). Obecně jsou kožní postižení poměrně dobře léčitelné (s výjimkou atrofické fáze ACA) a byly popsány mezi prvními příznaky LB (Bartůněk, 2013).

1.5.1.1 Erythema migrans

EM se projevuje přibližně 7-10 dní po přisátí klíštěte. Inkubační doba u EM se udává mezi 3 až 180 dny. Erytém se v místě přisátí klíštěte postupně zvětšuje a můžeme pozorovat také centrální výbled – prstenec šířící se směrem do okrajů. Diagnózu podporuje průměr erytému alespoň 5 cm, dosahovat může ale i několika desítek centimetrů. U dětí může být vyskytující se erytém menší. EM nevystupuje nad povrch kůže, nebývá bolestivý a může mírně svědit. Postižená kůže může být na pohmat teplejší a citlivější. Až u poloviny nakažených bývají popisovány systémové příznaky – únava, malátnost, cephalgia, artralgie. Rozlišujeme 3 druhy EM. EM představuje až 85 % všech kožních forem a bez léčby vymizí do několika týdnů či měsíců. Po antibiotické léčbě pak za několik dnů (Prokeš, 2015b).

U primárních EM rozlišujeme 3 klinické typy:

- 1. *Erythema migrans maculare*** – homogenní, bez centrálního výbledu (obr. 1)



Obrázek 1 *Erythema migrans maculare* (Zdroj: Prokeš, 2015)

2. *Erythema migrans annulare* – centrální výbled, červený lem na okraji (obr. 2)



Obrázek 2 *Erythema migrans annulare* (Zdroj: Prokeš, 2015)

3. *Erythema migrans concentricum* – erytém tvoří koncentrické kružnice, střídá se červená a bílá barva kůže, v anglické literatuře označováno jako bull's eye rash (obr. 3)



Obrázek 3 *Erythema migrans concentricum* (Zdroj: Prokeš, 2015)

1.5.1.2. Boreliový lymfocytom

Boreliový lymfocytom (BL) někdy označován jako *Lymphadenosis benigna cutis*, nebo boreliový pseudolymfom, je červenofialová papula s hladkým obvykle lesklým povrchem. V průměru může mít až několik centimetrů (Lacina et al., 2011).

Nejčastěji vzniká v místě přisátí klíštěte během 1-70 dnů. Predilekčními místy jsou ušní lalůčky, špička nosu, někdy však také *areoly* a *scrotum*. BL je obvykle solitární, ojediněle se v jedné lokalizaci mohou vyskytnout uzlíky dva a více. Subjektivně nepůsobí žádné obtíže a v 16 % může být doprovázen regionální lymfadenitidou. BL

klinicky rozlišujeme na typ *papulare* a *infiltratum*. BL představuje 3–5 % všech kožních forem onemocnění (Prokeš, 2015a).

1.5.1.3 Acrodermatitis chronica atrophicans (ACA)

Acrodermatitis chronica atrophicans (ACA) je pozdní a dlouhotrvající formou LB, která může být přítomna po mnoho let. Vyznačuje se červenými nebo modročervenými lézemi vedoucími k rozsáhlé atrofii kůže, která se stává čím dál výraznější. ACA je nejčastěji lokalizována na končetinách, ale může postihnout i jiné oblasti kůže, například obličej. V literatuře se uvádí, že k ACA jsou více náchylnější ženy. ACA se může vyskytovat v kterékoli věkové skupině, nejčastěji však u osob ve věku 40-50 let, u dětí jen zřídka. ACA se projevuje během přibližně 6 měsíců až 8 let po kousnutí klíštětem. U pacientů s ACA se mohou objevit také revmatologické, nebo neurologické příznaky, například periferní neuropatie, artropatie. Symptomy neuropatie jsou patrné u více než poloviny pacientů s ACA (Moniuszko-Malinowska et al., 2018).

1.5.2 Postižení kloubů-lymeská artritida

Postižení pohybového aparátu je typickou manifestací pozdní fáze infekce přibližně u 60 % neléčených pacientů zejména v Severní Americe. U pacientů trpících lymeskou artritidou (LA) se objevuje monoartikulární nebo oligoartikulární artritida, postihující nejčastěji velké klouby, zejména kolena. Méně častěji mohou být pak postiženy i jiné klouby jako kotník, loket, nebo zápěstí. Zánětlivé projevy se mohou objevovat ale i u jiných struktur, nejedná se tedy pouze o postižení kloubů, ale i o muskuloskeletální postižení (Hatchette et al., 2014).

Pokud není LA léčena, může přetrvávat měsíce až roky, anebo může samovolně odeznít. Mohou se také vyskytovat syndromy artralgie, myalgie nebo fibromyalgie, nejsou však hlavními kritérii pro LA. V případě polyartritidy malých kloubů je třeba zvážit i jiné diferenciální diagnózy, například zdali se nejedná o revmatoidní artritidu (polyartritida je u LA atypická) (Stanek et al., 2011).

1.5.3 Postižení nervového systému

Postižení nervového systému se může projevit v časném i pozdním stadiu infekce. V časném diseminovaném stadiu se postižení objevuje u 10–40 % pacientů s neléčeným EM. Neurologické projevy představují až 25 % všech klinických manifestací LB a jsou druhou nejčastější manifestací po kožních formách. Postižen může být centrální i periferní nervový systém (Prokeš, 2015a).

1.5.3.1 Časná neuroborelióza

Častým projevem je aseptická meningitida, projevující se horečkou, meningeální příznaky zejména u dospělých často chybí. Může být doprovázena parézou hlavových nervů, zejména *n. facialis*, méně často *n. oculomotorius*, *n. trochlearis* a *n. abducens*. U dospělých pacientů je relativně častá také radikulitida, která spolu s aseptickou meningitidou a parézou hlavových nervů tvoří tzv. Garinův-Bujadouxův-Bannwarthův syndrom (meningopolyradikuloneuritida, Bannwarthův syndrom) (Smíšková et al., 2017).

Tento syndrom se vyznačuje radikulárními bolestmi, defektem kožního cití, parézami končetin a oboustrannými obrnami *n. facialis*. V likvoru pak nalézáme typický obraz lymfocytární pleocytózy – aseptického zánětu (Prokeš, 2015b).

V diagnostice je však náročnější tzv. nekompletní Bannwarthův syndrom, kdy nedochází k paréze hlavových nervů. U dospělých pacientů je tak prakticky jediným klinickým příznakem radikulární bolest. Zánět míšního kořene může progredovat až k paréze postižené končetiny nebo svalů (např. trupu, břišní stěny) (Smíšková et al., 2017).

1.5.3.2 Pozdní neuroborelióza

Pozdní neuroborelióza může probíhat jako progresivní encefalomyelitida doprovázena poruchami paměti, emocí, změn v chování, poruchami osobnosti, narušením spánkového režimu, depresemi až demencí. Může také probíhat jako chronická polyradikulitida a polyneuritida vyznačující se asymetrickými

parestéziemi, bolestmi, poruchami v kořenových oblastech a na distálních částech končetin. Tyto poruchy jsou významným problémem v rámci diferenciální diagnostiky LNB a jsou často zaměňovány za onemocnění s podobnými projevy, například za diskopatii, neurosarkoidózu, *sclerosis multiplex* (Smíšková et al., 2017).

Pro stanovení správné diagnózy je nezbytné kvalitativní vyšetření likvoru doplněné o sérologické vyšetření a PCR (Bartůněk, 2013).

1.5.4 Postižení srdce

Kardiální komplikace v důsledku LB jsou označovány jako lymeská karditida. Vyskytuje se u 4-10 % pacientů, a to zejména u těch, kteří nebyli léčeni ATB již v akutní fázi infekce. Typickou kardiální manifestací jsou poruchy tvorby a vedení vzruchu, perikarditida, myokarditida, vzácněji pak pozdější přechod do zánětlivé dilatované kardiomyopatie (Vojáček et al., 2019).

1.5.5 Zrakové postižení

Oční projevy LB jsou velmi rozmanité a mohou se objevit ve všech fázích infekce, avšak častěji se projevují ve druhém a třetím stadiu. Oční poruchy způsobené boreliózou se velmi těžce rozlišují od náhodné koincidence z jiných příčin, zejména pak v endemických oblastech, protože žádné zrakové postižení není patognomické pro boreliózu. Poškození zraku se může projevit jako konjunktivitida, episkleritida, keratitida, uveitida, městnavá papila, neuropatie optického nervu, případně také formou parézy okulomotorických nervů (Bartůněk, 2013).

1.5.6 Postboreliový syndrom

I přes vhodnou antibiotickou léčbu se až u 10 % pacientů s LB mohou objevovat přetrvávající bolesti pohybového aparátu (bolesti kloubů, svalů), celková únava a kognitivní dysfunkce. Tento stav bývá označován jako Post-Lyme Disease Syndrome (PLDS). Léčba tohoto syndromu zatím není známá, avšak opakované podávání

antibiotik není pro pacienty přínosné a je spojováno s nejrůznějšími riziky. U většiny pacientů přetrvávající obtíže postupem času samy odezní (Scieszka et al., 2015).

Odborníci se domnívají, že přetrvávající příznaky jsou způsobené v důsledku reakce imunitního systému na perzistující borelie ve tkáních (CDC, 2019).

1.6. Prevence

K ochraně proti LB není doposud k dispozici žádná očkovací látka, vyvíjí se ale rekombinantní vakcína z evropských druhů borelií a prozatímní studie potvrzují proveditelnost použití ferritin 2 k vývoji vakcín proti klíšťatům (Hajdušek et al., 2009).

Proto je nejlepším preventivním opatřením před LB prevence přisátí klíštěte. Důležitý je vhodný oděv nejlépe s dlouhými rukávy a nohavicemi, který by měl být z hladké látky světlé barvy. Obuv by měla být pevná a vysoká. Hladký povrch znemožňuje klíštěti přisátí a světlá barva umožňuje snadnější detekci klíštěte na povrchu oděvu před přisátím (Kerles, 2015).

Jinak je ale barva zcela irelevantní, protože parazit se zrakem neorientuje. K hledání hostitele využívá chemoreceptor, tzv. Hallerův orgán, který je uložený na končetinách. Vhodná je též ochrana repelentními prostředky, které zabraňují přisátí klíštěte (Lacina et al., 2011).

1.7 Léčba

Léčba se zahajuje na základě klinických příznaků podpořených pozitivními laboratorními testy. Jen v případě, že máme podezření na *erythema migrans*, je ATB terapie indikována jen podle klinického nálezu. Vyšetření protilátek je v tomto stadiu nemoci zbytečné, protože je obvykle ještě nelze detekovat. Základní skupiny ATB, které jsou účinné na léčbu boreliové infekce, jsou tetracykliny, penicilinová antibiotika, cefalosporiny, případně pak makrolidy. U časných projevů boreliové infekce je většinou ATB terapie úspěšná. V pozdním stadiu jsou pak zvažovány i imunopatologické procesy, u kterých je efekt ATB minimální. Opakování ani prodlužování léčby obecně

není doporučováno, protože dlouhodobá léčba antibiotiky může mít řadu nežádoucích účinků (výrazné střevní dysmikrobie, postantibiotické kolitidy) (Smíšková et al., 2017).

1.8 Laboratorní diagnostika

Diagnostika onemocnění se zakládá především na klinických příznacích podložených laboratorními nálezy. Diagnosticky významný je také údaj o době přisátí klíštěte s následným rozvojem EM, popř. s dalšími pozdními kožními projevy (boreliový lymfocytom, ACA). U mnoha pacientů údaj o přisátí chybí, což ale diagnózu boreliózy nevylučuje. Mohlo dojít k přehlédnutí klíštěte, nebo k přisátí larvy či nymfy, která je hůře viditelná. Pro diagnostiku jsou významné i další charakteristické příznaky, zejména pak kloubní a neurologické (Smíšková et al., 2017).

1.8.1 Přímé laboratorní metody

Přímé metody jsou využívány k přímému průkazu agens. Jsou sice specifické, avšak málo citlivé, a proto se k průkazu boreliózy využívají výjimečně. Kultivace bakterie je sice možná, ale je velmi málo citlivá a časově i technicky náročná. Mikroskopické vyšetření na přítomnost borelií je málo senzitivní a v případě, že u vyšetřovaného materiálu nejsou použity monoklonální protilátky, tak i málo specifické. Z tohoto důvodu je jedinou přímou metodou, kterou lze v diagnostice použít, PCR borelií. Tato metoda může prokázat přítomnost nukleové kyseliny *B. burgdorferi* v různých vzorcích, avšak také má své limity. Senzitivita metody se odvíjí od druhu vyšetřovaného materiálu. Zatímco u vzorku tkáně z biopsie kůže nebo synoviální tekutiny může dosahovat až 75 %, v mozkomíšním moku může při použití jednoho amplifikačního systému dosáhnout maximálně 15–35 % (Smíšková et al., 2017).

Klinická využitelnost této metody je omezena nízkou citlivostí (zejména u vzorků krve) a potenciální kontaminací (Moore et al., 2016).

1.8.2 Nepřímé laboratorní metody

Sérologická diagnostika LB spočívá ve dvoustupňovém testování a je založena na průkazu časných (IgM) a pozdních (IgG) imunoglobulinů. Protilátky třídy IgM se tvoří většinou 3. až 6. týden od přisátí klíštěte, poté jejich hladina v krvi obvykle klesá. Protilátky třídy IgG se tvoří nejvíce v 6. až 10. týdnu od přisátí klíštěte, následně jejich syntéza pozvolna klesá, ale může přetrvávat i několik let (Kybicová et al., 2018).

Zároveň jsou nepřímé testy pro diagnostiku LB jako jediné schváleny americkou správou potravin a léčiv (FDA). Pro zvýšení specifčnosti sérologického testování bylo doporučeno dvoustupňové testování. V prvním kroku se používá citlivý enzymový imunotest (EIA), méně často pak nepřímý imunofluorescenční test (IFA). Pokud je test negativní, neprovádí se žádné další testování. Pokud je test hraniční nebo pozitivní, dochází ke druhému stupni testování, kdy je vzorek znovu testován pomocí Western blotu (WB) (Marques, 2015).

Western blot detekuje protilátky proti sadě předem vybraných proteinových antigenů *B. burgdorferi*. Reaktivita protilátky na tyto antigeny (značená pruhy na westernovém imunoblotu) nastane, pokud je intenzita zbarvení pruhů stejná, nebo intenzivnější než kontrolní proužek (Moore et al., 2016).

Pozitivní výsledky sérologických testů podporují diagnózu, ale nejsou rozhodující pro její stanovení. Sérologické testy také neposkytují informace o délce trvání infekce, aktivitě a závažnosti infekce, účelnosti léčby ani o prognóze onemocnění (Dlouhý et al., 2011).

2. CÍLE PRÁCE

- Seznámit se s klinickým průběhem a epidemiologickými aspekty onemocnění Lymeskou boreliózou.
- Zaměřit se na nejvhodnější diagnostické metody stanovení hladiny specifických protilátek třídy IgG a IgM metodou ELISA a následné potvrzení přítomnosti protilátek proti specifickým antigenům pomocí imunoblotu.
- Pokusit se prokázat, zda Lymeská borelióza postihuje více určité věkové skupiny.
- Pokusit se prokázat souvislost počtu pozitivních vzorků s ohledem na roční období.

Hypotézy:

- H1 Předpokládáme, že existuje rozdíl v reaktivitě imunitního systému s ohledem na věk pacienta postiženého Lymeskou boreliózou.
- H2 Předpokládáme, že existuje rozdíl v počtu vzorků krve pacientů postižených Lymeskou boreliózou s ohledem na pohlaví v Jihočeském kraji vyšetřovaných v roce 2019 laboratoři Stafila.
- H3 Předpokládáme, že větší záchyt pozitivních vzorků zaznamenáme v letních měsících, jelikož výskyt Lymeské boreliózy má sezónní charakter.

3. METODIKA

3.1 Biologický materiál

Veškerá zpracovaná data v mé bakalářské práci byla získána v laboratoři Stafila k.s. v Českých Budějovicích na oddělení mikrobiologie. Zabývala jsem se výsledky pacientů vyšetřovaných v roce 2019. Vyšetření probíhalo pomocí dvoustupňového testování. Nejprve metodou ELISA, poté následovala u pozitivních a hraničních pacientů konfirmace metodou Western-blot. Vyšetřovaným materiálem bylo sérum pacientů.

3.2 ELISA

Metoda ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) slouží k detekci specifických protilátek třídy IgG a IgM. Jedná se o jednu z nejpoužívanějších imunochemických metod. Test je založen na sandwichovém principu (tj. pevná fáze s navázaným specifickým antigenem – protilátka z vyšetřovaného vzorku – konjugát). Soupravy mají vysokou diagnostickou citlivost a specifitu a jsou vhodné pro stanovení antiboreliových protilátek (TEST LINE Clinical Diagnostics, s.r.o., ČR, návody diagnostických setů EIA *Borrelia recombinant IgG/IgM*, 2019).

3.2.1 Princip testu EIA

K provedení testu EIA se používá mikrotitrační destička, která má v jednotlivých jamkách navázané antigeny, do kterých se přidává vzorek pacienta. Pokud vzorek obsahuje specifické protilátky, navážou se na antigeny v jamkách a vytvoří imunokomplex antigen-protilátka. Na tento komplex se poté naváže přidaná značená protilátka. Značená protilátka (konjugát) je zvířecí imunoglobulinová frakce proti lidským imunoglobulinům IgG a IgM a je konjugovaná křenovou peroxidázou. Peroxidázová aktivita je stanovena za pomoci TMB substrátu, který v případě positivity zmodrá. Na závěr se přidá zastavovací roztok, který celou reakci ukončí. Vlivem změny

pH dochází ke změně modrého zbarvení na žluté. Intenzitu žlutého zbarvení následně měříme fotometricky při vlnové délce 450 nm a je úměrná koncentraci specifických protilátek IgG/IgM ve vzorku (TEST LINE Clinical Diagnostics, s.r.o., ČR, návody diagnostických setů EIA Borrelia recombinant IgG/IgM, 2019).

V použitých komerčních soupravách III. generace EIA Borrelia recombinant IgG se používá kombinace vybraných částí specifických antigenů VlsE, p83, p58, p41i (interní flagelin), p39, OspA, OspB, OspC, OspE, p17 a NapA. Pro testování vzorků ve třídě IgM jsou v komerčních soupravách použity kombinace rekombinantních antigenů OspC (*B. afzelii*, *B. garinii*, *B. burgdorferi s.s.*, *B. spielmanii*) VlsE, interního flagelinu p41i, p39, p17 a OspE *B. burgdorferi s.l.* (TEST LINE Clinical Diagnostics, s.r.o., ČR, návody diagnostických setů EIA Borrelia recombinant IgG/IgM, 2019).

3.2.2 Laboratorní vybavení

Veškeré výsledky testů EIA použité v praktické části byly analyzovány na přístroji Agility v laboratoři Stafila k.s. v Č. Budějovicích. Přístroj Agility (obr. 4) je plně automatizovaný analyzátor řízený monitorovacím systémem, který umožňuje kontinuální manipulaci se vzorky a reagensy. Tento přístroj slouží ke stanovení protilátek IgG a IgM ve vyšetřovaných vzorcích. Analyzátor je vybaven třemi robotickými rameny – dvě pipetovací (vzorky + reagenty), jedno pro transport komponent. Dále je vybaven promývacím zařízením, které má 8 kanálovou promývací hlavu, fotometrem, 12 inkubátory (6 vyhřívaných +4 °C – 45 °C; 6 nevyhřívaných +4 °C) a čtečkou čárového kódu. Simultánně přístroj zpracuje až 16 reagenčních souprav, má kapacitu 12 mikrotitračních destiček včetně kontinuálního přidávání a disponuje kapacitou až 200 vzorků. Každý vyšetřovaný vzorek má unikátní čárový kód, který díky identifikačnímu systému zabezpečuje správné rozpoznání vzorku a eliminuje tak chybovost (TEST LINE Clinical Diagnostics, s.r.o., ČR, příbalový leták k přístroji Dynex Agility System 2019).



Obrázek 4: Přístroj Agility používaný v laboratoři Stafila k. s. pro metodu EIA
(Zdroj: Vlastní)

3.2.3 Reagencie a příprava vzorků

Použité komerční soupravy pro test EIA dodávané firmou TestLine obsahují:

Potaženou mikrotitrační destičku s navázaným antigenem, 12 x 8 jamek v sáčku dodávané společně se sušidlem 1ks

Negativní kontrolu (Kalibrátor 1) 5 U/ml, v podobě roztoku, neobsahujícího specifické lidské protilátky, v pracovním ředění, 2 ml v balení.

CUT – OFF (Kalibrátor 2) 20U/ml ve formě roztoku, obsahující specifické lidské protilátky v hraniční koncentraci, v již v pracovním ředění, 3 ml v balení.

Pozitivní kontrolu (Kalibrátor 3) 200 U/ml, roztok, který obsahuje specifické lidské protilátky, je připraven k přímému použití, balení obsahuje 2 ml.

Konjugát obsahující zvířecí imunoglobulin proti lidskému IgM nebo IgG, který je značen peroxidázou a je již v pracovním ředění, 15 ml v lahvičce.

Ředící roztok ve formě pufru se stabilizátory proteinů, který je určený k ředění vzorků, balení obsahuje 105 ml.

TMB – Complete 2, jednosložkový substrátový roztok obsahující TMB/H₂O₂, 28 ml v balení a dále se již neředí.

Promývací roztok, kterým je 20krát koncentrovaný pufr, balení obsahuje 75ml. Před použitím je nutné ho naředit v poměru 1:20.

Zastavovací roztok s naředěnou kyselinou, 15 ml v lahvičce, již v pracovním ředění.

(TEST LINE Clinical Diagnostics, s.r.o., ČR, návody diagnostických setů EIA Borrelia recombinant IgG/IgM, 2019).

K vyšetření jsou samozřejmě zapotřebí také vzorky pacientů, které byly dodány do laboratoře na požadované vyšetření. Vzorkem, který lze testem ELISA vyšetřit, může být: sérum, likvor, citrátová plazma a synoviální tekutiny, které se uchovávají při +2 až +8 °C maximálně 1 týden. Pokud je nutné skladovat vzorky delší dobu, musí být zmrazeny na -20 °C. Před použitím se musí všechny vzorky důkladně promíchat a zředit. V případě séra, se ředí v poměru 1:101 (10 µl vzorku a 1 ml ředícího roztoku vzorků), u likvoru se ředí 1:2 (110 µl likvoru a 110 µl ředícího roztoku), u synoviálních tekutin je ředěno 1:21 (20 µl vzorku a 400 µl ředícího roztoku) a 1:41 (10 µl vzorku a 400 µl ředícího roztoku) (TEST LINE Clinical Diagnostics, s.r.o., ČR, návody diagnostických setů EIA Borrelia recombinant IgG/IgM, 2019).

Další potřebné vybavení k manuálnímu provedení testu:

- Jedno a vícekanálové pipety
- Jednorázové špičky
- Termostat na 37 °C
- Promývací zařízení
- Stopky
- Fotometr pro mikrotitrační destičky

3.2.4 Pracovní postup

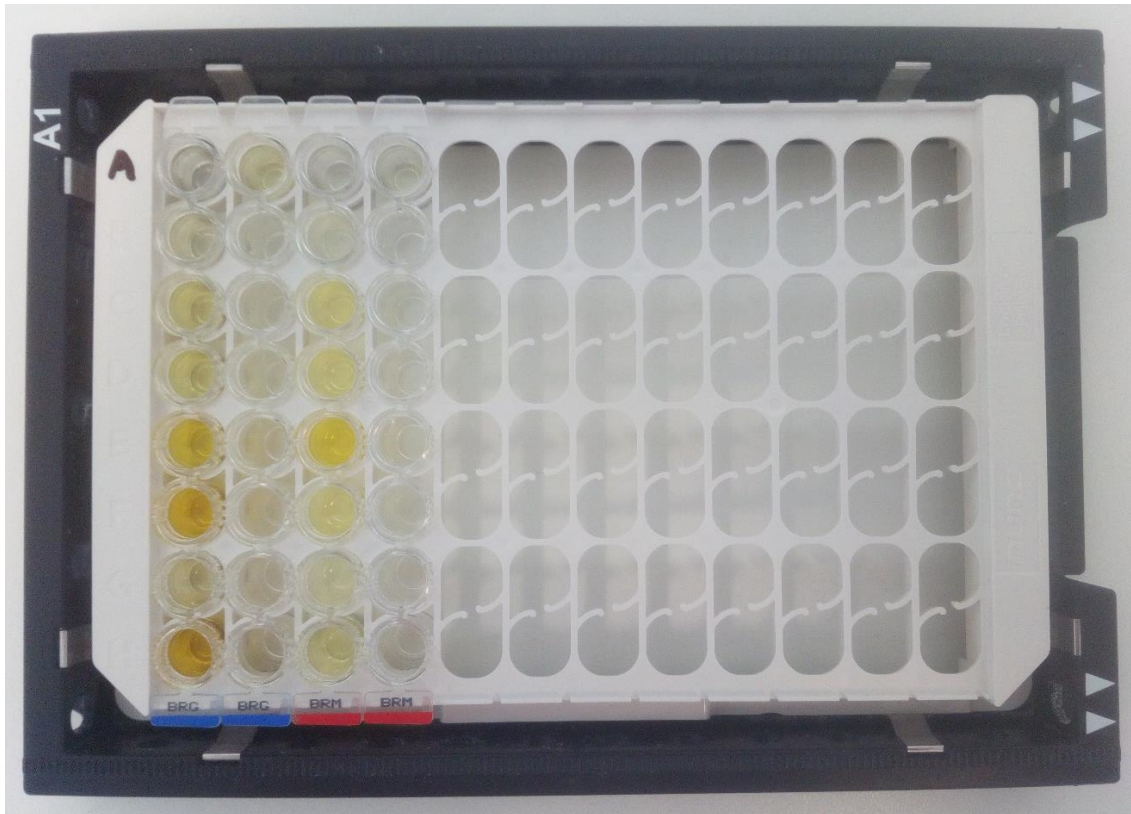
Před použitím jsem všechny reagenty vyndala z lednice a nechala je vytemperovat ve vodní lázni na laboratorní teplotu. Poté jsem roztoky ještě důkladně promíchala a byly připraveny k použití. Mikrotitrační destička má odlamovatelné stripy, nepoužijeme-li jí celou, zbylé stripy vrátíme zpět do obalu se sušidlem a hermeticky uzavřeme pro další použití.

V současné době je na většině pracovištích využíván hlavně automatizovaný systém, ale je možné i manuální provedení testu ELISA, a to pomocí následujícího postupu:

- Nejprve se naředí vzorky séra v poměru 1:101; tzn. 10 µl vzorku a 1 ml ředícího roztoku.
- Do jamek mikrotitrační destičky se dávkuje kontroly (kalibrátory) dle pracovního schématu (obr. 5)
 - první jamka se ponechá prázdná (blank).
 - do druhé jamky se pipetuje 100 µl negativní kontroly (Kalibrátor 1).
 - do následujících dvou jamek 100 µl CUT-OFF (Kalibrátor 2).
 - do dalších dvou jamek 100 µl pozitivní kontroly (Kalibrátor 3).
 - do zbývajících jamek se napipetuje 100 µl vzorků v odpovídajícím ředění.

- Destička se přikryje víčkem, a nechá se inkubovat 30 minut při 37°C.
- Po inkubaci se odsaje obsah jamek a 5krát promyje pracovním promývacím roztokem. Je důležité, aby se jamky plnily vždy po horní okraj. Po posledním promytí se zbytky roztoku důkladně vyklepnou do savé buničiny.
- Dále se do všech jamek kromě první jamky (blank) napipetuje 100 µl konjugátu.
- Destička se opět přikryje a nechá se inkubovat po dobu 30 minut při 37°C.
- Jamky se odsají a promyjí zase 5krát promývacím roztokem, nakonec se zbytky opět vyklepnou do buničiny.
- Do všech jamek se dává 100 µl TMB substrátu (tentokrát i do jamky blank).
- Necháme po dobu 15 minut inkubovat na 37 °C v temnu, přičemž je destička přikrytá víčkem.
- Po inkubaci je reakce ukončena přidáním 100 µl zastavovacího roztoku do všech jamek.
- Po zastavení reakce se fotometricky změří intenzita zbarvení roztoků proti blanku při vlnové délce 450 nm.

Po celou dobu se pracuje v rukavicích a s velkou opatrností, protože by se mohlo jednat o potenciálně infekční materiál. (TEST LINE Clinical Diagnostics, s.r.o., ČR, návody diagnostických setů EIA Borrelia recombinant IgG/IgM, 2019).



Obrázek 5: Mikrotitrační destička s napipetovanými vzorky a reagensy

(Zdroj: Vlastní)

3.2.5 Hodnocení výsledků

Po fotometrickém změření destičky zjistíme absorbanci vyšetřovaných vzorků. Absorbanci dále přepočítáváme na index pozitivity (IP). IP získáme po vydělení absorbance testovaného vzorku průměrnou absorbancí CUT-OFF naměřenou v téže sérii vyšetření:

$$IP = \frac{\text{Absorbance séra, likvoru, punktátu}}{\text{Průměrná absorbance CUT – OFF}}$$

Pro metodu EIA jsou stanoveny referenční meze, podle kterých se vzorky vyhodnocují jako pozitivní, hraniční, nebo negativní (Tabulka 1). Pokud je index pozitivity nižší než 0,9, výsledek je negativní. Vzorky s indexem pozitivity 0,9 až 1,1

jsou hodnoceny jako hraniční a je zapotřebí opakovat vyšetření za 2 až 6 týdnů z nově odebraného materiálu. Vzorky s indexem positivity větším než 1,1 jsou hodnoceny jako pozitivní.

Tabulka 1: Referenční meze metody EIA *Borrelia recombinant IgM/IgG*.

Index positivity (IP)	Hodnocení
nižší než 0,9	negativní
od 0,9 do 1,1	hraniční
vyšší než 1,1	pozitivní

Zdroj: TEST LINE, návod diagnostického setu EIA *Borrelia recombinant IgG*, 2019, TEST LINE, návod diagnostického setu EIA *Borrelia recombinant IgM*, 2019.

Odlišná je interpretace výsledků u vyšetření synoviální tekutiny. Hodnocení je založeno na porovnání IP dosažených při dvou odlišných ředěních vzorků, a to v poměru 1:21 a 1:41. Pokud je u obou ředění IP menší než 1,0, je výsledek negativní. V případě, že je hodnota u obou ředění větší než 1,0, je výsledek hodnocen jako pozitivní. Jako hraniční jsou vyhodnoceny vzorky, které mají IP v ředění 1:21 hodnotu větší než 1,0 a v ředění 1:41 menší než 1,0 (TEST LINE Clinical Diagnostics, s.r.o., ČR, návody diagnostických setů EIA *Borrelia recombinant IgG/IgM*, 2019).

3.3 Western blot

Jedná se o velmi citlivou a specifickou diagnostickou metodu používanou pro potvrzení výsledků zjištěných metodou ELISA. Využívá se po vyšetření metodou EIA u hraničních, nebo pozitivních výsledků a provádí se ve třídě IgG i IgM. Metoda je sice náročnější na provedení, ale dokáže ve vzorku detekovat přítomnost specifických protilátek proti jednotlivým antigenům, i ve velmi nízkých koncentracích. V současnosti je dostupných mnoho komerčních souprav, které snižují náročnost metody, ale jsou finančně poměrně nákladné. V komerčních soupravách jsou použity vysoce specifické rekombinantní boreliové antigeny, přesto se ve výjimečných případech může objevit zkřížená reaktivita s jinými mikroorganismy (např. *Escherichia coli*). Pro eliminaci

falešně pozitivních výsledků obsahuje testovací strip IgM antigen p18 (marker akutní infekce EBV) a testovací strip IgG antigen TpN17 (významný marker infekce syfilis) (TEST LINE Clinical Diagnostics, s.r.o., ČR, příbalový leták k přístroji BlueDiver, 2019).

3.3.1 Princip testu Western blot

Test je založen na principu enzymové imunoanalýzy. Jedná se o in vitro metodu, která se používá k detekci specifických protilátek IgG/IgM ve vzorku namířených proti rekombinantním antigenům borelií. Jednotlivé antigeny jsou naneseny na nitrocelulóзовou membránu, která je upevněná na plastové podložce. V průběhu testu se jednotlivé stripy inkubují společně se vzorky pacientů. Pokud se ve vzorcích nachází specifické protilátky, dochází k jejich vazbě na příslušné antigenní linie na stripu. Poté jsou stripy promyty a dále inkubovány s konjugátem, který vyvolá barevnou změnu proužků v místě komplexu (antigen-protilátka). Následná vizualizace je provedena inkubováním stripů společně se substrátovým roztokem. Po vybarvení se jednotlivé stripy vysuší a následně vyhodnotí.

Pro testování vzorků ve třídě IgG se používají antigeny: VlsE, p83, p58, p41, p39, OspB, OspA Ba, OspA Bg, OspA Bs, OspC, p17, NapA, p44, OmpA a specifický antigen *Treponema pallidum* TpN17.

Pro třídu IgM jsou použity antigeny: VlsE Bg, p83, p41, p39, OspC Ba, OspC Bg, OspC Bsp, OspC Bs a p17, p44, OmpA a specifický antigen EBV p18 (TEST LINE Clinical Diagnostics, s.r.o., ČR, návody diagnostických setů BLOT-LINE IgG/IgM, 2019).

3.3.2 Laboratorní vybavení

V laboratoři Stafila k. s. se metoda Western blot provádí na přístroji BlueDiver (obr. 6). Plně automatizovaný systém přístroje BlueDiver umožňuje rychlé a přesné zpracování a vyhodnocení imunoblotů. Samotné vyhodnocení testů se dělá pomocí programu Imunoblot Software.



Obrázek 6: Příklad přístroje BlueDiver pro metodu Western blot používaný v laboratoři Stafila k. s. (Zdroj: Vlastní)

3.3.3 Reagencie a příprava vzorků

Komerční soupravy pro test Western Blot dodávané firmou TestLine obsahují:

Stripy – reakční proužky s nanesenými rekombinantními antigeny (obr. 7)

Pozitivní kontrolu – obsahující specifické protilátky, již v pracovním ředění

Negativní kontrolu – již v pracovním ředění

Konjugát – roztok obsahující zvířecí imunoglobulin značený alkalickou fosfatázou (AP) namířený proti lidskému imunoglobulinu

Univerzální roztok – slouží k promývání stripů a ředění vzorků

Substrátový roztok – nažloutlý roztok BCIP a NBT

Před stanovením se musí vyšetřované vzorky naředit univerzálním roztokem. U séra/plazmy se ředí v poměru 1:51 tzn. 30 µl séra + 1,5 ml roztoku. Vzorky likvoru se ředí v poměru 1:2 a synoviální tekutina 1:17,5. Po naředění se vzorky pečlivě promíchají na vortexu. Vyšetřované vzorky mohou být uchovávány maximálně 1 týden při teplotě +2 °C až +8°C. Pokud jsou vzorky již naředěné, je nutné je vyšetřit co nejdříve (TEST LINE Clinical Diagnostics, s.r.o., ČR, návody diagnostických setů BLOT-LINE IgG/IgM, 2019).

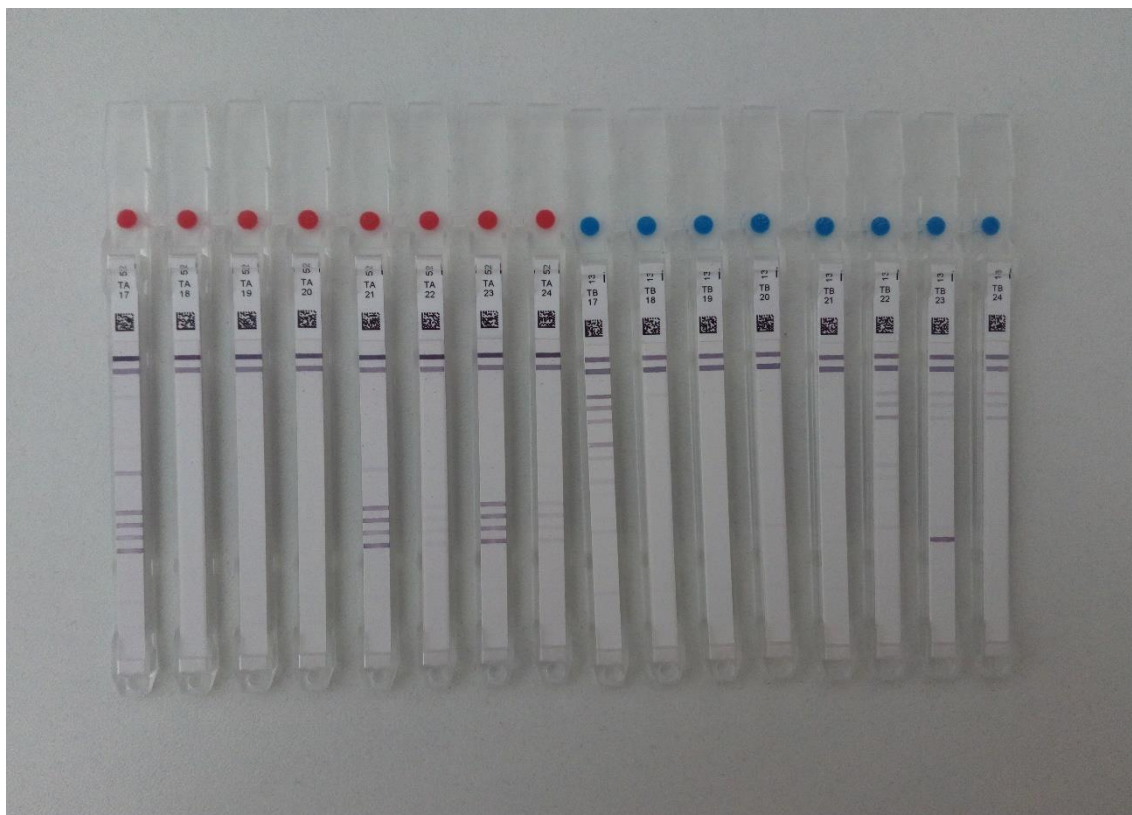
3.3.4 Pracovní postup

V současné době se na většině pracovištích využívá hlavně automatizovaný systém, ale metoda se může provést i manuálně, a to pomocí následujícího postupu.

Před použitím je nutné všechny reagentie nechat vytemperovat na laboratorní teplotu po dobu 30 minut. Nedoporučuje se, aby se před vytemperováním na požadovanou teplotu otevíraly, a to zejména testovací stripy, protože by mohly navlhnout. Nevyužité stripy je nutné vrátit zpět do obalu a pevně uzavřít pro další použití.

- Pomocí pipety dávkujeme 2 ml univerzálního roztoku a poté smáčíme stripy na třepačce po dobu 10 min. při laboratorní teplotě. Odsajeme promývací roztok.
- Naředíme si vzorky sér v poměru 1:51, tzn. 30 µl séra a 1,5 ml ředícího roztoku a poté pipetujeme spolu s kontrolami do jamek blotovací vaničky 1,5ml.
- Inkubujeme 30 min. při laboratorní teplotě na třepačce.
- Po uplynulém čase odsáváme a promýváme v univerzálním roztoku 3x 1,5 ml po dobu 5 minut za stálého kývání.
- Napipetujeme 1,5 ml konjugátu a inkubujeme 30 minut při lab. teplotě za stálého kývání.
- Odsajeme konjugát a stripy 3× promyjeme 1,5 ml univerzálního roztoku, vždy po 5 min. za stálého kývání.
- Pipetujeme 1,5 ml substrátu (BCIP/NBT) do každé jamky. Následně necháme inkubovat 15 minut (lab. teplota + třepačka).

- Odsáváme a promýváme v destilované vodě 2 × 2ml po 5 min., opět za stálého kývání.
- Vlhké stripy nalepíme do vyznačených rámečků na vyhodnocovacím protokolu, necháme zaschnout a poté hodnotíme výsledek reakce (TEST LINE Clinical Diagnostics, s.r.o., ČR, návody diagnostických setů BLOT-LINE IgG/IgM, 2019).



Obrázek 7: Blotovací stripy používané pro metodu Western blot (Zdroj: Vlastní)

3.3.5 Vyhodnocení testu

Testy se mohou vyhodnocovat vizuálně pomocí šablony, která je součástí soupravy nebo softwarově. My jsme výsledky hodnotily pomocí softwarového programu Immunoblot software v aktuální verzi (TEST LINE Clinical Diagnostics, s.r.o., ČR).

Všechny stripy se skenují scannerem do počítače, odkud se snímek načte do programu Immunoblot software. Vyhodnocení testu je založeno na intenzitě linií, jejich počtu a kombinaci. Linie jsou hodnoceny jako pozitivní, hraniční, nebo negativní. Na každém stripu se hodnotí také zbarvení kontrolní linie, která slouží ke kontrole funkčnosti a citlivosti testu a linie pro kontrolu přítomnosti příslušného konjugátu

(IgG/IgM). Pokud zůstanou tyto linie nezabarvené, tak se výsledky nemohou použít a test se musí opakovat. Vyhodnocení výsledků pro třídu IgM a IgG se provádí zvlášť (TEST LINE Clinical Diagnostics, s.r.o., ČR, návody diagnostických setů BLOT-LINE IgG/IgM, 2019).

3.3.5.1 Vyhodnocení pro třídu IgM

Přehled specifických antigenů:

- **VlsE Bg** – druhově specifický antigen, významný pro protilátkovou odpověď IgG
- **p83 Ba, p41 Ba, p39 Ba** – hlavní extracelulární protein (p83 Ba), vnitřní část flagelinu (p41 Ba), BmpA (p39) *Borrelia afzelii*
- **OspC Bs, Ba, Bsp, Bg** – vnější povrchový protein C, imunodominantní znak pro třídu IgM; druhově specifický antigen (*B. afzelii* (Ba), *B. garinii* (Bg), *B. burgdorferi sensu stricto* (Bs), *B. spielmanii* (Bsp))
- **p17 Bg** – vnější povrchový protein
- **p44, OmpA** – *Anaplasma phagocytophilum* – hlavní marker protilátkové odpovědi HGA (p44), významný faktor virulence (OmpA)
- **VCA-p18** – marker EBV infekce

Antigenní linie OspC, značí pozitivitu výsledku protilátek ve třídě IgM. Pokud nám protilátky třídy IgM s antigenní linií OspC vyjdou negativně nebo hraničně a hodnotí se dle následující tabulky:

Tabulka 2: Celkové vyhodnocení testu Western blot pro třídu IgM.

	VlsE, p83, p41, p39, p17		
Alespoň jedna linie OspC	2 pozitivní linie	1 pozitivní linie nebo 2 hraniční	bez linie nebo 1 hraniční linie
pozitivní linie	pozitivní	pozitivní	pozitivní
hraniční linie	pozitivní	pozitivní	hraniční
bez linie	pozitivní	hraniční	negativní

Zdroj: TEST LINE Clinical Diagnostics, s.r.o., ČR, návod diagnostického setu BLOT-LINE IgM, 2019.

3.3.5.2 Vyhodnocení pro třídu IgG

Přehled specifických antigenů:

- **VlsE Ba, VlsE Bg, VlsE Bs** – rekombinantně vyrobené, vysoce purifikované antigeny *Borrelia afzelii* (Ba), *B. burgdorferi sensu stricto* (Bs) a *B. garinii* (Bg)
- **p83, p58, p41, p39, p17** – hlavní extracelulární protein (p83 Ba), membránový transportér, marker diseminovaného stádia (p58), vnitřní část flagelinu (p41), BmpA (p39) *Borrelia afzelii*, – vnější povrchový protein (p17)
- **OspA Ba, OspA Bg, OspA Bs** – vnější povrchové proteiny A, antigeny časné protilátkové odpovědi, typický u neuroboreliózy
- **OspB** – vnější povrchový protein B, antigen pozdní protilátkové odpovědi
- **OspC** – vnější povrchové proteiny C, antigen časné protilátkové odpovědi
- **NapA** - (neutrofilní aktivační protein A) – silný imunogen, jeden z významných faktorů v patogenezi LA
- **p44, OmpA** – *Anaplasma phagocytophilum* – hlavní marker protilátkové odpovědi HGA (p44), významný faktor virulence (OmpA)

- **TpN17** – specifický antigen *Treponema pallidum*

Antigenní linie VIsE Ba, Bg i Bs jsou pro detekci protilátek ve třídě IgG nejcitlivější a pokud je jsou tyto linie zabarveny, je vzorek pozitivní na Lymeskou boreliózu. V časných stádiích onemocnění může být ale výsledek hraniční, nebo negativní a hodnotí se dle následující tabulky:

Tabulka 3: Celkové vyhodnocení testu Western blot pro třídu IgG.

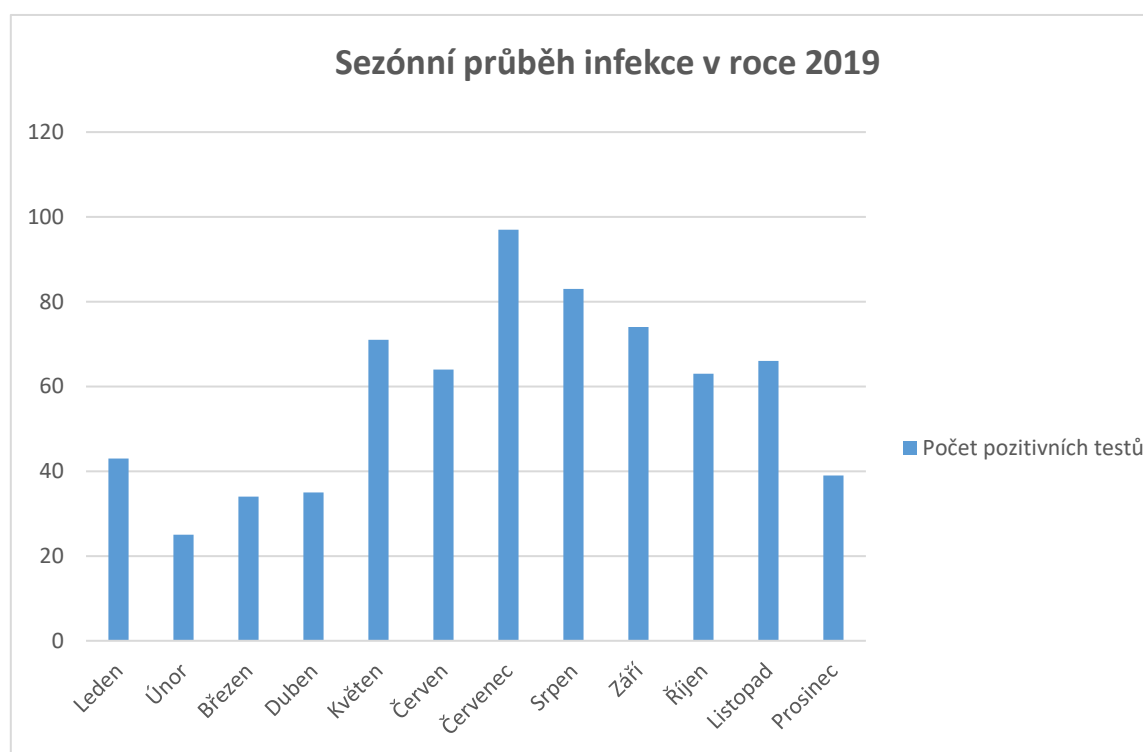
	p83, p58, p41, p39, p17, OspA, OspB, OspC, NapA		
Alespoň jedna linie VIsE	2 pozitivní linie	1 pozitivní nebo 2 hraniční linie	bez linie nebo 1 hraniční linie
pozitivní linie	pozitivní	pozitivní	pozitivní
hraniční linie	pozitivní	pozitivní	hraniční
bez linie	pozitivní	hraniční	negativní

Zdroj: TEST LINE Clinical Diagnostics, s.r.o., ČR, návod diagnostického setu BLOT-LINE IgG, 2019.

4. VLASTNÍ VÝSLEDKY

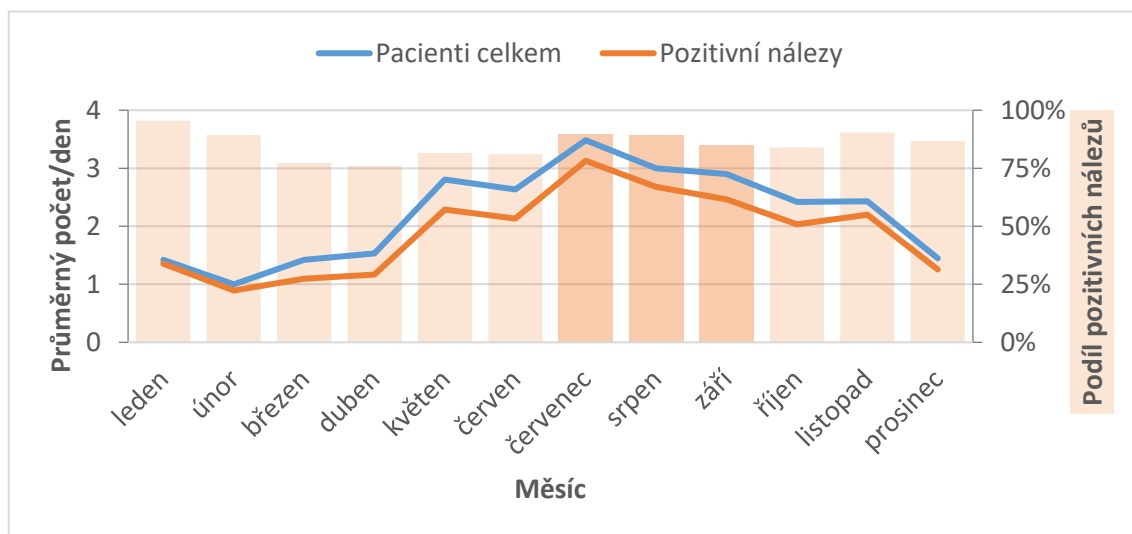
Veškeré použité výsledky testů ELISA a Western blot, ze kterých jsou zpracovány všechny grafy, mi byly poskytnuty laboratoří Stafila k.s. v Českých Budějovicích na oddělení mikrobiologie. Vyšetřovaným materiálem bylo sérum pacientů testovaných v roce 2019 a veškeré pozitivní a hraniční výsledky testů ELISA byly potvrzeny blotem. U hraničních výsledků se doporučuje opakovat vyšetření za 1-2 týdny.

Následující graf (graf 1) zobrazuje počet pozitivních pacientů s LB v průběhu roku 2019. Z grafu je zřejmá závislost výskytu LB na ročním období s maximem v letních měsících. Z toho je možné vyvodit, že se jedná o onemocnění sezónního charakteru. Počet infikovaných osob v jednotlivých měsících je silně ovlivněn také mikroklimatickými podmínkami (zejména teplotou a relativní vlhkostí vzduchu), které mají vliv na zvýšenou aktivitu klíšťat. Nejméně pozitivních výsledků za rok 2019 bylo zachyceno v únoru v celkovém počtu 25. Naopak nejvíce pozitivních výsledků bylo vyšetřeno v červenci v počtu 97.



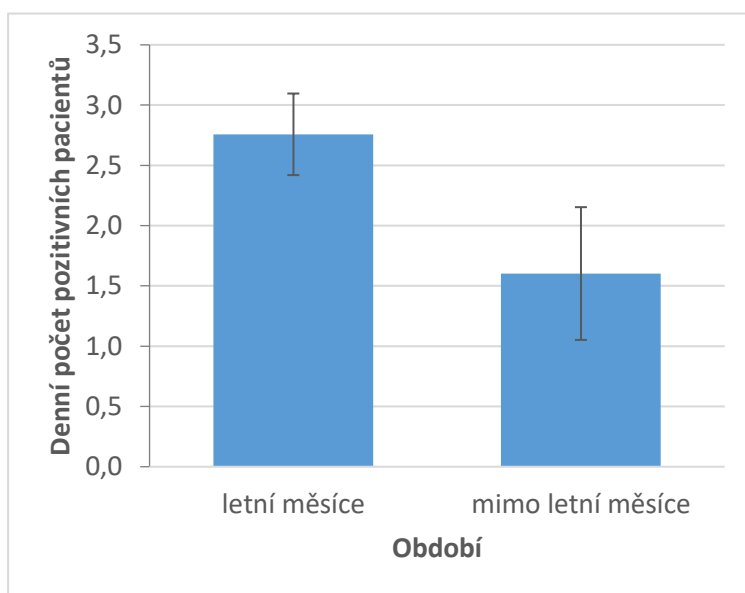
Graf 1: *Lymeská borelióza – sezónní průběh infekce v roce 2019 (Zdroj: Vlastní)*

V červenci bylo testováno 108 pacientů, bylo zjištěno 97 pozitivních nálezů (90 %). Za měsíc srpen bylo vyšetřeno 93 pacientů, zjištěno bylo 83 pozitivních nálezů (89 %). V září bylo vyšetřeno 87 pacientů, bylo u nich zjištěno 74 pozitivních nálezů (85 %). Tyto skutečnosti znázorňuje graf 2.



Graf 2: Průměrný počet a podíl pozitivních nálezů za den s ohledem na období (Zdroj: Vlastní)

V grafu 3 můžeme pozorovat statisticky významně vyšší počet pozitivních pacientů v letních měsících. Mimo letní měsíce je počet pozitivních pacientů nižší.



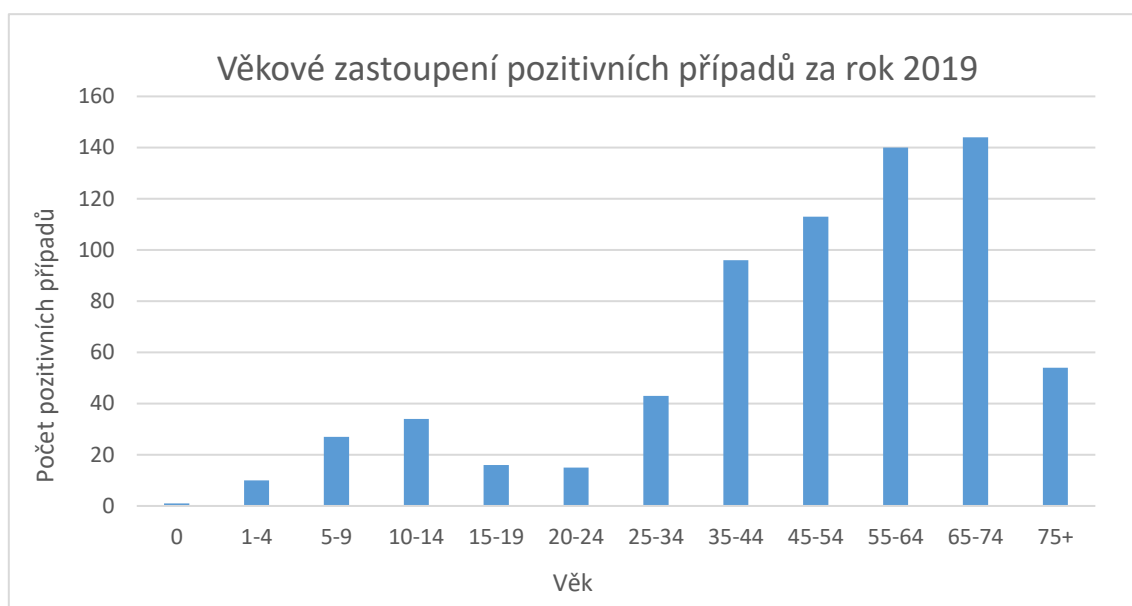
Graf 3: Statistická významnost pozitivních pacientů za určité období (Zdroj: Vlastní).

Tabulka 4: Parametrický T test k testování středních hodnot v závislosti na období.

Období	Denní počet pozitivních pacientů		T test
	průměr	sm.odchylka	p
letní měsíce	2,8	0,3	0,5 %
mimo letní měsíce	1,6	0,6	

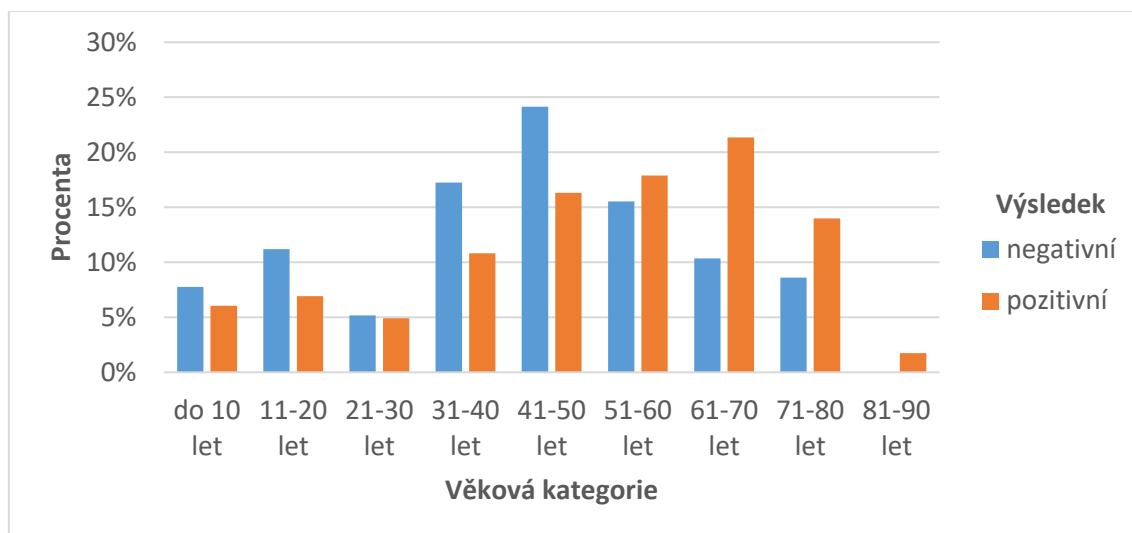
Zdroj: Statistik JČU

LB postihuje všechny věkové skupiny, ovšem výrazný vzestup nemocnosti zaznamenáváme po 30. roce života s maximem mezi 65-74 rokem (graf 4).



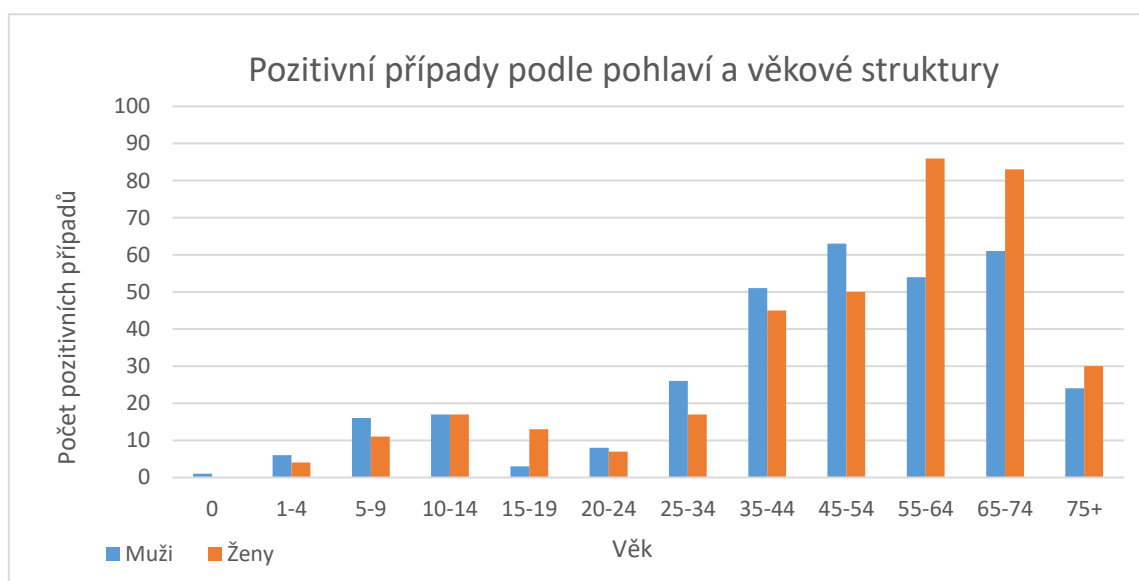
Graf 4: Věkové zastoupení pozitivních případů za rok 2019 (Zdroj: Vlastní).

Graf 5 zobrazuje procentuálně vyjádřené výsledky vyšetření ve srovnávaných skupinách. Můžeme tedy říci, že zastoupení věkových kategorií se u srovnávaných skupin liší a negativní výsledky se vyskytují spíše u mladších pacientů a naopak.



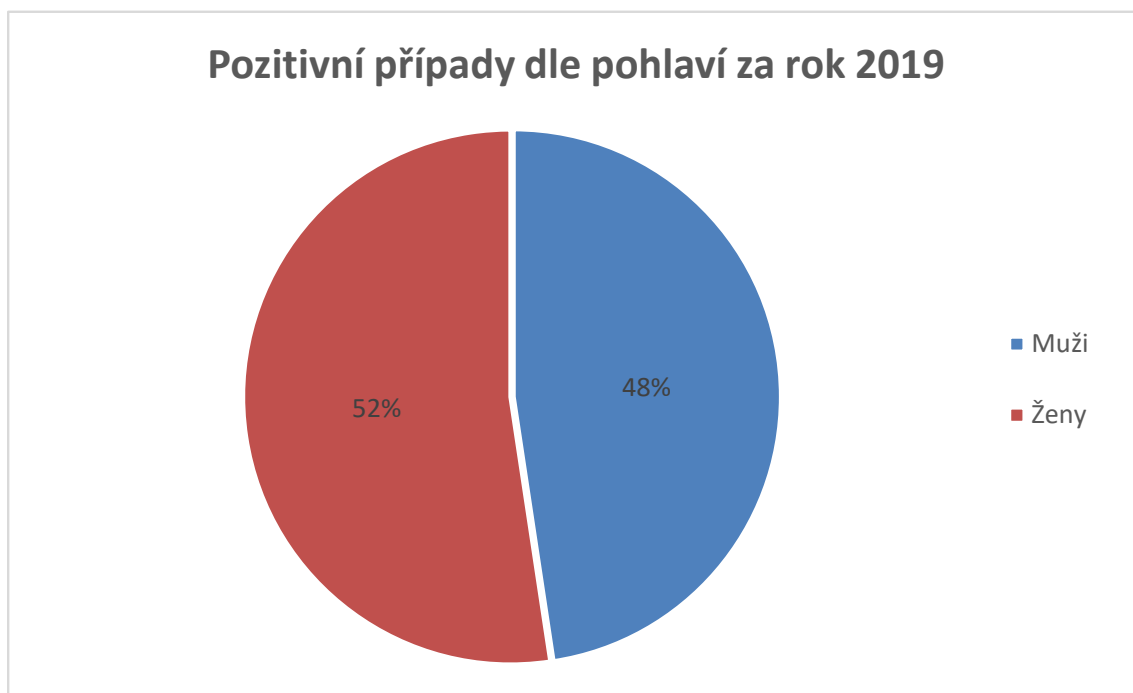
Graf 5: Zastoupení věkových kategorií – procentuálně vyjádřené výsledky vyšetření (Zdroj: Vlastní)

Graf 6 zobrazuje nemocnost pacientů za rok 2019 rozdělení podle věkové struktury a pohlaví a můžeme pozorovat maximum u žen mezi 55-64 rokem při celkovém počtu 86 testů a u mužů maximum mezi 45-54 rokem při celkovém počtu 63 pozitivních testů.



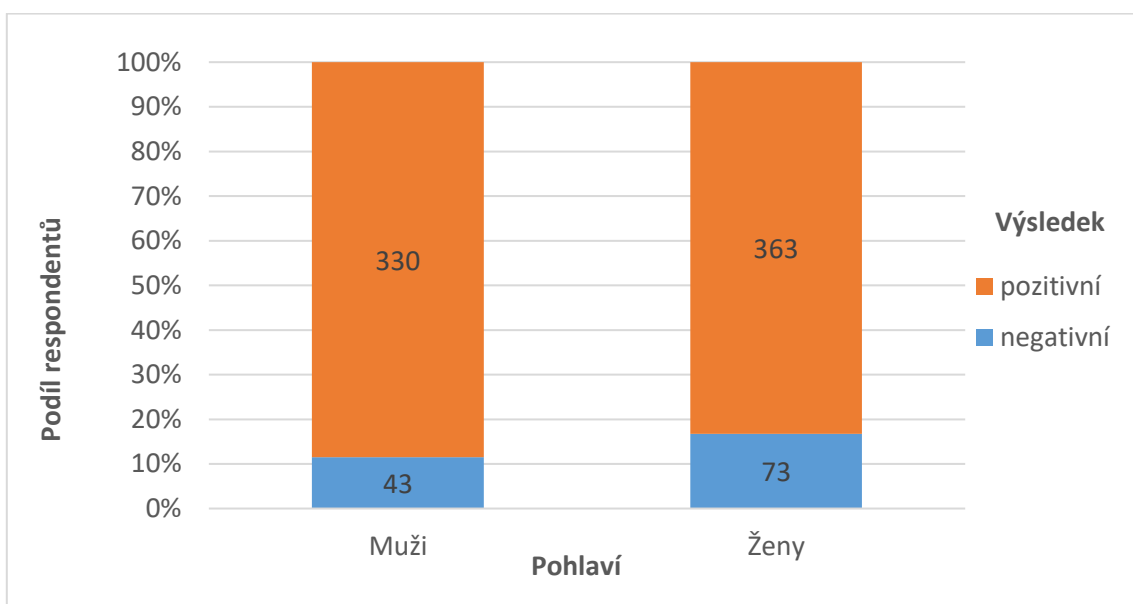
Graf 6: Pozitivní případy podle pohlaví a věkové struktury (Zdroj: Vlastní)

V roce 2019 bylo zjištěno 363 pozitivních výsledků u žen a 330 pozitivních výsledků u mužů (graf 7). Při srovnání pozitivních výsledků u obou pohlaví se ukázalo, že častěji jsou pozitivní ženy. Rozdíl mezi pohlavími jsou 4 % (33 pozitivních vzorků).



Graf 7: Pozitivní případy dle pohlaví za rok 2019 (Zdroj: Vlastní)

V grafu 8 jsou procentuálně znázorněné výsledky vyšetření u obou pohlaví. Můžeme tedy usuzovat o rozdílu pozitivních výsledků s ohledem na pohlaví.



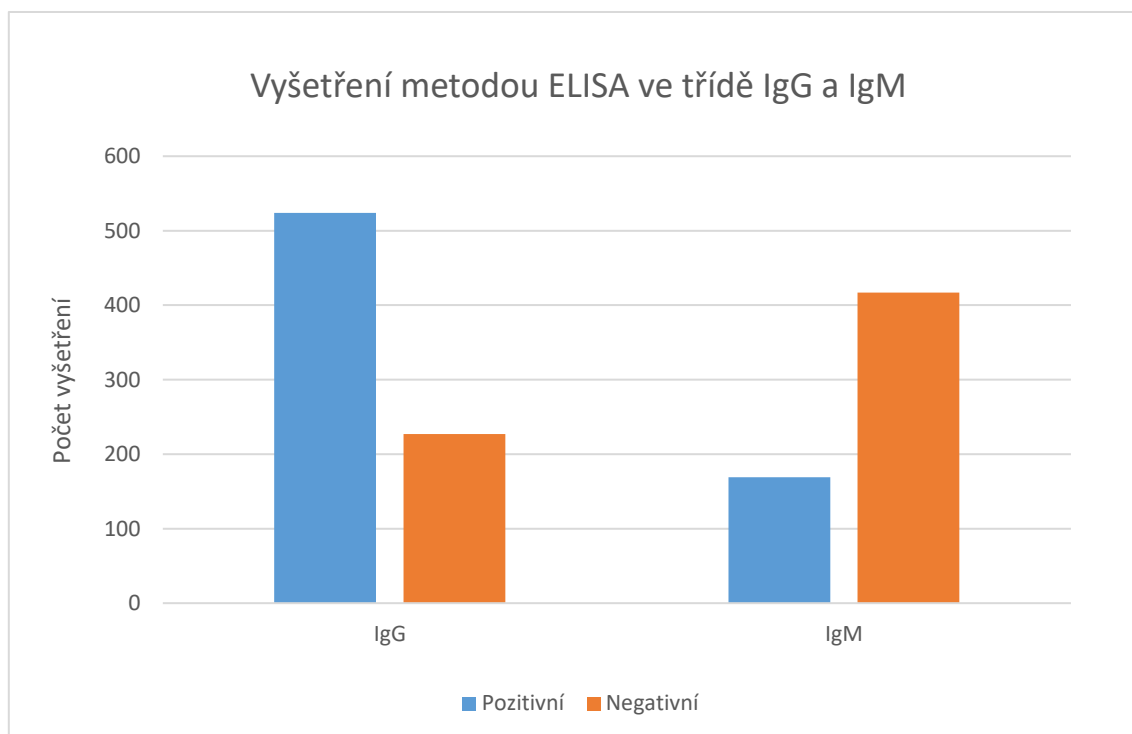
Graf 8: Procentuální vyjádřené výsledky vyšetření u mužů a žen. (Zdroj: Vlastní)

Tabulka 5: Test statistické významnosti v závislosti na pohlaví.

Pohlaví	negativní	pozitivní	celkem	očekávané		chí kvadrát test
Muži	43	330	373	53	320	p 3,5 %
Ženy	73	363	436	63	373	
Celkem	116	693	809	116	693	

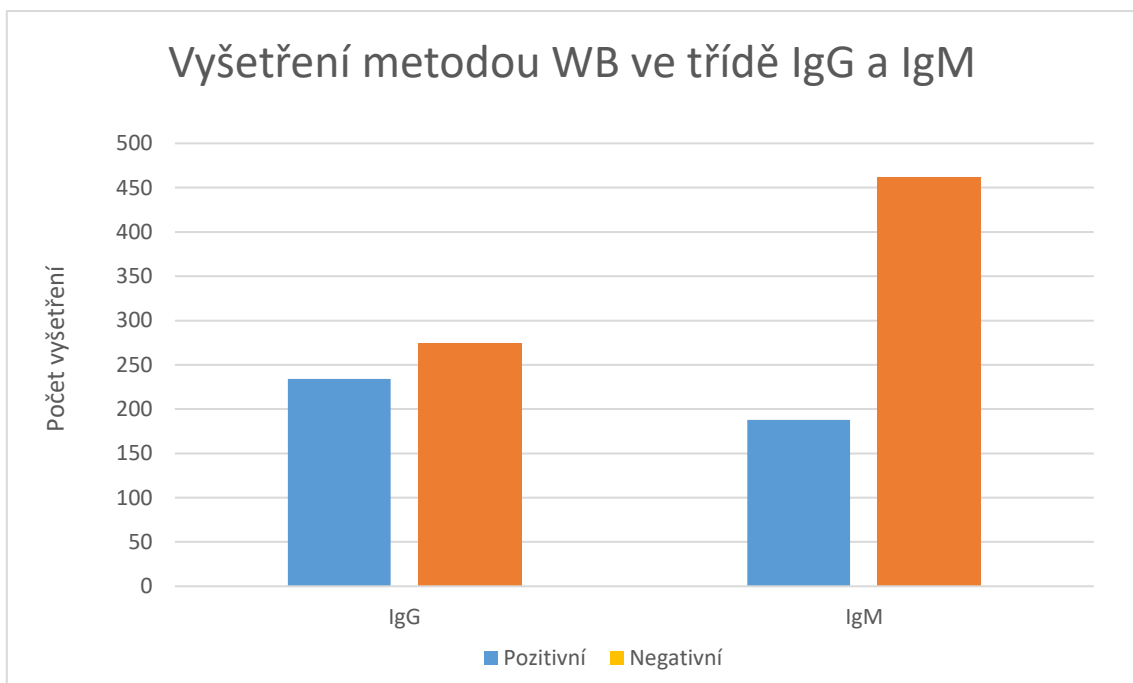
Zdroj: Statistik JČU

V dalším grafu (graf 9) můžeme pozorovat poměr pozitivních a negativních sér vyšetřených metodou ELISA. V každé třídě bylo vyšetřeno 2133 vzorků. Ve třídě IgG bylo zachyceno 524 pozitivních, 58 hraničních a 227 negativních vzorků. Z celkového počtu bylo ve třídě IgG pozitivních 25 % sér. Ve třídě IgM bylo zjištěno 169 pozitivních, 88 hraničních a 417 negativních vzorků sér. Z celkového počtu bylo ve třídě IgM pozitivních 8 % sér. Hraniční hodnoty nejsou v grafu uvedeny.



Graf 9: Vyšetření metodou ELISA ve třídě IgG a IgM (Zdroj: Vlastní)

Graf 10 zobrazuje vyšetření konfirmační metodou Western blot u výsledků, které v metodě ELISA byly vyhodnoceny pozitivní na lymeskou boreliózu. Celkem se jednalo o 693 pozitivních vzorků vyšetřených ve třídě IgG a 693 pozitivních vzorků ve třídě IgM. Ve třídě IgG bylo zjištěno 234 pozitivních, 185 hraničních a 274 negativních sér. Ve třídě IgM bylo zjištěno 188 pozitivních, 43 hraničních a 462 negativních sér. Ve třídě IgG bylo pozitivních sér 34 %, ve třídě IgM 27 %. Hraniční hodnoty nejsou v grafu uvedeny.



Graf 10: *Vyšetření metodou Western blot ve třídě IgG a IgM (Zdroj: Vlastní)*

5. DISKUZE

Diagnostika lymeské boreliózy je velmi náročná a nese s sebou řadu problémů, které komplikují lékařům stanovení správné diagnózy. Jedním z problémů jsou klinické příznaky LB, které jsou velmi rozmanité, některé i nespecifické a vyvolávají u každého pacienta odlišný průběh infekce. Každý lékař by měl tedy před stanovením diagnózy zhodnotit spolu s klinickými projevy pacienta i výsledky dalších vyšetření (např. biochemického), zhodnotit anamnézu pacienta eventuálně nechat laboratorně vyšetřit specifické protilátky proti infekci. Pouze v případě nálezu specifických protilátek v sérologickém vyšetření, který odpovídá klinickému obrazu LB, může být u pacienta stanovena diagnóza a zahájena antibiotická léčba. Výjimkou v podání antibiotik jsou klinicky jasné případy LB – *erythema migrans*, při jehož objevení lékař zahájí léčbu okamžitě i bez předchozího sérologického vyšetření. Léčba LB vychází z Doporučeného postupu diagnostiky a léčby lymeské boreliózy Společnosti infekčního lékařství České lékařské společnosti J. E. Purkyně (Krbková et al., 2018).

Protilátky se začínají tvořit po několika týdnech od přisátí klíštěte, a proto by se měla u pacientů, kteří mají klinické příznaky LB, ale negativní laboratorní výsledek, diagnostika zopakovat s časovým odstupem. Také je třeba zmínit, že až u desetin procent pacientů můžeme prokázat přítomnost protilátek IgG i přesto, že nemají žádné klinické příznaky. Příčinou může být již dříve prodělaná infekce, překonaná samotným imunitním systémem pacienta, nebo infekce přeléčená ATB. Tuto skutečnost je nutno zohlednit při hodnocení laboratorních výsledků, protože anamnestické protilátky mohou u pacientů přetrvávat až několik let. Z tohoto důvodu je zjišťování protilátek v séru pacienta bez klinického obrazu LB bezvýznamné a není důvodem k zahájení antibiotické léčby.

Další komplikací v diagnostice LB může být také zkřížená reaktivita – ve třídě IgG s bakterií *Treponema pallidum*, ve třídě IgM s virem EBV a bakterií *Escherichia coli* v obou třídách. Zkříženou reaktivitu se však daří eliminovat konfirmační metodou Western blot. V roce 2019 bylo v laboratoři Stafila k.s. v Č. Budějovicích metodou ELISA vyšetřeno 2133 pacientů s podezřením na LB. Každému pacientovi s podezřením na LB se vyšetřovaly specifické protilátky v séru v obou třídách. Metodou Western blot bylo vyšetřeno 839 pacientů. Vyšetřovaným materiálem bylo sérum, jehož odběr není náročný a nezatěžuje pacienta. Vyšetření lze provést také z mozkomíšního

moku či synoviální tekutiny, ale tyto materiály nejsou rutinním materiálem a odebírají se pouze ve specializovaných pracovištích.

Výskyt LB u sledovaných věkových skupin má stejně jako v minulých letech dvouvrcholovou distribuci. Výrazný vzestup byl zaznamenán po 30. roce života. Nejvíce pozitivních výsledků pak bylo zjištěno u starších pacientů ve věkovém rozmezí mezi 55-74 let s převahou u žen a také u mladších dětí ve věkovém rozmezí 5-14 let s převahou u chlapců. Hypotéza 1, která předpokládala, že existuje rozdíl v reaktivitě imunitního systému s ohledem na věk pacienta postiženého lymeskou boreliózou se nám potvrdila a tento výsledek je zcela v souladu s odbornou literaturou (Orlíková et al., 2019).

Hypotéza 2, která předpokládala, že existuje rozdíl v počtu pozitivních vzorků s ohledem na pohlaví byla také potvrzena, protože častěji byly infikovány ženy. Při srovnání pozitivních výsledků u obou pohlaví se ukázalo, že rozdíl mezi pohlavími jsou 4 % (33 pozitivních vzorků). Výsledky vyšly opět v souladu s literaturou, která uvádí že výskyt LB je častější u žen a že incidence u mužů a žen je v poměru 1:1,2.

Počet infikovaných osob v jednotlivých měsících je silně ovlivněn mikroklimatickými podmínkami (teplota, vlhkost), které mají významný vliv na zvýšenou aktivitu klíšťat a také na častější pohyb lidí v přírodě. Velmi suchá místa v důsledku vysokých teplot, trvale podmáčený terén, nebo chladno aktivitu klíšťat tlumí. V hypotéze 3 jsem předpokládala, že nejvyšší počet pozitivních vzorků bude zaznamenán v letních měsících. Tato hypotéza se potvrdila, protože nejvyšší záchyt pozitivních vzorků vyšetřených za rok 2019 byl zjištěn v červenci, srpnu, a září. Můžeme tedy usoudit, že příznivé podmínky pro klíšťata byly ještě v pozdím létu (září). Výsledná zjištění jsou také v souladu s odbornou literaturou (SZÚ, © 2019). Každý rok se však tato skutečnost může měnit v souvislosti se změnou klimatických podmínek.

Protože doposud nebyla známá žádná účinná vakcína, jedinou možností, jak omezit riziko nákazy, je důsledná ochrana před klíšťaty. Nyní se však diskutuje o úspěšně otestované vakcíně proti LB, kterou nedávno testovali čeští vědci z českobudějovického Biologického centra AV ČR, ve spolupráci s americkým farmaceutickým koncernem Sanofi, který vylepšil původní očkovací látku, která nyní cílí na všechny druhy borelií. Dle vědců je přípravek 100 % účinný. Výsledky byly publikovány na začátku května 2020 v odborném časopisu NPJ Vaccines (Kamp et al., 2020).

6. ZÁVĚR

Lymeská borelióza je multisystémové infekční onemocnění přenášené zejména klíšťaty rodu *Ixodes ricinus*. Původcem tohoto onemocnění je komplex spirochetálních bakterií *Borrelia burgdorferi sensu lato*. V České republice je každoročně hlášeno přibližně 4000 případů.

Ve své práci jsem shromáždila informace o lymeské boreliózy včetně historie, etiologie, epidemiologie, patogeneze, klinických příznaků, léčbě, prevenci a laboratorní diagnostice. Výsledky vyšetřovaných sér vyšetřených v laboratoři Stafila k. s. v Českých Budějovicích v roce 2019 jsem statisticky zpracovala a vyhodnotila s ohledem na sezónní výskyt infekce, dále jsem hodnotila výsledky metod ELISA IgG/IgM a Western blot IgG/IgM. Kromě obecně známe informace, že je LB nemocí sezónního charakteru, jsem zjistila promořenost mezi ženami a muži, a výskyt výsledků pozitivních na LB s ohledem na věk pacientů. Práce splnila stanovené cíle a potvrdila všechny stanovené hypotézy.

Při stanovení diagnózy je nutné, aby lékař zvážil spolu se sérologickými výsledky také klinický obraz a anamnézu pacienta.

Lymeská borelióza je závažné onemocnění a pokud borelie v organismu perzistují, může se lymeská borelióza rozvinout v chronickou formu, která postihuje životně důležité orgány především myokard, mozek a ledviny. Z tohoto důvodu je nezbytné klást velký důraz na její prevenci.

7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. BARTŮNĚK, P., 2013. *Lymeská borelióza*. 4., přeprac. a dopl. vyd. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-4355-4.
2. BENEŠ, J., c2009. *Infekční lékařství*. Praha: Galén. s. 289-292. ISBN 978-80-7262-644-1.
3. BUHNER, S. H., 2014. *Borelióza: přírodní prevence a bylinná léčba lymeské boreliózy a jejich koinfekcí*. Praha: Triton. ISBN 978-80-7387-780-4.
4. DLOUHÝ, P., HONEGR, K., KRBKOVÁ, L., PÍCHA, D., ROHÁČOVÁ, H. a ŠTRUNCOVÁ, V., 2011. Lymeská borelióza: doporučený postup v diagnostice, léčbě a prevenci. *Klinická mikrobiologie a infekční lékařství*. Praha, 17(4), 144-149. ISSN 1211-264 10.
5. HAJDUŠEK, O., ALMAZÁN, C., LOOSOVA, G., VILLAR, M., CANALES, M., GRUBHOFFER, L., KOPACEK, P. a la FUENTE J. de, 2009. Characterization of ferritin 2 for the control of tick infestation. *Vaccine* [online]. 9. April, 28(17), 2993-2998 [cit. 2020-05-18]. DOI: 10.1016/j.vaccine.2010.02.008.
6. HATCHETTE, TF, DAVIS, I. a JOHNSTON, BL., 2014. Lyme disease: clinical diagnosis and treatment. *Canada Communicable Disease Report*. 40(11), 194-208. DOI: 10.14745/ccdr.v40i11a01. ISSN 14818531. Dostupné také z: <https://www.canada.ca/content/dam/phac-aspc/migration/phac-aspc/publicat/ccdr-rmtc/14vol40/dr-rm40-11/assets/pdf/ccdrv40i11a01-eng.pdf>
7. HILDENBRAND, P., CRAVEN, D.E., JONES, R. a NEMESKAL, P., 2009. Lyme Neuroborreliosis: Manifestations of a Rapidly Emerging Zoonosis. *American Journal of Neuroradiology* [online]. 30(6), 1079-1087 [cit. 2020-01-04]. DOI: 10.3174/ajnr.A1579. ISSN 0195-6108. Dostupné z: <http://www.ajnr.org/lookup/doi/10.3174/ajnr.A1579>
8. KAMP, H. D., SWANSON, K. A., WEI, R. R., DHAL, P. K., DHARANIPRAGADA, R., KERN, A., SHARMA, B., ŠÍMA, R., HAJDUŠEK, O., HU, L.T., WEI, CH.-J., NABEL, G.J., 2020. Design of a broadly reactive Lyme disease vaccine. *Npj Vaccines* [online]. 5(1) [cit. 2020-05-28]. DOI:

- 10.1038/s41541-020-0183-8. ISSN 2059-0105. Dostupné z:
<http://www.nature.com/articles/s41541-020-0183-8>
9. KERLES, M., 2015. *Člověk a klíště*. JČU v Č. Budějovicích. ISBN 978-80-7394-515-2.
 10. KRBKOVÁ, L., KYBICOVÁ, K., PÍCHA, D., ROHÁČOVÁ, H. a SMÍŠKOVÁ, D., 2018. *Doporučený postup diagnostiky a léčby lymeské borreliózy: Doporučený postup Společnosti infekčního lékařství České lékařské společnosti J. E. Purkyně* [online]. Společnost infekčního lékařství České lékařské společnosti J. E. Purkyně, 30. 9. 2018 [cit. 2020-04-20]. Dostupné z:
<https://www.infekce.cz/DPLB18.htm>
 11. KREJSEK, J., ANDRÝS, C. a KRČMOVÁ, I., 2016. *Imunologie člověka*. Hradec Králové: Garamon. ISBN 978-80-86472-74-4.
 12. KŘUPKA, M. Existuje opravdu chronická lymeská borelióza? [přednáška]. In: YouTube [online]. Praha: Univerzita Karlova (Přírodovědecká fakulta). 30. srpna 2019. [cit. 2020-02-15]. Záznam dostupný z:
<https://www.youtube.com/watch?v=rxvh5KaybPM>
 13. KŘUPKA, M., RAŠKA, M. a WEIGL, E., 2008. Lymeská borelióza – biologie, patogeneze, diagnostika a léčba. *Dermatologie pro praxi*. 2(5-6), 236-239. ISSN 1802-2960.
 14. KYBICOVÁ, K., BALÁTOVÁ, P. a LUKAVSKÁ, A., 2018. Diagnostika lymeské borreliózy. *ZPRÁVY CEM* [online]. SZÚ, Praha, 2018, 27(7-8), 187-190 [cit. 2020-03-20]. Dostupné z:
http://www.szu.cz/uploads/documents/CeM/Zpravy_EM/27_2018/07_08_cervenec_srpen/187_diagnostika.pdf
 15. LACINA, L., KOJANOVÁ, M., KUKLOVÁ, I. a ŠTORK, J., 2011. Kožní projevy borreliózy: Diagnostická a léčebná doporučení. *Dermatologie pro praxi* [online]. Solen, 2011, 5(1), 12-17 [cit. 2019-09-20]. ISSN 1803-5337. Dostupné z:
<https://www.dermatologiepropraxi.cz/pdfs/der/2011/01/03.pdf>
 16. *Lymeská borelióza*, © [?2019], [online]. In: SZÚ, Praha [cit. 2020-05-20]. Dostupné z: <http://www.szu.cz/lymeska-borelioza>
 17. MADIGAN, M. T., MARTINKO, J. M., BENDER, K. S., BUCKLEY, D. H. a STAHL, D. A., 2015. *Brock biology of microorganisms*. 14th edition. USA: PEARSON. ISBN 978-0-321-89739-8.

18. MARQUES, A. R., 2015. Laboratory Diagnosis of Lyme Disease: Advances and Challenges. *Infectious Disease Clinics of North America* [online]. 29(2), 295-307 [cit. 2020-05-18]. DOI: 10.1016/j.idc.2015.02.005. ISSN 0891-5520.
19. MONIUSZKO-MALINOWSKA, A., CZUPRYNA, P., DUNAJ, J., PANCEWICZ, S., GARKOWSKI, A., KONDRUSIK, M., GRYGORCZUK, S. a ZAJKOWSKA, J., 2018. Acrodermatitis chronica atrophicans: various faces of the late form of Lyme borreliosis. *Advances in Dermatology and Allergology*. 35(5), 490-494. DOI: 10.5114/ada.2018.77240. ISSN 1642-395X.
20. MOORE, A., NELSON, Ch., MOLINS, C., MEAD, P. a SCHRIEFER, M., 2016. Current Guidelines, Common Clinical Pitfalls, and Future Directions for Laboratory Diagnosis of Lyme Disease. *Emerg Infect Dis*. [online]. United States, 22(7), 1169-1177 [cit. 2020-05-18]. DOI: 10.3201/eid2207.151694.
21. ORLÍKOVÁ, H., KYBICOVÁ, K., GAŠPÁREK, M., KYNČL, J. a MALÝ, M., 2019. Lymeská borrelióza v ČR: Roční zpráva o epidemiologické situaci za rok 2018. *Zprávy CEM* [online]. SZÚ, Praha, 28(11-12), 453-458 [cit. 2020-05-20]. ISSN 1804 – 8676. Dostupné z: http://www.szu.cz/uploads/documents/CeM/NRLs/lym.borrel/publikace/surveillanc_e_LB_2018.pdf
22. Post-Treatment Lyme Disease Syndrome, 2019. *CDC – Centers for Disease Control and Prevention...* [online]. Centers for Disease Control and Prevention [cit. 2020-01-02]. Page last reviewed: November 8, 2019. Dostupné z: <http://www.cdc.gov/lyme/postLDS/index.html>
23. PROKEŠ, Z., 2015. Lymeská borrelióza. *Dermatologie pro praxi* [online]. Solen, 9(1), 36-39 [cit. 2019-10-18]. ISSN 1803-5337. Dostupné také z: <https://www.dermatologiepropraxi.cz/pdfs/der/2015/01/08.pdf>
24. PROKEŠ, Z., 2015. Lymeská borrelióza. *Praktické lékařství* [online]. Solen, 11(E-verze 3/15), 15-24 [cit. 2019-09-20]. ISSN 1803-5329. Dostupné také z: <https://www.praktickelekarenstvi.cz/pdfs/lek/2015/89/03.pdf>
25. ROHÁČOVÁ, H., 2013. Je pozdní forma lymeské neuroborreliózy léčitelná? *Neurologie pro praxi* [online]. Solen, 14(4), 200-202 [cit. 2019-09-20]. ISSN 1803-5280. Dostupné také z: <https://www.neurologiepropraxi.cz/pdfs/neu/2013/04/10.pdf>

26. ROHÁČOVÁ, H., 2012. Lymeská borelióza. *Interní medicína pro praxi*. Solen, 14(5), 203-205. ISSN 1212-7299.
27. ROHÁČOVÁ, H., 2010. Lymeská borelióza – komplexní pohled. *Medicína pro praxi*. Solen, 7(8-9), 310-312. ISSN 1214-8687.
28. ROHÁČOVÁ, H., c2005. *Lymeská borelióza: průvodce ošetřujícího lékaře*. Praha: Maxdorf. Farmakoterapie pro praxi. s. 24-25. ISBN 80-734-5071-2.
29. SCIESZKA, J., DAŇBEK, J. a CIEŠLIK, P., 2015. Post-Lyme disease syndrome. *Reumatologia* [online]. 53(1), 46-48 [cit. 2019-5-11]. DOI: 10.5114/reum.2015.50557.
30. SHOR, S., GREEN, CH., SZANTYR, B., PHILLIPS, S., LIEGNER, K., BURRASCANO, J., BRANSFIELD, R. a MALONEY, E. L., 2019. Chronic Lyme Disease: An Evidence-Based Definition by the ILADS Working Group. *Antibiotics* [online]. 8(4), 269 [cit. 2019-11-20]. DOI: 10.3390/antibiotics8040269. ISSN 2079-6382.
31. SMÍŠKOVÁ, D. a PÍCHA, D., 2017. Diagnostika a léčba lymeské borreliózy. *Medicína pro praxi*. Solen, 14(2), 77-80. ISSN 1214-8687.
32. STANEK, G., FINGERLE, V., HUNFELD, K. P., et al., 2011. Lyme borreliosis: Clinical case definitions for diagnosis and management in Europe. *Clinical Microbiology and Infection*. 17(1), 69-79. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2010.03175.x. ISSN 1198743X. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1198743X14609162>
33. STEERE AC., *Borrelia Burgdorferi* (Lyme disease, Lyme borreliosis) in MANDEL, G. L., BENNETT, J. E., DOLIN, R.: *Principle and practices of infectious diseases*. 7th edition, Churchill Livingstone Elsevier, 2010, Ch. 242: 3071–3081.
34. *Výskyt vybraných hlášených infekcí v České republice, leden-prosinec 2019*, 2019, [online]. In: SZÚ, Praha [cit. 2020-05-20]. Dostupné z: http://www.szu.cz/uploads/documents/szu/infekce/tabulka_leden_prosinec_2019.pdf
35. TEST LINE Clinical Diagnostics, s.r.o., ČR, návod diagnostického setu BLOT-LINE IgG, 2019.
36. TEST LINE Clinical Diagnostics, s.r.o., ČR, návod diagnostického setu BLOT-LINE IgM, 2019.

37. TEST LINE Clinical Diagnostics, s.r.o., ČR, návod diagnostického setu EIA Borrelia recombinant IgG, 2019.
38. TEST LINE Clinical Diagnostics, s.r.o., ČR, návod diagnostického setu EIA Borrelia recombinant IgM, 2019.
39. TEST LINE Clinical Diagnostics, s.r.o., ČR, příbalový leták k přístroji Dynex Agility Systém, 2019.
40. TEST LINE Clinical Diagnostics, s.r.o., ČR, příbalový leták k přístroji BlueDiver, 2019.
41. VOJÁČEK, J., KETTNER, J. a DUŠEK, J., 2019. *Klinická kardiologie*. 4. Praha: Maxdorf. ISBN 978-80-7345-600-9.
42. VOTAVA, M., 2003. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun. s. 194. ISBN 80-902-8966-5.
43. VOTAVA, M., c2010. *Lékařská mikrobiologie – vyšetřovací metody*. Brno: Neptun. ISBN 978-80-86850-04-7.
44. *Předpověď aktivity klíšťat*, 2020, [online]. In: Český hydrometeorologický ústav, Praha [cit. 2020-05-15]. Dostupné z: <http://portal.chmi.cz/predpovedi/predpovedi-pocasi/ceska-republika/predpoved-aktivity-klisat>

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ACA	acrodermatitis chronica atrophicans
AP	alkalická fosfatáza
ATB	antibiotika
Ba	Borrelia afzelii
Bb	Borrelia burgdorferi
Bbsl	Borrelia burgdorferi sensu lato
Bg	Borrelia garinii
Bgp	Borelia glycosaminoglycans binding protein
BL	Boreliový lymfocytom
Bs	Borrelia burgdorferi sensu stricto
Bsp	Borrelia spielmanii
CNS	centrální nervová soustava
Dbp	Decorin binding protein
DNA	deoxyribonukleonová kyselina
EBV	Epstein-Barrové virus
ECM	erythema chronicum migrans
EIA	Enzymový imunotest
ELISA	Enzyme Linked Imunosorbent Assay
EM	erythema migrans
FDA	Food and Drug Administration
IFA	Nepřímý imunofluorescenční test
IgG	imunoglobulin G
IgM	imunoglobulin M
IP	index pozitivity
LA	lymeská artritida
LB	lymeská borelióza
LNB	lymeská neuroborelióza
Osp	Outer surface protein
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
pH	potenciál vodíku
PLDS	post boreliový syndrom
SZÚ	Státní zdravotní ústav

TMB	tetramethylbenzidin
WB	Western blot