

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra biologických a lékařských věd

Laboratorní diagnostika lymeské borreliózy

(diplomová práce)

Hradec Králové 2006

Radka Štemberková

Své upřímné poděkování bych chtěla věnovat paní MVDr. Zuzaně Čermákové za profesionální vedení a odborné konzultace při psaní této diplomové práce. Také bych ráda poděkovala labòrantkám z oddělení parazitologie Ústavu klinické mikrobiologie za vstřícnost a milé přijetí v laboratoři. Nemalý dík také patří sekretářce Dagmar Dlhé za poskytnutí určitého administrativního zázemí.

1.	ÚVOD A CÍL PRÁCE.....	6
2.	TEORETICKÁ ČÁST.....	8
2.1.	HISTORIE LYMESKÉ NEMOCI.....	8
2.2.	BIOLOGIE BORRELIA BURGDORFERI.....	9
2.2.1.	Obecná mikrobiologie.....	9
2.2.2.	Borreliové antigeny a jejich funkce.....	11
2.2.3.	Cirkulující imunokomplexy.....	16
2.2.4.	Borreliacidní protilátky.....	16
2.2.5.	Tvorba cyst.....	16
2.3.	EPIDEMIOLOGIE.....	17
2.3.1.	Geografické rozšíření.....	17
2.3.2.	Cyklus klíštěte a Borrelie.....	18
2.3.3.	Lymeská borrelióza v České republice.....	19
2.3.4.	Další významné aspekty.....	20
2.4.	PATOGENEZE LYMESKÉ BORRELIÓZY.....	21
2.4.1.	Patogenní faktory kódované spirochétami.....	21
2.4.2.	Ovlivnění imunity hostitele.....	22
2.5.	KLINICKÉ RYSY LYMESKÉ BORRELIÓZY.....	24
2.5.1.	Postižení kůže.....	25
2.5.2.	Postižení kloubů.....	25
2.5.3.	Postižení nervového systému.....	26
2.5.4.	Postižení srdce.....	27
2.6.	LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA.....	28
2.6.1.	Metody nepřímé.....	28
2.6.2.	Metody přímé.....	31
3.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	34
3.1.	CHARAKTERISTIKA SOUBORU.....	34
3.2.	LABORATORNÍ METODIKA.....	34
3.2.1.	Stanovení IgG a IgM protilátek metodou EIA.....	35
3.2.2.	Detekce IgG nebo IgM protilátek metodou WB.....	37
4.	VÝSLEDKY.....	39
4.1.	Přehled naměřených výsledků.....	39
4.2.	Přehled výsledků dotazníků.....	47
5.	DISKUZE.....	52
6.	ZÁVĚR.....	57
7.	SEZNAM LITERATURY.....	59

SEZNAM ZKRATEK

- ACA – acrodermatitis chronica atrophicans
ASPHLD – Association of state public health laboratory directors
ATB – antibiotikum
B.b. – *Borrelia burgdorferi*
B.b.s.s.; s.l. - *Borrelia burgdorferi sensu stricto, sensu lato*
B.gar., af. – *Borrelia garinii, afzelii*
BAT – borreliacidal antibody test
BBK 32, 50 – fibronektin vázající protein
BL – borreliový lymfocytom
BSK II – Barbour – Stonner – Kelly médium
CDC – Centres for Disease Control
CIK – cirkulující imunokomplexy
CMV – cytomegalovirus
CNS – centrální nervový systém
CSF – cerebrospinální fluidum
DAB – diaminobenzidin
DbpA, B – decorin binding protein A, B
EBV – Epstein – Baar virus
ECM – erythema chronicum migrans
EIA – enzyme immunosorbent assay
ELISA – enzyme linked immunosorbent assay
ELMI – elektronová mikroskopie
EM – erythema migrans
EMIBA – enzyme linked, IgM capture, immunocomplexes, biotinnylated antigen assay
Erp – OspE and OspF related protein
Fla A, B – flagelin A, B
hLFA - 1 α – human lymphocyte function associated antigen - 1 α
HMW – protein vysokomolekulární hmotnosti
HsP – heat shock protein
HSV – herpes simplex virus
IFA – immunofluorescence assay

LA – lymeská artritida
LB – lymeská borrelióza
LD – lyme disease
MAC – membránu atakující komplex
MEP - main extracellular protein
MHC – main histocompatibility complex
Mol. hm. – molekulová hmotnost
NB – neuroborelióza
nd - neprovedeno
NM – nitrocelulózová membrána
Osp – outer surface protein
PCR – polymerase chain reaction
PNS – periferní nervový systém
r – rekombinantní
RA – revmatoidní artritida
SF – synovial fluid (synoviální tekutina)
SLE – systémový lupus erythematosus
TLR 2, 4 – toll like receptor
TMB – tetrametylbenzidin
WB – western blot

1. ÚVOD A CÍL PRÁCE

Lymeská borelióza (LB) či lymeská nemoc představuje relativně nový globální zdravotní problém. V současné době je nejčastějším onemocněním přenášeným klíšťaty v Severní Americe a Evropě (27).

Onemocnění bylo nazváno lymeská nemoc podle malého města Lyme ve státě Connecticut (USA), kde byl na počátku osmdesátých let zkoumán epidemický výskyt zánětlivé arthropatie u dětí a dospělých (5). Původce choroby byl poprvé izolován z klíštěte roku 1982 a dva roky poté byl nový bakteriální druh zařazen do rodu *Borrelia* a označen po svém objeviteli jménem Willy Burgdorfer, *Borrelia burgdorferi* (27,30).

Borelióza je multisystémové onemocnění způsobené mikroaerofilní, gramnegativní spirochetou z řádu *Spirochetales* – *Borrelia burgdorferi* sensu lato (B.b.s.l.) (5). Na základě řady molekulárních biologických metod byla spirochéta *Borrelia burgdorferi* sensu lato rozdělena na tři následující klinicky nejvýznamnější druhy: *Borrelia burgdorferi* sensu stricto (B.b.s.s., všechny americké kmeny), *Borrelia garinii* a *Borrelia afzelii* (evropské kmeny včetně B.b.s.s.) (4,5,27,34,64). Tyto jednotlivé druhy se často spojují s typickými klinickými příznaky. B.b.s.s. nejobvykleji způsobuje záněty kloubů (lymeské mono-, polyartritidy - LA), srdeční obtíže a kožní projevy (erythema migrans – EM), *B. afzelii* je prakticky jedinou příčinou acrodermatitis chronica atrophicans (ACA) a mezi dominantní klinické projevy *B. garinii* patří neuroborelióza (4,5,27). Takové rozdělení však není striktní, pouze je nejběžnější.

Včasná diagnóza a terapie EM účinnými antibiotiky (ATB) je nezbytná k prevenci chronických srdečních, neurologických a kloubních obtíží (60). Rutinní laboratorní diagnostika využívá nejvíce nepřímého průkazu specifických protilátek třídy IgG a IgM v séru pacienta metodou ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) nebo EIA (enzyme immunosorbent assay) následovanou imunoblotingem (běžně western blot – WB) (32). Je-li výsledek nejasný může být doplněn metodami přímého průkazu borelií např. elektroňovou mikroskopií, kultivací či polymerázovou řetězovou reakcí (PCR). Jde o velmi diskutabilní a poměrně ekonomicky náročné možnosti diagnostiky s relativně nízkou výtěžností (32,50).

Cílem této práce je vzájemné porovnání výsledků laboratorního testování a klinických projevů LB v souboru pacientů Fakultní nemocnice Hradec Králové v královehradeckého regionu. Mou snahou je přiblížit na souboru 116 pacientů nejvýznamnější klinické projevy lymeské nemoci v našem regionu, výsledky sérologických vyšetření a zjistit četnost testovaných boreliových antigenů ve vztahu ke klinickým projevům LB.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. HISTORIE LYMESKÉ NEMOCI

První zmínku o lymeské borrelióze učinil dermatolog Buchwald, který publikoval popis acrodermatitis chronica atrophicans. Několik let poté byly také popsány další kožní projevy, lymfocytom a erythema migrans (5).

Swellingrebel pojmenoval v roce 1907 nový rod organismu *Borrelia* k počtě A. Borrelovi. Po srovnání s jinými rody jako je *Treponema* a *Leptospira*, byl tento rod zařazen do řádu *Spirochetales* (23).

Následující desetiletí objevů nových klinických příznaků a celé řady teorií a názorů o příčinné souvislosti tohoto multisystémového postižení vedla k zásadnímu objevu v osmdesátých letech, kdy Steere se svými spolupracovníky zkoumali zánětlivé artopatie epidemického rázu u 39 dětí a 12 dospělých, která zasáhla oblast poblíž městečka Lyme (Connecticut). Většina dětí trpěla juvenilní revmatoidní artritidou ve spojení s erytémem. Vědcům neunikla skutečnost, že oblast je typická rozšířením klíšťat rodu *Ixodes dammini* (nyní *Ixodes scapularis*) (5).

V roce 1982, Willy Burgdorfer a jeho kolegové poprvé izolovali bakterii způsobující LB, která velmi záhy byla po svém objeviteli pojmenována *Borrelia burgdorferi* (27,30).

Dermatologické formy onemocnění byly poprvé popsány ve Skandinávii a v Německu, neurologické postižení ve Francii a v Německu a revmatologické příznaky ve Spojených státech (52).

Zlomovým okamžikem pro diagnostiku bylo setkání CDC/ASPHLD v roce 1995 v Dearborn Michigan, které zavedlo dvoufázový protokol k popisu onemocnění a vymezilo pro LB klinická a laboratorní kritéria (32).

Tab.2.1.1.: Historické mezníky lymeské borreliózy dle let a autorů (výběr) (5)

rok	objev	autor
1883	První objev idiopatické atrofie kůže, později označené jako acrodermatitis chronica atrophicans (ACA)	Buchwald
1894	Lymphocytosis benigna cutis	Spiegler
1907	Objev rodu <i>Borrelia</i>	Swellengrebel
1909	Erythema migrans	Afzelius
1971	Zavedení techniky kultivace borrelií	Kelly
1975	Epidemická artritida	Steere
1982	Izolace <i>Borrelia burgdorferi</i> v klíštěti <i>Ixodes dammini</i>	Burgdorfer
1984	Průkaz protilátek v séru nemocných s lymeskou borreliózou	Ackermann
1987	Doporučen název lymeská borrelióza (III. Mezinárodní konference, New York)	
1988	První průkaz borreliie ve tkáni	Duray a Steere
1995	Vymezení klinických a laboratorních kritérií lymeské borreliózy na CDC/ASPHLD setkání v Dearborn Michigan	

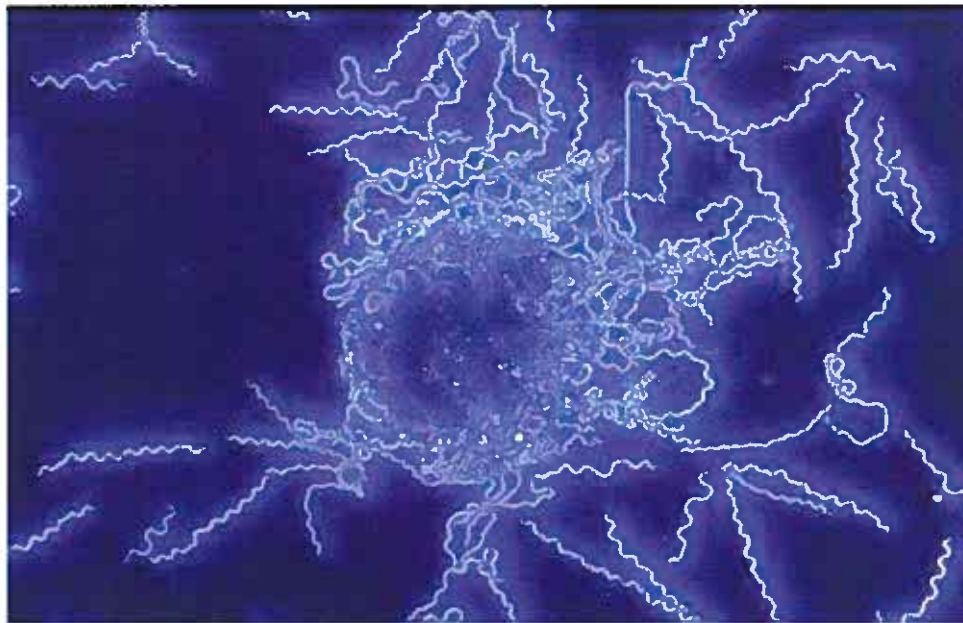
2.2. BIOLOGIE BORRELIA BURGENDORFERI

2.2.1. Obecná mikrobiologie

Borrelia burgdorferi je mikroaerofilní, gramnegativní, kultivačně náročná spirochéta vyznačující se helikálním (spirálovitým) tvarem o délce 10 – 30 µm a šířce 0,2 – 0,25 µm (64) a tupým až zašpičatělým zakončením (30).

Tzv. S – vrstva (surface – povrchová) bez charakteristického substrukturálního vzoru přiléhá na vnější membránu tvořenou třemi vrstvami. Ta je složena ze 45,9 % proteinů, z 50,75 % lipidů a z 3,33 % jiných uhlovodíků. Obklopuje periplazmatický prostor, tvořených počtem 7 – 9 bičků, umožňujících borrelii

pohyb, a protoplazmatický válec. Bičíky, procházející pod vnější buněčnou stěnou, jsou upevněny do bazálních disků a také dávají borrelii serpentinový tvar (30). Velká pružnost membrán jí umožňuje kromě pohybu také tvorbu cyst a vylučování membránových vezikulů, které spirochéta vystavuje ze stejných složek jako buněčnou stěnu, a obsahují plazmidovou výbavu (5).



Obr. 2.2.1.1.: *Borrelia burgdorferi* (odkaz č.1)

Genom typického kmene je mezi bakteriemi unikátní a mezi jednotlivými druhy nalézáme určité odlišnosti. Avšak některé rysy, jako např. typické plazmidy, jsou spirochétám B.b.s.l. společné. Např. *Borrelia burgdorferi* sensu stricto kmen B31 obsahuje lineární chromosom o velikosti 911 000 bp a 21 plazmidů (9 cirkulárních a 12 lineárních) o různých velikostech více než 613 000 bp, celkem tedy 1,5 Mbp (27).

Mikroaerofilní borrelie rostou in vitro na Barbour – Stoenner – Kellyho pěstě (BSK II) obohacené vitamíny, aminokyselinami, anorganickými solemi, N – acetylglukosaminem, sérovým albuminem a králičím sérem (30). N – acetylglukosamin je také stavebním kamenem chitinózního exoskeletu klíštěte (4). Při teplotě 30 – 34°C optimální pro množení a metabolismus, a při dostatku živin je generační doba 7 – 20 hodin (64). Nejcharakterističtějším rysem růstu je tvar jednotlivých kolonií na povrchu agaru. Jsou šedé, mělké, s nebo bez vypouklého tmavého středu a hladkých či drsných okrajů podobné „sázenému

vajíčku,, Kolonie se mohou vyznačovat variabilitou vzhledu v rámci izolátu získaného z jediného pacienta. Borrelie ztrácí infektivitu dlouhodobým pasážírováním v závislosti na růstových podmínkách, vnímavosti zvířete a odolnosti kmene (30).

Pro virulenci B.b.s.l. jsou významné vnější povrchové proteiny buněčné stěny (Osp – outer-surface protein), které umožňují spirochétě atakovat savčí buňky, a bičíkové proteiny, které zprostředkují šíření pohyblivých borrelií v hostitelském organismu (5,64). Plazmidy nesou geny hlavních Osp proteinů a pomáhají spirochétě adaptovat se a přežít ve značně odlišných prostředích, ve studenokrevném klíštěti a v savci.

B. burgdorferi má tři hlavní Osp proteiny, OspA, OspB, OspC, spolu s OspD, OspE, OspF a OspG (64). Dále disponuje vnějším a vnitřním bičíkovým glykoproteinem o molekulové hmotnosti 41 (flagelin – Fla) a 14 kDa. Protein s rozmezím molekulové hmotnosti 83 – 93 kDa je označován jako hlavní extracelulární protein (MEP) či protein vysokomolekulární hmotnosti (HMW). Existenčně významné jsou glykosaminopeptidy o mol. hm. = 37 kDa (odpovídá FlaA) a mol. hm. = 39 kDa (BmpA), umožňující průnik borrelií do buňky. Mezi důležité proteiny patří proteiny teplotního šoku (HsP – heat shock proteins) o molekulových hmotnostech 66 a 60 kDa (5,29,36).

2.2.2. Borreliové antigeny a jejich funkce

2.2.2.1. OspA

OspA je jedním z hlavních lipoproteinů vnější membrány B.b.s.l. o molekulové hmotnosti 31 kDa, je používán v serologické diagnostice a při výrobě vakcíny. Bylo popsáno osm OspA sérotypů (27). Zvláště Evropské kmeny jsou v OspA značně variabilní (30). Někdy se může stát, že volné protilátky proti borreliím mohou v CSF chybět, proto je často nalézáný OspA jako jediný diagnosticky použitelný (15).

OspA hraje důležitou roli při osídlování střeva klíštěte borreliemi, neboť jim umožňuje ukotvení v epitelu střeva. Saje-li klíště, snižuje se exprese OspA, což vede k odpoutání se borrelií od tkáně střeva, které pak putují do slinných žláz a odtud do krevního oběhu hostitele (60).

Byla nalezena homologie mezi určitým epitopem OspA a hLFA-1 α antigenem (human lymphocyte function associated antigen - 1 alpha) a zkříženě reagujícími T-lymfocyty v zanícené synovii. Toto spojení zřejmě vyúsťuje v prudký a prolongovaný zánět kloubu v nepřítomnosti živých borrelií a možná indukuje autoimunitní proces (17,67), perzistující i po eradikaci spirochét ATB.

OspA je vysoce zohledňovaný kandidát pro přípravu vakcíny proti LB. Nedávná studie ukázala, že vakcína připravená z mutantního kmene *B. burgdorferi*, který postrádal antigeny OspA a OspB, bude chránit křečky před atakem stejným, ale divokým kmenem, právě díky přítomnosti antigenů p18 a p39. (49). Testované nonborreliacidní protilátky proti OspA inhibovaly borrelie v ústním ústrojí klišťete a chránily myš před infekcí (52).

2.2.2.2. OspB

OspB je rovněž antigeně variabilní protein o molekulové hmotnosti 34 kDa. Hlavní OspB protein často chybí nebo je jen slabě exprimován. Může dojít k jeho ztrátě či změně během kultivace izolátu, podobně i u OspA a OspC proteinů (30).

Bývá zmiňována kombinace HLA-DR 4 a OspA nebo OspB ve spojení s chronickou artritidou a nedostatečnou odpovědí na terapii ATB (2). Použití OspA a OspB antigenů mj. zvýší sensitivitu IgG blotu během prvních týdnů infekce až na 95% (35). OspA a OspB spolu s dalšími proteiny (OspC, P83, flagelin) stimulují protilátkovou odpověď u pacientů s LB (65).

2.2.2.3. OspC

OspC je predominantní séroreaktivní antigen časně fáze onemocnění s molekulovou hmotností ležící mezi 20 a 25 kDa. Pomocí specifických protilátek bylo definováno 16 různých OspC sérotypů v Evropských a Severoamerických izolátech. OspC je tedy heterogennější než OspA, zvláště u kmenů B.b.s.s. a *B. afzelii* (27). Adaptace na různé zvířecí hostitele a selekční tlak jeho imunitní odpovědi je příčinou selekce a hlavní silou udržující variabilitu OspC (66). Genetická banka sekvencí DNA (National Center of Biotechnical information) uchovává více než 100 kmenů z USA a na 300 kmenů z celého světa (62).

Pacienti v pozdním stádiu onemocnění (s NB nebo s LA) nikdy netvoří protilátky ze třídy IgG proti OspC antigenu (36).

Během sání klíštěte je exprese OspC stimulována, je nutný pro průnik borrelií přes hemolymfu do slinných žláz klíštěte, odkud pak přecházejí do hostitele. Exprese OspC stejně jako OspA je podmíněna zvýšením teploty a poklesem pH v důsledku příjmu krve jako potravy (44). Efekt teploty na různou expresi OspA a OspC je zvýšen ko-kultivací *B. burgdorferi* s buňkami klíštěte (64).

2.2.2.4. OspD

OspD je lipopolysacharidový antigen o molekulové hmotnosti 26 – 28 kDa obsažený v buněčné stěně, který svým lytickým působením umožňuje adhezi k receptorům hostitelských buněk (61). Je mu přisuzována funkce toxinu, jediného, který borrelie produkují a je podobný botulotoxinu (5).

2.2.2.5. OspE, OspF, Erp – proteiny

B. burgdorferi také exprimuje OspE (28 kDa), OspF (18 kDa) a Erp – proteiny (OspE- a OspF-related proteins) během sání klíštěte, tvoří se v nadbytku při migračním procesu spirochét, v souvislosti se zvýšením teploty z 23°C na 35°C (31,64). OspE, OspF a Erp nejsou protektivní antigeny. Podléhají antigenním změnám po osmi měsících infekce, zatímco OspA je geneticky stabilní. Během progredující infekce jsou exprimovány nepřetržitě (31). Jejich funkce je zatím neznámá (5).

2.2.2.6. Hlavní extracelulární protein

MEP či HMW protein o molekulové hmotnosti mezi 83 – 93 kDa může být příčinou intracelulární perzistence borrelií. Gen pro P83 je lokalizován podobně jako gen pro flagelin a P39 na chromosomu. Zprostředkovává adhezi k receptorům hostitelských buněk (5).

2.2.2.7. HsP – protein a P60

HsP – protein je povrchově uložený protein o molekulové hmotnosti 66 kDa, který ovlivňuje teplotní změny, jímž jsou borrelie vystaveny při napadení savce klíštětem. Je rovněž přítomen u řady bakterií a v tkáních savců (61). Tyto molekuly byly zachovány během evoluce, snad protože plní důležité subcelulární funkce. Protilátky proti HsP se vyskytují u pacientů s LB, s onemocněním pojivových tkání a zánětlivými střevními chorobami. Díky nízké specifitě je diagnosticky méně významný. Existují přirozené anti-HsP protilátky, které jsou součástí normálního imunitního systému (14).

Antigen P60 patří rovněž do rodiny proteinů teplotního šoku, je také nespecifický, tudíž působí problémy při hodnocení výsledků sérologických testů (64).

2.2.2.8. Bičkový protein flagelin

Je imunodominantní antigen spojený s ranou infekcí o molekulové hmotnosti 41 kDa (14). Hostitel tvoří protilátky třídy IgM v časně fázi infekce (3.- 4. týden), syntéza dosahuje maxima 6.- 8. týden, poté prudce klesá (61). Je nejobvyklejším zdrojem zkřížených reakcí. Anti 41 kDa protilátky se mohou objevit po expozici flagelárním bakteriím, které se často objevují subklinicky (14). Můžeme je nalézt i u jiných borrelií, u *Leptospira* a *Treponema* (65).

Bylo zjištěno, že monoklonální imunoglobuliny proti flagelinu reagují také s myosinem, nervovými axony a různými komponentami bazického myelinu, což může vést po detekci imunitním systémem k demyelinizaci nervových vláken s nezvratnými důsledky chronické NB (61).

2.2.2.9. Antigeny P39 a P37

P39 je glykosaminopeptidový receptor, který borrelie využívá při „coiling fagocytóze“, kdy se neuplatňují lysozomy a mikrotubuly, ale kortex hostitelské buňky a proces cytolýzy (5). Molekulovou hmotností je blízký flagelinu a ve WB je odpovídající pruh obtížně rozeznatelný (36).

P37 protein o molekulové hmotnosti 37 kDa zvyšuje časnou protilátkovou odpověď a odpovídá tzv. FlaA genu. Jde o vnější plášťový protein

periplazmatické flagely (22). Jeho přesná funkce je neznámá. Pro IgG sérodiagnostiku NB a LA je FlaA velmi sensitivním antigenem (54).

Lokalizace lipoproteinů na povrchu buňky je energeticky nevýhodná a u většiny gramnegativních bakterií se nevyskytuje, avšak *B. burgdorferi* pravděpodobně využívá specifický transportní systém pro jejich přenos na povrch, čímž reguluje jejich expresi (31).

Rozdíly mezi u nás se vyskytujícími *B. garinii* a *B. afzelii* jsou ve fenotypu povrchových proteinů OspA, OspB a OspC, ve vnitřním fragmentu flagelinu (FlaII) a také v extracelulárním proteinu MEP (69).

Tab. 2.2.1.1. Specifita borreliových antigenů (29)

antigen	specifita	třída Ab	stádium LB
93 kDa (p83, p100)=MEP	Vysoce specifický	IgG	Pozdní chron. III. stádium
72 kDa, 66 kDa, 62 kDa	Nespecifické	IgG, IgM	Časné a pozdní stádium
60 kDa	Nespecifické	IgG, IgM	Časné a pozdní stádium
58 kDa	Vysoce specifický	IgG, IgM	Neuroborrelióza a III. Stádium
48 kDa	Slabě specifický	IgG, IgM	Podpoří pozitivní diagnózu
43 kDa	Vysoce specifický	IgG, IgM	Pozdní stádium
41 kDa (Fla)	Omezeně specifický	IgG, IgM	Časné a pozdní stádium
39 kDa (BmpA)	Vysoce specifický	IgG, IgM	Časné a pozdní stádium
37 kDa	Pochybně specifický	IgG	Podpoří pozitivní diagnózu
34 kDa (OspB)	Vysoce specifický	IgM	Časné stádium
31 kDa (OspA)	Vysoce specifický	IgM	Časné stádium
30 kDa	Vysoce specifický	IgG	Pozdní stádium
29 kDa	Vysoce specifický	IgG, IgM	Časné a pozdní stádium
28 kDa (OspE)	Vysoce specifický	IgG, IgM	Časné a pozdní stádium
25 kDa (OspC)	Vysoce specifický	IgM	Časné stádium
18 kDa (OspF)	Omezeně specifický	IgM	Podpoří pozitivní diagnózu

2.2.3. Cirkulující imunokomplexy

Cirkulující imunokomplexy (CIK) mohou být detekovány u řady onemocnění včetně LB, většinou jsou tvořeny antigenem specifickým pro mikroorganismus a zrcadlově odpovídající specifickou protilátkou (9). *B. burgdorferi* uvolňuje nepřetržitě velké množství proteinů, což je pravděpodobně příčinou produkce CIK. Ukládání a perzistence CIK se může rozvinout v přetrvávající, obtížně léčitelnou infekci (8). Byly detekovány v séru, v synoviální tekutině (SF) a v CSF u pacientů s EM, NB a LA. Kromě flagelinu a proteinů o molekulových hmotnostech 23 a 66 kDa, obsahovaly imunokomplexy především OspA protein. Takové imunokomplexy byly nalezeny u pacientů s pozdní LB, což zřejmě vysvětluje chybějící reaktivitu OspA ve standardních serologických testech, neboť detekovatelné anti-OspA protilátky jsou začleněny do CIK (9,10).

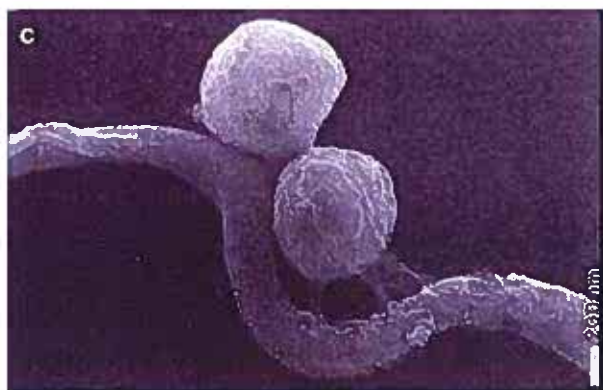
2.2.4. Borreliacidní protilátky

Infekce borreliemi indukuje produkci tzv. borreliacidních protilátek, které aktivují komplement vedoucí až k tvorbě membránu atakujícího komplexu (MAC). Tento komplex zabíjí spirochéty bez účasti fagocytů. Většina borreliových antigenů, které borrelie exprimují na svém povrchu, stimuluje tvorbu těchto vysoce specifických protilátek. BAT test (borreliacid test) může významně pomoci při confirmaci LB v klinické praxi (12).

2.2.5. Tvorba cyst

B. burgdorferi nemůže syntetizovat mastné kyseliny de novo, sérum je jejich významným zdrojem, proto se buňky z 90ti% a do 48 hodin transformují do podoby nepohyblivých cystických forem po inkubaci s BSK II médiem bez králíčího séra. Procento životnosti je různé, řada syntetizovaných proteinů si zachovává antigenicitu (3), avšak lišící se od vegetabilních in vivo forem. Cysty nalézáme rovněž v CSF a v tkáních, které neobsahují dostatek mastných kyselin a lipidů (33). Další morfologické změny, jako je tvorba měchýřků, „blebs“ a pupenů, jsou také pozorovány, je-li borrelie vystavena fyziologickému stresu (změny pH, deplece metabolitů) nebo expozici ATB (64). Tyto blebs a pupeny

obsahují DNA a jsou schopny výměny genetické informace (33). Bylo též zjištěno, že cysty v erythema chronicum migrans (ECM) nemají na svém povrchu OspA, nereagují tedy s příslušnými protilátkami. Může jít o cílenou schopnost těchto cyst vyhnout se rozpoznání imunitním systémem (3). Cysty *B. garinii* jsou považovány za infekční a jsou odpovědné za opakované neúspěchy v terapii ATB a za obvyklé relapsy LB (25).



Obr. 2.2.5.1.: Borreliové cysty po inkubaci s antibiotiky (odkaz č. 2)

2.3. EPIDEMIOLOGIE

Lymeská borrelióza patří v současné době mezi nejčastější infekce přenášené členovci v mírném pásmu severní polokoule. Symptomy lidského onemocnění vyvolané *Borrelia burgdorferi* sensu lato jsou popisovány v Evropě již koncem 19. století (5).

2.3.1. Geografické rozšíření

Pomocí analýzy genomu (uspořádání sekvencí DNA) byla metodou rozlišení polymorfismu restrikčních fragmentů B.b.s.l. rozdělena na tři geneticky determinované druhy: *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii*, *B. afzelii* (6). Spolu s *B. valaisiana* a *B. lusitaniae* a novým *B. bisetii* patří mezi druhy dokumentované v Evropě. *B. garinii* a *B. afzelii* jsou zde nejčastěji popisovanými druhy, B.b.s.s. je rozšířena hlavně v západoevropských zemích (27). Od B.b.s.s. se vyčlenila *B. andersonii* (6).

Vzdálený východ Ruska a asijské země obývají *B. garinii* a *B. afzelii*. *B. japonica*, *B. tanukii* a *B. turdi* jsou omezeny na území Japonského souostroví, kde byla nalezena i *B. valaisiana* (27). Na jižní polokouli byly případy LB popsány v Kolumbii, v Bolívii, v Argentíně, v Peru i v Africe a v Austrálii, ale spirochéty B.b.s.l. dosud nebyly izolovány (53). Jiné borrelie jako *B. lonestari* a *B. miyamotoi* jsou schopny vyvolat onemocnění klinicky podobné LB. Takové rozdělení není pravděpodobně konečné, další dosud nepojmenované genomické skupiny poukazují na značnou rozmanitost tohoto druhu (5).

Tab. 2.3.1.1. Přehled druhů *Borrelia burgdorferi* sensu lato (5,27)

druh Borrelie	výskyt
<i>Borrelia burgdorferi sensu stricto</i>	Severní Amerika, západní Evropa, nevyskytuje se v Rusku, Finsku, Asii
<i>Borrelia garinii</i>	Evropa, Čína, Japonsko, Korea, východ Ruska, Austrálie
<i>Borrelia afzelii</i>	Evropa, Čína, Japonsko, Korea, východ Ruska
<i>Borrelia andersonii</i>	Severní Amerika
<i>Borrelia valaisiana</i>	UK, Irsko, Nizozemí, Švýcarsko, Německo, Itálie Japonsko
<i>Borrelia lusitaniae</i>	Portugalsko, střední Evropa, Tunis
<i>Borrelia bissetii</i>	Severní Amerika, Evropa
<i>Borrelia japonica</i>	Japonsko
<i>Borrelia tanukii</i>	Japonsko
<i>Borrelia turdi</i>	Japonsko

2.3.2. Cyklus klíštěte a Borrelie

Přenašečem borrelií je hlavně klíště patřící do komplexu *Ixodes ricinus*, kmen Členovci (*Arthropoda*), z nichž *I. ricinus* a *I. persculatus* jsou Euroasijské druhy a *I. scapularis* a *I. pacificus* jsou Severoamerické druhy (64).

Klíště prochází čtyřmi vývojovými stádii během 2-letého životního cyklu: vajíčko, larva, nymfa, dospělec (imago) (66). Larvy se líhnou počátkem léta z vajíček nakladených na jaře, živí se na malých savcích, po nasycení spadnou na zem a ještě na konci léta se vyvinou v nymfy, které jsou borreliemi nejvíce

promořeny (5). Ty přezimují, dychtivě se pak celé jaro a léto krmí, aby se na podzim přeměnily v dospělce, kteří si již hledají větší zvířata (zvěř, dobytek, psi, lidé) jako své hostitele, na nichž jsou schopni prosperovat (26). Všechna klíšťata se pak živí nejméně dvakrát, jako larva a jako nymfa, přičemž pouze dospělé samice se živí potřetí. Spirochěty přecházejí během infekčního cyklu z klíštěte na savce a zpět na jedno ze svých vývojových stádií (66). Transovariální přenos B.b.s.l. byl sice experimentálně prokázán, ale při generalizované infekci klíštěte dochází k degeneraci vajíček (5), avšak uskutečňuje-li se takový přenos, je velmi efektivní, neboť udrží spirochěty v přírodě po pět až devět generací (64).



Obr. 2.3.2.1.: *Ixodes ricinus* - larva, nymfa, imago – samec, imago – samice (odkaz č.3)

2.3.3. Lymeská borrelióza v České republice

V ČR se *I. ricinus* (*Klíště obecné*) vyskytuje na celém území, promořenost klíšťat borreliemi se pohybuje v rozmezí 5 – 10%, lokálně až 30% (26).

Od roku 1986, kdy byla tato nová nozologická jednotka zařazena mezi infekce podléhající povinnému hlášení (5), až do roku 1995 měla LB v ČR stoupající tendenci s celkovým počtem 6302 případů nemocných. Od tohoto roku pak pozorujeme klesající tendenci s 2722 případy celkem (37). Vzestup frekvence hlášených případů LB, zejména po roce 1990, je ovlivněn zlepšením laboratorní a klinické diagnostiky (5). Rozložení nemocnosti v ČR není rovnoměrné, nejvyšší

incidenci vykazují západočeský, středočeský a severomoravský region, z okresů pak pravidelně např. Příbram, Frýdek – Místek, Tábor (37).

Noví pacienti s LB jsou hlášeni v průběhu celého roku, onemocnění vykazuje sezónní výskyt v závislosti nejen na ročním období, ale také na mikroklimatu jednotlivých měsíců (37) či na chování hostitele v rezervoárové oblasti (48).

Tab.2.3.3.1. Počet hlášených případů LB a klíšťové encefalidity v České republice v letech 1996 - 2004 (absolutní počty)

rok	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004
lymeská borrelióza	4192	2470	2138	2722	3847	3547	3658	3677	3243
klíšťová encefalitida	571	415	422	490	719	633	647	606	507

Zdroj: www.szu.cz (EPIDAT)

2.3.4. Další významné aspekty

Udává se, že pouze jedna třetina pacientů si vybavuje přisátí klíštěte, avšak přisátí larválních stádií je pro jejich miniaturní velikost snadno přehlédnutelné (69). EM nacházíme u poloviny pacientů a nemusí být detekován u dětí a jedinců s tmavou pleť (67). Typický erytém (rozšiřující se červená skvrna s tmavšími okraji) se v místě přisátí klíštěte objeví obvykle za 3 – 5 dní, ale i za několik hodin či za 4 – 5 týdnů a může být variabilní (60).

V Evropě (Polsko) je zánětlivá reakce v místě kousnutí mírnější, stejně jako další symptomy LB, v USA (New York) předchází onemocnění obvyklý flu-like syndrom. Takové rozdíly jsou způsobeny různými vektory a přenašeči, druhy borrelií, klimatickými podmínkami (70), ale také profesním zaměřením. Nejvíce případů LB je udáváno mezi lesními pracovníky a obyvateli zalesněných území, nemají však větší zdravotní problémy, symptomy LB jsou necharakteristické a až 47% vykazuje séropozitivitu vůči borreliovým antigenům (48).

Ačkoli jsou klinické rysy u evropských a amerických pacientů podobné, určité rozdíly jsou popsány. V Evropě je častější lymfocytom, ACA (prakticky ve 100% spojována s *B. afzelii*) a EM, encefalomyelitida a meningopolyneuritida (Bannwarthův syndrom) jsou spojovány s *B. garinii*. V Severní Americe převažuje diseminovaná časná infekce, sekundární kožní léze, lymeská meningitida a artritida způsobené *B. burgdorferi sensu stricto* (19).

Sérologické testování borrelií je mnohem problematictější v Evropě než v Americe, neboť infekci v Evropě mohou vyvolat tři druhy borrelií. Dále protilátková odpověď je v Evropě mnohem omezenější, neboť je zdejší populace více promořena nespecifickými borreliovými antigeny, a také subklinická infekce je v Evropě obvyklejší, což rovněž komplikuje diagnostiku LB (19).

LB postihuje všechny věkové skupiny s vzestupem po 30. roce života a vrcholem mezi 45 – 55 roky, častěji onemocní ženy v poměru 1 : 1,7. Lze pozorovat rozdíly v klinických manifestacích (37). Vnímavost k nákaze je všeobecná, postihuje i děti s maximem mezi 5 – 15 lety s incidencí 140 na 100 000 a s EM u 89% pacientů (34), pozorovány jsou reinfekce i asymptomatické infekce (5).

2.4. PATOGENEZE LYMESKÉ BORRELIÓZY

Borrelie vstupují do hostitelského organismu prostřednictvím svého přenašeče, kterým je nejčastěji klíště (5). Jiné hematofágní vektory mohou hrát roli v udržování B.b.s.l. v enzootickém cyklu, avšak přenos spirochét na člověka se děje jen vzácně (27). K přenosu infekce je totiž důležitá relativně dlouhá doba 12 – 72 hodin, během níž klíště saje (64). Spirochety se musejí odpoutat od epitelálních buněk střeva klíštěte, kde se vyskytují nejvíce, aby jimi prostoupily a skrze hemolymfu jsou rozesety do jiných tkání včetně slinných žláz. Současně prodělávají změny genové exprese, což jim umožňuje nejen přežít v odlišném prostředí, ale také uniknout specifické imunitní odezvě hostitele (60), spirochéta je tedy vysoce adaptabilní. Jsou též schopny proniknout neporušenou kůží (výkaly klíšťat, odstraňování holou rukou) (5).

2.4.1. Patogenní faktory kódované spirochétami

Většina výše popsanych povrchových lipoproteinů *B. burgdorferi* hraje významné role v uchycení se v odlišném prostředí klíštěte i savce a částečně i v patogenezi. OspA chrání borrelie před působením proteáz klíštěte a před komplementovým systémem savce, ale hlavně aťakuje povrchy různých buněk, což je důležité k

ukotvení spirochéty v systému (64). Průnik kůží a jinými tkáněmi je usnadněn vazbou antigenů OspA, OspB, P70 a P20 na plazminogen, který je nutný pro jejich úspěšnou diseminaci (5).

B. burgdorferi se v kůži spojuje s kolagenními vlákny. Vazba je zprostředkována mezi tzv. dekorinem (s kolagenem asociovaný proteoglykan) a borrelií exprimovaným decorin-binding proteinem (Dbp), který je kódován DbpA a DbpB geny. Proteinové produkty DbpA a DbpB genů se nazývají stejně a vzájemně se ovlivňují. Samotný borreliový DbpA protein inhibuje atak pomocí DbpB proteinu na lidský dekorin, což efektivně omezuje bakteriální adheenci. Zatímco DbpB protein vazbu DbpA na dekorin neinhibuje. DbpA hraje důležitou roli v časně fázi LB. Adherenci *B. burgdorferi* usnadňuje přežití a množení malého množství spirochét v kůži před diseminací krevní cestou. Dekorin, pomocí něhož invaduje spirochéta buňku využitím receptorově – zprostředkované endocytózy, může být příčinou přechodu LB do pozdního stádia. Tento receptor vázající dekorin byl izolován. Vazba borrelie na dekorin ovlivňuje jeho schopnost regulovat zánět (28). Borreliové DbpA a DpbB proteiny také zprostředkovávají vazbu na kolagenní fibrily extracelulární matrix srdce, nervového systému a kloubů, což vysvětluje častou přítomnost organismu v těchto orgánech (64). Jiné proteiny tzv. BBK 32 a 50 (fibronektin vázající proteiny) rovněž umožňují adheenci borrelií k extracelulární matrix, jsou exprimovány během sání klíštěte a pomáhají kolonizovat slinné žlázy klíštěte a migrovat ze sacího ústrojí do hostitele (52).

2.4.2. Ovlivnění imunity hostitele

B. burgdorferi určitým způsobem modifikuje a napadá imunitní odpověď a obývá imunologicky privilegovaná místa. Ke vstupu do mozku využívá kolagenu cév, k němuž se váže přes chondroitin sulfát, heparan sulfát a dekorin (51). Váže se též na kolagení fibrily pojivové tkáně a lidské synoviální buňky (17).

Během časně fáze onemocnění invaduje kožní Langerhansovy buňky, v nichž tlumí expres MHC molekul II. třídy. Potlačuje tak lokální imunitní odpověď v ACA (1). Buněčný povrch váže hostitelské proteiny jako jsou IgM protilátky, urokináza, plazminogen a fibrinogen, maskuje se tak před imunitním systémem a migruje intersticiálními prostory (18). Specifické protilátky proti *B. burgdorferi* se

formují poměrně pomalu po vstupu infekce do organismu, což dává spirochetám šanci dělit se (61).

V pokusech *in vitro* byla prokázána adherence k neuronům, gliovým a Schwanovým buňkám. Adheze na receptory jsou zprostředkovány galaktocerebrosidy a složkami myelinu. Takové reakce mohou vyústit v perzistenci borrelií s následnou zánětlivou odpovědí, která se může u 50 % pacientů rozvinout v autoimunitní proces (61). Vstupuje do fibroblastů a endotelových buněk, v nichž může dlouhodobě přežívat, což je nejspíš příčinou rezistence vůči terapii ATB (18).

Indukuje některé zánětlivé cytokiny (13) a mitogenezi polyklonálních B-lymfocytů (17). Lipopolysacharidy výrazně stimulují makrofágy k produkci protizánětlivého cytokinu IL-1, který vyvolává zvýšení teploty, zrychlení sedimentace erytrocytů i změny v kůži a kloubech (61). Experimentálně bylo prokázáno v kultivovaných imunitních, mozkových a endotelových buňkách uvolnění IL-6, -8, -10, což je způsobeno vazbou Osp k povrchovému znaku CD14 či k TLR receptorům (tool-like receptor). IL-10 je důležitý prozánětlivý downregulátor imunitní odpovědi (13). Krevní buňky pacientů s perzistentní LB uvolňují signifikantně nižší hladiny cytokinů INF α a TNF α v odpovědi na specifické borreliové stimuly. Má tedy vliv na rovnováhu mezi pro- a protizánětlivou imunitní odpovědí (17).

B. burgdorferi desenzibiluje aktivované lidské monocyty a navrácí jim toleranci, resp. snižuje jejich odpověď vůči TLR2 (váží lipoteichoové kyseliny LTA) a TLR4 receptorům (váží lipopolysacharidy LPS). LTA a LPS mohou indukovat zkříženou toleranci ke specifickým borreliovým stimulům (17).

Důležitá role specifických T-lymfocytů v patogenezi LA byla popsána v odstavci o OspA proteinu (viz 2.2.2.1. OspA). Funkce B-lymfocytů a produkce protilátek v patogenezi LB je stále nejasná. Th-1 lymfocyty, které převažují při infekci boreliemi, jsou zahrnuty v aktivaci makrofágů, které mohou indukovat typickou LA. Produkují IL-1, TNF, PGE2 a kolagenázy, které byly detekovány v synoviální tekutině od pacientů s LA. IL-1 a TNF aktivují osteoklasty a kostní reabsorpci vedoucí ke klinickým manifestacím LA (64).

2.5. KLINICKÉ RYSY LYMESKÉ BORRELIÓZY

Lymeská borrelióza může být vymezena do tří klinických stádií, která se mohou částečně překrývat (64).

První stádium, tzv. časné onemocnění, je charakterizováno lokálním zmnožením spirochét v místě vstupu (5). Během několika dnů až týdnů se u 30 – 50% pacientů objeví erythema migrans které je často provázeno chřipkovými příznaky, jako je malátnost, únava, bolesti hlavy, teplota a regionální lymfadenopatie (64). IgM protilátky jsou detekovatelné u 50 – 90% pacientů. IgG protilátky jsou obvykle na příliš nízké úrovni (44).

Během druhého stádia časné diseminace dochází za několik týdnů až měsíců k rozšíření spirochét do organismu cestou krevní i lymfatickou (5). Postihují řadu orgánů i tkání, ve kterých jsou schopny se uchytit. Jde zejména o svalstvo, klouby, myokard, játra, centrální a periferní nervový systém (CNS, PNS) a sekundárně může být postižena kůže (EM) (4). Rozvíjí se meningitida, kraniální neuritida a polyradikuloneuritida, v Evropě bývá popisován Bannwarthův syndrom (55). Někteří pacienti trpí srdečními problémy (palpitace, poruchy vedení vzruchu, myokarditida) (58). Artralgie a myalgie indikují časné muskuloskeletální postižení. Příмым důsledkem infekce borreliemi jsou keratitida a optická neuritida (64). Protilátky jsou detekovatelné u 70 – 80% pacientů. IgM jsou normálně přítomny, IgG se objeví záhy (44).

U malého procenta případů se za několik měsíců až let rozvine chronické stádium s postižením řady orgánů. Je charakterizováno intermitentními artritidami u 60% neléčených či nekompletně léčených (67), acrodermatitis chronica atrophicans (ACA) a neuropatiemi s postižením CNS, které zahrnují encefalomyelitidu, demenci a degenerativní demyelinizaci (4). V USA jsou neurologické symptomy mírnější, označené jako lymeská encefalopatie s paměťovým deficitem, depresiemi a dráždivostí (64). Ve většině případů nejsou IgM protilátky detekovatelné, IgG nalézáme u 90 – 100% pacientů (44).

2.5.1. Postižení kůže

Kožní formy LB jsou reprezentovány dermatózami, u nichž je jediným etiologickým agens *B. burgdorferi*, a řadí se sem erythema migrans (EM), borreliový lymfocytom (BL) a acrodermatitis chronica atrophicans (ACA) (5).

EM, první a nejčastější symptom, který se objevuje u 60 – 70% pacientů obvykle za 4 – 14 dní, což vede k myšlence, že všechny druhy *B. burgdorferi* nezpůsobují EM. U *B. afzelii* se uvádí spojení pouze s kožními symptomy, jako je EM nebo ACA (4).

EM je typicky červená, rozmanitá léze, která se objevuje v počáteční fázi infekce v místě kousnutí klíštěte nejčastěji za 3 – 30 dnů. Obvyklý je několikadenní odstup mezi přisátím klíštěte a vznikem erytému. Rozlišují se tři typy – anulární, homogenní a homogenní s lemem (5). Erytém se šíří do periferie a v centru bledne. Průměr erytému je od 5 cm až po několik desítek centimetrů (55). Mohou jej doprovázet typické flu-like symptomy s bolestí hlavy, kloubů a svalů a subfebriliemi (5).

ACA je pozdní kožní manifestace LB, chronická a progresivní, temně červená léze s edémem obvykle nad extenzory kostních výběžků (27). Objevuje se za několik měsíců po kontaktu s klíštětem jako akutní zánět kůže, který přechází v atrofickou fázi (ztenčení a zřasení kůže připomínající cigaretový papír, prosvítání žilní kresby) přibližně u 10% pacientů s ACA (5).

Borreliový lymfocytom vzniká v místě přisátí klíštěte za 1 až 70 dnů. Obvykle je to solitární uzlík tmavě červené barvy s hladkým, lesklým povrchem do 3 – 5 cm velikosti. Je typicky nalézán na boltci ucha a špičce nosu, méně na dvorci prsní bradavky a jiných lokalizací. Bývá provázen regionální lymfadenitidou (5).

2.5.2. Postižení kloubů

V roce 1975, kdy byla definitivně pochopena juvenilní revmatoidní artritida u dětí, spojili vědci tuto chronickou artritidu s nově pojmenovaným etiologickým agens, *B. burgdorferi* (43).

Lymeská artritida (LA) je nejobvyklejší muskuloskeletální symptom způsobený borreliovou infekcí v Severní Americe (27). Zahrnuje široké spektrum změn a projevů v oblasti pohybového aparátu. Kromě časné artralgie a myalgie, jsou to

hlavně akutně či chronicky probíhající artritidy, dále záněty šlach a jejich pochev (tenditidy, tendovaginitidy), úponů vazů (entezitidy), kloubních pouzder (kapsulitidy) a svalů (myositidy) (5).

Po týdnech až měsících infekce je nemocný vystaven atakům artralgií a mono- a oligoartritidám. Tyto záněty jsou většinou asymetrické, postihují velké klouby (především kolenní) a trvají dny i týdny. Navzdory léčbě se asi u 10% pacientů objeví za 1 rok i déle chronická LA, která je histologicky podobná revmatoidní artritidě (2). Ta se vyvíjí u části pacientů s haplotypem HLA-DRβ1*0401 a podobnými alelami a je odolná léčbě (43). Není-li infekční etiologie onemocnění známá od počátku, pak může být chybně diagnostikována jako revmatoidní artritida (21). Perzistující synovitida kolena může u některých pacientů vyústit do chronické artritidy anebo spustit autoimunitní proces rezistentní léčbě ATB, který je někdy nazýván post-LD syndrom (LD lyme disease). Ve skutečnosti jde o různé klinické jednotky, neboť u pacientů s post-LD syndromem nalézáme neurologické poruchy (67).

Postižení pohybového aparátu v průběhu jednotlivých stádií LB může být rozděleno do tří skupin:

1. artralgie, muskuloskeletální bolest bez objektivního nálezu na kloubu a okolí
2. artritida, kloubní zánět s objektivním fyzikálním nálezem na synoviální membráně s nebo bez kloubního výpotku
3. chronické změny kloubů a kostí pod kůží s ACA (5).

2.5.3. Postižení nervového systému

Neuroborrelióza (NB) je nejčastější manifestací diseminované infekce v Evropě a obvyklým symptomem v Severní Americe. Všechny tři běžné druhy *B. burgdorferi* sensu lato jsou známé jako původci NB a 72% případů v Evropě je způsobeno *B. garinii*. Postihuje CNS i PNS (27).

B. burgdorferi je v CNS lokalizovaná v leptomeningách, nervových kořenech a dorzálních kořenových gangliích, ale ne v parenchymu. Na periférii ji nacházíme v endoneuriu a ve tkáních spojených s periferními nervy (kosterní svalstvo, srdce, aorta, žlázy) (37).

Jednotlivé neurologické příznaky se dělí na časně a pozdní (55). Obličejová obrna je nejčastější klinický indikátor, bolesti hlavy a meningismus jsou

symptomy zánětu subarachnoidálního prostoru. Lymeská meningitida (projevuje se bolestmi hlavy a zvracením) se objevuje jako přímý důsledek invaze borrelií do nervového systému (51). V Evropě bývá v časně fázi NB popisován Bannwarthův syndrom (meningitis, neuritis cranialis, meningopolyneuritis), který se projevuje prudkou až mučivou kořenovou bolestí (55). V Severní Americe jsou u pacientů s NB nejběžnější meningitida, encefalopatie, obličejová obrna s parézou n. facialis, radikulitida a periferní polyneuropatie (11). Ta se řadí mezi chronické neurologické symptomy (46), objevuje se i v Evropě a manifestuje se míšní kořenovou bolestí (64). Po měsících až letech po primární infekci, či po delší době latence se objevují chronická encefalitida, polyneuritida a encefalomyelitida (46). Méně často jsou popisovány obrazy podobné roztroušené skleróze, neurologické a psychiatrické symptomy (55).

Imunitní mechanismy akutní NB jsou částečně objasněny. Imunitní odpověď je soustředěna do CNS, zahrnuje pleocytózu, disrupci bariéry krev – mozek a intratekální syntézu protilátek. V CSF pacientů nalézáme T- a B-lymfocyty a některé cytokiny a enzymy, které hrají důležitou roli v obraně proti spirochétám. Mechanismům chronické NB není zcela porozuměno, ví se o zkříženě reagujících T-lymfocytech s vlastními antigeny (13).

2.5.4. Postižení srdce

Lymeská karditida (LK) je označení pro postižení srdce a objevují se ve druhém stádiu několik týdnů po infekci (64). V USA se objevuje u 4 – 10% pacientů s neléčenou LB. V Evropě je incidence nižší od 0,3 – 4%. Takové rozdíly jsou způsobeny rozdílnou virulencí izolátů *B. burgdorferi*. Karditidou jsou častěji postiženi muži v poměru 3:1.

Podle CDC se LK manifestuje palpitací, poruchou vedení vzruchu, myokarditidou s nebo bez srdečního selhávání a dysfunkcí levé komory (58). V Evropě jsou to nejčastěji AV bloky, myokarditida, stenokardie, poruchy rytmu a kardiomegalie (37). Uvedené projevy jsou zdrojem synkop, bolestí na hrudníku a dušnosti. Nemocný může být asymptomatický a LK je nalezena při běžné lékařské prohlídce (5).

2.6. LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA

Diagnostika LB je založena na rozlišení charakteristických klinických rysů a znalosti expozice jedince v oblasti, kde je onemocnění endemické, a na výsledcích laboratorních testů (64). Využívá průkazu specifických protilátek metodami na principu ELISA, imunofluorescence či Western blot. Přímá izolace, kultivace, identifikace i elektronoptický průkaz borrelií jsou postupy značně ekonomicky i časově náročné, mají malou sensitivitu a poskytují nízký výtěžek (61). Velké naděje jsou vkládány do přímé detekce nukleových kyselin pomocí molekulárně biologických metod, hlavně do polymerázové řetězové reakce (PCR) (63).

2.6.1. Metody nepřímé

Imunoenzymatické metody ELISA a IFA patří mezi rutinně nejpoužívanější při zjišťování antiborreliových protilátek již od roku 1984 (32). Prokazují protilátky třídy IgM a IgG v krevním séru, vzácněji jsou doporučeny k vyšetření mozkomíšního moku a synoviální tekutiny (5). V současné době existuje bohatý výběr komerčně dostupných setů, z nichž většina má srovnatelnou sensitivitu a specifitu, neboť byly vyrobeny podle schvalovacího procesu FDA510K. Avšak pro screening se většina souprav jeví jako málo vhodná, protože nebyla výrobcem dosažena sensitivita 95%, což je požadováno. Cílem nových ELISA testů je sensitivita pro více společných a specifických borreliových antigenů, což jsou OspA (31, 32, 32,5kDa), OspB (34kDa), OspC (22, 23, 25kDa), BamA (39kDa) a MEP (83-93kDa) (32).

Imunoenzymatické ELISA testy nejčastěji využívají jako antigeny borreliový celobuněčný lyzát nebo bičíky (obsahující hlavně polymerizovaný FlaB protein) (54). Vyznačuje se však falešnou pozitivitou i negativitou (42), protože kromě výše uvedených specifických antigenů je tento celobuněčný lyzát složen ze zkříženě reagujících proteinů 41kDa, 58kDa, 66kDa a 73kDa (32). Flagelární antigen *B. burgdorferi* má epitopy podobné řadě bakterií, časně objevené protilátky nejsou specifické, navíc řada epitopů se v intaktní flagele ne vždy exponují (38). Většina testů není dostatečně citlivá v prvních třech týdnech infekce, proto použití jednotlivých čištěných antigenů nebo rekombinantně připravených proteinů (jako je OspC, OspE, OspF, P22, P35 a P39) by mělo

přinést zlepšení (41). Předpokladem je znalost genů kódujících antigenní proteiny, výroba syntetických ekvivalentů těchto genů a vnesení do expresního genomu *E.coli* (5). Zdá se, že použití vysoce čištěných, rekombinantně připravených rOspC a rP41 zlepší sensitivitu testů během počáteční fáze infekce. Sérové protilátky proti OspA a OspB se vyskytují nepravidelně, někdy chybí během progredující LB, proto je jejich využití zatím diskutabilní (42). Tyto proteiny se vyznačují úzkou specifitou danou pro různé druhy (5), resp. bohatou strukturální variabilitou (54). Pokusy zlepšit ELISA testy zahrnují capture typ ELISy (51), nové antigenní přípravky jako flagelin, rekombinantní proteiny a individuální epitopy a testování protilátek na PEG precipitátech séra (8).

Nepřímá imunofluorescence (IFA) je hodnotná jako ELISA, borrelie konjugované s fluorescenčně značenou zvířecí antihumánní protilátkou třídy IgG či IgM jsou vázány na skličko (32). Řada autorů věří, že interpretace IFA testů je subjektivní, závislá na druhu borrelie, s nízkou sensitivitou i specifitou a zkříženou reaktivitou s jinými spirochétami (27).

Novější metoda IMx® je enzymová imunoanalýza na mikročasticích (MEIA), které jsou potažené částečně přečištěným celobuněčným lyzátem *B. burgdorferi*, OspC a rekombinantním vnitřním fragmentem P41. Ten se vyznačuje malou podobností pořadí aminokyselin s antigeny příbuzných druhů, což zvyšuje specifitu testu vzhledem k *B. burgdorferi*. Metoda měří protilátky IgM v séru a plazmě na přístroji IMx a přihlíží ke klinickým příznakům (35).

Variantou enzymové imunoanalýzy a imunoblotu (antigeny na stripech) je borreliový DotBlot test. K detekci IgG a IgM využívá celobuněčný lyzátní a čtyři čištěné antigeny (MEP, flagelin, P39 a OspC), což zlepšuje specifitu. Je vhodný pro screening i pro detekci protilátek vůči boreliovým antigenům. Různé hladiny antigenů jsou nanášeny jako jednotlivé „doty“ (body) na membránu a vloženy do pacientova séra. Reakce probíhá v několika krocích a končí enzymovým štěpením za vzniku viditelných jednotlivých dotů (36).

Určitým průlomem pro diagnostiku LB bylo stanovení standardizovaných pravidel doporučených na CDC/ASPHLD zasedání v Dearborn Michigan v roce 1995. Jde o dvoufázový protokol, kde je pozitivní nebo hraniční ELISA či IFA následovaná pozitivním, vysoce specifickým WB (32).

Imunoblot (WB) je používán jak k charakterizaci protilátkové odpovědi, tak ke confirmaci výsledků IFA a ELISA testů. Může poskytnout detailnější informace o

borreliových antigenech a je mnohem sensitivnější a specifitější (40). Rovněž pro WB je snahou použít rekombinantně připravené antigeny, které jsou po expresi v *E. coli* přeneseny na nitrocelulózovou membránu. Pozitivní reakce se projeví obvykle hnědým zbarvením chromogenu na příčných proužcích v místě detekovaných antigenů. Ve třídě IgG je zaznamenána vyšší sensitivita (96-100%) vůči rekombinantním proteinům P93, P41 než při použití přirozených antigenů (76-92%) (24). Vyšší titry u ELISA testů obvykle dobře korelují s vysokou frekvencí pruhů na membráně. Pruhy o hmotnostech 41 a 39kDa se u takových sér vyznačují 100%ní četností (40). Použitím kombinovaného protokolu je možno dosáhnout sensitivity 100% u pacientů s NB a pozdní LB, specifita je takto rovněž nejvyšší (38). IgM blot je považován za pozitivní, jsou-li dva ze tří proužků přítomny (OspC, 39kDa, 41kDa) a u IgG blotu by měly reagovat 5 z 10 antigenů (32). V Evropě odpovídá pozitivitě IgG blotu přítomnost 3 až 4 antigenů. IgM se hodnotí stejně (5).

V Evropě je aplikovatelnost jediného antigenu v testu problematická, protože tři i více druhů borrelií způsobuje LB, vždy by se mělo při výběru antigenů vycházet z endemického genodruhu v dané geografické oblasti (5). Relativně vysoké procento nejasných výsledků získaných použitím antigenů u jediného kmene (např. 20 – 25% u *B. garinii*) může být redukováno použitím antigenů ze dvou dalších kmenů (24). Uvádí se, že 5 – 10% pacientů s pozdní LB postrádá zvýšené hladiny protilátek (54), mohou se také zvednout, přestože byl pacient opakovaně negativní na LB po terapii ATB (39). Jindy mohou protilátky v séru pacienta s EM přetrvávat i několik let po úspěšné léčbě. Proto nelze úspěch terapie ATB hodnotit imunoblotingem, neboť nekoreluje se zdravotním stavem, i když jsou protilátky přítomny (24). Je také nutné mít na paměti falešně pozitivní reakce způsobené virovými infekcemi (EBV, HSV, CMV aj.), autoimunitními chorobami (RA, SLE), tuberkulózou, syfilis, jinými zánětlivými onemocněními a malignitami (lymfom) (51).

ELISA i WB jsou zaměřeny na průkaz volných specifických protilátek a nejsou schopny detekovat nízké hladiny v časně fázi onemocnění, protože postrádají dostatečnou sensitivitu. Rovněž nerozlišují mezi aktivní a neaktivní infekcí způsobenou perzistencí protilátek po terapii ATB (8). Problém spočívá v tom, že protilátky jsou sekvastrovány v komplexech (IC) s antigeny, které spouštějí jejich produkci. Proto je snahou tyto protilátky uvolnit využitím „PEG imunokuliček“

s následným odpoutáním antigenu a detekcí imunoblotingem (10). Jiný test EMIBA (enzyme linked, IgM capture, IC, biotinylated antigen assay) stanovuje IgM protilátky na principu ELISy s výsledným měřením optické hustoty barevného produktu. Tyto a podobné testy potvrzují časnou LB a přesně rozlišují mezi aktivní a přetrvávající infekcí od séroreakivity perzistující po úspěšné léčbě (8).

Nově zaváděný poloautomatizovaný BAT test (borreliacidal antibody test) využívá živé borrelie (spouštějí produkci borreliacidních protilátek), které jsou inkubovány se sérem a komplementem s následnou vizualizací usmrcených buněk akridinovou oranží. BAT test se vyznačuje 79%ní sensitivitou a 100%ní specifitou (12).

2.6.2. Metody přímé

Tyto metody jsou založeny na přímém průkazu živého či usmrceného etiologického agens ve tkáních a tělesných tekutinách, popř. orgánech lidského organismu. Řadí se sem postupy kultivační, histologické, elektronoptické a molekulárně biologické (5).

Pro diagnózu infekčních onemocnění je standardní izolace původce z kultury. Kultivace borrelií z různých materiálů vyžaduje vysoce obohacené půdy (BSKII, BSK-H, MKP-modifikované Kelly médium) směsí aminokyselin, vitamíny, anorganickými solemi, ale i králičím nebo koňským sérem prostým protilátek vůči některým antigenům, které omezují jejich růst (30). V počátku, za 1–14 dní, se provádí kultivace statická, avšak vlivem metabolické aktivity a růstu borrelií dojde k takovým změnám prostředí, že je po 14 dnech nutné provést kultivaci kontinuální, jinak bychom nevyizolovali požadovaný kmen. Růst borrelií ovlivňuje řada konkrétních faktorů (5). Pouze tato metoda dává průkaz živých borrelií, a dovoluje definitivní diagnózu. Avšak pozitivní kultivace je pozorována pouze v časně fázi onemocnění. Nejvyšší záchytnost je zaznamenána z bioptických vzorků kožních lézí, nižší z plazmy, vzácně ze séra a pouze příležitostně z CSF pacientů s akutní meningitidou. Zatím nebyla izolována v pozdním stádiu LB (64).

Histologický průkaz je možný v roztěrech i histologických řezech zalitých do parafinu či pryskyřic po obarvení Giemsovým barviem a toluidinovou modří nebo

stříbřením. Nevýhodou je zbarvení pozadí a malé počty borrelií, specifitější je použití značených monoklonálních protilátek (5).

Elektronoptický průkaz je založen na zhodnocení morfologie borrelie (rozměry, počet bičků) a na imunocytochemické reakci antigenu s monoklonální protilátkou. Používají se ultrařezy i buněčný sediment získaný centrifugací. Vypracovaná imunosorbentní elektronová mikroskopie (ISEM) využívá reakce antigenu se specifickou protilátkou na pevném sorbentu a následnou konjugaci adsorbovaného antigenu s monoklonální protilátkou značenou zlatem. Vyznačuje se nízkou pozitivitou (9-23%) a dosud nebyla standardizovaná (5).

Metoda polymerázové řetězové reakce (PCR) byla poprvé použita k detekci cílového chromosomového genu *B. burgdorferi* asociovaného s P66 proteinem v roce 1989 (63). Odhaluje přítomnost DNA borrelií z plazmy, séra i plné krve, z CSF, moči a SF (32). PCR je založena na cyklické amplifikaci cílové sekvence DNA po rozštěpení dvouřetězce, vazbě synteticky připravených primerů na okraje známých sekvencí, polymerázové syntéze komplementárního řetězce z nukleotidů volně přítomných v Master Mixu a až 30ti násobném opakování jednoho cyklu. Získáme tak milión kopií molekul DNA, které prokazujeme na agaróze elektroforézou po obarvení ethidium bromidem nebo autoradiograficky pomocí specifické sondy značené ^{32}P , či chemiluminiscenčně nebo biotinem. PCR však také zahrnuje extrakci a přípravu vzorku DNA (63). Vyznačuje se relativně vysokou citlivostí a specifitou (47). Zvláště tzv. „nested PCR“ s dvoustupňovou amplifikací, která využívá více sad primerů, se vyznačuje extrémní citlivostí (46). Použití více různých vzorků sensitivitu ještě zvyšuje. Kombinací vzorků SF a moči u pacientů s lymskou artritidou se dosahuje sensitivity 91% a testováním CSF a moči u pacientů s neuroboreliózou 87%. Detekuje obvykle nejméně 3 borrelie/ml vzorku (59), zatímco PCR s použitím jediného primeru hodnotí okolo 10 borrelií (63). Sensitivita dosahuje pouze 30% u pacientů s časnou LB a 50% u pacientů s pozdní LB. Většina pacientů se stává PCR negativní po dvoutýdenní terapii ATB, přičemž k relapsu může dojít během relativně krátké doby (32). DNA *B. burgdorferi* může být detekována v tělesných tekutinách pacientů ještě 10 let a více po infekci (63). Pro PCR dosud nebyl vyroben komerční diagnostický set. V Evropě je navíc ztížena situace odlišnou sekvencí DNA různých druhů *B.b.s.l.* (5). Rutinní používání této metody vyžaduje speciální vybavení laboratoří. Zásadním problémem je snadná kontaminace

vzorků jinou DNA (např. „kontaminace produktem“) a z toho plynoucí falešně pozitivní reakce (51), a přítomnost „inhibitorů PCR“, které se mj. do vzorku dostávají během zpracování DNA (63). Dále není dobře standardizována, je drahá a nedokáže rozlišit DNA živých a mrtvých mikroorganismů (51). Také je nutná automatizace, neboť práce s radioaktivně značenými sondami vyžaduje maximální bezpečnost při práci (63).

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. CHARAKTERISTIKA SOUBORU

Hodnocený soubor výsledků sérologických vyšetření byl získán od 116 pacientů Fakultní nemocnice Hradec Králové. Skupinu nemocných tvořilo 46 mužů a 70 žen (1 : 1,5) ve věku od jednoho roku do 79 let. Věkové rozmezí žen se pohybovalo od 3 do 76 let s průměrem 39,1, u mužů se rozmezí nacházelo mezi 1 a 79 roky s průměrem 38,8. Do skupinu náležely tři děti od 1 do 5 roků.

Tab. 3.1.1. Věkové rozmezí souboru pacientů s LB

	počet vzorků	věk		
		rozmezí	průměr	medián
ženy	70	3 – 76	39,1	41
muži	46	1 – 79	38,8	42

Nejčastěji pacienti přicházeli k lékaři s nevysvětlitelnou únavou často chronického rázu (37 příp.), dále s bolestmi hlavy někdy provázenými teplotou a zvracením (19 příp.) a poměrně často trpěli bolestmi kloubů (9 příp.) a svalů (6 příp.). Ostatní necharakteristické příznaky se objevovaly méně (bušení srdce, závratě). Většina nemocných si nevybavovala typický prvotní příznak LB, erytém ani související přisátí klišťete.

3.2. LABORATORNÍ METODIKA

Pro laboratorní hodnocení lymeské borreliózy a k charakterizaci protilátkové odpovědi byly použity dvě rutinní sérologické metody: EIA *Borrelia afzelii* IgG a IgM (dva různé sety) (firma TEST – LINE Brno s.r.o.) a WESTERN BLOT (WB) *Borrelia garinii* IgG a IgM (firma BLOWESTERN diagnostika Praha).

3.2.1. Stanovení IgG a IgM protilátek metodou EIA

Princip:

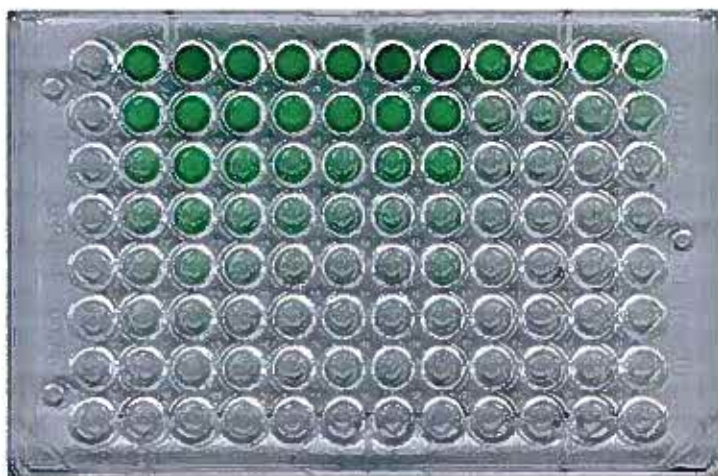
K detekci antiborreliových IgG a IgM protilátek metodou EIA (sandwich typ) je použit sonifikovaný celobuněčný antigen kmene *B. afzelii* KC90. Protilátkou je značená prasečí imunoglobulinová frakce proti lidskému IgG nebo IgM konjugovaná křenovou peroxidázou. Stanovení peroxidázové aktivity se provádí pomocí substrátu s TMB. Pozitivitu indikuje modré zbarvení, které se zastavovacím roztokem mění na žluté. Změna intenzity zbarvení se měří při vlnové délce 450 nm.

Složení setu:

1. Potažená destička s navázaným antigenem, 12 x 8 jamek
2. Negativní kontrola – lidské sérum bez protilátek proti borreliím
3. CUT – OFF – lidské sérum obsahující protilátky proti borreliím v hraniční koncentraci
4. Pozitivní kontrola - lidské sérum obsahující protilátky proti borreliím
5. Konjugát – prasečí imunoglobulin proti lidským IgG nebo IgM značený peroxidázou
6. Ředící roztok vzorků – pufr se stabilizátory bílkovin, obsahující extrakt z nepatogenních spirochét
7. TMB – Complete – jednosložkový chromogenní substrátový roztok obsahující TMB a H₂O₂
8. Promývací roztok – koncentrovaný pufr
9. Zastavovací roztok – obsahuje kyselinu sírovou 1mol/l

Pracovní postup:

1. Všechny reagenty necháme vytemperovat na laboratorní teplotu.
2. Do jamek v destičce dávkujeme kontroly a ředěné roztoky
 - jamku A1 ponecháme prázdnou (blank)
 - do jamky B1 pipetujeme 100μl negativní kontroly
 - do C1, D1 a E1 pipetujeme 100 μl CUT - OFF
 - do F1 pipetujeme 100μl pozitivní kontroly
 - a do zbývajících jamek (G1 – H12) pipetujeme 100μl ředěných vzorků



Obr. 3.2.1.1.: Destička pro EIA analýzu (pohled ze spodu) (odkaz č.4)

3. Za 30 minut inkubace při 37°C ve vlhké komůrce odsajeme obsah jamek a 4x promyjeme promývacím roztokem. Na závěr vyklepeme zbytky roztoku do savého materiálu.
4. Do všech jamek kromě A1 nadávkuje 100μl konjugátu a opět inkubujeme za stejných podmínek.
5. Po odsátí obsahu jamek a pětinasobném promytí opět důkladně vyklepeme zbytky roztoků do savého materiálu.
6. Do všech jamek dávkujeme 100μl jednosložkového substrátu TMB – Complete, inkubujeme 15 minut při 37°C v temnu. Reakci nakonec zastavíme zastavovacím roztokem.
7. Intenzitu zabarvení roztoků v jednotlivých jamkách změříme na fotometru při vlnové délce 450 nm proti blanku (jamka A1) do 10 minut po zastavení reakce.

Hodnocení:

Vyšetřované vzorky hodnotíme indexem positivity, který vypočítáme tak, že dělíme absorbanci testovaného roztoku průměrnou absorbancí CUT – OFF (jamky C1, D1, E1) naměřenou v téže sérii.

Tab. 3.2.1.1.: Interpretace výsledků

index pozitivity (IP)	hodnocení
Nižší než 0,9	negativní
0,9 až 1,1	hraniční
Vyšší než 1,1	pozitivní

3.2.2. Detekce IgG nebo IgM protilátek metodou WB

Princip:

Metoda využívá antigen z kultivátu kmene *Borrelia garinii*, nejčastějšího antigenu v našich podmínkách. Na nitrocelulózkové membrány (NM) jsou přeneseny elektroforeticky separované antigenní proteiny *B.garinii*. Po inkubaci naředěných vzorků a kontrol s jednotlivými pásky (NM) dochází k vazbě specifických protilátek na jednotlivé separované antigeny. Protilátkou je prasečí imunoglobulin proti lidskému IgG nebo IgM konjugovaný křenovou peroxidázou, která štěpí chromogen DAB. Pozitivitu indikuje hnědé zbarvení proužků v místě rozdělených antigenů na páscích nitrocelulózkové membrány.

Složení setu:

1. Pásky nitrocelulózkové membrány
2. Revitalizační roztok
3. Ředící roztok pro vzorky
4. Promývací roztok
5. Konjugátový IgG anebo IgM roztok s obsahem prasečí protilátky proti lidskému IgG anebo IgM značené křenovou peroxidázou
6. Substrátový roztok
7. 30% peroxid vodíku
8. Chromogen - diaminobenzidín (DAB) v ochranném obalu
9. Skim milk (Oxoid)
10. Polyetylenové misky s 10 žlábků pro pásky NM

Pracovní postup:

1. Všechny reagenty a soupravu necháme vytemperovat na laboratorní teplotu. Odstrihneme potřebný počet pásků a zbytek uložíme zpět do chladničky.
2. Před inkubací NM se vzorkem provedeme revitalizaci pásků v miskách pomocí 2ml revitalizačního roztoku. Po pěti minutách roztok slijeme.

3. Do žlábků misek pipetujeme 2 ml ředícího pracovního roztoku a ponoříme pásky nitrocelulóзовé membrány lícem nahoru. Po úplném nasycení pipetujeme vzorky a špičkou je promícháme. Inkubujeme nejméně 1 hodinu při 37°C.
4. Slijeme obsah žlábků, 3x promyjeme promývacím roztokem a nakonec destilovanou vodou. Promícháváme a promýváme důkladně, pásky nesmí zaschnout.
5. Poté pipetujeme 2 ml pracovního roztoku s konjugátem IgG anebo IgM. Inkubujeme 2 hodiny při 37°C. Po slití obsahu promýváme postupem dle bodu 2 návodu.
6. Připravíme si substrátový roztok s chromogenem: 25 ml substrátového roztoku smícháme s jednou ampulí chromogenu a 70 µl 30% peroxidu vodíku. Do každé jamky pipetujeme 2 ml. Inkubujeme 2 minuty v temnu.
7. Po slití substrátového roztoku s chromogenem zastavíme reakci 2 – 5 ml destilované vody. Pásky vyndáme pomocí pinzety a necháme oschnout
8. Pozitivní reakce se projeví hnědým zbarvením příčných proužků v místě vazby antigen-protilátka-konjugát. Porovnááme jejich polohu s obarvenou kontrolou.

Hodnocení:

Western blot *Borrelia garinii* IgG

- pozitivní: zbarvení 4 proužků v úrovni antigenů p93 – 83, p41, p39, p32, p24, p18, p14
- hraniční: zbarvení 2 – 3 proužků v úrovni stejných antigenů
- negativní: zbarvení 1 specifického proužku v úrovni stejných antigenů

Western blot *Borrelia garinii* IgM

- pozitivní: zbarvení 2 specifických proužků v úrovni antigenů p41 (flagelin), p24 (OspC)
- hraniční: zbarvení 1 specifického proužku v úrovni antigenu p41 (flagelin) a jeden další obarvený specifický proužek
- negativní: nepřítomnost p41 (flagelinu) a p24 (OspC)

4. VÝSLEDKY

4.1. PŘEHLED NAMĚŘENÝCH VÝSLEDKŮ

V následujících tabulkách 4.1.1. jsou přehledně uvedeny výsledky laboratorního měření metodou EIA a kvalitativní detekce jednotlivých borreliových antigenů metodou WESTERN BLOT. Zároveň je u každého výsledku uvedeno hodnocení. Přesný způsob hodnocení jednotlivých metod je uveden v příslušných podkapitolách (3.2.1. – hodnocení metody EIA, 3.2.2. – hodnocení metody WESTERN BLOT).

Hodnota označená P je pozitivní, H je hraniční a N je negativní. Písmeno Z představuje pacienta – ženu, písmeno M pacienta - muže. Symboly G a M označují třídu protilátek, CIK jsou cirkulující imunokomplexy, symboly ±, +, a ‡ (dvě plus) značí intenzitu specifické barevné reakce antigen-protilátka-konjugát na NM. Označení věk* s indexem představuje stáří pacienta v době serologického vyšetření, neboť řada jich přichází opakovaně. Takto se sleduje především odpověď na terapii.

Tab. 4.1.1.: Výsledky měření IgG a IgM protilátek metodou EIA

č.pac.	M/Z	věk*	EIA G/M (CIK)	G	P/N	M	P/N	CIK
1	Z	25	243/411//360/723	243	N	411	N	360/723
2	M	36	3770/1483	3770	P	1483	P	nd
3	M	79	1879/385	1879	P	385	N	nd
4	Z	55	799/620//584/1998	799	N	620	N	584/1998
5	M	43	1349/507//1483/748	1349	P	507	N	1483/748
6	Z	53	492/518//600/814	492	N	518	N	600/814
7	Z	53	130/420	130	N	420	N	nd
8	Z	52	1161/834//965/993	1161	P	834	N	965/993
9	M	50	517/1064//337/1705	517	N	1064	H	337/1705
10	Z	27	212/1104	212	N	1104	P	nd
11	Z	14	1180/395//685/391	1180	P	395	N	685/391
12	Z	58	3633/558	3633	P	558	N	nd
13	Z	8	1574/806//2381/2027	1574	P	806	N	2381/2027
14	M	41	270/1510	270	N	1510	P	nd
15	Z	52	605/511	605	N	511	N	nd
16	M	48	1469/133//1875/151	1469	P	133	N	1875/151
17	M	59	1436/171//130/300	1436	P	171	N	130/300
18	Z	57	914/260//269/293	914	H	260	N	269/293
19	Z	13	982/472//1076/771	982	H	472	N	1076/771
20	M	48	3060/514	3060	P	514	N	nd

21	M	10	534/1005//204/2694	534	N	1005	H	204/2694
22	M	10	3447/565//3541/1869	3447	P	565	N	3541/1869
23	Z	42	1862/855//2069/761	1862	P	855	N	2069/761
24	Z	36	781/419//115/865	781	N	419	N	115/865
25	Z	56	1706/789//2191/1119	1706	P	789	N	2191/1119
26	Z	43	463/434	463	N	434	N	nd
27	Z	63	1922/300	1922	P	300	N	nd
28	Z	69	1119/287//678/388	1119	P	287	N	678/388
29	Z	55	262/949	262	N	949	H	nd
30	Z	26	389/419//818/1096	389	N	419	N	818/1096
31	Z	37	776/837	776	N	837	N	nd
32	M	22	256/735	256	N	735	N	nd
33	Z	45	1579/489//1924/1240	1579	P	489	N	1924/1240
34	Z	32	265/773	265	N	773	N	nd
35	Z	66	383/1484//478/3977	383	N	1484	P	478/3977
36	Z	34	119/746//179/1319	119	N	746	N	179/1319
37	Z	46	3660/708//3798/1214	3660	P	708	N	3798/1214
38	M	5	1342/1236//956/1814	1342	P	1236	P	956/1814
39	Z	21	1002/535//452/1143	1002	H	535	N	452/1143
40	M	6	2272/597//1726/1377	2272	P	597	N	1726/1377
41	Z	52	230/1081	230	N	1081	H	nd
42	Z	51	1937/975	1937	P	975	H	nd
43	Z	24	1678/1099	1678	P	1099	H	nd
44	Z	48	362/1083//377/2790	362	N	1083	H	377/2790
45	M	50	1943/505	1943	P	505	N	nd
46	Z	48	1306/88	1306	P	88	N	nd
47	Z	48	289/744//316/1111	289	N	744	N	316/1111
48	M	19	441/686//510/2336	441	N	686	N	510/2336
49	M	32	368/826//205/1368	368	N	826	N	205/1368
50	M	24	3687/605//3828/520	3687	P	605	N	3828/520
51	Z	11	449/1797//461/3417	449	N	1797	P	461/3417
52	Z	22	728/466	728	N	466	N	nd
53	Z	24	1134/770	1134	P	770	N	nd
54	M	60	1871/285//2012/410	1871	P	285	N	2012/410
55	M	37	3129/2168//3659//4748	3129	P	2168	P	3659/4748
56	M	20	281/997//414/1814	281	N	997	H	414/1814
57	Z	43	473/1022//743/2044	473	N	1022	H	743/2044
58	Z	40	518/1265//422/1071	518	N	1265	P	422/1071
59	Z	17	4263/849	4263	P	849	N	nd
60	M	51	1584/499	1584	P	499	N	nd
61	M	57	3653/339//2079/357	3653	P	339	N	2079/357
62	Z	56	2601/478//3162/930	2601	P	478	N	3162/930
63	Z	29	1240/440//1198/500	1240	P	440	N	1198/500
64	M	15	1024/366//12/1045	1024	H	366	N	12/1045
65	Z	21	341/916//231/1988	341	N	916	H	231/1988
66	Z	3	776/1514	776	N	1514	P	nd
67	Z	9	335/1562//540/2399	335	N	1562	P	540/2399
68	Z	35	587/811//472/2254	587	N	811	N	472/2254

69	Z	20	1237/431//1102/682	1237	P	431	N	1102/682
70	Z	29	208/517//322/1065	208	N	517	N	322/1065
71	Z	23	752/543//729/1494	752	N	543	N	729/1494
72	M	52	1268/289//1720/403	1268	P	289	N	1720/403
73	Z	31	1658/429	1658	P	429	N	nd
74	Z	39	307/1748	307	N	1748	P	nd
75	Z	35	814/552	814	N	552	N	nd
76	Z	43	770/368	770	N	368	N	nd
77	Z	12	1717/2377//12/34	1717	P	2377	P	12/34
78	Z	22	2547/1197//2941/3335	2547	P	1197	P	2941/3335
79	M	20	301/853//342/1548	301	N	853	N	342/1548
80	Z	76	2533/210//3145/400	2533	P	210	N	3145/400
81	M	60	1284/688//1996/1303	1284	P	688	N	1996/1303
82	M	1	2587/1036//2144/1306	2587	P	1036	H	2144/1306
83	Z	69	2655/968	2655	P	968	H	nd
84	M	27	2806/560//3076/1188	2806	P	560	N	3076/1188
85	M	9	2071/641//2265/1415	2071	P	641	N	2265/1415
86	Z	59	1103/591//223/762	1103	P	591	N	223/762
87	Z	54	579/670//429/1198	579	N	670	N	429/1198
88	M	35	694/575//1224/1937	694	N	575	N	1224/1937
89	M	60	2351/424//2250/1034	2351	P	424	N	2250/1034
90	M	45	1382/368//1267/656	1382	P	368	N	1267/656
91	Z	55	1175/685//257/1809	1175	P	685	N	257/1809
92	M	75	2721/1060	2721	P	1060	H	nd
93	M	16	1018/550//254/660	1018	H	550	N	254/660
94	M	57	1666/224//2077/462	1666	P	224	N	2077/462
95	Z	70	286/1367//162/2128	286	N	1367	P	162/2128
96	M	68	1913/469//1563/516	1913	P	469	N	1563/516
97	Z	51	2268/298//2662/499	2268	P	298	N	2662/499
98	Z	20	862/763//902/1946	862	N	763	N	902/1946
99	M	61	1732/444//1927/418	1732	P	444	N	1927/418
100	M	58	1582/480	1582	P	480	N	nd
101	Z	23	779/507//481/375	779	N	507	N	481/375
102	Z	43	1229/244//1603/335	1229	P	244	N	1603/335
103	Z	50	2150/302//2895/655	2150	P	302	N	2895/655
104	Z	20	915/837//284/1331	915	H	837	N	284/1331
105	M	55	1250/611//763/1183	1250	P	611	N	763/1183
106	Z	29	148/577//120/800	148	N	577	N	120/800
107	Z	52	118/897//184/1422	118	N	897	N	184/1422
108	M	45	1191/1210//306/601	1191	P	1210	P	306/601
109	M	21	1058/511	1058	H	511	N	nd
110	Z	58	1096/1152//1085/2960	1096	H	1152	P	1085/2960
111	Z	37	1071/493//801/1416	1071	H	493	N	801/1416
112	M	19	874/657//583/2326	874	N	657	N	583/2326
113	M	65	1175/742//2006/2020	1175	P	742	N	2006/2020
114	M	27	257/1042//291/1826	257	N	1042	H	291/1826
115	M	23	2474/1042//1861/1404	2474	P	1042	H	1861/1404
116	M	64	1731/277//2399/456	1731	P	277	N	2399/456

Tab. 4.1.2.: Výsledky detekce IgG a IgM protilátek metodou WB

č.pac.	M/Z	věk*	P/N	G/M	p93	p83	p66	p41	p39	p18	p14	OspA	OspC
1	Z	25	P	G	±	±	+	+	+	+	+	+	+
			N	M			±		±				
2	M	36	P	G	+	±	±	±	+	±		±	
			N	M							+		±
3	M	79	P	G	+	+		±	+	+	+	+	+
			N	M									+
4	Z	55	H	G	+	+	+	±	±				
			P	M	+	+	+	+	+				
5	M	43	P	G	+	+	+	+	+			+	
			N	M			±	+	±				
6	Z	53	P	G	+	+	+	+	+	+		+	+
			H	M	+	+	±						+
7	Z	53	P	G	+	+	+	±	±		±	±	
			H	M	+		+	+	+			±	±
8	Z	52	P	G	+	+	+	±	+				+
			H	M	+	+		±					
9	M	50	H	G	±		+			+		±	
			P	M	+		+	+	+	+	+	+	+
10	Z	27	N	G				±					
			P	M			±	+		+		±	±
11	Z	14	P	G		+	+	±	+	+			
			N	M	±	±		+				±	
12	Z	58	P	G	+	+	±	±	±	±	±	+	+
			P	M		+		+	±	±	±	+	±
13	Z	8	P	G	+	+	+	+	±	+	+	+	+
			P	M	+	+	+		+		+		+
14	M	41	H	G			+	±	+		±		
			P	M	±		±	±			±	±	±
15	Z	52	P	G			+	+	+	+	±		
			H	M			+	+	+				
16	M	48	P	G	+	+		+	+		+	+	
			H	M	+	+	±						+
17	M	59	P	G	+	+	+	±	+		+	+	
			N	M							+		
18	Z	57	N	G	±	±	+						±
			P	M	±	±	+	+	+		+	+	+
19	Z	13	P	G	+	+	+	+	+	±	+	+	+
			P	M	+	+	±	+	+	+	+	±	+
20	M	48	P	G	+		+	+	+	±			
			H	M	+		±		±				
21	M	10	P	G	+	+	±	+	+	+	+	+	+
			N	M	+	+	±		±				
22	M	10	P	G	+	+	+	+	+	+	+	+	+
			H	M	±	±		+	±				±
23	Z	42	P	G	+	+	±	+	+		+	+	+
			N	M			±						+

24	Z	36	P	G	±	±	+	+	+	+	+	+	+
			N	M	+	+	±						
25	Z	56	H	G			±	+	±			+	
			P	M	+	+	+	+			+		
26	Z	43	P	G	+	±		±	+	±	±		±
			H	M				+		±		±	
27	Z	63	P	G	+	+	+	+	+	+	+	+	
			N	M	±	±		±	±				
28	Z	69	P	G	+	+	+	+	+			+	±
			N	M	+	+							
29	Z	55	P	G	±	±	+	±	+		±	±	+
			P	M		+	±	+	+		±	±	+
30	Z	26	H	G	+		+	+		±	+	+	
			P	M	+	+	+	+				+	
31	Z	37	H	G		+	+	+					
			P	M	±	±	±	+	+	±	+		±
32	M	22	P	G	+		+	+	±	±			+
			H	M	+		+	+		±	±	±	
33	Z	45	P	G	+	+	+	+	+		+	+	+
			N	M	±	±							
34	Z	32	P	G		+	±	+	+	±	±		
			P	M	+	+	+	+		±	±		
35	Z	66	P	G	+	+		+	+			±	+
			P	M	±	±	±	+	+	+	+	+	
36	Z	34	P	G	+	+	+		±	+		+	±
			P	M	+	+	+			+	+	+	+
37	Z	46	P	G	+	+	+	+		±	+	+	
			P	M	+	+	+	±		±	±	+	+
38	M	5	P	G		+	+	+				+	+
			P	M			+	+	+				+
39	Z	21	N	G	+	+	+	+					
			P	M	+	+		+	+				±
40	M	6	P	G	+	+		+	+		+	+	
			N	M	±	±	±						
41	Z	52	H	G			+	+		±		±	±
			P	M	+		+	±	±	±	±	±	
42	Z	51	P	G		±	+	±	±	±	±	+	±
			H	M			±	±					±
43	Z	24	P	G	+		+	±	+		±	±	
			P	M	+		±	±	+	±		±	
44	Z	48	H	G			+	+	+				±
			P	M	+	+	±	+	+				±
45	M	50	P	G				+	+	+	±		
			H	M			+	±	+	+			

46	Z	48	P	G			+	+	+	±		+	
			N	M					±				
47	Z	48	N	G	+	+	+	+					
			P	M	+	+	+			+	+	+	+
48	M	19	P	G	+	+	+	+	±			±	+
			H	M	+	+		+		+			
49	M	32	N	G			+	+	±				+
			P	M	+	+		+	+			±	+
50	M	24	P	G	±	±	+	±	+	+	+	+	+
			O	M									
51	Z	11	P	G	+	+	+	+		+	±	±	+
			P	M	+	+	±	+	+	±		+	+
52	Z	22	P	G	±		±	±		±			
			N	M									±
53	Z	24	P	G	±	±	±	±	±			±	
			P	M	±		+	+	±		+	+	
54	M	60	P	G	+		+	+	+	+	+	±	
			N	M	+		+	±					
55	M	37	P	G	+	+	+	+	+		+	+	±
			P	M	+	+	+	±	±		+	+	
56	M	20	P	G	±	±	+	+	±	+			+
			P	M	±	±		±	±	+	+		
57	Z	43	P	G	+	+	±	±	+	+			+
			H	M	+	+	±			±			
58	Z	40	N	G			+	+	±			±	
			P	M	+	+	+	+	+			±	
59	Z	17	P	G	+	±	+	±	+	+			
			P	M	±	±	+	+	+	+			
60	M	51	P	G	+		+	+	+	±	±	±	
			H	M						+			
61	M	57	P	G	+	+	+	±	+	±			+
			N	M	±	±	±						
62	Z	56	P	G	±	±	+	+	+		+	+	
			N	M						±			
63	Z	29	P	G	+	+	+	+	+			+	±
			N	M			±						
64	M	15	P	G	+	+	+	±	+			+	+
			P	M	+	+	±	±					+
65	Z	21	N	G	+	+		±		±			
			P	M	+	+	+	+	±	+			
66	Z	3	P	G	+	+	+	+	+	+	+	+	
			H	M				+	±	+		±	
67	Z	9	P	G			+	+	+	±	±	+	+
			N	M			+		+			±	+
68	Z	35	P	G	+	+	+	+	+	±			+
			P	M	±	±	±	+	±	±	+	±	
69	Z	20	P	G	+	+	+	+			+	±	+
			N	M	+	+							

70	Z	29	N	G			+						±	
			P	M	+	+	±	+	+	±		+		
71	Z	23	P	G	+	+	+	+	+			±	+	
			P	M				±		+	+	+	+	
72	M	52	P	G	+	+	+	+	+		+	±	±	
			N	M	±	±	+							
73	Z	31	P	G	+	±	+	±		±	±			
			H	M				±	±	+				
74	Z	39	P	G	±	±	±					+	+	+
			N	M			±							
75	Z	35	P	G			±	±	+	+		±		
			H	M	+		+	±						
76	Z	43	P	G			+	±	+		±	±	±	
			H	M	±								±	
77	Z	12	N	G				±						
			P	M			+	±	+			+		
78	Z	22	H	G	±	±	+	+	+	±		+	±	
			P	M	+	+	+	+	+		±	±	±	
79	M	20	P	G	±	±	±	+	+		±		+	
			P	M	+	+	+	+	±	+			±	
80	Z	76	P	G	+	+	+	+	±	±	+	+	+	
			N	M				±	±				+	
81	M	60	P	G	+	+		+	+	+	+	+		
			N	M					+	±				
82	M	1	P	G	+	+	+	±	+	+		+		
			H	M				+	+					
83	Z	69	P	G	+	+	+	+	+		+	+	+	
			N	M	+	+		±	±			±	±	
84	M	27	P	G	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
			N	M			±	±	±			±	±	
85	M	9	P	G	+	+	+	+	+	+	±	±	±	
			P	M	+	+	±		+			+		
86	Z	59	P	G	+	+	+	+				+	+	
			H	M			±	+					+	
87	Z	54	P	G			+	+	+	+		±	+	
			N	M										
88	M	35	P	G	+	+	+	+	+			+	+	
			N	M										
89	M	60	P	G	+	+	+		+	+	+	±	+	
			P	M	+	+		+	+	+	+			
90	M	45	P	G	+	+	±	+	+			+	+	
			N	M				±		±				+
91	Z	55	P	G	+	+	±		+		+	+		
			N	M	±	±								±
92	M	75	P	G			±	±	+	±			±	
			H	M			±	±						+
93	M	16	P	G			+	+			+	+		
			H	M								+	+	

94	M	57	P	G	+	+	+	±	+			+	+
			N	M				±	±				±
95	Z	70	H	G	+	+	+	+	+				
			P	M	+	+	+	+	+	+	+	+	+
96	M	68	P	G	+	+	+		+	+		+	+
			N	M	±	±						±	
97	Z	51	P	G	+	+	+	±	+			±	+
			N	M				±					
98	Z	20	P	G			+	+	±	+		±	+
			P	M	+	+	±	+	±				+
99	M	61	P	G	+	+	+		+	+	+	+	
			N	M	±	±		±					
100	M	58	P	G	+	±	+			+		+	
			N	M				±					
101	Z	23	P	G			+	+	+			+	+
			N	M				±					
102	Z	43	P	G	+	+	+	+	+			+	
			N	M									
103	Z	50	P	G	+	+		+			+	+	±
			H	M	+	+			±				+
104	Z	20	H	G	+	+	+		±			+	+
			P	M	+	+	±	+	±				±
105	M	55	P	G	+	+	+	+				+	+
			H	M			+	+		+			
106	Z	29	P	G	+	+	+	+	+			+	+
			H	M	±	±	±	+		±			
107	Z	52	P	G			±	+	+		+	±	+
			N	M			+	+					
108	M	45	H	G		+		+				+	
			P	M		+		+	+	+			
109	M	21	P	G		±		+	±			±	
			H	M				+	+				
110	Z	58	P	G	+	+	+	+	+			+	+
			P	M				±		+	+		
111	Z	37	P	G	+	+	±	±	±			+	
			P	M		+	+	+	±		±		+
112	M	19	P	G	+	+	±	+	±			+	+
			P	M	+	+	±	+	+				+
113	M	65	P	G	+	+	+	+			+	+	
			H	M	+	+	+	+					
114	M	27	P	G	±	±	+	+			+	+	
			N	M				±	+				
115	M	23	P	G	+	+	+	+	+		+	+	±
			N	M	±	±		+					
116	M	64	P	G	+	+	+	±	+			+	+
			P	M				+	±	±		+	

4.2. PŘEHLED VÝSLEDKŮ DOTAZNÍKŮ

V této části práce jsou shrnuty tabulky, které hodnotí údaje získané dotazníkovou metodou od 116 pacientů s lymeskou borreliózou.

Tab. 4.2.1. popisuje závislost pobytu pacienta v přírodě na výskytu onemocnění. Šest pacientů udává, že se v přírodě nepohybovalo v době před prvními příznaky onemocnění, přesto měli čtyři z nich klinicky diagnostikovanou LB a vesměs se u nich objevovala únava.

Tab. 4.2.1.: Pobyty v přírodě u pacientů s LB

ANO-ženy	% (ze 70)	ANO-muži	% (ze 46)	ANO-celkem	% (ze 116)
67	95,7	43	93,5	110	94,8
NE-ženy		NE-muži		NE-celkem	% (ze 116)
3		3		6	5,2

Tab. 4.2.2. zaznamenává možný způsob přenosu LB. U pacientů, kteří si vzpomněli na související přisátí klíštěte nebo možné poštípání hmyzem, jsme dále hodnotili, jak dlouho jej (klíště nebo hmyz) měli před prvními příznaky onemocnění a kolikrát.

Tab. 4.2.2.: Způsob přenosu LB

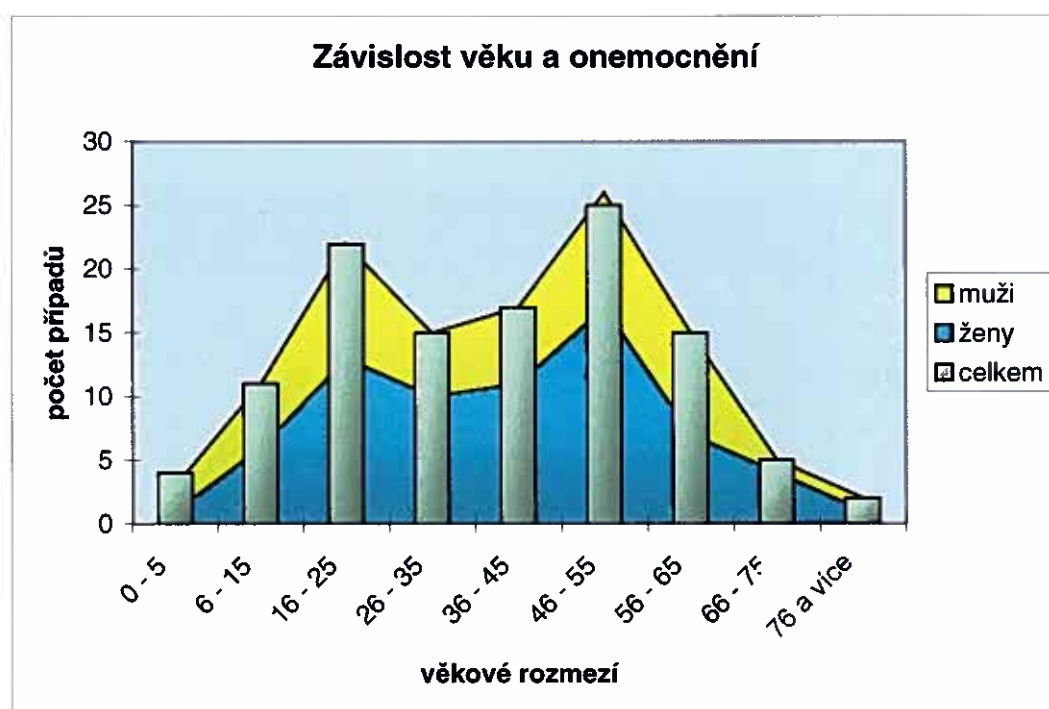
klíště	počet osob	% (ze 116)	hmyz	počet osob	% (ze 116)
ANO	62	53,5	ANO	49	42,2
NE	13	11,2	NE	7	6
neví	41	35,3	neví	0	
kdy před prvními příznaky		% (ze 62)	kdy před prvními příznaky		
< 2 týdny	5	8,1	< 2 týdny	0	
2 - 3 týdny	14	22,6	2 - 3 týdny	0	
déle	8	12,9	déle	0	
neví	35	56,4	neví	49	100
kolikrát		% (ze 62)	kolikrát		
1x	5	8,1	1x	0	
2x	2	3,2	2x	0	
opakovaně	44	71	opakovaně	45	91,8
neví	11	17,7	neví	4	8,1

klíště i hmyz	počet osob	% (ze 116)
ANO	32	27,6

Tab. 4.2.3. hodnotí počty případů LB v jednotlivých věkových skupinách a s přihlédnutím k pohlaví.

Tab. 4.2.3.: Nemocnost podle věku a pohlaví

věk	počet osob	ženy	muži
0 - 5	3	1	2
6 - 15	11	6	5
16 - 25	22	13	9
26 - 35	15	10	5
36 - 45	17	11	6
46 - 55	26	17	9
56 - 65	15	7	8
66 - 75	5	4	1
76 a více	2	1	1
celkem	116	70	46



Graf 4.2.1.: Výskyt onemocnění podle věku a pohlaví

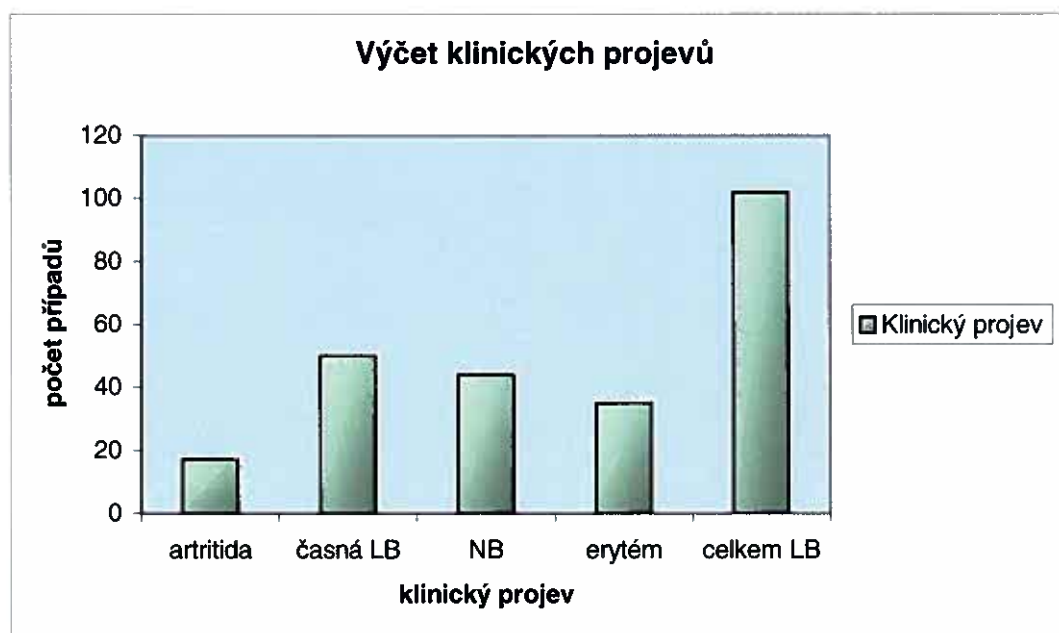
Pacienti, u nichž nebyla diagnostikována LB anebo byl výsledek diagnózy nejasný, přestože vyšetření western blotem u nich dokazuje pestrý výběr antigenů, jsem z následujícího hodnocení vyloučila a výsledky jsou shrnuty v tabulkách 4.2.6. a 4.2.7.. Podrobněji jsou rozebrány v části 5. DISKUZE. Rovněž jsem vyřadila tři pacienty ve věku do pěti let s pozitivní diagnózou LB (tab.

4.2.8.), neboť malé děti reagují díky nezralosti imunitního systému odlišně a měly by být popsány zvlášť. Lymeskou borreliózou u dětí se v této práci nezabýváme.

Tab. 4.2.4. zachycuje zastoupení jednotlivých klinických forem onemocnění u pacientů s diagnózou LB. Nejčastěji se objevují časná lymeská borrelióza a neuroborrelióza, přičemž u naprosté většiny pacientů se klinické projevy kombinují.

Tab. 4.2.4.: Klinické formy onemocnění

klin. projev	počet vz.	% (ze 102)	klin. projev	počet vz.	% (ze 102)
artritida	17	16,7	časná LB	50	49,1
NB	44	43,1	erytém	35	34,3
			eryt i časná	31	62 (z 50)
poz. Dg. LB	celkem	102			



Graf 4.2.2.: Hodnocené klinické projevy lymeské borreliózy

Tab. 4.2.5. je výčtem hodnocených klinických forem LB ve vztahu k nalezeným borreliovým antigenům, přičemž byly započítány všechny přítomné antigeny bez ohledu na intenzitu reakce, která byla hodnocena na třech úrovních (±, +, †). Poskytuje nám informaci o nejčastěji se vyskytujících antigenech.

Tab. 4.2.5.: Klinické formy onemocnění ve vztahu s borreliovými antigeny.

	vz.		p93	p83	p66	p41	p39	p18	p14	OspA	OspC
Artritida	17	IgG	16	16	14	16	15	6	9	14	8
		IgM	8	8	7	10	9	6	2	5	6
Časná LB	50	IgG	36	37	42	45	38	20	24	37	30
		IgM	30	26	33	35	25	15	13	26	16
NB	44	IgG	30	31	40	40	35	22	22	33	23
		IgM	29	26	29	33	23	15	13	23	12
Erytém	35	IgG	26	25	31	32	27	12	20	27	24
		IgM	22	19	25	20	12	9	8	17	11

Tab. 4.2.6.: Vybrání pacienti bez klinické diagnózy LB

č.pac.	M/Z	věk*	LB	A	Č	NBĚRY	EIA G/M (CIK)	WB G	P/N	WB M	P/N
1	Z	25	N	N	N	N	243/411/360/723	93±, 83±, 66+, 41+, 39+, A+, C+, 18+, 14+	P	66±, 39±	N
5	M	43	N	N	N	N	1349/507/1483/748	93+, 83+, 66+, 41+, 39+, A+	P	66±, 41+, 39±	N
24	Z	36	N	N	N	N	781/419/115/865	93±, 83±, 66+, 41+, 39+, A+, C+, 18+, 14+	P	93+, 83+, 66±	N
32	M	22	N	N	N	N	256/735	93+, 66+, 41+, 39±, C+, 18±	P	93+, 66+, 41+, A±, 18±, 14±	H
52	Z	22	N	N	N	N	728/466	93±, 66±, 41±, 18±	P	A±	N
101	Z	23	N	N	N	N	779/507/481/375	66+, 41+, 39+, A+, C+	P	66±, C+	N

Tab. 4.2.7.: Vybrání pacienti s nejasnou klinickou diagnózou LB

č.pac.	M/Z	věk*	LB	A	Č	NBĚRY	EIA G/M (CIK)	WB G	P/N	WB M	P/N
100	M	58	?	N	N	N	1582/480	93+, 83±, 66+, A+, 18+	P	66±	N
88	M	35	?	N	N	N	694/575/1224/1937	93+, 83±, 66+, 41+, 39+, A+, C+	P	---	N
90	M	45	?	N	N	N	1382/368/1267/656	93+, 83±, 66±, 41+, 39+, A+, C+	P	41±, C+, 18±	N
87	Z	54	?	N	N	N	579/670/429/1198	66+, 41+, 39+, A±, C+, 18+	P	---	N
70	Z	29	?	N	N	N	208/517/322/1065	66+, C±	N	93+, 83±, 66±, 41+, 39+, A+, 18±	P

Tab. 4.2.8.: Vybrání pacienti s klinickou diagnózou LB mladší pěti let

č.pac.	M/Z	věk*	LB	A	Č	NBĚRY	EIA G/M (CIK)	WB G	P/N	WB M	P/N
38	M	5	A	N	A	N	1342/1236/956/1814	83+, 66+, 41+, A+, C+	P	66+, 41+, 39+, A+	P
66	Z	3	A	N	A	N	776/1514	93+, 83±, 66+, 41+, 39+, A+, 18+, 14+	P	41+, 39±, A±, 18+	H
82	M	1	A	N	A	N	2587/1036/2144/1306	93+, 83±, 66+, 41±, 39+, A+, 18+	P	41+, 39±	H

5. DISKUZE

Přehledné zhodnocení klinicky významných kritérií lymeské borreliózy považuji za důležitý článek k pochopení značné variability tohoto onemocnění a jisté nevyzpytatelnosti borrelie jako takové.

Většina pacientů (110 ze 116) udala, že se v přírodě pohybovali v době před prvními příznaky onemocnění. Do této skupiny náleží všech 102 pacientů s pozitivně diagnostikovanou LB, tři děti ve věku do pěti let a všech pět pacientů s nejasnou diagnózou. Ze šesti negativně hodnocených pacientů (pobyt v přírodě), kteří současně tvrdili, že klíště neměli, byla LB diagnostikována u čtyř. Myslím si, že je prakticky nemožné, aby tito jedinci byli infikováni borreliemi prostřednictvím komára. Spíše si neuvědomují, že pobytem v přírodě je myšlena i zahrada, kde mohou samozřejmě také přijít do styku s klíštětem. Ztotožňujeme se s neprokázaným přenosem borrelií komáry a jiným hematofágním hmyzem (5). Může se tak stát jen velmi vzácně (27). K přenosu je nutná relativně dlouhá doba, po kterou klíště saje (64). Dále, přestože je borrelie velmi adaptabilní, je na vnitřní prostředí klíštěte existenčně vázaná (60).

Jistě by bylo velmi zajímavé zjistit, kteří pacienti se pohybují v přírodě profesionálně. Přestože byl tento dotaz vznesen, odpověď na něj chyběla ve 100 % případů.

Prakticky jediným přenašečem LB je klíště, ale pouze 60 pacientů (53,5 %) si vybavovalo přisátí klíštěte a zhruba třetina si to nepamatuje resp. neví. Tyto výsledky dobře korelují s prací Janovské (37). Ne všichni, kteří si přisátí klíštěte uvědomovali (62 pacientů), zároveň věděli jak dlouho jej před prvními příznaky měli. Třetina pacientů (30,7 %) udala časové rozmezí do tří týdnů, 8 pacientů udalo delší dobu mezi přisátím klíštěte a prvními příznaky onemocnění a 35 pacientů (56,4 %) si přesně nevzpomnělo. 71 % ze 62 pacientů měli klíště opakovaně, z čehož vyplývá, že ne každé přisátí s prvními příznaky onemocnění bezprostředně souvisí. Pacienti mohou objevit první symptomy onemocnění později, pravděpodobně proto si na klíště nevzpomenou, což je v Evropě poměrně typické (70) anebo si jednoduše nevybavují přisátí larválních stádií pro jejich miniaturní velikost (59).

Poštipání hmyzem u 42,2 % (49 ze 116) pacientů s LB není příliš slučitelné s rozvojem onemocnění. Poštípání hmyzem a současné přisátí klíštěte jsme zaznamenali u 32 pacientů.

Struktura pacientů podle věku a pohlaví do značné míry vypovídá o způsobu chování mužů a žen v daném věkovém rozmezí. Poměr výskytu LB u mužů a žen 1 : 1,5 je celkem srovnatelný s celorepublikovým průměrem (muži/ženy 1 : 1,7) (5). LB postihuje všechny věkové skupiny s mírným vrcholem mezi 16 – 25 rokem a s velmi výrazným vzestupem nemocnosti mezi 46 – 55 rokem (jak lze vidět v grafu 4.2.1.). I v tomto případě se ztotožňujeme s výsledky jiných autorů (5,37). Myslíme si, že první vrchol (16 – 25 let) souvisí se studentským způsobem trávení volného času. Se zvyšujícím se věkem, finančními možnostmi a obzory, rostoucími starostmi o vlastní děti se původní trend mění. Rodiče ve věku 46 – 55 let již nemusí o odrostlé děti pečovat a opět se navrací k přírodě. Jistě toto rozložení nemocnosti souvisí i s věkovou strukturou populace v ČR. resp. v královéhradeckém regionu.

V souboru pacientů s pozitivní diagnózou LB jsme hodnotili nejběžnější klinické projevy tohoto onemocnění.

V počtu lymeských artritid se naše výsledky shodovaly s dlouhodobým celorepublikovým průměrem. Např. v roce 1996 to bylo 18 % případů LA (37). v roce 1999 to bylo 16,9 % (5), přičemž LA je obecně myšlena jako muskuloskeletální problémy. Ve Spojených státech je LA mnohem běžnější. Uvádí se, že kolem 60 % pacientů s neléčeným erytémem zažilo ataky mono- nebo oligoartritidy, přičemž u 20 % z nich přechází onemocnění do chronicity (21). Zcela zřejmým důvodem je absolutní převaha B.b.s.s., která tento klinický projev způsobuje dominantně (27).

Neuroborrelióza byla diagnostikována u 43,1 % (44 pacientů ze 102), což však celorepublikový průměr (9,7 %) překračuje více než trojnásobně. Takový výsledek vyžaduje určité zamyšlení. Mohl by být ovlivněn výběrem setu k vyšetření western blotem, který odpovídal antigenní strukturou *B. garinii*. Mohl se vyznačovat zvýšenou senzitivitou. Souhlasíme s názorem, že regionální rozmanitost antigenní struktury tří nejběžnějších druhů borrelií v Evropě je tak velká, že standardizace této cenné metody je problematická (16, 19). Počty případů NB v Severní Americe se pohybují v rozmezí 5 – 20 %. NB je v Evropě nejčastěji spojována s *B. garinii*, s určitými odlišnostmi ji také mohou způsobit

B.b.s.s. a *B. afzelii*. V Německu připadá na *B. garinii* 58 % případů neuroborreliózy (27).

Časnou LB jsme zaznamenali u 49,1 % pacientů. Jako samostatný klinický projev není uváděna, je však důležitým předstupněm časné disseminace, jehož konstantní součástí je LA a NB. V námi hodnoceném souboru pacientů nebylo pravidlem, že by časnou LB provázel erytém konstantně. Pouze u 31 pacientů (62 % z 50 pacientů s časnou LB) jsme zaznamenali přítomnost EM, celkově se vyskytlo u 35 pacientů (34,3% ze 102). Tento dermatologický klinický projev je nalézán značně variabilně, celosvětově se objevuje u 90 % pacientů s LB (27), v ČR je to přibližně 70 % (5), jiní autoři udávají, že u 50 % pacientů může EM chybět (64). EM nemusí být rozeznáno u jedinců s tmavou pletí (67), což u nás zřejmě pravidlem nebude, a u malých dětí. 50 % našich dětských pacientů (7 ze 14 ve věku 1 – 15 let) erytém skutečně nemělo. Domnívat se, že do dermatologických forem nebyl zahrnut méně běžný ACA, by bylo zavádějící, neboť v ČR zastupuje dermatologické projevy jen jedním procentem. Malý výskyt EM bych spíše přičítala neúplnosti lékařských záznamů.

Vztah borreliových antigenů a klinických projevů LB vykazoval určitá pravidla a do jisté míry jsme ve výsledcích nalézali shodu.

U lymeské artritidy byla pozorována intenzivnější odezva ve třídě protilátek IgG, zřejmě z toho důvodu, že jde spíše o pozdní klinický projev objevující se až za několik měsíců. Zcela převažovaly antigeny p93, p83 (16 ze 17) a flagelární protein p41 (16 ze 17) následovaný p39, (15 ze 17) a p66 a OspA (14 ze 17). Přibližujeme se výsledkům studie prováděné u pacientů z Německa, kde převládaly antigeny p58 (protein teplotního šoku, nespecifické p60 nebo p66) (23 z 26), p93 (20 z 26), p41 (19 z 26) a OspA (17 z 26) (19). Antigenní rozdílnost je zřejmá. IgM odpověď je u LA slabší, převládaly antigeny p41 a p39.

Neuroborrelióza vykazuje rovněž bohatý výčet antigenů s intenzivnější odezvou ve třídě protilátek IgG a převahou p41 a p66 (40 ze 44), následované p39 (35 ze 44) a OspA (33 ze 44). IgM odpověď byla slabší s antigeny p41 (33 ze 44), p66 a p93. V německé studii převládají proteiny p41 a p58 (21 z 27).

Také klinický projev EM projevoval vyšší četnost antigenů v IgG třídě. Klade si otázku, zda nemohlo jít v některých případech o ACA nebo borreliový lymfocytom. Antigen p41 je opět dominantní (32 z 35) následovaný p66 (31 z 35), p39 a OspA (27 z 35), v IgM jsou to p66 a p41 (20 z 35) a p93.

V Německu je absolutně nejčastější p41 (18 z 29). V jiné studii převládá OspC a p41. Taktéž v hodnocení časně LB převažuje IgG nad IgM s antigeny p41 (41 z 50), p66, p83, p93 a OspA.

Hodnocené klinické projevy byly častěji provázeny protilátkovou odpovědí ve třídě IgG. Vzorky od pacientů mohly být vyšetřovány ve fázi disseminace onemocnění, tedy za několik týdnů až měsíců od počátku onemocnění, než byli pacienti na vyšetření lymeské borreliózy doporučeni ošetřujícím lékařem. Tato skutečnost může být jedním z důvodů, proč se u tak vysokého procenta pacientů s LB rozvinula neuroborrelióza. Zřejmě u nich nemuselo být rozeznáno EM v první fázi onemocnění (viz 34,3 % EM u 102 pacientů s pozitivní diagnózou) a pozdní diagnóza byla příčinou rozvinutí vážnějších klinických projevů. Nejen samotný erytém a necharakteristické klinické příznaky, ale i protilátková odpověď jsou v Evropě obecně mírnější povahy. Možná z důvodu vyšší promořenosti evropské populace nespecifickými antigeny (19). Mírné prvotní příznaky i určitá neuvědomělost mohou přivést pacienta k lékaři pozdě, IgM odpověď již nemusí být dominantní.

V počtu všech antigenů absolutně převažuje flagelární protein p41, stejně jako v řadě jiných studiích (19, 40, 42, 65). Zřejmě bývá detekován mezi 6 – 8 týdnem, kdy dosahuje maxima (61) a kdy se již rozvíjí stádium disseminace.

NB vzniká jako následek zkřížené reaktivity protilátek proti myosinu a jiným složkám myelinu; u našich pacientů je protilátková odpověď ve třídě IgG zvláště silná. U LA bychom očekávali absolutní převahu OspA vzhledem k patogenезi, avšak opět dominuje p41 spolu s p93 a p83. Tyto proteiny mají význam pro intracelulární perzistenci borrelií a zcela jistě ovlivňují činnost makrofágů, které svými produkty patrně nejvíce poškozují kloub včetně přilehlých šlach a úponů (64).

Je možné se domnívat, že absolutní převaha proteinů p41 a p66 ve všech klinických projevech je zřejmě podpořena nejen vysokou promořeností populace nespecifickými antigeny, ale i takovými, které pocházejí od nepatogenních treponém či leptospir. Anti p66 protilátky jsou navíc běžnou součástí imunitního systému (14). Naopak výskyt protilátek proti OspC proteinu v souboru našich pacientů s EM značně zaostává za evropským standardem (19). Zde bych přijala vysvětlení o regionální rozdílnosti v antigenní struktuře borrelií (19).

U čtyř ze šesti pacientů, kteří neměli diagnostikovanou LB (tab. 4.2.5.), přestože někteří vykazují protilátky proti více antigenům, byly opakovaně nalézány pozitivní reakce na HSV, EBV i CMV, dále i sezónní alergie. V jednom případě šlo o pacientku s pozitivní reakcí na *Toxocara canis* a jeden pacient měl diagnostikovanou *Sclerosis multiplex*. Opět byla pozorována silnější protilátková odpověď ve třídě IgG, p41 i p66 u všech pacientů, častěji pak p93, p39 a OspA. Přikláníme se k názoru, že jde o falešně pozitivní reakce (51). Protilátky proti nejméně jednomu antigenu *B. burgdorferi* jsou nalézány u 40 % pacientů bez LB, nejčastěji jde o p41 a p66. Tyto protilátky mohou být přirozené nebo výsledkem expozice antigenním epitopům jiných organismů (14). Rovněž subklinická infekce je v Evropě mnohem obvyklejší (19). Z toho vyplývá, že u nich nemusí být lymeská borrelióza vyloučena.

Taktéž u pěti pacientů s nejasnou diagnózou LB (tab. 4.2.6.) bych lymeskou nemoc zcela nevylučovala, přestože také neměli žádné klinické projevy onemocnění. Protilátková odpověď byla ve třídě IgG velmi intenzivní a většinou pozitivní, převládaly antigeny p66, OspA a OspC. Podle mého názoru, u čtyř z nich hodnoty EIA vyšetření neodpovídají diagnóze. Také u třech pacientů z této skupiny byl diagnostikován chronický únavový syndrom, jeden pacient měl nespecifickou meningitidu. Mnoho autorů řadí chronický únavový syndrom do klinických projevů LB (37, 64). Důvod může být zřejmý. Naši pacienti s tímto syndromem měli zvýšenou protilátkovou odpověď proti specifickým borreliovým antigenům v IgG nebo v IgM třídě. Taktéž přišli do styku s klíštětem.

Lymeská borrelióza je ne zcela dobře probádané onemocnění. V souvislosti s LB jsou popisovány obrazy podobné neurologickým a psychiatrickým symptomům (55). Řadě mechanismů LB, zvláště chronickým formám onemocnění, není dosud porozuměno (13).

Z výsledků hodnocení pacientů s negativní i nejasnou diagnózou LB vyplývá, že přirozeně se vyskytujících protilátek může být v populaci zřejmě mnohem více bez hlubšího klinického významu. Není zcela jasné, které faktory vedou k symptomatické infekci či k infekci s omezenými příznaky, pouze se ví, že vysoká koncentrace borrelií ve tkáních je významným spouštěcím faktorem onemocnění (48).

6. ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo zhodnotit řadu epidemiologických kritérií a klinických projevů lymeské borreliózy ve vztahu k borreliovým antigenům na souboru pacientů z královéhradeckého regionu. Rovněž jsme potvrdili variabilitu tohoto onemocnění po srovnání příslušných aspektů nejen v rámci celé ČR.

Lymeská borrelióza vykazuje přímý příčinný vztah ke způsobu přenosu svým prakticky jediným, v přírodě se vyskytujícím přenašečem *Ixodes ricinus*, i když si jej vybavovala jen polovina pacientů. Onemocnění postihuje ve zvýšené míře dospělou populaci, častěji ženy ve věku od 46 do 55 let, což jednoznačně souvisí s jejich způsobem trávení volného času v přírodě, ale i s profesním zaměřením jednotlivce.

V souboru našich pacientů jsme provedli zhodnocení jednotlivých klinických projevů lymeské borreliózy a výsledky jsme porovnali s celorepublikovým průměrem těchto projevů. Počet případů s neuroborreliózou jsme zaznamenali trojnásobně vyšší, erytém byl nalezen pouze u třetiny pacientů a časnou lymeskou borreliózu nedoprovázel konstantně. Pouze výskyt lymeské artritidy dosahuje běžné četnosti tohoto projevu v ČR.

Mezi jednotlivými borreliovými antigeny a klinickými projevy lymeské borreliózy byly skutečně nalezeny určité vztahy. S jinými autory podobných prací jsem se shodovali částečně. Absolutně převažovaly protilátky třídy IgG proti antigenům p41 a p66. Zřejmé rozdíly jsme si vysvětlovali regionální rozmanitostí antigenní struktury borrelií v Evropě. Určitým zdrojem těchto rozdílů je výběr setů od konkrétní firmy pro vyšetření metodou western blot. Firmy vyrábějící diagnostické sady se odlišují nejen vybraným kmenem a koncentrací borrelií, které používají pro přípravu stripů k vyšetření, ale také specifitou a senzitivitou svých souprav.

U pacientů s negativní diagnózou lymeské borreliózy byly často příčinou falešně pozitivních reakcí protilátek proti borreliovým antigenům infekce viry HSV, CMV a EBV, či onemocnění Sclerosis multiplex. Nevyskytovaly se u nich žádné hodnocené klinické projevy lymeské borreliózy, stejně jako v souboru pacientů s nejasnou diagnózou. U této skupiny pacientů byl třikrát diagnostikován chronický únavový syndrom, který je často řazen mezi klinické projevy lymeské borreliózy. Onemocnění není u obou těchto souborů zcela vyloučeno. Doporučuje

se sledování výše uvedených pacientů až do úplného vymizení i nespecifických příznaků onemocnění.

Lymeská borrelióza je zákeřné, velmi rozmanité onemocnění, dosud zahalené nepoznanými principy. Četné imunitní mechanismy však byly zásluhou pracovníků ve vědě rozluštěny. Stále se však objevují nové poznatky a laické i odborné veřejnosti umožňují porozumět tomuto onemocnění a druhu *Borrelia burgdorferi* jako takovému

7. SEZNAM LITERATURY

1. ABERER, E., KOSZIK, F., SILBERER, M.: Why is chronic lyme borreliosis chronic? *Clin. Infect. Dis.* 1997, 25 (7), s. 64-70.
2. AKIN, E., McHUGH, G.L., FLAVELL, R.A., FIGRIG, E., STEERE, A.C.: The immunoglobulin (IgG) antibody response to OspA and OspB correlates with severe and prolonged lyme arthritis and the IgG response to P35 correlates with brief and mild arthritis. *Infect. Immun.* 1999, 1, s. 173-181.
3. ALBAN, P.S., JOHNSON P.W., NELSON, D.R.: Serum starvation-induced changes in protein synthesis and morphology of *Borrelia burgdorferi*. *Microbiology.* 2000, 146, s. 119-127.
4. BALMELLI, T., PIFFARETTI, J.C.: Association between different clinical manifestations of lyme disease and species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Res. Microbiol.* 1995, 146, s. 329-340.
5. BARTŮŇEK, P. a spol.: Lymeská borrelióza. *Grada, Avicenum.* 2001.
6. BAŠTA, J., HULÍNSKÁ, D.: Aktuální systematické rozdělení kauzativního agens lymeské borreliózy – *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Zprávy ČEM.* 1999, 2.
7. BROWN, S.L., HANSEN, S.L., LANGONE, J.J.: Role of serology in the diagnosis of lyme disease. *JAMA*, 1999, 7, s. 62-66.
8. BRUNNER, H., SIGAL, L.H.: Use of serum immune complexes in a new test that accurately confirms early Lyme disease and active infection with *Borrelia burgdorferi*. *J. Clin. Microbiol.* 2001, 9, s. 3213-3221.
9. BRUNNER, M., SIGAL, L.H.: Immune complexes from serum of patients with lyme disease contain *Borrelia burgdorferi* antigen and antigen-specific antibodies: potential use for improved testing. *J. Infect. Dis.* 2000, 182, s. 534-539.
10. BRUNNER, M.: New method for detection of *Borrelia burgdorferi* antigen complexed to antibody in seronegative lyme disease. *J. Immunol. Methods.* 2001, 4, s. 185-190.
11. CADAVID, D., O'NEILL, T., SCHAEFER, H., PACHNER, A.R.: Localization of *Borrelia burgdorferi* strains in the nervous system and other

- organs in a nonhuman primate model of lyme disease. *Laboratory Investigation*. 2000, 80, s. 1043-1054.
12. CALLISTER, S.M., JOBE, D.A., AGGER, W.A., SCHELL, R.F., KOWASLKI, T.J., LOVRICH, S.D., MARKS, J.A.: Ability of the borreliacidal antibody test to confirm lyme disease in clinical practice. *Clin. Diag. Lab. Immunol.* 2002, 7, s. 908-912.
13. CEPOK, S., ZHOU, D., VOGEL, F., ROSCHE, B., GRUMMEL, V., SOMMER, N., HEMMER, B.: The immune response at onset and during recovery from *Borrelia burgdorferi* meningoradiculitis. *Arch. Neurol.* 2003, 6, s. 849-855.
14. COOKE, W.D., BARTENHAGEN, N.H.: Seroreactivity to *Borrelia burgdorferi* antigens in the absence of Lyme disease. *J. Rheumatol.* 1994, 21:1.
15. COYLE, P.K., SCHUTZER, S.E., DENG, Z., KRUPP, L.B., BELMAN, A.L., BENACH, J.L., LUFT, B.J.: Detection of *Borrelia burgdorferi* specific antigen in antibody negative cerebrospinal fluid in neurologic lyme disease. *Neurology*. 1995, 11, s. 2010-2015.
16. ČERNÝ, Z., BLAŽÍKOVÁ, I., ŠNERELOVÁ, M.: Zkušenosti s diagnostikou a léčbou lymeské borreliózy u souboru 518 dospělých nemocných hospitalizovaných na infekční klinice FN Brno-Bohunice v letech 1993 – 1997. *Klin. Mikrobiol. Inf. Lék.* 1999, 5 (6), s. 198-205.
17. DITERICH, I., RAUTER, C., KIRSCHNING, C.J., HARTUNG, T.: *Borrelia burgdorferi*-induced tolerance as a model of persistence via immunosuppression. *Infect. Immun.* 2003, 7, s. 3979-3987.
18. DORWARD, D.W., FICHER, E.R., BROOKS, D.M.: Invasion and cytopathic killing of human lymphocytes by spirochetes causing lyme disease. *Clin. Infect. Dis.* 1997, 25(1), s. 2-8.
19. DRESSLER, F., ACKERMANN, R., STEERE A.C.: Antibody responses to three genomic groups of *Borrelia burgdorferi* in European lyme borreliosis. *J. Infect. Dis.* 1994, 169, s. 313-318.
20. DRESSLER, F., WHALEN, J.A., REINHARDT, B.N., STEERE, A.C.: Western blotting in the serodiagnosis of lyme disease. *J. Infect. Dis.* 1993, 167, s. 392-400.

21. EIFFERT, H., KARSTEN, A., THOMSEN, R., CHRISTEN, H.J.: Characterization of *Borrelia burgdorferi* strains in lyme arthritis. *Scand. J. Infect.* 1998, 30, s. 265-268.
22. GILMORE, R.D., MURPHREE, R.L., JAMES, A.M., SULLIVAN, S.A., JOHNSON, B.J.B.: The *Borrelia burgdorferi* 37-kilodalton immunoblot band (P37) used in serodiagnosis of early lyme disease is the flaA gene product. *J. Clin. Microbiol.* 1999, 4, s. 548-552.
23. GIRONS, S., BARBOUR, A.G.: Antigenic variation in *Borrelia*. *Res. Microbiol.* 1991, 142, s. 711-717.
24. GRABHER, G., REDL, B., LOIDL, P., STOFFLER, G.: Serodiagnosis of lyme borreliosis with immunoblots using extracts from three genospecies, recombinant proteins and a DotBlot test. *American society of microbiology*. 1997, 5.
25. GRUNTAR, I., MALOVRH, T., MURGIA, R., CINCO, M.: Conversion of *Borrelia garinii* cystic forms to motile spirochetes in vivo. *APMIS*. 2001, 109 (5), s. 383-388.
26. GRUSHOFFER, L., LOUCKÁ, P., HOŠEK, P.: Klíšťata a člověk. *Vesmír*. 2004, 5.
27. GUIQONG, W., ALJE, P. van DAM, SCHWARTZ, I., DANCERT, J.: Molecular typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato: Taxonomic, epidemiological, and clinical implications. *J. Clin. Microbiol.* 1999, 10, s. 633-653.
28. GUO, B.P., BROWN, E.L., DORWARD, D.W., ROSENBERG, L.C., HÖÖK, M.: Decorin binding adhesions from *Borrelia burgdorferi*. *Mol. Microbiol.* 1998, 30(4), s. 711-723.
29. HAUSER, U., LENHERT, G., LOBERTANZER, R., WILSKE, B.: Interpretation criteria for standardised western blots for three european species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *J. Clin. Microbiol.* 1997, 6, s. 1433-1444.
30. HAYES, S.F., BURGDORFER, W.: Characteristics of *Borrelia burgdorferi*. ?.
31. HEFTY, P.S., JOLLIFF, S.E., CAIMANO, M.J., WIKEL, S.K., AKINS, D.R.: Changes in temporal and spatial patterns of outer surface lipoprotein expression of generate population heterogeneity and antigenic diversity in the

- lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Immun.* 2002, 7, s. 3468-3478.
32. <http://www.igenex.com/labtest.htm>: An understanding of laboratory testing for Lyme disease. *J. Spir. Tic-borrne. Dis.* 1998, 5.
 33. HULINSKA, D., BARTAK, P., HERCOGOVA, J., HANCIL, J., BASTA, J., SCHRAMLOVA, J.: Electron microscopy of langerhans cells and *Borrelia burgdorferi* in lyme disease patients. *Zbl. Bact.* 1994, 280, s. 348-349.
 34. HUPERTZ, H.I.: Lyme disease in children. *Current Opinion in Rheumatology.* 2001, 13, s. 434-439.
 35. IM®x SYSTÉM (návod), enzymová imunoanalýza lymeské borreliózy na mikročasticích. 2001.
 36. IMMUNODOT® (návod), enzymová imunoanalýza, borreliový DotBlot G a DotBlot M test. 1995.
 37. JANOVSÁ, D., HÁLKOVÁ, B.: Klinické projevy lymeské borreliózy v České republice (rozběr hlášených případů v roce 1996). *Klin. Mikrobiol. Inf. Lék.* 1998, 4, s. 110-116.
 38. JOHNSON, B.J.B., ROBBINS, K.E., BAILEY, R.E., CAO, B.L., SVIAT, S.L., CRAVEN, R.B., MAYER, L.W., DENIS, D.T.: Serodiagnosis of lyme disease: Accuracy of two-step approach using a flagella-based ELISA and immunoblotting. *J. Infect. Dis.* 1996, 174, s. 346-353.
 39. KMETY, E.: Dynamics of antibodies in *Borrelia burgdorferi* sensu lato infections. *Bratisl. Lek. Listy.* 2000, 101 (1), s. 5-7.
 40. MA, B., CHRISTEN, B., LEUNG, D., VIGO-PELFREY, C.: Serodiagnosis of lyme borreliosis by western immunoblot: Reactivity of various significant antibodies against *Borrelia burgdorferi*. *J. Clin. Microbiol.* 1992, 2, s. 370-376.
 41. MAGNARELLI, A., IJDO, J.W., PADULA, S.J., FLAVELL, R.A., FIGRIG, E.: Serologic diagnosis of lyme borreliosis by using enzyme-linked immunosorbent assays with recombinant antigens. *J. Clin. Microbiol.* 2000, 5, s. 1735-1739.
 42. MAGNARELLI, L.A., FIGRIG, E., PADULA, S.J., ANDERSON, J. F., FLAVELL, R.A.: Use of recombinant antigens of *Borrelia burgdorferi* in serologic tests for diagnosis of lyme borreliosis. *J. Clin. Microbiol.* 1996, 2, s. 237-240.

43. MASAROTTI, E.M.: Lyme arthritis. *Am. J. Med.* 2002, 86 (2), s. 297-309.
44. MASTABLOT BORRELIA (návod), western blot pro detekci anti-borreliových IgG/IgM protilátek.
45. MITCHEL, P.D., RED, K.D., ASPESLET, T.L., VANDERMAUSE, M.F., MELSKI, J.W.: Comparisons of four immunoserologic assays for detection of antibodies to *Borrelia burgdorferi* in patients with culture-positive erythema migrans. *J. Clin. Microbiol.* 1994, 8, s. 1958-1962.
46. MORAVCOVÁ, L., PÍCHA, D., LÁSIKOVÁ, Š., ŽDÁRSKÝ, E.: Porovnání dvou metod – průkazu intratékální syntézy specifických antiborreliových protilátek a polymerázové řetězové reakce – v diagnostice lymeské neuroborreliózy. *Čes. a Slov. Neurol. Neurochir.* 2003, 2, s. 121-125.
47. MORAVCOVÁ, L., PÍCHA, D., MAREŠOVÁ, D., ŠTĚPÁNKOVÁ, D.: Průkaz borreliových antigenů (vnějšího membránového proteinu OspB a flagelárního proteinu), v mozkomíšním moku u pacientů s neuroborreliózou. *Čes. a Slov. Neurol. Neurochir.* 2001, 3, s. 162-166.
48. NIŚCIGORSKA, J., SCOTARCZAK, B., WODECKA, B.: *Borrelia burgdorferi* infection among forestry workers – assessed with an immunoenzymatic method (ELISA), PCR, and correlated with the clinical state of the patients. *Ann. Agric. Environ. Med.* 2003, 10, s. 15-19.
49. NORTON HUGHES, C.A., ENGSTROM, S.M., COLEMAN, L.A., KODNER, C.B., JOHNSON, R.G.: Protective immunity is induced by *Borrelia burgdorferi* mutant that lacks OspA and OspB. *Infect. Immun.* 1993, 12, s. 5115-5122.
50. OKSI, J., UKSILA, J., MARJAMÄKI, M., NIKOSKELAINEN, J., VILJANEN, M.K.: Antibodies against whole sonicated *Borrelia burgdorferi* spirochetes, 41-kilodalton flagelin, and P39 protein in patients with PCR- or culture-proven late lyme borreliosis. *J. Clin. Microbiol.* 1995, 10, s. 2260-2264.
51. PACHNER, A.R.: Early disseminated lyme disease: lyme meningitis. *Am. J. Med.* 1995, 4, s. 30-43.
52. PAL, U., MONTGOMERY, R.R., LUSITANI, D., VOET, P., WEYNANTS, V., MALAWISTA, S. E., LOBET, Y., FIGRIG, E.: Inhibition of *Borrelia burgdorferi* – tick interactions in vivo by outer surface protein a antibody. *J. Immunol.* 2001, 166, s. 7398-7403.

53. PALACIOS, R., OSORIO, L.E.E., GIRALDO, L.E., TORRES, A.J., PHILIPP, M.T., OCHOA, M.T.: Positive IgG western blot for *Borrelia burgdorferi* in Colombia. *Mem. Inst. Oswaldo. Cruz.* 1999, 94 (4), s. 499-503.
54. PANELIUS, J., LAHDENNE, P., SAXEN, H., HEIKKILÄ, T., SEPPÄLÄ, I.: Recombinant flagellin A proteins from *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *B. afzelii*, and *B. garinii* in serodiagnosis in Lyme borreliosis. *J. Clin. Microbiol.* 2001, 11, s. 4013-4019.
55. PAŠKOVÁ, B., HÁJEK, T.: Lymeská borrelióza a duševní poruchy. *Psychiatrie.* 2001, 1.
56. PERSING, D.H., RUTLEDGE, B.J., RYS, P.N., PODZORSKI, D.S., MITCHELL, P.D., REED, K.D., LIU, B., FIGRIG, E., MALAWISTA, S.E.: Target imbalance : Disparity of *Borrelia burgdorferi* genetic material in synovial fluid from lyme arthritis patients. *J. Inf. Dis.* 1994, 169, s. 668-672.
57. PÍCHA, D., MORAVCOVÁ, L., MAREŠOVÁ, V.: Intratékální syntéza specifických antiborreliových IgG protilátek v mozkomíšním moku u pacientů s neuroborreliózou. *Čes. a Slov. Neurol. Neurochir.* 2000, 5, s. 279-282.
58. PINTO, D.S.: Cardiac manifestation of lyme disease. *Am. J. Med.* 2002, 86 (2), s. 285-296.
59. PRIEM, S., RITTIG, M.G., KAMRADT, T., BURMESTER, G.R., KRAUSE, A.: An optimized PCR leads to rapid and highly sensitive detection of *Borrelia burgdorferi* in patients with lyme borreliosis. *J. Clin. Microbiol.* 1997, 4, s. 685-690.
60. RUDOLF, I., ŠIKUTOVÁ, S., HUBÁLEK, Z.: Mohou komáři přenášet lymeskou borreliózu? *Vesmír.* 2005, 3.
61. RYŠKOVÁ, O., VYSLOUŽIL, L., HONEGR, K., LESNÁ, J., HORÁČEK, J., ŠKRABKOVÁ, J.: Lymeská borrelióza – výskyt antimyelinových protilátek v séru. *Epidemil. Mikrobiol. Imunol.* 2002, 2, s. 60-65.
62. SEINOST, G., GOLDE, W.T., BERGER, B.W., DUNN, J.J., QIU, D., DUNKIN, D.S., DYKHUIZEN, D.E., LUFT, B.J., DATTWYLER, R.J.: Infection with multiple strains of *Borrelia burgdorferi sensu stricto* in patients with lyme disease. *Arch. Dermatol.* 1999, 135, s. 1329-1333.
63. SCHMIDT, B.L.: PCR in laboratory diagnosis of human *Borrelia burgdorferi* infections. *J. Clin. Microbiol.* 1997, 1, s. 185-201.

64. SINGH, S.K., GIRSCHICK, H.J.: Lyme borreliosis: from infection to autoimmunity. *Clin. Microbiol. Infect.* 2004, 10, s. 598-614.
65. TILTON, R.C., RYAN, R.W.: The laboratory diagnosis of lyme disease. *J. Clin. Immunoassay.* 1993, 16, s. 208-214.
66. WANG, I.N., DYKHUYTZEN, D.E., QIU, W., DUNN, J.J., BOSLER, E.M., LUFT, B.J.: Genetic diversity of OspC in a local population of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto. *Genetics*, 1999, 1, s. 15-30.
67. WEINSTIEN, A., BRITCHOV M.: Lyme arthritis and post-lyme disease syndrome. *Current Opinions in Rheumatology.* 2002, 14, s. 383-387.
68. WESTERN BLOT (návod), protilátky proti *Borrelia burgdorferi* IgM a IgG.
69. WILSKE, C., FINGERLE, V., PRAEC-MURSIC, V., JAURIS-HEIPKE, S., HOFMANN, A., LOY, H., PFISTER, H.W., RÖSSLER, D., SOUTSCHEK, E.: Immunoblot using recombinant antigens derived from different genospecies of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Med. Microbiol. Immunol.* 1994, 183, s. 43-59.
70. ZAJKOWSKA, J., HERMANOWSKA-SZPAKOWICZ, T., COYLE, P., OSTROWSKA, J., PANCEWICZ, S., KONDRUSIK, M.: Comparative study of early lyme disease: erythema migrans in New York state and northeastern Poland. ? 2002, 8 (1), s. 37-43.

Odkazy obrázků:

Odkaz č. 1 - student.cbcmd.edu/.../bburgdorf_darkfield.html

Odkaz č. 2 - www.pattyknack.com/borrelia.html

Odkaz č. 3 - www.hvcn.org/info/mlda/tickpics.shtml

Odkaz č. 4 - <http://www.unilatex.com/elisa-test.htm>