

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**  
**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**  
**Katedra biologických a lékařských věd**

**POROVNÁNÍ VÝSLEDKŮ DVOU METOD LABORATORNÍ**  
**DIAGNOSTIKY LYMESKÉ BORRELIÓZY – METODY**  
**PCR A ELISA**

**Diplomová práce**

**Studijní program: Zdravotnická bioanalýtika**  
**Studijní obor: Odborný pracovník v laboratorních metodách**

**Bc. Radka Vargová**  
**Vedoucí diplomové práce: Ing. Lucie Křivčíková**  
**Konzultant: Mgr. Petra Kučerová**

Hradec Králové 2012

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAHE**  
**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**  
**Katedra biologických a lékařských věd**

**POROVNÁNÍ VÝSLEDKOV DVOCH METÓD LABORATORNEJ  
DIAGNOSTIKY LYMESKEJ BORRELIÓZY – METÓDY  
PCR A ELISA**

**Diplomová práce**

**Študijný program: Zdravotnícka bioanalýtika**  
**Študijný odbor: Odborný pracovník v laboratorných metódach**

**Bc. Radka Vargová**  
**Vedúci diplomovej práce: Ing. Lucie Křivčíková**  
**Konzultant: Mgr. Petra Kučerová**

Hradec Králové 2012

## Abstrakt

Bc. Radka Vargová

Porovnání výsledků dvou metod laboratorní diagnostiky lymeské borreliózy – metody PCR a ELISA

Diplomová práce

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Odborný pracovník v laboratorních metodách

V současnosti představuje lymeská borrelióza poměrně rozšířené onemocnění. Jejím původcem je spirocheta *Borrelia burgdorferi* sensu lato a nejvýznamnějším přenašečem v Evropě je klíště *Ixodes ricinus*.

V teoretické části své diplomové práce jsem popsala základní charakteristiky rodu *Borrelia*, jejich antigenní strukturu, epidemiologii a patogenezí, přenašeče onemocnění, klinické příznaky samotné infekce a možnosti laboratorní diagnostiky.

Má diplomová práce je zaměřená na porovnání diagnostiky lymeské borreliózy pomocí serologické metody ELISA a pomocí PCR. Na analýzu bylo použito 113 anonymizovaných vzorků pacientů, kteří byli vyšetřeni na přítomnost protilátek proti borreliím třídy IgG a IgM a metodou real-time PCR na přítomnost DNA patogenních borrelií.

Experimentální část uvádí převedení jednotlivých metodik, které jsme použili pro diagnostiku lymeské borreliózy.

V části výsledků je uvedena skutečnost, že při detekci DNA borrelií byl zaznamenán jen jeden pozitivní výsledek (celková pozitivita 0,88%). Vyšetření hladin protilátek ukázalo, že pozitivita v třídě IgG u mužů byla 25,45% a u žen 20,69%. V třídě IgM to bylo u mužů 9,09% a u žen 3,45%.

Diskuze a závěr uvádějí porovnání výsledků s odbornou literaturou.

Klíčová slova: *Borrelia burgdorferi*, ELISA, PCR, lymeská borrelióza

## Abstrakt

Bc. Radka Vargová

Porovnanie výsledkov dvoch metód laboratórnej diagnostiky lymeskej borreliózy – metódy PCR a ELISA

Diplomová práca

Univerzita Karlova v Prahe, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Odborný pracovník v laboratórných metódach

V súčasnosti predstavuje lymeská borrelióza pomerne rozšírené ochorenie. Jeho pôvodcom je spirochéta *Borrelia burgdorferi* sensu lato a najvýznamnejším prenášačom v Európe je kliešť *Ixodes ricinus*.

V teoretickej časti mojej diplomovej práce som opísala základné charakteristiky rodu *Borrelia*, ich antigénnu štruktúru, epidemiológiu a patogenézu, prenášačov ochorenia, klinické príznaky samotnej infekcie a možnosti laboratórnej diagnostiky.

Moja diplomová práca je zameraná na porovnanie diagnostiky lymeskej borreliózy pomocou serologickej metódy ELISA a pomocou PCR. Na analýzu bolo použitých 113 anonymizovaných vzoriek pacientov, ktoré boli vyšetrené na prítomnosť protilátok proti borreliám v triede IgG a IgM a metódou real-time PCR na prítomnosť DNA patogénnych borrelií.

Experimentálna časť uvádza prevedenie jednotlivých metodík, ktoré sme použili pre diagnostiku lymeskej borreliózy.

Vo výsledkovej časti je uvedená skutočnosť, že pri detekcii DNA borrelií bol zaznamenaný len jeden pozitívny výsledok (celková pozitivita 0,88 %). Vyšetrenie hladín protilátok ukázalo, že pozitivita v triede IgG u mužov bola 25,45 % a u žien 20,69 %. V triede IgM to bolo u mužov 9,09 % a u žien 3,45 %.

Diskusia a záver uvádzajú porovnanie výsledkov s odbornou literatúrou.

Kľúčové slová: *Borrelia burgdorferi*, ELISA, PCR, lymeská borrelióza

## **Abstract**

Bc. Radka Vargová

Comparison of results of two methods for laboratory diagnosing Lyme borreliosis – PCR methods and ELISA

Diploma thesis

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Specialist in laboratory methods

At present time the Lyme disease is relatively wide-spread affection. Its agent is spirochete *Borrelia burgdorferi* sensu lato and its most eminent vector in Europe is the tick *Ixodes ricinus*.

In the theoretical part of my thesis I described the basic characteristics of the genus *Borrelia*, its antigenic structure, epidemiology and pathogenesis, disease vectors, clinical symptoms of the infection and possibilities of laboratory diagnostics.

My thesis is aimed at comparison of diagnostics of Lyme disease by using serological method ELISA and using method PCR. It was used 113 anonymized samples of patients for analyse. The samples were examined for the presence of the antibody against *Borrelia* in classes IgG and IgM and by using real-time PCR method they were examined for the presence of DNA pathogenic *Borrelia*.

The experimental part of the thesis describes realization of the methods, which we have used for diagnostics of Lyme disease.

In the results part is claimed that we noticed only one positive result within detection of *Borrelia* DNA (total positivity 0,88%). The antibody level examination showed that positivity in the class IgG for males was 25,45% and for females 20,69%. In the class IgM the values were 9,09% for males and 3,45% for females.

Discussion and summary state comparisons of our results and literature.

Key words: *Borrelia burgdorferi*, ELISA, PCR, Lyme disease

## **Čestné vyhlásenie**

Prehlasujem, že táto diplomová práca je mojím pôvodným autorským dielom a všetky myšlienky, údaje a ich zdroje, z ktorých som pri spracovaní čerpala, riadne citujem. Práca nebola použitá pre získanie rovnakého alebo iného kvalifikačného titulu.

Hradec Králové, 30. 4. 2012

.....  
*podpis*

## **Pod'akovanie**

Touto cestou by som sa chcela pod'akovať Mgr. Petre Kučerovej za odborné vedenie, cenné rady a pripomienky, ktoré mi poskytla pri spracovaní tejto diplomovej práce. Moje pod'akovanie patrí taktiež Ing. Lucii Křivčikovej, ktorá sa ujala úlohy vedúcej diplomovej práce. Veľká vďaka patrí aj mojej rodine a priateľom za ich neustálu podporu.

# Obsah

Zoznam obrázkov.....	9
Zoznam tabuliek.....	10
Zoznam skratiek.....	11
ÚVOD, ZADANIE A CIEĽ PRÁCE.....	13
1 LYMESKÁ BORRELIÓZA.....	14
1.1 História lymeskej borreliózy.....	14
1.2 Charakteristika <i>Borrelia burgdorferi</i> .....	16
1.2.1 Všeobecné informácie o rode <i>Borrelia</i> a <i>Borrelia burgdorferi</i> .....	16
1.3 Epidemiologické charakteristiky ochorenia.....	21
1.3.1 Prenos ochorenia.....	21
1.3.2 Incidencia borreliózy.....	24
1.4 Patogenéza ochorenia.....	25
1.5 Imunitný systém a <i>B. burgdorferi</i> .....	27
1.6 Klinické prejavy.....	27
1.6.1 Prvé štádium – štádium včasnej lokalizovanej infekcie.....	29
1.6.2 Druhé štádium – štádium včasnej diseminovanej infekcie.....	30
1.6.3 Tretie štádium – štádium neskorej (chronickej) infekcie.....	33
1.7 Liečba LB.....	36
1.8 Laboratórna diagnostika lymeskej borreliózy.....	37
1.8.1 Metódy priame.....	38
1.8.2 Metódy nepriame.....	45
2 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ.....	52
2.1 Výber pacientov a vyšetřovaný materiál.....	52
2.2 Vyšetřenie vzoriek biologického materiálu na prítomnosť protilátok proti <i>B. burgdorferi</i> sensu lato metódou ELISA.....	52
2.2.1 Princíp testu.....	52
2.2.2 Zloženie diagnostickej súpravy.....	53
2.2.3 Pracovný postup.....	55
2.2.4 Validita testu a interpretácia výsledkov.....	55
2.3 Detekcia DNA borrelií pomocou real-time PCR.....	58
3 VÝSLEDKY.....	60
3.1 Súhrnné výsledky vyšetření metódou ELISA a PCR u žien.....	60
3.1.1 Výsledky vyšetření IgG a IgM protilátok metódou ELISA u žien.....	62
3.1.2 Výsledky PCR vyšetřenia u žien.....	63
3.2 Súhrnné výsledky vyšetření metódou ELISA a PCR u mužov.....	63
3.2.1 Výsledky vyšetření IgG a IgM protilátok metódou ELISA u mužov.....	65
3.2.2 Výsledky PCR vyšetřenia u mužov.....	66
4 DISKUSIA A ZÁVER.....	67
5 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY.....	74



## **Zoznam obrázkov**

Obrázok 1: <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato.....	18
Obrázok 2: <i>Ixodes ricinus</i> – Kliešť obyčajný.....	23
Obrázok 3: Počet ochorení lymeskou borreliózou v Českej republike v roku 2011.....	24
Obrázok 4: <i>Erythema migrans</i> .....	30
Obrázok 5: <i>Acrodermatitis chronica atrophicans</i> na dolných končatinách.....	34

## Zoznam tabuliek

Tabuľka 1: Interpretácia výsledkov vyšetrenia sér, plaziem a likvorov (IgG).....	56
Tabuľka 2: Interpretácia výsledkov založená na porovnaní IP nameraných pri dvoch rôznych riedeniach vzorky (IgG).....	57
Tabuľka 3: Interpretácia výsledkov vyšetrenia sér, plaziem a likvorov (IgM).....	58
Tabuľka 4: Interpretácia výsledkov založená na porovnaní IP nameraných pri dvoch rôznych riedeniach vzorky (IgM).....	58
Tabuľka 5: Výsledky vyšetrenia metódou ELISA a PCR u žien.....	60
Tabuľka 6: Vyšetrenie materiálu metódou ELISA IgG u žien.....	62
Tabuľka 7: Vyšetrenie materiálu metódou ELISA IgM u žien.....	62
Tabuľka 8: Vyšetrenie materiálu metódou PCR u žien.....	63
Tabuľka 9: Výsledky vyšetrenia metódou ELISA a PCR u mužov.....	63
Tabuľka 10: Vyšetrenie materiálu metódou ELISA IgG u mužov.....	65
Tabuľka 11: Vyšetrenie materiálu metódou ELISA IgM u mužov.....	66
Tabuľka 12: Vyšetrenie materiálu metódou PCR u mužov.....	66

## Zoznam skratiek

Ab	Antibody
Ag	Antigen
Arp	Arthritis-related Protein
ATB	Antibiotiká, antibiotická liečba
<i>B.</i>	<i>Borrelia</i>
Bdr	Borrelia Direct Repeat
BHQ	Black Hole Quencher
BSK	Barbour-Stoener-Kelly médium
cDNA	Complementary Deoxyribonucleic Acid
CNS	Centrálny nervový systém
CSF	Cerebrospinal fluid – mozgomiechový mok
CRASPs	Získané regulačné povrchové proteíny komplementu
CRP	C-reaktívny proteín
ČR	Česká republika
dATP	Deoxyadenosine Triphosphate
Dbp	Decorin Binding Protein
dCTP	Deoxycytidine Triphosphate
dGTP	Deoxyguanosine Triphosphate
DNA	Deoxyribonucleic Acid
dTTP	Deoxythymidine Triphosphate
EBV	Epstein-Barrovej vírus
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FAM	6-karboxyfluorescein
FlaA	Vonkajší flagelový obal – proteín
HEX	Hexachloro-fluorescein
HLA	Human Leukocyte Antigen
HsP	Heat Shock Protein
<i>I.</i>	<i>Ixodes</i>
IC	Inhibičná kontrola
IFA	Nepriama imunofluorescencia
Ig	Imunoglobilín
IL	Interleukín
IP	Index pozitivity

ISEM	Imunosorbentná elektrónová mikroskopia
JOE	4,5-dichloro-dimethoxy-fluorescein
MRI	Magnetic resonance imaging, magnetická rezonancia
NK	Negatívna kontrola
NS	Nervový systém
Osp	Outer Surface Protein
PCR	Polymerase Chain Reaction
PK	Pozitívna kontrola
qPCR	Kvantitatívna PCR
rDNA	Ribosomal Deoxyribonucleic Acid
RNA	Ribonucleic Acid
rRNA	Ribosomal Ribonucleic Acid
SPECT	Single Photon Emission Computed Tomography, tomografická scintigrafia
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TMB	Tetrametylbenzidín
TNF	Tumor Necrosis Factor
UV	Ultraviolet
VKK	Vnútoraná kontrola kvality
VlsE	Variable major protein-Like Sequense
WB	Western Blot

# ÚVOD, ZADANIE A CIEĽ PRÁCE

Lymeská borrelióza je multiorgánové infekčné ochorenie, ktorého pôvodcom je baktéria, spirochéta, z komplexu *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Najvýznamnejším vektorom nákazy v našich klimatických podmienkach je kliešť *Ixodes ricinus*, ktorý sa infikuje saním krvi na nakazenom zvierati. K prenosu infekcie na človeka dochádza, ak je kliešť prisatý na tele viac ako 24-36 hodín. Ochorenie sa prejavuje rozmanitými klinickými príznakmi, pričom niektoré z nich sú pre nákazu typické, zatiaľ čo iné môžu pri nesprávnom posúdení viesť k diagnostickým omylom. Stanovenie diagnózy lymeskej borreliózy si vyžaduje starostlivé posúdenie anamnestických údajov, klinických príznakov a samozrejme výsledkov laboratórných vyšetrení, ktoré môžu diagnózu potvrdiť alebo vylúčiť. Práve v laboratórnej diagnostike tohto komplexného ochorenia je často veľa nejasností, ktoré predstavujú výzvu na zlepšovanie diagnostických postupov a metódik.

Laboratórna diagnostika lymeskej borreliózy je založená predovšetkým na serologických vyšetreniach so stanovením hladín protilátok v triede IgG a IgM. Ich hodnoty sa menia v priebehu ochorenia v závislosti na fáze. Odpoveď každého organizmu je variabilná, závislá od virulencie patogéna, imunokompetencie pacienta, prípadne účinku podanej antibiotickej terapie.

Ďalšou pomerne rozšírenou diagnostickou metódou lymeskej borreliózy je polymerázová reťazová reakcia (PCR), ktorá slúži detekciu DNA borrelií v klinických vzorkách. Polymerázová reťazová reakcia má rôzne modifikácie, pri detekcii borreliovej DNA sú najpoužívanejšie real-time PCR a nested PCR. Úspešnosť zachytenia bakteriálnej DNA vo vzorke sa pohybuje vo veľmi širokom rozmedzí a závisí od množstva faktorov.

Cieľom mojej diplomovej práce je zhodnotiť možnosti diagnostiky lymeskej borreliózy uvedenými metódami a porovnať výsledky dosiahnuté v našej analýze s odbornou literatúrou.

# 1 LYMESKÁ BORRELIÓZA

## 1.1 História lymeskej borreliózy

Historicky prvá zmienka o lymeskej borrelióze pochádza z roku 1883, kedy dermatológ Alfred Buchwald uviedol opis „difúznej idiopatickej kožnej atrofie“, ktorý sa považuje za prvú zmienku o *acrodermatitis chronica atrophicans*, aj o lymeskej borrelióze ako takej.

Pomenovanie ochorenia „*acrodermatitis chronica atrophicans*“ použili v roku 1902 Herxheimer a Hartmann. Na základe pozorovania na ďalších pacientoch uviedli, že kožné zmeny sa vyvíjajú v čase, cez zápalovú fázu až k fáze atrofickej.

Neskoršie pozorovania ukázali okrem kožných zmien aj postihnutie iných orgánov. Práve kĺbne prejavy, ktoré prebiehali spoločne s akrodermatitídou, upútali množstvo autorov. Ehrmann a Fackenstein v roku 1925 pozorovali u niekoľkých pacientov artralgie pred rozvojom *acrodermatitis chronica atrophicans*. Nálezom však nevenovali potrebnú pozornosť. Pre ďalšie znalosti o *acrodermatitis chronica atrophicans* mala však veľký význam ich štúdia, v ktorej ich zaujala podobnosť medzi histologickými obrazmi v priebehu syfilisu a *acrodermatitis chronica atrophicans* [1, 2].

Prvé informácie o neurologických prejavoch priniesli v roku 1922 Garin a Bujadoux, ktorí opisovali prípady lymfocytárnej polyradikuloneuritídy s neuralgiformnými bolesťami a obrnami. Ťažkostiam predchádzalo prisatie kliešťa a vznik erytému. Následne bol publikovaný prípad muža, u ktorého sa rozvinula meningoencefalitída tri mesiace od vzniku *erythema migrans*. Autor ako prvý pomysľal na súvislosť medzi prisatím kliešťa, kožnou léziou a neurologickými symptómami.

O dvadsať rokov neskôr nemecký neurológ Bannwarth popísal syndróm nazvaný „Chronická lymfocytárna meningitída s klinickým syndrómom neuralgie a neuritídy“. Nanešťastie autor neprípisoval význam tomu, že u niektorých pacientov predchádzalo symptómom prisatie kliešťa a u jedného chorého aj kožný erytém.

V nasledujúcich rokoch bolo uvedených veľa názorov na etiopatogézu tohto multiorgánového ochorenia. V roku 1946 si Nanna Svartzová všimla zvýšenú sedimentáciu u pacientov s *acrodermatitis chronica atrophicans*. Skúsila im podať penicilín a po zaznamenanom úspechu bolo jasné, že sa bude jednať o bakteriálnu

infekciu. Na možnosť etiologickej spoluúčasti spirochét pri vzniku kožných lézií ako sú *erythema migrans* a *acrodermatitis chronica atrophicans* poukázal Lenhoff. S jeho názorom ďalší autori nesúhlasili, a tak bolo od neho upustené. V roku 1966 uviedol Schaltenbrand vzťah medzi *erythema migrans* a meningoradikuloneuritídou, ale ani on neobjasnil súvislosť oboch klinických prejavov. V šesťdesiatych a sedemdesiatych rokoch bolo *erythema migrans* opísané ako celkové ochorenie, ale pátranie po pôvodcovi nebolo úspešné [1, 2, 3].

K objasneniu jednotlivých príznakov a súvislostí medzi nimi postupne došlo až v osemdesiatych rokoch minulého storočia, keď Steer so spolupracovníkmi zamerali svoju pozornosť na epidemický výskyt zápalovej artropatie u 39 detí a 12 dospelých, ktorá vypukla v roku 1975 v blízkosti mestečka Lyme v štáte Connecticut, USA. Všímaví rodičia upozornili lekárov na ochorenie, ktoré sa vyskytlo u viacerých detí v tejto oblasti. Viac ako polovica detí (23 z 39) spĺňalo kritéria juvenilnej reumatoidnej artritídy. Lekárom však neunikol erytém, ktorý predchádzal kĺbnym ťažkostiam, takisto ani to, že daná oblasť je charakteristická zvýšeným výskytom kliešťov typu *Ixodes (I.) daminni*. Steer si dal všetky tieto skutočnosti do súvislosti, a tak v roku 1977 popísal so svojimi spolupracovníkmi novú nosologickú jednotku, najprv nazvanú lymeská artritída [1, 2, 4, 5].

Napriek tomu, že bolo známe ochorenie a jeho príznaky, stále chýbal pôvodca. Až v roku 1982 sa Willymu Burgdorferovi podarilo objaviť etiologické agens – spirochétu, ktorú izoloval z tráviaceho traktu amerických kliešťov rodu *I. daminni*. Onedlho bola rovnaká spirochéta nájdená aj u európskeho kliešťa *I. ricinus*. Spirochéta bola zaradená medzi borrelie a neskôr nazvaná podľa svojho objaviteľa *Borrelia (B.) burgdorferi*.

V roku 1987 na III. medzinárodnej konferencii v New Yorku venovanej tejto problematike bolo doporučené označenie tohto ochorenia ako lymeská borrelióza [1, 2].

Z uvedených informácií vyplýva, že lymeská borrelióza nepredstavuje nové ochorenie, ale až objavenie jej pôvodcu odštartovalo pátranie po epidemiologických súvislostiach a mikrobiologických charakteristikách borrelií, spoznávanie pestrého klinického obrazu ochorenia a rozmach diagnostických a terapeutických postupov. Úsilie Steera a jeho spolupracovníkov viedlo k objaveniu komplexnej a mnohotvárnej choroby. Výsledky ich štúdií položili základ pre súčasné pochopenie úlohy infekčného

agens, kliešťa ako vektora ochorenia a rozvoja jednotlivých príznakov, od včasných až po neskoré [3, 6].

## 1.2 Charakteristika *Borrelia burgdorferi*

### 1.2.1 Všeobecné informácie o rode *Borrelia* a *Borrelia burgdorferi*

Rod *Borrelia* zaraďujeme do radu *Spirochaetales*, čeľade *Spirochaetaceae*, kam patrí aj rod *Treponema* a *Leptospira*. Vo všetkých troch rodoch nájdeme druhy, ktoré sú pre človeka vysoko patogénne, najmä *Treponema pallidum* ako pôvodca syfilis, *Leptospira interrogans* a niekoľko druhov patogénnych borélií, ktoré z klinicko-patologického hľadiska môžeme rozdeliť na pôvodcov lymeskej borreliózy (*B. burgdorferi*) a pôvodcov návratných horúčok (*B. recurrentis*, *B. hermsii*). Z komplexu *B. burgdorferi* sensu lato sú najčastejšími pôvodcami lymeskej borreliózy *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. afzelii* a *B. garinii* [5, 7, 8, 9, 10].

#### *B. burgdorferi* sensu stricto

Je pôvodcom infekcií hlavne v USA a západnej Európe, rezervoárovým zvieratám sú hlodavce a vtáci. Z klinického hľadiska má význam vzťah tejto borrelie najmä k postihnutiu kĺbov, myokardu a neurologickým ťažkostiam [7, 8, 11, 12].

#### *B. afzelii*

Táto európska borrelia je pomenovaná po švédskom lekárovi Afzeliovi, ktorý v roku 1909 prvýkrát opísal klinické príznaky *erythema migrans*. Vyskytuje sa prevažne v kliešťoch sajúcich krv na hlodavcoch (napr. myš, hraboš, potkan). Má užší súvis s kožnými príznakmi ochorenia, konkrétne s *acrodermatitis chronica atrophicans*. Okrem Európy sa vyskytuje aj v Ázii [1, 7, 8, 11, 12].

#### *B. garinii*

Rezervoárom tejto borrelie sú najmä vtáci (napr. bažanty a rôzne druhy spevavých vtákov). Zodpovedá hlavne za neurologické prejavy lymeskej borreliózy. Je pomenovaná podľa francúzskeho lekára Garina, ktorý v roku 1922 spolu



s Bujadouxom ako prvý popísal u pacientov po prisatí kliešťa a po *erythema migrans* súvisiaci neurologický syndróm. Vyskytuje sa v Európe a Ázii [1, 7, 8, 12].

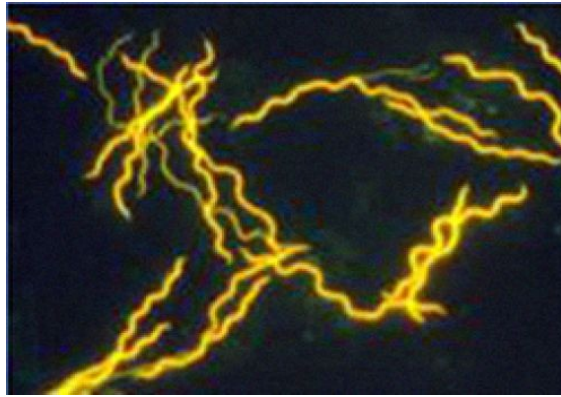
#### **A) Stavba bakteriálnej bunky *Borrelia burgdorferi***

Borrélie (obr. 1) sú gramnegatívne špirálovito stočené spirochéty o rozmeroch 0,2  $\mu\text{m}$  x 4-30  $\mu\text{m}$ . Vzdialenosť jednotlivých závitov je 2,2  $\mu\text{m}$  a ich počet sa pohybuje v rozmedzí 4-15. Na oboch koncoch tela sa nachádzajú bičíky v počte 7 - 9, na rozdiel od iných patogénnych borrélií, ktoré majú 15-20 bičíkov. Baktérie sa pohybujú rotáciou okolo pozdĺžnej osi alebo skracovaním a ťažovaním. Umožňujú to bičíky, ktoré sa vypínajú z bazálnych diskov v cytoplazmatickej membráne a obtáčajú telo baktérie pod vnútornou bunkovou stenou [1, 7, 9].

Stavba tela borrélií zodpovedá štruktúre gramnegatívnych baktérií. Protoplazmatický valec je ohraničený dvoma membránami, cytoplazmatickou membránou a tenkou vrstvou peptidoglykánu a vonkajšou membránou, ktorá je vysoko fluidná. Medzi vonkajšou a cytoplazmatickou membránou prechádzajú z oboch koncov filamentá umožňujúce pohyb. Prítomnosť mukoidnej vrstvy na povrchu bunky má zrejme význam pri väzbe proteínov k vonkajšej membráne [2, 7].

Bunková stena je zložená z troch vrstiev - vnútornej peptidoglykánovej, ktorá je flexibilná, strednej lipopolysachridovej a vonkajšej lipoproteínovej. Periplazmatickým priestorom je oddelená od cytoplazmatickej membrány na povrchu protoplazmatického valca. Vďaka veľkej flexibilitě membrán bunkovej steny je možné vysunutie bičíkov v proximálnom a distálnom smere, tvorba cýst a vylučovanie membranóznych vezikúl s obsahom plazmidovej výbavy. Fluidita vonkajšej membrány má význam pre adhéziu s bunkami hostiteľa. Umožňuje totiž posun bunkových glykosaminopeptidových receptorov a antigénnych molekúl proteínov [1, 2].

Za nevhodných podmienok (vplyv antibiotík, lytických enzýmov) na dcérskych bunkách nedôjde k obnove bičíkov, čím sa zmení celistvosť bunky. *B. burgdorferi* bez bičíkov tvorí nepravidelné štruktúry, napr. cysty, zárodočné „gema“, vezikuly a granuly [1].



Obrázok 1: *Borrelia burgdorferi* sensu lato

Farbenie akrídinovou oranž, fluorescenčná mikroskopia, zväčšenie 2000-krát

(Zdroj: [http://www.borelioza.cz/cs/clanky/borrelia\\_burgdorferi\\_\\_unikatni\\_bakterie/](http://www.borelioza.cz/cs/clanky/borrelia_burgdorferi__unikatni_bakterie/))

## ***B) Faktory virulencie a antigénna štruktúra B. burgdorferi***

Borrélie sa v priebehu svojho života stretávajú s rozličným prostredím. Pre ich život, rast a virulenciu sú preto dôležité najmä bičičky a vonkajšie povrchové proteíny – Outer surface protein (Osp) [1, 13].

### **Bičičkové antigény**

Bičičky sú tvorené vonkajším a vnútorným glykoproteínom (Mr 41kD a 14kD). Bičičkový proteín, flagelin, sa považuje za vysoko imunogénny, v priebehu infekcie je detekovaný ako jeden z najčastejších. Vyskytuje sa u všetkých druhov borrelií, podmieňuje ich šírenie v organizme a schopnosť kolonizovať bunkové povrchy [1, 2, 7].

### **Outer surface protein (Osp) - vonkajšie povrchové proteíny**

Osp sú lipoproteíny, ktoré sa v priebehu infekcie dostávajú do styku s tkanivami hostiteľa. Medzi hlavné povrchové proteíny patria OspA a OspB. Majú plazmidový pôvod, svojou veľkosťou aj antigénnou reaktivitou sú variabilné u jednotlivých kmeňov. Funkcia OspC je rôzna, v závislosti na fáze životného cyklu. OspA slúži na uchytenie borrelií v tráviacom trakte kliešťa, OspC má imunosupresívny účinok pri prieniku borrelií do hostiteľa. V rôznej miere sú exprimované aj ďalšie povrchové lipoproteíny, ako OspD (28 kDa), OspE (19kDa), OspF (26 kDa) [1, 2, 7].

### **VMP lipoproteín - VlsE**

Spirochéty spôsobujúce lymeskú borreliózu exprimujú na svojom povrchu lipoproteín VMP (variable major protein) v inej odbornej literatúre označovaný ako VlsE. Infekcia spôsobí sekvenčné zmeny a expresiu rekombinantných génov lokusu vls (variable major protein-like sequence). Dochádza tak k zmene antigenicity VlsE, čo prispieva k úniku pred imunitnou odpoveďou. V experimentoch bola zaznamenaná silná IgG protilátková odpoveď 4 týždne po infekcii, to naznačuje, že VlsE je exprimovaný vo včasnej fáze infekcie [14].

### **Imunodominantné antigény**

Peptidy C2 a C6 sa nachádzajú u *B. burgdorferi* sensu lato, *B. burgdorferi* sensu stricto a *B. garinii*. Ich antigénnosť je podporená reaktivitou patientských a zvieracích sér v priebehu infekcie. Potvrďuje to aj štúdiá uskutočnená v USA, kde u pacientov s akútnou a chronickou lymeskou borreliózou 35 zo 41 vzoriek vykazovalo reaktivitu a vysokú hladinu protilátok proti C6. Päť vzoriek sér, ktoré mali nedetekovateľnú hladinu protilátok proti C6 peptidu, bolo získaných od pacientov v skorom štádiu infekcie [14].

### **Decorin Binding Protein (Dbp)**

Decorin binding protein A je borreliový povrchový proteín a predstavuje jeden z kľúčových proteínov. V priebehu experimentálnej neuroborreliózy u myší vyvoláva silnú protilátkovú odpoveď a bol navrhnutý ako potenciálny vakcinačný proteín. Dbp-peptidy pochádzajúce z *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. afzelii*, *B. garinii* sú používané ako antigény v testoch ELISA [14, 15].

### **Arthritis-Related Protein (Glutathion-S-Transferasa)**

Ide o povrchový proteín *B. burgdorferi* o veľkosti 37 kD. Podľa doterajších zistení môže pravdepodobne zabrániť alebo zmierniť vážnosť artritídy. Protilátková odpoveď na tento jeden proteín sa podobá glutathion-S-transferase [14].

### C) Genetika *B. burgdorferi*

Veľký záujem o borrelié a súčasný rozvoj molekulárne genetických metód umožnil rozdelenie *B. burgdorferi* sensu lato (vtedy *B. burgdorferi* v širšom slova zmysle) na niekoľko geneticky definovaných druhov – genomospecies. Elektroforetickou analýzou DNA boli rozlíšené druhy *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. japonica*, *B. turdi*, *B. tunuki*, *B. sinica*, *B. valaisiana*, *B. lusitaniae*, *B. andersonii*, *B. bissetti*, *B. miyamotoi*, *B. bavariensis* a *B. spielmanii*. Ich počet pravdepodobne nie je konečný [1, 7, 11].

Z celosvetového hľadiska je najrozšírenejším pôvodcom lymeskej borreliózy *B. burgdorferi* sensu stricto, ktorá sa vyskytuje prevažne v USA. V Európe a Českej republike však dominujú iné dve borrelié - *B. afzelii* a *B. garinii*. Táto skutočnosť má zásadný význam pre správny výber antigénov do serologických reakcií pri diagnostike lymeskej borreliózy. Patogenita ďalších genomospecies pre človeka nie je úplne jasná, aj keď potenciálnymi patogénmi môžu byť *B. valaisiana* a *B. bissetti* [7].

*B. burgdorferi* je prvá spirochéta, ktorej genóm bol kompletne osekvenovaný. Je tvorený lineárnymi chromozómami a plazmidmi a predstavuje jedinečnú organizáciu genetického materiálu medzi baktériami [1, 2, 16].

Lineárny chromozóm o veľkosti 911 kb obsahuje 853 genetických elementov, zahŕňajúc 12 lineárnych a 9 cirkulárnych plazmidov. Plazmidy sú nositeľmi génov, ktoré určujú tvorbu povrchových proteínov Osp, nevyhnutných k životu *B. burgdorferi* sensu lato. *In vitro* sú však plazmidové štruktúry nestále, po kultivácii na umelých pôdach sa strácajú. Plazmidová výbava nemusí byť u jednotlivých druhov kompletná, čo sa prejaví na rozdielnej celkovej genómovej veľkosti [1, 2, 10, 16, 17].

Na základe genomickej analýzy *B. burgdorferi* možno povedať, že borrelié obsahujú genetické štruktúry, ktoré sú medzi prokaryotmi vzácné. Okrem už spomínaného lineárneho chromozómu a viacnásobných lineárnych a cirkulárnych plazmidov tu patrí aj jedinečná organizácia rRNA, vyše 150 génov, ktoré kódujú lipoproteíny alebo množstvo zatiaľ nerozpoznaných génov, ktoré sú nevyhnutné pre syntézu aminokyselín, mastných kyselín, enzýmových kofaktorov a nukleotidov. U *B. burgdorferi* absentujú gény pre enzýmy cyklu trikarboxylových kyselín

a zlúčeniny zúčastňujúce sa elektrónového transportu [17].

Spirochéty majú regulačné gény – *Borrelia direct repeat* (Bdr). Bdr proteíny nimi určené sú medzidruhovo aj vnútrodruhovo rozdielne a sú zodpovedné za tvorbu imunokomplexov. Borrélie vynakladajú veľké množstvo energie na zvyšovanie počtu Bdr génov a nimi riadenej produkcie proteínov s cieľom zachovaniu druhu. Výmena plazmidov, ktoré nesú Bdr gény a zvýšenie ich množstva v genóme, predstavuje základ pre variabilitu *B. burgdorferi* sensu lato. Vďaka tomu sú borrélie schopné rýchlo sa prispôbiť rôznym zmenám prostredia. V čreve kliešťov tvoria spirochéty vlastné regulačné Bdr gény, pre ktoré je stimulom krv. Ich úlohou je riadenie množenia a prechod borrélií do slinných žliaz tým, že ovplyvňujú funkciu génov pre OspA a OspC proteíny. OspA je dominantným antigénom *B. burgdorferi* sensu lato v čreve kliešťov, ale v slinných žľazách je fenotypicky potlačený, pretože vplyvom Bdr génu je funkcia OspA génu inhibovaná. Týmto sa zabráni zničeniu borrélií protilátkami hostiteľa, ktoré sú namierené proti OspA. Vplyvom vhodnej krvi sa pri prenose borrélií z kliešťa do teplokrvného hostiteľa blokuje funkcia OspA génu a zapojí sa gén pre syntézu povrchového OspC antigénu. Zvýšenie teploty vedie k zvýšenej produkcii nielen OspC antigénu, ale aj ďalších povrchových antigénov OspE a OspF, ktoré patria medzi antigény teplotného šoku (HsP) [1].

## 1.3 Epidemiologické charakteristiky ochorenia

### 1.3.1 Prenos ochorenia

Lymeská borrelióza patrí v súčasnosti medzi najčastejšie infekcie prenášané článkonožcami v miernom pásme severnej pologule, teda v Severnej Amerike a krajinách s miernou klímou v Európe a Ázii. Bola zaznamenaná aj v Škandinávii a v Austrálii [1, 5, 15, 18].

Riziko infekcie je spojené najmä so zamestnaním (lesnícky pracovníci), rekreačnými aktivitami v prírode (turistika, hubárčenie) a dôležitým faktorom je aj vek (deti 5-14, dospelí 50-64). Vektormi infekcie sú článkonožce, ktoré sajú krv rezervoárových zvierat, hlavne vtákov a hlodavcov. V Európe je lymeská borrelióza spôsobená patogénnymi európskymi druhmi spirochéty *B. burgdorferi* sensu lato, ktorej prenášačom je predovšetkým kliešť druhu *I. ricinus*. V USA je *B. burgdorferi*

prenášaná kliešťom *I. scapularis* a *I. pacificus*. Ochorenie môžeme teda charakterizovať ako zoonózu, u ktorej je človek náhodným hositeľom borélií [2, 5, 7, 10, 11, 15]. Okrem kliešťov boli borélie nájdené aj v iných druhoch hmyzu, ako roztoče, dvojkridle blchy a niektorí zástupcovia ovadovitých. Infekciu prenášajú aj muchy, moskyti a ďalšie druhy hematofágneho hmyzu. Štatistiky však poukazujú na významný rozdiel v infikovanosti medzi kliešťami a komármi (u kliešťov omnoho viac) [2, 8, 9].

Prenos borélií na rôznych hositeľov závisí od množstva faktorov, ako sú klimatické podmienky, vegetácia, správanie hositeľa, množstvo a pohyb ľudí. Dynamika infekcie je závislá od vzájomného pôsobenia medzi kliešťom a hositeľom. K prenosu borélií z prisátého kliešťa dochádza počas salivácie, regurgitácie, taktiež postriekaním kože telesným obsahom kliešťa v miestach poranenej kože. Doterajšie znalosti nasvedčujú tomu, že prenos borélií na človeka možný aj transplacentárne, prípadne aj krvnou transfúziou [2, 10, 11].

Podľa nedávnych prieskumov je zrejme celková prevalencia lymeskej borreliózy stabilizovaná, ale vzrastá jej geografické rozšírenie, predovšetkým do vyšších nadmorských výšok a zemepisných šírok. V Európe sa lymeská borrelióza vyskytuje medzi 35°N a 60°N a zvyčajne do nadmorskej výšky 1300 m.n.m. Ide o veľmi širokú priestorovú distribúciu. Donedávna sa kliešť obyčajný vyskytoval v našich zemepisných podmienkach len do výšky 700 m.n.m. Globálne otepľovanie a zmena klimatických podmienok spôsobili, že kliešte nachádzame vo väčších nadmorských výškach a sú tu schopné sa aj rozmnožovať. Posledné údaje uvádzajú výskyt životaschopných kliešťov do výšky 1000 – 1100 m.n.m. [11, 19].

### ***Ixodes ricinus* – najvýznamnejší kliešť v Českej republike**

Mierne pásmo a Česká republika predstavujú vďaka svojim geografickým podmienkam veľmi vhodný biotop pre výskyt najčastejšieho prenášača v miernom pásme - kliešť *I. ricinus* (obr. 2). Nájde ho hlavne v listnatých a zmiešaných lesoch, na vlhkých lúkach, v krovinatých porastoch, na otvorených lúkach s porastom vysokých tráv a rastlín, ale aj na trávnatých plochách v centre miest [1, 19].

Kliešte z čeľade *Ixodidae* majú jedno larválne, nymfálne a dospelé štádium (imágo). Ako prenášači boréliovej nákazy sa môžu uplatniť všetky vývojové štádia kliešťa. Experimentálne zistenia uvádzajú, že *B. burgdorferi* sa veľmi rýchlo

rozmnožuje v štádiu larvy a nymfy, zatiaľ čo pri premene na imágo klesne počet borrelií asi 10-krát. [2, 10, 11, 19,].

*B. burgdorferi* pretrváva v epiteli stredného čreva kliešťa, tu sa pomnoží a za 3-5 dní preniká do hemolymfy, následne do centrálného ganglia, slinných žliaz a ostatných tkanív kliešťa [2].

V prírodných podmienkach trvá životný cyklus *I. ricinus* zvyčajne dva až tri roky, za nepriaznivých podmienok aj viac. Rozlišujeme pritom vajíčko, larvu, nymfu a dospelého jedinca. Kliešť konzumuje krv hostiteľa vo všetkých štádiách okrem vajíčka [19].

V našich podmienkach predstavuje obdobie aktivity asi 210 – 240 dní. Nymfy a dospelí jedinci majú podobný priebeh aktivity. Larvy nachádzame na vegetácii neskôr, od konca apríla až do konca októbra [19].

Medzi hostiteľov kliešťov môžeme zaradiť množstvo živočíšnych druhov, najmä malé a veľké hlodavce, ale aj plazy a vtáky. Drobné živočíchy (napr. hlodavce, zajace, vtáky, jašterice) sú napádané prevažne nymfami a larvami. Dospelí jedinci parazitujú na väčších cicavcoch (kone, ovce, kozy, vysoká lesná zver). Vtáci predstavujú nielen hostiteľa etiologického agens lymeskej borreliózy, ale tiež pôsobia ako prenášači kliešťov na veľké vzdialenosti [2, 19].

*I. ricinus* je hlavným vektorom troch pre človeka preukázane patogénnych druhov – *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii* a *B. afzelii* v Európe. Štúdie poukazujú na rozdielnu prevalenciu jednotlivých druhov borrelií u rôznych hostiteľov [8, 20].



Obrázok 2: *Ixodes ricinus* – Kliešť obyčajný

(Zdroj: <http://www.biolib.cz/cz/taxonimage/id23480/?taxonid=76144>)

### 1.3.2 Incidencia borreliózy

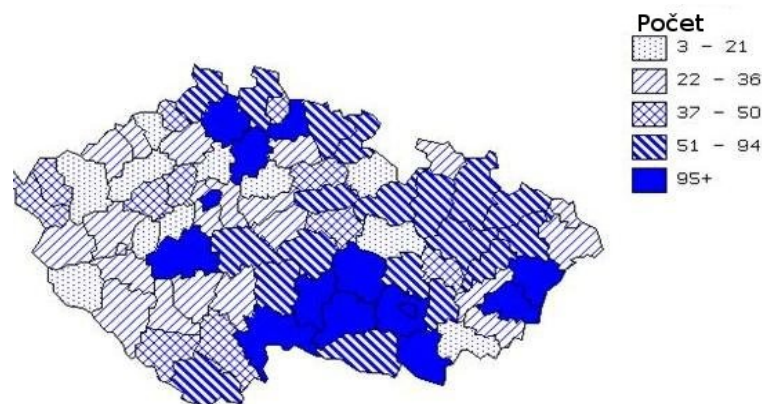
Incidenca lymeskej borreliózy začala byť v ČR sledovaná v roku 1986. Zavedením rutinej serologickej diagnostiky sa v roku 1988 výrazne zvýšil počet diagnostikovaných prípadov [2].

Medzi oblasti s najvyšším počtom hlásených prípadov (obr. 3) patria v Českej republike kraje Stredočeský, Liberecký, Vysočina, Jihomoravský, Zlínsky, Jihočeský, Olomoucký, Moravskoslezský.

Na Slovensku je to okolie Banskej Štiavnice, Zvolena, Žiaru nad Hronom, Nového Mesta nad Váhom, Púchova a Bardejova. Premorenosť kliešťov borreliami je na Slovensku asi 10 %, v niektorých lokalitách môže byť vyššia. Neochota zodpovedných pracovníkov hlásiť borreliózu je jedným z faktorov skreslenia týchto údajov. Ďalším faktorom je to, že často sú infikovaní rekreanti a chalupári s trvalým bydliskom v iných okresoch [1, 3, 20].

Na základe monitoringu kliešťov a rezervoárových zvierat možno potvrdiť výskyt všetkých patogénnych druhov borrelií na Slovensku – *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. afzelii*, *B. garinii*, ako aj *B. valaisiana* a *B. lusitaniae*, ktoré boli ešte donedávna považované za nepatogénne [3].

Je zjavné, že lymeská borrelióza vykazuje vzrastajúci gradient výskytu smerom zo západu na východ s najvyššou incidenciou v Strednej Európe (napr. Slovensko, 155/100 000) a najnižšou v Spojenom kráľovstve a Írsku (0,6/ 100 000). Skutočná incidencia je zrejme oveľa vyššia. Klesajúci charakter je zrejмый z juhu na sever v Škandinávii a zo severu na juh v Taliansku, Španielsku a Grécku [15, 21].



Obrázok 3: Počet ochorení lymeskou borreliózou v Českej republike v roku 2011

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



## 1.4 Patogenéza ochorenia

Životný cyklus spirochét je zabezpečený prenosom medzi kliešťami rodu *Ixodes* a vtáčimi a cicavčiami hostiteľmi. Žijú obligátne paraziticky a zatiaľ neboli objavené žiadne voľne žijúce druhy [1].

Prienik borrelií do ľudského organizmu nastáva prostredníctvom prenášača, ktorým je zvyčajne kliešť, a predstavuje celý komplex biologických procesov. Spirochéty exprimujú rôzne vonkajšie proteíny v závislosti od ich aktuálneho miesta výskytu – nenasatý kliešť, kliešť sajúci krv, organizmus hostiteľa [1].

Pri prechode medzi hostiteľmi prekonáva borrelia teplotné zmeny. S nimi súvisí prítomnosť HsP-proteínu o molekulovej hmotnosti 66 kD.

Ďalším významným antigénom je p60. Vyskytuje sa aj u iných baktérií a môže byť príčinou skřížených reakcií. Je vyvolávateľom imunitnej odpovede u pacientov s chronickým štádiom lymeskej borreliózy. Má polovicu aminokyselín zhodných s HsP60 (heat shock proteins), čo spôsobuje problémy pri hodnotení serologických testov [1, 2].

Na uchytenie borrelie v tráviacom trakte kliešťa slúži OspA, kde sa viaže na receptor pre OspA. V sajúcom kliešťovi, zhruba po 24-48 hodinách, borrelia zníži expresiu OspA, exprimuje OspC a migruje do slinných žliaz. Len spirochéty, ktoré sú schopné exprimovať OspC môžu opustiť zažívací trakt kliešťa. V slinných žľazách sa OspC viaže na Salp15, proteín o veľkosti 15 kD. Ten má imunosupresívny účinok, chráni borrelie pred pôsobením komplementu hostiteľa, čím môže uľahčiť kŕmenie kliešťa a následne aj prenos borrelií. Borrelia je schopná znížiť expresiu OspC ako odpoveď na tvorbu protilátok. Cieľom je vyhnúť sa odstráneniu a udržať infekčný proces. Vo včasnej imunitnej odpovedi sa okrem flagelinu uplatňuje práve vysoko špecifický OspC [1, 7, 10, 13, 14].

V závislosti na fáze životného cyklu borrelií sú exprimované aj iné povrchové lipoproteíny - OspD (28 kDa), OspE (19kDa), OspF(26 kDa). OspD má lytický účinok a je významný pre perzistenciu borrelií v bunkách. OspE umožňuje spirochéte vyhnúť sa likvidácii imunitným systémom a udržiavať chronickú infekciu [2, 7, 14].

Okrem spomínaných funkcií, viažu Osp antigény plazminogén, ktorý je nevyhnutný pre ich šírenie krvou.

Borreliie stimulujú monocyty k zvýšenej produkcii aktivátorov urokinázy,

dochádza k aktivácii plazmínu a tým sa zvyšuje schopnosť borélií prenikat' endotelom. Priamo aktivujú aj B lymfocyty a produkujú kostimulačné signály pre T bunky, indukujú tvorbu kyslíkových radikálov, interleukinu (IL) Il-1b, 6, 8 a TNF $\alpha$  (tumor necrosis factor) [1, 22].

Väzbu na špecifické tkanivové štruktúry umožňujú boréliám glykosaminoglykány na ich povrchu. Podľa niektorých zdrojov sú patologické reakcie *in vivo* dôsledkom interakcie vonkajších lipoglykoproteínov spirochét s tkanivovými štruktúrami. Borélie majú afinitu ku väzivovým štruktúram – kolagénovým vláknam.

Adhézia a prienik borélií do buniek je závislá na množstve extracelulárneho glykoproteínu p83 s molekulovou hmotnosťou 83-93 kD. Jeho produkcia sa zvyšuje so vzrastajúcou dobou inkubácie *in vitro* a dĺžkou infekcie *in vivo*. P83 má charakter fimbrií a sila vrstvy má vplyv na tvar buniek. Gén pre p83 sa nachádza spolu s génom pre flagelin a pre antigén p39 na chromozóme [1].

Pre prienik do bunky využívajú borélie rôzne mechanizmy a receptory. Hlavným mechanizmom pre penetráciu je adhézia baktérií pomocou proteínu p39. Ide o antigén vnútorných flagel. Nevyskytuje sa u všetkých druhov borélií [1, 2].

Borélie majú vyvinuté rôzne mechanizmy, ktorými sa snažia uniknúť pred imunitou hostiteľa. Vylučovanie membránových vezikúl s obsahom Osp antigénov a plazmidovou DNA predstavuje mimikry, ktoré sú prednostne fagocytované, zatiaľ čo borélie prežívajú ďalej. Vnútrobunkový antigén GroEL-faktor slúži na obranu proti bunkovej aj humorálnej imunite [1, 2].

Ako prevenciu proti zničeniu komplementom môžu borélie exprimovať CRASPs – získané regulačné povrchové proteíny komplementu. Pre únik získanej imunitnej odpovedi bol navrhnutý proteín LmpI [13, 14, 15].

*B. burgdorferi* sensu lato sa vyznačuje veľmi dobrou adaptáciou na vnútorné prostredie človeka, čo má za následok pomalý priebeh infekcie. Borélie sú schopné vyvolať imunopatologické procesy, ktoré spôsobujú rôzne orgánové postihnutia [1].

Výrazná heterogenita borélií im umožňuje meniť sa vplyvom podmienok prostredia. Ich patogenéza nie je zatiaľ celkom objasnená, ale podieľa sa na nej množstvo vlastných (dlhá generačná doba, nízka produkcia toxínov) aj hostiteľských faktorov [1].

Veľký význam má ich pohyblivosť, na základe ktorej sú schopné uniknúť imunitnej obrane hostiteľa.

Majú schopnosť väzby a aktivácie enzýmov hostiteľa a taktiež regulujú svoje povrchové proteíny pod vplyvom hostiteľskej reakcie.

Borrélie majú schopnosť infikovať ľudí a zvieratá dlhodobo (mesiace, roky) bez ohľadu na imunitnú obranu hostiteľa [1].

## **1.5 Imunitný systém a *B. burgdorferi***

Zdrojom antigénnej stimulácie sú rôzne komponenty, predovšetkým OspA, B, C, flagelin. Protilátková odpoveď vzniká už v prvých dňoch po infekcii produkciou IgM. IgG sa objavujú až o 2-4 týždne neskôr. K proteínom, ktoré ďalej vyvolávajú protilátkovú odpoveď patrí napríklad aj p18, p39 (BmpA), p100. Sú dobrými markermi neskorej odpovede v triede IgG [1, 7].

V prípade bunkovej imunity sú spirochéty fagocytované makrofágmi, majú schopnosť v nich dlhší čas prežívať, čo podporuje perzistenciu infekcie.

## **1.6 Klinické prejavy**

Lymeská borrelióza je multisystémové infekčné ochorenie s rozmanitou klinickou manifestáciou, ktorého pôvodcom je spirochéta z komplexu *B. burgdorferi* sensu lato. K hlavným príznakom patrí postihnutie kože, nervového systému, kĺbov a srdca. Pre diagnózu lymeskej borreliózy je nutné brať do úvahy, že pacient musí byť vystavený riziku uhryznutia kliešťom, čím sa myslí pobyt v trávinatej alebo lesnatej oblasti a to v období do 30 dní pred vznikom kožnej manifestácie ochorenia [2, 21].

Priebeh lymeskej borreliózy je možné rozdeliť do troch štádií, aj keď v mnohých prípadoch neprebehnú všetky. U pacientov môžu byť v jednotlivých štádiách prítomné typické, ale aj atypické symptómy a mnohokrát prebieha lymeská borrelióza len s miernymi príznakmi. U niektorých pacientov príznaky vymiznú spontánne bez liečby a nedochádza k ich postupu do chronického štádia. Priebeh lymeskej borreliózy je individuálne variabilný. Netypické prejavy ochorenia vedú často k diagnostickým omylom [2, 3].

Doba prisatia kliešťa, potrebná na prenos borrelií je minimálne 24-48 hodín, vtedy dochádza k prieniku baktérií do kože.

Hlavným príznakom prvého štádia je (u cca 60 % infikovaných jedincov) *erythema migrans*, mapovité začervenanie na koži. Sprievodnými ťažkosťami sú bolesti hlavy, únava, bolesti kĺbov a svalov.

V druhom štádiu dochádza k diseminácii borrelií krvnou cestou. Príznakom sú sekundárne ložiská *erythema migrans*, rôzne neurologické, kardiovaskulárne alebo kĺbne ťažkosti.

Tretie štádium je charakterizované postihnutím kože (*acrodermatitis chronica atrophicans*), kĺbov (mono- alebo oligoartritída, hlavne veľkých kĺbov – koleno, rameno, lakeť) s eróziami kĺbných chrupaviek a postihnutím nervového systému (meningitída, encefalitída, periférne neuropatie). Infekcia sa môže u tehotných preniesť aj na plod [1, 2, 3, 9, 20, 23].

Klinické prejavy lymeskej borreliózy sú v Severnej Amerike a v Európe veľmi podobné, ale väčšou variáciou genotypov v Európe dochádza k niekoľkým významným rozdielom.

V Európe ochorenie spôsobujú *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. burgdorferi* sensu stricto a príležitostne aj *B. spielmanii*, zatiaľ čo v USA je *B. burgdorferi* sensu stricto jediným patogénnym genotypom.

*Acrodermatitis chronica atrophicans* a boréliový lymfocytóm sú v Európe pomerne časté, v USA sú veľmi vzácnou manifestáciou.

*Erythema migrans* v Európe, spôsobené *B. afzelii*, expanduje pomalšie a centrálné vyblednutie je častejšie ako v USA, kde je rovnaká manifestácia spôsobená *B. burgdorferi* sensu stricto.

Neuroborrelióza sa častejšie vyskytuje u pacientov v Európe a naopak, lymeská artritída je častejšou manifestáciou u amerických pacientov. Avšak údaje o relatívnom výskyte sú obmedzené a skreslenosť v systéme hlásenia ochorenia, v USA aj v Európe, sťažuje dosiahnutie spoľahlivých záverov [5, 15, 16, 21, 24].

### 1.6.1 Prvé štádium – štádium včasnej lokalizovanej infekcie

V prvom štádiu včasnej lokalizovanej infekcie nachádzame na koži *erythema migrans* alebo boréliový lymfocytóm, súčasne môže byť prítomná regionálna lymfadenitída a príznaky podobné chrípke. Ku kožným zmenám lymeskej borreliózy sa viaže predovšetkým *B. afzelii*. Aj ostatné dva druhy môžu byť pôvodcami kožných zmien, ale oveľa zriedkavejšie [1, 6].

#### *Erythema migrans*

Je najcharakteristickejším príznakom prvého štádia, predstavuje až 85 % všetkých kožných prejavov. Vzniká v mieste prisatia kliešťa alebo uštipnutia hmyzu za približne 3-22 dní (v priemere 7 dní) [1, 2, 5].

Prejavuje sa ako makula alebo papula červenej farby, ktorá sa po dobu niekoľkých dní až týždňov šíri do plochy. Začervenanie väčšinou postupne bledne v centre a vzniká typická anulárna lézia (obr. 4). *Erythema migrans* je zvyčajne nebolestivé, býva teplejšie ako okolitá koža a subjektívne môže mierne svrbieť. Pri antibiotickej (ATB) liečbe vymizne za niekoľko dní. Mnohé *erythema migrans* majú v priemere viac ako 5 cm [1, 2, 20, 21].

Nie každé prisatie kliešťa spôsobuje kožné prejavy, *erythema migrans* sa vyvinie asi u polovice infikovaných. Na druhej strane 30-50 % pacientov s *erythema migrans* neudáva v anamnéze uštipnutie hmyzom ani prisatie kliešťa [1].

Vzácnym symptómom lymeskej borreliózy je regionálna alebo generalizovaná lymfadenitída – zväčšenie uzlín v blízkosti kožných lézií *erythema migrans* alebo boréliového lymfocytómu. U niektorých pacientov sa môžu vyvinúť príznaky podobné chrípke – nechutenstvo, zvýšená teplota, bolesť hlavy, málnosť, bolesti svalov a kĺbov. Uvedené ťažkosti sú veľmi premenlivé a zvyčajne spontánne zmiznú. Avšak ak sa uvedené symptómy vyskytujú bez *erythema migrans*, neindikujú lymeskú borreliózu [2, 3, 14, 21].



Obrázok 4: *Erythema migrans*

(Zdroj: <http://www.bada-uk.org/learn/Gallery/rash24.php> )

### **Boréliový lymfocytóm**

Boréliový lymfocytóm, niekedy nazývaný *lymphadenosis benigna cutis*, je papula (*lymphocytoma borreliensis papulare*) alebo plak (*lymphocytoma borreliensis infiltratum*) tmavo červenej až fialovej farby s hladkým lesklým povrchom o veľkosti od niekoľko mm do 3-5cm. Oveľa častejšie sa vyskytuje u detí ako u dospelých.

Objavuje sa za niekoľko týždňov po infekcii, najčastejšie na ušnom lalôčiku, špičke nosa, menej často na dvorci prsnej bradavky alebo na miešku. Zvyčajne nespôsobuje subjektívne ťažkosti, môže byť sprevádzaný regionálnou lymfadenitídou.

Bez vhodnej liečby lymfocytóm pretrváva mesiace, niekedy aj viac než rok. Odporúčané je histologické vyšetrenie, aby sa vylúčil kožný lymfóm a iné malignity. Boréliový lymfocytóm má typický histologický obraz s intenzívnym polyklonálnym B-lymfocytovým infiltrátom. Predstavuje asi 5 % kožných postihnutí [1, 12, 21].

### **1.6.2 Druhé štádium – štádium včasnej diseminovanej infekcie**

U niektorých pacientov dochádza po niekoľkých týždňoch alebo mesiacoch (2-12 týždňov) následkom lymfogénneho alebo hematogénneho rozsevu k rozvoju druhého štádia včasnej diseminovanej infekcie. Prejavuje sa postihnutím kože, ale predovšetkým neurologickými a kardiálnymi abnormalitami [2, 3].

### **Postihnutie nervového systému – akútna lymeská neuroborrelióza**

Lymeská borrelióza môže v druhom štádiu zasiahnuť centrálny aj periférny nervový systém. Príznaky sa objavujú približne za 3 týždne (rozmedzie 1-18 týždňov) od prisatia kliešť'a. V Strednej Európe je postihnutie nervového systému (NS) u väčšiny prípadov vyvolané infekciou *B. garinii* [1, 2, 25].

Prienik borrelií do centrálného nervového systému (CNS) závisí od ich schopnosti adhérencie a penetrácie cez cievny endotel a hematoencefalickú bariéru.

Úlohu zohráva proteolytická aktivita borrelií, aktivácia systémových cytokínov a iných mediátorov zápalu. Vzniká tak lymfocytárna meningitída, meningoencefalomyelitída, meningoencefalomyelopolyradikuloneuritída alebo meningopolyradikuloneuritída (Garin-Bujadoux-Bannwarth syndróm) [3].

Najčastejšou formou neuroborreliózy u dospelých je Bannwarthov syndróm – meningomyeloradikuloneuritída. Ide o postihnutie aferentných vlákien v zadných koreňoch miechy. Prejavuje sa silnými, často neznesiteľnými bolesťami, ktoré sú lokalizované asymetricky na tele a končatinách, prípadne v hrudnej oblasti, ich lokalizácia sa môže meniť zo dňa na deň a zhoršujú sa prevažne v noci, pričom neodpovedajú na bežnú analgetickú a antireumatickú liečbu. Tieto bolesti zvyčajne rýchlo klesajú po nasadení vhodnej antibiotickej liečby [1, 2, 3, 12, 21, 25].

V niektorých prípadoch môže byť Bannwarthov syndróm sprevádzaný aj poruchami vedomia (hlavne v nočných hodinách), neuropsychickými príznakmi (depresia, nepokoj, nespavosť), postihnutím n. VII a okohybných nervov. Vzácné sa objavuje ťažká únava, letargia a prejavy psychosyndrómu, ktorý podnecuje podozrenie na mozgový nádor alebo užívanie drog a psychotropných liekov. Príležitostne sú prítomné aj vegetatívne príznaky, ako potenie, obstipácia, poruchy močenia. Publikované boli aj rôzne neurologické a hormonálne abnormality, napr. izolovaný tinnitus. V prítomnosti viacerých príznakov je diagnóza jasná, ale ak je jediným príznakom koreňová bolesť, môže byť stanovená nesprávna diagnóza - diskopatia [1, 2, 3, 25].

Súčasťou Bannwarthovho syndrómu môže byť aj aseptická meningitída, klinicky sa prejavuje bolesťami hlavy, nauzeou, zvracaním, fotofóbiou a teplotami do 38°C. V likvore nachádzame lymfocytárnu pleocytózu a zvýšené množstvo bielkoviny [2].

U detí sú najčastejšími symptómami bolesti hlavy v dôsledku meningitídy a obrna tvárového nervu, ktorá býva zamieňaná za idiopatickú periférnu obrnu lícneho nervu - Bellova obrna. Bellova obrna sa lieči kortikosteridmi, zatiaľ čo neuroborrelióza antibiotikami. Ďalej sa u detských pacientov môžu vyskytnúť aj epileptické paroxyzmy, chorea, transverzálna myelitída, vestibulárne syndrómy [3, 21, 26].

### **Postihnutie srdca – lymeská karditída**

Termínom lymeská karditída sa označuje poškodenia srdca, ktorého príznaky sa prejavujú v priebehu 2 – 5 týždňov po vniknutí infekcie do organizmu. Kardiálne manifestácie sú vzácne, nepredstavujú viac ako 10 % všetkých klinických prejavov lymeskej borreliózy. Podľa odhadov sa lymeská karditída v Európe vyskytuje len u 4 % všetkých pacientov s lymeskou borreliózou [1, 21].

Typickým znakom lymeskej karditídy je rýchlo sa meniaci stupeň predsieňovokomorovej blokády. Charakteristickým nálezom je dôkaz frekventných a komplexných foriem komorových arytmií, ktoré vyvolávajú palpitácie. Príčinou nedostatočnosti pravej a ľavej časti srdca môžu byť perikarditída a myokarditída, hlavným prejavom je u väčšiny pacientov dušnosť. Mnohokrát je pacient asymptomatický a diagnóza lymeskej karditídy je objavená náhodne pri bežnej lekárskej prehliadke [1, 2, 12].

Podozrenie na diagnózu lymeskej karditídy by malo byť na mieste u mladších jedincov, ktorí vykazujú poruchy vedenia vzruchov bez zjavných rizikových faktorov a ktorí uvádzajú nedávnu expozíciu možnosti uhryznutia kliešťom [21].

Chronické srdcové poruchy (napr. dlhotrvajúca dilatovaná kardiomyopatia) môžu byť výnimočne spojené s borreliovou infekciou, ale priamy vzťah stále nie je potvrdený napriek detekcii borrelií z endomyokardických biopsií v ojedinelých prípadoch [21].

### **Kožné prejavy**

K prejavom druhého štádia patrí sekundárne *erythema migrans*, kožné vaskulitídy a *lymfadenosis benigna cutis* (boréliový lymfocytóm). Sekundárne *erythema migrans* nie je v ČR častým nálezom, ale boréliový lymfocytóm je pomerne bežným prejavom [2].



## Ďalšie prejavy

Pacienti s borreliózou často trpia bolesťami kĺbov a svalov, môže sa u nich v druhom štádiu rozvinúť akútna artritída. Postihnuté sú najmä veľké kĺby (napr. koleno, rameno), ale aj tzv. mäkké tkanivá (kĺbne puzdra, väzy, šľachy) [2].

Vo všetkých štádiách, prevažne však v druhom a treťom sa môžu objaviť aj očné zmeny, ktoré sú ale vzácne a uznanie lymeskej borreliózy ich príčiny je náročné. Ani jeden z obrazov očného postihnutia nie je typický pre lymeskú borreliózu. Ide zvyčajne o konjunktivitídu, keratitídu, episkleritídu, neuropatiu optického nervu a ďalšie. Diferenciálna diagnóza očnej formy lymeskej borreliózy je rozsiahla a pre potvrdenie neexistuje jednotný laboratórny marker. Nutné je vylúčenie inej príčiny [1, 2, 12, 21].

### 1.6.3 Tretie štádium – štádium neskorej (chronickej) infekcie

Chronické štádium lymeskej borreliózy nastupuje niekoľko mesiacov alebo rokov od začiatku infekcie. Prejavuje sa postihnutím kože, nervového systému, kĺbov a iných orgánov [2].

#### Postihnutie kože - *acrodermatitis chronica atrophicans*

Jedná sa o dlhotrvajúcu, zvyčajne progresívnu manifestáciu lymeskej borreliózy, ktorá sa vyskytuje takmer výlučne u dospelých, prevažne u žien. Je charakterizovaná červenými alebo fialovo-červenými léziami (obr. 5), pričom kožné zmeny možno rozdeliť do dvoch fáz:

- a) zápalová fáza** – akútny zápal kože, chorobné plochy majú nepravidelný tvar a červenofialovú farbu. Často sa vyskytuje opuch. Lézie sa nachádzajú na akrálnych častiach končatín,
- b) atrofická fáza** – je charakterizovaná atrofiou kože a podkožia, koža je lesklá, nepružná a riasi sa, môže byť hyperpigmentovaná. Nad kostnými protuberanciami a v oblasti atrofickej kože sa môžu vytvoriť fibroidné uzlíky a sklerodermické zmeny. Histologicky nachádzame drobné popraskané žilky, škvrny a skupinový infiltrát lymfocytov a plazmatických buniek [1, 2, 20, 21].



Obrázok 5: *Acrodermatitis chronica atrophicans* na dolných končatinách  
(Zdroj: <http://lymediseaseguide.org/acrodermatitis-chronica-atrophicans-hair-loss>)

### **Postihnutie nervového systému – chronická neuroborrelióza**

Ak nenastane v prvom štádiu potlačenie choroby imunitným systémom pacienta alebo liečbou, dôjde k diseminácii infekcie. Borrelie spôsobujú v nervovom systéme toxické a zápalové reakcie, deštrukciu neurónov, gliových buniek, mozgových obalov a nervových koreňov. Pohybujú sa perineurálne, v likvorových cestách. V CNS sa nachádzajú intracelulárne, najmä v endotelových a gliových bunkách. Ich pôsobením nastáva aktivácia bunkovej a protilátkovej imunity, ukladanie cirkulujúcich imunokomplexov do mikrocirkulácie, čo vedie ku vaskulitíde a trombóze s ischémiou mozgu, miechy, koreňov a periférnych nervov. Neskôr zohráva významnú úlohu autoimunita, ktorá zodpovedá za podobnosť borreliózy s reumatickými a demyelinizačnými chorobami. V pokročilom diseminovanom štádiu nastáva tvorba demyelinizačných plakov podobne ako pri skleróze multiplex [1, 3].

Chronická borreliová infekcia nervového systému je veľmi vzácna. Do tohto štádia sa dostane len malá časť postihnutých (menej ako 5 %), pretože väčšina pacientov s lymeskou borreliózou je diagnostikovaná a liečená už skôr. Postup do chronického štádia nastane častejšie v organizme oslabenom iným ochorením [3, 21, 25].

Typickými prejavmi sú chronická meningitída, encefalomyelitída a radikulomyelitída. Chronická encefalomyelitída je podobná roztrúsenej skleróze. Na rozdiel od nej sú však prítomné špecifické protilátky v sére a likvore, a tiež

lymfocytárna pleiocytóza, mierna až vysoká hyperproteinorachia, normálna glykorachia. Chronické zmeny CNS môžu spôsobiť difúziu atrofie mozgovej kôry s demenciou. Lymeská encefalopatia je klinicky charakterizovaná poruchou kognitívnych a behaviorálnych funkcií. Prejavuje sa miernou zmätenosťou, najmä v noci a u starších pacientov [2, 3, 21].

S neuroboreliózou môžu súvisieť aj určité psychiatrické poruchy ako depresia, anxieta, poruchy spánku či organické psychózy. Boli pozorované aj poruchy chôdze a mikcie [3, 25].

Diagnostika neuroboreliózy je založená na anamnéze, klinickom obraze, zobrazovacích metódach (MRI, SPECT) a na nepriamych a priamych laboratórnych analýzach. V liečbe neuroboreliózy je liekom voľby parenterálne aplikovaný ceftriaxon [3, 25].

### **Lymeská artritída**

Prejavy lymeskej artritídy sa mierne odlišujú v Európe a USA, v Európe je výskyt ochorenia nižší. Jedným z dôvodov je zrejme liečba *erythema migrans* antibiotikami zavedená v Európe už v roku 1951. Rozdielne klinické prejavy sa vysvetľujú aj geografickými odlišnosťami a rozdielmi v patogenetike jednotlivých kmeňov, vektorov, rezervoárov a podobne [2, 12, 24].

Určitú úlohu zrejme zohráva aj HLA systém. V USA sa predpokladá spojitosť chronickej artritídy s antigénom HLA DR 4 alebo DR 2. U európskych pacientov sa toto spojenie nepreukázalo [2, 12].

Po prieniku borrelií do krvného obehu tieto spirochéty kolonizujú hlavne kĺby, synoviu, chrupavku, mozog a srdcový sval. Pre ich príľnutie na endoteliálne bunky, bazálne membrány a extracelulárne matrice je dôležitým krokom rozpoznanie vhodných receptorov. Schopnosť adherovať po rozpoznaní špecifických receptorov je pravdepodobne príčinou tkanivového tropizmu borrelií [2].

Borrelie sa viažu len na chondroitínsulfát a keratansulfát. Prítomnosť baktérií v tkanive vyvoláva infiltráciu bunkami (monocyty, makrofágy, polymorfonukleáry), ktoré produkujú zápalové cytokíny, a aktiváciu synoviálnych buniek, ktoré potom produkujú hydrolytické enzýmy a iné molekuly [2].

Lymeská artritída je charakterizovaná opakujúcimi sa atakmi alebo dlhotrvajúcimi opuchmi kĺbov, najčastejšie jedného alebo niekoľkých veľkých kĺbov, zvyčajne kolena [2, 12, 21].

Klinické prejavy postihnutia pohybového aparátu vrámci lymeskej borreliózy môžeme rozdeliť na:

- a) **artralgie** – jedná sa o muskuloskeletárne, často migrujúce bolesti kĺbov a periartikulárnych štruktúr, kostí a chrbtice,
- b) **artritída** – ktorá prebieha ako akútne, intermitentné alebo chronické kĺbny zápal so zhrubnutím synoviálnej membrány a/alebo kĺbnym výpotkom,
- c) **chronické kĺbne alebo kostné zmeny pod kožou postihnutou *acrodermatitis chronica atrophicans*** – jedná sa najmä o subluxácie a luxácie kĺbov prstov, palcov nôh, bez vážnejších štrukturálnych zmien [2].

Bolesť kĺbov, svalov samostatne nepredstavujú kritériá pre muskuloskeletárnu prezentáciu lymeskej borreliózy. U pacientov s lymeskou artritídou sa nachádza vysoká hladina IgG, ale pozitívna serológia samostatne nie je dostatočná pre potvrdenie diagnózy. V diferenciálnej diagnostike musí byť zvážená reumatoidná artritída, ale aj osteoartritída, trauma, spondyloartritída, septická artritída a iné. Ak je možný odber synoviálnej tekutiny, odporúča sa kultivácia alebo PCR. Lymeská artritída predstavuje vzácny zápal kĺbov, pri ktorom sú bežné zápalové parametre ako napr. C-reaktívny proteín (CRP) alebo sedimentácia erytrocytov často v norme. Výrazné zvýšenie parametrov zápalu u pacienta sú argumentom proti diagnóze lymeskej artritídy [21].

## 1.7 Liečba LB

V liečbe lymeskej borreliózy sa uplatňujú najmä peniciliny (amoxicilin, penicilin G), cefalosporiny 2. a 3. generácie, makrolidy, azalidy a u dospelých hlavne tetracyklíny (doxycyklin).

Nesmierne dôležitým faktorom je dĺžka terapie, aby bol účinok antibiotík na borreliu dostatočný a došlo k ich odstráneniu. U dospelých pacientov s kožnými formami ochorenia je dobrou voľbou doxycyklin, ktorý znižuje riziko postupu ochorenia do chronického štádia. Dobre prechádza hematoencefalickou bariérou a jeho koncentrácia v likvore (CSF) dosahuje hodnoty nad minimálnu inhibičnú koncentráciu.

Vo včasnom štádiu je liečba perorálnymi preparátmi postačujúca, v neskorom

štádiu prebieha parenterálne, podáva sa najmä penicilin G a cefalosporiny 3. generácie [7, 25].

Pre manifestácie skorého štádia boreliózy (*erythema migrans*, boréliový lymfocytóm) je postačujúca perorálna liečba trvajúca 10-14 dní. Avšak výskyt pretrvávajúcich symptómov po absolvovaní zvyčajnej ATB terapie viedol k diskusii ohľadom perzistencie baktérií a možnej potrebe dlhšieho trvania liečby. Prevažná väčšina európskych publikácií týkajúcich sa liečby, udáva jej trvanie v rozmedzí 10-14 dní, niektoré štúdie udávajú 28 dní [5, 13, 21, 27].

Pre podporu užívania iných antibiotík, ako metronidazol, trimetoprim-sulfametoxazol, fluconazol, izoniazid, kombináciu antibiotík alebo steroidov nie je zatiaľ dostatok spoľahlivých údajov [25].

Účinkom antibiotickej terapie môže dôjsť k zníženiu, alebo odstráneniu protilátkovej odpovede, čo môže interferovať so serologickým vyšetrením [5].

## 1.8 Laboratórna diagnostika lymeskej borreliózy

Lymeská borrelióza predstavuje široké spektrum klinických prejavov so značnou variabilitou. Diagnostika tohto ochorenia by preto mala byť založená na posúdení rizika expozície možnosti uhryznutia kliešťom, klinického stavu pacienta a laboratórných vyšetreniach, ktoré podozrenie na toto multiorgánové ochorenie potvrdia alebo vylúčia.

Pre detekciu *B. burgdorferi* sensu lato bolo vyvinutých viacero laboratórných techník, ktoré poskytujú dôkaz o prítomnosti neporušených spirochét alebo ich komponentov (DNA, proteíny) v kliešťovi, rezervoárovom hostiteľovi a pacientovi [2, 17, 21].

Metódy detekcie borrelií môžeme rozdeliť na:

**a) priame:** kultivácia, svetelná mikroskopia v tmavom poli a polymerázová reťazová reakcia, histologický dôkaz, elektrónová mikroskopia, DNA-hybridizácia

**b) nepriame:** imunofluorescencia, Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), Western blot (WB) [2, 8].

Na potvrdenie aktívnej infekcie je najlepšou metódou kultivácia, ktorá je štandardnou technikou u väčšiny bakteriálnych nákaz. V prípade borrelií však ide o časovo a finančne náročnú techniku s nízkou výťažnosťou. Napriek tomu je stále viac používaná, najmä v rôznych výskumoch. Dostupnosť kultivovaných organizmov totiž poskytuje možnosti pre štúdium štruktúrnych, molekulárnych, antigénnych a patogenetických charakteristík odlišných druhov *B. burgdorferi* sensu lato [2, 17].

### 1.8.1 Metódy priame

#### A) Kultivácia

Kultivácia umožňuje dôkaz živých borrelií v organizme. Jej cieľom je potvrdenie diagnózy a spätné overenie prebehnutej infekcie. Kultivačne je možné dokázať perzistenciu infekcie v kožných léziách, disemináciu do rôznych orgánov, a to aj niekoľko týždňov až rokov po infekcii [1, 2].

Kultivácia je štandardom v laboratórnej diagnostike, ale s ohľadom na dočasnú spirochetémiu je izolácia z krvi náročná. V dôsledku nízkeho počtu životaschopných borrelií v bioptických vzorkách a ich náročnosť na kultivačné podmienky, sa variabilita pohybuje v širokom rozmedzí (1-70 %). Negatívne výsledky však nevylučujú aktívnu infekciu. Kultivácia je používaná najmä vo výskumných štúdiách pre porozumenie klinickým, laboratórnym a patogenetickým aspektom lymeskej borreliózy. V klinickej praxi nie je rutinne používaná hlavne pre pracnosť, finančnú a časovú náročnosť [2, 17, 21].

Kultivácia borrelií je veľmi náročná. *In vitro* rastú v mikroaerofilných podmienkach pri teplote 30-37°C po dobu až 12 týždňov. Vyžadujú vysoko obohatenú komplexnú pôdu, najpoužívanejšia je Barbour-Stoener-Kellyho (BSK), ktorá obsahuje aminokyseliny, N-acetylglukosamin, vitamíny a nukleotidy, králičie alebo konské sérum a ďalšie zložky. Práve preparáty králičieho a konského séru môžu obsahovať antispirochétové protilátky, čím brzdia rast borrelií. Každé nové balenie séra je nutné otestovať pomocou Western Blot. Rast borrelií ovplyvňujú aj faktory ako osmotický tlak, slnečné svetlo, UV žiarenie, pH prostredia (pH 7,5), oxidoredukčný potenciál [1, 7, 9, 17].

Borrélie sa dobre farbja anilínovými farbivami, je možné ich znázorniť Giemsovým farbením alebo striebrom [9].

Odber a prípravu klinického materiálu je nutné vykonávať za prísne sterilných podmienok. Identifikácia *B. burgdorferi* sensu lato sa uskutočňuje z mnohých odlišných tkanív a telesných tekutín pacientov s lymeskou borreliózou, ako sú biopsia a laváž *erythema migrans*, biopsia *acrodermatitis chronica atrophicans*, boreliového lymfocytómu, vzorky krvi, CSF alebo synoviálnej tekutiny. Zaujímavou metódou odberu vzorky je laváž lézie *erythema migrans*. Do postihnutého miesta sa vstrekuje fyziologický roztok a následne sa vytiahne. Hoci táto technika má nižšiu senzitivitu, jej výhodou je nižšia invazívnosť oproti biopsii [1, 17].

Záchyt borrelií z krvi alebo krvných komponentov u európskych pacientov je veľmi nízky (pod 10 %). Dôvodom môže byť aj fakt, že v Európe je príčinou kožných prejavov hlavne *B. afzelii*, ktorá sa zriedka šíri hematogénnou cestou [17].

Práca amerických autorov však uvádza, že výt'azok môže byť výrazne vyšší, ak sa na kultiváciu použije len plazma a kultivovaný objem sa zvýši na 9 ml. Výt'aznosť ďalej podporuje následné použitie qPCR na detekciu borreliovej DNA. [28]

### ***B) Svetelná mikroskopia v tmavom poli***

Predstavuje jednu z najstarších mikroskopických metód a slúži na pozorovanie malých alebo pohyblivých objektov. Jej základom je tzv. Tyndalov jav, kedy pozorovaný objekt nie je osvetľovaný priamo, ale svetlo na neho dopadá z boku, čím vzniká efekt žiarenia. Používa sa na rýchly dôkaz pohyblivých spirochét [1, 8].

### ***C) Histologický dôkaz***

Histologický dôkaz borrelií sa uskutočňuje v rozteroch farbených Giemsom a toulidínovou modrou alebo striebrením 1% dusičnanom strieborným a natrávením amlázou. Obe techniky sú použiteľné na histologických rezoch tkanív zaliatých do parafínu alebo živice. Priamy dôkaz je špecifický iba s použitím monoklonálnych protilátok proti povrchovým antigénom [1, 2].

#### **D) Elektrónová mikroskopia**

Elektrónoptický dôkaz predstavuje zhodnotenie morfológie baktérie (rozmery, bičičky, ...) a imunocytochemickú reakciu antigénu (Ag) s monoklonálnou protilátkou v ultrarezoch alebo bunkovom sedimente získanom centrifugáciou. Negatívne farbenie sa dosiahne použitím 1% kyseliny fosfowolframovej alebo 1-8% uranylacetátom.

Technika imunosorbentnej elektrónovej mikroskopie (ISEM) je založená na reakcii Ag so špecifickou Ab na pevnom sorbetne – mikroskopická sieťka. Následne dochádza ku konjugácii adsorbovaného Ag s monoklonálnou protilátkou značenou zlatom. Táto metóda predstavuje jasný dôkaz infekcie u seronegatívnych pacientov [1, 2].

#### **E) Polymerázová reťazová reakcia – PCR**

##### **Základné princípy PCR**

Polymerázová reťazová reakcia umožňuje *in vitro* enzymatickú syntézu a amplifikáciu špecifických sekvencií nukleových kyselín. Využíva opakovanie cyklov syntézy DNA podobným spôsobom ako prebieha *in vivo* DNA replikácia. DNA je možné amplifikovať priamo, RNA je nutné najprv reverzne transkribovať do cDNA a až následne túto amplifikovať [29].

Proces replikácie začína jednou molekulou dvojreťazcovej DNA označovanej matricová (terčová, templátová). Úsek DNA určený na amplifikáciu je definovaný párom oligonukleotidových primerov. Ide o synteticky pripravené krátke úseky DNA, ktorých 3' konce slúžia ako začiatkové miesta pre replikáciu [29].

Vďaka vysokej citlivosti umožňuje PCR zachytenie aj veľmi malého množstva nukleovej kyseliny vo vzorke. Základom úspešnej reakcie je použitie neporušeného úseku DNA matrice a tiež navrhnutie vhodných primerov na zaistenie špecifickosti reakcie [30, 31].

##### **Mechanizmus amplifikačnej reakcie**

Amplifikácia DNA pomocou PCR prebieha v troch opakujúcich sa krokoch:

1. Denaturácia – pri teplote 95 °C dochádza k oddeleniu jednotlivých vlákien DNA templátu, čo umožní hybridizáciu primerov. Je dôležité, aby nastala kompletná



denaturácia oboch vlákien. Inak by mohlo dôjsť k rýchlej renaturácii celej molekuly, čo by zabránilo interakcii s primermi [30, 31].

2. Hybridizácia (annealing) – pripojenie primerov na špecifické komplementárne miesta k denaturovanému templátu DNA. Uskutočňuje sa pri teplote 40-72 °C, v závislosti od dĺžky primerov a zastúpenia A-T a C-G párov. Túto teplotu je možné vyčítať priamo z údajov výrobcu primerov. Pre jej výpočet existuje viacero postupov. Primery sú orientované v smere 5' → 3' a pripájajú sa na 3' konce komplementárnej DNA [3, 13, 30].

3. Rast (expanzia, elongácia) DNA vlákna – enzým DNA polymeráza prikladá k 3'OH koncu primera deoxyribonukleotidy (dATP, dCTP, dTTP, dGTP) podľa komplementárnej sekvencie templátu až je celá terčová DNA replikovaná. Prebieha pri teplote 72–75 °C, ktorá je optimom pre *Taq* DNA polymerázu [30, 31].

Počet molekúl DNA sa po každom cykle zdvojnásobí. Reťazová reakcia poskytuje exponenciálnou amplifikáciou originálnu DNA, pričom počet cyklov (n) určuje koľko kópií je vytvorených (2n) [29, 30].

### **Reakčné zložky PCR**

- Vzorok – úsek izolovanej dvojvláknovej DNA, ktorý obsahuje sekvenciu vymedzenú primermi.
- Primery – dva oligonukleotidy (o dĺžke cca 18–30 nukleotidov) ohraničujúce úsek DNA určený na amplifikáciu.
- Termofilná DNA polymeráza.
- Štyri deoxyribonucleozidtrifosfáty - dATP, dCTP, dTTP, dGTP.
- Vhodný základný reakčný roztok s primeranou koncentráciou solí (Mg<sup>2+</sup>), pH reakčného prostredia musí byť v rozmedzí 8,3 - 9 [30, 31].

### **PCR v diagnostike lymeskej borreliózy**

PCR predstavuje priamy, vysoko špecifický test na detekciu DNA *B. burgdorferi*. Vyznačuje sa vysokou citlivosťou a vďaka tomu môže byť veľmi nápomocnou technikou pri detekcii a identifikácii rozsiahleho množstva vybraných patogénov, dokáže zachytiť aj menej než 10 borrelií vo vzorke. Limitujúcim faktorom pri detekcii *B. burgdorferi* sensu lato v klinických vzorkách je prechodná spirochetémia a relatívna náročnosť pri získaní borrelií zo vzorky. Takisto nie je možné pomocou

konvenčných DNA techník určiť, či je infekcia aktívna alebo nie. V súčasnosti nie sú cieľové sekvencie a primery používané pri analýze štandardizované a teda výsledky pochádzajúce z rôznych laboratórií sa môžu výrazne líšiť. Ďalším negatívom je predovšetkým finančná a manuálna náročnosť a tiež ľahká kontaminácia vzoriek inou DNA. Napriek spomínaným nevýhodám, v správnom prevedení môže táto technika ponúknuť použiteľnú diagnostickú podporu v zložitých prípadoch [2, 21].

Zatiaľ čo v USA je jediným patogénnym druhom spôsobujúcim lymeskú borreliózu *B. burgdorferi* sensu stricto, v Európe sa k nej pridávajú aj *B. garinii* a *B. afzelii*. Práve táto heterogenita európskych kmeňov musí byť vzatá do úvahy najmä pri vývoji diagnostických nástrojov, ako PCR primery a diagnostické antigény. Dôležitá je istota, že PCR detekuje práve spomínané tri patogénne druhy, pretože je schopná detekovať aj *B. valaisiana* a nedávno popísaný druh *B. spielmanii*, ktoré môžu byť tiež patogénne pre človeka [5, 32].

### **PCR analýza klinických vzoriek**

Z dôvodu nízkeho počtu spirochét v telesných tekutinách pacientov a v infekčnom tkanive sú pre spoľahlivé výsledky PCR analýzy kľúčovými krokmi odber, transport a príprava DNA izolátu z klinického materiálu. Počas týchto úkonov môže totiž dôjsť k degradácii DNA *B. burgdorferi* sensu lato [17, 27].

Pri skladovaní vzorky v BSK médiu po viac ako 24 hodín, môže dôjsť k migrácii spirochét do kultivačného média. Za týchto podmienok by mala byť DNA pripravená z kožnej biopsie aj z média analyzovaná samostatne. Alternatívou je zozbieranie spirochét z média centrifugáciou a ich spoločná analýza spolu s tými zo vzorky tkaniva. Vzorky biologického materiálu by mali byť po odobratí podrobené DNA extrakcii a následne PCR analýze, alebo by mali byť uskladnené zmrazením [17].

Jedným z problémov je možnosť interferencie hostiteľskej DNA pri detekcii DNA *B. burgdorferi* sensu lato v klinických vzorkách alebo vo vzorkách z kliešťov. Taktiež je to prítomnosť PCR inhibítorov, ktoré môžu byť minimalizované zriedením extrahovanej DNA [17].

Výsledok PCR môže byť kvalitatívny alebo kvantitatívny. Pre laboratórnu diagnostiku borreliovej infekcie zvyčajne postačuje kvalitatívna analýza, teda dôkaz

prítomnosti či neprítomnosti hľadanej DNA [1, 8, 17].

Úspešnosť a výkon PCR je závislý od niekoľkých faktorov, ako výber zodpovedajúcej cieľovej sekvencie a primerov pre PCR amplifikáciu, ďalej čistota a množstvo DNA. V klinických laboratóriách medzi najpoužívanejšie cieľové sekvencie patria napr. plazmidové gény ako *ospA* a *ospB*, chromozomálne gény ako tie pre flagelový proteín *p66* (klon 2H1), alebo génové segmenty 16S rRNA alebo 5S/23S rRNA. Avšak pre určenie najvhodnejšej metódy stále chýbajú veľké porovnávacie štúdie [1, 17, 32].

Vo všeobecnosti nie je možná štandardizácia diagnostických testov pre PCR a to predovšetkým v Európe, kde je diagnostika sťažená rôznou sekvenciou DNA odlišných rôznych genodruhov a subtypov *B. burgdorferi* sensu lato [1].

Medzi cieľové sekvencie používané pre detekciu DNA *B. burgdorferi* sensu lato v kožných biopsických vzorkách patrí *p66*, 16S rRNA, *fla*, 23S rRNA, 5S rRNA-23S rRNA, *recA* a *ospA*. Senzitivita PCR pre detekciu *B. burgdorferi* sensu lato DNA vo vzorkách *erythema migrans* a *acrodermatitis chronica atrophicans* je pravdepodobne závislá od cieľovej sekvencie [17].

Vo všeobecnosti je senzitivita PCR detekcie *B. burgdorferi* sensu lato DNA v krvi, plazme alebo sére pacientov s lymeskou borreliózou nízka. Nízky výťažok môže byť dôsledkom neprítomnosti spirochetémie, prechodnej spirochetémie a taktiež možnou prítomnosťou PCR inhibítorov v krvi pacienta [17, 27].

Jedna zo štúdií uvádza koreláciu medzi spirochetémiou potvrdenou pomocou PCR u pacientov s *erythema migrans*, mnohopočetnými *erythema migrans* a prítomnosťou zodpovedajúcich symptómov. Táto analýza indikuje, že silným prediktívnym faktorom PCR pozitivity je prítomnosť systémových symptómov [17].

Senzitivita PCR detekcie *B. burgdorferi* sensu lato DNA vo vzorkách CSF môže byť závislá na klinických prejavoch, počte bielych krviniek v CSF, trvaní ochorenia a či bola podaná ATB terapia. V PCR diagnostike boli použité 4 odlišné PCR primery, tri zamerané na *OspA* gény a jeden zameraný na *OspB* gén. Zhoda medzi oboma odlišnými technikami bola veľmi slabá [17].

Pre detekciu prítomnosti *B. burgdorferi* sensu lato v synoviálnej tekutine u pacientov s lymeskou artritídou je PCR oveľa citlivejšia ako kultivácia. Podanie

antibiotík však výrazne znižuje citlivosť reakcie [17, 24].

Úspešnosť detekcie DNA *B. burgdorferi* sensu lato zo vzoriek synoviálnej tekutiny závisí na použitých primeroch a trvaní ATB terapie. Zaujímavosťou je, že DNA borrelií bola nájdená v synoviálnej membráne u pacientov, ktorých synoviálna tekutina bola pri PCR analýze negatívna [17].

Zaujímavé môžu byť nové testovacie systémy, ktoré využívajú elektromagnetické signály generované bakteriálnymi DNA sekvenciami a v budúcnosti môžu zohrať úlohu v diagnostike lymeskej borreliózy [33].

### **Senzitivita a špecifickosť PCR**

Senzitivita detekcie borreliovej DNA v krvi pacientov (plazma, sérum) a vo vzorkách CSF je nízka. Opakom je analýza synoviálnej tekutiny u pacientov s lymeskou artritídou, kde je senzitivita vyššia. Napriek tomu, že citlivosť PCR detekcie borreliovej DNA v kožných biopsiách od pacientov s *erythema migrans* je pomerne vysoká, málo kedy je toto testovanie nevyhnutné. Diagnózu je totiž možné určiť zo špecifického vzhľadu kožnej lézie [17, 27].

U väčšiny pacientov je výsledok PCR po liečbe antibiotikami negatívny. Avšak detekciu DNA *B. burgdorferi* v plazme, moči a CSF počas liečby alebo krátko po nej je možné vysvetliť vysokou senzitivitou PCR metódy a zvyšujúcim sa množstvom mŕtvych spirochét, ktoré sú účinkom liekov uvoľnené z tkanív [1].

PCR a WB sú odporúčanými metódami pre testovanie synoviálnej tekutiny pri dôkaze lymeskej artritídy. PCR a ISEM sú metódy vhodné na analýzu CSF pacientov s podozrením na neuroborreliózu, zvlášť v prípade, keď sú protilátky negatívne [1].

### **Detekcia PCR produktu**

Na identifikáciu, separáciu a purifikáciu fragmentov DNA slúži elektroforéza v agarózovom alebo polyakrylamidovom géli. Separácia fragmentov DNA prebieha v elektrickom poli v závislosti na ich veľkosti. Rozdelené fragmenty DNA je možné izolovať z gélu a použiť pre ďalšie práce. Vhodné podmienky pre delenie fragmentov v rôznom rozpätí molekulových hmotností je možné zaistiť výberom typu a koncentrácie gélu [29, 31].

Metódou PCR v reálnom čase (real-time PCR) je možné kvantifikovať prírastok množstva nukleovej kyseliny v priebehu reakcie pomocou špecifickej teploty topenia v reakcii so SYBR Green I alebo využitím fluorescenčne označených hybridizačných sond (TaqMan). Výhodou je rýchlosť, viacfarebná optická detekcia v každom cykle, jednoduché odlíšenie špecifickej teploty topenia produktu od nešpecifickej, vysoká citlivosť, možnosť opakovaných reakcií (nested, multiplex, multilocus) v jednej kapiláre, čo znižuje riziko kontaminácie [1].

## 1.8.2 Metódy nepriame

Nepriame metódy slúžia na detekciu protilátok v triede IgG a IgM namierených proti *B. burgdorferi* sensu lato, ktoré sú prítomné v krvnom sére, mozgomiechovom moku alebo synoviálnej tekutine. Najčastejšie používanými testami sú nepriama imunofluorescencia (IFA), ELISA a Western blot [1, 2].

Práve serológia je prvým a zvyčajne aj jediným diagnostickým postupom, pretože umožňuje jednoduché získanie biologického materiálu, testovacie súpravy sú široko dostupné a aj napriek rôznym nejasnostiam a nedostatkom majú akceptovateľnú senzitivitu a špecifickosť [2, 21].

### A) Nepriama imunofluorescencia

Základom tejto metódy je reakcia protilátok v triede IgM a IgG so substrátom naneseným na sklíčka. Substrát predstavujú bunky infikované borreliami alebo samotné borrelie. Následne sa pridá antiľudská protilátka konjugovaná s fluoresceín-isotiokyanátom a nastane jej väzba na ľudské imunoglobulíny, reakciu detekujeme pomocou fluorescenčného mikroskopu. Riedením séra je možné stanoviť titer protilátok. Nevýhodou tejto techniky je potreba fluorescenčného mikroskopu, skúseného pracovníka, taktiež subjektívne hodnotenie a interpretácie výsledkov [1, 2, 17].

## **B) Enzyme Linked Immunosorbent Assay – ELISA**

### **Základné princípy metódy ELISA**

V klinickej praxi a základnom výskume patrí ELISA k najpoužívanejším imunochemickým metódam. Slúži na detekciu a kvantifikáciu protilátok, antigénov a k štúdiu štruktúry antigénov v telesných tekutinách, homogenátoch a tkanivových extraktoch.

Princípom metódy je imunochemická reakcia s enzymatickou detekciou, čo umožňuje stanoviť koncentráciu protilátky alebo antigénu v neznámej vzorke [29, 34].

Metóda využíva schopnosť väzby proteínov (imunoglobulínov) na povrch umelej hmoty a tiež schopnosť viazať enzýmy na Fc fragmenty imunoglobulínových molekúl [8]. Miestom reakcie je mikrotitračná doštička s 96 jamkami. Na steny jamiek je chemicky alebo absorpciou naviazaný antigén. K nemu sa pridá riedené vyšetované sérum a inkubuje sa určitú dobu. Nenaviazané zložky sa vymyjú. Prípadná reakcia medzi antigénom a špecifickou protilátkou prítomnou v sére sa vizualizuje prostredníctvom detekčnej protilátky s naviazaným substrátom (konjugát). Nenaviazaný konjugát je z reakčnej zmesi odstránený premytím. Viazaný konjugát je inkubovaný s enzymovým substrátom a poskytuje farebnú reakciu [34].

Základné vybavenie pre ELISA metódy predstavuje tzv. ELISA-reader. Ide o modifikovaný spektrofotometer umožňujúci meranie farebnej reakcie pri rôznych vlnových dĺžkach. Je upravený na odčítanie z mikrotitračných doštičiek. Výsledok, jednotky protilátok, sa vypočíta zmeraním optickej denzity a z riedenia pacientovho a referenčného séra. Konečným výsledkom je hodnotenie pozitívne – hraničné – negatívne. Kvantitatívne určenie množstva protilátok je len orientačné [2, 8, 34].

Výhodou metódy ELISA je citlivosť, špecifickosť a reprodukovateľnosť. ELISA metódy sa používajú hlavne na stanovenie proteínov (protilátok), ktoré sú prítomné v sére v nízkych koncentráciách, na stanovenie autoprottilátok o známej špecifickosti, špecifických protilátok proti očkovacím antigénom a proti infekčným činiteľom mikrobiálnym, parazitárnym aj vírusovým, na stanovenie cytokínov a ďalších látok [34].

## **ELISA v diagnostike lymeskej borreliózy**

ELISA patrí medzi najčastejšie používané serologické metódy. Jej cieľom je detekcia protilátok, predovšetkým v triede IgG a IgM, ktoré sú prítomné v sére pacienta, ale aj v mozgomiechovom moku a synoviálnej tekutine a reagujú s antigénmi v diagnostických setoch.

Komplexnosť antigénneho zloženia *B. burgdorferi* sensu lato je výzvou pre serodiagnostiku lymeskej borreliózy práve pre odlišnosť exprimovania jednotlivých antigénov v tele vektora a v hostiteľovi, pričom niektoré sú výlučne exprimované *in vivo* v infikovanom cicavčom hostiteľovi. Okrem toho existujú antigénne rozdiely medzi jednotlivými druhmi *B. burgdorferi* sensu lato spôsobujúcimi borreliózu. Priama detekcia borrelií v klinických vzorkách má svoje značné obmedzenia, preto sa serologická diagnostika dostáva do úlohy hlavnej laboratórnej metódy na podporu klinickej diagnózy lymeskej borreliózy [17].

## **Jednotlivé antigény a ich význam v diagnostike**

Ako antigén pre serologickú analýzu slúžia celé telá borrelií alebo umelo pripravené rekombinantné antigény. Pre ich použitie je dôležité poznanie génov, ktoré kódujú dané antigénne proteíny, výroba ich syntetických kópií a následne klonovanie pomocou *E. coli*. Momentálne sú dostupné rekombinantné antigény OspA, OspC, VlsE, flagelin, proteín p39 a p83. Problémom zostáva úzka špecifickosť rekombinantných OspA, OspB, OspC, OspF, OspD antigénov pre rôzne druhy (*B. burgdorferi*, *B. afzelii*, *B. garinii*) a taktiež protilátky proti nim, ktoré sa tvoria (s výnimkou OspC) relatívne neskoro a niekedy sa u ľudí nevytvoria vôbec [1, 2, 8, 25].

Pre *B. afzelii* a *B. garinii* sú špecifické antigény p39, p56, p14, p18, ktoré je však náročné pripraviť v rekombinantnej forme. Vo špecifickej RE ELISA (Biotest AG, Dreieich, Nemecko) boli použité rekombinantné vnútorné fragmenty flagelinu *B. garinii* a *B. afzelii* so zmesou antigénov p100, p39, OspC, p18, ktorých celková senzitivita bola 97% pre IgG a 92,4% pre IgM [1].

V novej generácii ELISA testov by mala byť vyššia senzitivita a špecifickosť pre viacero spoločných antigénov *B. burgdorferi* sensu lato, ako tri OspA, OspB, OspC, BmpA a MEP. Väčšina aktuálne používaných celobunkových testov ELISA je reaktívna proti 41kD, 58kD, 60kD, 66kD, 72kD proteínom. Aj napriek tomu, že tieto antigény sú súčasťou bunky *B. burgdorferi* sensu lato, vykazujú značnú skříženú reaktivitu

s nepatogénnymi spirochétami, šokovými antigénmi a s niektorými vírusmi (napr. EBV). Skríženú reaktivitu je možné znížiť vysytením vyšetrovaného séra sorbentom – absorpciou skrížene reagujúcich protilátok [1, 2].

Najvyššie hladiny špecifických IgM protilátok nachádzame medzi 3.-8. týždňom od začiatku symptómov a u väčšiny pacientov dochádza k ich postupnému poklesu. Sú namierené hlavne proti p41-flagelinu a OspC. Flagelový proteín - flagelin (41kD) predstavuje imunodominantný antigén borrelií. Na základe tejto skutočnosti, niektoré imunometódy obsahujú purifikovaný flagelový antigén samostatne, iné pridávajú flagelin k obohateniu antigénneho mixu. Veľkou nevýhodou je jeho značná skrížená reaktivita. Niektoré flagelové epitopy sú prítomné aj v tkanivách cicavcov, ako nervové tkanivo, synovie, srdcový sval. Vnútorňá časť flagelovej molekuly obsahuje variabilnú, druhovo špecifickú imunodominantnú oblasť, ktorá vykazuje nižšiu skríženú reaktivitu s antigénmi iných baktérií ako celý proteín. Flagelový vonkajší obal – proteín FlaA (37kD), patrí tiež k imunodominantným antigénom, hlavne v skorej fáze ochorenia [1, 2, 17].

Ďalší imunodominantný antigén predstavuje plazmidom kódovaný OspC proteín (21-25kD). Borrelié, ktoré sú dlhodobo kultivované *in vitro* neexprimujú OspC, čo vysvetľuje skutočnosť, že tento antigén nebol rozpoznávaný v skorších štúdiách, ktoré používali dlhodobo kultivované *B. burgdorferi* sensu lato ako zdroj antigénu. OspC je heterogénny a rozdiely v sekvenciách aminokyselín existujú medzi jednotlivými druhmi *B. burgdorferi* sensu lato. Výskum imunogénnych, konzervatívnych epitopov vrámci OspC proteínu viedol k vytvoreniu syntetického peptidu, ktorý obsahuje konzervatívny C-koniec s 10 aminokyselinami OspC proteínu (pepC10) [1, 2, 17].

Po rozšírení infekcie krvnou alebo lymfatickou cestou sa vytvárajú protilátky IgM proti antigénu p83. Reakcia IgM s OspA svedčí o relapse infekcie alebo o neskorej borrelióze. Vysoké hladiny IgM môžu pretrvávajúť počas celého priebehu ochorenia, alebo naopak ich môžeme detekovať až po ukončení terapie bez ohľadu na jej úspešnosť [1].

IgG protilátky predstavujú individuálne variabilnú a mnohokrát nepredvídateľnú imunitnú odpoveď organizmu na antigény, ktoré sú rozpoznávané neskôr. IgG protilátky sú najvyššie počas neskorých manifestácií a sa zvyčajne sa objavujú v neprítomnosti IgM. Môžu zostať detekovateľné aj niekoľko rokov. Stabilne pozitívny titer po liečbe



nemusi byť dôsledkom neúčinnnej terapie alebo perzistencie spirochét v organizme. Zo skúseností je známe, že v prípade väčšiny serologických testov negatívny výsledok vo včasnom štádiu nevylučuje ochorenie [2, 15].

Nedávne štúdie upozornili na chemokín CXCL13, ktorého úlohou je prilákanie B-buniek. Táto látka je vo zvýšených hladinách dokázateľná v CSF u pacientov s potvrdenou neuroboreliózou v skorom štádiu. V uskutočnenej štúdií dosiahla diagnostická senzitivita CXCL13 v ELISA teste v CSF 100 % v prípadoch skorej neuroboreliózy, špecifickosť bola 63 %. K normalizácii hodnôt došlo u 82 % 4 mesiace po terapii. Tento test môže byť nápomocný v prípade seronegatívnych pacientov v skorej fáze ochorenia, ako kontrola terapie a teda predstavuje sľubný diagnosticko-liečebný marker neuroboreliózy do budúcnosti [13, 25].

### **Detekcia protilátok a hodnotenie výsledkov**

Pre štandardizáciu serologických metód bolo dôležité zavedenie dvojfázového testu, ktorý určuje použitie screeningovej, vysoko senzitívnej ELISA a následné použitie Western blotu s vysokou špecifickosťou, ako metódu konfirmácie pozitívnych a hraničných výsledkov. Problém predstavuje použitie rôznych druhov a kmeňov *B. burgdorferi* sensu lato ako antigénu v ELISA a WB, čo má za následok nesúlad výsledkov [1, 15, 21, 24].

Pri diagnostike neuroboreliózy je dôležité serologické vyšetrenie CSF. Ako metóda slúži stanovenie indexu CSF/sérum. Predstavuje spojenie imunologického testu, ktorý meria špecifické protilátky v sére a v CSF. Výsledok je založený na kvantifikácii IgG protilátok v sére a v CSF. Citlivosť tohto testu je však nízka a negatívny výsledok nevylučuje neuroboreliózu. Je dôležité si uvedomiť, že pozitívny index môže pretrvávajúť dlhodobo aj po vymiznutí infekcie z CNS, ale zápalové parametre vymiznú v priebehu niekoľkých mesiacov [1, 21].

Takmer u všetkých imunokompetentných pacientov s neskorými manifestáciami (neuroborelióza, *acrodermatitis chronica atrophicans*, lymeská artritída) je prítomná pozitivita IgG protilátkovej odpovede. Seronegativita v neskorom štádiu lymeskej borreliózy je mimoriadne vzácna [21].

Pri hodnotení je nevyhnutné brať do úvahy falošne pozitívne aj falošne negatívne výsledky, ktorých dôvodom je hlavne prijatie neadekvátnych CUT-OFF hodnôt, prítomnosť skríženej reaktivity alebo falošne pozitívne reakcie v dôsledku autoimunitného ochorenia. Humorálna odpoveď imunitného systému je veľmi komplexná a individuálne premenlivá, predovšetkým vo vzťahu k jednotlivým antigénom borrelií [2, 21].

Pri interpretácii výsledkov serologických testov je potrebné myslieť aj na epidemiologickú anamnézu a klinický stav pacienta. Až potom predstavuje serológia užitočnú informáciu na doplnenie klinickej diagnózy. Pravdepodobnosť, že pozitívna serológia u pacienta skutočne odráža prebiehajúce ochorenie a pravdepodobnosť, že pacient s negatívnym výsledkom testu ochorenie nemá, závisí na charakteristikách danej metódy (senzitivita a špecifickosť) a na prevalencii ochorenia v populácii. Svoju úlohu zohráva aj podanie ATB, ktoré znižujú protilátkovú odpoveď. Význam výsledkov testov na protilátky proti *B. burgdorferi* sensu lato musí byť interpretovaný s opatnosťou, hlavne mimo endemických oblastí [2, 21, 24].

ELISA má oproti iným imunometódam výhody, ako jednoduché testovanie, objektívne vytváranie číselných hodnôt, ktoré korelujú v relatívnych číslach s množstvom prítomných protilátok a schopnosť automatizácie [17].

### **C) Western blot**

Cieľom tejto metódy je dôkaz úzko špecifickej protilátkovej odpovede. Oproti metóde ELISA je Western blot časovo náročnejší a drahší, ale má vyššiu špecifickosť.

Jeho princípom je detekcia protilátok, ktoré sú namierené proti konkrétnym antigénom. Používa sa najmä na overenie pozitivity ELISA testov a pri nejasných výsledkoch [2, 8].

Výšetrenie je možné rozdeliť do troch krokov:

- 1. rozdelenie borreliových proteínov** (z rozrušených celých buniek *B. burgdorferi*) elektroforézou na základe odlišnej molekulovej hmotnosti na polyakrylovom géli,
- 2. prenos rozdelených antigénov na mikrocelulózovú alebo nylonovú membránu** a ich následná inkubácia so vzorkou séra. Po pridaní vyšetřovaného séra sa špecifické protilátky proti jednotlivým Ag naviažu na dané antigény,

**3. vizualizácia naviazanej protilátky pomocou rádioaktívnej látky alebo farby,** čo umožňuje detekciu prúžkov, ktoré predstavujú komplex jednotlivých antigénov a špecifickej protilátky [2].

Serologická odozva nie je u európskych pacientov tak výrazná ako v USA, a to v akútnej, aj v neskorej borrelióze.

WB by mal byť prispôsobený na populáciu danej geografickej oblasti, vyrobený pokiaľ možno s endemickým genodruhom a lokálnym kmeňom. Kmene dlho rastúce v BSK pôde sa nesmú používať, pretože u nich dochádza k strate plazmidov. Najvhodnejšie je použitie izolátov už adaptovaných na človeka [1].

Výsledkom vyšetrenia je súbor špecifických proteínov (bakteriálnych antigénov), ktoré boli rozpoznané protilátkami v pacientovom sére. Na potvrdenie diagnózy lymeskej borreliózy je nutná detekcia prítomnosti protilátok proti konkrétnemu počtu presne určených antigénov borrelié [2].

Aj napriek množstvu nedostatkov patria medzi najčastejšie používané diagnostické postupy práve serologické vyšetrenia. Limitujúca je ich nízka senzitivita a často sa vyskytujúce pretrvávanie zvýšených titrov protilátok u pacientov bez prejavov ochorenia. Či sú zvýšené titre prejavom prekonanej subklinickej infekcie, nie je celkom objasnené. Problémom pri serologických vyšetreniach lymeskej borreliózy je takisto výrazná odlišnosť výsledkov medzi jednotlivými laboratóriami [2].

## 2 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

### 2.1 Výber pacientov a vyšetrovaný materiál

Na základe náhodného výberu bolo vybraných 113 pacientov, ktorých biologický materiál bol vyšetrovaný serologickou metódou ELISA na prítomnosť protilátok v triede IgG a IgM proti *B. burgdorferi* sensu lato a metódou PCR na prítomnosť DNA *B. burgdorferi* sensu lato. V tomto súbore sa nachádzalo 55 mužov a 58 žien. Vekový priemer mužov predstavoval  $47,31 \pm 28,32$  (vekové rozmedzie 5 – 88 rokov), vekový priemer žien  $47,31 \pm 26,95$  (vekové rozmedzie 6 – 87 rokov) a vekový priemer mužov a žien dohromady sa pohyboval v rozmedzí  $47,31 \pm 27,5$  (vekové rozmedzie 5 – 88 rokov).

### 2.2 Vyšetrenie vzoriek biologického materiálu na prítomnosť protilátok proti *B. burgdorferi* sensu lato metódou ELISA

Pomocou imunoenzymoanalytickej súpravy EIA Borrelia recombinant IgG/IgM (192) boli vyšetrené vzorky séra a likvoru na prítomnosť protilátok proti *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Súprava slúži na stanovenie prítomnosti protilátok aj v plazme, mozgomiechovom moku alebo synoviálnej tekutine a k dôkazu intratekálnej syntézy špecifických protilátok. Je možné ňou vykonať 192 testov.

EIA Borrelia recombinant IgG/IgM (192) predstavuje imunoenzymoanalytickú súpravu III. generácie s vysokou diagnostickou citlivosťou a špecifickosťou. Používa sa pre screeningové stanovenie antiborreliových protilátok a dôkaz intratekálnej syntézy u pacientov s podozrením na neuroboreliózu.

#### 2.2.1 Princíp testu

Súprava slúži na stanovenie antiborreliových protilátok triedy IgG/IgM v ľudskom sére alebo plazme. Na vnútornom povrchu mikrotitračnej doštičky sú imobilizované antigény. Špecifické protilátky prítomné vo vyšetrovanej vzorke

sa naviažu na imobilizovaný antigén, na nich sa v ďalšom kroku viaže zvieracia protilátka proti ľudskému IgG/IgM označená chrenovou peroxidázou. Peroxidázová aktivita viazaná na pevnú fázu je následne semikvantitatívne detekovaná použitím chromogénneho substrátu s tetrametylbenzidínom (TMB). Pozitívna reakcia sa prejavuje modrým zafarbením, ktoré sa pridaním zastavovacieho roztoku zmení na žlté. Jeho intenzita sa meria na fotometri pri vlnovej dĺžke 450 nm.

Ako antigén je v súprave EIA *Borrelia recombinant IgG* (192) použitá kombinácia vybraných častí špecifických antigénov (VlsE, p83, vnútorný flagelin – p41i, p39, OspC a p17) druhov *B. burgdorferi* sensu lato. V prípade stanovenia IgM pomocou EIA *Borrelia recombinant IgM* (192) je to kombinácia vybraných častí špecifických antigénov (vnútorný flagelin – p41i, p39, OspC) druhov *B. burgdorferi* sensu lato.

### 2.2.2 Zloženie diagnostickej súpravy

- Potiahnutá doštička s naviazaným antigénom o veľkosti 12 x 8 jamiek, v sáčku so sušidlom
- Negatívna kontrola (NK) – ľudské sérum bez protilátok proti borreliám, v pracovnom riedení
- CUT OFF – ľudské sérum s obsahom protilátok proti borreliám v hraničnej koncentrácii, v pracovnom riedení
- Pozitívna kontrola (PK) – ľudské sérum s obsahom protilátok proti borreliám, v pracovnom riedení
- Konjugát – zvierací imunoglobulín proti ľudským IgG/IgM označený peroxidázou, v pracovnom riedení
- Roztok na riedenie vzoriek – pufoer so stabilizátormi bielkovín
- TMB – Complete – jednozložkový chromogénny substrátový roztok s obsahom TMB a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- Premývací roztok (20x koncentrovaný) – koncentrovaný pufoer
- Zastavovací roztok – obsahuje 1 mol/l kyselinu sírovú

#### Potrebné laboratórne pomôcky

- diagnostická súprava EIA Borrelia recombinant IgG/IgM (192)
- jedno- a viackanálové pipety na 10 – 1000 µl a špičky pre jednorázové použitie
- skúmavky na riedenie vzoriek
- premývacie zariadenie
- stopky
- termostat na 37°C
- fotometer pre mikrotitračné doštičky (ELISA reader)

### ***Príprava pracovných roztokov a vzoriek***

#### **Premývací roztok**

Koncentrovaný premývací roztok riedime v pomere 1+19, ostatné reagenty sú už v pracovnom riedení.

#### **Príprava vzoriek**

Pre stanovenie špecifických protilátok zo séra a plazmy je potrebné vzorky dôkladne premiešať. Následne sa riedia: 1+100 riediacim roztokom vzoriek (10 µl vzorky + 1 ml riediaceho roztoku vzoriek).

Pri stanovení hladiny špecifických protilátok zo vzoriek mozgomiechového moku (likvoru) platí: Po dôkladnom premiešaní sa likvor riedi 1+1 riediacim roztokom vzoriek (110 µl likvoru + 110 µl riediaceho roztoku vzoriek).

Vzorky synoviálnej tekutiny sa po dôkladnom premiešaní riedia 1+20 a 1+40 riediacim roztokom vzoriek (20 µl tekutiny a 400 µl riediaceho roztoku vzoriek a 10 µl tekutiny a 400 µl riediaceho roztoku vzoriek).

Uvedené postupy platia pre obe diagnostické súpravy, teda pre stanovenie IgG aj IgM protilátok.

### 2.2.3 Pracovný postup

Pred začiatkom analýzy sme všetky reagenty nechali vytemperovať na laboratórnu teplotu a dôkladne premiešali.

Kontroly a riedené vzorky sme dávkovali v objeme 100 µl nasledovne:

- prvá jamka (A1) ostane prázdna (blank)
- 1 jamka Negatívna kontrola
- 2 jamky CUT OFF
- 1 jamka Pozitívna kontrola
- jednotlivé vzorky

Následne sme doštičku prekryli viečkom a inkubovali 30 minút pri teplote 37°C. Po uplynutí inkubačnej doby sme obsah jamiek odsali a 4x prepláchli pracovným premývacím roztokom. Zvyšky roztoku sme dôkladne vyklepali do savého materiálu.

Do všetkých jamiek okrem A1 sme pipetovali 100 µl konjugátu a opäť inkubovali 30 min pri teplote 37°C. Následne sme 5x premyli jamky pracovným premývacím roztokom.

Do všetkých jamiek sme v ďalšom kroku dávkovali 100 µl jednozložkového substrátu TMB – Complete a doštičku inkubovali 15 min v tme.

Reakciu sme zastavili pridaním 100 µl zastavovacieho roztoku v rovnakom poradí a intervaloch ako bol dávkaný substrát.

Do 30 min po zastavení reakcie sme zmerali intenzitu zafarbenia roztokov pomocou fotometra pri vlnovej dĺžke 450 nm oproti blanku (A1).

### 2.2.4 Validita testu a interpretácia výsledkov

#### *A) Platnosť testu pri stanovení hladiny špecifických protilátok v triede IgG*

Test platný v prípade, že:

1. Absorbancia blanku je nižšia ako 0,150.
2. Absorbancia Negatívnej kontroly je nižšia než polovica priemeru absorbancie CUT OFF

$$NK < \frac{\text{Priemerná absorbanca CUT - OFF}}{2}$$

3. Priemerná absorbanca CUT OFF je v rozmedzí 0,180 – 0,700:

$$0,180 < \text{priemerná absorbanca CUT OFF} < 0,700$$

4. Absorbanca Pozitívnej kontroly je väčšia než dvojnásobok priemernej absorbanacie CUT OFF:

$$PK > 2x \text{ priemerná absorbanca CUT OFF}$$

### ***B) Interpretácia výsledkov pri stanovení hladiny špecifických protilátok v triede IgG***

Výsledky vyšetrenia séra, plazmy, synoviálnej tekutiny a mozgomiechového moku sa udávajú v indexoch pozitivity.

INDEX POZITIVITY (IP) sa vypočíta ako podiel absorbanacie testovanej vzorky a priemernej absorbanacie CUT OFF nameranej v rovnakej sérii vyšetrení:

$$IP = \frac{\text{Absorbancia séra, plazmy, likvoru, synoviálnej tekutiny}}{\text{Priemerná absorbanca CUT - OFF}}$$

Tabuľka 1: Interpretácia výsledkov vyšetrenia sér, plaziem a likvorov (IgG)

<b>Index Pozitivity (IP)</b>	<b>Hodnotenie</b>
Menší než 0,9	negatívne
0,9 až 1,1	hraničné
Väčší než 1,1	pozitívne

Vzorky s hraničnou hodnotou (IP 0,9 – 1,1) je potrebné vyšetriť opäť z nového odberu za 3 – 6 týždňov.



Tabuľka 2: Interpretácia výsledkov založená na porovnaní IP nameraných pri dvoch rôznych riedeniach vzorky (IgG)

<b>Vzorka</b>	<b>Riedenie vzorky 1+20 IP</b>	<b>Riedenie vzorky 1+40 IP</b>	<b>Celkové hodnotenie</b>
<b>Vzorka A</b>	Menší než 1,0	Menší než 1,0	negatívne
<b>Vzorka B</b>	Väčší než 1,0	Menší než 1,0	hraničné
<b>Vzorka C</b>	Väčší než 1,0	Väčší než 1,0	pozitívne

### **C) Platnosť testu pri stanovení hladiny špecifických protilátok v triede IgM**

Test je platný v prípade, že:

1. Absorbancia blanku je nižšia ako 0,150.
2. Absorbancia Negatívnej kontroly je nižšia než polovica priemeru absorbancie CUT OFF

$$NK < \frac{\text{Priemerná absorbancia CUT} - \text{OFF}}{2}$$

3. Priemerná absorbancia CUT OFF je v rozmedzí 0,250 – 0,900:

$$0,250 < \text{priemerná absorbancia CUT OFF} < 0,900$$

4. Absorbancia Pozitívnej kontroly je väčšia než dvojnásobok priemernej absorbancie CUT OFF:

$$PK > 2x \text{ priemerná absorbancia CUT OFF}$$

### **D) Interpretácia výsledkov pri stanovení hladiny špecifických protilátok v triede IgM**

Výsledky vyšetrenia séra, plazmy, synoviálnej tekutiny a mozgomiechového moku sa udávajú v indexoch positivity.

INDEX POZITIVITY (IP) sa vypočíta ako podiel absorbancie testovanej vzorky a priemernej absorbancie CUT OFF nameranej v rovnakej sérii vyšetrení:

$$IP = \frac{\text{Absorbancia séra, plazmy, likvoru, synoviálnej tekutiny}}{\text{Priemerná absorbancia CUT} - \text{OFF}}$$

Tabuľka 3: Interpretácia výsledkov vyšetrenia sér, plaziem a likvorov (IgM)

<b>Index Pozitivity (IP)</b>	<b>Hodnotenie</b>
Menší než 0,9	negatívne
0,9 až 1,1	hraničné
Väčší než 1,1	pozitívne

Vzorky s hraničnou hodnotou (IP 0,9 – 1,1) je potrebné vyšetriť opäť z nového odberu za 3 – 6 týždňov.

Tabuľka 4: Interpretácia výsledkov založená na porovnaní IP nameraných pri dvoch rôznych riedeniach vzorky (IgM)

<b>Vzorka</b>	<b>Riedenie vzorky 1+20 IP</b>	<b>Riedenie vzorky 1+40 IP</b>	<b>Celkové hodnotenie</b>
<b>Vzorka A</b>	Menší než 1,0	Menší než 1,0	negatívne
<b>Vzorka B</b>	Väčší než 1,0	Menší než 1,0	hraničné
<b>Vzorka C</b>	Väčší než 1,0	Väčší než 1,0	pozitívne

Všetky informácie o používanej metóde ELISA sme získali z priloženého príbalového letáku v diagnostickej súprave [35].

### 2.3 Detekcia DNA borrelií pomocou real-time PCR

DNA borrelií sme izolovali pomocou izolačných kolóniek súpravy QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Roche, Czech Republic).

Detekciu borreliovej DNA sme uskutočnili pomocou real-time PCR. Vzhľadom na možnosť inhibície PCR reakcie, resp. DNA polymerázy, je potrebné v rámci dodržania správnej vnútornej kontroly kvality (VKK) používať tzv. inhibičnú kontrolu (IC), ktorá umožňuje zamedziť vydávaniu falošne negatívnych výsledkov.

Analýzu prítomnosti DNA patogénnych borrelií multiplex real-time PCR metódou sme realizovali na prístroji RotorGene 3000 (Corbett Research) so súčasťou amplifikáciou IC z oblasti ľudského HLA-DQ génu v jednej skúmavke.

Sekvencie primerov a hydrolytické sondy špecifické pre *Borrelia burgdorferi*

sensu lato boli vybrané z oblasti flagelinového génu. Sonda je označená fluorescenčným reportérom FAM (6-karboxyfluorescein) a nefluorescenčným zhášačom BHQ (Black Hole Quencher).

Sekvencia primerov a hydrolytickej sondy pre IC z oblasti ľudského HLA-DQ génu bola vybraná zo skôr publikovanej práce. Sonda pre inhibičnú kontrolu je značená iným fluoroforom (HEX - hexachloro-fluorescein) a zhášačom je opäť BHQ.

Optimálne zloženie reakčnej zmesi pre analýzu:

- TaqMan Universal Master Mix (2-krát, Applied Biosystems),
- forward primer FLA F1A, reverse primer FlaR1,
- sonda pre boréliu a primery HLA-DQ F a HLA-DQ R,
- sonda HLA-DQ HEX pre inhibičnú kontrolu,
- DNA vzorka 5  $\mu$ l a ľudská DNA 0,5  $\mu$ l.

Reakcia využíva univerzálny teplotný profil: 50 °C 2 min., 95 °C 10 min. 55 cyklov s teplotnými krokmi 95 °C 15 s a 60 °C 1 min., kedy dochádza k snímaniu fluorescence detekčným kanálom FAM (dôkaz DNA borélií pri 530 nm) a 4,5-dichloro-dimethoxy-fluorescein - JOE (inhibičná kontrola pri 555 nm) [36].

**Materiál potrebný pre uskutočnenie real-time PCR analýzy:**

- Laminárny box
- Nítrylové rukavice
- Ochranný plášť
- Mikropipety pre rôzne objemy
- Špičky na mikropipety pre rôzne objemy
- Ependorfky
- Sterilné skúmavky
- Izolačný kit QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Roche, Czech Republic)
- Vyhrievaný blok na 56 °C
- Kapiláry po real-time PCR analýzu
- RotorGene 3000 (Corbett Research)

## 3 VÝSLEDKY

### 3.1 Súhrnné výsledky vyšetrení metódou ELISA a PCR u žien

V nasledujúcej tabuľke č.5 sú prehľadne uvedené súhrnné výsledky vyšetrení ELISA a PCR u žien a druh biologického materiálu, z ktorého bola vykonaná analýza.

Tabuľka 5: Výsledky vyšetrenia metódou ELISA a PCR u žien

Číslo pacienta v súbore	Vek	Vyšetrovaný materiál		Výsledky vyšetrení		
		PCR	ELISA	PCR	ELISA IgG	ELISA IgM
1	87	nezráž. krv	sérum	negatívne	negatívne	negatívne
2	87	sérum	sérum	negatívne	negatívne	negatívne
3	85	sérum	sérum	negatívne	negatívne	negatívne
4	82	likvor	sérum	negatívne	negatívne	negatívne
5	82	sérum	sérum	negatívne	negatívne	negatívne
6	82	likvor	likvor	negatívne	<i>hraničné</i>	negatívne
7	80	likvor	likvor	negatívne	negatívne	negatívne
8	79	sérum	sérum	negatívne	<i>hraničné</i>	negatívne
9	78	sérum	sérum	negatívne	<b>pozitívne</b>	negatívne
10	77	sérum	sérum	negatívne	negatívne	negatívne
11	77	sérum	sérum	negatívne	<i>hraničné</i>	negatívne
12	76	likvor	likvor	negatívne	negatívne	negatívne
13	76	sérum	sérum	negatívne	<b>pozitívne</b>	negatívne
14	76	sérum	sérum	negatívne	<b>pozitívne</b>	negatívne
15	74	likvor	sérum	negatívne	<b>pozitívne</b>	negatívne
16	72	likvor	sérum	negatívne	negatívne	<i>hraničné</i>
17	72	likvor	likvor	negatívne	negatívne	negatívne
18	70	likvor	likvor	negatívne	<b>pozitívne</b>	negatívne
19	69	likvor	likvor	negatívne	negatívne	negatívne
20	66	sérum	sérum	negatívne	negatívne	negatívne
21	65	sérum	sérum	negatívne	negatívne	negatívne
22	65	sérum	sérum	negatívne	<b>pozitívne</b>	negatívne
23	64	sérum	sérum	negatívne	negatívne	negatívne

24	63	sérum	sérum	negatívne	negatívne	negatívne
25	62	sérum	sérum	negatívne	negatívne	negatívne
26	60	likvor	likvor	negatívne	<b>pozitívne</b>	negatívne
27	60	sérum	sérum	negatívne	negatívne	<i>hraničné</i>
28	45	sérum	sérum	negatívne	negatívne	negatívne
29	43	sérum	sérum	negatívne	<i>hraničné</i>	negatívne
30	41	likvor	likvor	negatívne	<i>hraničné</i>	negatívne
31	41	sérum	sérum	negatívne	negatívne	negatívne
32	40	sérum	sérum	negatívne	negatívne	<b>pozitívne</b>
33	38	sérum	sérum	negatívne	negatívne	negatívne
34	36	sérum	sérum	negatívne	negatívne	negatívne
35	35	sérum	sérum	negatívne	<b>pozitívne</b>	<i>hraničné</i>
36	34	sérum	sérum	negatívne	negatívne	negatívne
37	33	likvor	likvor	negatívne	negatívne	negatívne
38	33	sérum	sérum	negatívne	negatívne	negatívne
39	31	sérum	sérum	negatívne	negatívne	negatívne
40	30	likvor	likvor	negatívne	negatívne	negatívne
41	30	sérum	sérum	negatívne	<b>pozitívne</b>	negatívne
42	29	sérum	sérum	negatívne	negatívne	negatívne
43	26	likvor	sérum	negatívne	negatívne	negatívne
44	26	sérum	sérum	negatívne	<i>hraničné</i>	negatívne
45	25	sérum	sérum	negatívne	negatívne	negatívne
46	15	likvor	sérum	negatívne	negatívne	negatívne
47	14	sérum	sérum	negatívne	negatívne	negatívne
48	13	sérum	sérum	negatívne	negatívne	<b>pozitívne</b>
49	13	sérum	sérum	negatívne	negatívne	negatívne
50	12	sérum	likvor	negatívne	<b>pozitívne</b>	negatívne
51	12	sérum	sérum	negatívne	negatívne	negatívne
52	11	likvor	sérum	negatívne	negatívne	negatívne
53	10	sérum	sérum	negatívne	negatívne	negatívne
54	10	sérum	sérum	negatívne	negatívne	negatívne
55	10	sérum	sérum	negatívne	negatívne	negatívne
56	9	sérum	sérum	negatívne	<b>pozitívne</b>	negatívne
57	7	sérum	sérum	negatívne	<b>pozitívne</b>	negatívne
58	6	sérum	sérum	negatívne	negatívne	negatívne

### 3.1.1 Výsledky vyšetrení IgG a IgM protilátok metódou ELISA u žien

Stanovenie prítomnosti a hladiny protilátok v triede IgG a IgM proti *B. burgdorferi* sensu lato bolo pomocou ELISA testu vykonané na 58 vzorkách biologického materiálu odobraného od ženskej časti súboru pacientov. Ako vyšetrovaný materiál prevažuje sérum, ďalším bol likvor.

#### A) Výsledky vyšetrenia IgG protilátok metódou ELISA u žien

Pri detekcii hladiny IgG protilátok bolo zaznamenaných 12 pozitívnych (9 zo séra a 3 z likvoru) a 6 hraničných výsledkov (viď tabuľka 6).

Tabuľka 6: Vyšetrenie materiálu metódou ELISA IgG u žien

Materiál	Počet (%)	Pozitívne (%)	Hraničné (%)	Negatívne (%)
Sérum	47 (81,03)	9 (19,15)	4 (8,51)	34 (72,34)
Likvor	11 (18,97)	3 (27,27)	2 (18,18)	6 (54,55)
<b>Celkom</b>	<b>58 (100)</b>	<b>12 (20,69)</b>	<b>6 (10,34)</b>	<b>40 (68,97)</b>

#### B) Výsledky vyšetrenia IgM protilátok metódou ELISA u žien

Ako je uvedené v tabuľke č.7, detekcia IgM protilátok ukázala len 2 pozitívne a 3 hraničné výsledky, z toho všetky zo séra. Vyše 90 % výsledkov bolo vyhodnotených ako negatívne.

Tabuľka 7: Vyšetrenie materiálu metódou ELISA IgM u žien

Materiál	Počet (%)	Pozitívne (%)	Hraničné (%)	Negatívne (%)
Sérum	47 (81,03)	2 (4,26)	3 (6,38)	42 (89,36)
Likvor	11 (18,97)	0 (0)	0 (0)	11 (100,0)
<b>Celkom</b>	<b>58 (100)</b>	<b>2 (3,45)</b>	<b>3 (5,17)</b>	<b>53 (91,38)</b>

### 3.1.2 Výsledky PCR vyšetrenia u žien

Na zistenie prítomnosti DNA *B. burgdorferi* sensu lato bolo metódou PCR vyšetrených 58 vzoriek odobratých od žien. Prevažnú časť materiálu určeného na vyšetrenie tvorilo sérum a takmer jednu tretinu tvoril likvor. Pozitívny výsledok nebol zaznamenaný ani v jednom z 58 vyšetrení (vid' tabuľka č. 8).

Tabuľka 8: Vyšetrenie materiálu metódou PCR u žien

Materiál	Počet (%)	Pozitívne (%)	Negatívne(%)
Sérum	41 (70,69)	0 (0)	41 (70,69)
Likvor	16 (27,59)	0 (0)	16 (27,59)
Nezrážanlivá krv	1 (1,72)	0 (0)	1 (1,72)
<b>Celkom</b>	<b>58 (100)</b>	<b>0 (0)</b>	<b>58 (100)</b>

### 3.2 Súhrnné výsledky vyšetrení metódou ELISA a PCR u mužov

Tabuľka č. 9 prehľadne uvádza výsledky vyšetrení ELISA a PCR u mužov a taktiež druh biologického materiálu, z ktorého boli vykonané jednotlivé analýzy.

Tabuľka 9: Výsledky vyšetrenia metódou ELISA a PCR u mužov

Číslo pacienta v súbore	Vek	Vyšetrovaný materiál		Výsledky		
		PCR	ELISA	PCR	ELISA IgG	ELISA IgM
1	88	punktát	sérum	negatívne	pozitívne	hraničné
2	87	likvor	likvor	negatívne	hraničné	negatívne
3	84	sérum	sérum	negatívne	negatívne	negatívne
4	84	likvor	likvor	negatívne	negatívne	negatívne
5	84	likvor	likvor	negatívne	negatívne	negatívne
6	83	tkanivo	sérum	negatívne	negatívne	negatívne
7	83	likvor	likvor	negatívne	negatívne	negatívne

8	82	likvor	likvor	negatívne	negatívne	negatívne
9	81	likvor	sérum	negatívne	negatívne	negatívne
10	78	likvor	sérum	negatívne	negatívne	negatívne
11	77	likvor	likvor	negatívne	negatívne	negatívne
12	77	likvor	sérum	negatívne	negatívne	negatívne
13	77	sérum	sérum	negatívne	negatívne	negatívne
14	76	sérum	sérum	negatívne	negatívne	<i>hraničné</i>
15	73	sérum	sérum	negatívne	negatívne	negatívne
16	72	likvor	likvor	negatívne	<b>pozitívne</b>	negatívne
17	71	likvor	likvor	negatívne	negatívne	negatívne
18	70	likvor	likvor	negatívne	negatívne	negatívne
19	68	sérum	sérum	negatívne	negatívne	negatívne
20	67	likvor	sérum	negatívne	<b>pozitívne</b>	negatívne
21	66	sérum	sérum	negatívne	<i>hraničné</i>	negatívne
22	66	likvor	likvor	negatívne	negatívne	negatívne
23	65	sérum	sérum	negatívne	negatívne	negatívne
24	64	sérum	sérum	negatívne	negatívne	negatívne
25	61	sérum	sérum	<b>pozitívne</b>	negatívne	negatívne
26	60	sérum	sérum	negatívne	<b>pozitívne</b>	<i>hraničné</i>
27	44	nezráž. krv	sérum	negatívne	negatívne	negatívne
28	43	likvor	sérum	negatívne	negatívne	negatívne
29	42	likvor	likvor	negatívne	negatívne	negatívne
30	40	sérum	sérum	negatívne	negatívne	negatívne
31	35	sérum	sérum	negatívne	negatívne	negatívne
32	34	sérum	sérum	negatívne	<b>pozitívne</b>	hraničné
33	34	sérum	sérum	negatívne	negatívne	negatívne
34	30	sérum	sérum	negatívne	negatívne	negatívne
35	29	sérum	sérum	negatívne	<i>hraničné</i>	negatívne
36	28	sérum	sérum	negatívne	negatívne	negatívne
37	28	likvor	likvor	negatívne	<b>pozitívne</b>	<i>hraničné</i>
38	27	likvor	likvor	negatívne	negatívne	negatívne
39	27	likvor	sérum	negatívne	<b>pozitívne</b>	<b>pozitívne</b>
40	26	sérum	sérum	negatívne	negatívne	negatívne
41	26	sérum	sérum	negatívne	negatívne	<b>pozitívne</b>
42	25	likvor	likvor	negatívne	negatívne	negatívne



43	25	sérum	sérum	negatívne	<b>pozitívne</b>	<b>pozitívne</b>
44	15	sérum	sérum	negatívne	negatívne	negatívne
45	14	sérum	sérum	negatívne	negatívne	negatívne
46	13	sérum	sérum	negatívne	negatívne	negatívne
47	13	sérum	sérum	negatívne	<b>pozitívne</b>	<i>hraničné</i>
48	11	likvor	sérum	negatívne	<b>pozitívne</b>	negatívne
49	9	likvor	sérum	negatívne	<b>pozitívne</b>	negatívne
50	9	sérum	sérum	negatívne	<b>pozitívne</b>	<b>pozitívne</b>
51	8	sérum	sérum	negatívne	negatívne	negatívne
52	7	sérum	sérum	negatívne	negatívne	negatívne
53	6	sérum	sérum	negatívne	negatívne	<b>pozitívne</b>
54	5	sérum	sérum	negatívne	<b>pozitívne</b>	negatívne
55	5	likvor	sérum	negatívne	<b>pozitívne</b>	negatívne

### 3.2.1 Výsledky vyšetrení IgG a IgM protilátok metódou ELISA u mužov

ELISA test na zistenie prítomnosti a hladiny protilátok proti *B. burgdorferi* sensu lato v triede IgG a IgM bol vykonaný v prípade všetkých 55 vzoriek odobratých od pacientov mužského pohlavia. Materiálom na vyšetrenie bolo prevažne sérum, menšiu skupinu tvorili vzorky likvoru.

#### A) Výsledky vyšetrenia IgG protilátok metódou ELISA u mužov

Detekciou hladiny IgG protilátok bolo identifikovaných celkovo 14 pozitívnych výsledkov (12 zo séra a 2 z likvoru) a 3 výsledky hraničné. Ostatné vzorky boli vyhodnotené ako negatívne (viď tabuľka 10).

Tabuľka 10: Vyšetrenie materiálu metódou ELISA IgG u mužov

Materiál	Počet (%)	Pozitívne (%)	Hraničné (%)	Negatívne (%)
Sérum	41 (74,55)	12 (29,27)	2 (4,88)	27 (65,85)
Likvor	14 (25,45)	2 (14,29)	1 (7,14)	11 (78,57)
<b>Celkom</b>	<b>55 (100)</b>	<b>14 (25,45)</b>	<b>3 (5,45)</b>	<b>38 (69,1)</b>

### **B) Výsledky vyšetrenia IgM protilátok metódou ELISA u mužov**

Ako je uvedené v tabuľke č. 11, pri detekcii IgM protilátok bolo zistených len 5 pozitívnych výsledkov, z toho všetky zo séra a 6 výsledkov bolo hraničných. V prevažnej väčšine vyšetovaných vzoriek bola teda hladina IgM protilátok určená ako negatívna.

Tabuľka 11: Vyšetrenie materiálu metódou ELISA IgM u mužov

<b>Materiál</b>	<b>Počet (%)</b>	<b>Pozitívne (%)</b>	<b>Hraničné (%)</b>	<b>Negatívne (%)</b>
<b>Sérum</b>	41 (74,55)	5 (12,2)	5 (12,2)	31 (75,61)
<b>Likvor</b>	14 (25,45)	0 (0)	1 (7,14)	13 (92,86)
<b>Celkom</b>	<b>55 (100)</b>	<b>5 (9,09)</b>	<b>6 (10,91)</b>	<b>44 (80)</b>

### **3.2.2 Výsledky PCR vyšetrenia u mužov**

Metódou PCR na zistenie prítomnosti DNA *B. burgdorferi* sensu lato bolo vyšetrených 55 vzoriek od mužských pacientov, ako uvádza tabuľka č. 12. Najviac materiálu na vyšetrenie predstavovalo sérum, ďalšiu veľkú skupinu tvorili vzorky likvoru. Pozitívny výsledok analýzy bol dosiahnutý len v jedinom prípade.

Tabuľka 12: Vyšetrenie materiálu metódou PCR u mužov

<b>Materiál</b>	<b>Počet (%)</b>	<b>Pozitívne (%)</b>	<b>Negatívne (%)</b>
<b>Sérum</b>	29 (52,73)	1 (3,45)	28 (96,55)
<b>Likvor</b>	23 (41,82)	0 (0)	23 (100)
<b>Nezrážanlivá krv</b>	1 (1,82)	0 (0)	1 (100)
<b>Punktát</b>	1 (1,82)	0 (0)	1 (100)
<b>Tkanivo</b>	1 (1,82)	0 (0)	1 (100)
<b>Celkom</b>	<b>55 (100)</b>	<b>1 (1,82)</b>	<b>54 (98,18)</b>

## 4 DISKUSIA A ZÁVER

V mojej diplomovej práci sme sa zamerali na možnosti diagnostiky lymeskej borreliózy pomocou serologickej metódy ELISA a metódy PCR. Každá metóda je založená na inom princípe detekcie infekcie v organizme. PCR je priamou metódou, ktorá dokazuje prítomnosť infekčného agens prostredníctvom dôkazu DNA borrelie. ELISA je metódou nepriamou, ktorá hodnotí protilátkovú odpoveď organizmu na prítomnosť patogéna.

Na analýzu boli použité anonymizované vzorky pacientov, v ELISA metóde predovšetkým sérum a likvor. V PCR diagnostike to boli aj vzorky nezrážanlivej krvi, punktáty a tkanivo.

V prípade diagnostiky borreliovej DNA pomocou PCR metódy (real-time PCR) bol v našej analýze zaznamenaný len jediný pozitívny výsledok. Odborná literatúra však uvádza, že záchyt DNA borrelií v klinických vzorkách je vo všeobecnosti veľmi nízky.

V USA bola uskutočnená štúdia zameraná na stanovenie špecifického génu *recA* *B. burgdorferi* sensu stricto v klinických vzorkách pacientov s lymeskou borreliózou pomocou real-time qPCR. Detekcia DNA patogénnych borrelií zaznamenala pozitivitu v prípade 40 (80 %) kožných biopsií od 50 neliečených pacientov s *erythema migrans* [17].

V ďalšej odbornej práci bol detekovaný *fla* gén kódujúci flagelinový proteín *B. burgdorferi* sensu lato za použitia TaqMan próby. Pozitívny výsledok bol detekovaný v 5 z 28 (17,9 %) vzorkách synoviálnej tekutiny a 1 z 5 (20 %) biopsií synoviálnej membrány získaných od 31 pacientov s arthropatiami. Z 56 CSF vzoriek, získaných od 54 pacientov s podozrením na neuroboreliózu, bol len 1 (1,8 %) pozitívny pomocou real-time PCR [17].

V odbornej publikácii amerických autorov bola DNA *B. burgdorferi* sensu lato detekovaná pomocou PCR vo vzorkách krvi odobratých od pacientov s *erythema migrans* a skorým diseminovaným štádiom (neuroborelióza, karditída). Pozitívne výsledky dôkazu borreliovej DNA u pacientov s *erythema migrans* boli zaznamenané vo vzorkách plazmy len v 14 prípadoch zo 76 (18 %) [17, 37].

V inej štúdií boli od pacientov s klinickými prejavmi lymeskej borreliózy odobraté vzorky venóznej krvi, ktoré boli následne podrobené štandardnému serologickému dvojkrokovému testovaniu, a taktiež analyzované použitím nested PCR pre *B. burgdorferi* sensu lato 16S ribosomal DNA. PCR amplikón bol sekvenovaný pre potvrdenie genomickej DNA *B. burgdorferi* [38]. Testovaných bolo 130 pacientov, ktorí navštívili pohotovosť a 333 pacientov odoslaných od praktických lekárov. Celkom 5,4 % pacientov z pohotovosti vykazovalo na základe DNA analýzy prítomnosť spirochetémie, avšak ani jeden (0 %) z pacientov od praktických lekárov nebol DNA pozitívny. Veľmi zaujímavé je, že v serologickom testovaní bolo pozitívnych 8,4 % pacientov od praktických lekárov, ale len 1,5 % pacientov z pohotovosti [38].

Nested PCR a následné DNA sekvenovanie predstavuje veľmi užitočný doplnok štandardného dvojkrokového serologického testovania v diagnostike lymeskej borreliózy vo fáze spirochetémie. Jej zachytenie je zrejme najpravdepodobnejšie vtedy, ak sa u pacienta, ktorý sa vyskytoval v endemickej oblasti lymeskej borreliózy, vyvinú nešpecifické alebo špecifické klinické manifestácie ochorenia [38].

Dôvodom nízkeho záchytu borrelií z krvi môže byť hlavne dočasná spirochetémia, ktorá sťažuje izoláciu borrelií z krvného obehu, pretože zachytenie ich aktuálnej prítomnosti v tejto biologickej tekutine je veľmi náročné. Svoju úlohu zohráva aj možná prítomnosť PCR inhibitorov [17] a prípadná interferencia hostiteľskej DNA s borreliovou.

Oveľa vyššiu senzitivitu vykazuje PCR detekcia borreliovej DNA z lézií *erythema migrans*, pohybuje sa v rozsahu 36-88 % [3, 21, 32].

Senzitivita PCR detekcie v kožných biopsiách *acrodermatitis chronica atrophicans* je pravdepodobne závislá na vybranej cieľovej sekvencii.

V odbornej práci holandských autorov, ktorí k detekcii borreliovej DNA použili nested PCR s cieľovým génom *ospA*, bolo pozitívnych 15 z 24 (63 %) kožných biopsií *acrodermatitis chronica atrophicans*, len u 10 z týchto vzoriek (42 %) bol zaznamenaný pozitívny výsledok detekcie pri využití fragmentu 5S-23S rRNA ako cieľovej sekvencie. Závislosť výsledku vyšetrenia na vybranej sekvencii potvrdzuje aj malá štúdia z Nemecka. Pri detekcii s použitím cieľovej sekvencie génu *p66* boli pozitívni 4 z 5 pacientov s *acrodermatitis chronica atrophicans*, oproti 2 z 5 ak bol použitý gén

23S rRNA [17].

Diagnostická senzitivita PCR analýzy CSF pri včasnej neuroborelióze je v priemere 10-30 % [3, 25, 32]. V štádiu neskorej neuroboreliózy je senzitivita PCR extrémne nízka. Vo všeobecnosti má PCR analýza CSF nízku senzitivitu, ale môže byť použitá vo veľmi skorom štádiu neuroboreliózy s negatívnym protilátkovým indexom alebo u pacientov s imunodeficitom [25].

*B. burgdorferi* sensu lato bola detekovaná pomocou PCR v CSF u pacientov s rozličným spektrom neurologických symptómov v Spojených štátoch a v Európe. Senzitivita vyšetrení v USA sa v priemere pohybovala okolo 73 % a v Európe 23 %. Chýbanie „zlatého štandardu“ metódy, ktorý by podporil diagnózu neuroboreliózy, sťažuje posúdenie výkonnosti PCR analýzy CSF [17].

Senzitivita PCR detekcie *B. burgdorferi* sensu lato DNA vo vzorkách CSF môže závisieť aj od klinických prejavov, počtu bielych krviniek v CSF, trvaní choroby a podanej ATB terapie. V štúdiu v USA uskutočnenej u 60 pacientov s neuroboreliózou (16 skorá, 44 neskorá) bola citlivosť PCR v CSF 38 % v skorom štádiu a 25 % v neskorom štádiu.

Vo švédskej štúdiu bol dôkaz DNA *B. burgdorferi* sensu lato pozitívny len u pacientov s pleocytózou v CSF. Ani u jedného z 29 pacientov s klinickými prejavmi lymeskej borreliózy, ale bez prítomnosti pleocytózy, nebol výsledok PCR analýzy CSF pozitívny. [17]

V ďalšej odbornej správe bolo zistené, že u 7 zo 14 (50 %) pacientov s neuroboreliózou v Nemecku s trvaním ochorenia kratším ako 2 týždne bol zistený pozitívny výsledok PCR, v porovnaní s len 2 zo 16 (13 %) pacientov, u ktorých choroba trvala dlhšie ako 2 týždne [17, 32].

Vysokú citlivosť vykazuje PCR detekcia DNA *B. burgdorferi* sensu lato zo vzoriek synoviálnej tekutiny a synoviálnych tkanív (50-70 %), predovšetkým od neliečených pacientov. Najlepšie výsledky sú získané práve zo synoviálnych tkanív, nie z tekutiny [3, 17, 21, 24, 32].

Štúdia uskutočnená v USA zistila, že u pacientov, ktorí dostali ATB terapiu bol stupeň PCR pozitivity nižší. Naopak, u 96 % neliečených, alebo len krátko liečených

pacientov bola zaznamenaná PCR pozitivita vzoriek synoviálnej tekutiny. V tejto štúdií boli použité 4 primery, tri amplifikujúce DNA sekvencie kódujúce OspA a jeden zameraný na časť génu kódujúcu 16S rRNA. Výsledky ukazujú, že úspešnosť detekcie zo vzoriek synoviálnej tekutiny závisí od dĺžky trvania ATB terapie a na použitých špecifických primeroch [17].

Úspešnosť PCR detekcie je závislá od veľkého množstva faktorov, ako sú odber a spracovanie vzoriek, možnosť ich kontaminácie počas tohto procesu, druh biologického materiálu, z ktorého prítomnosť borrelií zisťujeme, výber samotnej metódy amplifikácie (štandardná PCR, nested PCR, real-time PCR), výber cieľovej sekvencie, interferencia s DNA hostiteľa či prítomnosť inhibítorov. Dôležitú úlohu zohráva aj doba odberu vzorky a s tým spojená pravdepodobnosť, či borrelié v danom biologickom materiáli naozaj zachytíme. Ďalším dôležitým faktorom ovplyvňujúcim výsledok je podanie antibiotík, ktoré možnosť záchytu patogéna výrazne znižujú.

Takmer 100% negativita PCR vzoriek v našej analýze je teda pravdepodobne odrazom náročnosti detekcie borrelií molekulárnymi metódami. Prevažnú väčšinu vyšetrovaného materiálu tvorilo sérum, a ako už bolo povedané, detekcia borreliovej DNA z krvi je jednou z najmenej úspešných.

Prostredníctvom ELISA metódy sme testovali vzorky sér a likvorov na prítomnosť protilátok v triede IgG a IgM. Použité boli diagnostické súbavy EIA *Borrelia recombinant IgG/IgM* (192). Zhodnotenie ukázalo, že pozitivita v triede IgG u mužov bola 25,45 % a u žien 20,69 %. V triede IgM to bolo u mužov 9,09 % a u žien 3,45 %.

Výsledky našej analýzy ukázali vyšší výskyt pozitívnych hladín protilátok u mužov, ako u žien. Toto zistenie však nekoreluje s informáciami v odbornej literatúre, ktorá uvádza častejší výskyt u žien (muži/ženy 1:1,7) [1, 2]. Tento rozdiel je možné vysvetliť tým, že naši pacienti boli vybraní náhodne a v porovnaní s veľkými štúdiami sme v mojej diplomovej práci pracovali s relatívne malým počtom pacientov – 113.

Taktiež bola zaznamenaná vyššia seropozitivita v triede IgG ako v triede IgM. Tento rozdiel môže byť spôsobený tým, že IgM protilátky sa objavujú ako prvé a hoci neskôr zvyčajne klesajú, v začiatkoch ochorenia nemusia byť u pacienta prítomné príznaky, ktoré indikujú ochorenie. Až neskôršie zdravotné problémy prinúti pacienta

vyhľadať lekársku pomoc, kedy už hladiny IgM protilátok nemusia dosahovať pozitívne hodnoty. Taktiež pri prítomnosti typickej lézie *erythema migrans*, ktorá je jasným znakom lymeskej borreliózy v jej včasnom štádiu, a anamnestických údajoch, ktoré svedčia pre možnosť infekcie *B. burgdorferi*, nemusí byť vykonané serologické vyšetrenie.

Rôzne štúdie a odborná literatúra uvádzajú ako sa protilátková odpoveď líši v jednotlivých štádiách lymeskej borreliózy. Hostiteľská protilátková odpoveď na prítomnosť infekcie *B. burgdorferi* sa vyvíja pomaly.

V období včasnej lokalizovanej infekcie (*erythema migrans*) býva seropozitivita protilátok približne v 20–50 % prípadov, vo včasnom diseminovanom štádiu v 70–90 %, v neskorom štádiu (len v triede IgG, IgM neslúži na diagnostiku pri neskorých štádiách ochorenia) sa blíži ku 100 % [3, 25, 32]. Len jedna tretina pacientov s *erythema migrans* je IgM alebo IgG pozitívna. Avšak prítomnosť typickej lézie *erythema migrans* zvyčajne postačuje na určenie diagnózy. U zvyšných dvoch tretín seroreaktivita vzrastá neskôr (3-4 týždne) a je ovplyvnená rozsahom diseminácie ochorenia. Je vhodné urobiť neskorší odber 2-6 týždňov po získaní prvej vzorky [18, 37]. IgM sa objavujú 2-4 týždne a IgG 3-6 týždňov po nástupe *erythema migrans* a dosahujú vrchol v 6-8 týždni. Titer IgG je vo všeobecnosti nízky počas prvých týždňov ochorenia [14, 39].

Používané ELISA testy by mali byť aspoň testy druhej generácie, ktoré boli vylepšené v zmysle skríženej reaktivity s inými baktériami alebo používajú purifikované flagelové antigény. Nedávno boli špecifické rekombinantné antigény (VlsE) a syntetické peptidy (C6 peptid) úspešne použité v USA a v Európe v štúdiu na sérach pacientov s *erythema migrans* a *acrodermatitis chronica atrophicans* [32].

Aj keď v skorom lokalizovanom štádiu je seropozitivita len u tretiny až polovice pacientov, zvyčajne prevládajú IgM nad IgG. Výnimkou môže byť imunitná odpoveď proti nedávno detekovanému VlsE. U amerických pacientov s *erythema migrans*, IgG odpoveď proti VlsE je pozorovaná skôr ako IgM odpoveď (u akútneho *erythema migrans* v 44 % oproti 19 %, u ustupujúceho *erythema migrans* v 59 % oproti 43 %). U európskych pacientov s *erythema migrans* bola skorá IgG odpoveď proti VlsE pozorovaná v 20 prípadoch z 23 (87 %), ktoré boli aj kultivačne potvrdené. V princípe, pacienti so skorými manifestáciami môžu byť seronegatívni, hlavne v prípade krátkeho

trvania symptómov. U pacientov s neuroboreliózou sa seropozitivita objavuje po 6 alebo viac týždňoch, a to takmer u 100 % prípadov. V prípadoch neskorého ochorenia (*acrodermatitis chronica atrophicans*), sú IgG detekovateľné u všetkých testovaných pacientov [25, 32].

V Dánsku bol vykonaný prieskum, ktorého cieľom bolo charakterizovať význam testovania a klinické znaky pacientov, u ktorých sa zisťovala hladina protilátok v sére proti *B. burgdorferi* sensu lato. Do štúdie boli zaradení pacienti z troch dánskych krajov (populácia 1,5 milióna obyvateľov) [40]. Všetky tri laboratória používali rovnakú komerčnú metódu pre stanovenie hladín IgG a IgM protilátok v sére (IDEIA, Oxoid, Cambridge, UK), ktorá je založená na purifikovanom flagelovom antigéne z dánskeho kmeňa *B. afzelii*. Podľa literatúry, diagnostická senzitivita pre IgG/IgM je 36/48 % u *erythema migrans*, 77/57 % u skorej neuroboreliózy a 100/12 % u *acrodermatitis chronica atrophicans* [40]. Testovaných bolo celkom 4 664 pacientov. IgM a IgG seropozitivita bola 9,2 % a 3,3 %. Silným prediktívnym faktorom pre IgM pozitivitu bol vek 0-15 rokov a podozrenie na *erythema migrans*, zatiaľ čo pre podozrenie na *acrodermatitis chronica atrophicans* bol prediktívny faktor IgG positivity. Podozrenie na *erythema migrans* bolo popísané u 38 % pacientov, lymeská artritída/diseminované ochorenie u 23 % a skorá neuroborelióza u 13 %. U 646 pacientov s prejavmi artritídy bolo podozrenie na lymeskú borreliózu, ale len 2,3 % boli IgG pozitívni. V porovnaní s celkovou seropozitivitou v populácii tieto výsledky ukázali, že lymeská artritída je v Dánsku vzácna [40].

Veľmi zaujímavá bola holandská štúdia, ktorá ukázala že, spoľahlivosť serologických testov nie je dostatočná. Porovnávaných bolo 8 komerčne dostupných ELISA metód a 5 imunoblotov. Metódy mali veľmi rozdielnu senzitivitu, špecifickosť a slabú zhodu. ELISA metódy boli pozitívne v 34 – 59 % u pacientov s podozrením na lymeskú borreliózu. Zaujímavý bol aj veľmi slabý súlad medzi imunoblotmi, ich značne variabilná senzitivita a špecifickosť. Tým vznikajú pochybnosti vo veľmi obhajovanom dvojkrovom testovaní. Napríklad, špecifická ELISA-imunoblot kombinácia testov bola schopná potvrdiť len 53 % pozitívnych výsledkov ELISA od pacientov s podozrením na lymeskú borreliózu, zatiaľ čo iné imunoblotty potvrdili 100 % ELISA výsledkov. Tieto zistenia len potvrdzujú, že výsledky serologického



testovanie sú značne závislé na vybraných komerčných kitoch [41].

Na základe uvedených zistení možno povedať, že sa vynára potreba vyvinúť testy, ktoré nebudú založené na serológii. Avšak napriek zhodnoteniu týchto nedostatkov, môže byť často príčinou nejasných záverov nie kvalita metód, ale len nesprávna interpretácia výsledkov lekárom. Pri mnohých infekciách totiž protilátky pretrvávajú dlhú dobu, aj po vyliečení ochorenia. Prítomnosť špecifických protilátok nedokazuje prítomnosť choroby a pozitívny protilátkový test môže byť aj v dôsledku klinickej alebo subklinickej infekcie v minulosti [32, 41].

Limitovaná senzitivita a špecifickosť indikujú, že serologické testy nemôžu byť samy o sebe použité na potvrdenie alebo rozhodnutie o diagnóze lymeskej borreliózy. Serológia môže skôr zvýšiť alebo znížiť pravdepodobnosť ochorenia v kontexte klinických symptómov a epidemiologickej anamnézy pacienta [25, 32, 39, 41].

Dôležitým faktorom pre interpretáciu laboratórnych výsledkov pre diagnózu lymeskej borreliózy je tzv. predtestová pravdepodobnosť ochorenia. Je to odhad pravdepodobnosti lymeskej choroby, založený na geografickej lokalizácii a symptómoch prítomných u pacienta. Ak je predtestová pravdepodobnosť vysoká, tak je veľmi pravdepodobné, že negatívny výsledok testu je falošne negatívnym. Vysokú predtestovú pravdepodobnosť majú napr. osoby žijúce v endemickej oblasti a osoby s objektívnymi symptómami lymeskej borreliózy [39].

Na záver mojej diplomovej práce by som chcela zdôrazniť skutočnosť, že lymeská borrelióza je ochorenie s veľmi zložitou diagnostikou. Výsledky laboratórnych vyšetrení často nemusia korelovať s klinickým obrazom u pacienta a naopak. Je preto nutné zvážiť všetky aspekty a až na základe ich starostlivého posúdenia možno vysloviť verdikt o diagnóze.

Serologické aj molekulárne metódy majú svoje výhody aj obmedzenia. To všetko sa premieta do výberu vhodnej diagnostickej metódy, ktorá následne pri správnom prevedení môže predstavovať účinný diagnostický nástroj. V laboratórnej diagnostike lymeskej borreliózy je však stále čo zlepšovať. Veda smeruje dopredu veľmi rýchlym tempom a preto je len otázkou času, kedy sa do pozornosti dostanú nové vysoko špecifické antigény, cieľové sekvencie génov a metódy ich detekcie, ktoré posunú laboratórnu diagnostiku lymeskej borreliózy opäť vpred.

## 5 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

- [1] BARTŮNĚK, P. a kol.: *Lymeská borelióza*. 3. vydanie. Praha: GRADA publishing, 2006. ISBN 80-247-1543-0, s. 11-108
- [2] VALEŠOVÁ, M.: *Lymeská artritida*. Praha: GRADA publishing, 1999. ISBN 80-7169-432-0, s. 12-52
- [3] GURČÍK, L.: Súčasný trendy v diagnostike a liečbe neuroboreliózy. *Neurológia pre praxi*, 2009, roč. 10, č. 3, s. 170-175
- [4] STALEY, J.T., GUNSALUS, R.P., LORRY, S., PERRY, J.J.: *Microbial life*. 2. vydanie. Sunderland, Massachusetts, USA: Sinauer Associates INC, Publishers, 2007. ISBN-13: 978-0-87893-685-4, s. 932
- [5] GREENWOOD, D., SALCK, R., PEUTHERER, J., BARER, M.: *Medical Microbiology. A guide to microbial infections: pathogenesis, immunity, laboratory diagnosis an control*. 17.vydanie. Elsevier Limited, 2007. ISBN 978-0-443-10209-7, s. 365-367
- [6] ELBAUM-GARFINKLE, S.: Close to Home: A History of Yale and Lyme Disease. *Yale Jorunal of Biology and Medicine.*, 2011, roč. 84, č.2, s. 103-108
- [7] VOTAVA, M. a kol: *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: NEPTUN, 2003. ISBN 80-902896-6-5, s. 191-195
- [8] BONCZEK, O.: *Srovnání metod DNA detekce rodu Borrelia*. Bakalárska práca. Masarykova univerzita v Brne, Přírodovedecká fakulta. Brno, 2009, s. 6-22
- [9] BEDNÁŘ, M. a kol.: *Lékařská mikrobiologie*. Praha: Marvil, 1999.
- [10] TILLY, K., ROSA, P.A., STEWART, P.E.: Biology of Infection with *Borrelia burgdorferi* . *Infectious Disease Clinics of North America*, 2008, roč. 22, č.2, 217-234

- [11] RIZZOLI, A., HAUFFE, H.C., CARPI, G. et al.: Lyme borreliosis in Europe. Euro surveillance: bulletin européen sur les maladies transmissibles = *European communicable disease bulletin*, 2011, roč.16, č.27, s. 1-8
- [12] STANEK, G., STRLE, F.: Lyme borreliosis. *Lancet*, 2003, roč. 362, s. 1639-1645
- [13] COUMOU, J., VAN DER POLL, T., SPEELMAN, P., HOVIUS, J.W.R.: Tired of Lyme borreliosis, Lyme borreliosis in the Netherlands. *The Netherlands Journal of Medicine*, 2011, roč. 69, č. 3, s. 101-108
- [14] VOJDANI, A., HEBRONI, F., RAPHAEL, Y., ERDE, J., RAXLEN, B.: Novel Diagnosis of Lyme Disease: Potential of CAM Intervention. *Evidence-based complementary and alternative medicine*, 2009, roč. 6, č. 3, s. 283-295
- [15] SCHNARR, S., FRANZ, J.K, KRAUSE, A., ZEIDLER, H.: Lyme borreliosis. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, 2006, roč. 20, č. 6, 1099-1115
- [16] FRASER, C.M., CASJENS, S., HUANG, W.M. et al: Genomic sequence od a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature*, 1997, roč. 390, s. 580-581
- [17] AGUERO-ROSENFELD, M. E., WANG, G., SCHWARTZ, I., WORMSER, G. P.: Diagnosis of Lyme Borreliosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 2005, roč. 18, č. 3, s. 484-501
- [18] STANEK, G., WORMSER, G.P., GRAY, J., STRLE, F.: Lyme borreliosis. *Lancet*, 2012, roč. 379, č. 9814, s .461-73
- [19] BUREŠOVÁ, R.: *Vliv klíštět na hostitele a jejich význam při prenosu patogenů*. Bakalárska práca. Česká zemědělská univerzita v Prahe, Fakulta životného prostredia. Praha, 2009, s. 7-24
- [20] HAVLÍK, J. et al: *Infekční nemoci. Příručka pro praktické lékaře*. Galén, 1998. ISBN 80-85824-90-6, s. 145-149

- [21] STANEK, G., FINGERLE, V., HUNFELD, K.-P. et al.: Lyme borreliosis: Clinical case definitions for diagnosis and management in Europe. *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 2010, roč. 17, č. 1, s. 69-76
- [22] ÖNDER, Ö., HUMPHREY, P.T., McOMBER, B. et al: OspC is a potent plasminogen-receptor on the surface of *Borrelia burgdorferi*.
- [23] BRISSON, D., BAXAMUSA, N., SCHWARTZ, I., WORMSER, G.P.: Biodiversity of *Borrelia burgdorferi* Strains in Tissues of Lyme Disease Patients . *PloS ONE*, 2011, roč. 6., č.8, s. 1-5
- [24] FEDER, H.M., JOHNSON, B.J.B., O'CONNELL, S., SHAPIRO, E.D., STEERE, A.C, WORMSER, G.P.: A Critical Appraisal of „Chronic Lyme Disease“. *The New England Journal of Medicine*, 2007. s 1422-1425
- [25] MYGLAND, Å., LJØSTAD, U., FINGERLE, V. et al. EFNS guidelines on the diagnosis and management of European Lyme neuroborreliosis. *European Journal of Neurology*, 2010, roč. 17, č.1, s. 8-16
- [26] BREMELL, D., HAGBERG, L.: Clinical characteristics and cerebrospinal fluid parameters in patients with peripheral facial palsy caused by Lyme neuroborreliosis compared with facial palsy of unknown origin (Bell's palsy). *BMC Infectious Diseases*, 2011, roč. 11 , č. 215, s.1-6
- [27] LIGOR, M., OLSZOWY, P., BUSZEWSKI, B.: Application of medical and analytical methods in Lyme borreliosis monitoring. *Analytical and Bioanalytical Science in Poland*, 2011
- [28] LIVERIS, D., SCHWARTZ, I., BITTKER, S., COOPER, D., IYER, R., COX, M.E., WORMSER, G.P.: Improving the Yield of Blood Cultures from Patients with Early Lyme Disease. *Journal of Clinical Microbiology*, 2011, s. 2166-2168

- [29] LUKÁŠ, Z. a kol.: *Imunohistochemické metody v biologii a v bioptické diagnostice*. Brno: Lékařská fakulta Masarykovy univerzity, 1997. ISBN 80-210-0620-X, s. 7-65
- [30] KRÁLOVÁ, B. a kol.: *Bioanalytické metody*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2001. ISBN 80-7080-449-1, s. 74-144, 235-249
- [31] ČIKOŠ, Š., KOPPEL, J., KANTÍKOVÁ, M.: *Polymerázová reťazová reakcia a jej použitie v biologickom výskume a diagnostike*. Košice: Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, 2001. ISBN 80-968618-0-8, s. 10-21, 77-78, 85-88
- [32] WILSKE, B., FINGERLE, V., SCHULTE-SPECHTEL, U.: Microbiological and serological diagnosis of Lyme borreliosis. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2007, roč. 49, s. 13-18
- [33] STRICKER, R.B., JOHNSON, L.: Lyme disease: the next decade. *Infection and Drug Resistance*. 2011, s. 1-9
- [34] BARTŮŇKOVÁ, J., PAULÍK, M. a kol.: *Výšetřovací metody v imunologii*. 1. vydanie. Praha: GRADA publishing, 2005. ISBN 80-247-0691-1, s. 53-64, 86-96
- [35] EIA *Borrelia* recombinant IgG/IgM (192), PLIVA-Lachema a.s., Brno. ENTEROtest 24. 2008. 4 s
- [36] BOLEHOVSKÁ, R., PLÍŠEK, S., PLÍŠKOVÁ, L., ČERMÁKOVÁ, Z., PALIČKA, V.: Lymeská borelióza. *Klinická biochemie a metabolismus*, 2009, č. 1, s. 24-28
- [37] LEE, S.H., VIGLIOTTI, V.S., VIGLIOTTI, J.S., JONES, W., PAPPUS, S.: Increased Sensitivity and Specificity of *Borrelia burgdorferi* 16S Ribosomal DNA Detection . *American Society of Clinical Pathologists*, 2010, roč. 133, č. 4, s. 569-576

- [38] LEE,S.H., VIGLIOTTI, V.S., VIGLIOTTI, J.S., JONES, W., WILLIAMS, J., WALSHON, J.: Early Lyme disease with spirochetemia - diagnosed by DNA sequencing. *BMC research notes*, 2010, roč. 3, s. 1-8
- [39] DEPIETROPAOLO, D.L., POWERS, J. H., GILL, J. M., FOY, A. J.: Diagnosis of Lyme Disease. *American Family Physician*, 2005, roč. 72, č. 2, s. 297-303
- [40] DESSAU, R.B., BANGSBORG, J.M., EJLERTSEN, T. et al.: Utilization of serology for the diagnosis of suspected Lyme borreliosis in Denmark: Survey of patients seen in general practice. *BMC Infectious Diseases*, 2010, roč. 10 , s 1 -10
- [41] KULLBERG, B.J., BERENDE, A., VAN DER MEER, J.W.M.: The challenge of Lyme disease: tired of the Lyme wars. *The Netherlands Journal of Medicine*, 2011, roč. 69, č. 3, s. 98-100