



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Studies

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

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zdravotně sociální fakulta
Katedra laboratorních metod a informačních systémů

Bakalářská práce

Sérologický průkaz lymeské boreliózy

Vypracovala: Iveta Nováková
Vedoucí práce: RNDr. Karel Fajfrlík, PhD.

České Budějovice 2014

Abstrakt

Tématem této bakalářské práce je zpracování problematiky lymeské boreliózy.

Onemocnění lymeské boreliózy je rozšířeno po celém světě. Původcem jsou různé druhy borelií dle geografického výskytu. Je to onemocnění, jehož přenašečem na našem území je hlavně klíště rodu *Ixodes ricinus* (v jiných oblastech světa jsou to i jiné druhy). Vyskytují se ve vlhkém prostředí, například v lese nebo ve vysoké trávě. Z toho vyplývá, že více ohroženi jsou lidé, kteří se v těchto lokalitách více vyskytují. Jako jsou například lesníci, ale i děti, které v přírodě tráví více volného času.

Lymeskou boreliózu můžeme rozdělit dle pozorovaných příznaků na tři stádia: časně lokalizované, diseminované a pozdní perzistentní stádium. Jako prvotním příznakem boreliózy je nejčastěji uváděna tvorba erythema migrans (EM). EM je vytvoření oválné načervenalé skvrny na kůži, v místě kde bylo přisáté klíště, která může postupem času samovolně vymizet. Jako další příznaky se dají uvést: boreliový lymfocytom, konjunktivitida, neuroborelióza, lymeská karditida a mnoho dalších. Proto pokud jdeme do oblastí, které jsou typická pro výskyt klíšťat, je dobré využít doporučených preventivních opatření před přisátím těchto roztočů.

K léčbě lymeské boreliózy se využívají antibiotika, které jsou podány pacientovi až po zjištění onemocnění LB. K antibiotické léčbě se používají hlavně: cefalosporiny, makrolidy, tetracykliny nebo peniciliny. Vždycky záleží na tom, v jakém stádiu antibiotika podáváme i na tom, zda pacient má typické klinické příznaky LB.

Pro laboratorní diagnostiku lymeské boreliózy se využívají přímé a nepřímé metody. Mezi přímé diagnostické metody se řadí kultivace borelií, hybridizace, imunoelektronová mikroskopie a metoda PCR (polymerázová řetězová reakce) na průkaz boreliové DNA. Dnes je z těchto metod převážně využívána metoda PCR. Z nepřímých diagnostických metod se využívá nepřímé imunofluorescence, Western

blot (WB) a ELISA testu (Enzyme Linked Immunosorbent Assay). Pomocí těchto metod se stanovují především specifické protilátky třídy IgM a IgG.

Cílem této práce bylo vyšetřit vzorky pacientů na lymeskou boreliózu pomocí metody ELISA testu a Western blotu, otestovat tyto metody a následně zhodnotit jejich výsledky. Jednotlivé vzorky sér, likvorů a punktátů ke zpracování mi byly poskytnuty ve Fakultní nemocnici v Plzni na oddělení sérologie a parazitologie. Před vyšetřením se musí vzorky zředit.

K metodě ELISA jsem využila přístroj od firmy Dynex, DSX – automatizovaný ELISA systém. Kterým se ve vzorcích stanovují protilátky třídy IgM a IgG. Jde o přístroj, kde během jednoho měření je možné vyšetřit od pacientů až 96 vzorků. Využila jsem i možnost, vyzkoušet si sama ruční stanovení ELISA testu, který se dnes moc nevyužívám, především při větším objemu přijatých vzorků. Pro další vyšetření protilátek IgM a IgG, jsem využila Western blotu a to pomocí komerční sady na ruční stanovení.

Celkem jsem vyšetřila v testu ELISA 90 vzorků v třídě IgM, kde vyšly 4 hraniční a 4 pozitivní vzorky od pacientů. Stejných 90 vzorků jsem vyšetřila stejnou metodou i ve třídě IgG, kde vyšly 4 pozitivní vzorky.

Dále pak metodou Western blot bylo vyšetřeno 98 vzorků. V třídě IgM vyšlo 5 hraničních a 18 pozitivních vzorků, v třídě IgG oproti tomu vyšlo 5 hraničních a 30 pozitivních vzorků.

Poté musí odborný lékař zhodnotit výsledky sérologických testů a klinických příznaků a postupovat tak, aby potvrdil lymeskou boreliózu a vyloučil jiná možná onemocnění.

Klíčová slova: Lymeská borelióza, borrelia, ELISA, Western blot

Abstract

This bachelor thesis deals with Lyme borreliosis (Lyme disease).

Lyme disease has a worldwide distribution. It is caused by several species of the *Borrelia* bacteria that vary according to geographic occurrence. In our country, this disease is transmitted, above all, by hard ticks of the genus *Ixodes ricinus* (Other genera are prevalent in other parts of the world.). These ticks are present in a wet environment, e.g. in the woods or in high grass. This poses a higher risk for people who stay or work in similar sites; i.e. lumberjacks, but also for children who spend their free time in the great outdoors.

According to symptoms Lyme disease can be divided into three stages: stage 1 is called early localized Lyme borreliosis, stage 2 is called early disseminated Lyme disease, and stage 3 is called late disseminated, or persistent Lyme disease. The most frequently reported typical early sign is a rash called erythema migrans (EM). EM is an oval reddish skin eruption created at the site of the tick bite; this skin condition may gradually disappear. Other symptoms are: borrelial lymphocytoma, conjunctivitis, neuroborreliosis, Lyme carditis, etc. Therefore, generally recommended preventive measures should be used before each trip to an area infested with ticks in order to avoid contact with the ticks.

Lyme disease is treated with antibiotics that are administered to a patient upon confirmation of the disease. As a rule the following antibiotics are prescribed: cephalosporin, macrolide, tetracycline or penicillin, depending on at what stage of the disease medication is prescribed and whether the patient shows typical Lyme disease symptoms.

Laboratory diagnostics of Lyme disease relies on direct and indirect methods. The direct methods include: cultivation of *Borrelia*, hybridization, immunoelectron microscopy, and the PCR method (polymerase chain reaction) applied to prove the presence of borrelial DNA. Of all the methods, PCR is most often the method of choice. The indirect diagnostic methods are: indirect immunofluorescence, Western blot (WB)

and ELISA tests (enzyme linked Immunosorbent Assay). These methods are used mainly to establish specific antibodies of the class IgM and IgG.

The aim of this thesis was to analyze patients' samples for the presence of Lyme disease by means of the ELISA test and the Western blot, to test these methods, and to evaluate their results. The individual samples of serums, liquors and punctuates to be analyzed were provided by the Teaching Hospital in Pilsen, specifically by the Department of Serology and Parasitology. The samples must be diluted before examination.

The method ELISA involved the use of a device manufactured by Dynex, DSX (an automated ELISA system). This device determines IgM and IgG antibodies in samples and facilitates analysis of up to 96 patient samples during a single measurement. The author of this thesis used this opportunity to try the manual determination of the ELISA test whose use is rather infrequent, especially in situations where a large number of samples need analyzing. The further examination of the IgM and IgG antibodies was accomplished with a Western blot, specifically by means of a commercial set for manual determination.

The author applied the ELISA test to a total of 90 samples in the IgM class. 4 samples were borderline and 4 were positive. The same method was used to analyze the same 90 samples in the IgG class where 4 samples were positive.

The Western blot method was used to examine 98 samples. The IgM class was borderline in 5 samples and positive in 18 samples. The IgG class was borderline in 5 samples and positive in 30 samples.

Following laboratory examination the results of serological tests and clinical symptoms must be considered by a physician who suggests a suitable method to prove Lyme disease and exclude others.

Key words: Lyme borreliosis, borrelia, ELISA, Western blot

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracoval(a) samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

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

V Českých Budějovicích dne (datum)

.....
(jméno a příjmení)

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucímu bakalářské práce RNDr. Karlu Fajfrlíkovi, Ph.D., za ochotu, jeho velmi cenné rady, připomínky, trpělivost při vedení mé bakalářské práce a za veškerý čas, který mi byl poskytnut. Dále bych chtěla poděkovat všem laborantkám z FN Plzeň z oddělení sérologie a parazitologie za vstřícnost, za svou velkou trpělivost a ochotu mi pomoci.

Obsah

ÚVOD.....	13
1 SOUČASNÝ STAV.....	14
1.1 Historie	14
1.1.1 Lymeská borelióza ve světě	14
1.1.2 Lymeská borelióza v ČR	15
1.2 Systematické zařazení borélií.....	15
1.2.1 Morfologie buňky.....	16
1.2.2 Antigenní struktura.....	18
1.3 Přenašeči onemocnění.....	18
1.3.1 Klíště	19
1.3.2 Životní cyklus klíšťat.....	20
1.3.3 Další možnost přenosu.....	21
1.4 Imunitní odpověď	21
1.5 Epidemiologie.....	22
1.5.1 Výskyt ve světě	22
1.5.2 Výskyt v České republice	23
1.6 Klinické příznaky	24
1.6.1 Časné lokalizované stádium	24
1.6.2 Časně diseminované stádium.....	25
1.6.3 Pozdní perzistentní stádium.....	25
1.7 Rozdělení dle poškození organismu.....	26
1.7.1 Kožní projevy	26
1.7.2 Revmatologické projevy	26
1.7.3 Neurologické projevy.....	26
1.7.4 Kardiální projevy	27
1.7.5 Postižení oka.....	27
1.7.6 Ostatní projevy LB	27
1.7.7 Lymeská borelióza v těhotenství	28
1.7.8 Lymeská borelióza u dětí	28
1.8 Postboreliový syndrom	29
1.9 Dárcovství krve	30

1.10 Onemocnění zvířat.....	30
1.11 Prevence	30
1.11.1 Správné odstranění klišťete.....	31
1.12 Laboratorní diagnostika LB.....	32
1.12.1 Přímé diagnostické metody	32
1.12.1.1 Kultivace	32
1.12.1.2 Imunofluorescence a elektronová mikroskopie.....	33
1.12.1.3 Hybridizace, PCR	34
1.12.2 Nepřímé diagnostické metody	34
1.12.2.1 ELISA test.....	35
1.12.2.2 Western blot.....	36
1.12.2.3 Nepřímá imunofluorescence	36
1.13 Terapie	36
1.13.1 Terapie v časně lokalizované fázi onemocnění.....	37
1.13.2 Terapie v diseminované fázi onemocnění.....	37
1.13.3 Terapie v pozdním perzistentní fázi onemocnění	38
2 CÍLE PRÁCE	39
3 METODIKA	40
3.1 Biologický materiál.....	40
3.1.1 ELISA test.....	40
3.1.2 Princip testu EIA	40
3.1.3 Laboratorní vybavení	41
3.1.4 Reagencie a příprava roztoků	43
3.1.5 Pracovní postup	45
3.1.6 Hodnocení.....	46
3.2 Western blot.....	47
3.2.1 Princip metody	47
3.2.2 Reagencie a příprava roztoků	48
3.2.3 Pracovní postup	49
3.2.4 Hodnocení	50
4 VLASTNÍ VÝSLEDKY	54
5 DISKUZE	58
6 ZÁVĚR	62

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ:	63
---	-----------

Seznam použitých zkratek

ACA- acrodermatitis chronica atrophicans

Ab - protilátka

Ag – antigen

ANA – antinukleární protilátky

BSK - Barboura-Stoennera-Kellyho

bb. - buňky

Bbsl – *Borrelia burgdorferi sensu lato*

CNS – centrální nervový systém

CDCP – Centrum pro kontrolu a prevenci nemocí

ČR – Česká republika

DNA – deoxyribonukleová kyselina

ECM – erythema chronicum migrans

EM – erythema migrans

ELISA – Enzym Linked Immunosorbent Assay (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

EIA – enzymoimunoanalýza

IS – imunitní systém

Ig – imunoglobulin

LB - lymeská borelióza

NaHCO₃ – hydrogenuhličitan sodný

NRL – Národní referenční laboratoř

NS – nervový systém

Osp – outer surface protein

PCR – polymerázová řetězová reakce (Polymerase-chain reaction)

PNS – periferní nervový systém

TMB – tetrametylbenzidin

tzv. – tak zvaný

WB – Western blot

Úvod

Jedním z důvodů, proč jsem si vybrala téma mé bakalářské práce o lymeské borelióze je, že člověk v mé blízkosti raným stádiem LB prošel. Také proto, že problematika tohoto onemocnění je stále aktuální téma v odborné i laické veřejnosti.

Lymeská borelióza je multisystémové onemocnění, které postihuje kůži, centrální nervový systém, srdce a mnoho dalších orgánů. Lymeská borelióza se dle příznaků dá rozdělit do tří stádií na časně lokalizovanou, diseminovanou a pozdní perzistentní. Bohužel vždy nemusí dojít k rozvoji počátečních příznaků a proto je potřebná ke konečné diagnóze laboratorní diagnostika. Způsob diagnostiky boreliózy je založen především na sérologických metodách (ELISA, Western blot), ale prokazuje se i metodami jinými. Postup léčby u boreliózy musí stanovit lékař, dle lokalizace nemoci a stádia. K terapii se využívají antibiotika.

Vakcinace proti LB zatím není možná, protože dodnes neexistuje účinná vakcína. Je tedy vhodné dodržovat preventivní opatření proti přisátí klíštěte.

1 Současný stav

1.1 Historie

1.1.1 Lymeská borelióza ve světě

V roce 1883 byly popsány změny na kůži, tehdy označeny jako „difúzní idiopatická kožní atrofie“, dnes známá jako acrodermatitis chronica atrophicans (ACA). Popsány byly německým lékařem Alfredem Buchwaldem. (3,10)

Později byly dokumentovány další případy ACA Karlem Herxheimerem a Kuno Hartmannem. (24) V roce 1909 Arvid Afzelius, dermatolog pocházející ze Švédska, popsal migrující erytém po přisátí klíštěte. O pár let později pozoroval změny na kůži dnes označovány jako boreliový lymfocytom.(3,24) Pojem boreliový lymfocytom vzešel od H. Bibersteina roku 1923 a v roce 1943 od B. Bäfverstadta dostal název lymfadenosis cutis benigna. (10)

Jako rozšiřující se erytém, nazývané erythema chronicum migrans (ECM) popsal v roce 1913 dermatolog z Rakouska Benjamin Lipschütz. (3, 10, 24)

O osm let později, dermatolog Jessner spojil možnost výskytu ACA spolu s kloubním poškozením. (3) Následující rok Ch. Garin a Ch. Bujadoux, francouzští neurologové, vyslovili první zmínku o poškození nervové soustavy, případu meningoradikuloneuritidy, kterou označily jako klíšťovou paralýzu. (10)

Po přibližně dvaceti letech, byla Alfredem Bannwarthem pozorována další skupina lidí, u kterých došlo k poškození NS: obrna lícního nervu či meningitida. Dnes jsou tyto známky poškození známy jako nejčastěji Garinův-Bujadouxův-Bannwarthův syndrom. (3, 24) Carl Lennhoff v roce 1948 poukázal na průkaz spirochét v histologických vzorcích zhotovené z EM. (10, 24) O rok později byl učiněn pokus léčby penicilinem u pacientů s ACA švédským lékařem N. Thyresonem. Léčba však nebyla tak účinná, jako u boreliového lymfocytomu roku 1950 prováděna G. E.Bianchem. (24)

Přibližně v 80. letech 20. století došlo k zvýšenému rozvoji vědeckých poznatků v problematice lymeské boreliózy. V roce 1977 došlo k epidemické artritidě v městečku Old Lyme (Connecticut), kde onemocnělo 39 dětí a 12 dospělých. Jedna čtvrtina postižených měla kožní postižení charakteru EM. Název lymeská artritida se následně přejmenovala na lymeskou nemoc, dle města kde se tato nemoc projevila v takovémto rozsahu. Byla prokázána souvislost tohoto onemocnění s klíštětem druhu *Ixodes dammini*, který se v této lokalitě hojně vyskytuje. (3, 24) V roce 1982 byl nalezen a popsán původce tohoto onemocnění, spirochéta, která byla začleněna mezi borelie a později byla pojmenovaná jako *Borrelia burgdorferi*. (3)

Definitivně byla tato infekce pojmenována jako lymeská borelióza na třetí mezinárodní konferenci roku 1987 v New Yorku. (3)

1.1.2 Lymeská borelióza v ČR

Nedlouho poté, co bylo toto onemocnění popsáno v USA, začaly se na Infekční klinice FN Na Bulovce objevovat první případy této nemoci. Klinika byla vedena prof. MUDr. Doutlíkem, DrSc. Na klinice se LB věnovali, zpočátku převážně z výzkumného hlediska, od roku 1985. (24)

1.2 Systematické zařazení borélií

Nejprve byl popsán jako původce LB jediný druh - *Borrelia burgdorferi*. (24). 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 a určitá komplikace ve výzkumu očkovací látky. (25)

Jedny z neznámějších a nejvýznamnějších druhů jsou:

v Evropě

- *Borrelia afzelii*
- *Borrelia garinii*
- *Borrelia burgdorferi sensu stricto* (vyskytující se především na severoamerickém kontinentu)

Dalšími popsánymi druhy jsou: *B. bissetti* a *B. valaisiana* a *B. Japonica*, ale je jich daleko více. Všechny tyto druhy borelií se od sebe liší zásadně ve svém antigenním složení. (6, 18, 20)

Jednotlivé druhy mají také odlišný vztah k postižení jednotlivých orgánů. Například *B. afzelii* postihuje hlavně kůži, *B. garinii* CNS a *B. burgdorferi sensu stricto* způsobuje kloubní poškození. (6, 14, 25)

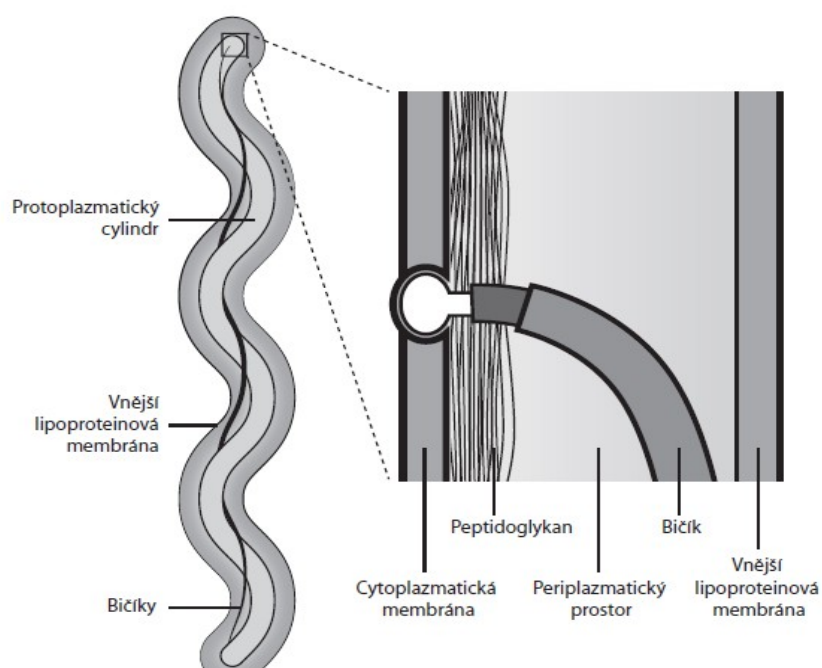
Borélie jsou zařazeny do čeledi *Spirochaetaceae*, řádu *Spirochetales*, třídy *Spirochaetes* a rodu *Borrelia*. (6) Borélie patří do skupiny gram-negativních, mikroaerofilních bakterií i když se gramem barví velmi špatně. K jejich obarvení tedy používáme barvení dle Giemsy a nebo stříbření. Velikost buněk se pohybuje mezi 4 μ m-30 μ m a v průměru 0,2 μ m. Bakterie má tvar spirály a ve vzdálenosti cca 2,2 μ m jsou záhyby, kterých je celkově kolem 4-15. (2, 7) Jejich pohyb (otáčení, natahování a smršťování) je umožněn pomocí bičíků, kterých mají přibližně 7-9. (7) Bičíky jsou složeny z kanálku přibližně o průměru 7,6 nm, a ty jsou ještě vyplněny dřením tkv. vnitřní flagelin. (3) Tyto orgány pohybu umožňují pohyb bakterií až rychlostí 2mm/minutu. I tato schopnost jim umožňuje přemoci hematoencefalickou a epiteliální bariéru. (18)

1.2.1 Morfologie buňky

Buňka je složena z membrány, kterou tvoří tři vrstvy: vnitřní jednovrstevná peptidoglykanová, dále lipopolysacharidové a vnější lipoproteinové, které jsou obě dvouvrstevné. (2) Mezi zevní membránou a protoplasmou je periplasmatický prostor, kde se nachází výše zmiňované bičíky. Bičíky jsou schopné směřovat svůj pohyb, jak v proximálním tak i distálním směru a mohou vylučovat membranózní vezikuly, které

obsahují plasmidovou DNA. (2, 24) Pokud se borélie dostanou do pro ně nevhodných podmínek, dokážou odstranit své bičíky, mohou se začít smršťovat a vytvářet pohyblivé cysty a nebo nepohyblivá granula. (2)

Další část tvořící buňku borélií je protoplasmatický cylindr, skládající se z buněčné stěny, cytoplasmatické membrány a cytoplasmy. (24)



Obr. č. 1: Řez spirochétou

(Zdroj: http://www.borelioza.cz/cs/ke_stazeni/ - Lymeská borelióza komplexní pohled)

Genom bakterie je tvořen z plasmidů, 12 lineárních a 9 cirkulujících a z malého chromozomu. (3, 24) Tyto plasmidy obsahují geny, které kódují tvorbu povrchových proteinů nutných k udržení borelií v hostiteli. (3) Jeden z nejvýznamnějších plasmidů pro borélie je cp26, který je zásadní pro přežití bakterie.

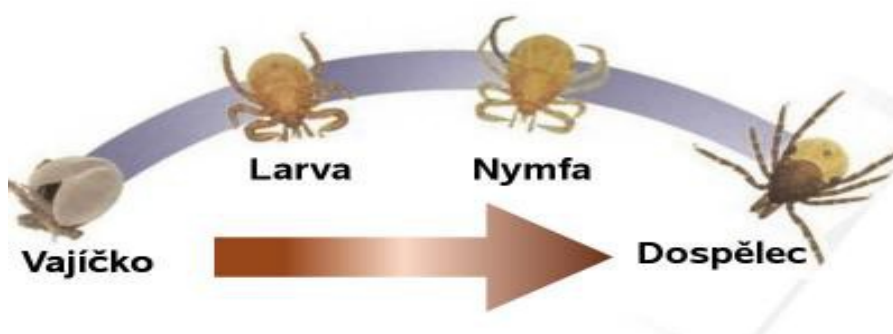
1.2.2 Antigenní struktura

Borrelia burgdorferi je vybavena dvěma zásadními antigeny (Ag): p60 jako cytoplasmatický a p41 jako bičíkový Ag. Mezi hlavní antigeny dále patří povrchové Ag, které se označují OspA (31-32 kDa) a OspB (34-36 kDa). Častěji jsou nacházeny u amerických izolátů. U více než poloviny evropských izolátů je popisován protein OspC (20 kDa), který se naopak málo objevuje u amerických. OspB u evropských často chybí. Proti proteinu p41 a OspC antigenu je namířena časná imunitní odpověď. Jako další povrchové antigeny jsou označeny OspE a OspF. Velkým problémem je, že může docházet ke ztrátě plasmidů a z toho vyplývajícím změnám povrchových proteinů. (24)

1.3 Přenašeči onemocnění

U nás v ČR, podobně jako v celé v Evropě, je hlavním přenašečem klíště rodu *Ixodes ricinus*, v Japonsku *I. ovatus*, v USA *I. scapularis*, *I. pacificus* a *I. dammini*.

Klíšťata se vyskytují především v trávě, lese či jiných porostech. (7) Jako hostitelé borélií v přírodě slouží hlavně menší hlodavci, malá i velká zvěř, ptáci, ale i domácí zvířata. (7,18) Ojediněle je popsán i přenos jinými vektory (komáři, ovády, bodalkami), ale přesný průkaz stále chybí. K přenosu onemocnění je potřeba, aby klíště bylo přisáto minimálně 1 den. A v přenašeči může být až půl milionů infekčních zárodků. (7)



Obr. č. 2: Stádia klíštěte

(Zdroj: http://kliste.cz/clanek/27/zivotni_cyklus_klistat)

1.3.1 Klíště

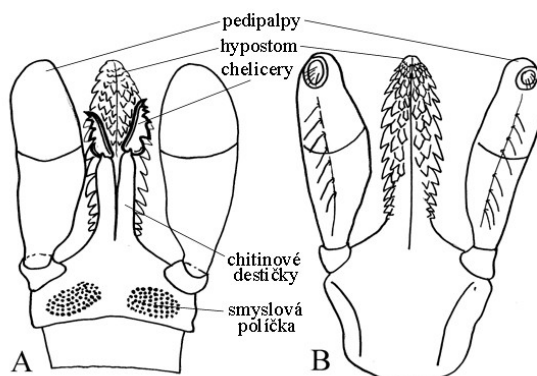
Klíšťata zařazujeme mezi pavoukovce (*Arachnida*). Patří do třídy roztočů (*Acarina*). (17) Jsou celosvětově rozšířená a jsou přenašeči i několika dalších původců virových onemocnění (virů klíšťové encefalidity, viru Tribeč), ale i původců bakteriálních (*Francisella tularensis*, *Coxiella burnetti*, *Rickettsia helvetica*, *Ehrlichia phagocytophila*). (27)

Hlavním přenašečem borélií jsou v našich klimatických podmínkách klíšťata rodu *Ixodes*. Tento název je odvozen z řeckého *ixos* → lepidlo a *ricinus* dle podoby samičky semenům ricínu. (17, 24)

Klíště obecné se živí sáním krve hostitele. Samička tímto může dosáhnout velikosti až 11 mm (normálně 4 mm), samečci nesají na hostitelých a celkově jsou menší, kolem 2,2-2,6 mm. Sameček od samičky se ještě liší zadečkem a to jeho tvarem a zabarvením. Samička má zadeček červený, měkký, sameček má zadeček leskle černý a je celý pokrytý štítkem. Samička má štítek má pouze na polovině těla. (1) Štít obsahující chitin, chrání klíšťata před rozmáčknutím.

Klíšťata jsou vybavena i smyslovým ústrojím (Hallerový orgán), které jim slouží k nalezení hostitele pomocí tepelných a chemických podnětů. (17) Nachází se na konci prvního páru nohou na konci termálního článku. (13) Jakmile si najde svého hostitele, hledá si ještě vhodné místo k přisátí. Jde hlavně o vlhké prostředí na pokožce. U člověka je to oblast třísel nebo podpaží. Pro nalezení těchto míst využívají na svém těle tzv. pedipalpy – na straně kusadel. K tomu aby došlo k porušení kůže, klíštěti napomáhají tzv. chelicery, což jsou naproti sobě pohybující se zoubky. (17)

K pevnému přichycení na pokožce slouží hypostom. Jde o bodavý „sosáček“, který se nachází na přední části těla. (9,17) Při sání krve se pomocí slinného žlábků dostávají do těla hostitele sliny, obsahující různé látky. (17) U některých teplomilných druhů klíšťat je produkována i tzv. cementová vrstva, která slouží k lepšímu udržení klíštěte na hostiteli. Další vylučované látky napomáhají k tomu, že tiší bolest, potlačují imunitní odpověď a brání srážení krve pomocí enzymu ixodinu. (6)



Obr. č. 3: Klíšťě obecné – stavba

(Zdroj: www.zoologie.frasma.cz/mmp%202011%20klepitkatci/klep%C3%ADtkatci.html)

Klíšťata mají v trávicím ústrojí postranní laloky, které následně slouží ke skladování nasáté krve. V klíšťatech se borélie usídlují ve střevech v jejich epitelálních buňkách prostřednictvím OspA proteinu. Po sání krve dochází k pomnožení spirochét, k zvýšení teploty, snížení pH, a dopadem toho se snižuje exprese OspA a zvýšení koncentrace OspC. Borélie se oddělí od epitelii střev, pomnoží se ve slinných žlázách a tím se dostávají do těla hostitele. Následně jsou roznášeny krevním oběhem do dalších částí těla. (6)

1.3.2 Životní cyklus klíšťat

Klíšťata můžeme rozdělit na jednohostitelská, (životní cyklus na jednom hostiteli) dvouhostitelská (životní cyklus na dvou hostitelích) a trojhostitelská (tři hostitelé). (17)

Dohromady mají klíšťata čtyři vývojová stádia: vajíčko → larva → nymfa → dospělec. Jedna samička klade 4000 - 5000 vajíček. (29) Z vajíček se vylíhnou velmi drobné larvy, které mají pouze 3 páry nohou. Larvy klíšťat sají krev, a po té může dojít k jejich přeměně na larvy. A k následné přeměně v osminohé nymfy. (27)

Nacházíme je již 50 cm nad zemí, kde sají krev na savcích menšího vzrůstu (zajíc, králík, veverka), po nasátí dochází ke konečné proměně, na dospělé jedince (imaga). (1, 17, 27) Imago je samec a samička, schopné reprodukce a tyto dospělci nacházíme do výšky až 1 metru. (17) Dospělý jedinec je již schopen sát na větší zvěři, ale i na člověku. Všechna stádia klíštěte jsou schopna sát jen jednou. (29) Samice sají krev, samci nalézají na hostitele jen za účelem rozmnožování. Tento jejich životní cyklus trvá přibližně 2 – 3 roky. Klíšťata se aktivují při teplotě 5 °C. (13)

1.3.3 Další možnost přenosu

Mezi další možnosti se řadí, přenos krevní transfúzí nebo borélie mohou proniknout i placentární bariérou. Ale takový přenos je spíše výjimečný. (2) Možnost přenosu jinými vektory byl zmíněn výše.

1.4 Imunitní odpověď

Pro přenos a rozvoj onemocnění je důležitá buněčná i protilátkou odpověď hostitele, ale i antigenní výbava mikroorganismů. Borélie aktivují nespecifickou, specifickou, buněčnou i humorální imunitu. K aktivaci imunitního systému (IS) jsou zásadní lipoproteiny, povrchové antigeny i flagelliny. (2, 24) Buněčná imunita je realizována prostřednictvím CD 4 a CD8 lymfocytů a makrofágů.

Poté, co se borélie dostanou do těla hostitele, začínají se množit. Může přitom vzniknout erytém na kůži nebo mohou být transportovány do mizních uzlin. Aktivací celého IS dojde i k aktivaci B-buněk, kryoglobulinu a později i protilátek ANA, kardiolipinu. Objevuje se revmatoidní faktor a aktivují se NK buňky. Imunitní odpověď provokují i povrchové proteiny borélie a slouží jako induktory prozánětlivých cytokinů (některých interleukinů-IL) a TNF α a chemokinů. (24)

Tvorba specifických imunoglobulinů IgM začíná po 2 – 4 týdnech. K vrcholu jejich koncentrace dochází po 3 – 8 týdnech, pak jejich koncentrace klesá. Tvorba specifických imunoglobulinů IgG nastává po 6 – 8 týdnech a v těle hostitele mohou být prokazatelné měsíce i roky. (16, 20)

1.5 Epidemiologie

Vzhledem k rozdílné délce inkubační doby LB, je onemocnění hlášeno celoročně bez ohledu na výskyt klíšťat. Právě inkubační doba má široký rozptyl a to mezi 1-300 dnů. (3, 7) Výskyt klíšťat je pozorován již od února (když roztaje sníh) až do listopadu, zvýšený výskyt je zaznamenán v období června a září. (33)

Toto onemocnění může zasáhnout, kteréhokoliv člověka v jakémkoliv věku, ale vyšší výskyt je hlášen po 30. roce života. Onemocnění postihuje častěji ženy než muže. (3)

1.5.1 Výskyt ve světě

Lymeská borelióza je rozšířená kosmopolitně. (26) Vyšší výskyt je hlášen z centrální Evropy a Skandinávie. (7) Na západě Evropy jsou častější hlavně neurologické příznaky, v severní a střední Evropě převažují kožní projevy a v USA projevy kloubní. Stejně jako v ČR je výskyt popisován u všech věkových skupin a je častější u žen. (14)

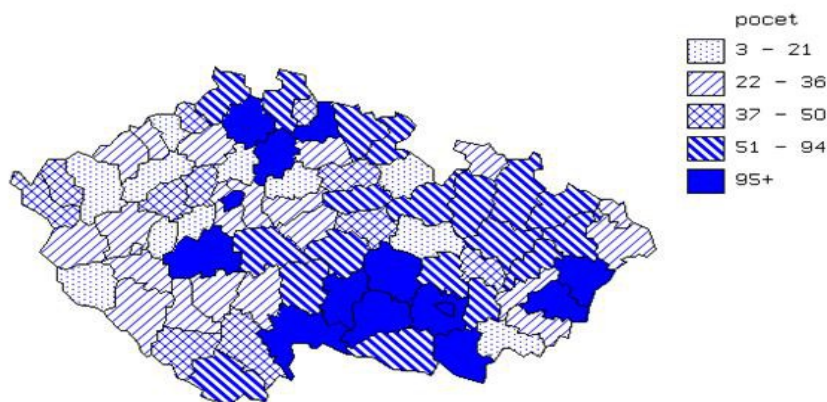
Výskyt onemocnění souvisí s výskytem promořených klíšťat. V roce 1998 byl realizován výzkum, který zkoumal promořenost vývojových stádií klíšťat ve státech Evropy. Byla prokázána pozitivita u 1,9% larev, 10,8% nymf a 17,4% dospělců. V Centru pro kontrolu a prevenci nemocí (CDCP) je hlášeno tisíce onemocnění za rok, vždy okolo čtvrt milionu. (24)

1.5.2 Výskyt v České republice

V České republice se pozoruje toto onemocnění od roku 1986. (24) Rok od roku, počet nahlášených případů v České Republice roste. V ČR se objevuje zejména *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia afzelii* a *garinii*. (22) Promořenost vývojových stádií v ČR se pohybuje přibližně kolem 12 %. Prevalence protilátek proti LB u české populace je okolo 10%, samozřejmě toto procento může být u exponovaných skupin (lesníci) vyšší. (26) Počet případů, které byly nahlášené v jednotlivých krajích ČR, byla zjištěna největší incidence v kraji Středočeském, Libereckém a kraji Vysočina.

Nedávnou studií se prokázalo, že klíšťata s infekcí, se vyskytují v blízkosti vodních toků, ale ve vyšších i nižších nadmořských výškách. (3)

Počet onemocnění Lymeskou boreliózou v ČR v roce 2011 podle okresu nákazy, Epidat



Obr. č. 4: Onemocnění Lymeskou boreliózou v ČR

(Zdroj: <http://www.szu.cz/tema/prevence/lymeska-borrelioza-epidemiologicka-data>)

1.6 Klinické příznaky

Lymeská borelióza může probíhat bezpříznakově anebo se symptomy, které má LB velice pestré. Máme příznaky, které se dají rozdělit do tří základních klinických stádií: časně lokalizované, diseminované a pozdní perzistentní. (6, 28) A podle typu vzniklé infekce u pacienta, lékař stanoví léčbu. (19)

1.6.1 Časné lokalizované stádium

Charakteristickým projevem je tvorba erythema migrans. EM se objevuje většinou z 60-70% u pacientů po přisátí klíštěte. (17) U EM dochází k vytvoření ohraničené skvrny, která je nebolestivá, zarudlá v průměru 3-68 cm a centrálně bledne. Bez léčení sama většinou vymizí. (6,19,28) Dále mohou nastat u člověka příznaky boreliózy, podobné chřipce, návaly pocení, bolest hlavy, únava, nevolnost. A následně může dojít k přechodu do druhého stádia. (6, 17, 19)



Obr. č. 5: Erythema migrans

(Zdroj: <http://osuemed.wordpress.com/tag/erythema-migrans/>)

1.6.2 Časně diseminované stádium

Objevuje se do několika týdnů. (28) V této fázi infekce už můžeme najít původce v celém těle. (17) Mohou se objevit neurologické projevy (meningitida, radikuloneuritida – Banwarthův syndrom, encefalitidy, obrna hlavových nervů – nejčastěji nervu lícního), dále se mohou na kůži objevit drobné erythemy, nebo může borelióza způsobit muskoskeletární poškození (artritida, záněty svalů a šlach), či konjunktivitidy, uveitidy, poškození kůže - boreliový lymfocytom, který je charakterizován vytvořením fialových uzlíků, vyskytující se především na prsních bradavkách, ušním lalůčku, nosu a skrotu). (6, 19, 25, 28) Dále může dojít ke kardiálnímu poškození. Kardiální poškození vznikají přibližně u 8% postižených, jde o myokarditidu a perikarditidu.(19)

Pokud dojde k vzniku meningoencefalomyelopolyradikuloneuritidě, dochází u ní k parézám končetin, kořenovým bolestem, které probíhají nejčastěji na trupu a končetinách. Tato forma často reaguje na analgetickou léčbu a celkově toto stádium může trvat týdny, ale i několik měsíců. (14)

1.6.3 Pozdní perzistentní stádium

Příznaky k tomuto stádiu se mohou projevit po měsících, ale i letech. (25, 34) Základním znakem je ACA projevující se na kůži. Objevuje se hlavně v evropském regionu. Nejčastější místo lokalizace jsou končetiny (na ploskách končetin, dlaních). (19) Příznaky jsou nebolestivé, modročervené, nateklé a později dochází ke ztenčení kůže, které se napohled podobá cigaretovému papíru. (17, 25) Toto stádium onemocnění, je téměř vždy spojeno s výskytem polyneuropatií a poškozením kloubů (nejčastěji kolena, lokte, ramena). (17, 19) Z dalších možných projevů, které se mohou v tomto stádiu objevit, je například lymeská artritida, karditida nebo chronická polyneuritida. (34) K takovému stádiu dospěje jen málo nemocných LB. Převážně u těch, u kterých je imunitní systém aktivován již nějakým jiným onemocněním. (14)

1.7 Rozdělení dle poškození organismu

1.7.1 Kožní projevy

Mohou se vyskytovat ve všech třech stádiích LB. (2) Mezi tyto projevy samozřejmě patří erythema migrans, objevující se po 3 – 30 dnech od nákazy. (5) Jako další jsou sekundární léze EM, (2) ACA nebo boreliový lymfocytom dříve *Lymphadenosis benigna cutis*, který se často vyskytuje na ušním boltci či prsní bradavce (tumoru podobný kožní infiltrát). (2, 5) Lymfocytom může bez nasazení léčby trvat i víc než rok. (2)

1.7.2 Revmatologické projevy

V časně i pozdní fázi infekce může vzniknout - Lymeská artritida, to je poškození v oblasti pohybového aparátu. (2) U časného stádia je to nejčastěji artralgie (bolest struktur pohybového aparátu) a myalgie (bolest svalů). (2, 5) Artralgie mohou být provázeny horečkou, únavou, slabostí či malou výkonností. V pozdějších stádiích se objevuje artritida (zánět kloubů) a další projevy jako záněty šlach (tendinitidy a tendovaginitidy), záněty úponů vazů a šlach do kosti (entezitidy) či záněty kloubních pouzder (kapsulitidy). (2)

1.7.3 Neurologické projevy

Při neurologických projevech dochází k poškození periferních nervů, mozkového parenchymu a pleny. (5) Mohou vzniknout meningitidy, periferní léze obličejového nervu, radikuloneuritidy, meningomyeloradikuloneuritida, encefalitida, pseudotumor cerebri, paraparéza, radikulopatie. Dalšími průvodními jevy mohou být: poruchy paměti, koncentrace, psychická vyšínutí a mnoho dalších neurologických projevů. (5,

14) U vzniku meningomyeloradikuloneuritidy (Garinův-Bujadouxův-Bannwarthův syndrom), dochází k poruchám kožního cití nebo k nesnesitelným neurogenním bolestem, které jsou způsobené zánětem míšních kořenů a plen. (2, 5)

1.7.4 Kardiální projevy

Jedná se především o myokarditidu, perikarditidu, dilatační kardiomyopatie nebo dochází k poruchám srdečního rytmu. (2, 5) Nejčastěji vede poškození srdce k atrioventrikulární blokádě stupně I-III. (33) Uvedená poškození srdce, se mohou projevovat palpitací, bolestí na hrudníku či dušností. Vyskytují se ale spíše sporadicky. (2, 24)

1.7.5 Postižení oka

Nejčastěji se objevuje v akutním fázi onemocnění. Může dojít ke vzniku konjunktivitidy, orbitální myozitidy, retinální vaskulitidy, chorioiditidě, episkleritidě, poškození očního nervu nebo dochází ke keratitidě, uveitidě a papilitidě. (5, 24)

1.7.6 Ostatní projevy LB

Jako další možné projevy se zařazuje průkaz proteinurie, hematurie, splenomegalie i suchý kašel. (5) U pacientů mohou být prokázány i zvýšené transferázy, dále může dojít k různým formám poškození ledvin či plicnímu poškozením. (24)

1.7.7 Lymeská borelióza v těhotenství

Negativní vliv boreliózy na plod u těhotných žen se přímo neprokázal. Samozřejmě pokud u těhotné ženy probíhá infekce LB, je důležité sledovat průběh onemocnění a reakci na léčbu antibiotiky. Záleží i na tom, kdy došlo k infekci matky, v jakém měsíci těhotenství se žena nachází. Dle toho může dojít k různému ohrožení plodu (funkčnímu i orgánovému poškození). (3) Borélie se nedostávají do mateřského mléka.(33)

Dojde-li přesto k infekci plodu, mohou nastat poškození podobné u syfilis. (17) Ale většina žen, u kterých byla LB prokázána a včas léčena, porodí zdravé dítě. (3) Borélie můžeme vyšetřit v takovém to případě z plodové vody nebo choriových klků pomocí PCR nebo elektronovým mikroskopem. (14)

1.7.8 Lymeská borelióza u dětí

Z 3 – 5 % onemocnění LB tvoří děti. Je to tím, že většina dětí tráví volný čas v přírodě. (3, 16)

Kloubní projevy u dětí jsou spojeny s prvním popisem epidemie LB. Klinické projevy jako EM jsou u dětí spíše v oblasti obličeje a krku. Častěji se objevuje boréliový lymfocytom. (3) Z neurologických postižení se objevují především meningitidy, bolesti hlavy, meningoencefalitidy, kraniální neuropatie, ataxie, chorea a další. (14)

	Stádium		
	Časně lokalizované	Časně diseminované	Pozdní diseminované
Časový odstup od nákazy	dny až týdny	týdny až měsíce	roky
Celkové příznaky	subfebrilie, chřipkovité projevy	subfebrilie, únavnost	únavnost
Kůže	erythema migrans (EM)	mnohočetná nebo sekundární EM, lymfadenosis cutis	acrodermatitis chronica atroficans
Nervový systém	ne	aseptická meningitida, encefalitida, myelitida, radikuloneuritida, parézy hlavových nervů (zvl. n. facialis)	chronická encefalitida, encefalomyelitida nebo polyneuritida, presenilní demence
Klouby, kosti, svaly	ne	migrující artralgie a artritidy, bolesti kostí, svalů, šlach	chronické artritidy a entezopatie
Srdce	ne	myokarditida, perikarditida, atrioventrikulární bloky	kardiomyopatie
Oči	ne	konjunktivitida, uveitida	chronická uveitida

Tab. č. 1 : Stádia lymeské borreliózy
(Zdroj: kniha Infekční lékařství – Beneš Jiří)

1.8 Postboreliový syndrom

K postboreliovému syndromu dochází u pacientů, kteří prodělali onemocnění LB a kteří byly léčeni ATB. Příznaky nemoci u pacienta stále přetrvávají, nezmírňují se nebo dochází k jejich zhoršení. (24) V takových to případech, může dojít k únavě, artralgii, myalgii, bolestem hlavy, poruchám spánku nebo k poruchám paměti. (20, 24, 34)

1.9 Dárcovství krve

Lidé po prodělané LB mohou krev darovat nejdříve po 2 letech. Podmínkou je, že hladiny specifických imunoglobulinů třídy IgM musí být negativní. Vždy je však vhodná konzultace s odborným infekcionista. (24)

1.10 Onemocnění zvířat

Ze zvířat se může nakazit pes, výjimečně kůň a skot. Klinické příznaky se nejčastěji objevují za 2 – 5 měsíců od nákazy. Infekce je provázena projevy, jako je kulhání, horečka, nechutenství, hubnutí, agresivita či zánětem očí nebo kloubů. I v léčbě psa můžeme využít antibiotika. A pokud chceme psa nechat očkovat proti borelióze, tak očkovací látky jsou pro ně k dispozici. (7, 27)

1.11 Prevence

V roce 1998 byla v USA uvedena vakcína LYMERix, (27) založená na rekombinantním OspA . (18) Měla, ale využití jen proti *Borrelia burgdorferi sensu stricto*. Pro Evropu vakcína nemohla být určena, jelikož se zde vyskytují borélie s odlišnou antigenní strukturou. O čtyři roky později, byla vakcína z trhu stažena, pro malý zájem, malou protektivitu pro popsané nežádoucí účinky. (18, 24)

V posledních létech se více pracuje na tzv. „protiklíštěcí vakcíně na bázi klíštěcího feritinu.“ Měla by zabráňovat samotnému přisátí klíšťat. (3)

Jelikož tedy neexistuje žádná vakcína, je v tomto ohledu důležité dodržovat preventivní jiná opatření. Pokud se chystáme do míst, které jsou typické pro výskyt klíšťat jako lesy, louky, parky a další, je důležité mít na paměti, že máme dodržovat určitá prevenční opatření. Doporučuje se mít dlouhé přiléhavé kalhoty, dlouhý rukáv a světlé barvy oblečení, na kterých jsou případná klíšťata nápadnější. (12, 17) K dalším

opatření můžeme využít repelenty s obsahem látky DEET (repelenty většinou obsahují 10-30% této látky). (12) Repelenty se používají přímo na tělo. (17) Je dobré spojit repelent, ještě s použitím pesticidu permethrinu, který se nanáší přímo na oblečení. Hlavně si musíme dávat pozor, jelikož permethrin se nesmí nanášet na pokožku. (12, 17) Permethrin se musí využívat jen do maximální koncentrace 0,5 %. Permethrin spolu s deltamethrinem patří mezi insekticidy, které lze též využít k ochraně před ostatním obtížným hmyzem.

Chemická látka DEET (N,N-dietyl-meta-toluamid) je kapalina bez zápachu. Podobný efekt účinnosti má i Icaridin, výhodou tohoto repelentního přípravku je, že nepoškozuje oděvy, ale ani nerozpouští umělou hmotu. (9)

Důležité je, po příchodu domů, velmi důkladně si prohlédnout své tělo. Nebo můžete poprosit někoho jiného, aby se nám podíval na část těla, kam špatně vidíme (kůže ve vlasech). (12)

1.11.1 Správné odstranění klíštěte

Zdali již došlo k přisátí klíštěte, musíme ho odstranit správným způsobem a co nejdříve. (17) K odstranění je dobré využít ochranných rukavic, pokud by jsme klíště vytahovaly rukou, protože borélie se z klíšťat mohou dostat do člověka i přes drobné oděrky. (14) V prvním momentě, se tedy musí místo s přisátým klíštětem zakápnout desinfekčním roztokem (Jodisol, Septonex, Betadin). (2) Následně si vezmeme do ruky pinzetu, v tomto případě nejsou rukavice nutné. Pomocí pinzety uchopíme klíště co nejbliž k pokožce a pomalým tahem se snažíme klíště vytáhnout. Jakmile klíště vytáhneme, je dobré ho ihned odstranit bezpečným způsobem (spláchnutí, spálení). (12) Nesmíme, opomenout postižené místo opět potřít desinfekčním roztokem. A po několik týdnů místo pozorovat, zdali nedojde k jeho zarudnutí. (3)

Zásadní pravidla po přisátí klíštěte jsou:

- co nejdříve odstranit klíště
- klíště se nesmí rozmačkat (17)



Obr. č. 6: Správné odstranění klíštěte

(Zdroj: <http://pozorkliste.cz/clanky/11-jak-spravne-odstranit-kliste>)

1.12 Laboratorní diagnostika LB

K laboratorní diagnostice LB jsou využívány metody přímé a nepřímé. (6)

1.12.1 Přímé diagnostické metody

Mezi tyto metody patří kultivace, elektronová mikroskopie, hybridizace, imunofluorescence a průkaz boreliové DNA pomocí PCR. (5, 24)

1.12.1.1 Kultivace

Izolovat dané mikroorganismy můžeme z kožních lézí EM nebo z krve. (15) Kultivace je, ale velmi náročná. Musí se použít vysoce obohacená půda s přísadami zvířecích sér. Dnes jsou již komerčně dostupné různé druhy půd jako BSK-H, BSK II, Sigma. (24) Pro izolaci v pozdní fázi infekce se využívají půdy (EMEM, MPM), které

slouží k záchytu cyst či granul borélií, které se vyskytují v krvi nebo mozkomíšním moku. (3) Dalším materiálem, z kterého můžeme borélie kultivovat jsou vzorky z biopsie kožních lézí, krve, synoviální tekutiny, mozkomíšního moku, ale i ze srdeční tkáně anebo duhovky. (11) Odběr biologického materiálu i jeho zpracování, musí být za velmi přísných podmínek. (3) Materiál inkubujeme minimálně 72 hodin, při 30-34 °C při mikroaerofilních podmínkách. Nárůst bakterií na půdě je prokazován mikroskopicky, PCR nebo sérologicky. (11)

Ke kultivaci přistupujeme také tehdy, ověřujeme-li již onemocnění diagnostikované nepřímými metodami. (11)

Jelikož má kultivace velmi malou senzitivitu, dlouhou dobu stanovení (až 6 týdnů) je spíše tato metoda využívána na výzkumné účely. (14)

1.12.1.2 Imunofluorescence a elektronová mikroskopie

V dnešním moderním světě nejsou tyto dvě metody tolik využívané, ale přesto musí být zmíněny.

U mikroskopie lze totiž vidět tvar spirochét – velikost, počet bičíků, povrchovou membránu, ale můžeme zpozorovat i cystické formy. (24) Klasická mikroskopie pro histologický průkaz je využívána výjimečně. U vzorků se využívá barvení Giemso, toluidinovou modří nebo se používá stříbření s 1% dusičnanem sodným. (3, 24) K barvení a následné mikroskopii se využívá roztěrů či tkáňových řezů. (15)

Imunofluorescence slouží k průkazu protilátky nebo antigenu. Dnes je známá přímá a nepřímá imunofluorescence. Přímá metoda je využívána k detekci antigenu, kdežto nepřímá metoda slouží k detekci protilátek v séru pomocí substrátu. Přímá metoda se, ale u stanovení LB nedělá. (30)

1.12.1.3 Hybridizace, PCR

Hybridizace je založena na klonování DNA. DNA je značená radiaktivním izotopem a váže se na známý úsek DNA. (24) Často, ale dochází k nejasné reakci. A proto se využívá metody PCR (polymerázová řetězová reakce). (17)

Metoda PCR vznikla v Cetus Corporation v Emeryville v Kalifornii. Metoda spočívá v namnožení genetického materiálu vybraného úseku DNA pomocí polymerázy, o třech teplotních fázích. (8, 17)

Polymerázová řetězová reakce je dnes velmi vyžadovaná metoda k rychlému stanovení infekčních agens. Jedná se o průkaz boreliové DNA. (24) Tato technika má několik nevýhod a to že má velmi nízkou citlivost, může dojít lehce ke kontaminaci vzorků, vysoké ceně na vyšetření nebo nespolehlivost u některého biologického materiálu. Jedna pozitivní věc na této metodě je její rychlost. (11, 24) Vyšetření z odběrového materiálu je velmi vhodný odběr a vyšetření ze synoviální tekutiny a kožních lézí, kde citlivost testu dosahuje až 90%. (5) PCR lze využít i na vyšetření z plodové vody (24), u mozkomíšního moku i krve, kde je citlivost metody u posledních dvou materiálů nízká. (11)

Je využíváný systém LightCycler PCR v reálném čase. Systém LightCycler PCR nám určuje množství DNA ve vzorku. Hlavně umožňuje vyšetření ve velmi krátkém čase cca 30-40 minut, výhodou je i vysoká senzitivita, možnost opakovaných reakcí v jedné kapiláře, vícebarevná optická detekce a další. Samozřejmě, že se musí dát pozor, aby vzorek byl velmi čistý, musí ho být dostatečné množství, jelikož na něm závisí senzitivita metody. (2)

1.12.2 Nepřímé diagnostické metody

Nejvyužívanější jsou sérologické metody. (5) Některý ze sérologických vyšetření může být negativní a průkaz může být až po 8. týdnu od nákazy ba i natrvalo negativní.

Mezi tyto metody se řadí: ELISA test, Western blot nebo nepřímá imunofluorescence. Dokazují se specifické protilátky v biologickém materiálu (synoviální tekutina, v séru, mozkomíšním moku). (16)

Tyto sérologické metody se nepoužívají hned po přisátí klíštěte. Ale až přibližně po třech týdnech od přisátí klíštěte nebo pokud jsou u pacienta zjevné příznaky nemoci. (17)

1.12.2.1 ELISA test

U ELISA testu stanovujeme specifické protilátky imunoenzymatickou reakcí. Je to jeden z nejvyžívanějších testů. Dnes je již na trhu k dispozici několik komerčních souprav ELISA (firmy Test-Line, DadeBehring, Euroimmun, Abbot, VirImmunit a dalších). (2, 16) Využívá se na průkaz specifických protilátek třídy IgM, IgG, které jsou pro boreliózu specifické. (24) Soupravy využívají antigeny, jako jsou: OspA 31-32,5 kDa, OspB 34 kDa, OspC 22,23,25 kDa, p39, a k proteinům: 41 kDa, 66 kDa, k proteinu periplasmatického prostoru (MEP) 83-93 kDa a k pár dalším. (3, 24) V některých případech se může stát, že získáme falešně pozitivní výsledky podobné u onemocnění syfilis. Může se jednat o tzv. zkříženou reakci s jinými spirochetálními bakteriemi, autoimunitní nemoc nebo při pozitivitě revmatoidního faktoru. Může dojít, ale i k falešně negativním výsledkům, které jsou příčinou toho, že bylo podáno velké množství antibiotik na začátku nemoci nebo protilátky nejsou detekovatelné či jsou těsně pod hranicí detekovatelnosti. (7, 16, 24) Abychom mohly tyto falešně negativní a pozitivní výsledky vyloučit, využívá se testu Western blot, který přesnější a citlivější (16)

1.12.2.2 Western blot

Dnes už nazýván jako Western blot, ale v roce 1975 byla tato metoda pojmenována dle E.M. Southern jako „southern blotting“, později ještě měla metoda název nordthern blotting, následně immunoblottig a až v roce 1881 se začal používat poslední název Western blotting.

Touto metodou lze stanovit v jednom vzorku více protilátek proti specifickým Ag. (8) Aby byl považován WB třídy IgM za pozitivní, musí minimálně s dvěmi uváděnými antigeny reagovat: OspC, 39 kD (periplazmatický antigen) nebo 41 kD (flagelin). Pokud chceme považovat WB pozitivní v třídě IgG, musí reagovat s alespoň pěti uváděných antigenů: 17 kD, OspF, OspC, 28 kD, OspA, OspB, 39 kD (periplazmatický antigen), 41 kD (flagelin) nebo 93 kD. (15) Tyto uvedené informace, ale nemůžeme jednoznačně říct, jelikož si hranici positivity stanoví firma, od které je konfirmační set na stanovení LB.

1.12.2.3 Nepřímá imunofluorescence

Dnes se využívá málo, jelikož má nízkou senzitivitu i specifitu. (24) Jako ELISA test se využívá k průkazu protilátek IgM a IgG, v krvi, synoviální tekutině nebo v mozkomíšním moku. Je založena na základě reakce těchto protilátek se substrátem (příkladně bb. infikované boreliemi či samotné borélie) naneseným na sklíčku. Reakce závisí na druhu Bbsl, který nám infekci způsobil. (3)

1.13 Terapie

Základem pro terapii lymeské boreliózy jsou antibiotika. (21) Chceme tím snížit trvání momentálních projevů a předejít následujícím stádiím LB, ale i odstranění mikroba z těla. A hlavně je důležité včas podat antibiotickou léčbu. (3, 7, 20)

K léčbě je využíváno především tetracyklinů, penicilinů, makrolidů a cefalosporinů. ATB jsou vybírány a podávány dle stádia onemocnění a dle lokalizace onemocnění. (3, 10)

Tvorba reakce podobné Jarisch-Herxheimerova do 24 hodin, může vzniknout právě v důsledku podání antibiotik. Doporučuje se podání kortikosteroidů, které snižují možnost vzniku. Tato reakce probíhá přibližně u 15% pacientů a projevuje se bolestí hlavy, pocením a horečkou. (14)

1.13.1 Terapie v časně lokalizované fázi onemocnění

Použití antibiotik je v této fázi minimálně 2. – 3. týdny. Jako velmi účinným se prokázal v časně fázi doxycyklin. Udává se podání dávky 2x100 mg po 12 hodinách. (21) Doxycyklin způsobuje fotosenzitivitu, dráždí žaludeční sliznici, ale má kvalitní průnik do tkání. (3) Proto pokud pacient užívá doxycyklin, měl by se vyhnout slunci nebo jinému UV záření. (34) Důležité je, že se prokázala účinnost jednorázového podání 200 mg doxycyklinu do tří dnů po přisátém klíštěti. (18)

Jako další ATB léčba se může podávat amoxicilin v dávce 3x1000 mg, který se podává hlavně u lidí, kteří mají alergii na tetracykliny či těhotným, kojícím ženám a u dětí do 8 let věku. Těmto skupinám jsou tetracykliny kontraindikované. (3)

1.13.2 Terapie v diseminované fázi onemocnění

Léčba ATB v této fázi onemocnění trvá okolo 3. týdnů. Do této skupiny patří ATB, která zabraňují rozvoji neuroboreliózy, lymeské karditidy či kloubního poškození. Jedná se hlavně o ceftriaxon (1x2000 mg denně), cefotaxim (3x2000 mg denně) nebo penicilin G (4x5 mil.j.). Tato terapie je, ale vyžadována pouze u závažných postižení. Jinak se využívá podání doxycyklinu, amoxicilinu nebo azitromycinu. (3, 24)

1.13.3 Terapie v pozdním perzistentní fázi onemocnění

Léčba trvá více jak 4. týdny. Důvodem mohlo být špatný výběr léku, útlum rozvoje klinických příznaků po krátkodobém podání ATB či terapi po chybně stanovené diagnóze. (24) Využívá se zde, hlavně cefalosporinů třetí generace a penicilinu G. (34)

2 Cíle práce

Jako cíle mé bakalářské práce jsem si stanovila:

- Shromáždit a rešeršně zpracovat odbornou literaturu k danému tématu
- Připravit přehled o současném průkazu lymeské boreliózy
- Stanovit množství protilátek u vybraných patientských sér
- Sérologicky vyhodnotit vzorky pacientů
- Získat ucelený přehled o průkazu a problematice onemocnění

3 Metodika

3.1 Biologický materiál

Vyšetření patientských vzorků probíhalo v měsících červnu a srpnu roku 2013 ve Fakultní nemocnici Plzeň na oddělení sérologie a parazitologie. Jako vzorky mi k možnému průkazu protilátek LB byl poskytnut již odebraný materiál: sérum, likvor a punktát.

3.1.1 ELISA test

Je to metoda, která je založena na reakci antigen – protilátka. ELISA test lze rozdělit na:

- Heterogenní nekompetitivní EIA (sandwich), značená protilátkou
- Heterogenní kompetitivní EIA, značená protilátkou nebo antigenem

Pomocí těchto metod, dokážeme stanovit v neznámém vzorku Ag nebo protilátku a v jaké koncentraci se nachází.

Je to metoda citlivá, má příznivou cenu vyšetření i dlouhou expiraci komerčních souprav. (8)

3.1.2 Princip testu EIA

Na povrchu mikrotitrační destičky jsou imobilizovány antigeny, kdy se následně po přidání vzorku naváží specifické protilátky. V dalším momentě se naváže zvířecí protilátka proti lidskému (IgM, IgG), která je značena konjugovaným enzymem. Peroxidázová aktivita je následně detekovaná pomocí přidání chromogenního substrátu s TMB. Pokud je pozitivní vzorek dojde k modrému zbarvení. A po přidání

zastavovacího roztoku reakce se změní barva na žlutou. Intenzita zabarvení se změří na fotometru při vlnové délce 450 nm. (31)

3.1.3 Laboratorní vybavení

K účelu stanovení protilátek IgM a IgG ve vzorcích od pacientů byl používán přístroj DSX- automatický ELISA systém. Jde o automatizovaný systém, který je řízen počítačem a kde dochází ke stanovení na jednotlivých mikrotitračních destičkách.



Obr. č. 7: Přístroj DSX-automatický systém ELISA

(Foceno ve FN Plzeň na oddělení sérologie)

Automatizuje pipetování vzorků, inkubaci, přidání reagentů, umývání a detekci fází testů.

Přístroj je vybaven:

☞ 4 x 2 litrové nádoby umývací zásobník (minimálně musí obsahovat 500ml)

- ☒ Pipetovací modul – k rozdělení kontrol, reagensů, vzorků, standard a spotřebního materiálu
- ☒ Ochranný kryt- uzavírá pracovní prostor a pipetovací modul
- ☒ Absorbační modul
- ☒ Umývací modul
- ☒ 4 x inkubátory
- ☒ Odpadní nádoba
- ☒ Uzavřená zásuvka – využívá se při inkubaci ve tmě
- ☒ Odpadní nádoba na kapalinu
- ☒ Nosič vzorků, nosič reagentů, nosič kontrol
- ☒ Nosič vzorkových špiček, nosič reagenčních špiček
- ☒ Odpadní propust' – aby se dostaly použité špičky do odpadní nádoby
- ☒ Plnicí odsávací trysky - kratší trysky na fluidum a delší trysky jako odsávací
- ☒ 4 x nosiče destiček
- ☒ Čtečka čárového kódu

Na tomto přístroji jsou především testovány sérum, plasma, likvor, punktát nebo vzorky obsahující větší části hmoty (stolice, tkáň, kultury), které by měly být před stanovením přefiltrovány, jinak by došlo u ucpání špiček.

Správnou identifikaci vzorku nám zabezpečuje čárový kód, který má každý vzorek svůj vlastní. Na přístroji můžou být najednou vyšetřeny až čtyři destičky (1 destička obsahuje 96 jamek, ale vždy ještě něco zaberou kontroly). Přístroj obsahuje i čtyři inkubátory, které lze jednotlivě nastavit na určitou teplotu (od +7°C až do 50°C) a každá

destička může být během inkubace protřepávána. A na každé jedné desce mohou probíhat rozdílné testy.

Dále je přístroj vybaven vedle míst pro vzorky i místy pro reagentie, standardy, ředící stojany a v neposlední řadě i pro jednorázové špičky. Právě pipetování je pomocí jednorázových špiček, což vylučuje možnou kontaminaci. Systém DSX je vybaven i alarmem, pokud si sami nevšimneme, upozorní nás, že dochází některý z roztoků nebo pokud dojde k nějaké chybě.

Systém DSX je dále vybaven softwarem Relevation, který nám umožňuje naprogramovat jednotlivé testy a jejich následné spuštění. Obsahuje Assay generator, kde je možnost vlastního zadávání testů pro jednotlivé vzorky přes Worklist, kde se zaškrťávají požadované testy pro jednotlivé vzorky.

Jakmile se analyzátor naprogramuje, připraví se počet jamek dle pacientů, zvlášť se připraví jamky na IgM a IgG. Vzorky se před stanovením promíchají na třepače a pomocí čtečky se načtou do programu. Musí se pohlídat zda jde o vzorek séra, punktátu a likvoru, kde se musí změnit správné ředění. Vzorky, reagenty, standardy, kontroly, spotřební materiál, mikrodestičky se vkládají do pracovního prostoru dle toho jak nás navádí počítačový systém na obrazovce.

Jakmile se spustí test, dochází k přenosu vzorků ze zkumavek do mikrodestiček, předředění vzorků, dále se rozpipetují jednotlivé kontroly a standardy do mikrodestiček. Následně dojde k rozpipetování reagentů a inkubaci mikrodestičky. V DSX systému jde vše postupně dle ELISA metody. Po všech krocích, v neposlední řadě ještě dojde k hodnocení výsledků.

3.1.4 Reagentie a příprava roztoků

Použité reagentie jsou dodávány v komerčních setech od výrobce Test-Line s.r.o.

V soupravách jsou dodávány:

- ☒ **mikrodestičky** s již navázaným antigenem 12 x 8 jamek (2 ks)
 - ☒ **negativní kontrola** – lidské sérum bez protilátek proti boréliím (2ml)
 - ☒ **CUT – OFF** lidské sérum obsahující protilátky proti boréliím v hraniční koncentraci (3ml)
 - ☒ **Pozitivní kontrola** – lidské sérum obsahující protilátky proti boréliím
- Všechny zde uvedené kontroly (negativní, pozitivní a CUT-OFF) není třeba ředit.
- ☒ **Konjugát** – zvířecí Ig proti lidskému IgM nebo IgG značený peroxidázou (28 ml), již v pracovním ředění
 - ☒ **Ředící roztok vzorků 2** – pufr se stabilizátory bílkovin (110ml)
 - ☒ **TMB-Complete 2** – jednosložkový chromogenní substrátový roztok, obsahující TMB a H₂O₂ (28 ml), již v pracovním ředění
 - ☒ **Promývací roztok 2** (20 x konc.) – koncentrovaný pufr, ředí se 1:19 (promývací roztok x destilovaný voda), dodáváno 150 ml
 - ☒ **Zastavovací roztok** – jedná se o žiravinu obsahující H₂SO₄ (1mol/l), dodáváno 28 ml

K následnému vyšetření je samozřejmě zapotřebí ještě odebrané vzorky od pacientů, které byly dodány do laboratoře na příslušné vyšetření. Vzorky na test ELISA jsou: sérum, likvor a synoviální tekutiny, které musí být uchovávány při +2 až +8 °C, pokud by se měly uchovat delší dobu je nutné je zmrazit na -20 °C. Před použitím se musí zředit. Pokud je to sérum, ředí se 1:100 (10 µl vzorku a 1 ml ředícího roztoku), u likvoru se ředí 1:1 (110 µl vzorku a 110 µl ředícího roztoku), u synoviálních tekutin je ředěno 1:20 (20 µl vzorku a 400 µl ředícího roztoku) a 1:40 (10 µl vzorku a 400 µl ředícího roztoku). Před samotným začátkem reakce, se musí reagentie v setu vytemperovat na laboratorní teplotu a promíchat. (31)

K provedení testu ještě využíváme:

- Jedno a vícekanálové pipety na 10 – 100 μ l
- Jednorázové špičky
- Stopky
- Termostat na 37 °C
- Fotometr pro mikrotitrační destičky
- Promývací zařízení

3.1.5 Pracovní postup

Dnes je již využíván hlavně automatizovaný systém, ale je možné i test ELISA stanovit ručně, pomocí následujícího postupu (31):

- Nejprve si naředíme vzorky: sérum 1:100, synoviální tekutiny 1:20 (1:40) a likvor 1:1
- Připravíme si mikrotitrační destičku
 - první jamka (blank) zůstává prázdná
 - pipetujeme 100 μ l negativní kontroly do druhé jamky
 - do následujících dvou jamek pipetujeme 100 μ l CUT-OFF
 - do další jedné jamky pipetujeme 100 μ l pozitivní kontroly
 - a do zbývajících jamek pipetujeme 100 μ l vzorků v odpovídajícím ředění
- Přikryje se víčkem, a dá se inkubovat při 37°C na 30 minut

- Poté se odsají jamky a promyjí se 4 krát promývacím roztokem, na konci se zbytky roztoku vyklepávají do svého materiálu (buničiny)
 - Napipetuje se 100 µl konjugátu, a jamka blank stále zůstává prázdná
 - Inkubuje se opět při 37°C na 30 minut a destičky přikrytá víčkem
 - Odsají se jamky a promyjí se tentokrát 5 krát promývacím roztokem, na konci se zbytky opět vyklepávají do svého materiálu
 - Přidá se susstrát s TMB 100 µl, tentokrát i do jamky blank
 - Inkubuje se 15 minut na 37°C v temnu a destička přikrytá víčkem
 - Po uběhlé inkubaci ihned přidáváme zastavovací roztok 100 µl do všech jamek
 - K dokončení už jen dáme fotometricky změřit při 450 nm proti blanku. Fotometricky to musí být změřeno do půl hodiny po zastavení reakce.
- (31)

Hlavně si musíme uvědomit, že pracujeme s potenciálně infekčním materiálem!

3.1.6 Hodnocení

Zhodnocení jednotlivých výsledku vychází přímo z počítače, jako negativní (-), pozitivní (POZ) a hraniční (HRAN). Hodnotí se to dle indexu positivity (IP), který je vypočítáván jako:

$$IP = \frac{\text{abrosbance séra, plazmy, likvoru, synoviální tekutiny}}{\text{průměrná absorbance CUT-OFF}}$$

Pokud je IP menší než 0,9 je tento výsledek daný jako negativní. Pokud by hodnota byla 0,9 až 1,1 jde o výsledek hraniční a pokud by byla hodnota větší 1,1 jde už o výsledek pozitivní.

Jediná výjimka je u vzorků punktátů, které se ještě hodnotí dle jejich ředění 1:20 a 1:40, dle tabulky uvedené níže (31):

Vzorek	Ředění vzorku 1:20	Ředění vzorku 1:40	Celkové
	IP	IP	Hodnocení
Vzorek x	menší než 1,0	menší než 1,0	negativní
Vzorek y	větší než 1,0	menší než 1,0	hraniční
Vzorek z	větší než 1,0	větší než 1,0	pozitivní

Tab. č. 2: Vyhodnocení punktátu

(Zdroj: TEST LINE- EIA, Imunoenzymatická souprava)

3.2 Western blot

Využívá se jako konfirmační metoda a je využita, při hraničních a pozitivních výsledcích u ELISA testu. (14) Je to metoda, která je velmi citlivá, náročná, ale dokáže zjistit i drobné množství specifické protilátky ve vzorku. Základem je blotting, kde má dojít k přenosu elektroforeticky rozdělených protilátek na membránu a znázorněním protilátky reakcí s daným antigenem. Dnes je již možnost dodání komerčních souprav, které snižují náročnost metody, ale tímto se u nich nabývá na ceně. (8)

3.2.1 Princip metody

Použitá souprava Euroline zprostředkovává stanovení lidských protilátek třídy IgM a IgG in vitro proti Ag Bbsl v séru nebo plazmě.

Testovací stripy jsou potažené purifikovanými Ag. (35,36) Proteinové antigeny se v prvním kroku rozdělí v polyakrylamidovém gelu nejčastěji pomocí SDS-PAGE (dodecylsulfát sodný). Kdy dochází k rozdělení dle jejich molekulové hmotnosti. (30) Molekulové hmotnosti jsou uváděné v kDa a jejich poloha na stripu je označena

výrobci. (13) Naředěné vzorky se inkubují s testovacími stripy. Při pozitivní reakci, se naváží protilátky IgM nebo IgG (i IgA). Při následné inkubaci dochází k detekci protilátek, kde je enzymovým konjugátem značená protilátka proti lidskému IgM a IgG a vyvolává barevnou reakci. (35,36)

3.2.2 Reagencie a příprava roztoků

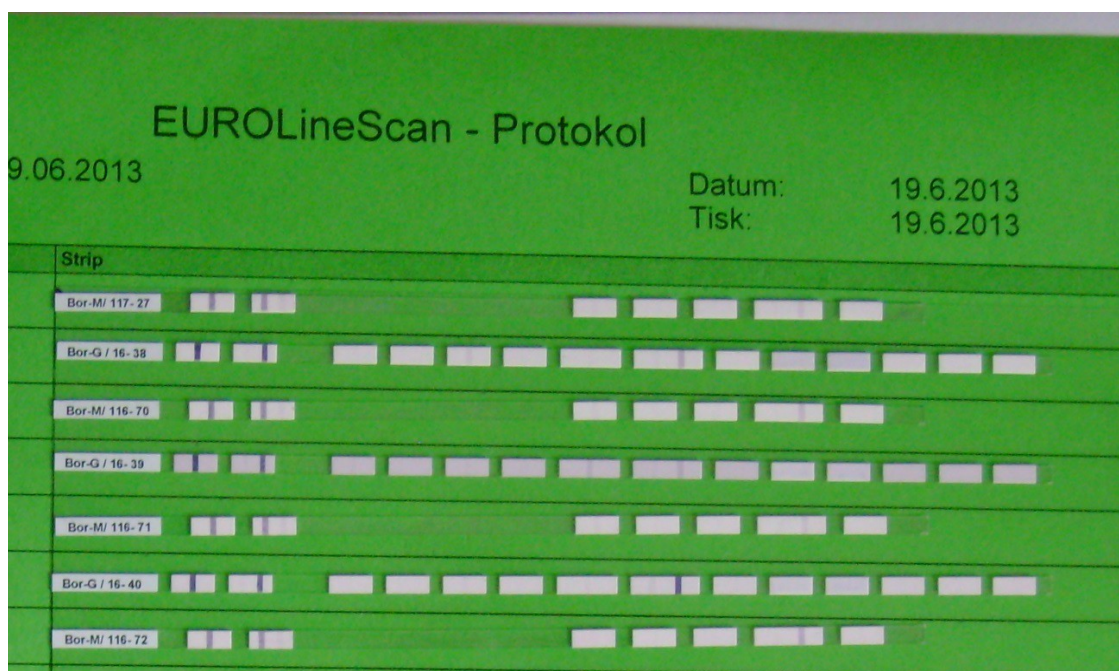
Vzorky pacientů se před stanovením musí naředit v poměru 1:51. Punktát 30 µl + 1500 µl ředícího roztoku, likvor 300 µl + 1200 µl ředícího roztoku a 30 µl séra pacienta a 1500 µl ředícího roztoku. Vzorky pacientů mohou být uchovávány až dva týdny při teplotě +2 až +8°C. Pokud, ale již došlo k jejich naředění, mohou být vzorky inkubovány pouze jeden den. (35,36)

Již dodávaný komerční set obsahuje:

- ☞ **Testovací stripy** – musí se vytemperovat na pokojovou teplotu před použitím
- ☞ **Kontroly** – je 50x koncentrována, před použitím se musí naředit 1:51 univerzálním pufrem (30 µl kontroly a 1,5 ml pufru)
- ☞ **Univerzální pufr** – 10x koncentrovaný, před použitím se promíchává a ředí se 1:10 s deionizovanou vodou (destilovanou vodou), na jeden strip je třeba 1,5 ml univerzálního pufru a 13,25 ml deionizované vody (destilované vody)
- ☞ **Enzymový konjugát** – je 10x koncentrovaný, naředí se 1:10, pro jeden strip je to 0,15 ml anti-lidského IgG koncentrátu a 1,35 ml naředěného univerzálního pufru
- ☞ **Substrátový roztok** – je ihned k použití (35,36)

3.2.3 Pracovní postup

- Z dodávaných setů, se vyjme jen potřebný počet testovacích stripů, které se umístí jednotlivě do prázdných žlábků vaničky. Každý strip musí být řádně popsán.
- Do inkubační vaničky se napipetuje 1,5 ml univerzálního roztoku do každého kanálku. Při pokojové teplotě na 15 min., se dá na třepačku
- Poté se roztok pomocí pipety odsaje ze žlábků
- 1,5 ml naředěného vzorku se napipetují do každého žlábků a při pokojové teplotě se na 30 min. dávají znovu na třepačku
- Pomocí pipety se odsaje po uběhlé době inkubace veškerý roztok ze žlábků a promyje se 3x po 5 min. s 1,5 ml univerzálního pufru na třepačce
- Pipetuje se 1,5 ml naředěného enzymového konjugátu do jednotlivých žlábků a inkubuje se opět při pokojové teplotě, 30 minut na třepačce
- Následně se odsaje na třepačce, všechny roztok ze žlábků a promyje se 3 krát po 5 min. s 1,5 ml univerzálního pufru
- Po promytí se napipetuje 1,5 ml substrátu do jednotlivých žlábků a inkubuje se 10 min. při pokojové teplotě na třepačce
- Odsaje se všechny roztok ze žlábků, promyje se 3 krát po 1 min. destilovanou vodou (eventuálně deionizovanou)
- Jako poslední krok se jednotlivé stripy nalepí na adhezivní folii zeleného protokolu, usuší a jsou vyhodnoceny pomocí softwaru EuroLineScan (35,36)



Obr. č. 8: Protokol WB EUROLineScan – vyhodnocení
(Foceno ve FN Plzeň na oddělení sérologie)

3.2.4 Hodnocení

K vyhodnocení se využívá software EUROLineScan. Kde hodnocení u třídy IgM a IgG se liší. (35,36) V nálezů se hodnotí proteiny, které se od sebe liší molekulovou hmotností (v kDa). (17)

Vyhodnocení pro třídu IgM:

- **VlsE Bb** – rekombinantně vyrobený, vysoce purifikovaný antigen VlsE *Borrelia burgdorferi*
- **p41 Ba, p39 Ba** – elektroforézou purifikovaný nativní flagellin (p41) a nativní BmpA (p39) *Borrelia afzelii*
- **OspC Ba, Bb, Bg** – purifikované, vysoce specifické nativní antigeny OspC (p25) *Borrelie afzelii* (Ba), *Borrelia burgdorferi* (Bb), *Borrelia garinii* (Bg)

- **Kontrolní proužky** – anti-lidské IgG nebo IgM, určení přítomnosti vyšetřované třídy protilátek k rozpoznání jedinců se syndromem protilátkové nedostatečnosti
- **Kontrola** – inkubační kontrola nám ukazuje správné provedení inkubace (35)

Pokud by v testu vyšel pozitivní proužek antigenu OspC Ba, OspC Bb, OspC Bg, jde o pozitivní výsledek protilátek IgM. V některých případech mohou protilátky třídy IgM s OspC reagovat negativně nebo slabě pozitivně, zda by k tomuto případu došlo, hodnotí se dle tabulky:

Výsledek protilátek		Specifické antigenní proužky : p39, VlsE Bb	
OspC Ba nebo OspC Bb nebo OspC Bg		1 proužek pozitivní	Žádný proužek
	Proužek antigenu pozitivní	pozitivní	Pozitivní
	OspC Ba nebo OspC Bg slabě pozitivní	pozitivní	hraniční
	Proužek antigenu negativní	pozitivní	negativní

Tab. č. 3: Vyhodnocení Western blotu třídy IgM

(Zdroj: Návod k testu pro Anti-Borrelia EUROLINE-RN-AT (IgM))

Vyhodnocení pro třídu IgG:

- **VlsE Ba, Bb, Bg** – rekombinantně vyrobené, vysoce purifikované antigeny VlsE z *Borrelia afzelii* (Ba), *Borrelia burgdorferi* (Bb) a *Borrelia garinii* (Bg)
 - **Lipid Ba a Bb** – z membránové frakce extrahovány *Borrelia afzelii* (Ba) a *Borrelia burgdorferi* (Bb), často v pozdní fázi infekce
 - **p83 Ba** – elektroforeticky purifikovaný nativní protein z *Borrelia afzelii*
 - **p41 Bg a p39 Bg** – elektroforeticky purifikovaný nativní flagelin (p41) a nativní BmpA (p39) z *Borrelia garinii*
 - **OspC Bg** – elektroforeticky purifikovaný, vysoce specifický nativní OspC (p25) z *Borrelia garinii*
 - **p58, p21, p20, p19, p18** – vyrobené rekombinantně, vysoce specifické antigeny Bb
 - **Kontrolní proužky** – anti lidské IgG a IgM, určení přítomnosti vyšetřované třídy protilátky k rozpoznání jedinců se syndromem protilátkové nedostatečnosti
- (36)

Pokud by v testu vyšel pozitivní proužek antigenu VlsE *Borrelia burgdorferi*, jde o pozitivní výsledek protilátek IgG. V některých případech mohou protilátky třídy IgG s VlsE reagovat negativně nebo slabě pozitivně, zda by k tomuto případu došlo, hodnotí se dle tabulky (36):

Výsledek		Specifické proužky antigenu: p18, p19, p20, p21, p58, OspC (p25), p39, p83, Lipid Bb, Lipid Ba, VlsE Bg, VlsE Ba		
		2 nebo více proužků pozitivních	1 proužek pozitivní	Žádný proužek
VlsE Borelie burgdorferi (VlsE Bb)	Proužek antigenu pozitivní	pozitivní	pozitivní	pozitivní
	Proužek antigenu slabě pozitivní	pozitivní	pozitivní	hraniční
	Proužek antigenu negativní	pozitivní	hraniční	negativní

Tab. č. 4: Vyhodnocení Western blotu u třídy IgG

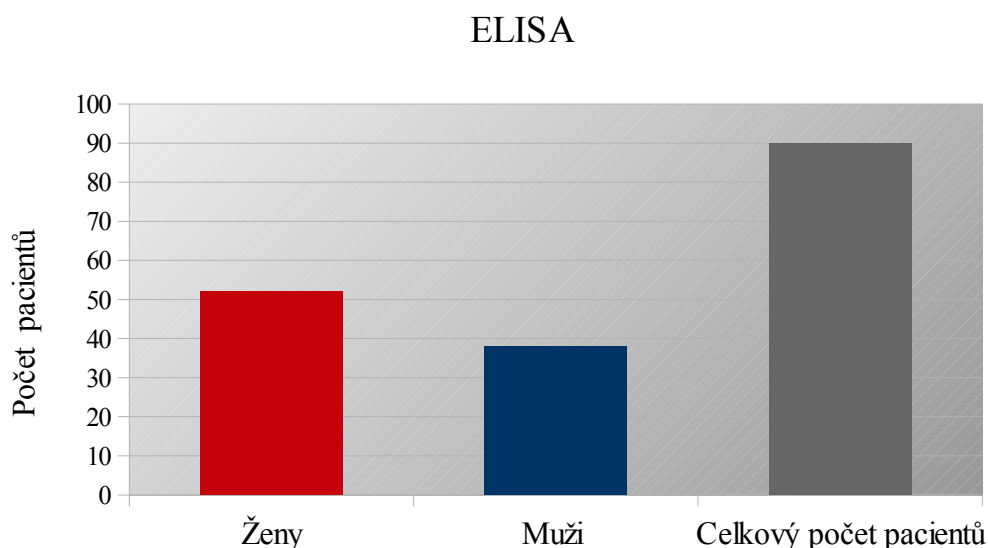
(Zdroj : Návod k testu pro Anti-Borrelia EUROLINE-RN-AT (IgG))

Dnes nejsou přesná kritéria pro vyhodnocení Western blotu. Záleží hlavně, jaké antigeny se ke stanovení použily (kmen borélie, nativní x rekombinantní). (17)

4 Vlastní výsledky

Materiál ke zpracování mi byl poskytnut ve Fakultní nemocnici Plzeň na oddělení serologie a parazitologie. Stanovení proběhlo během měsíců červen a srpen roku 2013.

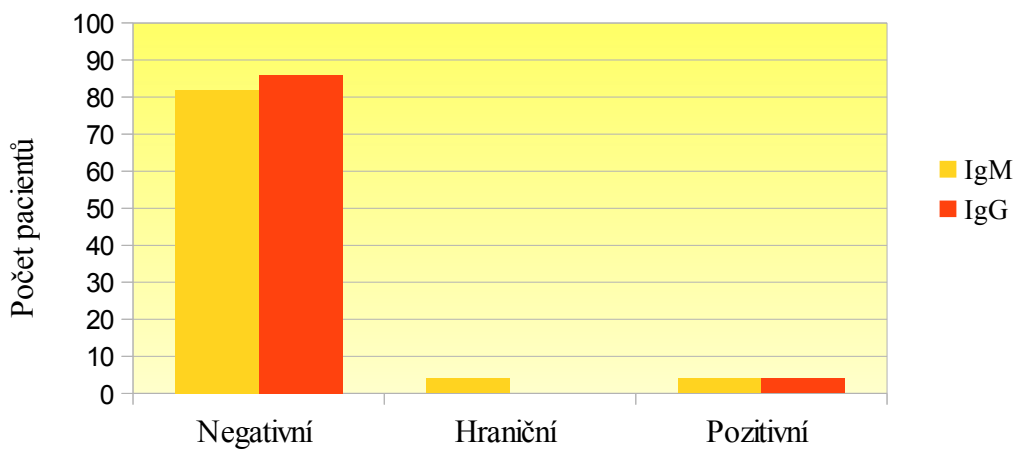
Vzorky pacientů byly vyšetřeny testem ELISA a pomocí Western blotu. U testu ELISA jsem vyšetřila celkem 90 vzorků od pacientů s podezřením na onemocnění Lymeskou boreliózou. Jednalo se převážně o vzorky séra, ale i punktátů a likvoru. Z toho bylo 52 vzorků od žen a 38 vzorků od mužů. Jak je ukázané na níže uvedeném grafu.



Graf. č. 1: ELISA test-počet vyšetřených pohlaví

Každý vzorek se vyšetřoval zvlášť na mikrodestičce na třídu IgM a IgG, tudíž 90 vzorků bylo vyšetřeno ve třídě IgM a 90 vzorků ve třídě IgG. Ve výsledkách bylo v třídě IgM 82 negativních vzorků, hraniční byly 4 a 4 pozitivní vzorky. V třídě IgG vyšlo 86 negativních, 4 pozitivní a žádné hraniční vzorky.

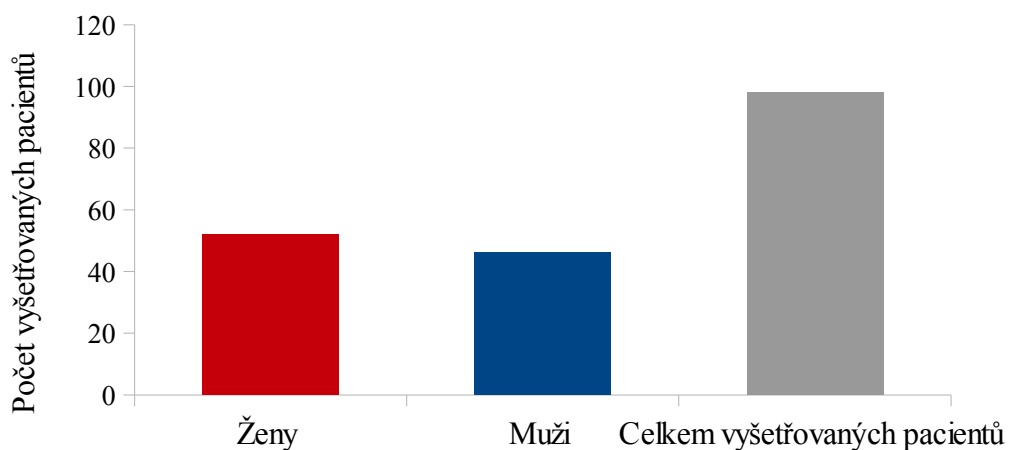
ELISA



Graf. č. 2: Výsledky ELISA testu

V testu Western blot, jsem dohromady vyšetřila 98 vzorků. Žen bylo vyšetřeno v testu WB celkem 52, mužů bylo 46.

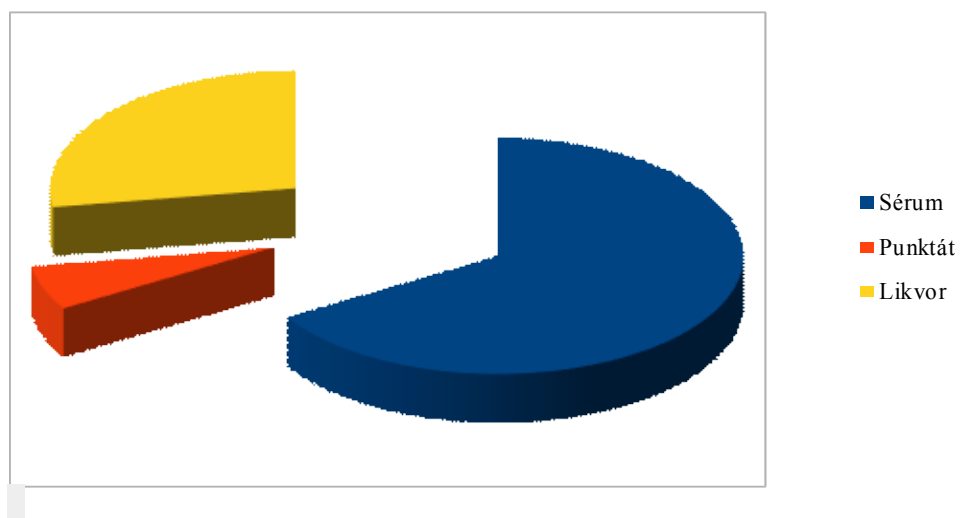
Western blot



Graf č. 3: WB – počet vyšetřených pohlaví

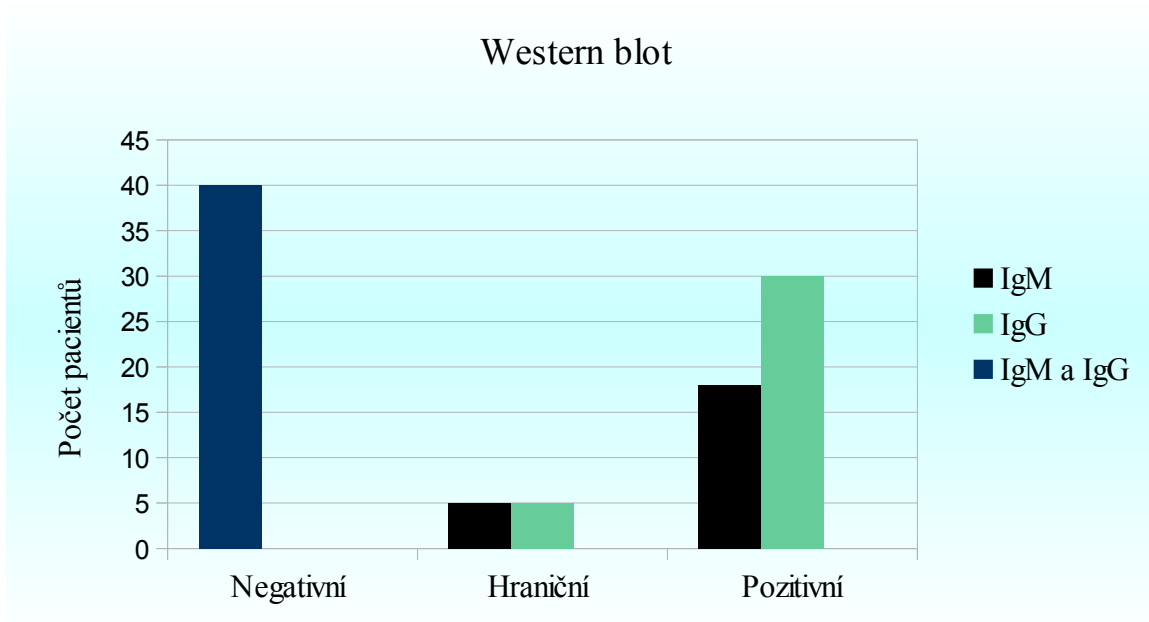
Jako u testu ELISA, i zde bylo převážně vyšetřováno sérum, méně pak likvor a punktáty. Vzorků sér bylo vyšetřeno celkem 65, dále bylo 27 vyšetřených likvorů a 6 punktátů.

Western blot



Graf č. 4: WB – vyšetřené vzorky

V testu WB vyšlo 40 negativních vzorků celkově v třídě IgM a IgG. V třídě IgM vyšlo 5 hraničních a 18 pozitivních vzorků. A v třídě IgG vyšly výsledky jako 5 hraničních a 30 pozitivních vzorků.

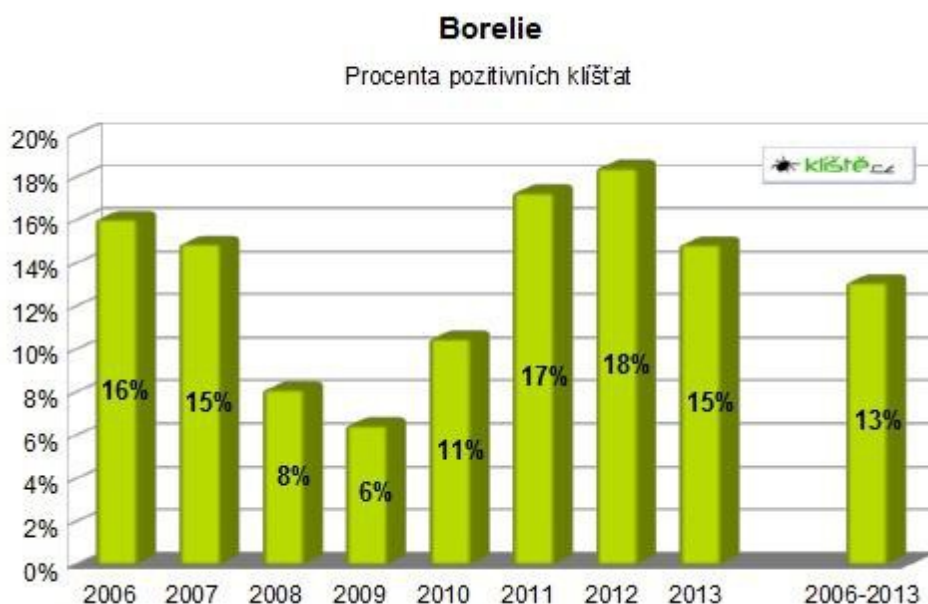


Graf č. 5: WB – rozdělení dle výsledků

5 Diskuze

Pouze asi polovina z pacientů si pamatuje, že u nich došlo k přisátí klíštěte, další část si uvědomuje, že byli poštípani nějakým hmyzem a zbytek si nevzpomíná na žádný možný způsob, jak by mohlo k přenosu dojít. (3)

Na níže uvedeném grafu, který je od roku 2006 až do roku 2013, můžeme vidět procento pozitivních klíšťat na borelii. Nejvíce pozitivních klíšťat v ČR bylo roku 2012 (18%), následně rok 2011 (17%), 2006 (16%), 2007 (15%) a 2013 (15%).



Graf. č. 6: Procento pozitivních klíšťat, rok 2006-2013

(Zdroj: http://kliste.cz/clanek/51/vyskyt_infikovanych_klistat_v_jednotlivych_letech)

Na dalším grafu lze vidět kolik bylo v roce 2012 nakažených klíšťat v procentech, dle jednotlivých krajů v České Republice. Jak můžeme vidět, nejvíce jich bylo v kraji Karlovarském, Královehradeckém, Olomouckém a nejméně pak v oblasti kraje Pardubického, Zlínském a Plzeňském.



Obr. č. 9: Výskyt nakažených klíšťat dle jednotlivých krajů
(Zdroj: http://tn.nova.cz/bin/mobile/index.php?article_id=397081)

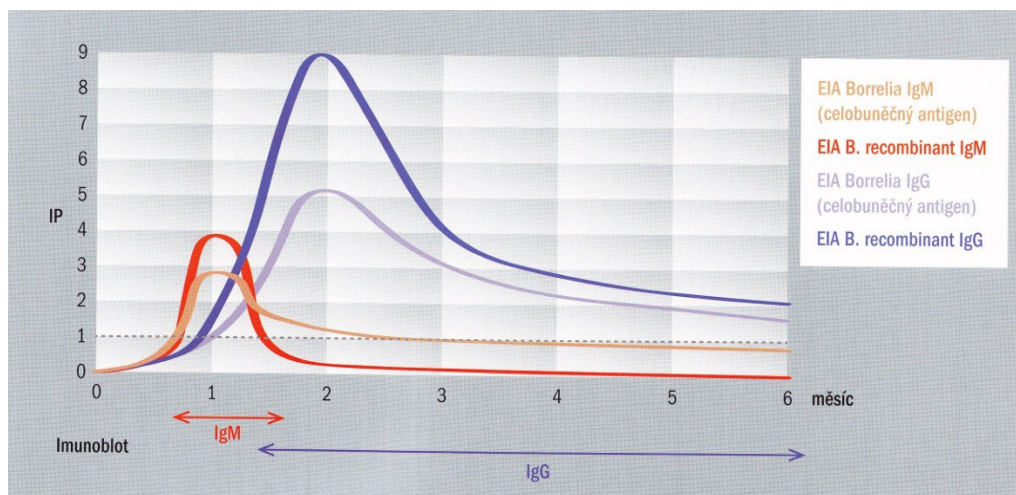
Je důležité, aby ošetřující lékař posoudil mezi sebou klinické nálezy a výsledky laboratorních testů. (24) Pokud by pacient, ale měl vytvořený erythem nebo boreliový lymfocytom, kdy tyto klinické příznaky opravdu vykazují, že jde o LB, lékař není povinen čekat na sérologické testy a může i bez toho podat antibiotickou léčbu. (33)

Jinak posouzení klinických příznaků a sérologických testů je velmi důležité, u pacientů, kteří nemusejí mít klinické příznaky nebo mají příznaky, které ale mohou poukazovat i na jiné onemocnění. V tomto případě by se lékař neměl rozhodnout, aniž by je mezi sebou neposoudil a tím vyloučil jiné možné příčiny. I když i to se může stát v dnešní době, kdy už je diagnostika rozšířenější a o nemoci se ví více, přesto dochází k tomu, že lékař předepíše pacientovi léčbu antibiotiky, aniž by blíže specifikoval, že jde o lymeskou boreliózu.

Při interpretaci výsledků si musíme uvědomit, že tvorba protilátek na počátku onemocnění - v časné fázi je pomalý. (31)

Protilátky třídy IgM se objevují až po přibližně 2 týdnech, kdy nemusí být detekovatelné. Jejich vrchol může začínat v 3. týdnu a pokračovat až do 8. týdne, kdy pak následně mohou klesat. Zato protilátky IgG se zvyšují kolem 6. týdne od nákazy. A to jakou má pacient výšku titru, nemusí odpovídat tomu, jak probíhá onemocnění, či že jde o onemocnění LB. (16)

Musíme si uvědomit možnou zkříženou reaktivitu, která v tomto případě může často nastat příkladně s treponemami a leptospirami. Nebo i u falešné positivity IgM, která je spojená s infekční mononukleózou, sklerodermií nebo u systémového lupus erythematoses. (33) Pokud by se objevily protilátky třídy IgM a IgG, nemůžeme si být jisti, že jde o LB, jelikož se můžeme setkat s pozitivitou IgM přibližně u 2-3% zdravých lidí a s pozitivitou IgG u 10% zdravých lidí. (34) Často může dojít i k tomu, že dlouho po naze jsou protilátky v séru stále prokazatelné. Pokud má pacient uvedené v anamnéze, že v dřívější době prošel onemocněním LB, nejde o možné vrácení infekce, tím že by došlo k selhání léčby a není důvod mu znovu podávat antibiotika. Protože po infekci LB jsou protilátky prokazatelné ještě řadu let po jejím prodělání. (33)



Obr. č. 10: Schématická dynamika tvorby protilátek

(Zdroj: Imunoenzymatické soupravy k diagnostice LB – TestLine)

Pokud předpokládáme při ELISA testu u negativních IgM, ale pozitivních IgG protilátek, že by mohlo jít o časné stádium nemoci, tak k tomuto účelu slouží metoda WB. Pro pozdní stádium nemoci je typická pozitivita IgG a anti VlsE IgG. (23)

Sérologické výsledky mohou být do 8. týdne stále negativní a někdy i natrvalo. Může dojít i k případů, kdy se neprokáží IgM protilátky, a jsou pouze prokazatelné IgG. Právě pro časnou fázi infekce je typické, že protilátky nejsou přítomné v séru nebo to nastává i po časné léčbě antibiotiky. Proto je doporučováno, aby se odběr opakoval minimálně po 4. týdnech. (16)

Dle výsledků, které mi vyšly, byly ženy vyšetřovány častěji nežli muži, jak v testu ELISA, tak i v testu Western blot.

Podávána antibiotika na onemocnění LB se doporučuje brát maximálně po dobu čtyř týdnů, déle ne. U časného onemocnění je jednoznačně doporučováno podávání doxycyklinu, u lidí kteří ho nemůžou užívat se podává azitromycin nebo claritromycin. (33)

K onemocnění LB by se dalo říct, že je těžko diagnostikována, hlavně v případě, že pacient nemá klinické příznaky, hlavně typické pro LB a mohlo by jít o jiné onemocnění. Proto by se mělo velmi dbát na srovnání příznaků a sérologických testů, aby se vyloučily jiné možné příčiny.

6 Závěr

Lymeská borelióza se řadí mezi antropozoonózy. Jde o onemocnění, které je rozšířeno v oblasti Evropy, Asie a Severní Ameriky. Jako vektorem se dnes označují především klíšťata, v naší oblasti *Ixodes ricinus*. (20)

Pokud se klíště přisaje na tělo hostitele a jestliže obsahuje borélie, tak závisí na době přisátí klíštěte, než se dostane do těla, tedy čím déle, tím větší pravděpodobnost, že se dostane do těla. A proto u lidí, kteří jsou více ohroženi nákazou LB jako jsou například lesníci, kteří se během své pracovní doby pohybují v lokalitách, kde se klíšťata vyskytují, by se dalo doporučit, tak jako pro ostatní lidi, že by měly: mít dlouhé kalhoty nejlépe zastrčené ve své obuvi, dále nosily dlouhé rukávy, využívaly dostupné repelenty a vždy po příchodu domů si prohlídly své tělo. Jelikož v dnešní době není možné se proti LB očkovat. A i když je známý patogen, který způsobuje LB, stále není očkování proti této nemoci.

Pomocí přímých a nepřímých metod je možné stanovit hladiny boreliových protilátek třídy IgM a IgG, i když vždy není jednoznačné, zda pokud jsou pozitivní výsledky, že se skutečně jedná o LB a ne o jiné možné onemocnění. Jsou případy, že hladiny těchto uvedených imunoglobulinů nemusí být pozitivní a přesto u pacienta probíhá infekce LB.

Z metod pro diagnostiku se dnes nejvíce využívá ELISA testu a konfirmační metody Western blot, která se využívá především k zhodnocení vzorků, které byly vyšetřované ELISA testem a kde výsledky vyšly nejasně.

Dnes je již léčba dostupná v podobě antibiotik, a čím dříve se začne s jejich léčbou tím lépe pro pacienta. Zda je léčba podávána v časném stádiu využívá se doxycyklinu, azitromycinu nebo claritromycinu. V pozdější fázi je to potom penicilin G a cefalosporiny druhé a třetí generace.

7 Seznam použitých zdrojů:

1. Anděra, M., Procházka, P., Zadražil V. *Zvířata v lese*. Praha: Aventinum, 2001. ISBN 80-7151-173-0
2. Bartůněk, P., et al. *Lymeská borelióza*. 3. doplněné a přepracované vydání. Praha: Grada Publishing, 2006. ISBN 80-247-1543-0
3. Bartůněk, P., et al. *Lymeská borelióza*. 4. přepracované a doplněné vydání. Praha: Grada Publishing, 2013. ISBN 978-80-247-4355-4
4. Bednář, M., et al. *Lékařská mikrobiologie*. Bakteriologie, virologie, parazitologie. Praha: Marvil, 1996
5. Beneš, J. *Infekční lékařství*. Praha: Galén, 2009. ISBN 978-80-7262-644-1
6. Bolehovská, R., et al. *Lymeská borelióza*. *Klin. Biochem. Metab.* 2009. č. 17: s. 24-28.
7. Buchancová, J., et al. *Lymeská borelióza z pohledu pracovního lékařstva – porovnávající štúdia*. *Pracovní lékařství*. 2009. č. 2: s. 46-55
8. Bartůňková, J., et al. *Výšetrovací metody v imunologii*. Praha: Grada, 2011. ISBN 978-80-247-3533-7
9. Čechová, L. *Ochrana před klišťaty a obtížným hmyzem*. *Praktické lékařství*. 2009. č. 4: 184-188
10. Černý, Z. *Klinické projevy a terapie lymeské boreliózy*. *Lékařské listy*. 2000. č.39: s. 12-13
11. Dušek, P. *Diagnostika lymeské boreliózy*. *Kruh*. [online] 2011. s. 1-4

Dostupné:

http://pavel.duskovi.info/skola/medicina/Diagnostika_lymeske_boreliozy.pdf

12. Gordon, D., et al. *Život bez nemocí*. Praha: Reader's Digest, 2011. ISBN 978-80-7406-136-3
13. Fránková Bílková, H. *Laboratorní diagnostika neuroborreliózy*. Zpravodaj CKL ZÚ. 2011. č. 1: 2-4
14. Gurčík, L. *Súčasný trendy v diagnostice a léčbě neuroboreliózy*. Neurol. prax. 2009. č. 3: s. 170-176
15. Holečková, D., et al. *Laboratorní diagnostika novějších neuroinfekcí*. Posgraduální medicína. 2006. č. 3: s. 319-322
16. Hejnar, P. *Specifika nepřímé diagnostiky toxoplazmózy a lymeské boreliózy u dětí*. Pediatrie pro praxi. 2001. č. 2: s. 112-115.
17. Kimmig, P., et al. *Klíšťata*. Nepatrné kousnutí s neblahými následky. Praha: Pragma, 2003. ISBN 80-7205-881-9
18. Křupka, M., et al. *Lymeská borelióza – biologie, patogeneze, diagnostik a léčba*. Dermatologie pro praxi. 2008. č. 2: s. 236-239
19. Lobovská, A. *Infekční nemoci*. Praha: Karolinum, 2002. ISBN 80-246-0116-8
20. Pícha, D. *Lymeská borelióza*. Postgraduální medicína. 2009. č. 8: s. 827-832
21. Pícha, D. *Infekce přenášené klíšťaty*. Postgraduální medicína. 2006. č. 3: s. 310-314
22. Pýchová, M., et al. *Trojí infekce vinou jednoho parazita aneb Co vše může způsobit jediné klíště*. Medicína pro praxi. 2011. č. 8: s. 190-192
23. Procházková, Z. *Lymeská borelióza*. Sestra. 2013. č. 4: s. 33-35
24. Roháčová, H. *Lymeská borelióza*. Průvodce ošetřujícího lékaře. Praha: Maxdorf, 2005. ISBN 80-7345-071-2
25. Roháčová, H. *Lymeská borelióza v ordinaci PL z pohledu infektologa*. Practicus. 2004. č. 6: s. 182-184

26. Roháčová, H. *Onemocnění přenášená klíšťaty*. Interní medicína pro praxi. 2006. č. 6: s. 280-283
27. Sedlák, K., Tomšíčková, M. *Nebezpečné infekce zvířat a člověka*. Praha: Scientia, 2006. ISBN 80-86960-07-2
28. Staňková, M., Marešová, V., Vaništa J. *Infekční lékařství minimum pro praxi*. Praha: Triton, 2002. ISBN 80-7254-236-2
29. Stejskal, V. *Klíšťata, komáři, blechy, vosy*. Praha: Scriptum, 1995. ISBN 80-85528-37-1
30. Thon, V., et al. *Základy vyšetření v klinické imunologii*. Brno: MU, 2009. ISBN 978-80-210-4227-8
31. Test-Line. *EIA Borrelia recombinant IgM*. Imunoenzymatická souprava. 2012. s.1-13
32. Test-Line. *Imunoenzymatické soupravy k diagnostice Lymeské borreliózy. Borrelia burgdorferi sensu lato*. Brno: TestLine Clinical Diagnostics s.r.o.
33. Dlouhý, P., et al. *Lymeská borrelióza: Doporučený postup v diagnostice, léčbě a prevenci*. [online] 2011.
Dostupné z : <http://www.infekce.cz/DoporLB11.htm>
34. Votava, M., et al. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun, 2003. ISBN 80-902896-6-5
35. Western blot. *Návod k testu pro Anti-Borrelia EUROLINE-RN-AT*. Protilátky proti Borrelia (IgM). EUROIMMUN, s.1-15
36. Western blot. *Návod k testu pro Anti-Borrelia EUROLINE-RN-AT*. Protilátky proti Borrelia (IgG). EUROIMMUN, s.1-15
37. Dynex. *DSX-automatizovaný systém ELISA*. Uživatelská příručka.