

**Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

Katedra biologických a lékařských věd

LYMESKÁ BORELIÓZA

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce:

Mgr. Marcela Vejsová

Autorka bakalářské práce:

Martina Houdková

Zdravotnická bioanalytika

Kombinovaná forma

HRADEC KRÁLOVÉ 2008

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

1.4. 2008

Děkuji paní Mgr. Marcele Vejsové za odbornou pomoc a vedení, ochotu, cenné rady a podněty při zpracování mé bakalářské práce. Rovněž děkuji své rodině za toleranci a trpělivost při sepisování.

OBSAH

SOUHRN.....	5
ABSTRACT.....	6
CÍL PRÁCE.....	7
1 TEORETICKÁ ČÁST	8
1.1 ÚVOD	9
1.2 SPIROCHÉTA – TAXONOMICKÉ ŘAZENÍ	10
1.3 EPIDEMIOLOGIE	12
1.4 PŘENAŠEČI.....	13
1.5 PATOGENEZE	15
1.6 PREVENCE	17
1.7 STADIA ONEMOCNĚNÍ A KLINICKÉ PŘÍZNAKY	18
1.8 LÉČBA	20
1.9 MORFOLOGIE	22
1.10 GENOM	25
1.11 ANTIGENY BORELIE	26
1.11.1 Povrchové antigeny - OspA, B, C, D, E a F	27
1.11.2 Bičkový antigen (flagellin FlaA a FlaB)	27
1.11.3 Lipoproteiny p20 a p22	28
1.11.4 VisE	28
1.11.5 Membránový protein p66	29
1.12 DIAGNOSTIKA.....	30
1.12.1 METODY PŘÍMÉ	31
1.12.2 METODY NEPŘÍMÉ	34
1.13 FALEŠNÁ POZITIVITA	38
1.14 VLIV EBV A MOŽNÉ ZKŘÍŽENÉ REAKCE PŘI LABORATORNÍ DIAGNOSTICE.....	40
2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	41
2.1 SOUBOR VZORKŮ	43
2.2 ELISA (enzyme linked immuno sorbent assay)	44
2.3 HODNOCENÍ VÝSLEDKŮ A INTERPRETACE	45
2.4 ELISA TEST-LINE	46
2.4.1 Stanovení EIA Borrelia IgG firmy TEST-LINE s.r.o.(=TL).....	49
2.4.2 Stanovení EIA Borrelia IgM firmy TEST-LINE s.r.o. (=TL).....	51
2.4.3 Stanovení EIA Borrelia rekombinant IgM firmy TEST-LINE s.r.o.(=TL)	53
2.5 ELISA EUROIMMUN.....	55
2.5.1 Stanovení EIA Borrelia IgG firmy EUROIMMUN (=EU).....	58
2.5.2 Stanovení EIA Borrelia IgM firmy EUROIMMUN (=EU).....	60
2.6 EUROIMMUN WESTERN BLOT	62
2.7 DISKUZE	74
2.8 ZÁVĚR.....	76
2.9 SEZNAM ZKRATEK.....	77
2.10 SEZNAM LITERATURY	79

SOUHRN

První část bakalářské práce je věnován základním poznatkům o původci onemocnění Lymeské boreliozy *Borrelia burgdorferi sensu lato*. Je stručně popsána taxonomie spirochéty, epidemiologie, přenašeči, patogeneze, prevence, stadia onemocnění a klinické příznaky, léčba a morfologie.

Větší část je věnována antigenům borelií z důvodu jejich využití při laboratorní diagnostice. Je zde uveden také kompletní přehled možností laboratorní diagnostiky Bb. Část je věnována falešné pozitivě a možnostem zkřížených reakcí při laboratorní diagnostice.

Druhá část bakalářské práce, experimentální část, je věnována porovnání dvou výrobců ELISA souprav. Výsledky měření jsou uvedeny v tabulkách experimentální části a pro přehlednost znázorněny graficky. Zhodnocení výsledků práce je uvedeno v diskuzi.

ABSTRACT

Forepart of bachelor work is concerned for knowledge basics about invader of disorder Lyme disease *Borrelia burgdorferi sensu lato*. There is short description of spirochete taxonomy, epidemiology, medium, pathogenesis, prevention, disorder stages and clinical appearances, treatment and morphology.

Bigger part is concerned for antigens borrelia because of importance for laboratory diagnostic. There is described complete review of Bb. laboratory diagnostic survey possibilities as well. Another part is concerned for false positivity and for possibilities of crossed response at laboratory diagnostic.

Second part of bachelor work, experimental part, is concerned for comparison of two ELISA kit producers. Metering results are in experimental part mentioned in charts and for lucidity diagrammatized. Work results estimation is mentioned in discussion paragraph.

CÍL PRÁCE

Cílem této bakalářské práce je na základě samostatně vyhledané literatury podat přehled o onemocnění lymeské boreliózy, taxonomickém řazení, přenašečích, patogenezí, prevenci, o stádiích a příznacích, léčbě a morfologii *Borrelia burgdorferi*. Větší část je věnována antigenům borelií a jejich laboratorní diagnostice.

Experimentální část je zaměřena na porovnání ELISA metody dvou výrobců vzhledem ke konfirmaci Western blotem a statistické zhodnocení výsledků.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 ÚVOD

Lymeská borelióza (LB) je nejčastější klíšťaty přenášené onemocnění, jehož epidemiologická, klinická, ale také sociální závažnost v Evropě, USA a v dalších částech světa významně stoupá. Protože je borelie významným patogenem člověka i zvířat, byla v posledních letech věnována stále větší pozornost základním otázkám biologie a ekologie původce tohoto onemocnění včetně molekulových mechanismů patogeneze s cílem proniknout do podstaty interakcí borelií s jejich přenašeči i jejich definitivními hostiteli.



obrázek 1. Klíšťě rodu *Ixodes*
(zdroj:<http://www.fda.gov/consumer/updates/lymedisease062707.html#symptoms>)

LB je klíšťaty přenášené zánětlivé infekční onemocnění vyvolané bakterií ze skupiny spirochét, zvanou *Borrelia burgdorferi*. Původně se onemocnění označovalo jako „lymeská artritida“ (tj. zánět kloubů) a jako infekční onemocnění byla poznána v roce 1975 po epidemiologickém vyšetření několika sdružených případů kloubního zánětu u pacientů v městě Lyme ve státě Connecticut v USA. Společným znakem těchto případů bylo hmyzí kousnutí. Poté byl z klíštěte rodu *Ixodes* izolován původce nákazy. Studie ukázaly, že se v USA onemocnění vyskytovalo endemicky (tj. v určitých oblastech trvale) již v roce 1962. Příznaky onemocnění byly známy v Evropě již v prvním desetiletí 20. století.

Lymeská borelióza byla prokázána ve 43 zemích světa a na všech kontinentech mimo Antarktidu a Jižní Ameriku. V Evropě a USA je LB nejčastější infekcí přenášenou klíšťaty a je dnes považována za nejvýznamnější infekci přenášenou vektory v mírném klimatickém pásmu.

1.2 SPIROCHÉTA – TAXONOMICKÉ ŘAZENÍ

Na základě morfologických a biologických vlastností je *Borrelia burgdorferi sensu lato* (Bbsl) taxonomicky řazena:

- říše: *Prokaryotae*
- doména: bakterie
- kmen: spirochéty
- třída: *Spirochaetes*
- řád: *Spirochaetales*
- čeleď: *Spirochaetaceae*
- rod: *Borrelia*



obrázek 2. Spirochéta - *Borrelia burgdorferi* (zdroj: <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/imagepages/1427.htm>)

V čeledi *Spirochaetaceae* je zařazeno kolem 30 druhů rodu *Borrelia*. Zvláštní skupinu tohoto rodu tvoří *Borrelia burgdorferi sensu lato* (tj. *Borrelia burgdorferi* v širším slova smyslu). Jedná se o skupinu 11 příbuzných genomospecies *Borrelia burgdorferi*, které se navzájem liší antigenní strukturou a patogenním vlivem.

Podle sekvenčního uspořádání chromozomové DNA v pulzní gelové elektroforéze byly spirochety *Borrelia burgdorferi sensu lato* rozlišeny na druhy:

- *Borrelia burgdorferi sensu stricto*
- *Borrelia baronii*
- *Borrelia afzelii*
- *Borrelia japonica*
- *Borrelia andersonii*
- *Borrelia valaisiana*
- *Borrelia lusitaniae*
- *Borrelia bissettii*
- *Borrelia tanukii*
- *Borrelia turdae*
- *Borrelia sinica*
- *Borrelia miyamotoi*

K nejčastěji se vyskytujícím druhům v Evropě náleží *Borrelia burgdorferi sensu stricto* (Bbss), *Borrelia garinii* a *Borrelia afzelii*, které jsou v největší míře příčinou tvorby protilátek v České republice.

1.3 EPIDEMIOLOGIE

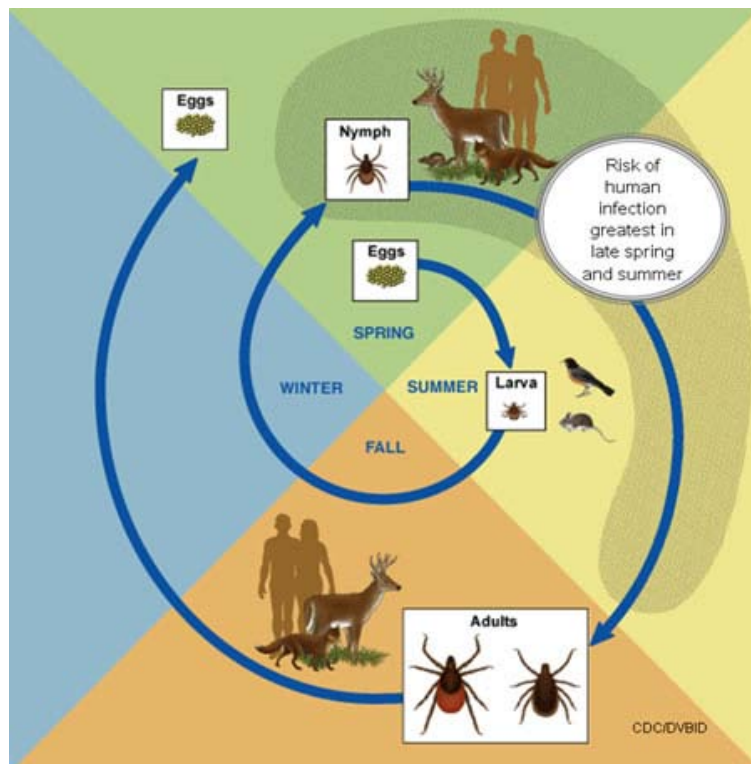
Česká republika je svým geografickým charakterem velmi vhodným biotopem pro výskyt nejčastějšího typu přenašeče v mírném pásmu – klíštěte *Ixodes ricinus*. V četnosti výskytu onemocnění přenášených klíšťaty dominuje právě lymeská borelióza. Promořenost klíšťat boreliemi na území ČR kolísá v rozsahu 2-22%. (1)

V roce 1986 se zavedla sérologická diagnostika a infekce byla zařazena mezi infekce podléhající povinnému hlášení.

Rozložení počtu hlášených případů v České republice není rovnoměrné. Výskyt LB se podle hlášených případů v krajích výrazně liší. Nejvyšší incidenci vykazuje kraj středočeský, pardubický a karlovarský. LB vykazuje také sezónní výskyt v závislosti na ročním období a mikroklimatu v jednotlivých měsících. (2)

1.4 PŘENAŠEČI

Jediným přenašečem – vektorem patogenních druhů *Borrelia burgdorferi sensu lato* je celosvětově uznáno klíště rodu *Ixodes*. Borelie rostou a prodělávají vývoj ve střevě klíštěte a mění se pod vlivem přijímané potravy, kterou je krev a



lymfa hostitele. Vývoj a přežívání borelií ve všech

obrázek 3. Přenos klíštěte (zdroj: http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/lyme/images/TickLifeCycle_707.jpg)

stádiích klíštěte – larva, nymfa, imago závisí na hostiteli. K předání infekce z hostitele musí být splněna řada podmínek (např. přechod borelií do slinných žláz v kvantitě vyšší než 100). Pouze jedna třetina nakažených klíšťat je schopna infekci předat. Přenos jiným vektorem nebyl experimentálně prokázán a v současné době je ve světě zpochybňován vzhledem k vývojovým změnám, které borelie prodělávají ve střevě klíštěte. (3)

K přenosu dochází zpravidla v období od března do listopadu a úzce souvisí především se sezónní aktivitou klíšťat a rekreační aktivitou člověka. V naší republice je celostátně průměrně infikováno 5 – 10 % klíšťat. Není typická přírodní ohniskovost jako u klíšťové encefalitidy, klíšťata jsou promořena na velkém území. Endemické oblasti se neshodují s ohnisky klíšťové encefalitidy. Přenos infekce z klíštěte na hostitele je možný až po vycestování borelií do slinných žláz klíštěte, tedy nejdříve za 24 hodin po přisátí. Po 72 hodinách po přisátí je nákaza přenesena téměř ve všech případech. Další možností přenosu je trusem klíšťat. Při odstraňování klíšťat

(lidem, psům, kočkám) mohou být borelie obsažené v tomto trusu vetřeny do kůže či zaneseny na spojivky a poté pronikat rankami i neporušenou kůží. (3)

Přírodní rezervoár borelií tvoří více než 200 druhů zvířat, na nichž klíště parazituje, a jednak jsou rezervoárem klíšťata samotná. Hostiteli klíšťat ve všech třech stádiích jeho vývoje jsou např. drobní hlodavci (larva), hlodavci a ptáci (nymfa), vysoká zvěř a pasený dobytek (imago). Člověk je náhodným a konečným hostitelem klíšťat a představuje slepou uličku v šíření nákazy. Riziko nákazy po přisátí infikovaného klíštěte se u nás odhaduje na 5 – 10%. Například ale v jižním Německu je infikováno 10 – 33% klíšťat. Ze všech přisátých klíšťat je v endemických oblastech Evropy příčinou nákazy člověka boreliemi v průměru jedno klíště ze sta (1% riziko). (4)

1.5 PATOGENEZE

Přenos borelií od klíštěte k hostiteli není pouhou mechanickou záležitostí, ale komplexem biologických procesů, které jsou rozpoznány teprve v poslední době. Spirochéty nacházející se v zažívacím traktu sajícího klíštěte exprimují vnější povrchové proteiny (Osp = outer surface proteins a to konkrétně OspA, B, C, D, E, F, VlsE, p66), které nejsou syntetizovány, pokud jsou spirochéty v nenasátém klíštěti. Bylo prokázáno, že OspA je faktorem umožňujícím adhezi spirochét k buňkám epitelu zažívacího traktu klíšťat, a pouze spirochéty, které jsou schopny exprimovat OspC, mohou opustit jeho zažívací trakt a přejít do hemocelu. Jakmile se spirochéty dostanou do těla hostitele, musí se dále množit, aby dlouhodobě přežily. (5)

Protilátková odpověď začíná již v prvních dnech po infekci, avšak běžně prokazatelná je až po několika týdnech. Protilátková tvorba obvykle začíná produkcí IgM, která může trvat několik týdnů až měsíců. IgG se objevují o 2-4 týdny později, avšak pro pomalý rozvoj choroby jsou klinické příznaky diseminace infekce již zpravidla provázeny přítomností IgG. Spektrum antigenních specifit IgM i IgG protilátek se může lišit i u jednotlivých pacientů i forem onemocnění. Sekrece IgG (a vzácně i IgM) může přetrvávat měsíce až léta i bez vazby na další klinický vývoj onemocnění. V některých případech nejsou specifické protilátky prokazatelné vůbec, jindy může vést k jejich absenci časná terapie antibiotiky. (5)

Základní klinicko-patologickou charakteristikou vyvolavatele Bbsl je relativně velmi dobrá adaptace na vnitřní prostředí člověka (a řadu dalších obratlovců). Tento fakt způsobuje, že průběh infekce je pomalý, často inaparentní – spontánní vyhojení je častější než případy léčené. Imunitní odpověď je mírná s řadou variací, letální případy nejsou známy. Faktory, které nebyly z větší části objasněny, vedou za určitých okolností k plíživé progresi infekce s postižením více orgánových systémů. Průběh infekce může být i chronický nebo relapsující. Borelie jsou schopny navodit i imunopatologické procesy, které způsobují další orgánová postižení, často již bez účasti infekčního agens, které tak sehrává úlohu spouštěcího mechanismu.

Patogeneze tkáňových změn u lidské infekce je z větší části neobjasněna a pravděpodobně se poněkud liší u jednotlivých forem postižení. V zásadě však lze rozlišit čtyři základní mechanismy patologického působení:

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

V místě inokulace spirochét do kůže dochází k primárnímu pomnožení, v typickém případě za manifestace *erythema migrans*. Tento typ postižení je lokalizovanou formou infekce. V některých případech jsou borelie dokonce tolerovány tak, že nejsou mikroskopicky prokazatelné žádné zánětlivé změny. Nedojde-li k jejich eliminaci, šíří se spirochéty do organismu cestou krevní i lymfatickou, většinou s latencí několika dnů, týdnů až měsíců. Tím se infekce dostává z prvního lokalizovaného stadia do stadia diseminace.

Za příznivých okolností jsou borelie schopny se uchytit zejména v centrálním i periferním nervovém systému, kloubech, myokardu, kosterních svalech, některých očních tkáních a sekundárně v kůži. Též v této fázi může dojít ke spontánnímu vyhojení infekce. V malém procentu případů se infekce dlouhodobě usidluje v některém z postižených orgánů za vzniku chronického stadia. V chronické fázi infekce může být postiženo více orgánů, nejčastěji je to kloubní, nervový a kožní systém. (5)

1.6 PREVENCE



Vzhledem k tomu, že dosud není očkovací látka

k dispozici (díky vysoké antigenní variabilitě evropských kmenů), je jedinou formou omezení rizika boreliové infekce pouze pečlivá ochrana před klíšťaty. To hlavně

v endemických oblastech, kde je nutné zachovávat určitý režim, který omezuje pohyb ve zvláště exponovaných oblastech. Znamená to vyhýbat se porostům na okrajích lesů, volit vhodné oblečení a používat repelenty. Nezbytná je pečlivá prohlídka těla.

Přisáté klíště je nutné odstranit co nejdříve, místo vydezinfikovat a sledovat několik týdnů pro případné zarudnutí. Zarudnutí anebo generalizované příznaky připomínající chřipku je nutné konzultovat s lékařem.

Prevence spočívá ve vystříhání se návštěvy endemických oblastí a v informování veřejnosti o těchto rizicích. Vyhubení přenašečů nemoci není možné. (6, 7, 8)

obrázek 4. Klíště (zdroj: http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/lyme/images/TickLifeCycle_707.jpg)

1.7 STADIA ONEMOCNĚNÍ A KLINICKÉ PŘÍZNAKY

Klinické formy se v současné době dělí na akutní a chronické. Dlouhou dobu však bylo uznáváno a stále se ještě používá schematické dělení do třech stádií.

Typickou primární manifestací (dříve stadium I.) infekce Bbsl je *erythema chronicum migrans*, cirkulární zčervenání kůže v okolí kousnutí klíštěte. Erytém je doprovázen celkovými chřipkovými symptomy s horečkou, zimnicí a třesavkou, s bolestí hlavy a zvracením. V některých případech se může objevit lymfadenopatie (*lymphadenosis cutis benigna*). V tomto stadiu může dojít ke spontánnímu uzdravení nebo se může rozvinout generalizovaná borelióza. Přechodná fáze do chronicity je asymptomatická: IgM protilátky proti antigenům Bbsl jsou sérologicky detekovatelné u 50% až 90% pacientů. Prevalence IgG protilátek je významně nižší. Přesto v tomto stadiu jsou sérologické výsledky často negativní. Jsou-li přítomny odpovídající symptomy, doporučuje se sledovat pacienta několik týdnů.

Několik týdnů až měsíců po kousnutí klíštětem (dříve stadium II.) se může rozvinout množství symptomů. V popředí jsou neurologické symptomy: meningitida, encefalitida, asymetrická polyneuritida, parézy hlavových nervů. Rovněž nacházíme často artritidu, především kolenního kloubu, nelokalizované bolesti kostí, kloubů a svalů. Méně časté jsou kardiologické projevy – myokarditida a perikarditida. Protilátky proti antigenům Bbsl jsou sérologicky detekovatelné u 50% až 90% pacientů. Nacházíme hlavně IgM protilátky, později pak často pouze IgG. Přesto IgM protilátky mohou dlouho přetrvávat.

Typickými projevy infekce Bbsl v chronickém stadiu (dříve stadium III.) jsou chronická relapsující erozivní artritida, *acrodermatitis chronica atropicans* a progresivní encefalomyelitida, která může přejít v *sclerosis multiplex*. V tomto stadiu IgG protilátky významně narůstají u 90% až 100% pacientů, zatímco IgM protilátky jsou detekovatelné jen zřídka. Do skupiny chronických forem jsou řazeni nemocní, jejichž obtíže trvají nejméně jeden rok, nebo u nich byla diagnóza stanovena před více než rokem a přetrvává u nich klinický nález či laboratorní známky infekce.

Infekce Bbsl může být sérologicky diagnostikována u mnoha pacientů s různou symptomatologií (například rozsáhlé artritické potíže nebo závažné neurologické symptomy), jejichž příčina byla dříve nejasná. Pro diagnózu neuroboreliózy je rozhodující nález protilátek v mozkomíšním moku, protože zde zřídka, na rozdíl od séra, dochází ke zkřížené reakci, která by mohla ovlivnit výsledky testu, proto je pozitivní reakce očekávána pouze v případě neuroboreliózy.

Vrozená (tj. během těhotenství vzniklá) nákaza lymfskou boreliózou může mít pro novorozence smrtelné následky. (9, 10)

1.8 LÉČBA

Léčba LB musí být komplexní. Lze ji rozdělit na léčbu kauzální a symptomatickou. Terapie onemocnění se zahajuje vždy při korelaci nálezů kliniky a laboratoře.

Kauzální léčba spočívá v podávání antibiotik. S ohledem na intracelulární parazitizmus je vhodné použití antibiotik dobře pronikajících do tkání a buněk. U LB se můžeme setkat se třemi stádii onemocnění (přítomnost různých forem onemocnění).

U akutního stádia se jako lék volby používá doxycyklin, u dětí do 8 let a těhotných např. amoxicillin. U alergie na výše zmíněná antibiotika lze použít cefalosporiny II. – III. generace nebo makrolidy. U forem postihujících klinicky nervovou soustavu je nutno použít antibiotika s dobrým průnikem přes hematoencefalitickou bariéru – např. krystalický penicilín nebo cefalosporiny III. generace. U kardiální formy se podávají běžná parenterální antibiotika. Post – lyme syndrom, jenž se někdy může u onemocnění LB vyskytnout, nelze antibiotiky již ovlivnit. Vyznačuje se velkými bolestmi svalů, únavou a bolestí kloubů.

Diagnostické rozpaky mohou nastat u diagnosticky nejasných pacientů s pozitivním nálezem protilátek a s nespecifickými příznaky (občasná bolest hlavy, únavnost, občasná ataralgie, zvětšení mízních uzlin). Zde je nutno vyloučit všechna další onemocnění, která mohou podobné příznaky vyvolat a pokusit se o ověření diagnózy provedením některé z přímých metod (předně PCR). Chybou bývá zahájení antibiotické léčby pouze na základě pozitivního nálezu protilátek bez klinických příznaků, nebo ji opakovat pokud nedojde k jejich poklesu po léčbě. Naopak u některých nemocných mohou po antibiotické léčbě hladiny protilátek ještě stoupnout, což může být způsobeno rozpadem antigenního materiálu borelií a větší stimulací imunitního systému.

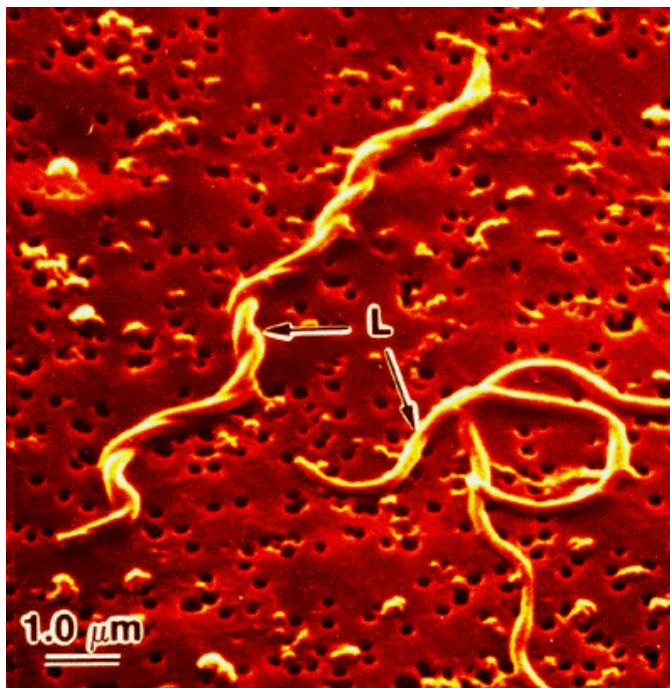
Pacienti jsou po léčbě LB zařazeni do dispenzární péče, která by měla trvat 2 roky. V tomto období jsou dispenzarizované osoby sledovány v intervalech 3 měsíců, kdy se provádí sérologické a klinické vyšetření. U pacientů s čerstvým záchytem *erythema chronicum migrans* má smysl stanovovat protilátky nejdříve za 6 – 8 týdnů. V této době by měl být pacient již

po léčbě časného stádia onemocnění. Protilátky se stanovují jako výchozí titr pro další sledování, nikoli pro opakování léčby.

I po antibiotické léčbě trpí někteří nemocní nepříliš významnými komplikacemi, které jsou podmíněny buď imunologicky, nebo mají příčinu v přetrvávání borelií v organismu. Další komplikací léčby antibiotiky je snížení nebo vymizení imunitní odpovědi proti boreliím, což má nepříznivý vliv na sérologické potvrzení infekce. (9, 11)

1.9 MORFOLOGIE

Mikroaerofilní, gramnegativní spirochéty Bbsl se vyznačují tenkým, spirálově vinutým tvarem., Spirálovitě stočené buňky s pravidelnými závity v počtu 4-15 se pohybují rotací kolem podélné osy nebo smršťováním a natahováním. Pohyb umožňují bičíky, kterých je 7-9 a obtáčí



tělo borelie pod vnější buněčnou stěnou. Buněčná stěna se

skládá ze tří vrstev. Stěna je od cytoplazmatické membrány oddělena periplazmatickým prostorem. Velká flexibilita membrán buněčné stěny umožňuje vysunutí bičíků, tvorbu cyst a vylučování membranózních vezikulů, které mají stejnou stavbu jako buněčná stěna a obsahují plazmidovou výbavu.

Pro život a virulenci Bbsl jsou významné bičíky a vnější povrchové proteiny (Osp) buněčné stěny, které lze použít k identifikaci. Při určitých podmínkách borelie ztrácí bičíky a v nevhodném prostředí (lytické enzymy, antibiotika) je není schopna obnovit a vytváří nepravidelné struktury, například cysty. Velmi důležitou roli hraje nedávno objevený VlsE antigen (variable major protein-like sequence, expressed = exprimovaná sekvence podobná jednotce hlavního variabilního proteinu).

Bičíky jsou tvořeny vnějším a vnitřním glykoproteinem. Hostitel tvoří v časně fázi infekce proti proteinu bičíku (flagellinu) a vnějšímu proteinu povrchu OspC protilátky třídy IgM. Humorální IgG protilátky tvořené proti tomuto proteinu mohou být nespecifické a mohou způsobit zkříženou reakci s lidským antigenem HsP60 (axonální protein nervových buněk), která může být příčinou autoimunity, ale i chronické artritidy.

obrázek 5. *Borrelia burgdorferi* (zdroj: <http://www.wadsworth.org/databank/borrelia.htm>)

Adheze *Borrelia burgdorferi* k receptorům buněk pomocí molekul glykosaminopeptidu jí umožňuje pronikat do buněk. Intracelulární perzistence borelií závisí na množství hlavního extracelulárního proteinu, který je tvořen v periplazmatickém prostoru stěny.

Přítomnost HsP-proteinu má zřejmě, podobně jako přítomnost Osp antigenu, vztah k teplotním změnám, jimž je spirochéta vystavena v okamžiku napadení hostitele přenašečem (klíštětem). Teplotní šok může vést k patologickým reakcím vzhledem k přítomnosti homologního proteinu v organizmu hostitele.

Přítomnost proteinu p60 u Bbsl působí obtíže při hodnocení výsledků sérologických testů. Navíc je tento „společný“ antigen i u jiných bakterií.

Spirochety Bbsl se liší svým genotypem i fenotypem – antigenní strukturou. Výzkum hlavních antigenních determinant vedl k zjištění odlišných sérotypů i v rámci jednoho druhu. Povrchové antigeny jsou u jednotlivých kmenů odlišné. Jsou to lipoproteiny s plazmidovým původem. Bylo zjištěno, že dlouhodobým pasážováním v kultivační půdě, vlivem opakované infekce zvířat, ale i vlivem antibiotik dochází k postupné ztrátě Osp antigenů. Spirochety však vlastní regulační geny- *Borrelia* direct repeat (Bdr) uložené v cytoplazmatické membráně, které nejsou ovlivnitelné protilátkami a antibiotiky. Tyto geny a jimi řízená tvorba proteinů je zodpovědná za tvorbu imunokomplexů. Borelie vynakládají značnou energii na zvyšování počtu těchto genů k zachování druhu. Výměna plazmidů nesoucích Bdr geny a zvyšování jejich nadbytku v genomu je základem pro variabilitu Bbsl a je to prostředek pro přizpůsobování se změnám okolí.

Cytologická obranná reakce proti boreliím přímo závisí na způsobu fagocytózy. Té odolávají spirochety vázané v imunokomplexech s protilátkami. Proti buněčné i humorální obraně hostitele se borelie brání vnitrobuněčným antigenem kterým je GroEL-faktor, podobný lidským stresovým proteinům, které se uvolňují při poškození tkání.

Borelie je velmi heterogenní bakterie, která se mění vlivem prostředí a na jejíž ne zcela objasněné patogenezi se podílí řada vlastních i hostitelských faktorů. Virulence kmenů borelií závisí i na změnách, jimiž organizmy procházejí přenosem z klíšťat na teplokrevné savce. Důležitá je i jejich

pohyblivost, která jim umožňuje unikat z místa obranné reakce hostitele. Schopnost vázat a aktivovat hostitelské enzymy jim pomáhá pronikat endotelem krevních cév. Borelie mají definovaný orgánový tropizmus (např. *Borrelia afzelii* pro kůži, *Borrelia garinii* pro nervovou tkáň). Mají schopnost regulovat vlastní povrchové proteiny pod vlivem hostitelské reakce. Mitogenní aktivita Bbs1 na B lymfocyty, a ovlivnění syntézy adhezivních molekul a cytokinů, které boreliím neškodí, může být fatální pro hostitele (autoimunitní reakce). (3)

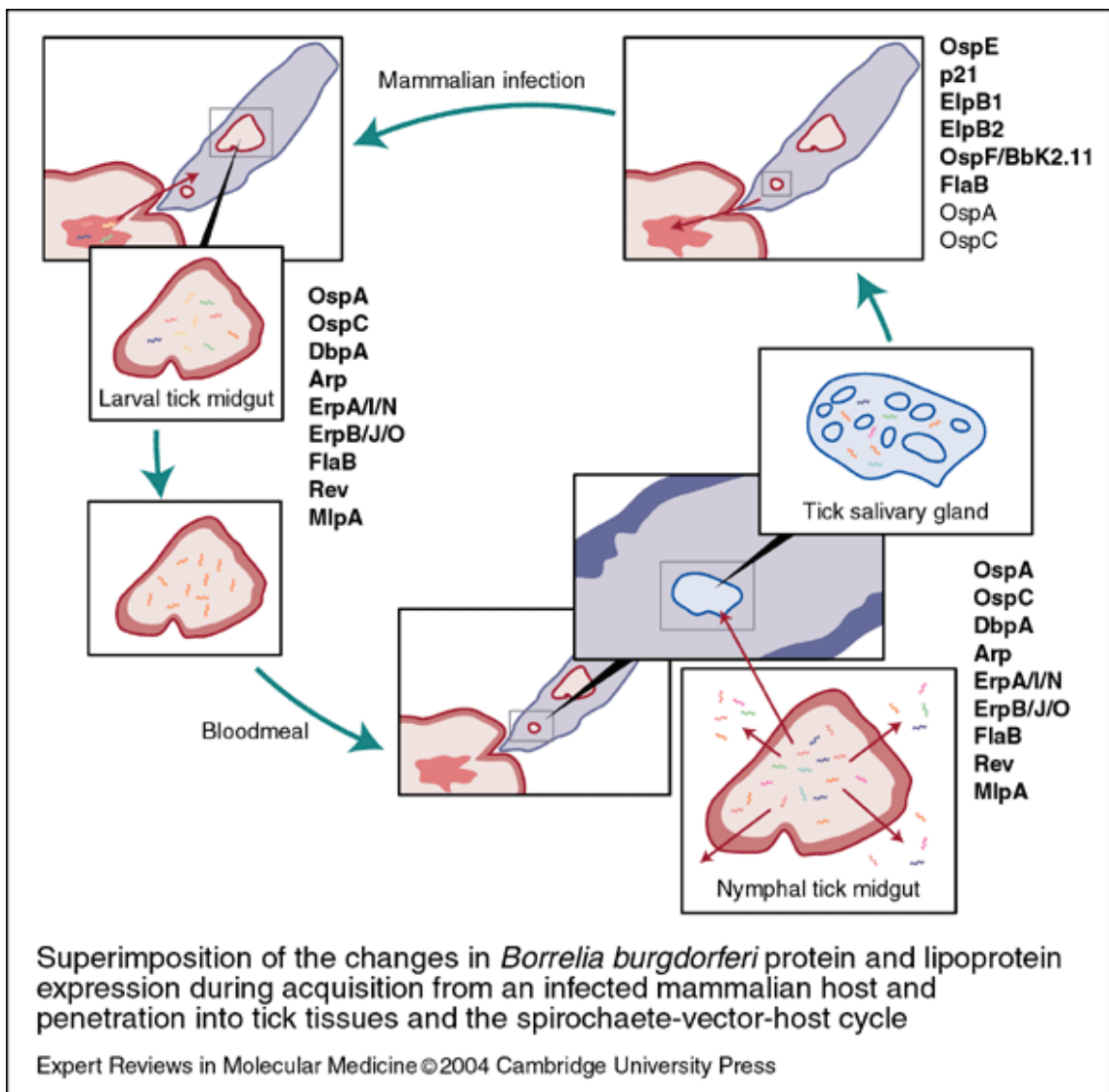
1.10 GENOM

Borelie jsou jedním z organismů, u kterého je známa sekvence celého genomu. V roce 1997 byla publikována DNA sekvence *Borrelia burgdorferi* kmen B31, která obsahuje lineární chromozóm o délce 910 725 párů bází. Genom obsahuje ještě plazmidy, z nichž je 9 lineárních a 12 cirkulárních. Chromozóm neobsahuje geny pro celulární biosyntetické reakce. *Borrelia burgdorferi* tvoří extracelulárně membránové vezikuly, které obsahují povrchové antigeny OspA, OspB, OspC, OspD a plazmidovou DNA. Vylučování těchto vezikul je ochranným mechanismem proti sérovým protilátkám. (12)

Plazmidy borelií se chovají jako odštěpené části chromozomů. Během růstu dochází k postupné ztrátě zejména kratších plazmidů a tím následně i ke ztrátě vnějších variabilních proteinů. (13)

1.11 ANTIGENY BORELIE

Borelie jsou vybaveny celou řadou antigenů neproteinové i proteinové povahy. Skupina proteinových antigenů zahrnuje přibližně 30 antigenů. Povrchové antigeny jsou zodpovědné za vyvolání protektivní imunitní odpovědi proti boreliím. Jednotlivé antigeny se liší svou molekulovou hmotností, která se udává v kDa (kilodaltony). Exprese antigenů je schématicky znázorněna na obr.6.



obrázek 6. Expresa antigenů Bbsl (zdroj:<http://www.ermm.cbcu.cam.ac.uk/04007306h.htm>)

1.11.1 Povrchové antigeny - OspA, B, C, D, E a F

Povrchové proteiny vnější membrány patří mezi nejlépe prostudované antigeny. Jsou zodpovědné za hostitelskou imunitní odpověď. Povrchové antigeny jsou převážně plazmidového původu. Mezi nejdůležitější antigeny patří:

OspA, důležitý lipoprotein vnější buněčné membrány. Molekulová hmotnost tohoto proteinu činí 31 až 34 kDa podle toho, u kterého genomospecies se vyskytuje. (14)

Bylo popsáno 8 různých sérotypů tohoto antigenu. Vyšlo najevo, že sérotypy dobře korelují s klasifikací Bbsl. (15)

Protein OspA byl rovněž použit při vývoji vakcíny proti LB (16).

OspB, velikost a antigenní reaktivita tohoto proteinu je různá u různých genomospecies, podobně jako u OspA. Molekulová hmotnost proteinu je 34 až 35kDa. Protilátky proti OspB se tvoří až v pozdní fázi nemoci. (17)

OspC je důležitý protein o velikosti 20 až 25 kDa (15), který je převládajícím séroaktivním antigenem časného stádia infekce způsobené Bbsl (18). OspC je ve srovnání s OspA mnohem variabilnější, zejména u kmenů Bbss a *Borrelia afzelii*. (15)

OspD je lipopolysacharid s lytickým účinkem o velikosti 28 až 29 kDa.

OspE a **OspF**, stejně jako dříve zmíněné proteiny, vykazují antigenní reaktivitu. Jedná se o strukturní složky vnější membrány borelií, které byly identifikovány s různým stupněm exprese u jednotlivých izolátů a v závislosti na fázi životního cyklu borelií. (19)

1.11.2 Bičíkový antigen (flagellin FlaA a FlaB)

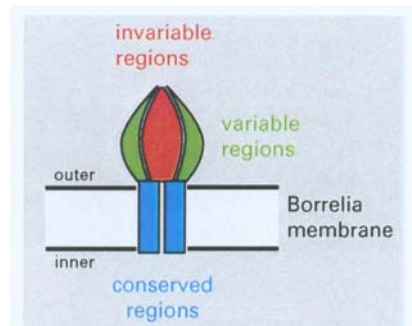
Bičíkový antigen flagellin patří mezi imunogenní proteiny. Bičík borelií je tvořen ze dvou proteinů – FlaA o molekulové hmotnosti 37 kDa a majoritní FlaB o molekulové hmotnosti 41 kDa. Mimo jiné FlaA spouští časnou IgM protilátkovou imunitní odpověď u pacientů s LB a může se využívat také jako marker v diagnostických sadách. (3)

1.11.3 Lipoproteiny p20 a p22

Lipoproteiny borrelií p20 a p22 byly identifikovány teprve v nedávné době jako strukturní jednotky receptoru pro dekorin a proteoglykan asociovaný na povrchu kolagenu. Spirochetální lipoproteiny jsou silnými induktory protizánětlivých cytokinů a chemokinů. (20)

1.11.4 VlsE

VlsE (variable major protein-like sequence, expressed = exprimovaná sekvence podobná jednotce hlavního variabilního proteinu) je charakterizovaný povrchový antigen Bbsl. Jeho význam pro sérologickou diagnostiku byl až donedávna přehlížen. VlsE hraje klíčovou roli ve strategii přežití borelie. Po vniknutí do



obrázek 7. VlsE na povrchu borelie (zdroj: www.dynex.cz)

hostitelského organismu borelie neustále mění svoje povrchově exprimované VlsE a touto cestou se snaží uniknout rozpoznání a eliminaci imunitním systémem. VlsE protein se dělí na několik částí: chráněné (conserved) části, které slouží jako transmembránové domény a kotva pro VlsE v bakteriální membráně, a dále na variabilní a konstantní oblasti. Variabilní části jsou nasměrovány ven a jsou neustále měněny rekombinací, čímž se zasahující imunitní systém setkává neustále s novými, pozměněnými antigenními epitopy. Konstantní oblasti jsou maskovány variabilními oblastmi a v žijících boreliích jsou tak chráněny od přímého zásahu imunitního systému. Jakmile je mrtvá bakterie borelie zpracována antigen prezentujícími buňkami, je také kompletní VlsE antigen prezentován imunitnímu systému a hostitelský organizmus tvoří protilátky proti konstantním a konzervovaným oblastem VlsE. Tyto protilátky nemohou reagovat s boreliemi *in vivo*, protože specifické epitopy jsou maskovány, ale jsou velmi vhodné pro diagnózu boreliózy, protože jsou zaměřeny proti vysoce konzervovaným cílovým antigenům. (21)

1.11.5 Membránový protein p66

Jedná se o protein, jehož funkce nebyla dlouhou dobu známa a patří mezi další studované antigeny.

Přehled antigenů je uveden v tabulce 1.

Tabulka 1. Přehled antigenů

ANTIGEN/OZNAČENÍ	VÝZNAM	SPECIFITA	FÁZE
83kDa (100kDa, 94kDa)	povrchový protein membránových vezikul	velmi vysoká	pozdní
75kDa, 66kDa	teplotní šok	žádná	časná/střední
60kDa(62kDa)	common antigen (GroEL)	žádná	časná/střední
58kDa	teplotní šok	žádná	střední
55kDa(56kDa)	P 55	nízká	pozdní
47kDa	teplotní šok	žádná	časná/střední
41kDa	flagellin	nízká	časná
39kDa	P 39 BmpA	velmi vysoká	všechny
37kDa	P 37	vysoká	všechny
34kDa	OspB	vysoká	pozdní
31kDa	OspA	vysoká	pozdní
28/28kDa	OspD	vysoká	střední
25kDa (21,22,23)	OspC	velmi vysoká	velmi časná
18kDa (21kDa)	P 18	vysoká	pozdní
5kDa	glykolipid	mírná	pozdní

1.12 DIAGNOSTIKA

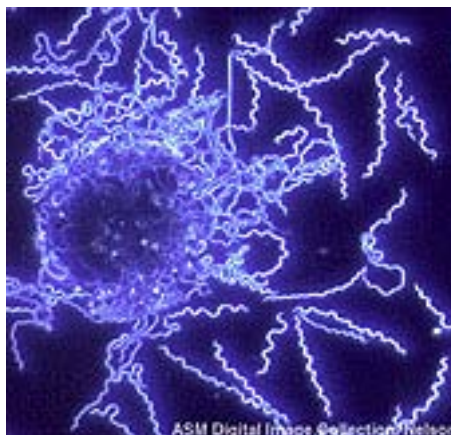
Průkaz onemocnění může být proveden přímou nebo nepřímou metodou. Mezi přímé metody patří mikroskopie, kultivace a průkaz specifické deoxyribonukleové kyseliny pomocí PCR (polymerase chain reaction = polymerázová řetězová reakce). Nepřímé metody zahrnují průkaz specifických i nespecifických diagnosticky prokazatelných protilátek v tělních tekutinách metodou IFA (imunofluoroanalýza), ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) a WB (Western blot). Diagnostice jsou také k dispozici kombinované techniky – imunosorbční elektronová mikroskopie, imunofluorescenční mikroskopie, mikroskopický aglutinační test.

Druh odebraného materiálu určeného k laboratorní diagnostice závisí na typu postižení a lokalizaci, které může infekční agens Bbsl vyvolat. Mezi nejčastěji vyšetřovaný materiál patří:

- sérum
- likvor – mozkomíšní mok
- synoviální tekutina
- moč
- kožní biopsie
- oční sklivec

1.12.1 METODY PŘÍMÉ

Přímá metoda je v zásadě ideální způsob. Najde-li se v organismu původce onemocnění nebo nějaká jeho část, nemůže být o správné diagnóze pochyb. Pro přímou metodu je však zapotřebí takový vyšetřovací



materiál, který původce obsahuje. V mnoha případech je jeho získání obtížné, zvláště

obrázek 8. *Borrelia burgdorferi* (zdroj: <http://www.textbookofbacteriology.net/Lyme.html>)

tehdy, když se původce skrývá nebo je na zcela nepřístupných místech, takže tím znemožňuje přímý průkaz, anebo je příliš nákladné prokázat jeho přítomnost.

Světelná mikroskopie v zástině

Lze ji použít k rychlému průkazu spirochét v klíštěti. Pomocí této metody se hodnotí infikovanost klíšťat v různých vývojových stádiích, v různých lokalitách a možné riziko pro lidi, zvláště v rekreačních oblastech.

Kultivační metoda

Umožňuje přímou detekci *Borrelia burgdorferi*. Borelie rostou ve vysoce obohacené komplexní Barbour-Stoner-Kellyho půdě (BSK). Generační doba růstu trvá asi 12-18 hodin. Kultivace prokazuje živé borelie v organismu. Provádí se k potvrzení diagnózy a k retrospektivnímu ověření proběhlé infekce. Kultivačně lze prokázat perzistenci infekce v kožních lézích a diseminaci Bbsl do orgánů několik týdnů až roků po infekci.

Histologická metoda

Hodnotí se roztěry po obarvení dle Giemsy, toluidinovou modří nebo stříbřením s 1% dusičnanem stříbrným po natrávení amylázou. Přímý průkaz je specifický pouze při použití monoklonálních protilátek proti povrchovým antigenům.

Elektronoptický průkaz (ISEM)

Průkaz je založen na zhodnocení morfologie borelie a na imunocytochemické reakci antigenu s monoklonální protilátkou. Tato metoda je jednoznačným průkazem infekce i u séronegativních pacientů.

Technika DNA-hybridizace

Metoda je založena na přímé detekci nukleových kyselin Bb. Jde o vazbu uměle zhotovené próby, většinou klonované DNA Bb, značené radioaktivním izotopem, a známou sekvencí DNA Bbsl. Metoda byla adaptována na průkaz RNA mikroba, která se vyskytuje ve větším počtu kopií. (22)

Metoda polymerázové řetězové reakce (PCR)

Velmi citlivá metoda, která dokáže hodnotit i méně než 10 borelií ve vzorku. Je založena na cyklickém zmnožování cílové DNA. PCR je nejrozšířenější způsob amplifikace. Enzymová amplifikace DNA probíhá v termocykleru ve třech teplotních fázích, které se opakují podle potřeby. Prvním fází je denaturace dvouvláknové DNA na dvě jednovláknové matricové molekuly při 95°C. Následuje annealing - ochlazení na 50 - 55°C, kdy se na oba konce jednovláknové DNA připojí komplementární oligonukleotidové sondy – primery. Poslední fází je elongace. Dochází k připojení volných oligonukleotidů z reakční směsi (dle komplementarity bazí) termostabilní DNA-polymerázou při 72°C. Jeden cyklus v termocykleru trvá 40s a pro vizualizaci se vyžaduje při 85% účinnosti amplifikace 42-45 cyklů, což trvá v optimálním případě 30 minut. Namnožené úseky jsou již kvantitativně dostatečné pro průkaz gelovou elektroforézou v agaróze po obarvení ethidiumbromidem. V termocykleru lze paralelně amplifikovat řadu vzorků. (23)

Nově zavedená metoda PCR v reálném čase pomocí LightCycleru, umožňuje kvantifikaci DNA ve vzorku a detekci DNA bakterie pomocí specifické teploty tání v reakci se značenými hybridizačními sondami. Pomocí této metody byla zjištěna prevalence různých druhů borelie v klíšťatech v různých regionech, u různých druhů zvířat a u pacientů v závislosti na klinických symptomech. (24)

Přímý průkaz borélií kultivací má nízkou senzitivitu a je časově i finančně náročný. Z těchto důvodů nedovoluje uplatnění v běžné praxi. Detekce nukleové kyseliny spirochéty v biologickém materiálu je jednou z mála možností, jak zlepšit laboratorní diagnostiku LB. Jedním z prvních pokusů o klinickou aplikaci polymerázové řetězové reakce (PCR) byl právě průkaz *Borrelia burgdorferi sensu lato*. (25)

Od té doby byla publikována řada prací, které využívají metodiku PCR na průkaz borelií v biologickém materiálu. Studie se mezi sebou liší způsobem izolace DNA, výběrem použití primerů i vlastním postupem. Optimální průběh PCR by měl být snadno proveditelný, měl by být použitelný pro všechny pacienty s LB a měl by být schopen detekovat všechny patogenní druhy a kmeny se stejnou citlivostí. Pro PCR diagnostiku LB nebyl standardizován komerční diagnostický set. (22)

PCR a WB jsou vhodné metody pro testování synoviální tekutiny a jsou doporučovány pro průkaz lymeské artritidy.

PCR a ISEM jsou metody doporučené k testování mozkomíšního moku pacientů se suspektní neuroboreliózou, zvláště když jsou protilátky negativní.

Je prokázáno, že specifická DNA Bbsl může být detekována v moči pacientů s LB. Toto by mohlo být použito pro diagnostiku LB, popřípadě i na monitorování účinku antibiotické léčby. Zjištění DNA Bbsl v plazmě, moči a v moku během léčby nebo krátce po ní lze vysvětlit velkou senzitivitou PCR metody i vzrůstajícím počtem mrtvých spirochét, uvolněných z buněk účinkem antibiotik. (26)

Ve výběru vhodného biologického materiálu leží první kritický bod celé DNA diagnostiky. Biopsie z tkání, o nichž se předpokládá, že by zde Bb mohla perzistovat (kromě kůže), nejsou běžně dostupné. Přítomnost borelií v periferní krvi je extrémně nízká a tak i průkaz boreliové DNA má, na rozdíl od jiných infekcí, velice nízkou senzitivitu. Mozkomíšní mok, synoviální tekutina a moč tak představují prakticky jediné klinicky dostupné materiály, přičemž dosud publikované výsledky PCR detekcí u LB naznačují, že moč je jako vstupní biologický materiál nejprůkaznější. V moči lze prokázat přítomnost specifické nukleové kyseliny.

Nevýhodou všech PCR je však snadná kontaminace materiálu jinou DNA, dále značná finanční i manuální náročnost, což snižuje možnost využití metody pro rutinní klinickou diagnostiku. (22)

1.12.2 METODY NEPŘÍMÉ

Základní princip těchto diagnostických postupů je průkaz specifických protilátek. Předpokladem je dostatečné množství protilátek tvořených imunitním systémem, ze kterých se dá vyvodit, zda organismus přišel do styku s příslušnou infekcí. Mnohé infekce totiž proběhnou klinicky nepozorovány a proto je stanovení protilátek jedinou možností volby. Z toho vyplývá, že při sérologické diagnostice mohou nastat potíže s interpretací, neboť například prokázané specifické protilátky nemusí bezpodmínečně souviset se stávajícími klinickými příznaky. Navíc je nutné pečlivé zhodnocení výsledků, protože borelie nesou mimo jiné i např. bičíkové antigeny (flagelin), které mají společné s jinými bakteriemi.

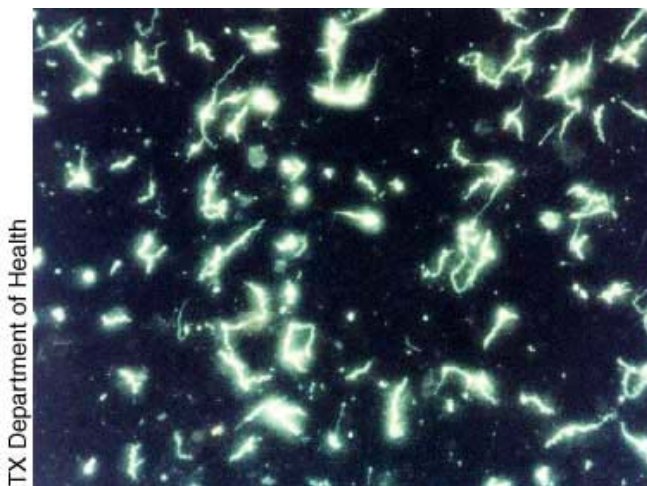
Obvykle se doporučuje dvoustupňové stanovení protilátek. K tomu používáme dva typy vyšetření – ELISA (první krok) a Western blot (druhý krok).

NEPŘÍMÁ IMUNOFLUORESCENCE

IFA (imunofluorescence) - používá se k průkazu protilátek třídy IgM a IgG v krevním séru, vzácně v mozkomíšním moku a synoviální tekutině.

Používají se jak celobuněčné, tak izolované antigeny. IFA má nižší senzitivitu a specifitu než

ELISA. Metoda je nevhodná pro screeningový test (vyšetřování, zmapování). (13)



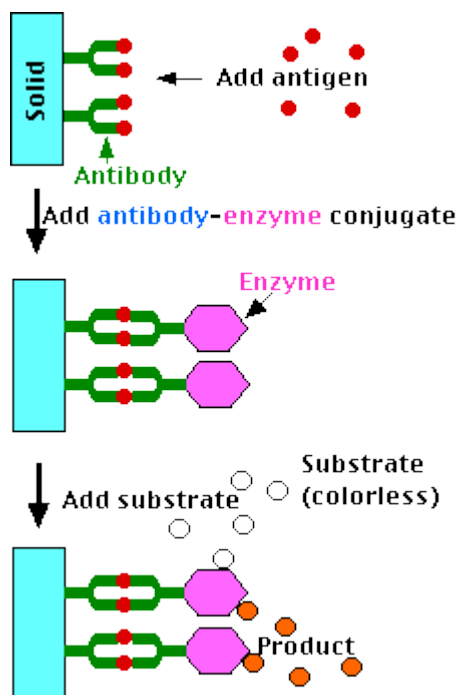
obrázek 9. Pozitivní IFA (zdroj: http://www.lyme.org/gallery/b_burgdorferi.html)

NEPŘÍMÁ HEMAGLUTINACE

Testovací metoda je založena na principu nepřímé hemaglutinace. Ovčí erythrocyty senzibilizované taninem a fixované glutaraldehydem slouží jako nosiči pro purifikované antigeny *Borrelia burgdorferi sensu lato* (*Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii*, *B. afzelii*). Protilátky pacienta s Bbsl aglutinují specificky testovací erythrocyty.

Nesenzibilizované kontrolní erythrocyty, které jsou součástí testovací soupravy, se specifickými protilátkami proti Bbsl nereagují a slouží k průkazu spontánní aglutinace ovčích erythrocytů. Pozitivní kontrola obsažená v testovací soupravě slouží ke kontrole aglutinačních schopností testovacích erythrocytů.
(27)

ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay)



obrázek 10. ELISA (zdroj: <http://www.elisaassay.com/sandwich-elisa-assay/>)

prokazované protilátky.

Principem testu je reakce specifických protilátek s příslušným antigenem. V prvním kroku reakce probíhá inkubace zředěného patientského séra, plazmy nebo likvoru. V případě přítomnosti protilátek v séru, dochází k jejich navázání na antigen. Následuje promytí a aplikace konjugátu (protilátky proti lidským IgG a IgM protilátkám s navázaným enzymem) po následné inkubaci a promytí (odstranění nenavázaného konjugátu) se provádí aplikace substrátu značeného nejčastěji křenovou peroxidázou. Pozitivní reakce se projeví změnou barvy substrátu. Výsledné zbarvení je přímo úměrné množství

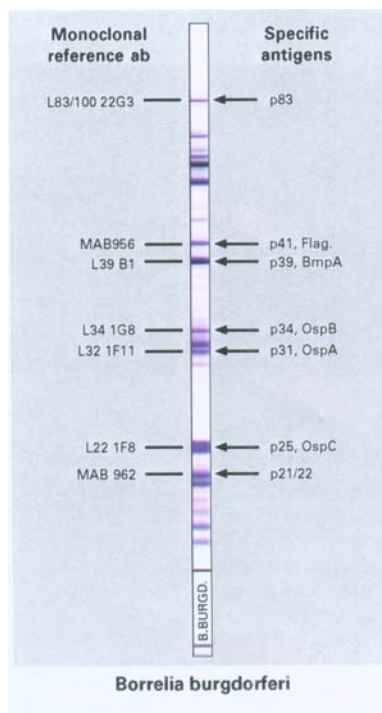
Konečný výsledek metody je vyhodnocen spektrofotometricky při určité vlnové délce (získáme absorbanci známých kontrol a absorbanci testovaných vzorků).

Je to jednoznačně nejčastěji používaná metoda průkazu LB. Její výhodou oproti nepřímé imunofluorescenci je nejen vyšší senzitivita a specificita, ale i lepší reprodukovatelnost. Jednoznačným výstupem je hodnocení ve škále: pozitivní - hraniční - negativní. Kvantitativní určení obsahu protilátek považujeme za orientační. Výsledky ELISA testu jsou interpretovány ve vztahu k velké skupině normálních sér a stupeň reaktivity u těchto kontrol definuje jako CO (Cut off = horní hranice normálních hodnot). Hodnota je doporučená výrobcem.

Při pozitivním ELISA testu (nebo při pozitivní imunofluorescenční metodě) je vhodné provést confirmaci Western blotem.

Pro zlepšení specificity těchto reakcí se používají rekombinantní antigeny, které mají naopak nižší citlivost. (28, 29)

WESTERN BLOT



obrázek 11. WB (zdroj: www.dynex.cz)

WB umožňuje sérologické určení protilátek proti lidským patogenním druhům borelie. Jedná se o vyčištěné, biochemicky charakterizované antigeny nanesené na definovaná místa membrány.

Jsou dvě možnosti přípravy blotů. Klasické WB systémy používají nativní antigeny poskytující kompletní spektrum antigenu kultivovaných buněk, tkání, či infekčních agens, kdy jednotlivé proteiny jsou elektroforeticky rozděleny podle velikosti. Avšak velké množství antigenů na prouzcích membrány znesnadňuje vyhodnocení membrány, protože jednotlivé antigeny leží často velmi blízko sebe. Tento problém lze do značné míry odstranit směsí rekombinantních antigenů – rekombinantní

VisE, a směsí rekombinantních antigenů (P83/100, p39, p41, OspC, Osp17, p58). Například firmy EUROIMMUN – anti borrelia Euroline - Wb. Kombinováním různých elementů v sekvencích DNA ve variabilních a konstantních oblastech vzniká až nekonečný počet různých povrchových proteinů. DNA využívající se pro syntézu proteinů se nazývá VisE (E = exprimovaná) a je exprimována výlučně *in vivo*. Nevýhodou použití směsi rekombinantních antigenů je dosažení nižší citlivosti, zvláště u časných infekcí. Nejsou proto ke stanovení boreliózy doporučovány. Jednotlivé rekombinantní antigeny však mohou doplňovat WB.

WB slouží k průkazu úzce specifické protilátkové odpovědi, která umožňuje stanovení jednotlivých antigenů o různé molekulové hmotnosti, například 41 nebo 34 kDa, na principu reakce s příslušnou protilátkou. Reakce protilátek s antigenem je ovšem závislá na typu borelie, která infekci vyvolala, což je logicky limitem této metody z hlediska senzitivity a specifity. WB by měl být rezervován pro případy klinicky vysoce suspektní LB, kde sérologické hodnoty (ELISA) jsou hraniční nebo pozitivní, resp. jako metoda confirmující.

Protilátková odpověď na Bbsl je vcelku dobře známa. Obecně platí, že vrchol tvorby protilátek typu IgM je mezi 3. - 8. týdnem od začátku infekce. Typické je, že specifické protilátky IgM postupně klesají u většiny nemocných. U části z nich však mohou přetrvávat po celou dobu nemoci. Na počátku LB je tvorba obou typů protilátek zprostředkována bičíkovým antigenem 41kDa (flagelin). Bohužel tento antigen není druhově specifický. Protilátková odpověď rozpoznaná později je individuálně různá a nelze ji odhadnout. Spektrum specifických protilátek tvořících se proti jednotlivým antigenům časem vzrůstá. Reakce na protilátky typu IgG (produkované v pozdní fázi) jsou obvykle chápány jako znak prodělaného onemocnění. Nejčastěji jsou sérologická vyšetření negativní, jestliže vzorek krve je odebrán v časném stádiu onemocnění. (30, 31, 32)

1.13 FALEŠNÁ POZITIVITA

V řadě případů se setkáváme s falešnou pozitivitou. Nemocní s různými chorobami spirochetálního původu a bez vztahu ke klinickým okolnostem, ale rovněž ženy v průběhu gravidity, dávají falešně pozitivní výsledky. Podobně může ovlivňovat výsledek i koincidence s přítomností revmatoidního faktoru nebo antinukleárních protilátek, systémového *lupus erythematoses*, sklerodermie či EBV infekce.

Orientaci komplikuje rovněž skutečnost, že vysokou pozitivitu sérologických testů prokazujeme často u lidí, kteří klinické projevy LB nikdy neměli.

Další obtíže komplikující aplikaci sérologických testů je výrazná variabilita výsledků různých laboratoří. Ze zkušeností vyplývá, že monitorování IgG protilátek má jen malou výpovědní hodnotu při posuzování efektivity antibiotické léčby, stejně jako není spolehlivým kritériem pro odhad přetrvávání nebo reaktivace infekce. Na selhání laboratorní diagnostiky se může podílet řada faktorů či okolností, především:

- infekce vyvolaná jinou genomickou skupinou *Borrelia burgdorferi*
- inaparentní infekce
- reinfekce
- doba trvání infekce
- stadium onemocnění
- léčba antibiotiky
- imunitní stav
- věk
- jiné základní onemocnění
- koinfekce
- infekce herpetickými viry

Při interpretaci sérologických testů je třeba respektovat následující skutečnosti:

- a) sérologický test může být negativní, byla-li krev odebrána příliš brzy (nedošlo k vytvoření protilátek)
- b) negativní výsledek s klinickou diagnózou LB může být způsoben podáním antibiotika na počátku onemocnění
- c) negativní výsledek nevylučuje onemocnění LB
- d) druhý odběr krevního vzorku by neměl následovat dříve než za 4-6 týdnů po prvním
- e) při konvenčním diagnostickém postupu by měl sérologický nález
 - vykazovat vyšší titr protilátek
 - vykazovat vzestup těchto protilátek ve dvou oddělených vzorcích krve získaných v odstupu několika týdnů a analyzovaných ve stejné laboratoři
 - pozitivní průkaz antiboreliových protilátek nemůže být hodnocen odděleně, bez znalosti epidemiologické anamnézy, klinických projevů suspektní LB a po vyloučení jejich jiné etiologie
 - výška titrů neodpovídá závažnosti ani aktivitě onemocnění (33)

1.14 VLIV EBV A MOŽNÉ ZKŘÍŽENÉ REAKCE PŘI LABORATORNÍ DIAGNOSTICE

Vlivem patogenního působení *Borrelia burgdorferi sensu lato* je oslabený organismus náchylný k reaktivaci virů čeledi *Herpesviridae*, jak bylo prokázáno experimentálně i v klinických vzorcích přímým a nepřímým průkazem.

Indukce lytického cyklu EBV v lymfoblastoidních buňkách vlivem působení virulentního kmene *Borrelia garinii* bylo vyšší než při působení avirulentního kmene *Borrelia afzelii* a mnohonásobně vyšší než v kontrolních slepě infikovaných kulturách. Účinek na EBV reaktivaci má i samotné médium (BSK-H), v němž byla *Borrelia garinii* pomnožena.

Společné syndromy u lymeské borreliózy a herpetické infekce prokázané sérologicky a přímým průkazem byly: kraniální neuritida s parézou n. facialis, Bannwarthův syndrom, polyradikulitida, meningitida, progredientní encefalomyelitida a únavový syndrom.

Specifické antigeny *Borrelia burgdorferi sensu lato* a antigeny EBV neposkytují zkřížené reakce, jak bylo prokázáno ve WB s monoklonálními protilátkami proti borelii a proti EBV. Nespecifické antigeny teplotního šoku (HsP) a antigeny bičků borelie mohou poskytovat nespecifické reakce v ELISA IgM a IgG testech při různých bakteriálních a virových infekcích, kterým je možno zabránit vysycováním vzorků revmatoidním faktorem, sorbentem nebo samotným antigenem borelií.

Reakce protilátek s hlavními povrchovými antigeny OspA a OspB borelií je úzce specifická, jak ukázaly testy s rekombinantními antigeny v ELISA po vysycení, ale ovlivněná heterogenitou genodruhů borelií a variabilitou jejich antigenů.

Infekce borelie a EBV může postihnout pacienty s jinou předchozí diagnózou, např. s roztroušenou sklerózou a při onkologických problémech. Vlivem imunosupresivní léčby mohou mít sekundární bakteriální a virové infekce těžší chronizující průběh. Sekundární infekce lze prokázat pouze přímými metodami ISEM a PCR. Sérologie ELISA vlivem časté promořenosti lidí herpetickými viry bývá neprůkazná. (34)

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Porovnávání ELISA metody českého výrobce TEST-LINE s.r.o. s německým výrobcem EIROIMMUN. Potvrzení positivity je confirmováno metodou Western blot německé firmy EUROIMMUN. Při stanovení jsou používány soupravy se směsnými antigeny *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia afzelii* a *Borrelia garinii*. Výsledky porovnání jsou uvedeny procentuálně v závěru práce.

2.1 SOUBOR VZORKŮ

Výběr vzorků byl proveden na základě positivity ELISA testu firmy EUROIMMUN buď u IgG nebo IgM protilátek. Vzorky poskytlo Oddělení klinické biochemie a hematologie, Synlab – OKBH Kartouzská s.r.o., Praha 5. Vzorky byly shromažďovány jeden měsíc a podle zásad Správné laboratorní práce zmraženy na -20°C a za týden společně analyzovány.

2.2 ELISA (enzyme linked immuno sorbent assay)

Princip testu je založen na detekci antiboreliových IgG nebo IgM protilátek v lidském séru, plazmě, mozkomíšním moku nebo synoviální tekutině metodou EIA, typ sandwich, tj. pevná fáze – antigen – protilátka – značená protilátka. Pro detekci protilátek je použit sonifikovaný celobuněčný směsný antigen vybraných kmenů borelie. Značenou protilátkou bývá prasečí imunoglobulinová frakce proti lidskému IgG nebo IgM konjugovaná křenovou peroxidázou. Stanovení peroxidázové aktivity se provádí pomocí substrátu s TMB. Pozitivita se projevuje zbarvením reakční směsi a jeho intenzita se měří fotometricky (pro Bbsl při vlnové délce 450nm).

2.3 HODNOCENÍ VÝSLEDKŮ A INTERPRETACE

Hodnocení a interpretace výsledků jsou uvedeny v tabulce 2 a 3.

Výpočet indexu pozitivity (IP):

dělení absorbance testovacího vzorku průměrnou absorbancí CUT-OFF naměřenou v téže sérii vyšetření

$$IP = \frac{\text{absorbance (vzorku)}}{\text{průměrná absorbance (CUT - OFF)}}$$

Tabulka 2. Interpretace výsledků

INDEX POZITIVITY IP	HODNOCENÍ
Nižší než 0,9	Negativní
0,9 až 1,0	Hraniční
Vyšší než 1,0	Pozitivní

Tabulka 3. Hodnocení výsledků ELISA testů

IgG – IgM +	- Nízké hodnoty IgM mohou být způsobeny i zkříženou reakcí s autoantigeny (není to aktivní proces) - Pozitivní reakce je příznakem primoinfekce
IgG + IgM –	- Anamnestické protilátky - Případně chronický stav onemocnění
IgG + IgM +	- Doznívání akutní fáze - Reaktivace procesu

2.4 ELISA TEST-LINE

Imunoenzymatická souprava pro stanovení IgG a IgM protilátek proti *Borrelia burgdorferi sensu lato* v lidském séru. Prováděno bylo současně ELISA stanovení pomocí rekombinantního antigenu IgM.

Informace o použitém antigenu a pracovní postup jsou uváděny výrobcem.

Použitý antigen

Použitý antigen zahrnuje antigeny všech hlavních patogenních kmenů borelií. Byl připraven kultivací *Borrelia garinii*, *Borrelia afzelii* a *Borrelia burgdorferi sensu stricto*. Vybrané kmeny jsou charakteristické obsahem heterogenních izoform povrchových antigenů OspA, OspC a vnějšího extracelulárního antigenu p83-100, lišících se antigenní strukturou i molekulovou hmotností. Tento výběr zaručuje optimální pokrytí patogenních kmenů borelií. (35)

Pomůcky a reagenty

Vzorky, mikrotitrační destičky s navázanými směsi antigenů Bbsl., kalibrační séra, pozitivní kontrola, negativní kontrola, enzymový konjugát, promývací pufr, ředící roztok, TMB-Complete (substrát), zastavovací roztok, jedno a vícekanálové pipety na 10-100 μ l, zkumavky pro ředění vzorků, jednorázové špičky na pipetu, víčka na destičky, stopky, vlhká komůrka, termostat na 37°C,

Pracovní postup

Všechny reagenty se vytemperují na laboratorní teplotu.

Příprava vzorků séra nebo plazmy:

Vzorky séra nebo plazmy se ředí ředícím roztokem v poměru 1:100. (Kalibrační a kontrolní séra jsou předem naředěna a připravena k použití.)

Inkubace vzorků:

Pipetuje se 100 µl kalibračního séra, pozitivní kontroly nebo zředěného séra pacienta do jednotlivých jamek podle pipetovacího protokolu. Inkubuje se 30min ve vlhké komůrce při 37°C v termostatu.

Promývání:

Vyprázdní se jamky a čtyřikrát je promyjí vždy nejméně 200µl naředěného pufru (podle pokynů výrobce).

Inkubace konjugátu:

Pipetuje se 100µl konjugátu do každé jamky. Inkubuje se 30min ve vlhké komůrce při 37°C v termostatu.

Promývání:

Vyprázdní se jamky a pětkrát se promyjí vždy nejméně 200µl naředěného pufru.

Inkubace substrátu:

Pipetuje se 100µl roztoku substrátu do každé jamky. Inkubuje se 15min ve vlhké komůrce při 37°C v termostatu a v temnu.

Zastavení reakce:

Pipetuje se 100µl zastavovacího roztoku do každé jamky ve stejném pořadí a stejnou rychlostí jako roztok substrátu.

Měření:

Fotometrické měření intenzity zabarvení se provádí při vlnové délce 450nm do 10ti minut po přidání zastavovacího roztoku fotometrem MRX II Revelation firmy DYNEX s.r.o.

Validita testu

Q.C. rovnice = quality control rovnice

CO = cutt off hodnota

= horní hranice normálních hodnot doporučená výrobcem

NC = negativní hodnota

PC = pozitivní kontrola

Test je platný, jestliže:

1. absorbance blanku je nižší než 0,150.
2. absorbance negativní kontroly je nižší než polovina průměru absorbance CO.
 $NK < \text{průměrná absorbance CO} / 2$
3. průměrná absorbance CO je v rozmezí 0,250 – 0,850
 $0,250 < \text{průměrná absorbance CO} < 0,850$
4. absorbance pozitivní kontroly je větší než dvojnásobek průměrné absorbance CO.
 $PK > 2 \times \text{průměrná absorbance CO}$

Hodnoty se uvádí u každého měření. Pro správné provedení analýzy musí Q.C. rovnice splňovat tyto podmínky:

1. blank < 0,150
2. $0,9 > CO > 0,25$
3. $CO > NC \cdot 2$
4. $PC > 2 \cdot CO$

2.4.1 Stanovení EIA Borrelia IgG firmy TEST-LINE s.r.o.(=TL).

Hodnoty absorbancí a IP jsou uvedeny v tabulce 4.

Validita testu -Q.C.rovnice:

1. blank < 0,150

2. $0,9 > CO > 0,25$ $0,850 > 0,661 > 0,250$

3. $CO > NC * 2$ $0,661 > 0,164$

4. $PC > 2 * CO$ $2,151 > 1,322$

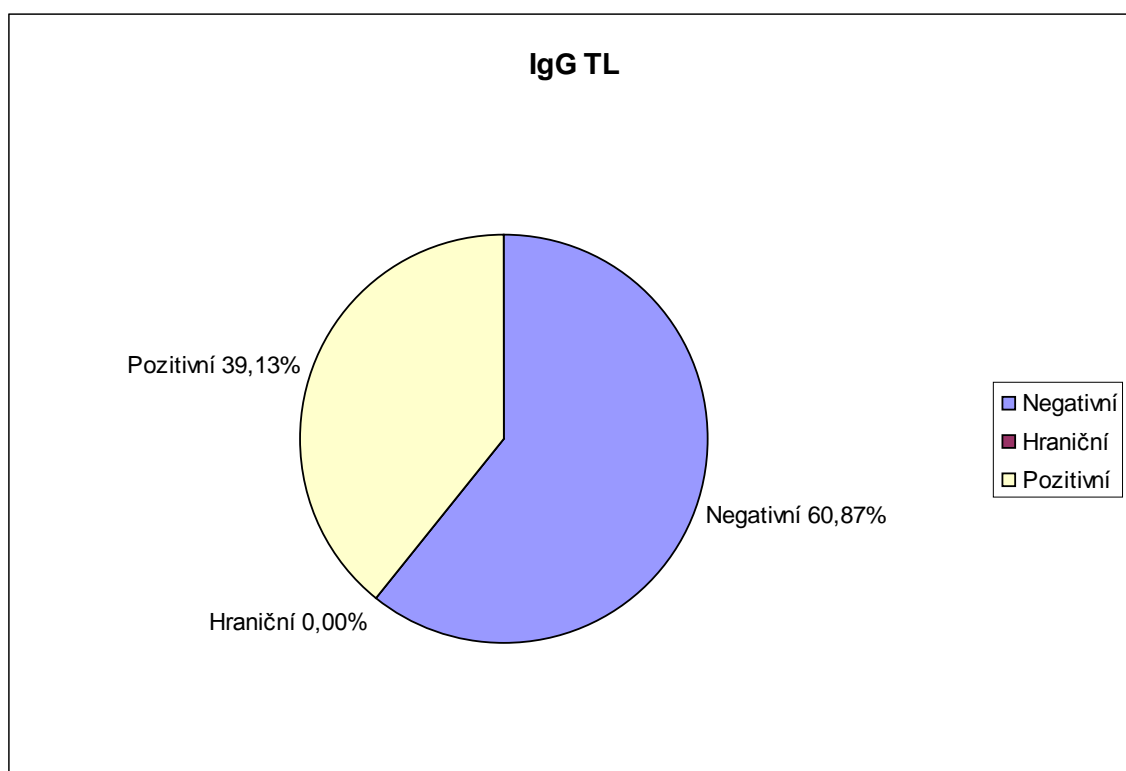
Tabulka 4. ELISA IgG (TL)

identifikace, číslo vzorku	absorbance	index pozitivity	pozitivní/negativní
blank			
NK	0,08	0,12	
CO (1.)	0,65	0,99	
CO (2.)	0,66	1,00	
CO (3.)	0,67	1,01	
PK	2,15	3,26	
1	1,03	1,56	+
2	2,07	3,13	+
3	0,50	0,75	-
4	0,53	0,80	-
5	0,40	0,58	-
6	0,27	0,40	-
7	0,41	0,62	-
8	0,48	0,72	-
9	0,44	0,66	-
10	0,35	0,53	-
11	1,43	2,17	+
12	1,25	1,90	+
13	1,53	2,31	+
14	0,29	0,43	-
15	0,73	1,11	+
16	0,16	0,24	-
17	0,93	1,41	+
18	0,21	0,32	-
19	0,25	0,38	-
20	0,43	0,66	-
21	2,08	3,15	+
22	0,10	0,15	-
23	2,24	3,38	+

Tabulka 5. Percentuelní vyjádření četnosti positivity IgG (TL)

	četnost	%
Negativní	14	60,87%
Hraniční	0	0,00%
Pozitivní	9	39,13%

Graf 1. Vyjádření četnosti positivity IgG (TL)



2.4.2 Stanovení EIA Borrelia IgM firmy TEST-LINE s.r.o. (=TL)

Hodnoty absorbancí a IP jsou uvedeny v tabulce 6.

Validita testu - Q.C.rovnice:

1. blank < 0,150

2. $0,9 > CO > 0,25$ $0,900 > 0,610 > 0,250$

3. $CO > NC * 2$ $0,610 > 0,224$

4. $PC > 2 * CO$ $1,303 > 1,221$

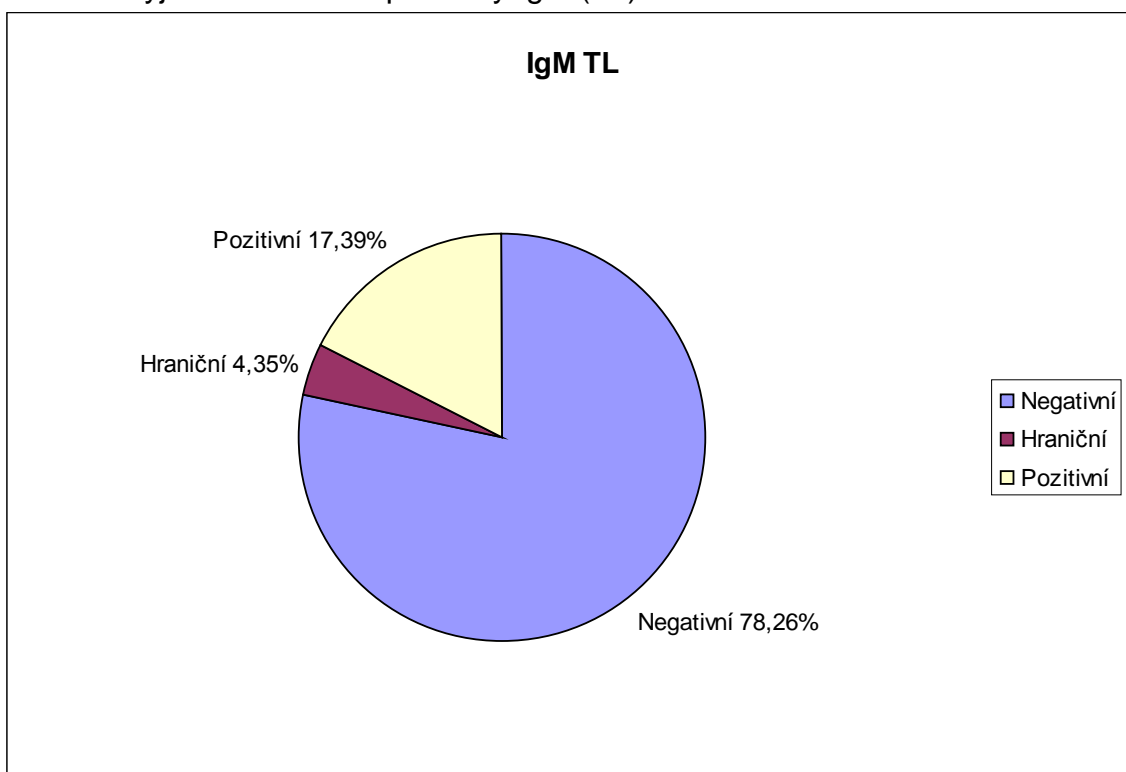
Tabulka 6. ELISA IgM (TL)

identifikace, číslo vzorku	absorbance	index pozitivity	pozitivní/negativní
blank			
NK	1,112	0,184	
CO (1.)	0,65	1,06	
CO (2.)	0,60	0,98	
CO (3.)	0,59	0,96	
PK	1,30	2,14	
1	0,36	0,60	-
2	0,15	0,24	-
3	0,26	0,43	-
4	0,41	0,67	-
5	0,90	1,83	+
6	0,62	1,01	+
7	0,19	0,31	-
8	0,39	0,64	-
9	0,22	0,36	-
10	0,36	0,59	-
11	0,24	0,40	-
12	0,52	0,85	-
13	0,32	0,52	-
14	0,61	1,00	hraniční
15	0,36	0,59	-
16	0,29	0,48	-
17	0,16	0,26	-
18	0,08	0,13	-
19	0,69	1,13	+
20	0,71	1,20	+
21	0,11	0,18	-
22	0,20	0,32	-
23	0,29	0,48	-

Tabulka 7. Percentuelní vyjádření četnosti positivity IgM (TL)

	četnost	%
Negativní	18	78,26%
Hraniční	1	4,35%
Pozitivní	4	17,39%

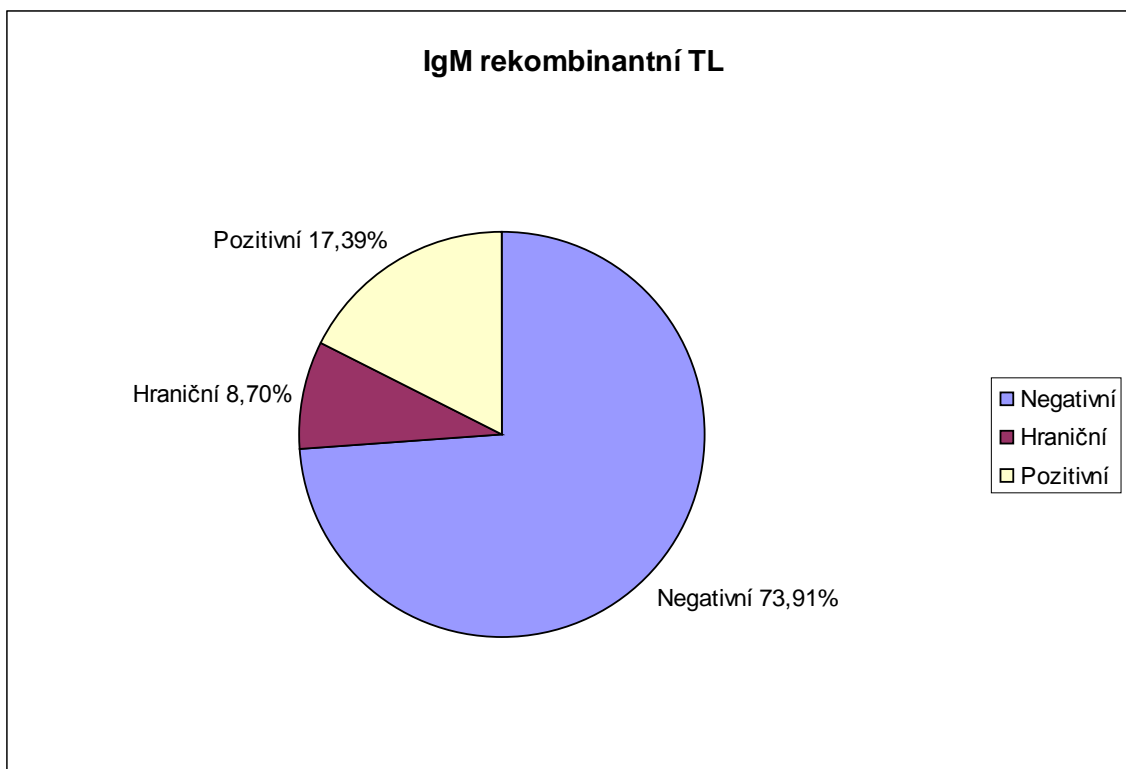
Graf 2. Vyjádření četnosti positivity IgM (TL)



Tabulka 9. Percentuelní vyjádření četnosti positivity IgM rekombinantní (TL)

	četnost	%
Negativní	17	73,91%
Hraniční	2	8,70%
Pozitivní	4	17,39%

Graf 3. Vyjádření četnosti positivity IgM rekombinantní (TL)



2.5 ELISA EUROIMMUN

Imunoenzymatická souprava pro stanovení IgG a IgM protilátek proti *B. burgdorferi sensu lato* v lidském séru.

Informace o použitém antigenu a pracovní postup jsou uváděny výrobcem.

Použitý antigen

Antigeny byly izolovány z obzvláště vhodných kmenů borelie (*Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia garinii* a *Borrelia afzelii*). Vykultivované kmeny byly solubilizovány pomocí sodium dodecyl sulfátu. Použitá směs antigen obsahuje všechny významné proteiny.(36)

Pomůcky a reagensie

Vzorky, mikrotitrační destičky s navázanými směsi antigenů Bb, kalibrační séra, pozitivní kontrola, negativní kontrola, enzymový konjugát, promývací pufr, vzorkový pufr, chromogen/substrát, stop roztok, jedno a vícekanálové pipety na 10-100 μ l, zkumavky pro ředění vzorků, jednorázové špičky na pipetu, víčka na destičky, stopky, vlhká komůrka

Pracovní postup:

Všechny reagensie se vytemperují na laboratorní teplotu.

Příprava vzorků séra nebo plazmy:

Vzorky séra nebo plazmy se ředí vzorkovým pufrem 1: 100. (Kalibrační a kontrolní séra jsou připravena k použití.)

Inkubace vzorků:

Pipetuje se 100 μ l kalibračního séra, pozitivní kontroly nebo zředěného séra pacienta do jednotlivých jamek podle pipetovacího protokolu a inkubuje se 30min při laboratorní teplotě.

Promývání:

Vyprázdní se jamky a třikrát je promyjí vždy nejméně 200 μ l naředěného pufru (podle pokynů výrobce).

Inkubace konjugátu:

Pipetuje se 100 μ l zředěného konjugátu do každé jamky. Inkubuje se 30min při laboratorní teplotě.

Promývání:

Vyprázdní se jamky a třikrát je promyjí vždy nejméně 200 μ l naředěného pufru.

Inkubace substrátu:

Pipetuje se 100 μ l roztoku chromogen/substrát do každé jamky. Inkubuje se 15 min ve tmě při laboratorní teplotě.

Zastavení reakce:

Pipetuje se 100 μ l zastavovacího roztoku do každé jamky ve stejném pořadí a stejnou rychlostí jako roztok chromogen/substrát.

Měření:

Fotometrické měření intenzity zabarvení se provádí při vlnové délce 450 nm (a referenční vlnové délce 630nm) do 30 minut po přidání zastavovacího roztoku fotometrem MRX II Revelation firmy DYNEX s.r.o.

Validita testu

Q.C. rovnice = quality control rovnice

CO = cutt off hodnota

= horní hranice normálních hodnot doporučená výrobcem

NC = negativní hodnota

PC = pozitivní kontrola

Test je platný, jestliže:

1. Horní hranice normálních hodnot (CUT-OFF hodnota), který doporučuje EUROIMMUN, je 20 RU/ml.
2. Hodnoty vyšší než horní hranice jsou hodnoceny jako pozitivní, hodnoty nižší jako negativní.
3. absorbance negativní kontroly je nižší než CO.
4. absorbance pozitivní kontroly je vyšší než CO.

Hodnoty se uvádí u každého měření a pro správné provedení analýzy musí Q.C. rovnice splňovat tyto podmínky:

PK > CO > NK

2.5.1 Stanovení EIA Borrelia IgG firmy EUROIMMUN (=EU).

Hodnoty absorbancí a IP jsou uvedeny v tabulce 10.

Validita testu - Q.C.rovnice:

PK > CO > NK

0,999 > 0,227 > 0,013

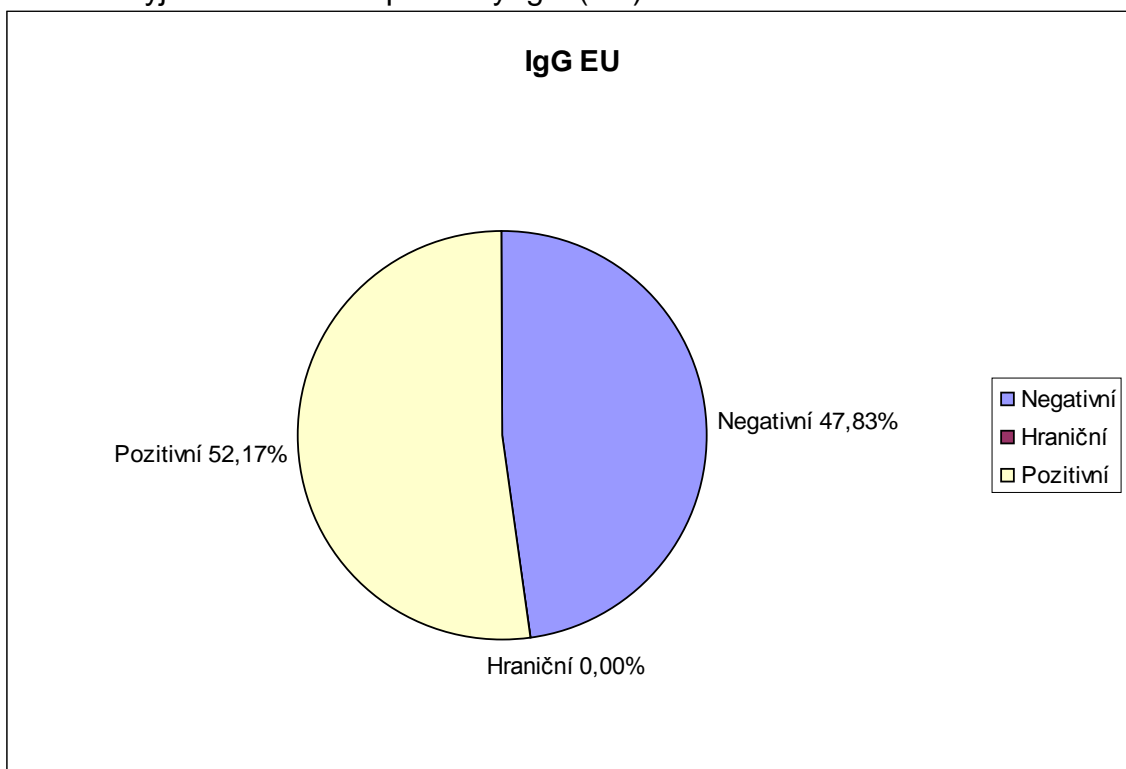
Tabulka 10. ELISA IgG (EU)

identifikace, číslo vzorku	absorbance	index positivity	pozitivní/negativní
blank			
NK	0,01	0,06	
CO (1.)	0,23	1,00	
PK	1,00	4,41	
1	0,40	1,72	+
2	1,41	6,11	+
3	0,28	1,20	+
4	0,35	1,41	+
5	0,05	0,31	-
6	0,08	0,53	-
7	0,07	0,43	-
8	0,32	0,37	-
9	0,38	1,47	+
10	0,04	0,19	-
11	0,82	3,30	+
12	0,94	4,15	+
13	1,46	6,50	+
14	0,08	0,34	-
15	0,39	1,94	+
16	0,03	0,15	-
17	0,51	2,62	+
18	0,97	0,63	-
19	0,02	0,16	-
20	0,06	0,45	-
21	0,41	2,67	+
22	0,05	0,34	-
23	1,49	6,70	+

Tabulka 11. Percentuelní vyjádření četnosti positivity IgG (EU)

	četnost	%
Negativní	11	47,83%
Hraniční	0	0,00%
Pozitivní	12	52,17%

Graf 4. Vyjádření četnosti positivity IgG (EU)



2.5.2 Stanovení EIA Borrelia IgM firmy EUROIMMUN (=EU).

Hodnoty absorbancí a IP jsou uvedeny v tabulce 12.

Validita testu - Q.C.rovnice:

PK > CO > NK 1,19 > 0,407 > 0,08

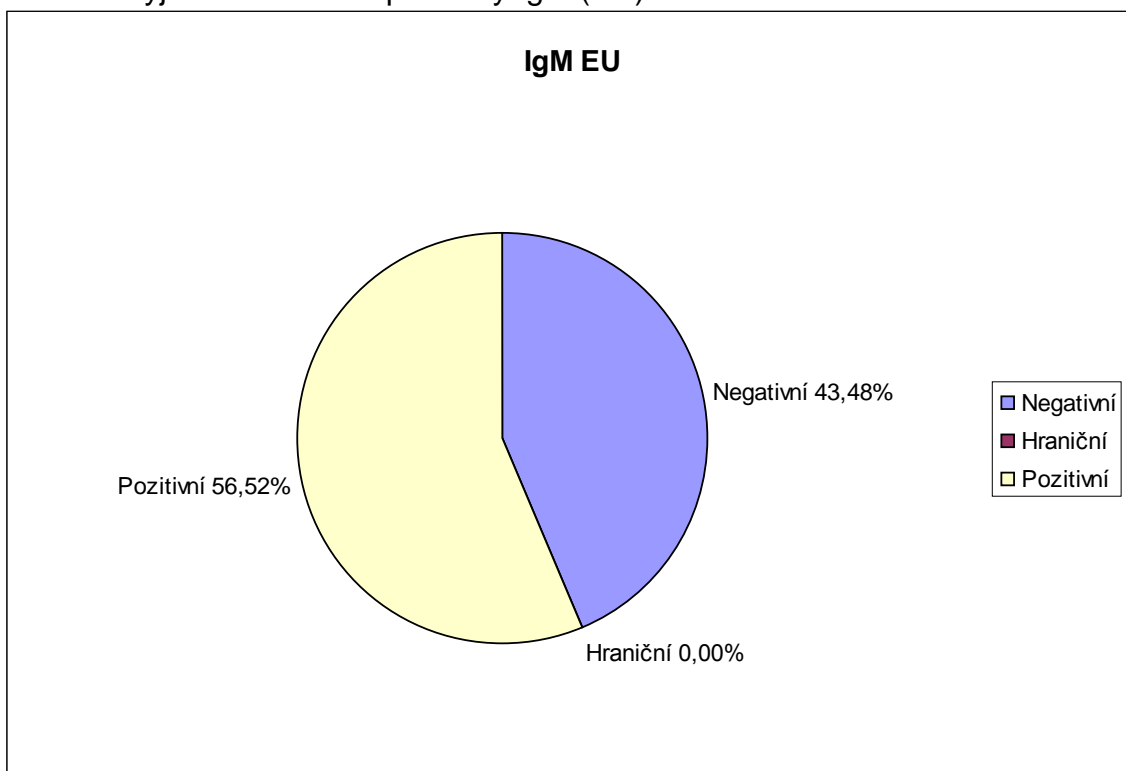
Tabulka 12. ELISA IgM (EU)

identifikace, číslo vzorku	absorbance	index positivity	pozitivní/negativní
blank			
NK	0,08	0,20	
CO (1.)	0,41	1,00	
PK	1,19	2,92	
1	0,08	0,22	-
2	0,79	2,13	+
3	0,06	0,17	-
4	0,18	0,62	-
5	0,42	1,46	+
6	1,59	5,50	+
7	0,39	1,10	+
8	0,40	1,20	+
9	0,20	0,54	-
10	0,40	1,20	+
11	0,17	0,45	-
12	0,21	0,52	-
13	0,35	0,81	-
14	0,89	2,20	+
15	1,11	2,50	+
16	0,60	1,90	+
17	0,12	0,29	-
18	0,42	1,40	+
19	0,41	1,36	+
20	0,47	1,64	+
21	0,08	0,28	-
22	0,41	1,38	+
23	0,22	0,75	-

Tabulka 13. Percentuelní vyjádření četnosti positivity IgM (EU)

	četnost	%
Negativní	10	43,48%
Hraniční	0	0,00%
Pozitivní	13	56,52%

Graf 5. Vyjádření četnosti positivity IgM (EU)



2.6 EUROIMMUN WESTERN BLOT

Konfirmace metodou WB se provádí při hraničním nebo pozitivním ELISA testu. WB je vhodné provést i u negativního ELISA testu a pozitivních klinických příznacích.

Antigen pro *Anti-Borrelia-burgdorferi-WESTERN BLOT* firmy EUROIMMUN je získán ze zvlášť vhodného kmene *Borrelia burgdorferi sensu lato*. Vykultivovaná borelie byla převedena do roztoku pomocí sodium dodecyl sulfátu. Rozpustné proteiny byly diskontinuální polyacrylamidovou gelovou elektroforézou rozděleny podle molekulové hmotnosti a přeneseny na nitrocelulózu.

Pomůcky a reagensie

Vzoroky, potažené testovací stripy, univerzální pufr, konjugát, roztok substrátu, destilovaná voda, zkumavky na ředění séra, automatická pipeta, kývavá třepačka

Pracovní postup

Příprava

Blotovací stripy se umístí do inkubačních kanálků obsahujících 1,5 ml univerzálního pufru, které se nechají 15min třepat při laboratorní teplotě.

Inkubace vzorku

Pufr se odsaje, pipetuje se 1,5 ml zředěného séra (1:51) do inkubačních kanálků, které se nechají 30 min tepat při laboratorní teplotě.

Promývání

Odsaje se sérum a promyje se 1,5ml univerzálním pufrem třikrát po pěti minutách v kývavé třepačce.

Inkubace s konjugátem

Odsaje se pufr a pipetuje se 1,5 ml konjugátu do inkubačních kanálků, nechá se 30min třepat při laboratorní teplotě.

Promývání

Odsaje se sérum a promyje se 1,5ml univerzálním pufrům třikrát po pěti minutách v kývavé třepačce.

Inkubace se substrátem

Odsaje se pufr, pipetuje se 1,5ml roztoku substrátu do inkubačních kanálků, nechá se 10min třepat při laboratorní teplotě.

Zastavení

Odsaje se pufr a kanálky se stripy se třikrát propláchnou destilovanou vodou.

Vizuální hodnocení a interpretace výsledků

Tabulka 14. Hodnocení výsledků WB

Kategorie	Antigeny
1	Zkříženě reagující a nedefinované antigeny s molekulovou hmotností 15 kDa, 17 kDa, 28 kDa, 32 kDa, 36 kDa, 43 kDa, 47 kDa, 50 kDa, 57 kDa, 59 kDa, 62 kDa a 75 kDa.
2	Rodově specifické antigeny s molekulovou hmotností 41 kDa (flagellin).
3	Druhově specifické a vysoce specifické antigeny s molekulovou hmotností 18 kDa, 21/22 kDa, 25 kDa, 31 kDa, 34 kDa, 39 kDa a 83 kDa.

Tabulka 15. Interpretace IgG protilátek

Výsledky	Charakteristika
Negativní	Žádné proužky nebo slabá reakce z kategorie 1 a 2.
Hraniční nebo suspektní	Jeden zřetelný proužek z kategorie 3 a několik zřetelných signálů z kategorie 1 a 2. Doporučujeme odebrat nový vzorek a test za několik týdnů zopakovat.
pozitivní	Více než jeden zřetelný proužek z kategorie 3. zejména v případě pacientů v pozdějším stadiu nemoci, můžeme nacházet více proužků z kategorie 1 a 2.

Tabulka 16. Interpretace IgM protilátek

Výsledky	Charakteristika
Negativní	žádné hodnotitelné antigenní proužky nebo slabá intenzita některých proužků z kategorie 1.
Hraniční nebo suspektní	Jeden antigenní proužek z kategorie 2 (flagellin, p 41). Doporučujeme po několika týdnech odebrat nový vzorek a test opakovat.
pozitivní	Alespoň jeden zřetelný proužek z kategorie 3.

Tabulka 17. Popis a rozdělení jednotlivých antigenů.

Molekulová váha	Antigen	Specifická
<u>p83 kDa</u>	Membránový, vezikulární	Vysoce specifický (degradační produkt p100)
p75 kDa	Proteiny teplotního šoku	Nespecifický
p62 kDa	Membránový Proteiny teplotního šoku	Nespecifický
p57/59 kDa		Nespecifický (časná fáze infekce)
p50 kDa		Nespecifický
p47 kDa		Pravděpodobně genově specifický
p43 kDa		Nespecifický
p41 kDa	flagellin	Rodově specifický
<u>p39 kDa</u>		Vysoce specifický
p36 kDa		Specifita nejistá
<u>p34 kDa</u>	Osp B	Zevní povrchový protein B Vysoce specifický
p32 kDa		Rodově specifický
<u>p31 kDa</u>	Osp A	Zevní povrchový protein A Vysoce specifický

p29 kDa		Pravděpodobně specifický
p28 kDa		Nespecifický
<u>p25 kDa</u>	Osp C	Zevní povrchový protein C Vysoce specifický
<u>p21/22 kDa</u>	Osp C	Část komplexu Osp C Vysoce specifický
p18 kDa		Pravděpodobně specifický
p17 kDa		Nedefinovaný
VisE		Vysoce specifický

Stanovení bylo provedeno testovací soupravou Systémy pro stanovení boreliózy Western blotem IgG a Systémy pro stanovení boreliózy Western blotem IgM firmy EUROIMMUN.

Tabulka 18. Výsledky confirmace WB

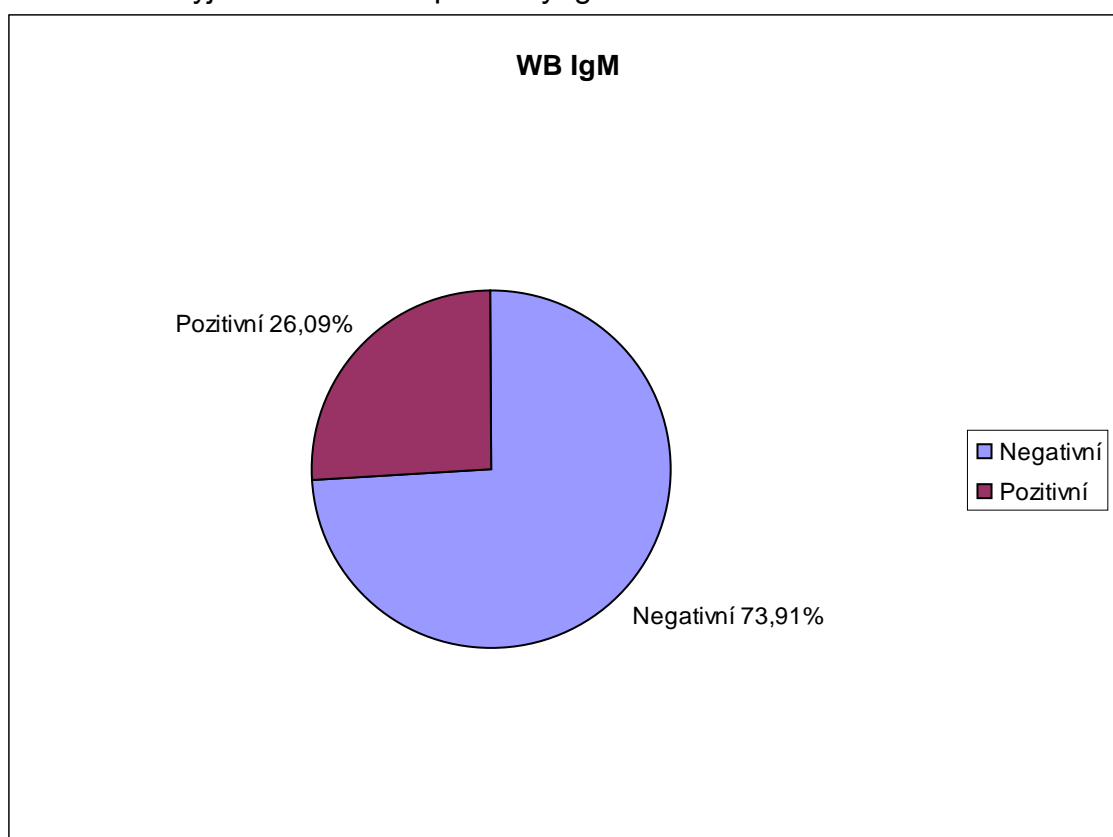
Číslo vzorku	WB IgG	WB IgM
1	p18,p41, p83,VisE = + Pozitivní	Negativní
2	p39,p18,p41,p83,VisE = + Pozitivní	Negativní
3	Negativní	Negativní
4	Negativní	Negativní
5	Negativní	P25,p31,p41,p83 = + Pozitivní
6	Negativní	P18p39,p41,p25 = + Pozitivní
7	Negativní	Negativní
8	Negativní	Negativní
9	Negativní	Negativní
10	Negativní	Negativní
11	p39,p18,p34,p41,p83,VisE = + Pozitivní	Negativní
12	p19,p21,p25,p28,p39,VisE = + Pozitivní	Negativní
13	P18,p25,p83,VisE = + Pozitivní	Negativní
14	Negativní	P25,p18,p41 = + Pozitivní
15	Negativní	P25 = + Hraniční hodnota, opakovat za 4-6 týdnů

16	Negativní	Negativní
17	p31,p83, VisE = + Pozitivní	Negativní
18	Negativní	Negativní
19	Negativní	Negativní
20	Negativní	P41,p39 = + Hraniční hodnota
21	p18,p21,p25,p30,p39,VisE = + Pozitivní	Negativní
22	Negativní	P31 = + Hraniční hodnota, opakovat za 4-6 týdnů
23	p21,p31,p39,p83,VisE = + Pozitivní	Negativní

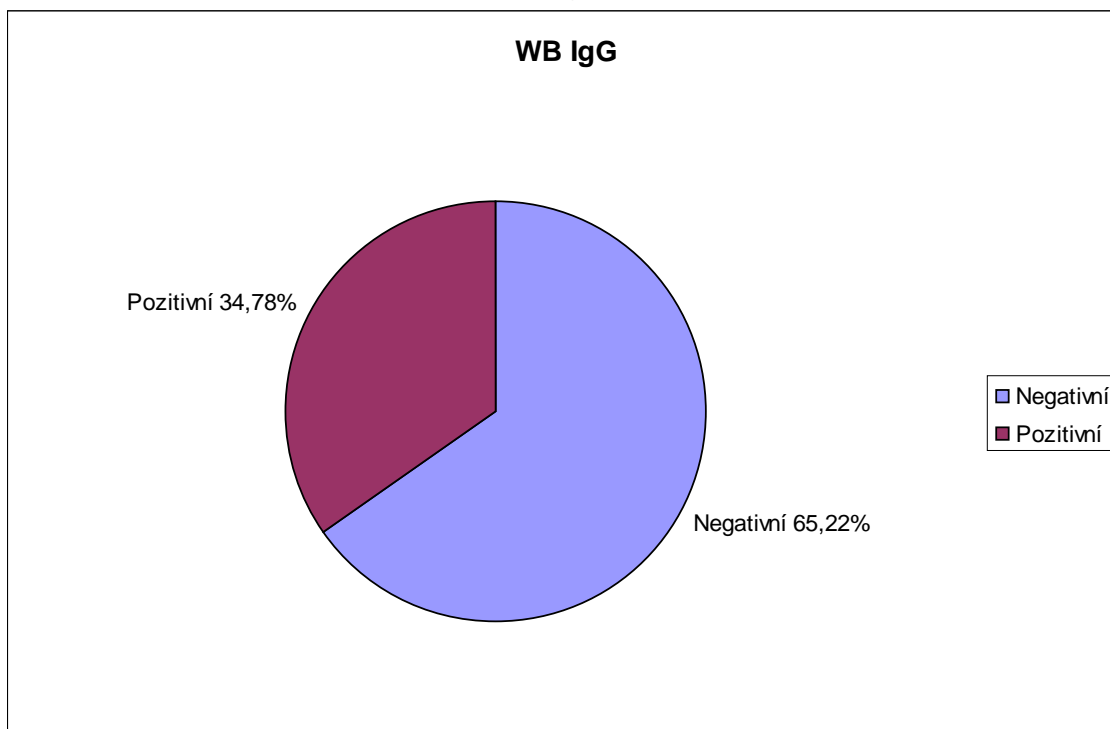
Tabulka 19. Percentuelní vyjádření četnosti positivity WB

	IgG	IgG%	IgM	IgM%
Negativní	15	65,22	17	73,91
Pozitivní	8	34,78	6	26,09

Graf 6. WB vyjádření četnosti positivity IgM



Graf 7. WB vyjádření četnosti positivity IgG



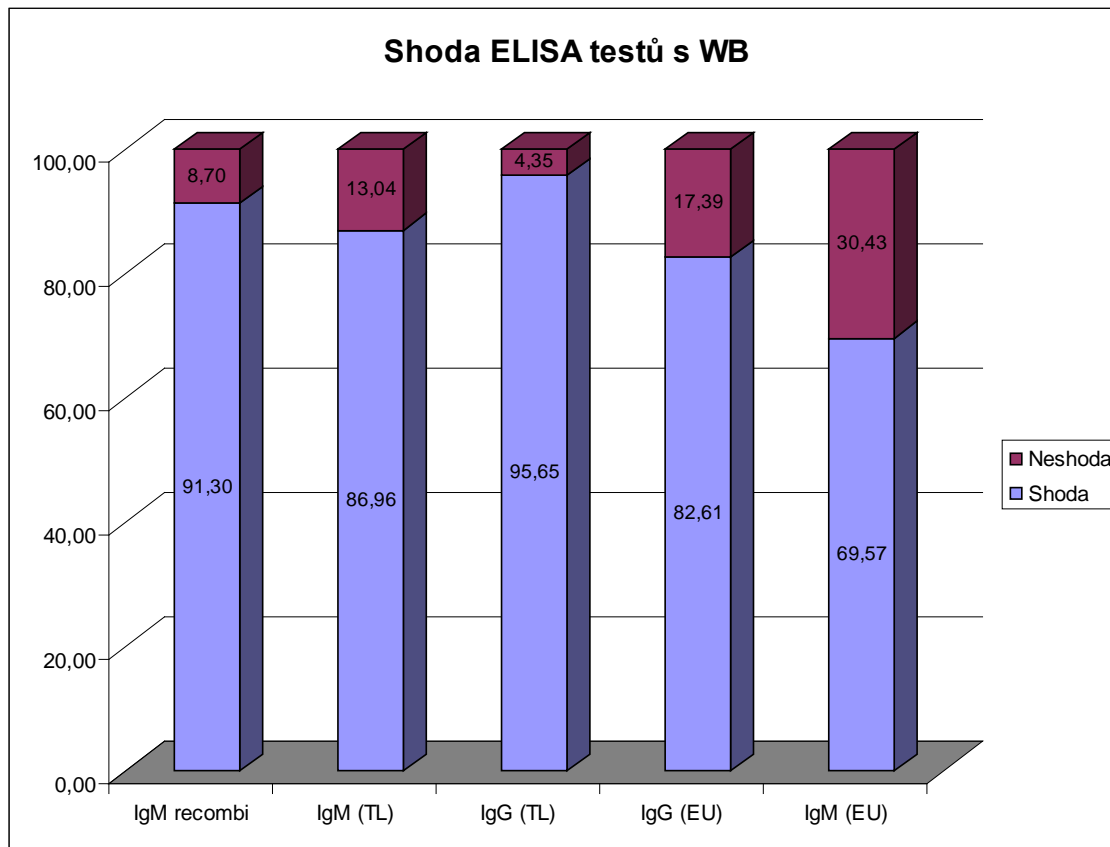
Tabulka 20. Výsledky všech testů

ČÍSLO	ELISA EI IGG	ELISA EI IGM	ELISA TL IGG	ELISA TL IGM	ELISA TL IGM RECOMBI	WB EI IGG	WB EI IGM
1	+	-	+	-	-	+	-
2	+	+	+	-	-	+	-
3	+	-	-	-	-	-	-
4	+	-	-	-	-	-	-
5	-	+	-	+	+	-	+
6	-	+	-	+	+	-	+
7	-	+	-	-	-	-	-
8	+	+	-	-	-	-	-
9	+	-	-	-	-	-	-
10	-	+	-	-	-	-	-
11	+	-	+	-	-	+	-
12	+	-	+	-	-	+	-
13	+	-	+	-	-	+	-
14	-	+	-	±	±	-	+
15	+	+	+	-	+	-	+
16	-	+	-	-	±	-	-
17	+	-	+	-	-	+	-
18	-	+	-	-	-	-	-
19	-	+	-	+	-	-	-
20	-	+	-	+	+	-	±
21	+	-	+	-	-	+	-
22	-	+	-	-	-	-	+
23	+	-	+	-	-	+	-

Tabulka 21. WB/ELISA - SHODA/NESHODA

	IgM rekombinantní	IgM (TL)	IgG (TL)	- IgG (EU)	- IgM (EU)
1	SHODA	SHODA	SHODA	SHODA	SHODA
2	SHODA	SHODA	SHODA	SHODA	NESHODA
3	SHODA	SHODA	SHODA	NESHODA	SHODA
4	SHODA	SHODA	SHODA	NESHODA	SHODA
5	SHODA	SHODA	SHODA	SHODA	SHODA
6	SHODA	SHODA	SHODA	SHODA	SHODA
7	SHODA	SHODA	SHODA	SHODA	NESHODA
8	SHODA	SHODA	SHODA	SHODA	NESHODA
9	SHODA	SHODA	SHODA	NESHODA	SHODA
10	SHODA	SHODA	SHODA	SHODA	NESHODA
11	SHODA	SHODA	SHODA	SHODA	SHODA
12	SHODA	SHODA	SHODA	SHODA	SHODA
13	SHODA	SHODA	SHODA	SHODA	SHODA
14	SHODA	SHODA	SHODA	SHODA	SHODA
15	SHODA	NESHODA	NESHODA	NESHODA	SHODA
16	NESHODA	SHODA	SHODA	SHODA	NESHODA
17	SHODA	SHODA	SHODA	SHODA	SHODA
18	SHODA	SHODA	SHODA	SHODA	NESHODA
19	SHODA	NESHODA	SHODA	SHODA	NESHODA
20	SHODA	SHODA	SHODA	SHODA	SHODA
21	SHODA	SHODA	SHODA	SHODA	SHODA
22	NESHODA	NESHODA	SHODA	SHODA	SHODA
23	SHODA	SHODA	SHODA	SHODA	SHODA
SHODA	21	20	22	19	16
NESHODA	2	3	1	4	7
% shody	91,30%	86,96%	95,65%	82,61%	69,57%

Graf 8. Grafické vyjádření shody ELISA s WB



2.7 DISKUZE

Spirochéta *Borrelia burgdorferi sensu lato* je patogenní bakterie, která vyvolává multisystémové onemocnění Lymeskou boreliózu, které je nejčastější zoonózou a způsobuje v ČR ročně přibližně 3 500 onemocnění.

V první, teoretické části, jsem se zaměřila na popis základních informací o původci onemocnění, klinických příznacích, léčbě, prevenci, patogenezí, morfologii spirochéty a laboratorní diagnostiku s možností zkřížených reakcí. Antigeny, které jsou zodpovědné za počátek a průběh nemoci, patří mezi proteiny vyskytující se na vnější membráně. Jsou to antigeny zodpovědné za tvorbu časných (IgM) nebo pozdních (IgG) protilátek, diagnostikovatelných laboratorními metodami. Přehled diagnostických metod je uveden.

Výrobci testovacích souprav a odborná literatura uvádí, že s ohledem na reaktivitu organismu na Bbsl je nezbytné brát v úvahu pomalou tvorbu protilátek v časném stadiu onemocnění, možnost ovlivnění tvorby protilátek předchozí aplikací antibiotik, netypickou dynamiku protilátkové odpovědi, séronegativitu u malého procenta nemocných, možnost zkřížených reakcí u osob s jiným spirochétálními bakteriemi a nepatogenními boreliemi. I u gravidních žen lze zaznamenat falešně pozitivní nálezy. Je vhodné také počítat s možnou laboratorní chybou.

Nutné a EUCALBem doporučované je provádět konfirmace WB IgG a IgM každého pozitivního ELISA testu, právě kvůli vyloučení zkřížené reakce. Doporučováno je také provádět konfirmaci u negativního ELISA testu a přítomných klinických příznacích. Z toho vyplývá nutná komunikace mezi laboratoří a klinickým pracovištěm.

Výhodou WB je možnost detekovat a analyzovat reakci protilátek proti jednotlivým antigenním proteinům Bbsl. Laboratoře, které užívají kombinaci ELISA a WB a mají kombinovanou senzitivitu a specifitu průměrně 85 až 95%.
(37)

Experimentální část je zaměřena na porovnání soupravy EIA *Borrelia* IgG a EIA *Borrelia* IgM a EIA *Borrelia* IgM rekombinantní českého výrobce TEST-LINE s.r.o. a soupravy ELISA *Borrelia* IgG a ELISA *Borrelia* IgM německého výrobce EUROIMMUN s konfirmací Western blotem testovací

soupravou Systémy pro stanovení borreliózy Western blotem IgG a Systémy pro stanovení borreliózy Western blotem IgM firmy EUROIMMUN.

Podle experimentálního měření a jeho výsledků porovnání souprav se:

IgG TEST-LINE shoduje v 95,65% s WB

IgM TEST-LINE shoduje v 86,96% s WB

IgM rekombinantní TEST-LINE shoduje v 91,3% s WB

IgG EUROIMMUN shoduje v 82,61% s WB

IgM EUROIMMUN shoduje v 69,57% s WB

Bylo zjištěno, že výrobky firmy TEST-LINE vykazují větší procentuální shodu v ELISA testech při stanovování protilátek IgG, IgM i rekombinantní IgM. Shoda v testech ELISA TL a WB EU IgG je 95,65%, IgM je 86,96% a IgM rekombinantní je 91,3%. Shoda v testech ELISA EU a WB EU IgG je 82,61% a IgM je 69,57%.

Podle výsledků našeho měření testy souprav firmy EU vykazují u IgG o 13% větší neshodu a u IgM o 17% větší neshodu v ELISA testech oproti soupravám IgG a IgM firmy TL (IgM proti rekombinantnímu antigenu IgM TL o 22% větší neshodu).

Státní zdravotní ústav a jeho referenční laboratoř pro lymeskou boreliózu průběžně sleduje a provádí porovnávání souprav různých výrobců dostupných na našem trhu. Z jejich výsledků vyplývá, že čím vyšší je senzitivita testů, tím nižší je specificita testů. (38)

Uvádí, že většina komerčních testů má vzájemně srovnatelnou senzitivitu i specificitu, protože byly vyrobeny podle schvalovacího protokolu FDA 510K. (29)

Naše experimentální porovnání se s výše uvedeným porovnáním referenční laboratoře shoduje.

A dovolte mi zajímavost na závěr. V publikaci německého prof. Kimmiga et al. Klíště jsem v kapitole o výskytu klíšťat našla zmínku o tom, že tak často v literatuře uváděná osmi set metrová hranice možnosti výskytu klíšťat neexistuje. Omyl vychází z výzkumu provedeného na území bývalého Československa, kde jsou dle jeho názoru hory vysoké maximálně osm set metrů.

2.8 ZÁVĚR

Onemocnění LB patří v České republice k poměrně častým onemocněním přenášených klíšťaty.

Borelie je jedním z organizmů, u kterého je známa sekvence celého genomu, tudíž lze patogenezí tohoto onemocnění pokládat za dobře prostudovanou.

V oblasti laboratorní diagnostiky je díky rozvoji EIA metod možnost stanovování protilátek, například ELISA metodou, prakticky v každé laboratoři. Pozitivní testy je vhodné konfirmovat metodou Western blot. K dispozici je velké množství výrobců dodávajících testovací soupravy.

Porovnávání dvou výrobců je věnovaná experimentální část. Podle našeho měření soupravy EIA Borrelia IgG, IgM a rekombinantní IgM firmy TEST-LINE vykazují vyšší procentuální shodu s konfirmací WB testovací soupravou Western blot IgG a IgM než soupravy EIA Borrelia IgG a IgM firmy EUROIMMUN.

2.9 SEZNAM ZKRATEK

Bb	Borrelia burgdorferi
Bbsl	Borrelia burgdorferi sensu lato
Bbss	Borrelia burgdorferi sensu stricto
Bdr	Borrelia diarect repeat = vlastní regulační geny
EUCALB	European Union Concerted Action on Lyme Borreliosis
CO	Cut Off = horní mez normálních hodnot (udávaná výrobcí)
EBV	Epsteina – Barrové Virus
EIA	Enzyme Immunosorbent Assay = enzymová imunoanalýza
ELISA	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay = imunoenzymatická metoda ke zjištění protilátek
EU	EUROIMMUN
FDA	Food and Drug Administration
HsP	Heat shock Proteins = proteiny teplotního šoku
HsP60	axonální protein nervových buněk
IFA	imunofluoroanalýza
IgG	Imunoglobulin G
IgM	Imunoglobulin M
IP	Index Pozitivity
ISEM	Imunosorbentní Elektronová Mikroskopie
kDa	kilodaltony
LB	Lymeská Borelióza
NC	Negativní kontrola
Osp	Outer surface proteins, vnější povrchové proteiny
PC	Pozitivní kontrola
PCR	Polymerase Chain Reaction = polymerázová řetězová reakce
Q.C.	Quality Control
TMB Complete	jednosložkový chromogenní substrátový roztok
TL	TEST-LINE s.r.o.

VisE	Variable major protein-like sequence, Expressed = exprimovaná sekvence podobná jednotce hlavního variabilního proteinu
WB	Western Blot

2.10 SEZNAM LITERATURY

1. ROHÁČOVÁ H.: *Lymeská borelióza*, farmakoterapie pro praxi, Jessenius Maxdorf, 2005, [s.19]
2. JANOVSÁ D. *Epidemiologická situace v České republice*. In: BARTŮŇEK P a kol.: *Lymeská borelióza*, 3., doplněné a přepracované vydání, Grada, 2006, [s.25-40]
3. HULÍŇSKÁ D. *Mikrobiologie*. In: BARTŮŇEK P a kol.: *Lymeská borelióza*, 3., doplněné a přepracované vydání, Grada, 2006, [s.14-22]
4. KIMMIG P., HASSLER D., BRAUN R.: *Klíšťata. Nepatrné kousnutí s neblahými následky*. PRAGMA 2003, [79-103]
5. PÍCHA D. *Patogeneze*. In: BARTŮŇEK P a kol.: *Lymeská borelióza*, 3., doplněné a přepracované vydání, Grada, 2006, [s.43-48]
6. BARTŮŇEK P. *Prevence*. In: BARTŮŇEK P a kol.: *Lymeská borelióza*, 3., doplněné a přepracované vydání, Grada, 2006, [s.60]
7. Bartůňek, P., Mrázek, V.: *Imunizace proti lymeské borelióze – první zkušenosti*. Čas Lék čes, 1999; 138; [s.340-342]
8. STEERE AC., SIKAND VK., MEURICE F., PARENTI DL., FIKRIG E., SCHOEN TR., NOWAKOWSKI J., SCHMID CH., LAUKAMP S., BUSCARINO C., KRAUSE DS.: *Vaccination against Lyme disease with recombinant Borrelia burgdorferi outer-surface lipoprotein A with adjuvant*. New Engl J Med, 1998; 339; [s.209-215]
9. HERCOGOVÁ J. *Postižení kůže*. In: BARTŮŇEK P a kol.: *Lymeská borelióza*, 3., doplněné a přepracované vydání, Grada, 2006, [s.62-70]
10. ROHÁČOVÁ H.: *Lymeská borelióza*, farmakoterapie pro praxi, Jessenius Maxdorf, 2005, [s.21-25]
11. <http://www.onkologickecentrum.cz/>
12. FRASER C.M., CASJENS S., HUANG W.M., SUTTON G.G., CLAYTON R., LATHIGRA R., WHITE O., KETCHUM K.A., DODSON R., HICKEY E.K., GWINN M., DOUGHERTY B., TOMB J.F., FLEISMANN R.D., RICHARDSON D., PETERSON J., KERLAVAGE A.R., QUACKENBUSH J., SALYBERG S., HANSON M., van VUGT R., PALMER N., ADAMS M.

- D., GOCAYNE J., VENTER J. C. (1997): *Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete Borrelia burgdorferi*. Nature 390: [s580-586].
13. Bartůněk P. a kol.: *Lymeská borelióza*, Grada ,2001, [s.90].
14. WANG G., van DAM A. P., SCHWARTZ I., DANKERT J.: *Molecular Typing of Borrelia burgdorferi sensu lato: Taxonomic, Epidemiological, and Clinical Implications*. Clin. Microbiol. Rev.,1999, 12 [s.633-653]
15. WILSKÉ B., BUSCH U., FINGERLE V., JAURIUS-HEIPKE S., PREAC-MURSIC V., ROSSLER D. :*Immunological and molecular variability of OspA and OspC. Implications for Borrelia vaccine development*. Infection 1996, 24 [s. 208-212]
16. Van HOECKE Ch. & LOBET Y.: Development of European vaccine against Lyme disease. In: *International conference on Lyme disease.*, Brussels, Belgium, 2001, abstract
EUCALB: <http://meduni09.edis.at/eucalb/cms/index.php?lang=en>
17. www.biopticka.cz; výzkum – Lymeská borelióza a její původci.
18. FUNG B. P., McHUGH G. L., LEONG J. M., STEERE A. C.: *Humoral immune response to outer surface protein C of Borrelia burgdorferi in Lyme disease: role of the immunoglobulin M response in the serodiagnosis of early infection*. Infedt. Immun., 1994, 62, [s.3213-3221]
19. Hulínská D.: *Mikrobiologie*. In Bartůněk P., *Lymeská borelióza*, Grada, 2001, [s.13-18]
20. VICTORIA Y. GORBACHEVA, HENRY P. GODFREY and FELIPE C. CABELLO: *Analysis of the bmp Gene Family in Borrelia burgdorferi Sensu Lato*. Journal of Bacteriology,2000,[s.2037-2042]
21. http://www.dynex.cz/files/download/EUROLINWEB_VIsE_cz_OBR1432.pdf
22. HULÍNSKÁ D. *Laboratorní diagnostika*. In: BARTŮNĚK P a kol.: *Lymeská borelióza*, 3., doplněné a přepracované vydání, Grada, 2006, [s.50-59]
23. ZIMA T.: *Laboratorní diagnostika*. Galén. 2002, [s.635]
24. HULÍNSKÁ D., DŘEVOVÁ H., VOTÝPKA J.: *Polymerázová řetězová reakce v laboratorní diagnostice*. Zprávy CEM 10, č.8, 1999, [s.384-389]

25. ROSA PA, SCHWAN TG.: *A specific and sensitive assay for the Lyme disease spirochete Borrelia burgdorferi using the polymerase chain reaction.* J. Infect. Dis, 1989; 160, [s.1018-1029]
26. MORAVCOVÁ L., LÁSIKOVÁ Š., PÍCHA D., ŽDÁRSKÝ E.: *Průkaz specifické DNA Borrelia burgdorferi v moči pacientů s lymeskou boreliózou.* Klin mikrobiol inf lék, 2000; 6(7)[s.221-224]
27. http://www.bagmed.cz/doc/BAG-Borrelia-HA-test_cesky_navod.doc
28. <http://hulinska.xf.cz/index.php?st=text&nd=2>
29. <http://www.szu.cz>
30. http://www.dynex.cz/files/download/wb_borrelia_burgdorferii_igm.pdf
31. HULÍNSKÁ D.: *Poznatky o lymeské borelióze vyšetřené pomocí Western blotu.* Epidemiol Mikrobiol Imunol, 1997, 46 [s. 3-8]
32. HAUSER U., LENHERT G., LOBENTANZER R., WILSKE B.: *Interpretation criteria for standardized Western blots for three European species of Borrelia burgdorferi sensu lato.* Clin Microbiol, 1997, 46 [s.3-8]
33. P. Bartůněk, V. Mrázek, P. Vařejka, D. Janovská, M. Valešová: *Lymeská borelióza: možnosti a meze interpretace sérologických nálezů.* Prakt. Lék., 1998, 78, [s.611-614]
34. HULÍNSKÁ D.: *Podíl spirochet Borrelia burgdorferi a virů z čeledi Herpesviridae při některých neurologických syndromech.* SZÚ Praha, 1999, závěr
35. TEST-LINE: pracovní návod
36. <http://www.euroimmun.de/>
37. TRAJEVO RT., KRAUSE PJ., SIKAND VK., SHRIEFER ME., RYAN R., LEPORE T., PORTER W., DENNIS DT.: *Evaluation of two-test serodiagnostic method for early Lyme disease in clinical practice.* J Infect Dis, 1999, [s.931-938]
38. <http://hulinska.xf.cz/index.php?st=text&nd=2> ; www.szu.cz