



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Sciences

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

**Stanovení protilátek proti Lymeské borelióze, ELISA
vs. Western Blot**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program: **SPECIALIZACE VE ZDRAVOTNICTVÍ**

Autor: Nikola Marhounová

Vedoucí práce: RNDr. Michaela Kotková, Ph.D.

České Budějovice 2020

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svoji bakalářskou práci s názvem „Stanovení protilátek proti Lymeské borelióze, ELISA vs. Western blot“ vypracovala samostatně, pouze s použitím pramenů v seznamu citované literatury.

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

V Českých Budějovicích dne 11. 8. 2020

.....

Nikola Marhounová

Poděkování

Chtěla bych poděkovat mé vedoucí práce RNDr. Michaele Kotkové, PhD., za ochotu a vstřícnost po celou dobu práce, a také za poskytnutí cenných rad a materiálů k práci.

Děkuji také svému příteli a rodině za podporu během studia.

Stanovení protilátek proti Lymeské borelióze, ELISA vs. Western Blot

Abstrakt

Lymeská borelióza je jedno z nejčastějších onemocnění přenášené klíšťaty. Lymeská borelióza má mnoho klinických příznaků, ovšem u mnoha pacientů může probíhat i asymptomaticky. Laboratorní diagnostika tohoto onemocnění spočívá ve stanovení protilátek ve třídách IgM a IgG nejprve pomocí ELISA testu, a poté konfirmací pomocí Western blotu.

Tato bakalářská práce je rozdělena na dvě části. V první, teoretické části, je popsána historie onemocnění, a patogen, který onemocnění způsobuje. Nedílnou součástí je také popis přenašeče, tedy klíštěte, a přenos původce lymeské boreliózy. Detailněji jsou popsány děje, které se odehrávají během přenosu *Borrelie*, a jak přitom reaguje tělo hostitele. Větší část teoretické části je věnována popisu klinických příznaků lymeské boreliózy a její laboratorní diagnostice. Jsou popsány metody přímé i nepřímé, ovšem nepřímým metodám je věnována větší část, neboť je to zadání mé bakalářské práce.

V druhé, praktické části, je popsán postup obou metod nepřímé diagnostiky, tedy ELISA testu a Western blotu. Během mé praxe jsem se podílela na vyšetření 510 lidských sér, kdy jsem pomocí WB stanovovala protilátky třídy IgM a IgG.

Součástí této kapitoly jsou také výsledky mé práce přehledně znázorněné v tabulkách a grafech. Protože Western blot je v klinických laboratořích používána jako konfirmační metoda, jsou počty pozitivních testů provedených touto metodou nižší než pomocí ELISA testu. ELISA test nemá tak vysokou specificitu, mnohé pozitivní testy se po konfirmaci pomocí WB ukáží jako negativní. Jde o to, že dochází k reakci s antigenem flagelinu, který se ovšem může vyskytovat i u jiných bakterií, které mají bičík. Proto je tak důležitá konfirmace pozitivních testů pomocí metody Western blot.

Klíčová slova

Klíště obecné; patogen; protilátky; ELISA; Western Blot

Determination of antibodies against Lyme Disease, ELISA vs. Western Blot

Abstract

Lyme disease is one of the most common tick-borne diseases. Lyme disease has many clinical symptoms, but it can also occur asymptotically in many patients. Laboratory diagnostics of this disease involves the determination of IgM and IgG antibodies, first by ELISA test, and then it is confirmed by Western blot.

This bachelor thesis is divided into two parts. The first, theoretical part, describes the history of the disease, and the pathogen that causes the disease. Theoretical part also includes the description of the vector, the tick, as well as a transmission of Lyme disease. The events which take place during *Borellia* transmission and how the host body reacts, are described in more detail. Most of the theoretical part is devoted to the description of clinical symptoms of Lyme disease and to its laboratory diagnostics. Both, direct and indirect methods, are described. But a larger part is devoted to indirect methods, because it is the assignment of my bachelor thesis.

In the second, practical part, the procedure of both methods of indirect diagnostics, ELISA test and Western blot, is described. During my practice, I participated in the examination of 510 of human sera. It was used Western blot test to determine IgM and IgG antibodies against Lyme disease.

Results of my work are clearly shown in tables and graphs. Because Western blot is a confirmatory method in clinical laboratories, the number of positive tests performed by this method is lower than by ELISA test. ELISA test has not such a high specificity as Western blot. Many positive tests prove negative after confirmation by Western blot. It's because there is a reaction with the flagellin antigen, which, however, also occurs in other flagellate bacteria. Therefore it is important to confirm of positive tests by Western blot.

Keywords

Tick, pathogen, antibodies, ELISA, Western Blot

Obsah

1	TEORETICKÁ ČÁST	10
1.1	Historie	10
1.2	Současnost	11
1.3	Etiologie.....	11
1.4	Borrelia burgdorferi sensu lato	11
1.4.1	Morfologie	11
1.4.2	Růst	13
1.4.3	Antigenní struktura.....	14
1.5	Klíště	15
1.6	Přenos borelie.....	17
1.6.1	Mechanismus přenosu	20
1.7	Patogenita a virulence	21
1.7.1	Patogeneze	22
1.8	Imunitní mechanismy proti borelii	22
1.9	Lymeská borelióza	23
1.9.1	Prevence	23
1.9.2	Epidemiologická situace v ČR.....	25
1.9.3	Klinický obraz.....	27
1.9.4	Postižení kůže	29
1.9.5	Postižení kloubů (muskuloskeletálního systému)	32
1.9.6	Postižení nervového systému.....	33
1.10	Laboratorní diagnostika lymeské boreliózy.....	34
1.10.1	Přímé metody.....	34
1.10.2	Nepřímé metody.....	36
2	PRAKTICKÁ ČÁST	40
2.1	Vyšetření metodou ELISA	40

2.1.1	Test LIAISON BorreliaIgG	40
2.1.2	Test LIAISON BorreliaIgM II.....	41
2.2	Vyšetření metodou Western Blot.....	41
2.2.1	Test Anti-Borrelia EUROLINE	41
3	VÝSLEDKY	45
4	DISKUZE	48
5	ZÁVĚR.....	50
6	CITACE.....	51
7	SEZNAM TABULEK.....	53
8	SEZNAM OBRÁZKŮ	53

SEZNAM ZKRATEK

ACA	<i>Acrodermatitis chronica atrophicans</i>
Bb, Bb a Bg	<i>Borrelia burgdorferi</i> , <i>B. afzelii</i> a <i>B. garinii</i>
Bbsl	<i>Borrelia burgdorferi sensu lato</i>
Bdr	Borrelia direct repeat
BmpA	Glykosamidopeptidový receptor
CD	Cluster of differentiation
CLIA	Chemiluminiscenční analýza
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
EIA	Enzyme immuno assay
ELISA	Enzyme-linked immuno assay
EM	<i>Erythema migrans</i>
Ig	Imunoglobulin
INF	Interferon
kDa	Kilodalton
LB	Lymeská borelióza
Osp	Outer surface protein, vnější povrchový protein
PCR	Polymerázová řetězová reakce
RLU	Relativní světelná jednotka
SZÚ	Státní zdravotní ústav
TNF	Tumor necrosis factor
VlsE	Variable lipoprotein surface-exposed protein
WB	Western blot

Cíl a zadání práce

Hlavním cílem této bakalářské práce je seznámit se s metodami, pomocí kterých se stanovují protilátky proti lymeské borelióze (LB) v klinických laboratořích. Toto onemocnění má v České republice vysokou incidenci, a proto je jeho diagnostika a včasná léčba velice důležitá. Nemalou součástí práce je popis patogena způsobujícího lymeskou nemoc, jeho přenos a klinické příznaky onemocnění u člověka.

Toto téma je mi velmi blízké, neboť jsem na základní škole lymeskou boreliózu prodělala.

Úvod

Lymeská borelióza je zánětlivé multisystémové bakteriální onemocnění, které postihuje kromě kůže, pohybového aparátu a srdce i nervový systém. (Bartůněk, 1996) Toto onemocnění je zoonóza způsobená spirochétami rodu *Borrelia*. Vektorem patogena ve střední Evropě je klíště obecné (*Ixodes ricinus*). Riziko infekce je středně vysoké (v ČR je v průměru infikováno boreliemi cca 10-20 % klíšťat) a onemocnění bývá často asymptomatické. (Bartůněk, 1996)

Základní klinické spektrum boreliové infekce je si podobné na celém světě. Můžeme však najít rozdíly v klinických projevech mezi lymeskou boreliózou vyskytující se v Evropě a Severní Americe (Nadelman et Wormser, 1998) Tyto rozdíly jsou dány rozdílnými vlastnostmi a invazivní strategií původců onemocnění vyskytujících se na daných kontinentech. Z toho důvodu můžeme objevit rozdíly v klinické prezentaci i mezi regiony v rámci Evropy. (Hubálek a Halouzka, 1997)

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Historie

V druhé polovině 19. století, byly poprvé zaznamenány a popsány nejrůznější projevy nemoci i bez toho aniž by byl znám původce onemocnění. V tomto čase nebylo uvedeno ani správné pojmenování této nemoci.

První, kdo publikoval popis onemocnění *acrodermatitis chronica atrophicans* (ACA), byl v roce 1883 dermatolog Buchwald. Až o několik let poté byl popsán lymfocytom i *erythema migrans* (EM). (Bartůněk, 2013)

Zanedlouho bylo zjištěno, že kromě kožních změn způsobené touto nemocí se vyskytují i případy, kdy byl postižen i nervový systém. Onemocnění tak bylo označeno za celkové, neboli systémové. Etiopatogeneze však stále nebyla objasněna.

V následujících letech se objevila celá řada různých teorií a názorů na původce tohoto multiorgánového onemocnění. Až Lenhoff přišel s podstatným tvrzením. Upozornil totiž na možnou etiologickou účast spirochet při kožních onemocněních typu *erythema migrans* a *acrodermatitis chronica atrophicans*. Nikdo jiný, to však nepotvrdil a proto bylo od tohoto názoru opuštěno.

Onemocnění lymeská borelióza byla znovu studována až Steerem v průběhu osmdesátých let 20. století, a to díky rodičům dětí z městečka Old Lyme v Connecticutu. Děti zde byly opakovaně postihovány neobvyklým endemickým zánětem kloubů, a to hlavně v letních měsících. Steere a jeho spolupracovníci na tento epidemický výskyt zaměřili svoji pozornost. Na 39 dětech provedli klinické a epidemiologické šetření. Padesát devět procent z nich splnilo kritérium pro juvenilní revmatoidní artritidu. Pozornosti lékařů však neunikl ani erytém, který tuto kloubní afekci předcházel a ani fakt, že je pro tuto oblast charakteristické rozšíření klíšťat druhu *Ixodes dammini*. Díky tomu tak byla v roce 1977 lymeská borelióza pojmenována jako lymeská artritida (tzv. zánět kloubů).

V roce 1982, byl objeven i původce této nemoci. Byla jím spirochéta, která byla zařazena do rodu *Borrelia* a nazvána dle svého objevitele, *Borrelia burgdorferi*.

V roce 1987 na III. Mezinárodní konferenci v New Yorku, která se věnovala této problematice, pak bylo doporučeno označení onemocnění jako lymeská borelióza. (Bartůněk, 2006)

1.2 Současnost

V současné době je známo více než dvanáct druhů rodu *Borrelia* (Křupka et al., 2008). Do skupiny *Borrelia burgdorferi sensu lato* (Bbsl) patří: *B.burgdorferi*, *B.afzelii*, *B.japonica*, *B.andersonii*, *B.tanukii*, *B.turdi*, *B.valaisiana*, *B.lonestari* a *B.bissettii*.

Jejich počet jistě není zdaleka konečný. I když onemocnění není nové, etiopatogeneze je velmi rozmanitá a doposud ne zcela objasněna. Lymeská borelióza je tak nadále předmětem dalších studií a výzkumů.

1.3 Etiologie

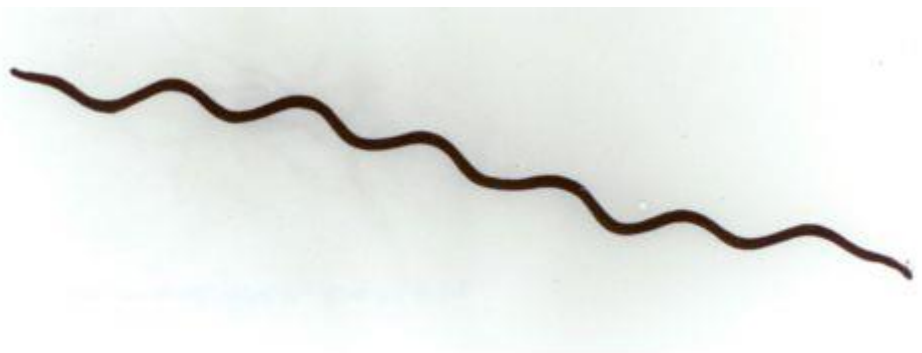
Bylo zjištěno, že onemocnění lymeská borelióza způsobují bakterie rodu *Borrelia*. Je známo více druhů bakterií tohoto rodu, které toto onemocnění způsobují. Nejprve byl popsán jako původce lymeské boreliózy jediný druh - *Borrelia burgdorferi*. V dalších letech, v podstatě až do současnosti, se jako původci objevují i další druhy a poddruhy. I to je příčinou širokého spektra klinických příznaků onemocnění. Pro shrnutí, *Borrelia burgdorferi* vyvolává onemocnění nejčastěji v Severní Americe, v Evropě je to zejména *Borrelia garinii* a *Borrelia afzelii*. (www.kliste.cz)

1.4 *Borrelia burgdorferi sensu lato*

Borrelia burgdorferi sensu lato (Bbsl) – je to bakteriální komplex, který v této chvíli zahrnuje více jak jedenáct pojmenovaných genotypů. (Bartůněk, 2013)

1.4.1 Morfologie

Bbsl jsou gramnegativní spirálovité bakterie, dlouhé 4-30 μm a široké 0,2-0,5 μm (viz obr. 1). (Rozsypal et al., 1981).

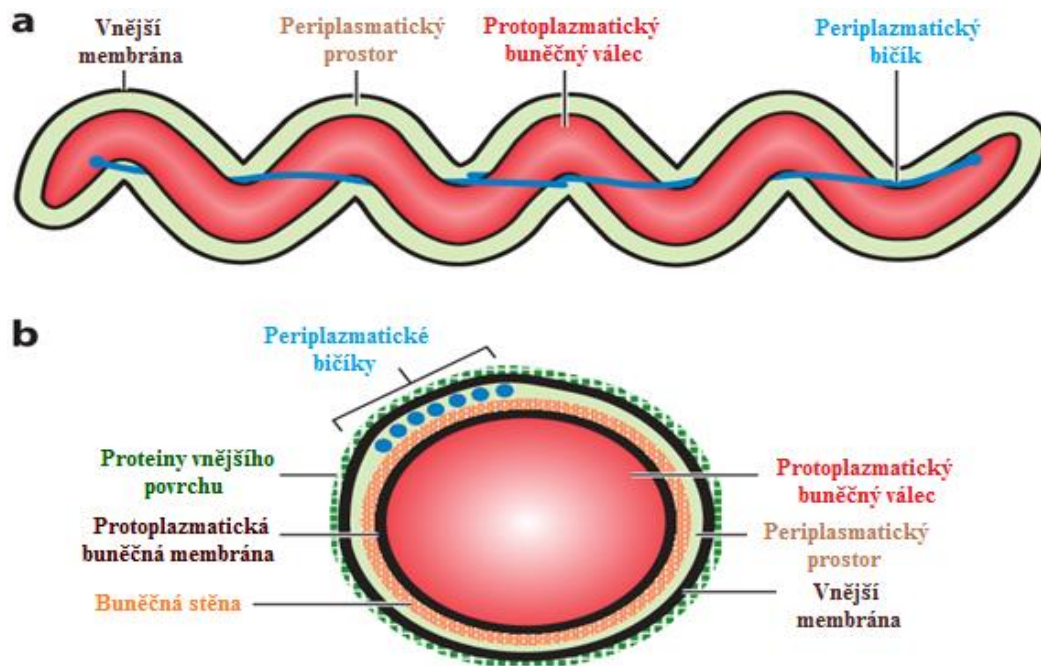


obr. 1 *Borrelia burgdorferi s. l.* v elektronovém mikroskopu. (Zdroj www.borelioza.cz)

Spirály jsou tvořeny 4-15 závity, a díky rotacím kolem podélné osy se pohybují, případně pomocí jejich natahování či smršťování. Díky tomu mohou vyvinout rychlost až 2 mm za sekundu. Mají 7-9 bičíků, které vycházejí ze dvou pólů a to bazálních disků, které jsou umístěny v cytoplazmatické membráně, a obtáčejí tělo borelie pod vnější buněčnou stěnou a umožňují jí tak pohyb a také průnik do míst, kam se jiné bakterie nemohou dostat. Tyto bičíky jsou duté a neopouzdrěné. Borelie jsou primárně extracelulárními patogeny a volně procházejí epitelem i hematoencefalickou bariérou. Jsou tak schopné vstupovat do buněk, například fibroblastů, dendritických buněk a makrofágů, a v nich nadále přežívat. Množí se relativně pomalu a to příčným, nebo podélným dělením, přibližně každých 7-20 hodin. (Meriläinen a kol., 2015; Vancová a kol., 2017)

Obal bakterie je tvořen trojvrstevnou buněčnou stěnou z peptidoglykenů na vnitřní straně, lipopolysacharidů a lipoproteinů na vnější straně. Stěna je oddělena periplazmatickým prostorem od cytoplazmatické membrány na povrchu protoplazmatického válce. Flexibilita této stěny umožňuje tvorbu cyst a vylučování vezikul, které obsahují plasmidy (viz obr. 2). Vezikuly mají stejné složení jako buněčná stěna a navíc mají, jak už bylo zmíněno, plazmidovou výbavu. Fluidita vnější membrány umožňuje posun antigenních molekul proteinů a buněčných glykosaminopeptidových receptorů, které jsou významné pro adhezi s hostitelskou buňkou. Spirochéty borelií se od ostatních spirochét odlišují přítomností vezikulárních a fibrilárních útvarů, které jsou podobné glykokalyxu buňky (ochranný plášť povrchu dané buňky).

Borelie jsou schopny tvořit i tzv. non-spirální formy, které jsou reverzibilní a mohou aktivně přejít ve formu spirální. Tvorba cystických forem a odškrcovaných váčků, obsahujících složky cytoplazmy, je pozorována při vystavení klasické spirální formy nevhodným podmínkám, jako je nízké pH, nedostatek nutričních zdrojů nebo nízký osmotický tlak. Tyto formy, které mají sníženou metabolickou aktivitu, jsou schopny reverze v plně metabolicky aktivní spirální formu. Tento jev znesnadňuje mikroskopický průkaz a těmito mimikry se mohou ukrývat před nepříznivými faktory imunitního systému nebo antibiotickou léčbou. (Bartůněk, 2006; Roháčová, 2005)



obr. 2 Struktura spirochéty *Borrelia burgdorferi*

obr. a) Schéma spirochéty *Borrelia* spp. - modře jsou znázorněny bičíky, které vycházejí z pólu buňky a obtáčejí se pod vnější buněčnou stěnou kolem celého těla borelie.

obr. b) Průřez tělem borelie. Modře vyznačeno sedm periplasmatických bičíků, které tvoří pevně zabalenou část, která tak způsobuje vyboulení vnější strany membrány. (Zdroj www.semanticscholar.org)

1.4.2 Růst

Mikroaerofilní borelie rostou ve vysoce obohacené komplexní živné půdě BSK (Barbourova-Stoenerova-Kellyho půda) *in vitro* při 33 °C. *in vitro* je generační doba růstu 12 – 14 hodin. *In vivo* bylo při opakovaných odběrech krve od pacientů s erytémem, pozorováno dělení buněk během 6 a 12 hodin. Růst borelií byl pozorován i v krvi pacienta, a to i 6 dní po pokousání klíštětem, kde rostly za pomoci příčného a podélného zaškrcení mateřské buňky. Ta ztrácí pomocí těchto zaškrcení septa skoro polovinu bičíků. U dceřiných buněk poté z disků a háčků vyrostou bičíky nové. K obnově bičíků nedojde pouze v nevhodných podmínkách, například při použití antibiotik.

Při experimentálních podmínkách v laboratoři prokazují borelie svou velkou odolnost. V citrátové krvi vydrží až čtrnáct dní při 4°C, v mozkomíšním moku je to osm

dní. Lze je také izolovat z vody, která byla znečištěná klíšťaty, nebo výkaly od hlodavců či ptáků. (Bartůněk, 2013).

1.4.3 Antigenní struktura

Jednotlivé druhy *Borelia burgdorferi sensu lato* se neliší jen svým genotypem, ale i fenotypem. To znamená, že se liší ve své antigenní výbavě, se kterou souvisí imunogenní a patogenní vlastnosti (virulence).

Antigenní struktura borelií je velmi pestrá. *Borrelia burgdorferis.l.* má podobné antigeny jako ostatní borelie, a zároveň můžeme tyto antigeny nalézt i u jiných spirochét. U *Borrelia burgdorferis.l.* byli zkoumány hlavní antigenní determinanty, což vedlo ke zjištění odlišných sérotypů u borelií stejného druhu. Tyto antigeny určují především citlivost a specifitu serologických testů. Borelie mají schopnost měnit své antigeny v závislosti na tom, v jaké fázi jejich životního cyklu se právě nacházejí. (Bartůněk, 2006).

Antigeny mají většinou proteinový charakter, ale i na povrchu bakterie se vyskytují málo známé neproteinové antigeny, jako jsou peptidoglykany nebo látky podobné lipopolysacharidu. (Bartůněk, 1996)

1.4.3.1 Povrchové proteiny a antigeny borelie

Seznam významných bílkovin, které společně vytvářejí zevní membránu:

1. OspA – lipoprotein s molekulovou hmotností 30-32 kDa
2. OspB – 34-36 kDa
3. OspC – 21-22 kDa

A dalšími jsou - lipoprotein OspD, OspE, OspF – tyto lipoproteiny jsou strukturální složky membrány, které v závislosti na jakoukoli fázi životního cyklu borelie, mají různý stupeň exprese. Antigeny Osp mají svůj původ v plazmidech. Ty nesou regulační geny borelií.

Borelie jsou antigenně velmi nestálé a za určitých podmínek jsou schopné antigeny měnit. Toto jim dává možnost uniknout protilátkové odpovědi. Například v přísátém klíštěti je antigen OspA, není však u borelie, která infikovala svého hostitele – u nich se objeví antigen OspC. Není ale vyloučena opětovná tvorba antigenu OspA. (Votava, 2003)

Antigeny p60 a p41 mají konstantní hmotnost. P60 je cytoplasmatický antigen, který je široce zkříženě reagující.

P41 je reprezentující bičkový antigen. Je antigeně heterogenní, což znamená, že v kožních izolátech z Evropy má specifický epitop, ale na amerických izolátech nebyl na tomto epitopu detekován. Tato heterogenita se vyskytuje i u antigenů OspC a OspA. (Roháčová, 2005)

Tento antigen také často způsobuje v serologických stanoveních falešnou pozitivitu a to proto, že není specifický pouze pro borelie, ale vyskytuje se i u jiných bičíkatých bakterií. Pávě na tento antigen je vázána tvorba protilátek v časném stádiu boreliózy. Kromě něj se v časně imunitní odpovědi uplatňuje i antigen OspC, který je vysoce specifický a vyznačuje se svojí vysokou reaktivitou se séry testovaných pacientů, kteří mají projevy časně infekce (u vyšetření Western blot je dominantním markerem časně odpovědi ve třídě IgM). V protilátkové odpovědi jsou také zapojeny proteiny p18, p39 a p100 (u vyšetření Western blot jsou spolehlivými markery pozdní odpovědi ve třídě IgG). (Votava, 2003)

1.4.3.2 Bdr geny

Spirochety borelií vlastní regulační geny – *Borrelia direct repeat* (Bdr). Tyto geny mají celkem 18 členů. Bdr proteiny, které jsou určeny těmito geny, jsou jak mezidruhově tak vnitrodruhově rozdílné. Jsou uloženy v cytoplazmatické membráně, nedají se ovlivnit protilátkami ani antibiotiky. Řízená tvorba proteinů, která je ovlivněna těmito Bdr geny, má za následek tvorbu imunokomplexů. (Bartůněk, 2006)

1.5 Klíště

Česká republika se nachází v mírném pásmu, je tedy ideálním místem pro život hlavního přenašeče lymeské boreliózy, klíštěte. Klíště patří do kmene členovců, třídy pavoukoců, řádu roztočů – nejedná se tedy o hmyz. (Bartůněk, 1996).

Hlavním vektorem přenosu borelie v Evropě je *Ixodes ricinus*, v USA je to *Ixodes damini*.

Délka životního cyklu klíštěte, který souvisí se životním cyklem borelií, závisí na konkrétních podmínkách a pohybuje se v rozmezí 2 až 6 ti let. Než se klíště přemění v dospělého jedince-imago, musí projít třemi stádii - larva, nymfa a dospělec. Během vývojového cyklu klíštěte můžeme u vývojových fází pozorovat i klidová stádia, která mohou trvat 6-12 měsíců. Larvy a nymfy se vyvíjí v další stádium, dospělci kladou vajíčka, vždy na jaře. Z vajíčka se vylíhne larva měřící cca 0,8 mm, s třemi páry nohou. Larva saje na hostiteli asi tři dny a poté hostitele opustí. Vybírá si většinou drobné

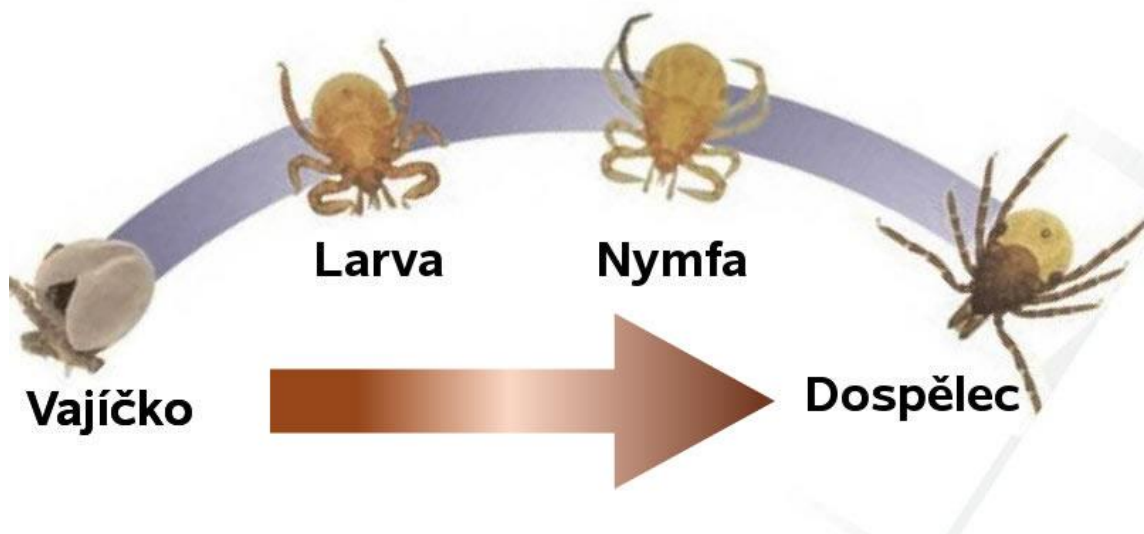
hlodavce, ale není to pravidlo, může se přisát i na člověka. Po nasátí začne trávit potravu a dostane se do stádia metamorfózy - započne přeměna na další vývojové stádium zvané nymfa. Zde dochází k přeměně orgánů z larválních do vyššího vývojového stupně. Přeměna trvá více jak měsíc. Nymfa měří cca 1,2 – 1,5 mm a má čtyři páry nohou. Na hostiteli sají krev 4 – 5 dnů. Je to stádium, které nalezneme na člověku přisáté nejčastěji. Nymfa po nasátí se následně začne přeměňovat v dospělého jedince - imago. Dospělí samci a samice klíštěte jsou schopni reprodukce, a rozeznáme je od sebe pouhým okem. Zatímco u samce je tělo kryté chitinizovaným hřbetním štítkem, u samice dosahuje štítek do jedné třetiny těla. Zbytek těla samice je tvořen měkkým, kožovitým, rezavě zbarveným útvarům. (viz obr. 3).



obr. 3 Dospělí jedinci klíštěte rodu *Ixodes ricinus*. (zdroj www.kliste.cz)

Přeměna v dospělého trvá přibližně 42 dnů. V dospělosti krev sají pouze samice, role samce je již pouze reprodukční. Hostiteli dospělých klíšťat jsou především větší živočichové jako psi, koně, kočky, vysoká zvěř či lidé. Sají cca 7 – 8 dní. Samečci po oplodnění samic umírají a samičky se chystají na přezimování. Na jaře pak samičky nakladou vajíčka a též uhynou. Po naklazení vajíček se do dvou měsíců vylíhnou šestinohé bezbarvé larvy a cyklus se opakuje (viz obr. 4). (Rosa, 2005; www.kliste.cz)

Je třeba také zmínit, že reprodukční schopnost klíšťat je velmi vysoká. Samička dokáže naklást 2500 až 4000 vajíček. (www.kliste.cz)



obr. 4 Vývojový cyklus klíštěte. (zdroj www.kliste.cz)

Klíšťata se v přírodě nejčastěji nacházejí na okrajích listnatých a smíšených lesů nebo v travnaté či křovinaté krajině. Vyskytují se obvykle do nadmořské výšky 800 m. V každém svém stádiu vylézají klíšťata do různé výšky. Larvy se vyskytují převážně několik centimetrů nad povrchem půdy, nymfy a dospělí jedinci se uchycují do jednoho metru nad povrchem. (www.kliste.cz)

1.6 Přenos borelie

Borelie se vyskytují převážně v přírodě, kde kolují mezi klíšťaty a volně žijícími obratlovci.

Hlavním rezervoárem *B. burgdorferi s. l.* v Evropě a Asii je myšice (*Apodemus spp.*), v Severní Americe je to křeček bělonohý (*Peromyscus leucopus*). Snadno se totiž od přenašeče nakazí a některé z nich se po celý život stanou nosičem tohoto patogena. Imunitní systém myši je tolerantní k původci onemocnění, dochází tak u nich k celoživotní bakteriémii, kdy jsou původci neustále přítomni v periferní krvi. To je vysvětlení, proč je myš tak snadným rezervoárem. Dalším vhodným rezervoárem může být potkan, krysa nebo zajíc (ne však králík, o nich to známo není). Ve střední Evropě je mnohopočetným hostitelem plch velký (*Glis glis*). Díky těmto rezervoárům je infekční cyklus zachován. Nevýznamným rezervoárem jsou jeleni nebo skot. Není známo, že by se od vektorů nakazily. (Daneš, 2003; Kimming, 2003)

Dále se na přenosu borelií mohou podílet někteří ptáci, na kterých hojně parazitují larvy klíštěte.

Do lidského organismu nebo do zvířete se borelie dostanou prostřednictvím přenašeče (vektor), který patogena získal od jiného nakaženého hostitele nebo co-feedingem s jiným infikovaným klíštětem na téže hostiteli. (Bartůněk, 2006)

V Evropě je hlavním vektorem tohoto přenosu více druhů klíšťat rodu *Ixodes ricinus*, a všechna jejich vývojová stádia od larvy, nymfy až po dospělého jedince. Můžeme říct, že je zde určitá spojitost mezi druhem borelie a rezervoárem. Vyšší prevalence *Borrelia afzelii* byla zjištěna u hlodavců, jako jsou hraboši, myšice, ale i krysy nebo potkani. *Borrelia garinii* se většinou vyskytuje u ptactva (například u bažantů, ale i u jiného okrasného ptactva), objevíme ji i u hlodavců a hmyzožravců, ale to jen velmi málo. Dále je tu také *B.lusitanie*, pro kterou jsou rezervoárem některé druhy ještěrek, nebo *B.spielmanii*, která byla objevena u plchů. *Borrelia burgdorferi s.l.* je detekována u ptáků i hlodavců. U některých studií se můžeme dočíst i to, že klíšťa jsou různě vnímavá k jednotlivým druhům *B. burgdorferi* v závislosti na geografických oblastí, a že některé borelie že jsou vázány na určitý druh klíšťat. (Bartůněk, 2013).

Je zde i odlišnost v osidlování hostitelů jednotlivými vývojovými stádii klíštěte. Jak již bylo výše řečeno, klíšťa rodu *Ixodes* mají tři vývojová stádia, a to larvu, nymfu a dospělé. Každé stádium saje pouze jednou. Po nasycení odpadnou a dojde k metamorfóze. Sání na hostiteli probíhá i několik dní a díky pohybu těchto hostitelů se klíšťa a tím i případná infekce *B.burgdorferi s. l.* rozšiřuje, a lymeská borelióza se tak udržuje v přírodě (Rosa, 2005; Bartůněk, 2013).

Teoreticky mohou být přenašečem i některé druhy hmyzu, u kterých byla přítomnost spirochét někdy prokázána (Bartůněk, 2006). Jsou to například hemofágní mouchy, samičky komárů nebo muchniček. Takovýto způsob přenosu však nebyl experimentálně ověřen, a tak izolaci borelií z hmyzu nelze považovat za důkaz. Hlavním a celosvětovým uznávaným přenašečem je tedy klíšťa.

Je zde ještě jedna varianta přenosu nákazy, a to při krevní transfúzi nebo z matky na plod (Roháčová, 2005). Tento přenos, odborně transplacentární, byl popsán jen pár let po objevení původce nemoci. V roce 1985 byl popsán případ ženy, která onemocněla v prvním trimestru těhotenství lymeskou boreliózou. Žena nebyla залéčena antibiotiky a v 35.týdnu porodila dítě, které během prvního týdne života zemřelo na srdeční vady (zúžení aorty i aortálního oblouku, otevřená Botallova dučej a endokardiální fibroelastóza).

Histologický nález prokázal spirochéty ve slezině, ledvinách a v kostní dřeni. Objevily se i další podobné případy, kdy u dětí byli pomocí histologie nalezeny spirochéty borelie. I přes tyto pozitivní nálezy nebyla prokázána souvislost s infekcí. Ve tkáních totiž nebyly prokázány žádné zánětlivé změny ani imunologická odpověď. (www.pediatricpropraxi.cz)

Jestliže je možnost přenosu borelie z matky na plod, nabízí se zde otázka, je-li možný přenos například i z mateřského mléka. Nebylo však doposud nic takového hlášeno. Zajímavá je ale situace, kdy se pomocí metody PCR podařilo získat DNA *Borellia burgdorferi* z mateřského mléka a i moči kojících matek. (www.pediatricpropraxi.cz)

Byl také prokázán i vertikální přenos agens z jednoho stádia vektora do dalšího, a to v průběhu metamorfózy, tzv. transtadiální a transovariální přenos. Agens je tak předáváno samičkou jejímu potomstvu. (Krbová, 2007)

1.6.1 Mechanismus přenosu

Klíště se na svého hostitele nepřisaje hned potom, co se na něj dostane, ale hledá si vhodná místa. Obvykle je jimi jemná a vlhčí pokožka. Tím je především oblast podpaží, třísel, podkolenních jamek, břicho a oblast za ušima. Není to však pravidlo, klíště se může přisát i na jiná místa, například na hlavě ve vlasech. Na to, aby se klíště dokázalo na hostitele přisát, je vybaveno hypostomem. To je orgán ústního ústrojí ve tvaru harpuny s protisměrnými háčky. Ty zajišťují pevné přichycení a následnou možností přijímání krve (viz. obr. 5). (www.kliste.cz).



obr. 5 Takto vypadá přisáté klíště přisáté na člověku. (zdroj www.kliste.cz)

Přenos Bbsl z klíštěte na hostitele není pouhá mechanická záležitost, ale je řadou biologických procesů. Spirochety přežívají v klidovém stavu na podzim a v zimě v zaživacím traktu nymf. (Bartůněk, 2013)

Jakmile se klíště přisaje, začne do hostitele vpouštět směs chemických látek, které slouží jako chemotraktant pro borelie nacházející se v hostiteli. Tímto způsobem dochází k nákaze vektora (Buhner, 2014). Tato směs chemických látek se do hostitele dostává pomocí slin, s nimi se do rány dostane i látka, která kolem bodacího ústrojí vytvoří tzv. cementovou vrstvu, která znesnadňuje odstranění klíštěte.

Ve směsi chemických látek ve slinách, které pomáhají přemoci obranu hostitele, se nachází látky, které tlumí srážení krve. Dále jsou to látky, které brání zánětlivému procesu u hostitele, tzn., že nevzniká v místě bodnutí svědění, tudíž si v prvním několika hodinách hostitel ani nevšimne, že je na něm klíště přisáté. U hostitele je také

potlačena imunitní odpověď na přísátí. Tím dojde k vytvoření vhodných podmínek k přenesení infekce. (www.kliste.cz).

Je-li klíště infikováno, borelie se množí v jeho zažívacím traktu. Poté, co se klíště přisaje na hostitele, dochází ke stimulaci Bdr genů krví. Tyto geny pak řídí expresi povrchových proteinů (OspA a OspC) a tím umožní přechod borelií do slinných žláz klíštěte. OspA antigen je zodpovědný za přichycení se bakterií ve střevě klíštěte a při přechodu do slinných žláz je jeho exprese potlačena a zvyšuje se hladina OspC. Díky zvýšení exprese OspC antigenu, je umožněno bakteriím opustit trávicí trakt a následný přechod do slinných žláz klíštěte. Tento jev, kdy se lipoprotein OspA vytratí, patrně souvisí s adaptací borelie na různé druhy hostitele, kteří mají různý metabolismus a různou teplotu. OspC je tedy před sáním klíštěte sotva prokazatelný (teplota je pod 24 °C). Jakmile se ale zvýší teplota nasáváním krve do klíštěte, OspC má možnost se zmnožit (Daneš, 2003). Dále má tento lipoprotein schopnost navázání imunoregulačního proteinu Salp15 (ten je obsažen ve slinách klíštěte), který pomáhá boreliím proti imunitní reakci v počáteční fázi infekce od hostitele (Křupka, 2008). Prostřednictvím bodacího ústrojí a infikovaných slin, které jsou během sání klíštěte vylučovány do hostitele, se bakterie dostávají do těla hostitele. Zda spirochéty organismus hostitele infikují nebo ne, je ovlivněno dobou sání, která se u vývojových stádií liší. Obvykle se uvádí, že postačí 24–36 hodin. Se zvyšující se dobou sání se tedy zvyšuje pravděpodobnost nákazy.

Spirochéty mohou do těla hostitele proniknout i přes neporušenou kůži ze střevního obsahu klíšťat, a to zejména při nesprávné manipulaci s ním při vyndávání z rány. (Bartůněk, 2006; Roháčová, 2005) Infikovaná mohou být všechna tři výše zmiňovaná vývojová stadia. Spirochety borelií se mohou objevit i u komárů, od nich však přenos nebyl zaznamenán. Nebo také při laboratorní infekci. Dále je předpokládán možný přenos přímou inokulací (krevní transfuze), nedá se však snadno prokázat a je raritní. (Bartůněk, 2013)

1.7 Patogenita a virulence

U borelií dosud nebyli identifikovány žádné faktory virulence jako toxiny nebo enzymy. Mezi faktory patogenity se řadí především aktivní pohyb pomocí bičků a přítomnost lipopolysacharidového komplexu, který se podílí na vzniku teploty a na tkáňovém poškození. (Bartůněk, 2013; Votava, 2003)

1.7.1 Patogeneze

Lidská infekce započne po přenesení spirochet, prostřednictvím přísátého klíštěte, do kůže. Aby spirochety v těle hostitele přežili, musí se po přenesení začít množit. Nastává tak komplex různých dějů, které jsou závislé na řadě různých faktorů. Bakterie v hostiteli mohou přetrvávat týdny i měsíce, přičemž se pomalu množí.

Časně byli spirochéty borelií prokázány v kostní dřeni, v kůži slezině, v lymfatických uzlinách, ve varlatech i v játrech. Brzy je také zasažen centrální nervový systém, a to ve 2-3 týdnech od začátku infekce. I přesto, že hematogenní šíření je méně intenzivní než například tkáňové či lymfogenní, dochází nakonec mezi 2. a 3. měsícem k osídlení všech hlavních zasažených orgánů – hlavně kůže a podkoží, klouby, nervové tkáně, myokard a kosterních svalů. Přítomné spirochety ve tkáních zde mohou přetrvávat v klidovém režimu v řádech měsíců i let. Tento stav může být plně asymptomatický, nebo ho mohou doprovázet různé klinické obtíže. Střídá se také období klidu a relapsu. Je doložen případ, kdy byla spirochéta borelie izolována devět let po časně neuroborelióze, a to z mozkové tkáně.

Kmeny spirochet se liší membránovými adhezenčními faktory. Kmeny borelií, které tyto adhezenční faktory mají, se mohou šířit z místa inokulace, Klíště do tkáně předá různorodou populaci spirochet, ze které se vyselektují invazivní varianty. To jsou takové, které například neobsahují proteiny OspA a OspC (Bartůněk, 2013).

1.8 Imunitní mechanismy proti borelii

Každý člověk má jinou imunitní ochranu, a tak na infekci borelií reaguje každý zcela jinak. Proti infekci je v obraně zahrnuta vrozená i adaptivní imunita. Během počáteční fáze infekce indukují spirochéty prozánětlivou odpověď v lézích zvaných *erythema migrans*, a v krevních mononukleárních buňkách, které produkují prozánětlivé cytokiny, hlavně INF- γ (Bartůněk, 2006). Při migrujícím erytému je buněčná odpověď organismu spojená s výskytem CD4 a CD8 lymfocytů a makrofágů. Infekce je tak ovlivněna hlavně interakcí mezi boreliemi a makrofágy (fagocytujícími buňkami), které pohlcují bakterie (Roháčová, 2005). Z fagocytované borelie jsou upraveny na antigenní materiál, který spustí imunitní obranu organismu, a makrofágy mají za úkol vyvolat zánětlivou reakci (Daneš, 2003). Toto jsou dvě základní tvrzení, které je dobré rozvinout. Začneme tedy od začátku, kdy borelie pronikne do organismu hostitele.

Jakmile se tak stane, aktivují se během několika dnů základní složky imunitního systému. Jsou to výše zmíněné makrofágy, T a B-lymfocyty. Makrofágy vylučují

prozánětlivé a zánět podporující látky (TNF- α a interleukiny), některé z nich vyvolávají tvorbu adhezních molekul na povrchu buněk. Díky tomu se v organismu začnou tvořit cytokiny, ty způsobují rozšíření cév a kapilár tak, že se zpomalí tok krve a zvýší se propustnost stěn cév. Kromě bílých krvinek do okolí proniká i krevní tekutina s přítomností bílkoviny. Některé z nich se uplatňují v místě infekce v imunitní reakci. Na aktivaci lymfocytů reaguje borelie tvorbou INF- γ . V prvních dnech po infekci začíná protilátkou odpověď, která začíná produkcí IgM. Protilátky IgG nastupují později, o cca 2-4 týdny. Po antibiotické léčbě jejich koncentrace klesá, ale jejich sekrece dokáže přetrvávat měsíce až roky. Protilátky proti OspA a OspB se začnou tvořit až v pozdní fázi infekce. (Bartůněk, 2013; Daneš, 2003) Výskyt protilátek IgM vrcholí přibližně ve 3.- 6. týdnu a jsou zaměřeny pro flagelárnímu antigenu p41. Aktivace je spojena s aktivací B buněk. Kolem 6.- 8. týdne nastupují již výše zmíněné specifické protilátky třídy IgG. (Roháčová, 2005)

Velký význam pro imunitní reakce je fakt, že se borelie vyskytuje převážně v imunologicky zvýhodněných místech – nervová tkáň, oko nebo kloub. Máme čtyři základní druhy patologického působení spirochét borelií:

- spirochéty množící se *in situ*, kdy dochází k následnému poškození díky zánětlivým mediátorům a komponent spirochét
- imunopatologické reakce, které byly vyvolány zkříženou antigenní reaktivitou mezi tkáňovými antigeny a spirochétou
- imunopatologické reakce, které začali přítomností spirochét, ale dokáží pokračovat i bez jejich přítomnosti
- „toxické“ reakce, které jsou spojené s odolností původce v organismu (Bartůněk, 2006)

1.9 Lymeská borelióza

1.9.1 Prevence

Nejlepší prevencí před nákazou lymeské boreliózy, je vyhnout se endemickým oblastem. Endemická oblast, je oblast, ve které se nachází vektor, tedy klíště, nebo jsou zde hlášeny minimálně tři případy onemocnění lidí. (Bartůněk, 1996).

Pokud se vydáme do takovéto oblasti, je dobré dodržovat určitý režim. Jako například omezit pohyb na okraji listnatých lesů a v křovinách. Dále je důležité se chránit vhodným oděvem, jako jsou dlouhé nohavice nebo vyšší obuv. Je také vhodné

používat kvalitní repelentní přípravky, kterými je dobré nastříkat hlavně ponožky, kalhoty a další části oděvu. Po návratu je potřeba se důkladně prohlédnout, nejlépe při mytí. Pokud bychom na sobě našli prisáté klíště, je zapotřebí ho co nejdříve odstranit. Včasným odstraněním klíštěte totiž můžeme zabránit přenosu infekce. Experimentální pokusy dokazují, že pokud je klíště odstraněno do 24 hodin od prisátí, je přenos infekce minimální (pozn. Toto neplatí pro klíšťovou encefalitidu, je přenášena rychleji než borelióza). Ranku po klíšťeti je zapotřebí očistit antiseptikem (Bartůněk, 1996). Nesmíme také zapomenout, že před klíšťaty se musíme chránit též v zahraničí. V tabulce je udán přehled států a jejich pravděpodobná incidence lymeské boreliózy (viz tab. 1).

Borelióza se s výjimkou Austrálie, vyskytuje po celém světě. Nemá totiž jako klíšťová encefalitida vymezenou minimální průměrnou roční teplotu. Borelie se tak vyskytují i na severním zemském pólu. Prokázány tam byly u mořského ptactva, které bylo napadeno klíšťetem *Ixodes uriae*. (Kimming, 2003).

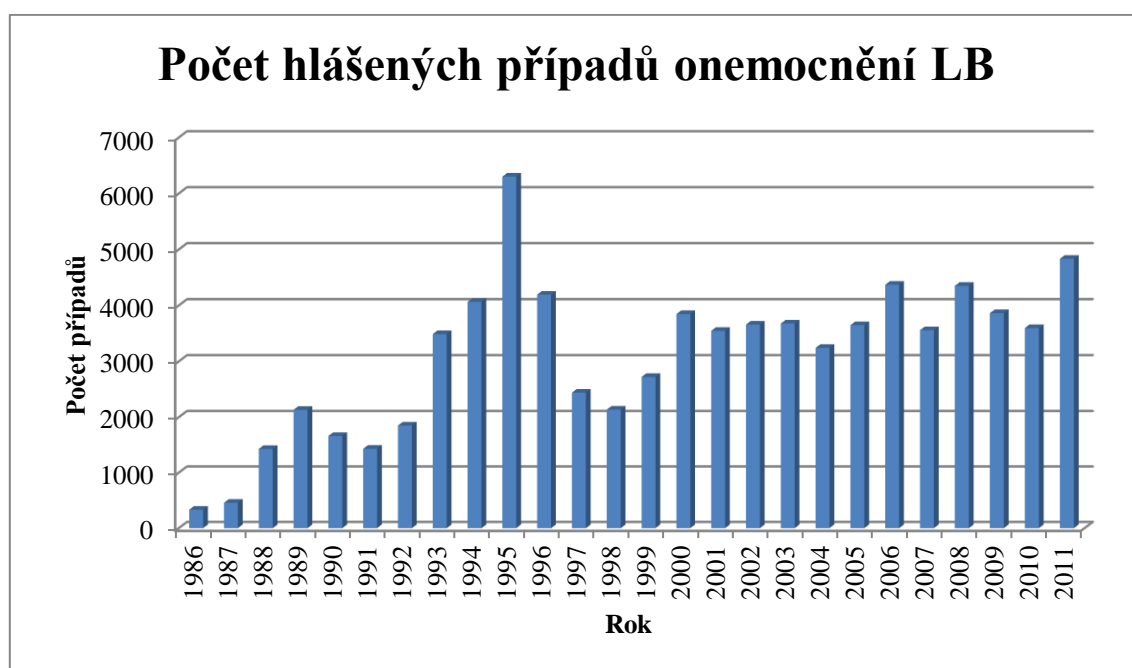
tab. 1 Pravděpodobná incidence lymeské boreliózy v některých státech

Stát	Incidence případ/100 000 osob
Velká Británie	0,3
Irsko	0,6
Francie	16
Německo	25
Švýcarsko	30,4
Bulharsko	55
Švédsko	69
Norsko	125
Slovinsko	168
Rakousko	130
Estonsko	31,2
Maďarsko	11

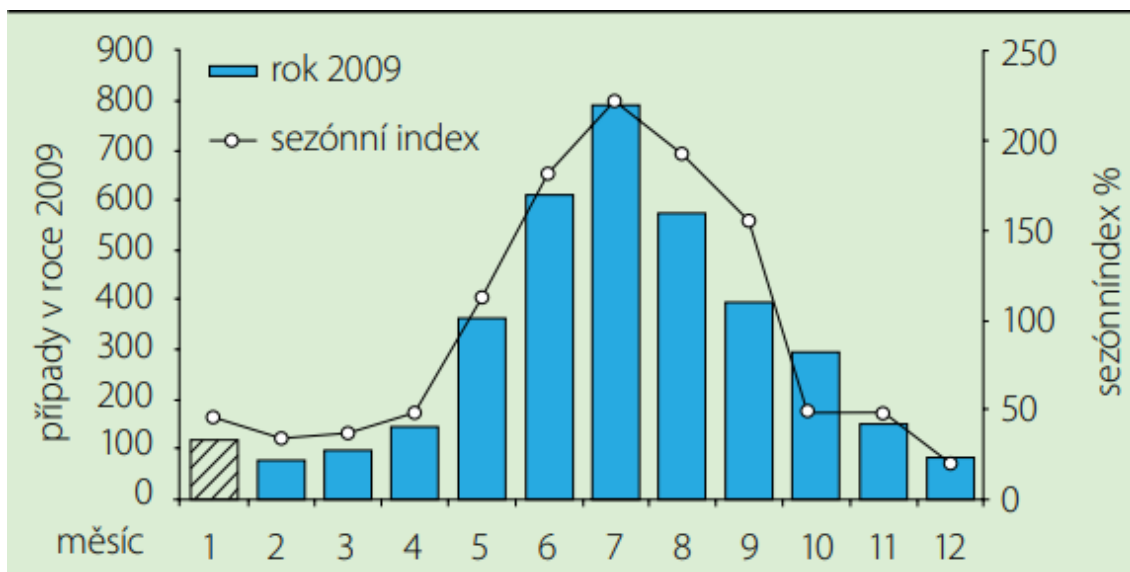
(Zdroj: Bartůněk, 2006)

1.9.2 Epidemiologická situace v ČR

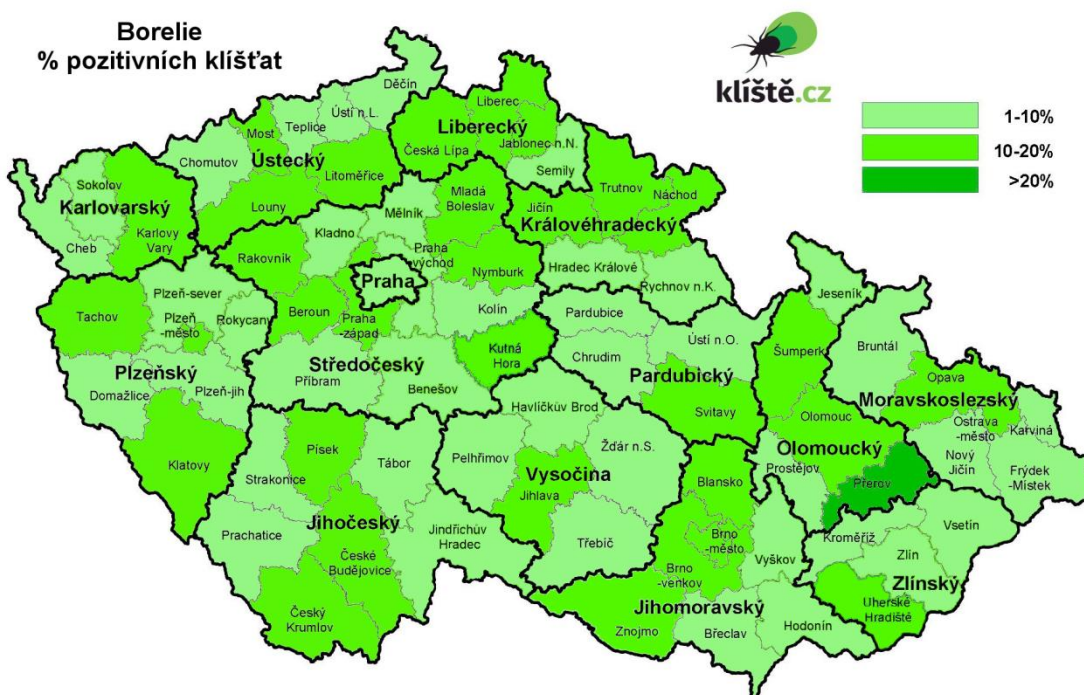
V České republice patří lymeská borelióza k nejčastějším zoonózám přenášeným klíšťaty. Je zde velmi vhodné prostředí pro výskyt nejčastějšího přenašeče lymeské boreliózy v mírném pásmu – a to klíštěte *Ixodes ricinus*. Každý rok je tak hlášeno kolem 3500-4000 případů nakažení (viz. obr. 6). Onemocnění má sezónní charakter. Ten souvisí s aktivitou klíšťat, a to především v létě, (viz obr. 7) nejvíce v červenci. Nemocnost u nás kolísá mezi 40 až 60 případy na 100 000 obyvatel za rok. Incidence je v každém okrese jiná, jak znázorňuje mapa. Záleží to hlavně na počtu infikovaných klíšťat v krajích (viz obr. 8). Nejvíce je nemocná skupina dětí od 5 do 9 let, poté skupina dospělých ve věkovém rozmezí 55-69let. Zajímavostí také je, že nemocnost je 1,7 x vyšší u žen než u mužů (Prokeš, 2015).



obr. 6 Počet hlášených případů onemocnění lymeskou boreliózou v letech 1986-2011 v ČR. (Použitá data Bartůněk, 2006)



obr. 7 Sezónní výskyt lymeské boreliózy dle měsíců v roce 2009 a dlouhodobý průměr. (Zdroj www.szú.cz)



obr. 8 Mapa pozitivních klíšťat na borelie. (Zdroj www.kliste.cz)

1.9.3 Klinický obraz

Onemocnění je značně variabilní. Má četné charakteristické symptomy, přesto některé klinické příznaky jsou společné pro vícero nemocí, a tím znesnadňují její včasnou diagnostiku. U choroby je zvýšená možnost rizika vývoje do chronické formy. To je také důvod, proč je onemocnění tak komplikované. Tyto chronické stavy mohou trvat velmi dlouho, v řádu měsíců i let. Při průběhu nemoci je vyžadováno základní studium patogenů a sledování všech klinických projevů lymeské boreliózy u pacienta. Onemocnění má různé projevy v časném a pozdním stádiu (Stites, 1994).

V současné době se stadia onemocnění dělí na akutní a chronické. Stále je však uznáváno ještě staré dělení na tři stadia. Onemocnění může postihnout jakýkoliv orgán. Nejvíce je zastoupena kůže (67%), muskuloskeletální systém (17%), nervový systém (12%) a zbytek jsou méně časté formy jako oční, kardiální atd. Inkubační doba je v rozmezí týdnů až let (Roháčová, 2005)

1.9.3.1 Schematické dělení:

1. Časné lokalizované stádium – postihuje hlavně kůži v místě, kde se klíště přisálo (*erythema migrans*)
2. Časné diseminované stádium – při tomto stádiu dochází k akutnímu zánětu různých orgánů (systémy periferního, centrálního nervového a kardiovaskulárního systému, výjimkou není ani pohybové ústrojí a kůže)
3. Pozdní diseminované stádium – rozvíjí se chronický zánět ve výše uvedených částech těla.

1.9.3.1.1 Časné lokalizované stadium boreliózy

Tímto stádiem celé onemocnění začíná. Jak bylo výše zmíněno, borelie vstoupí do kůže hostitele při sání infikovaným klíštětem. Nadále se v pokožce borelie pomnoží a mohou vytvořit erytém, což je charakteristicky zarudlé terčovitě zbarvení kůže okolo vpichu. Tvar erytému je dán lokálním šířením borelií z místa infekce centrifugálně. Erytém se objeví v rozmezí 3-30 dnů a měří cca 5 cm. Zánětlivá ložiska erytému se mohou vyskytnout i v jiných místech než v oblasti vpichu – to dalo za následek názvu *erythema migrans* (viz obr. 8)



obr. 9 Erythema migrans (zdroj www.wikipedia.cz)

Dále se mohou u pacienta objevit nespecifické příznaky, jako bolest hlavy, nechutenství, únava, zvýšená tělesná teplota a k tomu bolest svalů a kloubů. Nemoc se díky těmto nespecifickým příznakům špatně určuje, projevy jsou velmi individuální a leckdy probíhá i bezpříznakově. Nemoc se tedy často včasné neurčí a nezačne se tak s léčbou.

1.9.3.1.2 Časně diseminované stádium

Ve druhém stádiu jsou borelie rozšířeny krevní cestou, a to už během několika dnů. Objevuje se boreliový lymfocytom a neurologické, revmatologické či kardiologické projevy. Postup boreliózy v organismu je zcela individuální, ale zhruba kolem druhého měsíce od nákazy se objevuje borelie v mozkové tkáni, myokardu a játrech. V těle se začínají tvořit proti borelii protilátky, je to zhruba třetí až čtvrtý týden od nakažení. Nejprve protilátky třídy IgM, poté třídy IgG.

1.9.3.1.3 Pozdní diseminované stádium

Může se objevit po několika měsících až rocích a projevuje se jako *acrodermatitis chronica atrophicans* (ACA). Tento kožní projev se může objevit na končetinách nebo trupu, výjimkou však není ani oblast obličeje. Dále se může objevit lymeská artritida, karditida, chronická progresivní encefalitida nebo chronická polyneuritida. V tomto stádiu jsou u vyšetření zachyceny protilátky třídy IgG. (Votava, 2010)

1.9.4 Postižení kůže

Postižení kůže u lymeské boreliózy je ten nejtypičtější projev onemocnění. Nejčastější z nich je již výše zmíněný migrující *erythema migrans*, který představuje až 85% všech kožních projevů a objevuje se až u poloviny nemocných. Je to nebolestivé, kruhové nebo oválné postižení kůže červené barvy a může dosáhnout i několika desítek centimetrů. V každé literatuře se objevuje jiná inkubační doba, je tedy velké rozmezí, a to 3-180 dní. Typický pro tento erytém je vybledlý střed se světle červeným okrajem. Mizí po několika týdnech či měsících bez léčby. A to tím, že od centra vybledává až k jeho samému okraji. U některých nemocných se mohou objevovat sekundární erytémy. Ty jsou menší a bývá jich většinou více. Pro zajímavost můžeme uvést, že tyto sekundární erytémy se objevují většinou u pacientů z USA (je to až v 50%) než u pacientů v Evropě (to bývá cca u 8%).

Po klinické stránce rozlišujeme tři druhy *erythema migrans*:

1. Anulární – *erythema migrant anulare* – je to erytém, který se prstencovitě šíří do okolí, má červený lem s hladkým povrchem a jak bylo zmíněno výše, objevuje se u něj centrální výbled.

2. Homogenní – *erythema migrant maculare* – tento erytém se může nebo nemusí šířit do svého okolí, jeho centrum je zarudlé po celou dobu jeho výskytu a povrch je opět hladký.

3. Terčovitě, irisovitě – *erythema migrant concentricum* – erytém vytváří koncentrickou konfiguraci a bývá v podobě dvou nebo i více kruhů, v kruzích se střídá světle červená, tmavě červená a přirozená barva kůže pacienta.

Erytém může doprovázet lymfadenitida (zánět uzlin), nebo obecně chřipkové příznaky, jako je únava, bolest hlavy, bolest kloubů nebo zvýšená teplota. Erytém nebolí, může mírně svědět, být citlivý na dotek, místo na kterém se nachází je teplejší než jeho okolí. (Štork, 2008; Bartůněk 2006; Roháčová, 2005)

1.9.4.1 Boreliový lymfocytom

Ten se dělí na dva typy, a to buď papule (*lymphocytoma boreliensis papulare*), nebo plak (*lymphocytoma boreliensis infiltratum*). Je nebolestivý, červený až fialový uzel s hladkým povrchem, veliký až několik centimetrů v průměru. Nejčastěji postihuje ušní boltce (viz obr. 9), špičku nosu nebo prsní bradavky.



obr. 10 Boreliový lymfocytom na ušním boltci. (zdroj www.rizenadetoxikace.com)

1.9.4.2 Acrodermatitis chronica atrophicans (ACA)

Nastupuje několik let po nakažení borelií a je projevem třetího stadia. Postihuje kůži akrálních extenzorových partií rukou a nohou v okolí kloubů (viz obr. 10). Jsou postiženi častěji ženy než muži a má několik typů. Onemocnění započne formou akutního zánětu kůže (*ACA inflammatoria*). Ten se projeví jako lividní červená skvrna na akrálních částech s prosáknutím, až hustou konzistencí (*ACA maculare*). Jestliže převažuje otok, je červenofialové zbarvení méně patrné (*ACA oedematosa*). Na ulnární straně předloktí, na lokti nebo nad ručními klouby se v průběhu zánětu mohou tvořit tuhé papule a uzly v barvě kůže. Jejich histopatologickým podkladem je soustředěně uspořádané vazivo (*ACA fibromatosa*). Po několika měsících zánět přechází v atrofii, kůže začíná dostávat nepřirozenou barvu, kterou můžeme přirovnat k barvě cigaretového papíru, kdy vymizí i elastické vlákna a rozšíření cév, tzv. dilataci (*ACA teleangiectatica*, *ACA atrophica sensu strictiori*).

Další dermatózy jsou *granuloma anulare*, difuzní reverzibilní alopecie, pseudopelade Brocq. (Bartůněk 2006; Roháčová 2005; Štork 2008)



obr. 11 *Acrodermatitis chronica atroficans* – zánětlivá fáze. (zdroj www.praktickelekarstvi.cz)

1.9.4.3 Léčba kožních projevů

K léčbě jsou vhodná antibiotika z řady tetracyklinů, penicilinů, makrolidů nebo cefalosporinů. Citlivost *Borrelia burgdorferi* je jednotná a antibiogramy prakticky shodné. Nemusí se tedy stanovovat citlivost kmene u pacienta. Dle toho, který orgán je postižen, a ve kterém stadiu onemocnění je, lékař zvolí druh antibiotik, způsob podání a také dobu léčení.

- Doxycyclin – Tetracyklinový derivát, který má široké spektrum účinnosti. Ve srovnání s tetracyklinem je jeho spektrum účinnosti několikrát vyšší. Nejúčinnější při léčbě časně fáze a také v preventivním opatření proti chronicitě. Dobře proniká do tkání, je dobře vstřebatelný po perorálním podání. Může se také podávat dlouhodobě. Jeho nevýhodou je, že může dráždit žaludeční sliznici a je fotosenzitivní.

- Amoxicilin – Je to analog ampicilinu. Má stejné spektrum účinku, které je někdy i mnohem výraznější. Podáváme ho především tehdy, pokud nemůžeme podat tetracyklinu, tedy u těhotných a kojících žen, u malých dětí a hlavně u pacientů s alergií na tetracykliny.

- Azitromicin - Je to acidorezistentní antibiotikum, které se výborně vstřebává, dostává se do tkání, ze kterých se postupně uvolňuje. Je určen převážně pro těhotné a kojící ženy a pro děti do 8 let věku, které jsou alergické na penicilin.

- Ceftriaxon, cefotaxim a penicilin G – Používají se při 2. a 3. stadiu onemocnění, k léčbě nervových, kloubních a srdečních projevech onemocnění. Má vysokou účinnost a dobře proniká do likvoru a synoviální tekutiny. Aby se mohli eliminovat cysty, doporučuje se přidávat i metronidazol. (Hejzlar, 1995; Bartůněk, 2005)

1.9.5 Postižení kloubů (muskuloskeletálního systému)

Jedná se především o artritidy, myozitidy, burzitidy, fasciitidy, tenditidy, tendovaginitidy nebo kapsulitidy. Označení lymeská artritida, které se používá je tak označení pouze pro postižená kloubů, které se projeví v pozdním stadiu. Muskuloskeletální systém zas může být postižen ve kterékoli fázi onemocnění boreliemi. Nemocný může reagovat artralgiemi nebo myalgiemi již při časně diseminaci, tedy hned na počátku. V časně diseminované fázi jsou to artritidy malých kloubů, zánět šlach a svalů, k tomu dochází k zánětu i jejich obalů. V pozdní diseminaci poté na řadu přicházejí velké klouby. Ve většině případů se jedná o monoartritidy, kdy bývá postižen pouze jeden kloub, oligoartritidu, kdy bývají postiženy 2-4 klouby nebo polyartritidu s postižením více jak 5ti klouby. Nejvíce postihnuté klouby jsou kolenní, ramenní či loketní. (Roháčová, 2005)

Postižení pohybového aparátu můžeme rozdělit jednoduše do tří skupin, a to artralgií, artritidu nebo chronické změny kostí a kloubů.

1. Artralgie

Migrující bolest kloubů, kostí a páteře bez známek nějakého poškození, kdy mohou být bolestivé i svaly (myalgie). Ve druhém a třetím stadiu jsou artralgie velmi časté, ale objevit se mohou i v prvním stadiu u horeček. Bolesti trvají od několika dnů až po několik týdnů. Jen málokdy mohou bolesti zůstat trvalé. Provází je zvýšená únava.

2. Artritida

Stejně jako artralgie se objevuje ve druhém a třetím stadiu. Artritida je zánět kloubů, který je doprovázen otokem a může se objevit i zmnožení nitrokloubní tekutiny. Tím je omezena hybnost, funkce a místo je velmi bolestivé.

3. Chronické změny kostí a kloubů

Všechny výše zmíněné změny mohou doprovázet chronické boreliové kožní léze *acrodermatitis chronica atroficans* (ACA). (Bartůněk, 2006)

1.9.5.1 Lymeská artritida

Je to systémové zánětlivé onemocnění, které má široké spektrum změn a projevů v oblasti pohybového aparátu. Dochází tak v časném nebo pozdě diseminovaném stadiu infekce.

Na rozvoji kloubních onemocnění, viz výše, se podílejí dva mechanismy, a to odolnost infekce a navozené imunopatologické děje díky infekci. Nejčastěji je postižen kolenní kloub. Při artritidě kolene je v místě postižení zvýšené množství synoviální tekutiny, která může migrovat do podkolenní, kde následně vznikne Bakerova cysta. Pacienti také mohou trpět migrujícími artralgiemi a postižením šlachových úponů nebo šlachových pochev. Po léčbě mohou u některých léčených pacientů přetrvávat kloubní problémy a zvýšená únava. (Pavelka, 2010)

1.9.6 Postižení nervového systému

1.9.6.1 Neuroborelióza

Postižení nervového systému u lymeské boreliózy je velmi časté a může být postižen jak periferní, tak centrální nervový systém. Nervová tkáň je sice chráněna hematoencefalickou bariérou, ale i přesto borelie do ní proniknout krátce po začátku infekce. Jak je to možné, zatím nebylo vysvětleno, a je nad touto otázkou řada otazníků.

Mezi projevy akutní neuroboreliózy patří encefalitida a meningitida. Odlišit se dají neurologickým nálezem v mozkomíšním moku. Vzácně se může objevit i myelitida, tedy postižení míchy. Meningitidy a encefalitidy jsou typicky doprovázeny obrnami lícního nervu, kdy mohou být postiženy obě strany obličeje.

Máme-li u neuroboreliózy postižených více hlavových nervů, jedná se o *neuritis cranialis multiplex*. Dalším charakteristickým projevem je Garinův-Bujadouxův syndrom. Jedná se o meningoradikulitidu, kterou charakterizuje částečné ochrnutí (paréza) například lícního nervu.

V některých publikacích se můžeme dočíst o spojitosti neuroboreliózy s psychiatrickým onemocněním, poruchami paměti či chováním. Tato spojitost dostala označení Lyme psychiatric syndrome (Roháčová, 2005).

1.9.6.2 Postižení oka

Postižení očí není u lymeské boreliózy časté, je však velmi různorodé. Pokud se objeví, může doprovázet jakoukoliv fázi onemocnění. Oční forma postižení u lymeské boreliózy je obtížně stanovitelná. Žádný obraz oční formy postižení není pro lymeskou

boreliózu typický a musí se tedy brát v potaz možnost, že výskyt očního postižení nemusí mít spojitost právě s probíhající lymeskou boreliózou. Nejčastější projevy postižení oka u lymeské boreliózy jsou:

1. Konjunktivitida, episkleritida nebo edém víček – objevuje se u první fáze onemocnění, po erytému;
2. Epiteliální nebo stromální keratitida – po prvních příznacích se může objevit po měsících až rocích. A to v podobě subepitálních neohrazených infiltrátů, nebo intersticiální keratidy, která postupně indukuje vaskularizaci rohovky;
3. Uveitida – objevuje se hlavně u pozdější fáze onemocnění, většinou jako projev imunoalergické reakce;
4. Dále jsou to exsudativní odchlípení sítnice, městnavá papila, neuropatie optického nervu či částečné ochrnutí okulomotorických nervů (Bartůněk, 2013).

1.10 Laboratorní diagnostika lymeské boreliózy

Diagnostika lymeské boreliózy, je vzhledem k jejímu širokému spektru klinických příznaků, obtížná. Onemocnění je typické svými obdobími remise a následujícími akutními stavy, trvající týdny, či měsíce. Takto cyklický průběh nemoci, který je daný antigenní variabilitou a imunomodulací hostitele (schopnost měnit imunitní odpověď), vyžaduje podrobné studium patogenů a využití mnoha laboratorních metod. (Bartůněk, 2006)

Laboratorní metody v diagnostice lymeské boreliózy dělíme na dva typy:

1. Přímé metody
2. Nepřímé metody

1.10.1 Přímé metody

Do těchto metod se řadí kultivace, mikroskopie, histologie a detekce nukleových kyselin, tedy PCR (polymerázová řetězová reakce), kvalitativní či kvantitativní PCR v reálném čase. Tyto přímé metody, se využívají hlavně tehdy, když selžou v diagnostice metody nepřímé, tedy sérologické. Je to z toho důvodu, že jsou pacienti, u kterých se nevyvine protilátková odpověď. Přímé metody průkazu jsou pak jedinou volbou v diagnostice v prokázání vazby mezi klinickými příznaky a etiologickými obtížemi. Přímé metody jsou na rozdíl od těch nepřímých obtížnější a mnohem nákladnější. (Bartůněk, 2013)

1.10.1.1 Kultivace

Kultivace je u borelií poměrně složitá. Jsou to sice kultivovatelné mikroorganismy, citlivost metody však není zcela uspokojivá. Odběr vzorku na kultivaci musíme provádět za přísně sterilních podmínek. Používají se vakuované zkumavky s EDTA nebo s citrátem. V citrátové krvi nám borelie v lednici vydrží živé až 9 dní. Na kultivaci se musí použít kultivační půda, která je vysoce obohacená a s přísadkami zvířecích sér. Většinou o 6% králíčího nebo koňského séra. Ke kultivaci jsou na výběr různé druhy půd, například BSK II, BSK-H, Sigma, EMEM atd. Nejčastěji se používá BSK médium (Barbourova-Stoennerova-Kellyho) a trvá 7-14 dní. Kultivace probíhá v několika stádiích, v počátku logaritmického růstu, za 1-14 dní se provede kultivace statická, kdy díky růstu borelií a jejich změně v metabolismu dochází ke změně prostředí. Za 14 dní se provádí kultivace kontinuální, na nové půdě ve čtyřdenních intervalech. Tato část se nazývá pasážování. Po třech tzv. pasážích můžeme pak mluvit o izolaci kmene borelie.

Růst borelií může ovlivnit teplota (ideální je u nich 34-35°C), osmotický tlak, ultrafialové záření, sluneční světlo, pH prostředí (pH 7,5) a oxidoredukční potenciál (Eh je od +0,1 do 0,1-0,2), ke snížení oxidoredukčního potenciálu můžeme použít cystein nebo kyselinu aspartovou.

Zachycení borelií závisí i na druhu odebraného vzorku, například vyšetření z likvoru či kůže. Z krve se borelie zachytí vzácně. (Roháčová, 2005; Votava, 2010)

1.10.1.2 Elektronová mikroskopie

Umožňuje rychlý průkaz spirochet, které můžeme detailně v mikroskopu sledovat. Vidíme jejich velikost, počet bičíků, části povrchových membrán.

Klasická elektronová mikroskopie se v počátku vyšetřování lymeské boreliózy používala velmi hojně, teď už se od ní ustupuje. Přínosem však je vylepšená mikroskopická metoda Larssona a Bergstroma, která je založená na dvoufázové centrifugaci spirochet borelií z krve pacienta, případně z nasátých klíšťat. K barvení se používá Giemsa nebo akridinová oranž. (Bartůněk, 2006; Roháčová, 2005)

1.10.1.3 Histologický průkaz

Využívá se u něj barvení Giemsou a toluidinovou modří, nebo technika stříbření. Vzorku jsou zalité do parafínu či pryskyřice. Používají se monoklonální protilátky proti povrchovým antigenům, jen tak je průkaz specifický. (Bartůněk, 2006; Roháčová, 2005)

1.10.1.4 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Tato metoda je nejvyužívanější přímou metodou. Velmi citlivá metoda, která je založena na cyklickém zmnožení cílové DNA. Během procesu dochází k rozdělení dvoušroubovice DNA na jednotlivá vlákna, na které se dále navazují primery (krátké úseky DNA, které se specificky párují s komplementární oblastí na templátové DNA). Nové vlákno se syntetizuje prostřednictvím nukleotidů, které jsou volně přítomné v roztoku, a za pomoci termostabilní DNA polymerázy. Tyto kroky se cyklicky opakují díky změnám teplot uvnitř cycleru. Díky tomu se získá dostatečné množství kopií hledané DNA, které se dále prokazují pomocí gelové elektroforézy.

Vyšetření PCR se můžeme provádět z mozkomíšního moku, synoviální tekutiny, plodové vody, z krve (vzácnější z důvodu pronikání borelií do tkání) nebo z moči. Moč je ultrafiltrát plazmy, je zde tedy vyšší koncentrace borelií, je tedy velmi vhodná. (Roháčová, 2005)

1.10.2 Nepřímé metody

Řadíme sem serologická vyšetření, kterých se používá hned několik. Dříve se hojně využívala imunofluorescence. Metoda však měla velmi nízkou specificitu. Jejím problémem byla i nemožnost automatizace, proto se k vyšetření u tohoto onemocnění přestala využívat. Nyní se v klinických laboratořích běžně používají níže popsané nepřímé metody, ELISA a Westernblot. (Votava, 2003)

1.10.2.1 ELISA

ELISA (angl. zkratka *enzyme-linked immuno sorbent assay*), známá také jako **EIA** (angl. zkratka *enzyme immuno assay*), je analytická metoda, která se využívá ke kvantitativnímu stanovení protilátek proti danému antigenu. Tato metoda má řadu variant. Všechny jsou založeny na vysoce specifické interakci antigenu a protilátky, přičemž na jednoho z těchto partnerů je kovalentně navázán enzym (nejčastěji peroxidáza nebo alkalická fosfatáza). Enzym aktivuje chemickou přeměnu substrátu, který je přidáván do reakční směsi, na produkt, který je barevný. Tento produkt se poté stanovuje spektrofotometricky. Koncentrace produktu je úměrná koncentraci antigenu nebo protilátky ve vzorku. Dalším společným znakem metod ELISA je zakotvení antigenu na nerozpustný nosič (často povrch reakční nádoby nebo mikrotitrační destičky), což usnadňuje separaci imunochemicky navázaných molekul. (Votava, 2010)

Zjišťují protilátky IgM i IgG. Vyšetřují se z krevního séra, mozkomíšního moku nebo ze synoviální tekutiny. Je mnoho komerčních souprav, kde se používají heterogenní sérotypů Bbsl. Nová generace testů je vysoce citlivá pro více společných a specifických antigenů. Z povrchových antigenů to jsou: OspA (31, 32 a 32,5 kDa), OspB (34 kDa), OspC (22, 23 a 25 kDa). Z proteinů periplasmatického prostoru to jsou: MEP (83 až 93 kDa) či glykosamidový receptor p39. Většina testů ELISA je reaktivní i proti antigenu bičíku (41kD) a antigenu teplotního šoku. (Bartůněk, 2013)

1.10.2.1.1 Druhy ELISA

- Nekompetitivní (sendvičová) ELISA

K průkazu protilátek existuje několik variant této metody. Příkladem může být detekce protilátek u toxoplazmózy. Na pevnou fázi se naváže antigen, přidá se sérum, které vyšetřujeme, konjugát a jako poslední substrát. Díky tomu, že protilátka se tak nachází mezi antigenem a konjugátem, je tato metoda nazývána sendvičová. Konjugát je zde namířen proti lidským antigenům IgA, IgG nebo IgM. U průkazu IgM protilátek může nastat falešná pozitivita v sérech, které obsahují tzv. revmatoidní faktor (protilátka třídy IgM proti lidskému IgG, vyskytuje se např. u autoimunitních onemocnění).

- Metoda záchytných protilátek

Tato metoda je spolehlivější. Na destičky se natáhnou protilátky proti lidskému IgM. Přidá se vzorek séra, z něhož se vychytají všechny molekuly IgM, bez ohledu na to, jaká je jejich protilátkou specifita. Dále následuje antigen, který se zachytí, jestliže v séru byli proti tomuto antigenu IgM protilátky. Konjugát je zde namířen proti antigenu. U tohoto postupu nedochází k falešně pozitivním výsledkům při obsažení revmatoidního faktoru.

- Kompetitivní (soutěživá) ELISA

Během této metody se k důkazu protilátek, se k navázanému antigenu přidá směsice vzorku, a konjugátu proti antigenu. Konjugát tak soutěží o antigen s protilátkami.

1.10.2.1.2 Výhody ELISA

Největší výhoda u těchto metod je možnost automatizace, díky čemuž se umožní vyšetřovat velký počet vzorků. Nepatrné jsou tak nároky na kvalifikaci u personálu v laboratoři, mnohdy stačí pouhé zaškolení se v této metodě. ELISA je také univerzální, na trhu jsou k dispozici soupravy k důkazu protilátek skoro proti všem mikrobům. Umožňuje nám také prokázat protilátkovou aktivitu v jednotlivých třídách imunoglobulinů. Dokážeme tak odhadnout, kdy zřejmě k infekci, kterou vyšetřujeme, došlo.

1.10.2.1.3 Nevýhody ELISA

Jedinou nevýhodou je u této metody cena. A to jak přístroje, tak komerčních souprav. (Votava, 2010).

1.10.2.2 Western Blot (Imunoblot)

V klinické laboratoři se používají komerčně dodávané kity pro stanovení protilátek proti boreliím z patientských sér.

1.10.2.2.1 Postup při vlastní reakci

Stripy jsou inkubovány jednotlivě v pufru udržujícím stálé pH prostředí v jamkách vaničky určené pro imunoblot. Poté se přidá patientské sérum. Pokud jsou v séru přítomny protilátky, navážou se na příslušný antigen na stripu. V dalším kroku se přebytečné protilátky odstraní promytím pomocí univerzálního pufru. Následuje přidání konjugátu, což jsou enzymem značené anti-human protilátky. Po inkubaci opět dojde k promytí stripů a odstranění přebytečných protilátek. Dále se přidá substrát,

který s enzymem na anti-human protilátce vytvoří barevnou reakci. Reakce se zastaví přidáním destilované vody. Měří se spektrofotometricky.

Pacientovo zředěné sérum se nanese na pásek. Pokud jsou v séru přítomné protilátky, navážou se na příslušné antigenní frakce. V dalším kroku se přebytečné protilátky odstraní promytím pomocí univerzálního pufru. Následuje přidání konjugátu, což jsou enzymem značené anti-human protilátky. Po inkubaci opět dojde k promytí stripů a odstranění přebytečných protilátek. Dále se přidá substrát, který s enzymem na anti-human protilátce vytvoří barevnou reakci. Reakce se zastaví přidáním destilované vody. Měří se spektrofotometricky.

1.10.2.2.2 Využití metody

Slouží k potvrzení či vyloučení přítomnosti protilátek proti borelióze v sérech u pacientů, jejichž séra byla prvně zpracována metodou ELISA. Tím dojde k potvrzení nebo vyloučení diagnózy lymeské boreliózy. Díky této metodě se dají vyloučit falešně pozitivní výsledky, které vyšli u metody ELISA a také se pomocí ní dají prokázat specifické protilátky třídy IgM. Ukázalo se, že na začátku imunitní reakce se tvoří protilátky jen proti některým antigenům borelií. (Votava, 2010)

2 PRAKTICKÁ ČÁST

Praktická část mé bakalářské práce spočívala ve vyšetření protilátek třídy IgG a IgM proti boreliím metodou Western Blot (dále jen WB), kdy se pomocí WB potvrdí či vyvrátí pozitivní výsledek z ELISA testu. Vyšetření boreliózy pomocí ELISA testu je v laboratoři plně automatizován pomocí analyzátoru LIAISON od firmy DiaSorin. Z tohoto důvodu spočívala má práce ve vyšetření 510 patientských sér pomocí metody Western Blot.

Zkumavka s krví pacientů se nejprve v laboratoři přijme, řádně dle pravidel označí pomocí čárového kódu a následně se zcentrifuguje (3000 otáček na 10 minut), aby se získalo sérum, které se poté vyšetřuje. V laboratoři sylab czech s.r.o., kde jsem absolvovala praxi, jsem se podílela na vyšetření 510 sér pacientů pomocí Imunoblotu. Séra byla od mužů, žen i dětí různých věkových kategorií. Výsledky vyšetření jsou uvedeny níže a pro názornost shrnuty i pomocí grafů.

2.1 *Vyšetření metodou ELISA*

Vyšetření v mikrobiologické laboratoři touto metodou probíhá na analyzátoru LIAISON. Ruční ELISA se v této laboratoři neprovádí. Test se jmenuje jednoduše LIAISON Borrelia IgG nebo IgM.

2.1.1 *Test LIAISON BorreliaIgG*

2.1.1.1 *Princip*

Test využívá metodu chemiluminiscenční imunoanalýzy (CLIA) pro stanovení specifických protilátek třídy IgG proti *B. burgdorferi sensu lato* (dále jen Bbsl) ve vzorcích lidského séra. Může se použít i plazma.

Testovací souprava využívá již výše zmíněný antigen borelií VlsE. Tento zevní povrchový lipoprotein má hlavní význam v imunitní odpovědi proti lymeské borelióze (dále LB). Rekombinantní VlsE je nejvhodnějším markerem pro laboratorní diagnostiku časně i pozdní IgG imunitní odpovědi LB, a má vysokou diagnostickou citlivost i specifitu.

Specifické protilátky IgG proti Bbsl jsou stanoveny metodou nepřímé chemiluminiscenční imunoanalýzy (CLIA). Součástí soupravy pro vyšetření protilátek proti Bbsl jsou magnetické částice, které jsou potaženy rekombinantními antigeny specifickými pro Bbsl, a myší monoklonální protilátky, které jsou značeny derivátem isoluminolu (konjugát isoluminol-protilátka). Roztoky se musí inkubovat.

Při první inkubaci se protilátky proti Bbsl přítomné v kalibrátorech, vzorcích či kontrolách navážou na pevnou fázi. Během druhé inkubace reaguje konjugát s IgG proti Bbsl, které jsou již navázané na pevnou fázi. Po každé inkubaci se promytím odstraní materiál, který se nenavázal. V další fázi se přidají startovací reagenty, díky kterým dojde k prudké chemiluminiscenční reakci. Fotonásobičem se měří světlý signál, který odpovídá množství konjugátu isoluminol-protilátka. Výsledek se udává v relativních světelných jednotkách (RLU) a koresponduje s koncentrací IgG protilátek proti Bbsl v kalibrátorech, vzorcích či kontrolách.

2.1.2 Test LIAISON Borrelia IgM II

Test využívá metodu chemiluminiscenční imunoanalýzy (CLIA) pro kvalitativní stanovení specifických protilátek třídy IgM proti Bbsl ve vzorcích lidského séra či plazmy.

Testovací souprava pro zvýšení přesnosti diagnostiky využívá specifické rekombinantní antigeny získané z bakterie *E. coli*. Souprava má pevnou fázi potaženou vysoce specifickým zevním povrchovým proteinem OspC, který je dominantní pro IgM odpověď v časně fázi infekce, a antigen VlsE. Stanovení je dále sejně jako u stanovení IgG.

2.2 Vyšetření metodou Western Blot

2.2.1 Test Anti-Borrelia EUROLINE

2.2.1.1 Princip testu

Testovací souprava EUROLINE umožňuje kvalitativní *in vitro* stanovení lidských protilátek třídy IgG nebo IgM proti antigenům borelie v séru či v plazmě. Testovací souprava obsahuje testovací, komerčně vyráběné stripy, které jsou potažené purifikovanými antigeny. V prvním kroku reakce se inkubují naředěné vzorky pacientů s imunoblotovými stripy. Jestliže dojde k pozitivní reakci, specifické IgG nebo IgM protilátky se navazují na odpovídající antigeny. K detekci navázaných protilátek slouží druhá inkubace provedená s enzymově značenými anti-lidskými protilátkami (enzymový konjugát), která katalyzuje barevnou reakci.

2.2.1.2 Příprava reagensí

- Všechny reagensie musejí být minimálně 30 minut před zahájením testu vytemperovány na pokojovou teplotu.
- Potažené testovací stripy: Stripy jsou komerčně vyráběné a ihned připraveny k použití.
- Pozitivní kontrola: Kontrolním sérum je dodáno 50x koncentrované. Pro jeho přípravu jsem odebrala požadované množství připraveného séra pipetou a naředila je 1:51. Kontrola se musí řádně promíchat. Kontrolu jsem si připravila IgG i IgM (každá kontrola má svou testovací soupravu).
- Enzymový konjugát: Enzymový konjugát je koncentrovaný 10x. Stejně jako u pozitivní kontroly, tak i enzymový konjugát jsem naředila pomocí univerzálního pufru, a to 1:10.
- Univerzální pufr: Tento pufr je také 10x koncentrovaný. Nádobka s pufrem musí být dobře promíchaná. Poté jsem z ní pipetou odebrala požadované množství. Pufr jsem naředila 1:10 destilovanou vodou.
- Substrátový roztok: Tento roztok je připraven k použití a nemusela jsem ho tedy nijak ředit. Musela jsem však dávat pozor, substrát je citlivý na světlo, pracovala jsem tedy rychle a nádobku dlouho nevystavovala dennímu světlu.

2.2.1.3 Postup testu

Test jako takový není nijak složitý, jelikož už je vyšetření z větší části automatizované. Před zahájením testu se provede automatický self-test analyzátoru. Poté, jsem si připravila reagensie, viz výše. Jednotlivé reagensie jsem přiřadila ke konkrétním čerpadlům analyzátoru, a ty se pak načerpají do hadiček přístroje. Poté jsem si do inkubační vaničky připravila požadované množství stripů (viz obr. 11). Nejprve jsem pokládala proužky IgG, poté proužky IgM, podle protokolu. Poté čárovým kódem označené zkumavky se sérem jsme umístila dle čísel do stojánku a ten jsem vložila do analyzátoru (viz obr. 12). Analyzátor si séra načte a dále pracuje automaticky. Musela jsem pouze hlídat, aby nedošly nějaké roztoky, či nenastane jiný problém. V případě, že by k nějakému problému došlo, přístroj to ohlásí. Při činnosti kroku "Pipetování séra" může nastat situace, kdy se přístroji nepodaří nalézt hladinu vzorku v primární zkumavce. V takovém případě po ukončení automatického pipetování všech vzorků analyzátor vyzve k ručnímu napipetování vzorků, u kterých automatické pipetování selhalo.



obr. 12 Analyzátor s připravenými roztoky a vanička na stripy. (zdroj vlastní foto)



obr. 13 Vanička s připravenými stripy a stojan se zkumavkami s patientskými séry. (zdroj vlastní foto)

Vyhodnocení testu probíhá též v počítači. Dříve se jednotlivé stripy nalepovaly na zelený papír, skenovaly a vyhodnocovali ručně. Tento moderní analyzátor však disponuje kamerou, která stripy na konci testu vyfotí, odešle do počítače a výsledky automaticky vyhodnotí. Jednotlivé výsledky se ukládají v podobě PDF a tisknou se.

Tištěné výsledky z analyzátoru se spolu s výsledkovým listem zasílají lékaři. Pro úplnost je ještě přiložen list, který vysvětluje význam jednotlivých antigenů.

Poznámka: Správné provedení testu na protilátky třídy IgG (či IgM) proti antigenům borelie je potvrzeno zabarvením kontrolního proužku a pozitivní reakcí IgG (či IgM) proužku. Jestliže jeden z těchto proužků vykazuje špatnou nebo žádnou barevnou reakci, výsledky nemohou být použity a test se musí zopakovat. Zároveň nám správnost výsledků potvrzují pozitivní kontroly v obou třídách protilátek.

Antigeny a jejich uspořádání na stripu ze soupravy IgG:

- 1) Antigeny- VlsE Ba, VlsEBb a VlsEBg: Vysoce purifikované rekombinantní antigeny VlsE z *Borrelia afzelii* (Ba), *Borrelia burgdorferi* (Bb) a *Borrelia garinii* (Bg).
- 2) Lipid Ba a Lipid Bb: Z membránové frakce byly extrahovány lipidy *Borrelia afzelii*(Ba) a *Borrelia burgdorferi* (Bb). Protilátky proti lipidům borelie, které se často vyskytují v pozdní fázi infekce.
- 3) p83: Purifikovaný rekombinační protein p83 z borelie. Protilátky proti p83 se často objevují v pozdní fázi infekce.
- 4) p41 a p39: Purifikovaný rekombinantní flagelin (p41) a BmpA (p39) z borelie.
- 5) OspC: Vysoce specifický dimer OspC získaný (p25) z různých boreliových kmenů.
- 6) p58, p21, p20, p19, p18: Rekombinantní, vysoce specifické antigeny z *Borrelia burgdorferi* purifikované afinitní chromatografií.
- 7) Kontrolní proužky: IgG nebo IgM.
- 8) Kontrola: Indikuje správné provedení inkubace s konjugátem.

Antigeny a jejich uspořádání na stripu IgM

- 1) Antigeny
- VlsE Bb: Rekombinantně vyrobený a vysoce purifikovaný antigen VlsE *Borrelia burgdorferi* (Bb).
- 2) p41 Ba a p39 Ba: Elektroforézou purifikovaný nativní flagelin (p41) a nativní BmpA (p39) *Borrelia afzelii*(Ba)
- 3) OspC Ba, OspC Bb a OspC Bg: Purifikované, vysoce specifické nativní antigeny OspC (p25) *Borrelia afzelii*(Ba), *Borrelia burgdorferi* (Bb) a *Borrelia garinii* (Bg).
- 4) Kontrolní proužky: IgG nebo IgM
- 5) Kontrola: Indikuje správné provedení inkubace s konjugátem.

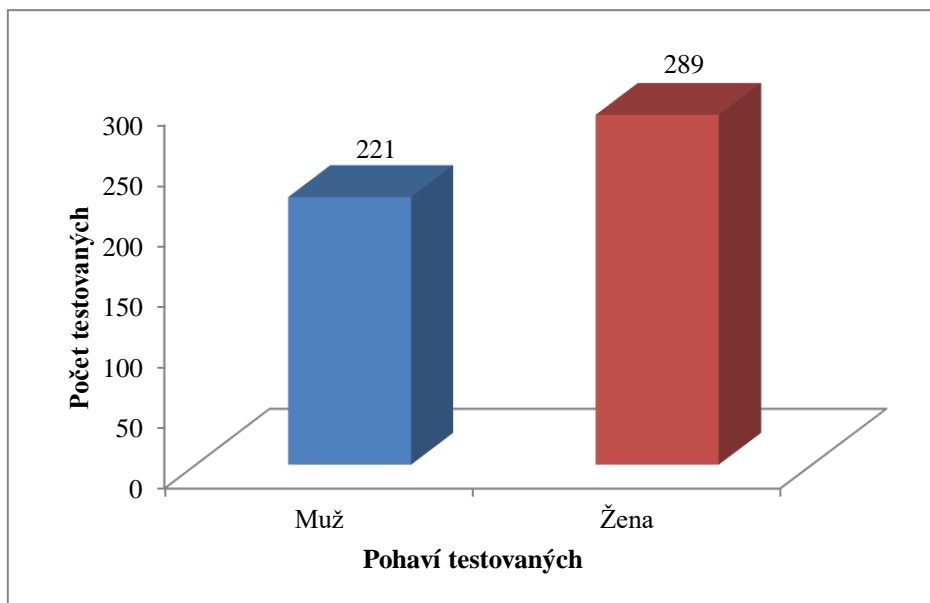
3 VÝSLEDKY

Během své praxe jsem se velkou měrou podílela na vyšetření celkem 510 vzorků pomocí metody Western blot. Své výsledky jsem shrnula v příložených grafech a tabulkách (viz níže).

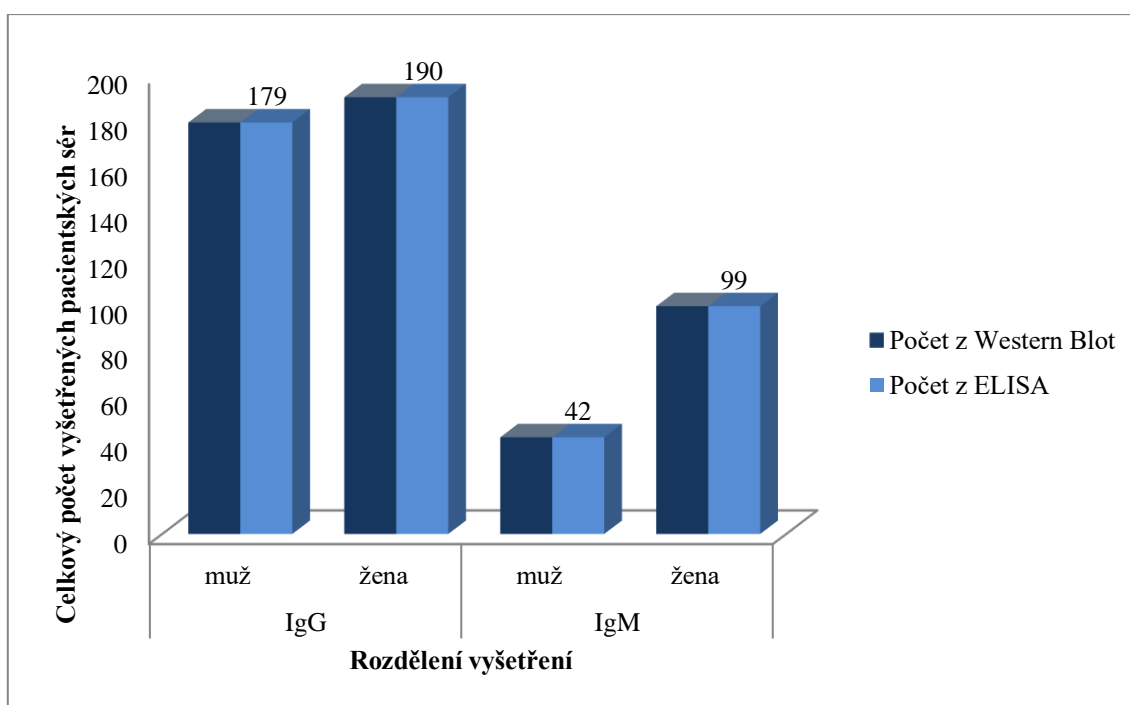
První tabulka (viz tab. 2) nám přehledně udává počty vyšetřených patientských sér v jednotlivých třídách protilátek pomocí ELISA testu a Western Blotu. Zároveň jsem vyšetřené vzorky rozdělila podle pohlaví (viz obr. 14). Pro lepší znázornění je tabulka zanesena taktéž do grafu (viz obr. 15).

tab. 2 Celkový počet vyšetření rozdělený podle pohlaví, tříd vyšetřovaných imunoglobulinů a podle typu testu.

	Western Blot	ELISA
IgG	369	369
Muž	179	179
Žena	190	190
IgM	141	141
Muž	42	42
Žena	99	99
Celkový součet vyšetření	510	510

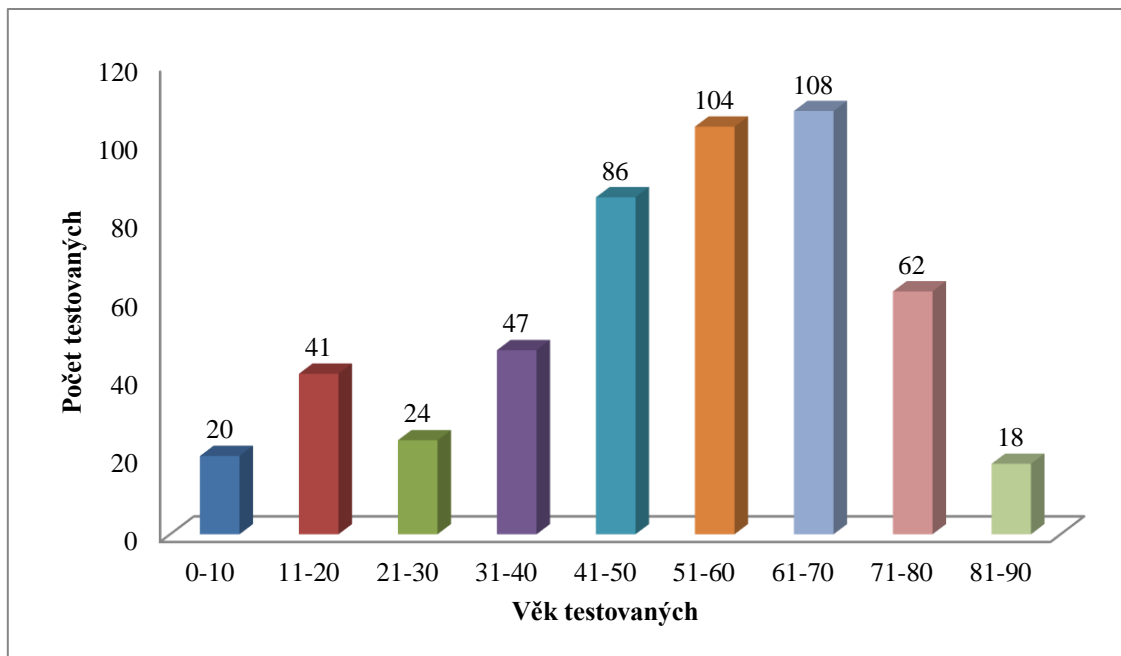


obr. 14 Rozdělení testovaných na pohlaví.



obr. 15 Celkový počet vyšetření rozdělený podle pohlaví, tříd vyšetřovaných imunoglobulinů a podle typu testu.

Následující graf (viz obr. 16) nám zobrazuje počet testovaných rozdělených podle věkových kategorií. Nejvíce testovaných pacientů bylo ve věkové kategorii 61-70 let. Pacienti ve věku 51-60 let byly druhou nejčastější věkovou skupinou, která podstoupila testování na boreliózu.



obr. 16 Věkové kategorie testovaných pacientů na lymeskou boreliózu.

Hlavním cílem této bakalářské práce je porovnání dvou metod: ELISA a WB. Jelikož jsem samostatně prováděla pouze metodu WB, která potvrzuje, či vyvrací pozitivní výsledky na Lymeskou boreliózu metodou ELISA, vytvořila jsem tabulku, která znázorňuje počet pozitivních výsledků na protilátky třídy IgG a IgM, kde pod každou protilátkou jsou udány i pozitivní a negativní výsledky pomocí metody WB. Následuje tabulka (viz tab. 3), která nám ukazuje výsledky vyšetření pomocí WB v jednotlivých třídách protilátek a jednotlivých pohlaví.

tab. 3 Přehled potvrzených a vyvrácených testů.

	Počet pacientů
IgG	
ELISA pozitivní	293
WB negativní	54
WB pozitivní	239
IgM	
ELISA pozitivní	118
WB negativní	31
WB pozitivní	87
Celkový součet	411

4 DISKUZE

Své získané výsledky jsem porovnávala s informacemi, které jsou volně dostupné na webových stránkách Státního zdravotního ústavu (SZÚ). Porovnávaná data jsou z let 2015 a 2016, kdy bylo hlášeno 2847 a 4694 případů onemocnění LB. Od roku 2000 je trend v nemocnosti LB setrvalý s meziročními výkyvy. Jestliže porovnáme data z roku 2015 a 2016, vidíme, že se výskyt onemocnění zvýšil o 61%. Je tedy pravděpodobné, že se má data a data se SZÚ nemusí stoprocentně shodovat ve všech ohledech. Toto může být důvodem i možnému meziročnímu výkyvu, nebo počtem testovaných na 100 000 tisíc obyvatel.

Začneme-li první zkoumanou věkovou skupinou, tedy dětmi a dospívajícími do 21 let, má data se SZÚ neshodují. U SZÚ je prevalence vyšší, avšak v mém šetření (výjimkou pacientů nad 80 let), je to skupina s nejmenším počtem pozitivních výsledků. Je velmi pravděpodobné, že menší počet nemocných v této věkové skupině je díky větší oblibě moderní techniky, kdy děti už netráví tolik volného času hrami venku, ale tráví čas ve virtuální realitě (hry, „stýkání se“ na sociálních sítích, televize, apod.).

U druhé skupiny poukazují výsledky na skutečnost, že u SZÚ dosáhne skupina 20-24 letých minima. V mém šetření nedosahuje úplného minima, ale nemůžeme ani říci, že by v této skupině byl vysoký nárůst. Ze získaných dat SZÚ jsou z dlouhodobého hlediska výsledky v této věkové skupině neměnné po několik let.

Další skupinou, u které jsem provedla šetření, byla věková skupina do 40tilet. Tato skupina je v mém šetření i v šetření SZÚ nejméně zasaženou touto nemocí. Domnívám se, že důvodem je reakce s antigenem borelie již v mladém věku, a získáním protilátek.

Největší maximum prevalence můžeme zaznamenat ve věkové skupině od 41 do 70 let. V tomto bodě dochází k maximální shodě mého šetření a získaných dat ze SZÚ. Lze předpokládat, že tuto část populace už více trápí různé typy bolestí, od bolení kloubů až po bolest hlavy. Tyto některé symptomy mohou být podobné LB. Pacienti se tak nechají na LB otestovat. Jelikož se nám imunita neustále vyvíjí, může dojít v mladém věku k samovyléčení onemocnění, protilátky nám však v těle stále zůstávají. Tudíž lidé, kteří se ve středním věku nechají na boreliózu otestovat kvůli bolestem kloubů či hlavy, mohou být pozitivní při testování, aniž by tyto symptomy měly něco společného s LB. Je to jedna z možností, proč by prevalence onemocnění v této skupině mohla být tak vysoká. Další možností je, že pacient onemocnění v tomto středním věku opravdu má, trpí však ještě jiným onemocněním, a příznaky LB mohou být díky tomu výraznější, a

pacient se tak nechá otestovat. V tomto případě je podstatné zdůraznit fakt, že je trvalý trend v prodlužování průměrné délky života, což má za následek zvyšující se počet starších osob v populaci a taktéž se tento trend podílí na zvyšující se nemocnosti ve střední věkové skupině.

Po porovnání věkových skupin, jsem následně nemocnost porovnávala zvlášť u mužů a žen. Z rozdělení nemocných dle pohlaví vyplývá, že ženy jsou více pozitivní než muži (shoda se SZÚ). Můžeme se domnívat, že to je dáno jejich vyšší náklonností ke zdravému životnímu stylu. Také se domnívám, že další varianta může být ta, že se většinou více zajímají o svůj zdravotní stav. Nechají se na LB otestovat při pouhém náznaku onemocnění, nebo pokud zjistí, že měly klíště. Mohu s jistotou tvrdit, že u mužů to bude právě naopak.

Dle doporučeného postupu v diagnostice, léčbě a prevenci Společnosti infekčního lékařství České lékařské společnosti J. E. Purkyně by mělo být při diagnóze LB nejprve provedeno sérologické vyšetření protilátek proti borelióze metodou ELISA. Pozitivitu testu pak potvrdit či vyvrátit pomocí metody Western blot. Nevýhodou metody ELISA je častá zkřížená reaktivita a falešně pozitivní test v obou testovaných třídách imunoglobulinů. Pozitivita metody ELISA testů bývá často dána reakcí s antigenem flagelinu. Tento antigen se vyskytuje u jakékoli jiné bičíkaté bakterie, jako je *Listeria*, *Helicobakter pylori*, *Salmonella* a další. Pozitivita dána tímto antigenem, tak ne vždy potvrzuje lymeskou boreliózu. Je i několik případů, kdy protilátky proti boreliím byly zjištěny i u zdravých osob (5-10%). Předpokládá se, že jde o samovyléčení při nízké parazitémii. Přítomnost těchto protilátek není důvodem k léčbě, není-li přítomen klinický obraz lymeské boreliózy. Na druhou stranu u mnoha pacientů s lymeskou boreliózou nebyly zachyceny protilátky třídy IgM. Častěji jsou nacházeny pouze protilátky IgG.

5 ZÁVĚR

Jak již bylo řečeno, metoda Western blot se využívá především k potvrzení přítomnosti protilátek IgM i IgG proti Bbslu pozitivních ELISA testů. Na druhé straně je schopna vyloučit falešně pozitivní výsledky způsobené zkříženou reaktivitou, neboť ELISA testy nevykazují takovou specifitu a protilátky mohou reagovat i s antigeny jiných mikrobů. Stejně tak lze pomocí Western blotu detekovat specifické protilátky třídy IgM proti některým boreliovým antigenům, které se objevují v časně fázi infekce.

Závěrem lze říci, že se nelze spolehnout jen na sérologické metody při diagnostice lymeské boreliózy. Pozitivní výsledky ELISA testu nebo Western blotu sice diagnózu podporují, ale nejsou pro její stanovení rozhodující. Je třeba diferenciálního odlišení od ostatních onemocnění a velký důraz je kladen na klinický obraz a anamnestické údaje pacienta.

6 CITACE

1. Bartůněk P., 1996. *Lymeská borelióza*. Praha: Grada, ISBN 80-7169-242-5
2. Bartůněk P., 2006. *Lymeská borelióza*. 3. dopl. a přeprac. vyd. Praha: Grada. ISBN 80-247-1543-0.
3. Bartůněk P., 2013. *Lymeská borelióza*. 4. přeprac. a dopl. vyd. Praha: Grada. ISBN 978-80.247-4355-4.
4. Buhner S. H., 2014. *Borelióza: přírodní prevence a bylinná léčba lymeské boreliózy a jejích koinfekcí*. Praha: Triton. ISBN 978-80-7387-780-4
5. Daneš L., 2003. *Přírodně ohniskové nákazy*. V Praze: Karolinum. ISBN 80-246-0568-6
6. Hejzlar M., 1995. *Antibiotika v praxi*. 2. přeprac. a rozš. vyd. Praha: Makropulos. Galén. ISBN 80-901776-4-6
7. Hubálek Z., Halouzka J., 1997. Distribution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genomic groups in Europe, a review. *Eur. J. Epidemiol.*, 13, 951-957.
8. Kimmig P., Rüdiger B., a Hassler D., 2003. *Klíšťata: Nepatrné kousnutí s neblahými následky*. Praha: Pragma. ISBN 80-7205-881-9.
9. Krbková L., 2007. [online]. [cit. 2020-05-03] Lymeská borelióza. *Medicína pro praxi*. Vol. 5, s. 200 – 203. Dostupné z: <http://www.medicinapropraxi.cz/pdfs/med/2007/05/03.pdf>
10. Křupka M., Raška M., Weigl E., 2008. [online]. [cit. 2020-05-20]. Lymeská borelióza – biologie, patogeneze, diagnostika a léčba. *Dermatologie pro praxi* 5-6:236-239. Dostupné z: www.solen.cz/artkey/der-200805-0007_Lymska_borelioza-biologie_patogeneze_diagnostika_a_lecba.php
11. Meriläinen L., Herranen A., Schwarzbach A., Gilbert L., 2015. Morphological and biochemical features of *Borrelia burgdorferi* pleomorphic forms. *Microbiology*, 161: 516-527.
12. Nadelman R. B. et Wormser G. P., 1998. Lyme borreliosis. *The Lancet* 352(9127): 557–565
13. Nejezchlebová H., Bečárová K., Žákovská A., 2015. [online]. [cit. 2020-05-08] Klíšťata a rizika přenosu nákazy z matky na plod a dítě. Přehledový článek *Pediatric pro praxi*. Olomouc: Solen. Dostupné z www.pediatricpropraxi.cz/pdfs/ped/2015/03/04.pdf, ISSN 1213-0494

14. Pavelka K., 2010. *Revmatologie*. 2., přeprac. vyd. Praha: Galén. ISBN 978-80-7262-688-5
15. Prokeš Z., 2015. [online]. [cit. 2020-06-03] Lymeská borrelióza. *Dermatol. praxi* roč. 9, vol. 1, s. 36 - 39. Dostupné z: www.dermatologiepropraxi.cz/pdfs/der/2015/01/08.pdf
16. Roháčová H. 2005. *Lymeská borelióza: průvodce ošetřujícího lékaře*. Praha: Maxdorf. Farmakoterapie pro praxi. ISBN 80-7345-071-2.
17. Rosa P. A., Tilly K. et Stewart P. E., 2005. The burgeoning molecular genetics of the Lyme disease spirochaete. *Nature Reviews Microbiology* 3(2): 129–143.
18. Rozsypal S. 1981. *Obecná bakteriologie*. Praha: SPN – Státní pedagogické nakladatelství. Učebnice pro vysoké školy.
19. Stites D. P., a Terr A. I., 1994. *Základní a klinická imunologie*. Praha: Victoria Publishing. ISBN 80-85605-37-6
20. Štork J., 2008. *Dermatovenerologie*. Praha: Galén. ISBN 978-80-246-1360-4
21. Votava M., 2010. *Lékařská mikrobiologie - vyšetřovací metody*. Brno: Neptun. ISBN 978-80-86850-04-8
22. Votava, M., 2003. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun. ISBN 80-902896-6-5
23. Vše o klíšťatech – Životní cyklus klíšťat, 2020. [online]. [cit. 2020-06-21]. Dostupné z: www.kliste.cz/cz/vse-o-klistatech/clanek/zivotni-cyklus-klistat.

7 SEZNAM TABULEK

tab. 1 Pravděpodobná incidence lymeské boreliózy v některých státech.....	24
tab. 2 Celkový počet vyšetření rozdělený podle pohlaví, tříd vyšetřovaných imunoglobulinů a podle typu testu.....	45
tab. 4 Přehled potvrzených a vyvrácených testů.....	47

8 SEZNAM OBRÁZKŮ

obr. 1 Borrelia burgdorferi s. l. v elektronovém mikroskopu. (Zdroj www.borelioza.cz)	11
obr. 2 Struktura spirochéty Borrelia burgdorferi	13
obr. 3 Dospělí jedinci klíštěte rodu Ixodes ricinus. (zdroj www.kliste.cz)	16
obr. 4 Vývojový cyklus klíštěte. (zdroj www.kliste.cz)	17
obr. 5 Takto vypadá přisáté klíště přisáté na člověku. (zdroj www.kliste.cz)	20
obr. 6 Počet hlášených případů onemocnění lymeskou boreliózou v letech 1986-2011 v ČR. (Použitá data Bartůněk, 2006).....	25
obr. 7 Sezónní výskyt lymeské boreliózy dle měsíců v roce 2009 a dlouhodobý průměr. (Zdroj www.szú.cz).....	26
obr. 8 Mapa pozitivních klíšťat na borelie. (Zdroj www.kliste.cz).....	26
obr. 9 Erythema migrans (zdroj www.wikipedia.cz)	28
obr. 10 Boreliový lymfocytom na ušním boltci.(zdroj www.rizenadetoxikace.com).....	30
obr. 11 Acrodermatitis chronica atroficans – zánětlivá fáze. (zdroj www.praktickelekarstvi.cz)	31
obr. 12 Analyzátor s připravenými roztoky a vanička na stripy. (zdroj vlastní foto)	43
obr. 13 Vanička s připravenými stripy a stojan se zkumavkami s patientskými séry. (zdroj vlastní foto).....	43
obr. 14 Rozdělení testovaných na pohlaví.....	46
obr. 15 Celkový počet vyšetření rozdělený podle pohlaví, tříd vyšetřovaných imunoglobulinů a podle typu testu.....	46
obr. 16 Věkové kategorie testovaných pacientů na lymeskou boreliózu.	47