

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

katedra biologických a lékařských věd

Lymeská borelióza

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: Pharm. Dr. Petr Jílek, CSc.

Školitel specialista: MUDr. Věra Kůrková

Hradec Králové, 2011

Lenka Čapková

ČESTNÉ PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práci jsem nepoužila k získání jiného titulu.

V Hradci Králové, dne 2. 5. 2011

podpis

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji panu Pharm. Dr. Petrovi Jílkovi, CSc. a MUDr. Věře Kůrkové za vedení a cenné rady při přípravě a psaní této práce.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

Kandidát: Lenka Čapková

Vedoucí bakalářské práce: Pharm. Dr. Petr Jílek, CSc.

Školitel specialista: MUDr. Věra Kůrková

Téma práce: Lymeská borelióza

Práce obsahuje mikrobiologii patogena, laboratorní diagnostiku, patogenezi, klinické příznaky, terapii, prevenci a epidemiologickou situaci lymeské boreliózy.

ABSTRACT

Topic of Lyme borreliosis.

The work includes microbiology causer, laboratory diagnosis, clinical symptoms, pathogenesis, therapy, prevention, epidemiological situation of Lyme borreliosis.

Obsah

1. Zadání - cíl práce	6
2. Úvod	7
3. Historie	8
4. Mikrobiologie.....	10
4.1. Morfologie – <i>Borrelia spp.</i>	10
4.2. Růst	11
4.3. Odlišnosti patogena	12
5. Laboratorní diagnostika	14
5.1. Přímé metody.....	14
5.1.1. Kultivace	15
5.1.2. Světelná mikroskopie v zástinu	15
5.1.3. Histologický průkaz	16
5.1.4. Elektronoptický průkaz	16
5.1.5. DNA - hybridizace	17
5.1.6. PCR	17
5.2. Nepřímé metody	18
5.2.1. ELISA.....	19
5.2.2. Western blot.....	22
5.2.3. IFA.....	23
6. Patogeneze	24
7. Klinické projevy	27
7.1. Postižení kůže	28
7.2. Postižení kloubů	29
7.3. Postižení oka	29
7.4. Postižení srdce.....	30
7.5. Neuroborelióza	30
7.6. Postižení u dětí.....	31
7.7. Postižení v těhotenství	32
8. Terapie.....	33
9. Prevence	35
10. Epidemiologická situace.....	37
11. Diskuse	42
12. Závěr	44

1. Zadání - cíl práce

Cílem mé práce je seznámit s problematikou onemocnění lymeská borelióza, která představuje u pacientů v ČR vážný zdravotní a socioekonomický problém. Mým cílem je také seznámit s její diagnostikou, klinickými příznaky a epidemiologickou situací u nás i v Evropě a s postupy prevence a možné terapie.

2. Úvod

Lymeská borelióza je komplexní bakteriální onemocnění vyvolané mikroaerofilní, pohyblivou, Gram negativní spirochétou *Borrelia burgdorferi*, „sensu lato“ s těmito druhy: *B.afzelii*, *B.garinii*, *B.valaisiana*, *B.spielmanii*. Lymeská borelióza patří u nás mezi nejčastější antropozoonózy přenášené klíštětem rodu *Ixodes*. Jedná se o multisystémové onemocnění, příčinou je její nesporně značná variabilita, typické necharakteristické symptomy, které mohou imitovat řadu jiných onemocnění a znesnadňují její diagnostický proces. Jde o onemocnění, kde je možnost rizika vývoje této choroby do chronicity, provázené klinickými i laboratorně prokazatelnými relapsy. Proto je toto onemocnění tak komplikované. Relapsy mohou trvat týdny i měsíce. Cyklický průběh nemoci vyžaduje nejen základní studium patogenů, ale i využití řady komplexních vyšetřovacích metod. Toto onemocnění má časná a pozdní stadium. (Stites, 1994)

Nákazou jsou nejvíce ohroženi lidé, kteří se dlouhodobě pohybují v přírodě, hlavně v listnatých lesích, křovinách a vysokých trávách. Jen u malé části infikovaných lidí se projeví klinické příznaky lymeské boreliózy.

Onemocnění obvykle začíná typickým kožním erythemem, někdy jsou příznaky jako u chřipky, atd. Následné stádium může být u každého odlišné. Příznaky jsou buď jednotlivé nebo kombinované. Může dojít k onemocnění srdce, oka, kloubů, kůže, atd.

Do povědomí lékařů se toto onemocnění dostalo koncem 70. Let, kdy byla odhalena spojitost mezi její přítomností spirochéty v organismu, záněty orgánů a stykem pacienta s infikovaným klíštětem. (Bartůněk, 2006)

3. Historie

1883 – první zmínka o lymeské borelióze, popsal ji dermatolog Buchwald jako acromadermatitis atrophicans(ACA).

Pár let po té byl popsán lymfocytom a erythema migrans (dále jen EM). Tyto kožní projevy dále doprovázelo zjištění o postižení dalších orgánů.

1921 – publikoval Jessner u postiženého ACA spolu s laryngitidou

1922 – referovali Garin a Bujadoux o případě meningopolyneuritidy ve spojení s EM.

40. léta 20. st. – popsal Bannwarth řadu nemocných, kteří měli multifokální postižení nervového systému po přisátí klíštěte.

1966 – popsal Schaltenbrand vztah EM a meningitidou.

Dále se postupně prezentovala řada teorií v souvislosti a tímto multiorgánovým onemocněním.

Lonhoff upozornil na možnou účast spirochét při EM a ACA.

60. - 70. léta – EM uznáno jako celkové onemocnění, ale bez známého původce.

80. léta – byla popsána lymeská nemoc podle městečka Lyme v Connecticutu, kde Steere a spol. zpozorovali epidemický výskyt zánětlivé artropatie s předcházejícím erytémem u 59% dětí. Také tato oblast byla charakteristická přemnožením klíštěte rodu *Ixodes dammini*.

1982 – objevení spirochéty jako původce infekce, zařazení mezi borelie a označena *Borrelia burgdorferi*.

1987 – na III. mezinárodní konferenci v New Yorku označení lymeská borelióza. (Bartůněk, 2006)

Tab. 1.1 Zásadní objevy v historii lymeské boreliózy

1883	První popis „idiopatické atrofie kůže“, později označené jako Acrodermatitis chronica atrophicans (ACA)	Buchwald
1894	Lymphocytosis benigna cutis	Spiegler
1909	Erythema migrans (EM)	Afzelius
1921	Souvislost mezi přisátím klíštěte a EM	Afzelius
1922	EM + postižení nervového systému	Garin + Bujadoux
1923	První popis vícečetného EM	Lipschütz
1924	Souvislost ACA a kloubních obtíží	Jessner
1941	Meningoradikuloneuritida + postižení kloubů	Bannwarth
1946	Úspěch PNC v léčbě ACA	Herxheimer
1948	Speciální technika k průkazu spirochét v kožní biopsii z EM	Lenhoff
1971	Zavedení techniky kultivace borrelií	Kelly
1975	Epidemická artritida	Steere
1980	Postižení srdce	Steere
1982	Izolace borreliie (Bb) v klíštěti <i>Ixodes dammini</i>	Burgdorfer
1983	Průkaz Bb v krvi pacientů s LB	Benach
1984	Průkaz protilátek v séru nemocných (LB)	Ackermann
1985	První důkaz o transplacentárním přenosu Bb	Schlesinger
1987	Doporučen název lymeská borelióza (III. mezinárodní konference, New York)	

(Bartůněk, 2006, Lymeská borelióza, s.12)

4. Mikrobiologie

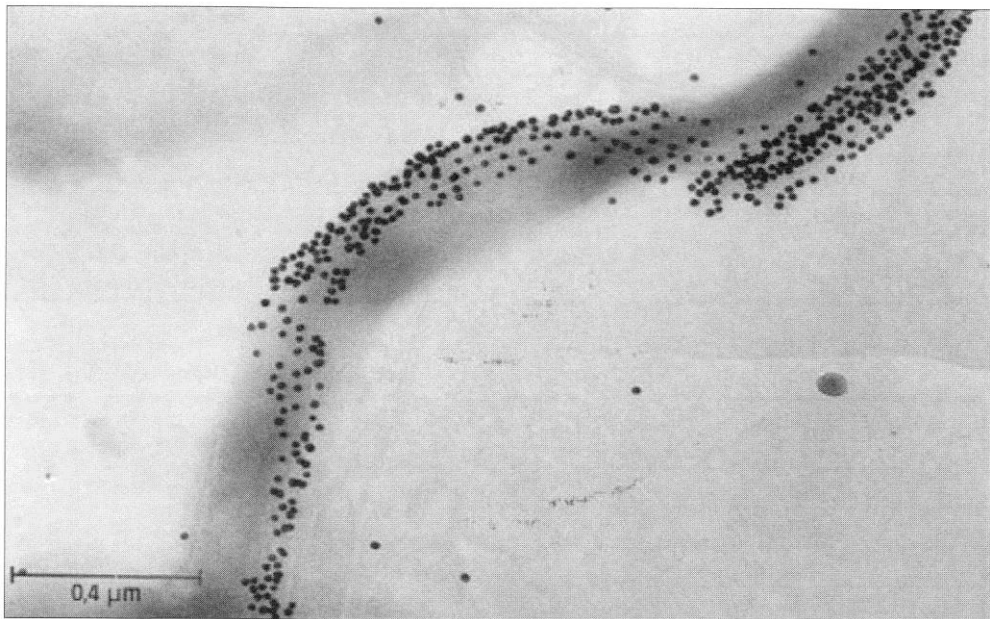
4.1. Morfologie – *Borrelia spp.*

Patogen způsobující onemocnění lymfská borelióza se nazývá *Borrelia burgdorferi sensu lato*. Je to tenká, s pravidelnými závití spirálovitě vinutá buňka o rozměrech 0,2 μm . x 4-30 μm . Závití mají vzdálenost 2,2 μm . s počtem 4-15. Pohybují se rotací kolem podélné osy nebo se smršťují a natahují. Pohyb umožňuje 7-9 bičíků. (Jiné patogenní borelie mohou mít až 20 bičíků.) Bičíky jsou tvořeny vnějším a vnitřním glykoproteinem o molekulové hmotnosti 41 a 14 kD. Protein se nazývá flagelin. Bičíky se vypínají se z bazálních disků mezi oběma konci buňky. Bazální disky jsou umístěny v cytoplasmatické membráně, která obtáčí tělo borelie pod vnější buněčnou stěnou. Ta je tvořena třemi vrstvami:

- a) vnitřní peptidoglykanová
- b) střední lipopolysacharidová
- c) vnější lipoproteinová

Stěna je oddělena periplazmatickým prostorem od cytoplasmatické membrány na povrchu protoplazmatického válce.

Flexibilita membrán je dána vysunutím bičíků v proximálním a distálním směru, tvorbou cyst a vylučování membranózních vezikulů. Vezikuly mají stejné složení jako buněčná stěna a navíc mají plazmidovou výbavu. Fluidita vnější membrány umožňuje posun antigenních molekul proteinů a buněčných glykosaminopeptidových receptorů, které jsou významné pro adhezi s hostitelskou buňkou. Borelie se odlišují od ostatních spirochét přítomností intramembranózních tělísek podobající se tvaru fibril a vezikul. Jsou podobné glykokalyxu buněk. (Bartůněk, 2006)



Obr. 2.1 Elektronogram – ukazuje bičičky označené monoklonální protilátkou proti flagellinu (Mab H9723), které obtáčí spirálovitě vinuté tělo *B. garinii* pod vnějším obalem (konjugát Protein A-zlaté partikule) (Jansen GmbH), zvětšeno 100 000x (foto D. Hulínská)

(Bartůněk, 2006, Lymeská borelióza, s.14)

4.2. Růst

K růstu, pohybu, životu i virulenci *Borrelia burgdorferii* je nutná přítomnost bičičků a vnějších povrchových proteinů Osp (Outer surface proteins) buněčné stěny.

Mikroaerofilní borelie rostou in vitro ve vysoce obohacené komplexní živné půdě BSK (Barbourova-Stoenerova-Kellyho půda). Zde je generační doba růstu 12 – 14 hod., in vivo není známá. V krvi byl růst borelií pozorován pomocí příčného a podélného zaškrcení mateřské buňky. Mateřská buňka ztrácí pomocí těchto zaškrcení septa asi polovinu bičičků. U dceřiných buněk z disků a háčků vyrostou nové bičičky. K obnově bičičků nedojde pouze v nevhodných podmínkách, jako při použití ATB, lytické enzymy a tím se pak narušuje soudržnost buňky. Vytváří se nepravidelné struktury, cysty, vezikuly, granula, zárodečné „gema“. Mohou se pozorovat v krvi i v mozkomíšním moku.

V experimentálních podmínkách borelie dokazují velkou odolnost. V citrátové krvi vydrží čtrnáct dní při 4 °C, v mozkomíšním moku osm dní a dva dny v destilované vodě. Ze znečištěné vody infikované infikovanými klíšťaty nebo jejich výkaly a výkaly hlodavců a ptáků, lze borelie také izolovat. (Bartůněk, 2006)

4.3. Odlišnosti patogena

Výzkum histopatogeneze vedl k hypotéze o vývoje cyklu spirochét, to je antigeně, imunologicky a morfologicky odlišných borelií v organismu hostitele i v klíštěti rodu *Ixodes* (Burgdorfer, 1999).

Cystické formy jsou považovány za morfologickou fázi v nevhodných podmínkách pro spirochétu.

Imunologickou fázi tvoří borelie, které infikují hostitele bez ohledu na jeho imunitní obranu řadu měsíců a let.

Antigenní fázi tvoří antigen variabilní systém (VlsE), díky kterému mohou spirochety aktivní imunitní obraně a léčbě. (J. Burrascano Jr., 2008)

Spirochety se liší svým fenotypem a genotypem.

Povrchové antigeny (imunologické proteiny):

Osp A, B – variabilní a mají plazmidový původ

p41 – bičíkový flagelin, má specifické epitopy

p60 – obecný antigen, společný i pro jiné bakterie

Osp C – hlavní imunogen v časně imunitní odpovědi

p100 – hlavní imunogen v pozdní imunitní odpovědi

Povrchové antigeny mají odlišnou velikost i antigení reaktivitu. Jsou to lipoproteiny plazmidového původu. Plazmidy mají kruhovou i lineární strukturu. Při jejich ztrátě dochází současně ke ztrátě virulence a variability proteinů, neboť jsou nositeli genů.

Borelie intracelulárně uložené se nedělí. Intracelulární perzistence borelií byla prokázána in vitro, in vivo i po léčbě ATB. *Borrelia burgdorferii sensu lato* tvoří extracelulární membránové vezikuly s povrchovými antigeny Osp A, B, C, D a plazmidovou DNA. Je to obranný mechanismus proti sérovým protilátkám. Borelie se zbavuje antigenů v podobě vezikul a tím dochází k fagocytóze vezikul a ne spirochét.

Borelie je heterogenní bakterie měnící se vlivem prostředí, přenosu na teplokrevného hostitele, uniká z místa obranné reakce hostitele, váže a aktivuje hostitelské enzymy, reguluje vlastní povrchové proteiny, ovlivňuje syntézu adhezivních molekul a cytokinů a také způsobuje orgánový tropismus. (Bartůněk, 2006)

5. Laboratorní diagnostika

Laboratorní diagnostika boreliózy je odlišná vzhledem k velké pestrosti možných klinických projevů a rozlišení výsledků od akutního stádia k anamnestické reakci. Diagnóza onemocnění spočívá na klinickém obrazu, epidemiologické anamnéze a laboratorním vyšetření. Laboratorní metody by měly klinickou diagnózu objasnit, nejen confirmovat.

Odběr vyšetřovaného materiálu a jeho příprava musí vždy probíhat za daných podmínek:

- a)** Musí se vždy zajistit sterilní odběr (dezinfekce, sterilní odběrové nádoby a jehly), především u odběru mozkomíšního moku, krve, synoviální tekutiny, atd.
- b)** Odběr musí provádět vždy odborně způsobilá osoba (mozkomíšní mok,...)
- c)** Je důležité použít vhodné odběrové nádoby dle metody (sterilní zkumavky, vakuové zkumavky s přesným poměrem antikoagulačního činidla EDTA).
- d)** Doba odběru také může ovlivnit kvalitu vzorku. (Votava, 2010)

5.1. Přímé metody

Přímá diagnostika původce onemocnění je ideální způsob, pokud se vyšetřuje materiál, kde se přímo původce nachází nebo se nachází nějaká jeho část. K přímému průkazu borelií patří metody, kultivační, mikroskopické, histologické, elektronoptické a PCR metoda. (Kimmig, 2003)

5.1.1. Kultivace

Kultivace borelií je možná na živné půdě BSK (viz. Přílohy). Kultivace probíhá při teplotě 33°C. Alanin je nutný ke kultivaci přítomných cyst. Tomuto kroku se říká předkultivace.

Kultivace probíhá ve třech stádiích. Tím dalším je kultivace statická, kde růstem a změnou metabolismu v boreliích dochází hlavně ke změně jejich prostředí. Proto je nutné po čtrnácti dnech provést kultivaci kontinuální v podmínkách nové půdy, tzv. pasážování. Teprve po třech pasážích lze mluvit o izolaci kmene.(Hulínská a kol., 2000)

K růstu borelií je důležité dodržet teplotu, osmotický tlak, sluneční světlo, UV záření, pH 7, 5, oxidoredukční potenciál ($Eh \pm 0, 1$ do 0, 1 – 0, 2). Snížením oxidoredukčního potenciálu lze docílit přidáním cysteinu nebo kyseliny asparagové. Ke kultivaci borelií se používá krevní plazma.(Votava, 2000)

Kultivace prokazuje živé borelie v organismu. Kultivace je bohužel málo výtěžná.

5.1.2. Světelná mikroskopie v zástínu

Další metoda přímého průkazu je světelná mikroskopie v zástínu. Používá se k průkazu pohyblivých borelií v klíštěti. Slouží k průzkumu různých lokalit, jaké je riziko pro lidi a také se touto metodou stanovují vývojová stádia klíšťat.(Bartůněk, 2006)

5.1.3. Histologický průkaz

Histologický průkaz borelií má dvě varianty metod. Buď na preparát použít barvení Giemsou – Romanowski (viz. Přílohy) a toluidinovou modří nebo preparát nechat natrávit amylázou a použít stříbření pomocí 1% dusičnanu stříbrného. Obě metody lze použít i na tkáně zalité v parafínu. Pro specifčnost metody je nutné použít monoklonální protilátku proti povrchovým antigenům. (Hulínská, 2006) Přímý histologický průkaz u boreliózy z excize kůže při EM je možný, ale v klinické praxi se nepoužívá. (Bartůněk, 2006)

5.1.4. Elektronoptický průkaz

Elektronoptický průkaz antigenu zhodnocuje morfologii borelie a imunocytochemickou reakci antigenu s monoklonální protilátkou. Materiál je buď centrifugován nebo připraven na tenké ultrařezy. Upravený materiál se fixuje roztokem 4% paraformaldehydu a 0, 1% glutaraldehydu. K negativnímu barvení se používá 1% fosfowolframová kyselina nebo 1-8% uranylacetát. (Na toto vyšetření musí být heparinizovaná krev, u neuroboreliózy se vyšetřuje mozkomíšní mok)

ISEM (imunosorbentní elektronová mikroskopie), podobný průkaz, ale s použitím specifické protilátky na pevném sorbentu (mikroskopická síťka s formvarovou blankou) a následuje adsorpce antigenu a monoklonální protilátkou značená zlatem. Metoda nebyla dosud standardizována, proto může být zatím použita jako doplňková metoda před kultivací. (Bartůněk, 2006)

5.1.5. DNA - hybridizace

DNA – hybridizace založená na detekci DNA a RNA borelií. Jde o vazbu uměle zhotovené próby, většinou klonované DNA borelií, značené radioaktivním izotopem, na známou sekvenci DNA borelií, jež je fixována na membránovém nosiči. (Bartůněk)

K vyšetření touto metodou se používá žilní krev s K2 EDTA, ze které je izolována DNA pomocí depurinace, alkalické hybridizace a neutralizace. Po té následuje kontrola čistoty a koncentrace připraveného vzorku – izolátu DNA. (Šimůnek, 2010)

5.1.6. PCR

PCR metoda je mnohem citlivější než DNA- hybridizace. Je vhodná na detekci genetického materiálu *Borrelia burgdorferi* v synoviální tekutině, krvi, moči, mozkomíšním moku, kůži a jiných tkáních. Jde o princip mnohonásobného zmnožení genetického materiálu pomocí enzymu polymerázy. Díky tomu je možné prokázat i velmi malé množství DNA patogena. (K falešně pozitivní reakci může dojít, pokud se zmnoží zavlečený nežádoucí genetický materiál. Tato metoda je citlivá i na její přípravu!) Výhoda PCR metody u stanovení DNA *Borrelia burgdorferi* je, že se může touto metodou vyšetřovat plazma, moč, mozkomíšní mok během léčby i krátce po ní. (Bartůněk, 2006)

(Příprava vzorku k PCR metodě je shodná s přípravou vzorku k DNA- hybridizaci.)

5.2. Nepřímé metody

Nepřímým průkazem rozumíme průkaz infekčního agens podle nálezu stop, které zanechalo v organismu, totiž naprostou většinou nálezu protilátek, zcela vzácně podle průkazu specifické buněčné imunity. (Votava, 2001)

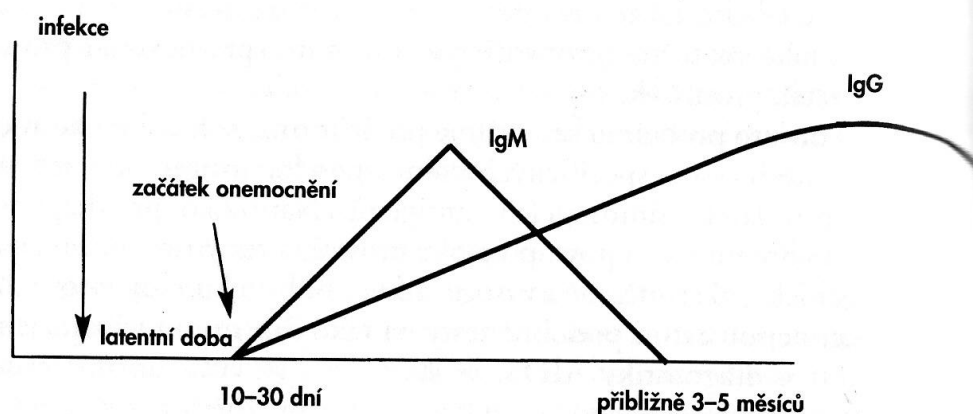
Sérologické metody se provádějí s podezřením na ta onemocnění, kde je špatná dostupnost a obtížnost kultivace nebo jiných přímých metod jako je tomu právě u lymeské boreliózy. Imunitní odpověď je velmi variabilní. (Kimmig, 2003)

Výsledky sérologického vyšetření v časně fázi onemocnění nebo u osob časně léčených ATB jsou většinou negativní. Asi u třetiny nemocných dochází za 3 – 6 týdnů k tvorbě IgM protilátek (protilátky značící obecně časnou fázi onemocnění, netvoří se po léčbě nebo imunodeficitní jedinci), jejichž hladina se postupně snižuje a během několika měsíců, (někdy i let) vymizí. IgG protilátky (protilátky značící pozdní stádium nemoci nebo imunitní paměť na infekční agens či očkovací látku) se většinou objevují až v nepřítomnosti IgM, mají vrcholnou hladinu až v pozdní fázi onemocnění. Mohou přetrvávat mnoho let i po léčbě a nemají vztah k úspěšnosti terapie nebo přetrvávání spirochét v organismu. Zvýšení těchto protilátek není indikací k přeléčení. Časový interval mezi vzorky by měl být 6 – 8 týdnů, k porovnání hladin těchto odlišných protilátek a posouzení, v jakém stádiu se onemocnění nachází a podle toho také stanovit terapii. (Ticháček, 1996)

U časně neuroboreliózy lze protilátky detekovat dříve v mozkomíšním moku než v séru. U neuroboreliózy se vypočítává index mozkomíšní mok/sérum (použití ELISA testu) = hodnota větší než 1 svědčí o přítomnosti protilátek v CNS. (Problém přes hematoencefalitickou bariéru.)

Všechny sérologické metody mají podobný princip, zviditelnění reakce mezi antigenem a protilátkou.

Laboratorní diagnostika lymeské boreliózy je v současné době založená hlavně na sérologickém vyšetření, např. metodou ELISA, IFA, Imunoblotting, Western blot, enzymový imunosorbční test.



Obr. 39

Časový výskyt protilátek IgM a IgG (na příkladu borreliózy). Při infekci se nejdříve vytvoří protilátky IgM, které existují jen několik měsíců. Protilátky IgG představují „dlouhodobou paměť“ imunitního systému; objeví se sice později, ale jsou prokazatelné často po celé roky, nebo dokonce celý život.

(Kimmig P., Klíšata, 2000, s.68)

5.2.1. ELISA

ELISA je vůbec nejčastěji používaným sérologickým testem na průkaz specifických antiboreliových protilátek. Je preferována proto, že je citlivá a lze ji automatizovat a dobře kvantifikovat. Ve většině laboratoří se používá jako screeningový test.

K této metodě se používají:

- Polyklonální protilátka vázaná na pevném povrchu (většinou na stěně jamky v mikrotitrační destičce)
- Monoklonální protilátka navázaná na enzym
- Rozpustný antigen – ve vyšetřovaném séru, sleduje se jeho přítomnost
- Enzym – většinou peroxidáza
- Chromogenní substrát
- Kyselina sírová
- Roztok na vyplachování přebytků z mikrodestičky

- Detekční přístroj – spektrofotometr (měření absorbance při monochromatickém záření 380 – 405nm.)
- Automatická mikropipeta a sterilní špičky

Princip metody:

Na stěnu destičky s navázanou protilátkou se naváže antigen. Po promytí se na neobsazenou část naváže protilátka s enzymem. Po následném promytí se antigen prokáže přidáním chromogenního substrátu, který je enzymem štěpen na barevný produkt. Intenzita zbarvení je přímo úměrná koncentraci antigenu (Pecka, 2006)

Postup reakcí:

1. Do jamky s navázanou protilátkou přidáme vzorek.
2. Antigen se nachytá na navázanou protilátku.
3. Vypláchneme zbytek vzorku.
4. Přidáme druhou protilátku s navázaným enzymem.
5. Protilátka se naváže na antigen.
6. Vypláchneme zbytek nenavázané protilátky.
7. Přidáme bezbarvý substrát.
8. Po reakci substrátu s enzymem se směs zbarví.
9. Reakci zastavíme přidáním kyseliny sírové
10. Změříme výsledné zbarvení
11. Vyhodnotíme

(Pecka)

Dnes se ve většině laboratoří pro tuto metodu používají automaty.

Vyšetření na lymeskou boreliózu ELISA testem naší laboratoří. (Mikrobiologie, Nemocnice Písek):

Naše laboratoř k vyšetření na lymeskou boreliózu používá testovací soupravu ELISA od firmy UROIMMUN.

Testovací souprava poskytuje semikvantitativní nebo kvantitativní in vitro zkoušku na lidské IgG(IgM) protilátky proti borreliovým antigenům v séru nebo plazmě. Souprava obsahuje mikrotitrační pásky po 8 odlomitelných reagenčních jamkách potažených směsí celých antigenových extraktů *Borrelia burgdorferi sensu strigo*, *B. afzelii*, *B. garinii* a rekombinantní VlsE *B. burgdorferi*.

V 1. reakčním kroku se v jamkách inkubují naředěné vzorky:

100 µl. kalibračních sér (č.1-200 RU/ml.; č.2- 20 RU/ml.; č.3-2 RU/ml.),
pozitivní, negativní kontrola a naředěná séra pacientů.

- Inkubace 30 min. při pokojové teplotě, promývání promývacím pufrem
- Při pozitivní reakci se naváže IgG(IgM) protilátka na antigen

V 2. reakčním kroku se detekují navázané protilátky použitím enzymově značených IgG protilátek:

100 µl. enzymového konjugátu (enzym peroxidáza),
-inkubace 30 min. při pokojové teplotě, promývání promývacím pufrem

Ve 3. reakčním kroku dochází ke značení chromogen/substrátovým roztokem:

100 µl. chromogen/substrátového roztoku (barevná reakce)

- Inkubace 15 min. při pokojové teplotě, nutné chránit před světlem
- 100 µl. roztoku 0,5M kyseliny sírové – zastavovací roztok reakce

Následuje fotometrické měření při vlnové délce 450 nm. a referenční délce 620 nm. a 650 nm. během 30 min. počínaje přidáním zastavovacího roztoku.

Hodnocení:

-semikvantitativní- poměr extinkční hodnoty pacientova (nebo kontrolního) séra a extinkční hodnoty kalibračního séra 2.

Poměr < 0,8 negativní

Poměr ≥ 0,8 do < 1,1 hraniční

Poměr ≥ 1,1 pozitivní

-kvantitativní- sestavení standardní kalibrační křivky a vynesení bodů extinkčních hodnot sér pacientů

< 16 RU/ml negativní

≥ 16 až < 22 RU/ml hraniční

≥ 22 RU/ml pozitivní

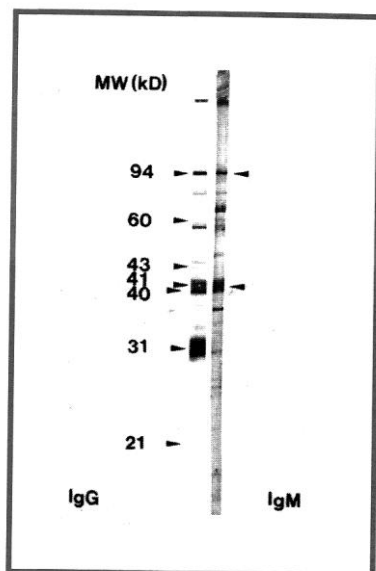
(pracovní návod ELISA)

Průlomem bylo rozhodnutí Centrem pro kontrolu v prevenci nemocí určující užití metody následující po ELISA testu u hraničních hodnot a u hodnot, kdy hodnoty protilátek se neshodují s klinickým stavem pacienta zvaný imunobloting nebo western blot. (Bartůněk, 2006)

5.2.2. Western blot

Western blot má vysokou specifičnost pro konfirmaci všech pozitivních a hraničních protilátek. Při metodě western blot na rozdíl od ELISA dochází k rozlišení protilátek od různých proteinů původce. Zobrazí se v podobě jednotlivě zbarvených proužků na papírovém podkladě. Některé z proužků dávají jednoznačnou informaci. ELISA je brána jako vyhledávací test a western blot jako ověřovací test. Výsledná negativita u western blotu je brána jako falešně pozitivní hodnota v ELISA testu. I u western blotu se odlišují časně a pozdní infekce, určující protilátky IgM a IgG.

Pro kompletní vyšetření protilátek u lymeské boreliózy se vyžadují tyto testy: ELISA: IgM; ELISA: IgG; WB: IgM; WB: IgG (Kimmig, 2003)



Obr. 42
Schéma westernblotu (immunoblotu).
Na rozdíl od jednoduché ELISY umožňuje
westernblot současně rozlišení protilátek
od různých proteinů původce; zobrazí se to
v podobě jednotlivých zbarvených proužků.

(Kimmig, 2000, Klišťata, s.70)

5.2.3. IFA

Jedna z posledních používaných metod je IFA (imunofluorescence). Vazby protilátek na původci se prokážou pomocí fluorescenčního barviva. Při pozitivní reakci dochází pod UV zářením k fluorescenci původce zeleně a při negativním nálezu se jeví červeně.

Přímý postup metody je reakce protilátek třídy IgM a IgG se substrátem obsahující borelie naneseným na sklíčku. Reakce je variabilní, závislá na druhu borelií, který infekci vyvolal.

Hodnocení je subjektivní. Používá se zvířecí Ig (imunoglobulin) konjugovaný s fluoresceinem.

Výhodou je ředění sér a tím možnost identifikovat hodnotu titru přítomných sérových protilátek. Rozmezí pozitivních hodnot je od 1:40 - 1:1280.

Sérum od pacientů s lymeskou boreliózou může někdy reagovat ve specifických treponemových testech, ale ne v netreponemových, př.VDRL.(Stites, 1994)

6. Patogeneze

Borrelia burgdorferi sensu lato (dále jen Bbsl) je komplex 11 ověřených a pojmenovaných genospecies. Do této skupiny z evropských patogenních kmenů patří *Borrelia burgdorferi*, *Borrelia afélii*, *Borrelia garinii*. *Borrelia burgdorferi sensu stricto* (dále jen Bbss) jsou pojmenovány hlavně americké kmeny. *Bbss*, *Borrelia afzélii*, *Borrelia garinii* a *Borrelia spielmanii* mají prokázanou patogenitu.

Spirochéty nebyly dosud samostatně prokázány v přírodě, žijí obligátně paraziticky. Jejich biologický cyklus je udržován mezi hostiteli ptačími, savčími a klíšťaty rodu *Ixodes*. Přenos z člověka na člověka se nevyskytuje. Za hlavní epidemiologickou skupinu jsou považováni hlodavci a ptáci, neboť mají velkou roli v šíření přírodních ohnisek infekce.

Borelie pronikají do organismu pomocí přenašeče, kterým je nejčastěji klíště v jakémkoliv vývojovém stádiu. I z výkalů klíštěte pronikají borelie přes neporušenou kůži. Další způsob přenosu je při odstraňování klíštěte nechráněnou rukou, laboratorní infekce, při transfúzi krve a přenos přes placentu z matky na plod. (Havlík, 1990)

Vývojová stádia klíštěte jako jsou larvy, nymfy a dospělci sají několik dnů a po přenesení borelií do organismus projeví prolongované nebo perzistující infekce, většinou asymptomatické. (Kimmig, 2003)

Přenos je mechanickou i složitou biologickou záležitostí. Spirochéty se nachází v zažívacím traktu sajícího klíštěte a produkují vnější proteiny (OspA, B, C, D, E, F, p6, VlsE, p66), ale jen pokud je klíště nasáklé krví. OspA umožňuje adhezi spirochét k epitelovým buňkám zažívacího traktu klíštěte.

OspC dovoluje, aby spirochéty mohly opustit zažívací trakt.

Přežití spirochét v organismu je závislé na jejich neustálém množení. Prvním krokem v organismu hostitele je adherence borelií k tkáňovým strukturám. Kmeny borelií se liší přítomností adhezenčních faktorů, díky nim se můžou šířit z místa inokulace. Šíření hematogenní je méně významné než

šíření lyzogenní či tkáňové. Borelie, které neobsahují proteiny OspA a OspC jsou invazivnější. Diseminace u vnímavého hostitele trvá 2 – 4 týdny.

Borelie mají afinitu k vazivovým strukturám, kolagenním vláknům, mají schopnost aktivovat plasminogen s kaskádou fibrinolytických reakcí. Ve tkáni je přítomna zánětlivá celulóza, hlavně aktivované makrofágy produkující cytokiny TNF α , IL-1 β , IL-6 a chemotaktické substance IL-8, MCP-1. Monokiny uvolňují expresi adhezivních molekul E-selektin, VCAM-1, ICAM-1 na endotelové buňky a následným uvolňováním monocytů a granulocytů do postižené tkáně. Spirochéty mají také schopnost aktivovat komplement a tím chemotaktické a vazodilatační reakce. (Bartůněk, 2006)

Klinickým důkazem imunitní reakce jsou celkové chřipkové příznaky, erytém, stádium generalizace do orgánů a relapsy nebo chronické stadium onemocnění. Imunitní odpověď je mírná, letální případy nejsou známy.

Základní klinicko-patologickou charakteristikou vyvolavatele Bbbs je dobrá adaptace na vnitřní prostředí člověka. Patogeneze tkáňových změn u lidské infekce je z větší části neobjasněna a pravděpodobně se liší u jednotlivých forem postižení. V zásadě však lze rozlišit čtyři základní mechanismy patologického působení:

1. Množení spirochét in situ s následným poškozením vlivem zánětlivých mediátorů a komponent spirochét.
2. Imunopatologické reakce vyvolané zkříženou antigenní reaktivitou mezi spirochétou a tkáňovými antigeny za přítomnosti spirochét.
3. Imunopatologické reakce odstartované přítomností spirochét, avšak pokračující bez jejich další přítomnosti.
4. Málo definované „toxické“ reakce spojené s perzistencí agens v organismu (např. encefalopatie při pozdní neuroborelióze). (Pícha, 2006)

Tabulka 1.1 Zásadní objevy v historii lymeské boreliózy

Species	Geografické rozšíření	Vektor	Patogenita
Borrelia afzelii	Evropa, Asie	Ixodes persulcatus(Asie) Ixodes ricinus(Evropa)	Lymeská borelióza-kožní léze,ACA
Borrelia andersonni	Sev.Amerika	Ixodes dentatus	nepatogenní
Borrelia bissetti	Sev.Amerika	Ixodes pacificus,Ixodes Scapularis*,Ixodes spinipalpis**	nepatogenní
Borrelia burgdorferi	Evropa, USA	Ixodes pacificus (USA) Ixodes ricinus (Evropa) Ixodes scapularis (USA) Ixodes uriae (Švédsko)	Lymeská borelióza, Borrelia burgdorferi - artritida
Borrelia garinii	Evropa, Asie	Ixodes persulcatus (Asie) Ixodes ricinus (Evropa)	Lymeská borelióza – neurologické manifestace
Borelia japonica	Japonsko	Ixodes ovatus	nepatogenní
Borrelia lusitaniae	Evropa, Sev.Amerika	Ixodes ricinus	Patogenní?
Borrelia sinica	Čína	Ixodes ovatus	nepatogenní
Borrelia tanukii	Japonsko	Ixodes tanuki	nepatogenní
Borrelia turdi	Japonsko	Ixodes turdi	nepatogenní
Borrelia valaisiana	Evropa, Čína, Korea, Tchajwan, Japonsko	Ixodes columnae (Asie) Ixodes nipponensis (Asie) Ixodes ricinus (Evropa)	Erythema migrant, provází B.garinni
Borrelia spielmanii	Evropa	Ixodes ricinus	Lymeská borelióza-kožní léze,ACA

*- Ixodes scapularis dříve Ixodes dammini

**-Ixodes spinipalpis dříve Ixodes neotomae

(Bartůňek, 2006, Lymeská borelióza, s.25)

7. Klinické projevy

Klinické projevy lymeské boreliózy jsou velmi pestré. Mohou imitovat celou řadu různých klinických syndromů spadajících do sféry zájmů různých medicínských oborů jako je revmatologie, neurologie, dermatologie, kardiologie, psychiatrie a další. (Černý a kol., 2008)

Lymeská borelióza má časná a pozdní stádium.

Klinická stádia lymeské boreliózy:

1. stádium – časná lokalizovaná infekce

Erythema migrant (EM)

Lymphadenosis cutis (solitární lymfocytom, častý při reinfekcích)

Generalizované symptomy: chřipkový infek (přechod do stádia 2)

2. stádium – časná diseminovaná infekce

Manifestace na kůži:

Sekundární léze EM (vzácně)

Lymphadenosis cutis benigna (diseminovaný lymfocytom)

Neurologická manifestace:

Bannwartův syndrom (meningoradikuloneuritis)

Obrna mozkových nervů (především N. facialis)

Kardiální manifestace:

Karditis (tachyritmie, A-V blokáda)

Revmatologická manifestace:

Myalgie, artralgie

3. stádium – perzistující infekce (chronické postižení kolagenu)

Revmatologická manifestace:

Artritida, (myozitida)

Neurologické pozdní manifestace:

Periferní neuropatie

Progresivní encefalomyelitida

Dermatologické pozdní manifestace:

Aromadermatitis chronica atrophicans (ACA)

(Landesarbeitsgruppe Borreliose und FSME, 1999)

Inkubační doba se liší podle klinických projevů. U EM je 7 – 10 dní (rozpětí 1 – 180 dní), u desiminované časně formy 20 – 65 dní, u pozdní formy 6 – 12 měsíců i několik let. (Ticháček, 1996)

7.1. Postižení kůže

Typickým příznakem je pomalu šířící skvrna, zvaná erythema migrans (EM), která se objeví v místě přisátí klíštěte. Skvrna se kruhově zvětšuje a má většinou ohraničený lem s výbledem uprostřed. Klinicky je možné rozlišit tři základní typy EM:

- anulární – šíří se do okolí s centrálním výbledem, centrální hojení
- homogenní – nemusí se šířit do okolí, místo zůstává zarudlé
- homogenní s lemem – dva i více soustředných kruhů

Skvrna je obvykle větší než pět cm. Může se vytvořit během několika dnů po přisátí klíštěte, ale také až za několik týdnů. EM se objevuje u 70 – 80% pacientů. (Švecová, Buchvald, Opršalová, Doležalová, 2000)

Časným příznakem může být také horečka, třesavka, bolesti ve svalech, únava. Tato fáze může připomínat příznaky chřipky. (Ticháček, 1996)

Projevy EM nebolí, svědí, je citlivý na dotek a je teplejší než okolní kůže. Bez léčby vymizí do několika týdnů až měsíců, při ATB léčbě ustupují za několik dní. Boreliový lymfocytom je temně červený až modročervený uzlík velikosti 1 – 5 cm., může být doprovázen zduřením mízních uzlin. Projevuje se většinou u dětí, výjimečně u dospělých. Bývá lokalizován na ušním boltci, na špičce nosu, na dvorcí prsní bradavky a na skrotu. Lymfocytom může bez léčby trvat několik měsíců až rok. (Hercogová, 2006)

7.2. Postižení kloubů

Postižení kloubů při onemocnění lymeská borelióza se nazývá lymeská artritida (LA). Projevuje se bolestmi, které se stěhují a trvají krátkou dobu. Ataky se opakují. Patří sem i zánětlivé projevy dalších struktur pohybového aparátu. Jedná se zejména o záněty šlach a jejich pochev (tendinitidy, tandovaginitidy, tenisynovitidy), úpony vazů a šlach do kosti (enteritidy), kloubních pouzder a burs (kapsulitidy, bursitidy), svalů (myositidy). (Ticháček a kolektiv, 1996)

Projevy postižení pohybového aparátu v průběhu jednotlivých stádií lymeské boreliózy mají různý charakter a je možné je rozdělit do třech skupin:

- Artralgie – muskuloskeletární bolest bez objektivního nálezu na kloubu a jeho okolí
 - Artritida – kloubní zánět s objektivním nálezem zhrubění nebo zesílení synoviální membrány a/nebo kloubního výpotku.
 - Chronické změny kloubů a kostí pod kůží s ACA.
- (Valešová, 2007)

7.3. Postižení oka

Oční projevy boreliózy jsou velmi různorodé, mohou se objevit ve všech fázích nemoci. Konjunktivitida, episkleritida i edém víček se objevuje v časném stádiu choroby během několika dní po objevení EM. Epiteliální či stromální keratitida může vzniknout za měsíce i léta po prvních příznacích. Uveitida je popisována spíše v pozdních fázích LB jako projev imunoalergické reakce, ale může být také prvním klinickým projevem. Vzácněji se pozoruje exsudativní odchlípení sítnice, městnavá papila nebo neuropatie optiku. Prvním projevem LB mohou být i obrny, jednostranné či oboustranné postižení n. VI, méně časté je postižení n. III. a n. IV. Porucha nervu VI. Je často spojena i s lézí n. VII. (Diblík, 2006)

7.4. Postižení srdce

Lymeská karditida (LK) je označení pro postižení srdce, ke kterému dochází ve druhém stadiu boreliózy, zpravidla v odstupu dvou týdnů až pěti měsíci.

Srdeční obtíže se mohou projevit dušností a připomínat infarkt myokardu. Kardiální symptomy provázejí atrioventrikulární bloky nebo vzácněji akutní myoperikarditidu.

Klinickou manifestaci LK lze pro přehlednost vymezit do uvedených okruhů:

- Poruchy srdečního rytmu
- Perikarditida (s výpotkem nebo bez něj)
- Myokarditida (s recentním srdečním selháním nebo bez něj)
- Dilatovaná kardiopatie jako pozdní projev manifestace.

Největším diagnostickým problémem ve vyšších věkových skupinách je průkaz LK pro vysoký výskyt ICHS. V tomto kontextu je nutné upozornit na možný vliv s věkem stoupající prevalence poruch srdečního rytmu.

(Bartůnek, 2006)

7.5. Neuroborelióza

Nervové příznaky zahrnují bolesti hlavy, ztuhlost šíje, poruchy citlivosti a hybnosti, obrny, zejména lícního nervu, bolesti v zádech i v končetinách.

Symptomy kolísají a mohou trvat měsíce a přejít do chronicity. Jsou projevem aseptické meningitidy, kraniální neuritidy včetně obrn hlavových nervů, chorei, cerebrální ataxie, motorické a senzorické radikuloneuritidy, myelitidy a encefalitidy.

Neuroborelióza způsobuje poruchy nervově – svalového přenosu, poruch emocí, poruchy extrapyramidového systému a poruchy konginitivních, paměťových a exekutivních funkcí. (Bartůněk, 2006)

7.6. Postižení u dětí

Růstové, imunologické a další zvláštnosti dětského věku vedou i k rozdílům v klinické manifestaci LB. Sérokonverze u dětí je častější než klinické projevy, tím se odlišují od dospělých.

- EM se častěji vyskytuje na krku a v obličeji, únava, někdy projevy chřipky a teplotou, spontánně ustupující do 5 – 21 dní a s EM.
- Lymfocytom – vzácný, ale u dětí častější.
- ACA – asi u 10% dětí v pozdním stádiu onemocnění.
- Kloubní projevy – asi polovina dětí s prokázanou artritidou nemá žádný časný projev LB. Může přejít do chronické fáze. Klouby jsou zduřelé, bolí, jsou častěji zarudlé než u juvenilní chronické artritidy, bývá výpotek, je porušena funkce. K postižení kloubů se přidává myozitida kosterních a okohybných svalů.
- Kardiální projevy – hodně vzácné, po léčbě hned ustupují
- Neurologické projevy – bolest hlavy, výskyt slepoty jako důsledek těžké intrakraniální hypertenze, častá periferní obrna n. VII. skoro u 55% zasažených dětí
- Lymeská meningitida – jde o lymfomonocytární pleiocytózu v mozkomíšním moku, v začátcích nebývá vysoká teplota, bolest hlavy, někdy porucha soustředění, někdy obrna lícního nervu s přetrvávající disfunkcí n. VII., lepší prognóza než u jiných meningitid.
- Kongenitální LB – přenos z matky na plod, přenos protilátek IgG z matky bez klinických projevů a ani nevyžadují léčbu. EM v prvním trimestru – děti zemřeli hned po porodu s častými orgánovými malformacemi. (Hoza, 2006)

7.7. Postižení v těhotenství

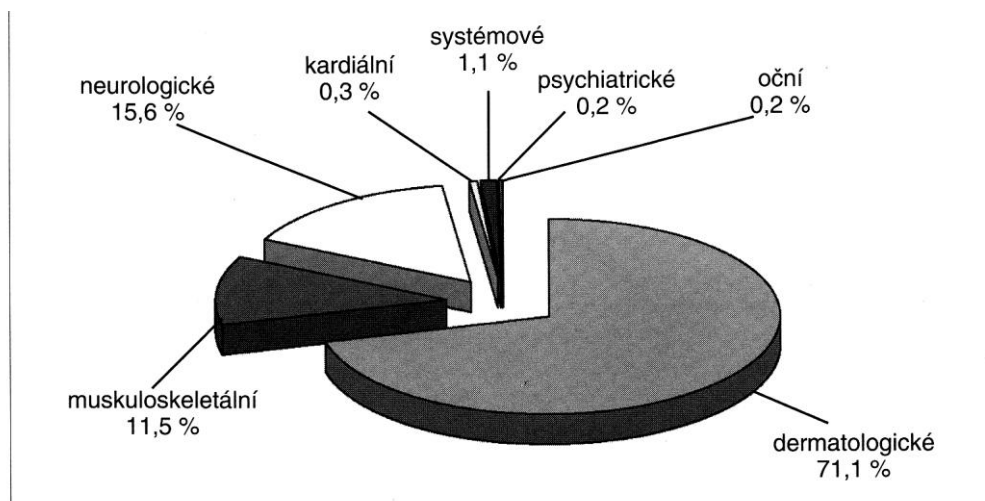
Je pravděpodobné, že v závislosti na době, kdy dojde k infekci matky, může dojít k různě závažnému ohrožení plodu. Boreliová infekce v graviditě představuje jen nízké riziko pro patologický vývoj těhotenství, pokud je adekvátně léčena ATB. Matka, která prodělala infekci v minulosti, by neměla plod ohrozit.

Pravidelné ultrazvukové vyšetření je zaměřeno na odhalení morfologických změn či rozvoj hypotrofizace plodu. V úvahu přichází i prenatální průkaz infekce plodu metodami invazivní diagnostiky.

1. Trimestr – průkaz borelií v choriových klcích
2. a 3. Trimestr – placentocentéza, amniocentéza

Po 22. týdnu gravidity – lze očekávat imunitní odpověď plodu.

(Calda, 2006)



Graf 3.12 Základní klinické projevy lymeské boreliózy v ČR v roce 2004

(Bartůněk, 2006, Lymeská borelióza, s.36)

8. Terapie

Léčba Lymeské boreliózy se odvíjí od stádia onemocnění, ve kterém se nachází. V počátečním stadiu k vaskulitickým procesům, proto stačí léčba perorální. U dětí je jiná stavba vaziva, proto také stačí perorální léčba.

ATB jsou vhodná podávat ve fázi dělení borelií, spící zárodky jsou ATB nedotčeny. Je vhodnější léčbu opakovat, než ji dlouhodobě užívat. Je dobré mít na zřeteli, že jde o systémové onemocnění, a že vymizení kožní léze nesvědčí o vyléčení choroby. Používaná ATB se nesmějí poddávkovat, nedošlo by ke zničení zárodků ve špatně přístupném místě. To může být někdy příčinou selhání terapie. (Kimmig, 2003)

Asi 80% pacientů v chronickém stadiu se dá vyléčit pomocí jednoho cyklu léčby.

Léčba určená pro jednotlivá stádia (léčba doporučená naší laboratoří):

1.stádium – lokalizovaná infekce:

Doxycyklin 2 krát denně 100 mg. perorálně po dobu tří týdnů.

Alternativou je amoxicilin (např. 3 krát 500mg. - 1g. u dospělých), případně v kombinaci s probenicidem.

Rovněž se hodí azitromycin (500 mg./3dny, pauza, 4dny, pauza – to celé 3krát opakovat).

Pro děti je vhodný amoxicilin.

2.stádium – fáze generalizace:

Cefotaxim (Claforan) 2 krát 3g. po dobu třech týdnů.

Ceftriaxon (Rocephin) 2–4 g. po dobu třech týdnů.

Rezerva: doxycyklin 2 krát 100 mg. nitrožilně po dobu 21 dní.

Azitromycin (Zithromax), Sumamed, Atithrox

3.stádium – pozdní manifestace >6 měsíců:

Cefotaxim (Claforan) 2 krát 3g. po dobu 21 dní.

Ceftriaxon (Rocephin) 4g. po dobu 21 dní.

Rezerva: doxycyklin i.v.

Makrolidy (včetně azitromycinu) nejsou v chronickém stádiu vhodné.

(Kůrková, 2011)

Projev léčby začíná tzv. Herxheimerovou reakcí organismu. Pacient má výrazné klinické projevy, které se každým dnem mění. Jednou jde např. o horečku, blednutí kůže, jiné dny zase zimnice, třes, zčervenání v obličeji, postupně bolesti kloubů, hlavy, svalů, . . .atd. Během léčby se mohou objevit záněty kloubů. Pokud k Herxheimerově reakci nedojde, byla zřejmě špatně zvolená diagnóza. Alergie na danou léčbu jsou vzácné.

Každé tři měsíce po dokončení léčby by mělo dojít ke kontrole pacienta jak klinicky, tak i sérologicky. K recidivám nemoci může dojít i po téměř dvou letech, způsobené zřejmě „spícími zárodky“ v kolagenech. Při dlouhodobé péči o pacienta dochází ke změně symptomů.(Kimmig, 2003)

9. Prevence

Jako nejlepší způsob prevence jako u řady jiných onemocnění by byla očkovací látka. Bohužel do dnešní doby není k dispozici vakcína proti borelióze, která by se mohla použít na lidi. Zbývá jen se pečlivě chránit při pohybu v přírodě před klíšťaty. Největší riziko samozřejmě číhá v endemických oblastech, tam je dobré být opravdu na pozoru. (Daniel, 2007)

Je to „vystavení účinku u obyvatel nebo u návštěvníků endemické oblasti na více než 30 dní před vznikem EM nebo na více než jeden rok před projevy pozdní manifestace lymeské boreliózy. Endemická oblast je přitom chápána jako oblast s rizikem lymeské boreliózy podporovaným buď přítomností ustáleného vektoru (přenašeče *Borrelia burgdorferii sensu lato*), nebo výskytem minimálně třech případů onemocnění lidí“. (Bartůněk, 2006)

Míra rizikovosti záleží také na délce pobytu v přírodě, tím jsou vystaveni hlavně lidé pracující v přírodě jako jsou lesní dělníci, myslivci, zemědělci a další skupinou jsou lidé trávící dlouho volný čas v přírodě, to jsou turisté, děti v letních táborech, dovolené, ...atd.

K ochraně před klíšťaty je nutné dodržovat určitý režim:

- Zakryta co největší část těla, dlouhé kalhoty, vyšší boty
- Použití repelentů, hlavně na spodní část těla, boty
- V přírodě se vyhýbat rizikovým oblastem, okraje listnatých lesů, vysoké trávy, křoviny
- Po návratu z přírody je vhodné zkontrolovat celé tělo, zda není klíště přisáto (může být přisáto i ve vlasech)
- Je dobré se vždy raději umýt
(Ticháček, 1996)

Při zjištění přisátého klíštěte, je dobré dodržet tyto pokyny:

- Nečekáme, až se klíště nasaje krví, odstraníme ho co nejdříve.
- Nejprve místo, kde je klíště přisáto vydezinfikujeme dezinfekčním roztokem jako je Jodisol, Septonex, Betadine tct. nebo 3% roztokem jodové tinktury.

- K odstranění klíštěte je dnes vhodné si pořídit speciální pinzetu na klíšťata, krouživým pohybem odstraníme klíště.
- Je důležité dávat pozor, aby se klíště nepřetrhlo, nerozdrtilo.
- Nikdy na klíště nesaháme nechráněnou rukou.
- Znovu vydezinfikujeme místo stejným dezinfekčním roztokem.
- Postižené místo pečlivě sledujeme až několik týdnů.
- V případě, že místo po klíštěti bude zarudlé nebo se bude zdát jinak podezřelé, vždy raději vyhledáme lékaře. (Bartůněk, 2006)

10. Epidemiologická situace

Mírné pásmo severní polokoule patří mezi nejčastější oblast, kde dochází k šíření lymeské boreliózy přenášená členovci, v Evropě především klíštětem rodu *Ixodes ricinus*.

Onemocnění má svoji historii, ale největší rozvoj poznatků po stránce mikrobiologické a epidemiologické byl v roce 1982.

Bbsl zahrnuje řadu species. *Bbss* je odlišná od ostatních borelií. Za původce, které způsobují onemocnění lymeská borelióza jsou považovány *Bbss*, *Borrelia garinii*, *Borrelia afzelii*, *Borrelia valaisiana* a *Borrelia spielmanii*. Rozdělení na jednotlivé druhy má i klinický význam. Členění kmenů je podle povrchových antigenů OspA a OspC a jejich serotypů. (Wilske)

Ani v Evropě není rovnoměrné rozdělení kmenů, např. *Borrelia garinii* způsobující neurologické projevy se vyskytují hlavně v západní Evropě, ve střední Evropě a ve Skandinávii převažuje *Borrelia afzelii*.

Hlavním rezervoárem infekce jsou hlodavci, hmyzožravci, ptáci, divoce žijící obratlovci a klíšťata rodu *Ixodes ricinus* komplex, ale i jiné druhy klíšťat. U komárů, blech a jiného hmyzu nebyl přenos jednoznačně prokázán.

(Göpfertová, Pazdiora, Dáňová, 2006)

EM je společným klinickým projevem všech patogenních druhů v počátečním stádiu. *Bbsl* vyvolává u skotu, psů, koní podobné symptomy jako u člověka.

V české republice dominuje onemocnění lymeská borelióza v četnosti výskytu z onemocnění přenášenými klíšťaty. Česká republika je svým geografickým charakterem velmi vhodným biotopem pro výskyt klíštěte rodu *Ixodes ricinus*.

Od roku 1986 je lymeská borelióza zařazena mezi infekce, které je povinné hlásit hygienickým stanicím. Počet hlášení postupně stoupá s rozvojem laboratorní i klinické diagnostiky. V roce 1995 bylo nejvíce hlášených pacientů s touto infekcí (61,5/100 000 obyvatel) související i se zvýšeným výskytem infikovaných klíšťat. Nejvíce hlášení bylo zaznamenáno ve středočeském,

pardubickém a karlovarském kraji. Velké výkyvy hlášení lymeské boreliózy bylo v jihočeském kraji. (Bartůněk, 2006)

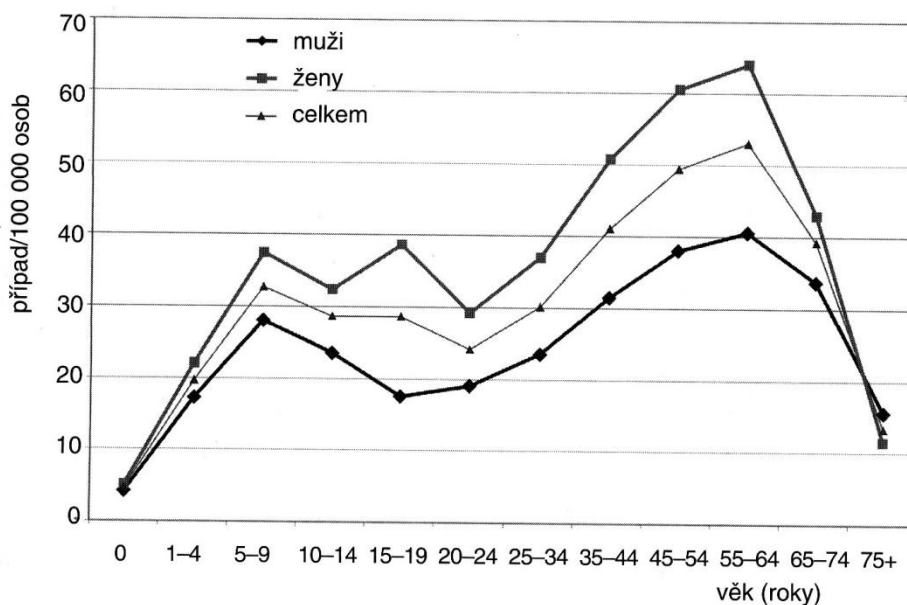
Vysoká možnost získání infekce je v oblastech spíše s nižší nadmořskou výškou v okolí vodních toků.

Lymeská borelióza je nákaza s přírodní ohniskovostí. Vykazuje sezónní výskyt a je závislá na mikroklimatu ovlivňující aktivitu vývojových stádií klíšťat i chování lidí v přírodě. (CEM, 2004)

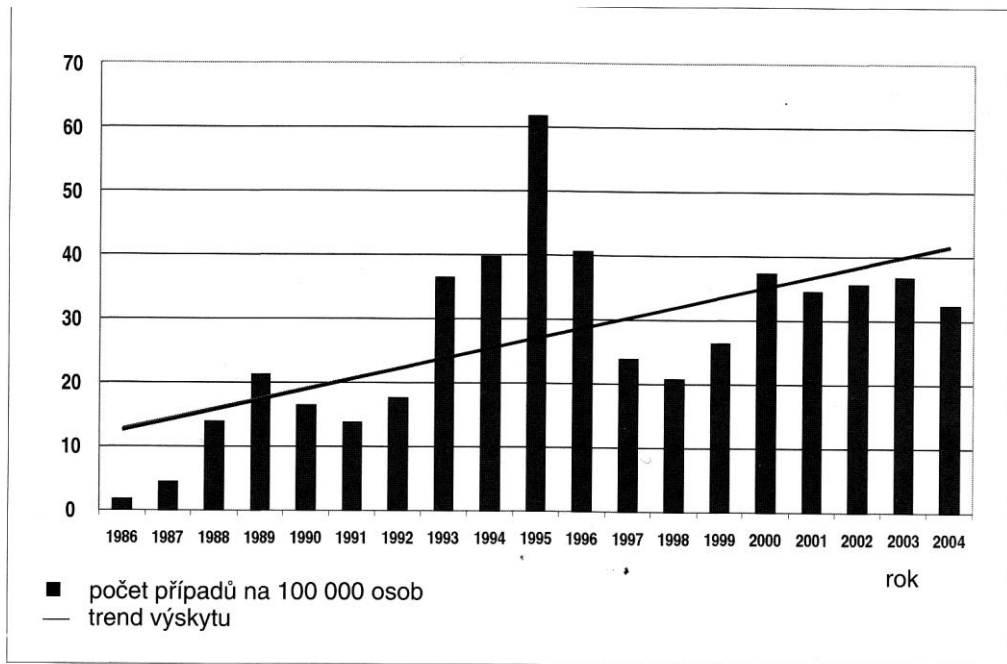
Lymeská borelióza postihuje všechny věkové kategorie, nejvýraznější interval vzestupu je od 30. roku života a horní hranice je 49 let. Vnímavější k naze jsou ženy. Vnímavost je všeobecná, vyskytují se reinfekce i asymptomatické infekce. U 10% zdravé populace se vyskytují antiboreliové protilátky IgG bez klinických příznaků (Bartůněk, 2006).

Očkovací látka z evropských druhů je zatím bohužel ve vývoji.

Epidemiologická situace v České republice

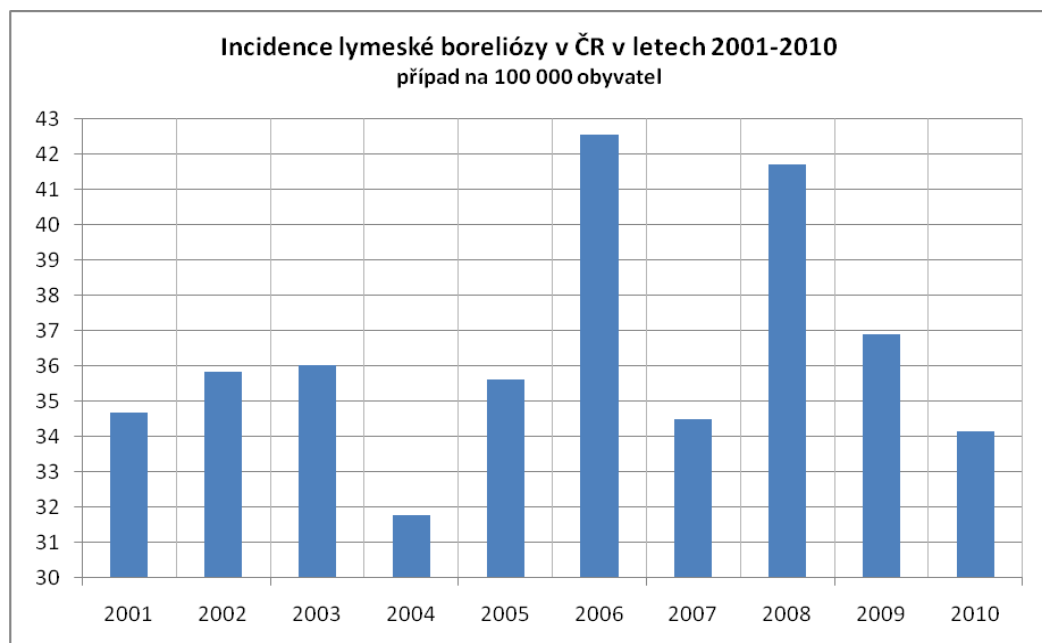


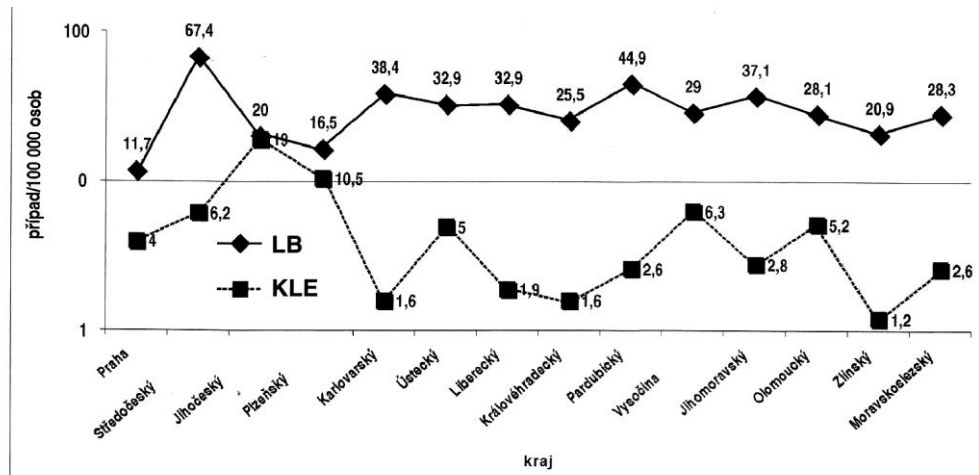
Srovnání počtu nakažených případů dle věku a pohlaví v roce 2006. (Bartůněk, 2006, Lymeská borelióza, s.39)



Graf 3.5 Incidence lymeské boreliózy v České republice v letech 1986–2004

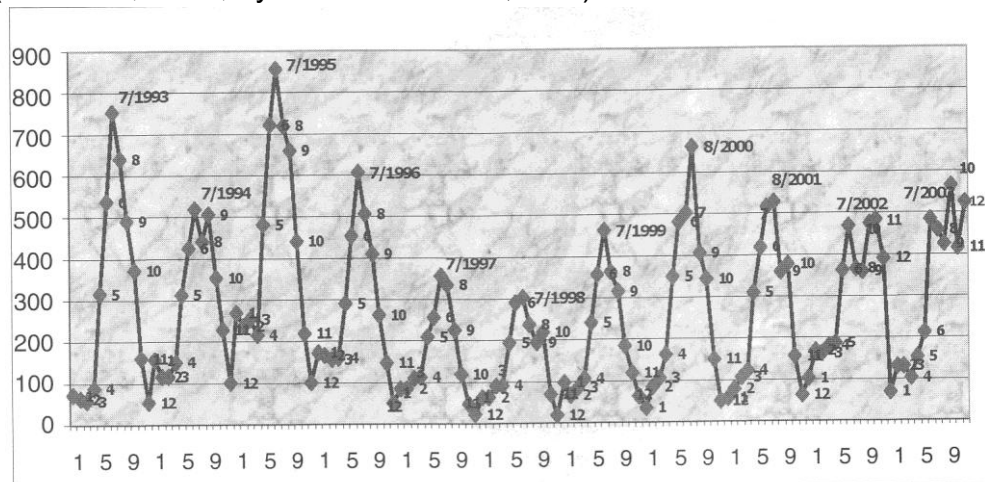
(Bartůněk, 2006, Lymeská borelióza, s.31)





Graf 3.6 Incidence lymeské boreliózy (LB) a klíšťové encefalitidy (KLE) v ČR v r. 2004 podle krajů

(Bartůněk, 2006, Lymeská borelióza, s.32)



Graf 3.7 Sezónnost výskytu lymeské boreliózy v ČR v letech 1993–2003

(Bartůněk, 2006, Lymeská borelióza, s.34)

Z hlediska zoologie patří klíšťata k pavoukovcům, mají ve stádiu dospělosti osm končetin. V podrobnějším dělení spadají do třídy roztočů.

Uchycení klíštěte je tak pevné, že zvíře není schopno samo se ho zbavit. Při vlastním sání vyměšují klíšťata sliny, které se dostávají do rány. Délka sání je rozdílná. V každém vývojovém stádiu saje klíště jen jedenkrát a na jednom hostiteli. Klíště rodu *Ixodes* se nazývá „tříhostitelské“. Každé vývojové stádium larva, nymfa, imago (dospělec) saje krev na odlišném hostiteli. Larvy a nymfy preferují malé hlodavce a ptáky, dospělci primárně sají na větších savcích včetně domácích zvířat. Plně nasáté samičky se podobají zralým semenům Ricinus (ricínu).

Všetchna vývojová stádia se stávají infekčními po ingesci spirochét v průběhu sání krve na infikovaných savcích nebo ptácích. Během metamorfózy klíštěte přechází infekce postupně z jednoho stádia na druhé.
(Kimmig, 2000)

11. Diskuse

V naší mikrobiologické laboratoři provádějí metodou ELISA – vyšetření antiboreliových protilátek laborantky. Samy si připravují vzorek, všechny potřebné roztoky, standardy a komponenty dodané v testovací soupravě. Používáme soupravu od firmy EUROIMMUN. Metoda je provedena dle přidaného pracovního návodu.

Po dokončení metody laborantky předávají lékařům získané výsledky a ti je vyhodnocují. V případě pozitivních nebo hraničních hodnot konzultují další postup, buď další kontrolní vyšetření s časovým odstupem nebo přímo ATB léčba.

Z grafu „Epidemiologická situace v ČR. (Bartůněk, 2006, Lymeská borelióza, s.39)“ je vidět, že do devátého roku dochází k poměrně strmému nárůstu hlášených případů lymeské boreliózy. Je to pravděpodobně dáno pobytem této věkové kategorie v přírodě. Rovněž ve středním věku dochází k dalšímu nárůstu zhruba do šedesáti let. Předpokládám, že příčina je obdobná jako v nižší věkové kategorii s tím, že muži zcela nepochybně tráví více času v přírodě v souvislosti se svými volnočasovými aktivitami (rybaření, lov, turistika, houbaření).

Incidence LB v ČR v r. 1986-2004. (Bartůněk P., Lymeská borelióza, 2006, s.31) V tomto grafu vystihuje období, kdy vyšetřovací metody na lymeskou boreliózu byly velmi žádané v souvislosti s medializací lymeské boreliózy a hlášení pozitivních případů hygienickým stanicím se stalo povinné.

Incidence lymeské boreliózy a klíšťové encefalidity v ČR v r. 2004 podle krajů (Bartůněk, 2006, Lymeská borelióza, s.32). Ze srovnání obou nejčastějších onemocnění přenášených klíšťaty u nás je zřejmé, že počet případů lymeské boreliózy je vyšší. Je to dáno tím, že proti klíšťové meningoencefalitidě existuje očkovací látka.

Sezonní výskyt LB v letech 1993 – 2003 (Bartůněk, 2006, Lymeská borelióza, s.34) Na grafu jsou vidět období, kdy lidé tráví většinu času v přírodě a klíšťata mají také své období a aktivity.

12. Závěr

V mé práci jsem se zaměřila na celkovou problematiku onemocnění lymeská borelióza. U nás patří k nejrozšířenějším antropozoonózám přenášené klíštětem rodu *Ixodes ricinus*.

Zjistila jsem, že díky včasné diagnostice tohoto onemocnění a prevenci, lze předejít mnoha zdravotním komplikacím, které tato choroba může způsobit. Zjišťovala jsem průběh onemocnění, jeho klinické příznaky, možnosti léčby, preventivní postupy zajišťující snížení rizika nákazy a patogenezi onemocnění.

Hlavně jsem se zaměřila na původce nemoci, tím jsou *Borrelia burgdorferii sensu stricto*, *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. spielmanii*, na její morfologii, růst, odlišnosti a laboratorní metody, kterými se dá tento patogen odhalit. Jde o přímý a nepřímý průkaz. Nejběžnějšími testy používanými v laboratorní praxi je vyhledávací test ELISA a konfirmační test Western blot.

Diagnostika onemocnění se opírá o výsledky těchto testů v kombinaci s klinickými projevy pacienta.

Pro časnou fázi tohoto onemocnění je typické EM a výrazné zvýšení IgM protilátek. Inkubační doba je přibližně 2 – 3 týdny.

Podle vyšetření se dá určit, o jaké stádium onemocnění se jedná a podle toho zvolit vhodnou léčbu ATB.

U této nemoci platí, že pokud se včas neodhalí nebo je přehlédnuta, dostává se do chronické fáze, dochází k trvalým obtížím.

Lymeská borelióza vyžaduje stále pozornost, neboť přetrvávající potíže nemocné omezuje ve všech oblastech života.

PŘÍLOHY

BSK (Barbourovo-Stoennerovo-Kellyho) živná půda – použití ke kultivaci *Borrelia burgdorferii*. Jde o syntetický základ, který se musí doplnit peptonem, kvasničným extraktem a bovinním sérovým albuminem, příp. ještě králičím sérem.(Votava, 1999)

Giemsa – Romanowski roztok – použití k barvení krevních nátěrů k průkazu parazitů, spirochét, mykoplasmat, rickettsií a chlamydií. Rztok obsahuje metanol, je toxický při vdechnutí a při styku s kůží. Uchovává se při laboratorní teplotě, v kryté kyvetě.

K barvení se používá v ředění: 1 díl roztoku Giemsa-Romanowski (před použitím nutno přefiltrovat) a 9 dílů fosfátového pufru (pH 6,7 – 6,8)
(Votava, 2010)

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ACA	acromaderntis chronika atrophicans
ATB	antibiotika
Bbsl	Borrelia burgdorferi sensu lato
Bbss	Borrelia burgdorferi sensu scripto
BSK	Barbourova – Stoenerova – Kellyho půda
CNS	centrální nervový systém
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ELISA	Enzyme – Linked Immuno Sorbent Assay
ELM	elektronoptický mikroskop
EM	erythema migrans
ICAM	adhezní molekula
ICHS	ischemická choroba srdeční
IFA	imunofluorescence
Ig	imunoglobulin
IL	interleukin
ISEM	imunosorbentní elektronová mikroskopie
LA	lymeská artritida
LB	lymeská borelióza
LK	lymeská karditida
Osp	outer surface proteins
p	protein
TNF α	tumor nekrotizující faktor α
VCAM	adhezivní molekula
VDRL	Veneral Disease Research Laboratory
VisE	antigen – variabilní systém
WB	Western blot

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Daniel P. Stites, ABBA I. Terr. Základní a klinická imunologie. VICTORIA PUBLISHING, a.s., 1994, 715 s., ISBN 80-85605-37-6

Petr Bartůněk a kolektiv. Lymeská borelióza. 3.vydání, Grada Publishing, a.s., 2006, 120 s., ISBN 80-247-1543-0

B. Ticháček. Manuál prevence v lékařské praxi. Fortuna, Praha 1996, 125 s., ISBN 80-7168-400-7

Zdeněk Černý kolektiv autorů. Infekční nemoci. 2.vydání, Národní centrum ošetřovatelství a nelékařských zdravotnických oborů, Brno 2008, 284 s., ISBN 978-80-7013-480-1

Peter Kimmig, Klíšťata. PRAGMA, 2003, 109 s., ISBN 80-7205-881-9

Jiří Havlík, Infektologie. 2. vydání, Avicenum, 1990, 377 s., ISBN 08-062-90

Dana Göpfertová, Petr Pazdiora, Jana Dáňová, Epidemiologie, 1.vydání, Karolinum, 2006, ISBN 80-246-1232-1

Miroslav Pecka, Praktická hematologie, skripta UK FF Hradec Králové

Miroslav Votava, Lékařská mikrobiologie obecná, Neptun, 2001, ISBN 80-902896-2-2

Miroslav Votava a kolektiv, Lékařská mikrobiologie vyšetřovací metody, Neptun, 2010, ISBN 978-80-86850-04-8

Miroslav Votava, Kultivační půdy v lékařské mikrobiologii, 1.vydání, HORTUS, 2000, ISBN 80-238-5058-X

Zprávy centra epidemiologie a mikrobiologie: Státní zdravotní ústav Praha,
2004-12, ISSN 1211-7358

Zprávy centra epidemiologie a mikrobiologie: Státní zdravotní ústav Praha,
2000/12, ISSN 1211-7358

Epidemiologie, mikrobiologie, imunologie. Časopis společnosti pro epidemiologii
a mikrobiologii. Česká lékařská společnost J. E. Purkyně, 2000/08, ISSN 1210-
7913

Joseph J. Burrascano, Pokročilá témata v lymfické nemoci [online]. 2008/10,
http://www.ilads.org/lyme_disease/B_guideline_12_17_08.pdf

Návod na provedení testu, Anti- Borrelia plus VlsE ELISA (IgG/ IgM),
EUROIMMUN, EI 2132-9601-2 G

Šimůnek T., přednáška Izolace DNA – molekulární biologie, UK FaF HK

Osobní rozhovor

MUDr. Kůrková Věra (2011): [Pers. kom.], 21.4.2011