

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

**Laboratorní metody detekce *Borrelia burgdorferi* v klinickém  
materiálu**

(bakalářská práce)

Vedoucí bakalářské práce: Mgr. Marcela Vejsová, Ph.D.

*„Prohlašuji, že tato bakalářská práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“*

datum:

podpis:

Ráda bych poděkovala paní Mgr. Marcele Vejsové, Ph.D. za odborné vedení, poskytnutí materiálů, ochotu a cenné rady při zpracování mé bakalářské práce. Děkuji i své rodině za trpělivost a dlouhodobou podporu při studiu.

# Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Autor: Petra Mottlová

Název: Laboratorní metody detekce *Borrelia burgdorferi* v klinickém materiálu

Bakalářská práce

Studijní obor: Zdravotní laborant, prezenční forma

Cíl práce: Shrnutí hlavních dosud známých poznatků o Lymeské borrelióze. Jednotlivé kapitoly pojednávají o historii onemocnění, etiologii, epidemiologii, patogenезi, prevenci, klinickém obrazu, léčbě a diagnostice. Větší pozornost je věnována právě dnešním možnostem laboratorní diagnostiky onemocnění a její problematice. Cílem praktické části je vytvořit statistický přehled o stavu onemocnění v Hradci Králové.

Metody: Statistická analýza datového souboru pacientů, kteří byli vyšetřeni nepřímou metodou ELISA pro průkaz protilátek proti borreliím ve Fakultní nemocnici Hradec Králové. Výsledky analýzy jsou uvedeny v tabulkách a pro lepší orientaci také v grafech.

Výsledky: Ze 7067 případů bylo 70,9% negativních a 28,1% pozitivních vyšetření. Převládala akutní fáze onemocnění. Ženy byly více postiženy (55,1%) než muži (44,9%). Průměrný věk žen byl 60 až 69 let a mužů 50 až 59 let. Září bylo nejčastějším měsícem odběru vzorků. Analýza prokázala nejvyšší výskyt základní diagnózy A69.2 (lymeská nemoc) a nejčastějším odebíraným klinickým materiálem bylo sérum.

Závěry: Lymeská borrelióza je poměrně rozšířené onemocnění, které může způsobit vážné následky. Výsledky laboratorních vyšetření nemusí odpovídat klinickému obrazu pacienta a je nutné k diagnostice přistupovat komplexně. Výsledky statistické analýzy se shodují s fakty uváděnými v odborné literatuře.

# Abstract

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Author: Petra Mottlová

Title: Laboratory methods of detection of *Borrelia burgdorferi* in clinical material  
Bachelor thesis

Field of study: Medical laboratory technician, attendance study form

Background: Summarize the main finding of the known Lyme borreliosis. Individual chapters deal with the history of the disease, etiology, epidemiology, pathogenesis, prevention, clinical picture, treatment and diagnosis. Greater attention is being paid to the possibilities of today's laboratory diagnosis of the disease and its issues. The aim of the practical part is to provide a statistical overview of the disease in Hradec Králové.

Methods: Statistical analysis of the data of patients who were examined by indirect ELISA method to detect antibodies of borrelias at the University Hospital in Hradec Králové. Analysis was performed in a professional statistical software. Results of the analysis are given in tables and for better orientation in graphs as well.

Results: From 7067 cases were 70,9% negative and 28,1% positive. The acute phase was the most common stadium. Women were more affected (55,1%) than men (44,9%). The average age of woman was 60 to 69 years and men 50 to 59 years. September was the most common month of sampling. The analysis demonstrated the highest prevalence of primary diagnosis A69.2 (lyme disease) and serum was the most common biological material used for examination.

Conclusions: Lyme borreliosis is a widespread disease that can causes serious after-effect. Laboratory results always not correspond with clinical picture of the patient. It is necessary comprehensive approach. Results of statistical analysis are consistent with the facts reported in the literature.

# Obsah

<b>Seznam použitých zkratk</b> .....	<b>8</b>
<b>1 Úvod</b> .....	<b>10</b>
1.1 Zadání bakalářské práce .....	10
<b>2 Cíle práce, výzkumné otázky, metodologie</b> .....	<b>11</b>
<b>TEORETICKÁ ČÁST</b>	
<b>3 Historie</b> .....	<b>13</b>
<b>4 Etiologie</b> .....	<b>15</b>
4.1 Morfologie .....	15
4.2 Taxonomie .....	16
4.3 Genom .....	17
4.4 Antigenní struktura.....	18
4.4.1 Povrchové antigeny .....	18
4.4.2 Lipoproteiny .....	19
4.4.3 Bičíkový antigen (flagelin FlaA a FlaB) .....	20
4.4.4 VlsE .....	20
4.4.5 Regulační proteiny.....	21
<b>5 Epidemiologie</b> .....	<b>22</b>
5.1 Celosvětové rozšíření LB.....	22
5.2 Vektor .....	24
5.3 Způsoby přenosu .....	26
5.4 Zvířecí rezervoár .....	26
<b>6 Patogeneze</b> .....	<b>27</b>
<b>7 Prevence</b> .....	<b>29</b>
<b>8 Klinický obraz</b> .....	<b>30</b>
8.1 Časně lokalizované stadium – 1. stadium.....	30
8.2 Časně diseminované stadium – 2. stadium .....	31
8.3 Pozdní perzistentní stadium – 3. stadium .....	31

<b>9 Léčba .....</b>	<b>33</b>
<b>10 Diagnostika .....</b>	<b>35</b>
10.1 Nepřímé metody.....	36
10.1.1 Nepřímá imunofluorescence.....	36
10.1.2 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) .....	37
10.1.3 Western blot .....	37
10.2 Přímé metody .....	38
10.2.1 Kultivace.....	38
10.2.2 Histologický průkaz.....	39
10.2.3 Světelná mikroskopie v zástinu .....	39
10.2.4 Elektronoptický průkaz .....	39
10.2.5 DNA-hybridizace .....	40
10.2.6 Polymerázová řetězová reakce (PCR) .....	40
<b>ANALYTICKÁ ČÁST</b>	
<b>11 Zpracování dat .....</b>	<b>43</b>
<b>12 Výsledky .....</b>	<b>43</b>
12.1 Určení počtu pozitivních a negativních výsledků vyšetření .....	43
12.2 Rozdělení pozitivních výsledků vyšetření podle stadia onemocnění .....	44
12.3 Rozdělení pozitivních výsledků vyšetření podle pohlaví .....	46
12.4 Rozdělení pozitivních výsledků vyšetření podle věku a pohlaví.....	47
12.5 Rozdělení pozitivních výsledků vyšetření podle měsíce odběru .....	48
12.6 Rozdělení pozitivních výsledků vyšetření s diagnózou A69.2 podle věku. 49	
12.7 Rozdělení pozitivních výsledků vyšetření s diagnózou jinou než A69.2....	50
12.8 Určení nejčastěji odebíraného materiálu k vyšetření .....	51
<b>13 Diskuse .....</b>	<b>53</b>
<b>14 Závěr .....</b>	<b>56</b>
<b>15 Použitá literatura a zdroje .....</b>	<b>57</b>
<b>Seznam obrázků, tabulek a grafů .....</b>	<b>60</b>

## Seznam použitých zkratek

- ACA *acrodermatitis chronica atrophicans*
- ATB antibiotikum
- Bb *Borrelia burgdorferi*
- Bbsl *Borrelia burgdorferi sensu lato*
- Bbss *Borrelia burgdorferi sensu stricto*
- Bdr borrelia direct repeat – vlastní regulační geny
- BL borreliový lymfocytom
- BSK Barbour Stoener Kelly
- CSF mozkomíšní mok
- EIA Enzyme Immunosorbent Assay – enzymová imunoanalýza
- ELISA Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay –  
imunoenzymatická metoda ke zjištění protilátek
- EM *erythema migrans*
- Hsp heat shock proteins – proteiny teplotního šoku
- IFA imunofluorescenční metoda
- IgG imunoglobulin G
- IgM imunoglobulin M
- i.m. intramuskulární podání
- IP index positivity
- IS imunitní systém
- i.v. intravenózní podání
- LB lymeská borrelióza
- MEP main extracellular protein
- NRL Národní referenční laboratoř
- NS nervový systém
- ORF open reading frames – kódující sekvence genu
- Osp outer surface protein – vnější povrchové proteiny
- PCR Polymerase Chain Reaction – polymerázová řetězová reakce
- PNC penicilin
- p.o. perorální podání
- SZÚ Státní zdravotnický ústav



- UV ultrafialové záření
- VlsE Variable major protein-like sequence, Expressed – exprimovaná sekvence podobná sekvenci hlavního variabilního proteinu
- WB Western Blot

# 1 Úvod

Lymeská borrelióza (LB) je onemocnění, které bylo objeveno v poměrně nedávné době. Již od samého počátku své historie byla choroba pro badatele velkou záhadou. Její tajemství spočívalo v multisystémových klinických projevech a obtížně prokazatelném původci. Popisy klinických projevů jsou ale známy po dlouhou dobu. První zmínka o LB pochází z roku 1883, kdy byl popsán projev *acrodermatitis chronica atrophicans* (ACA). Muselo ovšem uběhnout přibližně sto let, než se podařilo prokázat původce onemocnění, kterým je bakterie *Borrelia burgdorferi sensu lato* (Bbsl).

LB je rozšířena především v Evropě, Severní Americe a Asii. V České republice je nejčastější antropozoonózou, jejíž závažnost stoupá. Přenos je zprostředkován kousnutím infekčního klíštěte rodu *Ixodes*, čímž se dostává Bbsl do hostitele a následuje rozšíření do různých oblastí organismu. Bbsl je mikroaerofilní gramnegativní pohyblivá spirochéta, která způsobuje rozmanitá postižení kůže, kloubů, nervového systému, srdce nebo oka.

Od doby objevu vznikla řada poznatků o vyvolávajícím agens, patogenezí, klinickém průběhu, diagnostice i léčbě. Téma je aktuální zejména z toho důvodu, že se i dnes potýká hlavně diagnostika a léčba onemocnění s řadou úskalí. LB se může svým průběhem podobat řadě chorob a některé její formy se obtížně diagnostikují. Současně interpretace sérologických testů s sebou přináší riziko nerozpoznání nemoci. Na druhé straně často dochází k mylné diagnostice pouze na základě pozitivních výsledků sérologie bez výskytu klinických projevů u pacienta. Dobrou prognózu na vyléčení má stav, kdy je LB diagnostikována v časném stádiu a je zahájena okamžitá léčba. Pozdní stádia jsou hůře léčitelná. Z těchto důvodů vyžaduje diagnostika komplexní diagnostický přístup.

## 1.1 Zadání bakalářské práce

Zadáním bakalářské práce je poskytnout čtenáři hlavní fakta o LB se zaměřením na laboratorní metody využívané k diagnostice a problematiku diagnostiky. Speciální část je věnována statistické analýze LB, zpracování, vyhodnocení výsledků, jejich interpretaci a diskuzi s využitím teoretických a praktických znalostí dané problematiky.

## 2 Cíle práce, výzkumné otázky, metodologie

Práce je rozdělena na teoretickou a analytickou část. Cílem první části práce je vytvořit ucelený přehled o dosud známých poznatcích onemocnění. V teoretické části jsem pro zodpovězení výzkumných otázek využila zejména studium odborné literatury a obsahovou analýzu kvantitativních i kvalitativních dat. Konkrétně jsem se snažila odpovědět na následující otázky:

- *Jak se rozvíjely poznatky o onemocnění?*
- *Jaká je jeho etiologie?*
- *Jaká je epidemiologie?*
- *Jaká je patogeneze?*
- *Jak se nejlépe chránit před infekcí?*
- *Jaký je klinický průběh onemocnění?*
- *Jak probíhá léčba?*
- *Jaké jsou možnosti diagnostiky?*

Základ analytické části pak tvoří datový soubor o pacientech Fakultní nemocnice v Hradci Králové, jež jsem podrobila důkladné statistické analýze (detailnější informace o souboru čtenář nalezne na straně 43 v úvodu analytického oddílu). Cílem analytické části práce je podat statistický přehled o stavu onemocnění v Hradci Králové. Metodikou je zde tedy sekundární analýza kvantitativních dat, k níž jsem využila profesionálního statistického softwaru SPSS<sup>1</sup>. Otázky, na které jsem hledala odpovědi, jsou tyto:

- *Kolik bylo celkem případů s pozitivním a negativním výsledkem vyšetření protilátek?*
- *Jaká převládala fáze onemocnění u pozitivních případů?*
- *Kolik bylo pozitivních mužů a kolik žen?*
- *Jaké bylo rozložení pozitivních případů v závislosti na věku a pohlaví?*
- *Jaký byl nejčastější měsíc výskytu pozitivit?*
- *Jaké byly nejčastější základní diagnózy u pacientů?*
- *Jaký typ vyšetřovaného biologického materiálu převládal?*

---

<sup>1</sup> Celým názvem Statistical Package for the Social Sciences – jedná se o statistický a analytický program vyvíjený již od roku 1968 zejména pro sociální vědce.

## TEORETICKÁ ČÁST

### 3 Historie

Lymeská borrelióza (dále jen LB) má velmi pestrou historii, protože díky svým rozdílným projevům v různých stádiích přiváděla po mnoho let odborníky na scestí. Projevy byly považovány za samostatné, protože se odborníci setkávali s nemocnými prodávajícími jednotlivé fáze neznámé nemoci.

První zmínka o LB pochází z roku 1883, kdy dermatolog Buchwald publikoval popis *acrodermatitis chronica atrophicans* (dále jen ACA) (Bartůněk a kol., 2006). Dalším významným badatelem byl Afzelius, který se po řadu let věnoval kožním i celkovým projevům provázejícím do té doby neznámé erytémové onemocnění. Popsal toto onemocnění v roce 1909 jako *erythema chronicum migrans* (dále jen EM). Byl prvním člověkem, který prokázal i jednoznačný vztah k přisátí klíštěte. O několik let později zaznamenal Burckhardt další kožní onemocnění. Toto časté postižení se vyznačuje podnětlivým chronickým infiltrátem. Postihuje obvykle ušní boltce, nos, první bradavky nebo genitálie. Bylo označeno jako *lymphocytoma cutis*. Jako první v roce 1922 Garin a Bujadoux popsali neobvyklé postižení nervového systému. Informovali o případě meningopolyradikuloneuritidy s následnou obrnou mimických nebo končetinových svalů, jímž předcházela výskyt EM.

Uplynulo dalších dvacet let, než německý revmatolog Bannwarth popsal řadu nemocných, kteří měli po přisátí klíštěte radikulitidu, resp. multifokální postižení nervového systému. V roce 1966 popsal Schaltenbrand vztah mezi EM, radikuloneuritidou, resp. meningitidou, aniž by však přispěl k objasnění etiopatogeneze, protože se zaměřil chybným směrem. Soustředil se na viry (Bojar, 1996). Důležitý byl názor Lenhoffův, který v roce 1948 upozornil na možnou etiologickou účast spirochét při kožních lézích typu EM a ACA. Jeho názor však nesdíleli další badatelé a byl označen za omyl (Bartůněk a kol., 2006). Z Evropanů, kteří se také snažili objevit původce onemocnění, byli nejbližší cíli Ackerman a Hörstrup. Původce ale neurčili. Navrhli však této klinické jednotce syndromologické označení – Garinův-Bujadouxův-Bannwarthův syndrom. Název se stal po dlouhou dobu synonymem pro LB (Bojar, 1996).

V 80. letech došlo k zásadnímu obratu. Steere se spolupracovníky zaměřili svoji pozornost na epidemický výskyt zánětlivé artropatie u 39 dětí a 12

dospělých, která propukla v oblasti poblíž městečka Lyme (Connecticut). 23 dětí z 39 (59 %) splňovalo kritéria juvenilní revmatoidní artritidy, ale pozornosti lékařů neunikl erytém, který kloubnímu postižení předcházela, stejně jako okolnost, že v oblasti je rozšířený výskyt klíšťat typu *Ixodes dammini*. Tak byla popsána nová, resp. staronová nozologická jednotka – lymeská nemoc. Průkaz původce se ale nedařilo. Virová hypotéza byla zavádějící. Až v roce 1982 byl objeven i původce této infekce, spirochéta zařazená mezi borrelie a podle svého původce později nazvaná *Borrelia burgdorferi* (dále jen Bb) (Bartůněk a kol., 2006).



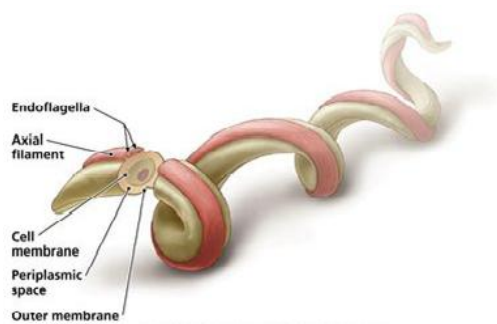
**Obr. 1 – Objevitel původce LB-Willy Burgdorfer**

(zdroj:<http://www.niaid.nih.gov/topics/lymediseases/research/pages/cause.aspx>)

## 4 Etiologie onemocnění

### 4.1 Morfologie

Původcem LB je spirochéta *Borrelia burgdorferi sensu lato* (*Borrelia burgdorferi* v širším slova smyslu, dále jen Bbsl). Bb je mikroaerofilní, gramnegativní bakterie, která se vyznačuje tenkým, spirálovitě vinutým tvarem. Rozměry bakterie jsou 0,2  $\mu\text{m}$  x 4-30  $\mu\text{m}$ . Spirálovitě stočené buňky s pravidelnými závití (4-15 závitů) se pohybují rotací kolem podélné osy nebo



**Obr. 2 – Buněčná struktura *Borrelia burgdorferi***

(zdroj: [http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Borrelia\\_burgdorferi\\_NEU2011](http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Borrelia_burgdorferi_NEU2011))

smršťováním a natahováním. Pohyb umožňují bičíky, kterých je 7-9 (na rozdíl od ostatních patogenních borrelií, např. *B. recurrentis*, *B. hermsi*, které mají 15-20 bičíků). Bičíky se vypínají mezi oběma konci buňky z bazálních disků a obtácejí tělo borrelie pod vnější buněčnou stěnou. Bb je primárně extracelulární patogen, ale je schopný proniknout i do buněk. Právě díky bičíkům mohou borrelie pronikat do míst, kam se jiné patogeny nedostanou (Hulínská, 2006).

Bičíky se skládají z (Dlouhý, 1996):

- *bazálního disku* – je součástí protoplasmatické membrány a slouží k úponu bičíku do protoplasmatického cylindru,
- *zúženého krčku* – spojuje bazální disk s dalšími částmi bičíku,
- *zahnutého háku* – určuje, ve kterém směru bičík přiléhá k Bb a
- *dříku* – vlastního těla bičíku (vláknitá část).

Zevní membrána se skládá ze tří vrstev: vnitřní peptidoglykanová, střední lipopolysacharidová a vnější lipoproteinová. Stěna je oddělena periplazmatickým prostorem od cytoplasmatické membrány. Protoplasmatický cylindr tvoří nejvnitřnější část Bb a je ohraničen membránou (Dlouhý, 1996). Velká flexibilita membrán buněčné stěny umožňuje vysunutí bičíků, tvorbu cyst a vylučování membránových vezikulů, které mají stejné složení jako buněčná stěna a obsahují plazmidovou výbavu. Imunitní systém (dále jen IS) vezikuly rozezná a bojuje

proti nim. Mezitím bakterie dokáže změnit svou antigenní strukturu, čímž se maskuje před IS. Fluidita vnější membrány umožňuje posun antigenů a buněčných glykosaminopeptidových receptorů významných pro adhezi s buňkami hostitele (Hulínská, 2006).

Borrelie mají zajímavou a ne dosud plně vysvětlenou vlastnost. Jsou schopny tvořit různé tzv. „non-spirální“ formy. Tvorba cystických forem a odškrcených váčků obsahujících složky cytoplazmy, je pozorována při vystavení klasické spirální formy suboptimálním životním podmínkám, jako je nízké pH, nedostatek nutričních zdrojů nebo nízký osmotický tlak. Cystické formy mají sníženou metabolickou aktivitu a jsou většinou schopny reverze v plně metabolicky aktivní spirální formu. Tento jev se může uplatnit při úniku před nepříznivými faktory, jako je působení IS nebo antibiotická léčba, a také komplikuje mikroskopický průkaz borrelií (Křupka a kol., 2008).

## 4.2 Taxonomie

Původce LB byl na podkladě morfologie a biologických vlastností taxonomicky zařazen:

<b>říše:</b> <i>Procarvotae</i>
<b>doména:</b> Baktérie ( <i>Eubacteria</i> )
<b>kmen:</b> Spirochéty ( <i>Spirochatae</i> )
<b>třída:</b> <i>Spirochaetes</i>
<b>řád:</b> <i>Spirochaetales</i>
<b>čeleď:</b> <i>Spirochaetaceae</i>
<b>rod:</b> <i>Borrelia</i>
<b>druh:</b> <i>Borrelia burgdorferi sensu lato</i>

Zdroj: (internet 1)

V současné době Bbsl zahrnuje řadu genomospecies. Druhy byly rozděleny dle sekvenčního uspořádání chromosomové DNA v pulzní gelové elektroforéze (Hulínská, 2006). Druhy se liší geografickým výskytem, přítomností různých kombinací plazmidů, antigenní strukturou, zastoupením strukturních složek a



jejich funkčními aktivitami a také patogenitou. V důsledku zmíněných molekulových odlišností existují také značné rozdíly v klinickém obrazu systémového onemocnění LB (internet 2).

Tab. 1: Přehled druhů Bbsl a jejich výskyt

DRUH	VÝSKYT
<i>Borrelia burgdorferi sensu stricto</i>	celý svět
<i>Borrelia garinii</i>	Evropa
<i>Borrelia afzelii</i>	Evropa
<i>Borrelia japonica</i>	Japonsko
<i>Borrelia andersonii</i>	nově objevený druh v Evropě
<i>Borrelia valaisiana</i>	nově objevený druh v Evropě
<i>Borrelia lusitaniae</i>	nově objevený druh v Evropě
<i>Borrelia bissettii</i>	druh objevený v USA, později izolován ve Slovinsku, Švédsku a ČR
<i>Borrelia tanuki</i>	JV Asie
<i>Borrelia turdi</i>	JV Asie
<i>Borrelia sinica</i>	JV Asie
<i>Borrelia miyamotoi</i>	druh objevený v USA, později izolován ve Slovinsku, Švédsku a ČR

Zdroj: (Roháčová, 2005)

Řád Spirochaetales zahrnuje pohyblivé bakterie šroubovitého tvaru. Některé jsou významnými lidskými patogeny. Nejbližšími příbuznými borrelie jsou např. *Treponema* sp., která je původcem onemocnění syfilis, bejel, frambezie nebo pinta, dále *Leptospira* sp., která způsobuje Weillovu nemoc nebo blaťáckou horečku, a také *Spirillum minor*, což je původce horečky z krysího kousnutí. Rod *Borrelia* zahrnuje 22 druhů, z nichž některé jsou součástí normální ústní flóry, jiné jsou ovšem patogenní (Dlouhý, 1996).

### 4.3 Genom

U Bb je známa sekvence celého genomu. Způsob organizace genetického materiálu je mezi bakteriemi unikátní. Genom bakterie Bb kmene B31 obsahuje

lineární chromozom o velikosti 911 kb a 12 lineárních a 8 cirkulárních elementů – plazmidů. Plazmidy jsou považovány za minichromozomy, protože *in situ* jsou bez chromozomu neschopné funkce. Nesou geny, které určují tvoření všech povrchových proteinů (outer surface protein, Osp), nutných pro přežití Bbsl v hostiteli (Hulínká, 2006).

Kódující sekvence tzv. „open reading frames“ (ORF) tvoří 93 % chromozómu. Z celkového počtu 853 ORF je u 59 % genů známa jejich biologická funkce, 12 % ORF má neznámou funkci a jsou nalezeny i u jiných druhů bakterií a 29 % ORF jsou nové geny. Geny kódované plazmidy souvisejí většinou s virulencí a infektivitou, ale biologická úloha většiny z nich není známá. Chromozóm obsahuje geny kódující proteiny, které se uplatňují v DNA replikaci, transkripci, translaci, transportu látek a energetickém metabolismu, ale neobsahuje geny pro biosyntézu látek (Fraser a kol., 1997).

## 4.4 Antigenní struktura

Bbsl má velmi bohatou antigenní strukturu. Pro život, růst a virulenci Bbsl jsou významné bičičky a vnější povrchové proteiny (Osp) buněčné stěny, které jsou nejlépe prostudované (Hulínká, 2006).

### 4.4.1 Povrchové antigeny

Povrchové antigeny jsou lipoproteiny. Plazmidy nesou geny pro tvorbu molekul, které pokrývají povrch borrelií. Borrelie jsou schopné stále měnit svůj povrch právě díky plazmidům, které si mohou navzájem vyměňovat i s jinými bakteriálními druhy. Přizpůsobují se tak vnějšímu prostředí (např. změna teploty při přechodu z vektoru do hostitele) a také je to výborná ochrana před obrannými mechanismy svých hostitelů (internet 1).

Na povrchu borrelií se nachází velké množství antigenů, které jsou nezbytné pro přežití mikroba v organismu hostitele. V následující části textu uvedu především antigeny specifické, které jsou důležité pro diagnostiku. Pokud je antigen specifický, tak se v organismu tvoří protilátka, která proti tomuto konkrétnímu antigenu bojuje a pokud se prokáže pomocí sérologických testů její

přítomnost a ještě se u člověka projevují klinické příznaky onemocnění, je to jasný průkaz antigenu v těle pacienta.

OspA (30–32 kDa) je bílkovina zevní membrány, která je spolu s OspB (34–36 kDa) považována za nejdůležitější antigenní determinantu imunitních odpovědí a séroakcí (Bojar, 1996). Oba proteiny jsou kódovány na lineárním plazmidu 49kb a jsou antigenně variabilní. Variabilita těchto dvou determinant je u evropských kmenů borrelií větší než v Severní Americe. V mnoha případech jeden, nebo dokonce oba chybí v antigenní výbavě. Protilátky proti OspA a OspB se tvoří v pozdní fázi nemoci. OspA i OspB jsou vysoce specifické antigeny (internet 2).

OspC (21–22 kDa) je antigenně heterogenní protein přítomný u mnoha evropských kmenů. Na rozdíl od OspA a OspB, které jsou jen slabě imunogenní, OspC je hlavní protein, proti kterému se namířena časná imunitní odpověď (tvorba protilátek třídy IgM). Gen se nachází na cirkulárním plazmidu 26 kb (Dlouhý, 1996).

OspD (26 kDa) je další z lipoproteinů, jehož gen se nachází na lineárním plazmidu (38 kb) (internet 2). OspE (19 kD) při časně infekci deaktivuje komplement. Díky jeho přítomnosti je patogen schopný obejít buněčnou imunitu. OspF (18 kDa) je pravděpodobně specifický antigen. Vyskytuje se zejména v časných fázích infekce (internet 3).

#### 4.4.2 Lipoproteiny

Intracelulární perzistence borrelií je závislá na množství hlavního extracelulárního proteinu (MEP) o molekulové hmotnosti 83 a 93 kD. MEP je tvořen v periplazmatickém prostoru stěny. Gen pro p83 je lokalizován, podobně jako pro flagellin a pro antigen p39 na chromozomu. Produkce antigenu p83 (MEP) se zvyšuje s délkou infekce (Hulínská, 2006). 83 kD je vysoce specifický antigen stejně jako 93 kD. Oba tyto antigeny jsou značeny také jako p100. Protilátky proti němu se tvoří v pozdní chronické infekci (marker 3. stádia borreliózy), zejména u neuroborreliózy (internet 3).

p20 a p22 (20 a 22 kDa) byly identifikovány v poslední době jako strukturní jednotky receptoru pro dekorin, proteoglykan asociovaný na povrchu kolagenu (internet 2). p60 (60 kDa) je cytoplazmatický protein, nejběžnějším u

Bb. Je důvodem častých zkřížených reakcí s jinými bakteriemi, u kterých je také přítomen (Dlouhý, 1996). Přítomnost proteinu působí obtíže při hodnocení výsledků sérologických testů. p66 (66 kDa) je HsP-protein (heat shock protein), který má zřejmě, podobně jako přítomnost OspC antigenu, vztah k teplotním změnám, jimž je spirochéta vystavena v okamžiku napadení savce klíštětem. Teplotní šok může vést k patologickým reakcím, vzhledem k přítomnosti homologního proteinu v organismu savce (Hulínská, 2006). p39 (Bmp A) je vysoce specifický antigen. Často se vyskytuje během časně infekce spolu s OspC (internet 3).

#### 4.4.3 Bičkový antigen (flagellin FlaA a FlaB)

Bičík borrelií se skládá ze dvou proteinů FlaA (37 kDa) a majoritního FlaB (41 kDa). FlaA spouští časnou IgM protilátkovou imunitní odpověď u pacientů a bývá často využíván jako marker v diagnostických sadách (internet 2). Majoritní FlaB není specifický pouze pro borrelie a sdílí epitopy i s dalšími bakteriemi. Opakovaně bylo prokázáno, že tvorba protilátek proti Bb je v časném stádiu vázána na tvorbu protilátek proti FlaB (Bojar, 1996).

#### 4.4.4 VlsE

VlsE (variable major protein-like sequence, expressed = exprimovaná sekvence podobná sekvenci hlavního variabilního proteinu) je nově charakterizovaný povrchový protein Bb. Dříve neměl pro sérologickou diagnostiku význam. VlsE představuje klíčový antigen pro přežití borrelie. Jakmile borrelie pronikne do organismu, mění svoje povrchově exprimované VlsE a tím se brání imunitní ochranné reakci organismu.

Struktura antigenu se dělí na více částí. Chráněné (conserved) části slouží jako transmembránové domény pro uchycení VlsE antigenu v bakteriální membráně.

Variabilní části směřují ven a jsou neustále měněny pomocí rekombinace. Díky proměnám se IS setkává stále s novými, pozměněnými antigenními epitopy,

které jsou neznámé. Konstantní části jsou maskovány variabilními oblastmi, které je chrání před reakcí IS.

Jakmile je mrtvá bakterie borrelie zpracována pomocí antigen prezentujících buněk, je VlsE antigen předkládán IS a organizmus hostitele tvoří protilátky proti konstantním a konzervovaným oblastem. Protilátky ale nemohou *in vivo* reagovat s borreliemi, protože specifické epitopy jsou maskovány, ale jsou vhodné pro diagnostiku, protože jsou zaměřeny proti vysoce konzervovaným cílovým antigenům (internet 4).

#### 4.4.5 Regulační proteiny

Jsou kódovány regulačními geny – *Borrelia direct repeat* (Bdr). Bdr proteiny jsou mezidruhově i vnitrodruhově rozdílné. Nachází se v cytoplasmatické membráně, nejsou ovlivnitelné protilátkami ani ATB. Borrelie se snaží zvyšovat počet Bdr genů a jimi řízené produkce proteinů k zachování druhu. Výměna plazmidů nesoucí Bdr geny a zvyšování jejich nadbytku v genomu je základem pro značnou variabilitu Bbsl, a je to prostředek pro přizpůsobení se změnám prostředí. Na Bdr geny působí stimulačně krev. Tyto geny řídí množení a přechod borrelií do slinných žláz tím, že řídí funkci genů pro OspA a OspC proteiny. OspA je dominantním antigenem Bbsl ve střevě klíšťat, ale ve slinných žlázách je fenotypicky potlačen a zapojí se gen pro syntézu povrchového OspC antigenu. Zvýšení teploty vede ke zvýšení OspC antigenu a také dalších povrchových antigenů OspE a OspF, které náleží mezi antigeny teplotního šoku (HsP) (Hulínská, 2006).

## 5 Epidemiologie

LB je antropozoonózou, která se vyskytuje v mírném pásu Evropy, Asie, Severní Ameriky a nevyhýbá se ani Australii. Onemocnění je šířeno mezi hostiteli pomocí vektoru, kterým je nejčastěji klíště rodu *Ixodes*. V Evropě je to nejčastěji klíště *Ixodes ricinus*, na východě Evropy a v Asii převládá *Ixodes persulcatus* a v USA *Ixodes dammini* nebo *Ixodes pacificus*. Onemocnění podléhá hlášení (Bojar, 1996).

Z dosud objevených druhů borrelií, pouze *Borrelia burgdorferi sensu stricto* (Bbss), *B. garinii*, *B. afzelii* a *B. valaisiana* jsou považovány za původce onemocnění LB. Povrchové antigeny OspA a OspC jsou příčinou značné heterogenity evropských kmenů. Na základě antigenní charakteristiky OspA se borrelie člení na 7 OspA sérotypů. *Borrelia afzelii* způsobuje především kožní manifestace jako je ACA a EM. *B. garinii* je původcem neurologických symptomů a Bbss kloubních postižení. *B. valaisiana* byla prokázána zatím jen u EM. Každý druh je sice původcem jiných klinických projevů, ale EM způsobují všichni (Janovská, 2006).

Tab. 2: Typizace Bbsl-vztah mezi druhy borrelií, typem OspA a OspC

Species	Typ OspA	Typ OspC
<i>B. burgdorferi sensu stricto</i>	TYP 1	5 typů
<i>B. afzelii</i>	TYP 2	4 typy
<i>B. garinii</i>	TYP 3	1 typ
	TYP 4	3 typy
	TYP 5	1 typ
	TYP 6	2 typy
	TYP 7	1 typ

Zdroj: (Janovská, 2006)

### 5.1 Celosvětové rozšíření LB

Bylo prokázáno, že se LB vyskytuje po celém světě. V USA dnes představuje nejčastější antropozoonózu (Bojar, 1996). Ve východních státech USA

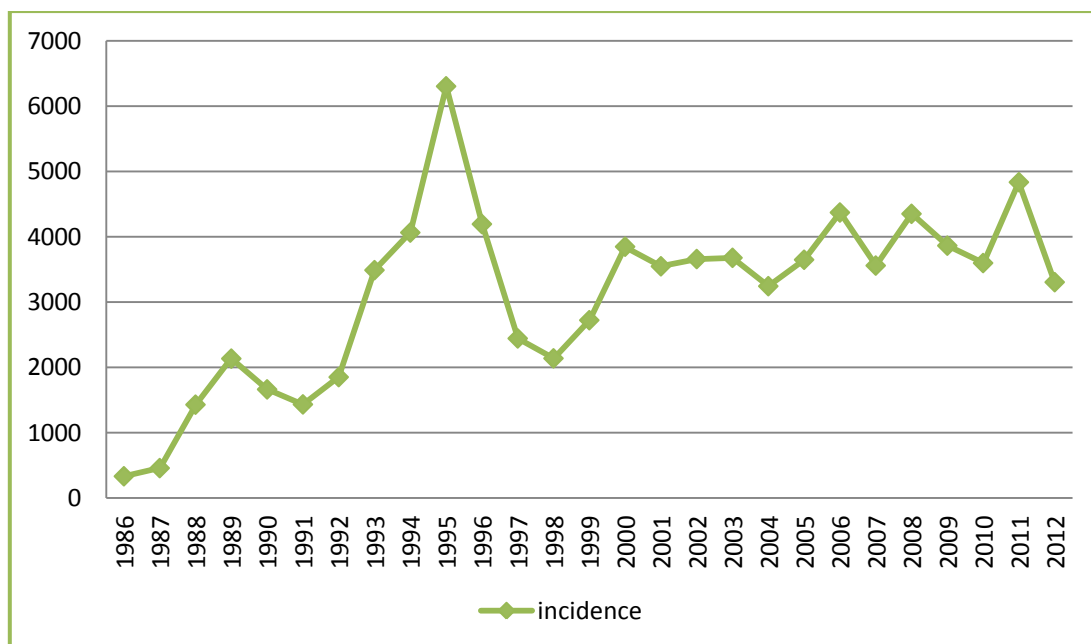
je v epidemických oblastech infikováno Bb přibližně 60 % klíšťat, v Evropě mezi 5-35 %, u nás celostátně 5-10 % (Dlouhý, 1996). Rozložení původců onemocnění není v Evropě rovnoměrné. Neurologické klinické projevy jsou nejčastější v západní Evropě a s nimi spojená *B. garinii*. Ve střední Evropě a Skandinávii je nejčastější *B. afzelii*. Bbss není dominantní v žádném evropském regionu a její výskyt nebyl prokázán v Rusku, Finsku a Asii. *B. valaisiana* byla izolována z klíšťat v Evropě a Asii, je to nejobecnější genospecies u klíšťat v Irsku (Janovská, 2006).

Česká republika je díky své geografické poloze velmi vhodným biotopem pro výskyt LB. Přenašečem v mírném podnebí je klíště *Ixodes ricinus*. Počty hlášených případů v ČR od roku 1986-2012 jsou zaznamenány v tabulce č. 3 a vyneseny v grafu č. 1. Výskyt LB vykazuje zvýšenou frekvenci v letech 1993 a 1994, a vrcholí v roce 1995, kdy incidence LB v ČR dosáhla 61,2/100 000 obyvatel (6 302 hlášených případů). Vzestup souvisel se zvýšeným výskytem klíšťat. Poté pozorujeme klesající tendenci a stagnaci, ale počet případů stále přesahuje 32/100 000 osob (Janovská, 2006). Začátek nového století vrcholí v roce 2006, kdy byla incidence 42,6/100 000 obyvatel (4 370 hlášených případů). V roce 2008 bylo v ČR hlášeno 4 350 případů LB, což představuje nemocnost 41,6/100 000 obyvatel. V roce 2009 bylo hlášeno 3 863 případů. Nemocnost tedy mírně klesla na 36,9/100 000 obyvatel. V roce 2011 došlo opět ke zvýšení počtu případů, hlášeno bylo 4 834 a v roce 2012 bylo 3 304 případů (internet 5; 6; 7).

Tab. 3: Počet hlášených případů onemocnění LB v letech 1986-2012

<b>1986</b>	<b>1987</b>	<b>1988</b>	<b>1989</b>	<b>1990</b>	<b>1991</b>	<b>1992</b>	<b>1993</b>	<b>1994</b>
333	458	1429	2134	1663	1433	1851	3488	4063
<b>1995</b>	<b>1996</b>	<b>1997</b>	<b>1998</b>	<b>1999</b>	<b>2000</b>	<b>2001</b>	<b>2002</b>	<b>2003</b>
6302	4193	2443	2138	2722	3847	3547	3658	3677
<b>2004</b>	<b>2005</b>	<b>2006</b>	<b>2007</b>	<b>2008</b>	<b>2009</b>	<b>2010</b>	<b>2011</b>	<b>2012</b>
3243	3647	4370	3558	4350	3863	3597	4834	3304

Zdroj: (Janovská, 2006; internet 7)



Graf 1: Incidence LB v České republice v letech 1986-2012

Zdroj: (Janovská, 2006)

## 5.2 Vektor

Hlavním vektorem onemocnění jsou klíšata. V Evropě převládá *Ixodes ricinus*, na východě Evropy a v Asii *Ixodes persulcatus*, v USA hlavně *Ixodes scapularis* (dříve nazývané *Ixodes dammini*) a *Ixodes pacificus*. Bb byly izolovány i z klíšat ježků (*I. hexagonus*), u *I. trianguliceps*, u klíšat argasid (*Argas persicus*), v komárech, ovádech, mouchách, blechách a v klíšatech rodu *Dermacentor*, ale tyto členovci mohou být vektory Bb nejspíš jen výjimečně.

Klíšata patří do kmene členovců, řádu roztočů (nejedná se o hmyz) a do rodu *Ixodes*. Mají tvrdý krunýř-hřbetní štítek (chitinové sputum), u samečků pokrývá celý hřbet, u samic pouze jeho přední část. Klíšě tvoří tělo, 6 nebo 8 nohou a hlavička. Hlavička má bodací orgán, tzv. hypostom – připomíná harpunu s dozadu obrácenými zoubky a slouží k zakotvení klíšete do kůže hostitele. Všechny druhy klíšat se živí krví obratlovců. Není typická přírodní ohniskovost, klíšata jsou infikována na velkém území.



Obr. 3 – Klíšě rodu *Ixodes*

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



Endemické oblasti se neshodují s ohnisky střeoevropské klíšťové encefalitidy (Dlouhý, 1996).

Na jaře snesou dospělé samice vajíčka, ze kterých za 6-8 týdnů vylíhnou larvy šedožluté barvy, velké 0,8 mm, se 6 nohama. V létě se larvy přichytí na drobné savce (hlodavci), ze kterých sají krev. Krev je nezbytná pro další vývoj. Po sání se uvolní a padnou na zem, stanou se inaktivní. V tomto stádiu stráví zimu. Na jaře druhého roku se přemění v nymfy. Nymfy mají 8 nohou a měří 1,2 mm. V období od května do července parazitují na zvířeti-rezervoár (ježci, veverky, zajíc, ptáci). Přichycení trvá vždy krátkou dobu (3-6 dnů). Nymfy se po třech měsících mění v dospělá klíšťata (imago). Imago má 8 nohou, sameček měří 2,5 mm a má lesklý černý hřbetní štítek, který tvoří pevnou schránku, což mu znemožňuje nasát mnoho krve. Samička je větší, měří 4 mm a štítek kryje jen přední část, zadní část je zbarvená do červena. V létě napadají imaga vysokou zvěř. Po páření a sání krve zvětší samičky svůj rozměr až 200x. Po 8-30 dnech kladou okolo 2 000 vajíček, nebo přečkají zimu, na jaře nakladou vajíčka a umírají. Larvy (resp. nymfy), které vznikly na začátku léta, se přemění na nymfy (resp. imaga) tentýž rok. Vajíčka snesená na podzim a klíšťata vzniklá na podzim hibernují a podstupují přeměnu na jaře. Klíšťe přijímá potravu pouze jednou v každém vývojovém stádiu (Dlouhý, 2006).

Vývoj borrelie probíhá ve střevě klíšťete. Existuje řada podmínek, které musejí být splněny, aby došlo k předání infekce. Mezi takové podmínky patří např. přechod do slinných žláz, rezistence spirochéty vůči faktorům přijímané krve, synchronizace generační doby růstu nejméně u poloviny populace spirochét ve střevních buňkách, vyšší počet spirochét ve slinné žláze než 100. Jen 1/3 nakažených klíšťat je schopna předat infekci. U klíšťete, které je napadené, dojde vlivem zmnožení borrelií k rozpadu střevních buněk, což může být příčinou jejich smrti. Mezi druhy Bbsl probíhá ve střevě boj o přežití. Při dvojité nebo trojitě infekci přežijí více virulentní druhy. Nákaza více druhy je velmi vzácná (Hulínská, 2006).

Sezónní aktivita klíšťat ve střední Evropě začíná v březnu a končí v listopadu. Aktivita klíšťat má dva vrcholy. Nejvyšší výskyt jedinců je ze začátku léta (květen, červen) a menší vrchol přichází ještě s teplým a vlhkým podzimem (září). Na konci listopadu klíšťata opouštějí hostitele i vegetaci a zimní měsíce přežívají v půdě (Dlouhý, 1996).

### 5.3 Způsoby přenosu

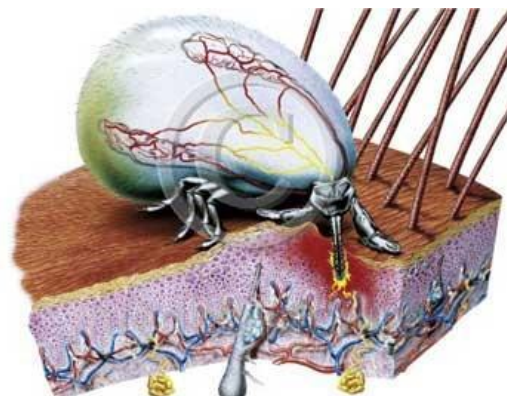
Nejčastější způsob přenosu infekce je prostřednictvím slin přísátých klíšťat. Bb přežívají ve střevě klíšťat a při sání krve pronikají střevní stěnou a hemolymfou do jiných orgánů včetně slinných žláz. K této diseminaci dochází hlavně v počáteční a prostřední fázi sání, nejvíce 1.-3. a 5.-6. den po přísátí. Během sání krve je do rány hostitele vylučováno velké množství slin s protizánětlivými, antikoagulačními a anestetickými látkami. Přenos infekce probíhá teprve poté, co borrelie vycestují do slinných žláz, tedy nejdříve za 24 hodin po přísátí. Po 72 hodinách je infekce přenesena skoro ve všech případech. Druhý typ přenosu je pomocí trusu klíšťat, kterým se může hostitel infikovat během odstraňování klíštěte, Bb jsou vetřeny do kůže nebo zaneseny na spojivky, pronikají rankami i neporušenou kůží. Další typ přenosu je možný prostřednictvím transfúze, močí hlodavců (Dlouhý, 1996).

### 5.4 Zvířecí rezervoár

Jako zvířecí rezervoár může sloužit více než 200 druhů zvířat. Klíště samotné je taky rezervoárem. Mezi savce přenášející onemocnění patří hlodavci (myš, hraboš, myšice, norník, zajíc, veverka), hmyzožravci (ježek, krtek, rejsek), vysoká zvěř (srnec, jelen), domestikovaná zvířata (pes, kočka, skot). Rezervoárem mohou být i ptáci. (Dlouhý, 1996: 19-20) Poslední studie poukazují na vyšší prevalenci *B. afzelii* u hlodavců. *B. garinii* je převážně detekována u ptactva, méně často u hlodavců. *B. valaisiana* je často nacházena v duální infekci s *B. garinii*. Bbss se vyskytuje jak u hlodavců, tak u ptáků (Janovská 2006).

## 6 Patogeneze

Borrelie mají nekompletní metabolickou výbavu, což je nutí k závislosti na hostiteli. Neobsahují enzymy pro syntézu aminokyselin, mastných kyselin a nukleotidů, které získávají z hostitele. (Křupka a kol., 2008: 236-239) Borrelie přežívají zejména v imunologicky zvýhodněných kompartmentech (nervová tkáň, kloub, oko) a to má velký význam pro imunitní reakce i rozvoj orgánového poškození (Pícha, 2006).



**Obr. 4 – Samička sající krev z hostitele**

(zdroj: <http://www.hafbezobav.cz/clanek-2009032701-Lymska-borelioza.html>)

Borrelie se musejí během svého životního cyklu vypořádat s odlišnými podmínkami okolního prostředí. Musí dokázat osídlit trávicí trakt klíštěte, po nasátí krve se skrz slinné žlázy dostat do krevního řečiště hostitele, poté uniknout imunitním obranným mechanismům organismu hostitele a diseminovat do okolí. Díky přesné regulaci exprese povrchových proteinů (Osp) je to umožněno.

Když se borrelie nachází ve střevě klíštěte, na jejím povrchu jsou exprimovány především proteiny OspA a OspB, které slouží jako adhezivní molekuly. Exprese těchto proteinů se snižuje během sání krve a naopak se zvyšuje exprese proteinu OspC. Pomocí proteinu OspC je bakterie schopna přejít z trávicího traktu do slinných žláz klíštěte. OspC má schopnost navázat imunoregulační protein Salp15, který je obsažený ve slinách klíštěte, a pomáhá tak borreliím přežít imunitní reakci v iniciální fázi infekce hostitele.

Pokud infekce přechází do diseminované fáze, dochází ke snížení exprese OspC a na povrchu se objevuje protein VlsE, který se vyznačuje vysokou antigenní variabilitou. Antigenní variabilita VlsE je podmíněna genovou rekombinací multidoménového VlsE genu. Působení specifické imunitní odpovědi hostitele je omezeno díky expresi VlsE a umožňuje přechod do chronické fáze choroby. V těle hostitele borrelie exprimují také molekuly, které vážou H-faktor. H-faktor je zapojený do regulace aktivace komplementu. Tyto

molekuly, např. povrchové proteiny z rodiny Erp (OspE/F related proteins), pomáhají uniknout mechanismům nespecifické imunity.

Dále borrelie exprimují adhezivní molekuly pro uchycení v hlavním cíli, kterým je pojivová tkáň. Nejvýznamnějšími jsou tzv. Decorin binding protein (Dbp) A a B, Fibronectin binding protein (BBK 32) a Borelia glycosaminoglycans binding protein (Bgp). Během pozdní fáze infekce se znovu objevují adhezivní proteiny OspA a OspB. Patogen po přenosu do krevního oběhu prochází cévní stěnou a objeví se v perivaskulárním prostoru, kde vzniká zánětlivá reakce s nahromaděním mononukleárů. Tato časná fáze manifestuje v 70 % případů kožními příznaky ve formě EM. Mezi další znaky časně fáze patří přítomnost protilátek třídy IgM se specifitou k OspC a antigenu bičíků (flagelin-p39). V této fázi dochází často ke spontánnímu uzdravení (remise). Pokud není onemocnění léčeno, šíří se borrelie z kůže do dalších orgánů mohou způsobovat postižení nervového systému (periferní obrna lícního nervu, meningoencefalitida, polyradikulopatie), kloubů (lymská artritida) nebo způsobit další kožní projevy (sekundární EM, borreliový lymfocytom a později ACA), případně vzácněji lymskou karditidu či postižení očí. Léčba je založena na podávání antibiotik (dále jen ATB). Pokud i po podání ATB přetrvávají potíže, pravděpodobně se začínají uplatňovat autoimunitní mechanismy. Byla prokázána souvislost mezi přítomností protilátek anti-OspA a anti-OspB a trváním projevů artritidy, hlavně u pacientů s fenotypem HLA-DR4. Předpokládá se zde zkřížená reaktivita mezi OspA a homologní aminokyselinovou sekvencí na lidské adhezivní molekule LFA-1. Podobně se předpokládá zkřížená reaktivita protilátek mezi jinými antigeny borrelií a strukturami nervové tkáně (Křupka a kol., 2008).

## 7 Prevence

V USA roku 1998 byla uvedena na trh vakcína Lymerix založená na použití rekombinantního proteinu OspA, což je metodou genového inženýrství připravený povrchový protein *B. burgdorferi*. U lidí se kvůli podobnosti OspA antigenu a molekul na povrchu lidských kloubních tkání od této formy vakcíny ustoupilo. Ve vývoji je humánní OspC vakcína (v ČR na ní pracuje firma Bioveta), ale vzhledem k variabilitě povrchových antigenů borrelií a nutnosti zacílit na všechny kmeny borrelií vyskytujících se v ČR asi v dohledné době na trhu nebude (internet 8).

V současné době tedy není dostupná aktivní ani pasivní imunizace proti LB. Snížit výskyt lze jedine ochranou před klíšťaty. Člověk by se měl vyhýbat nebezpečným místům, kde hrozí velké riziko nákazy (okraj lesa, podrosty, křoviny, vysoká tráva). Nosit šaty světlé barvy (klíště je lépe viditelné), hladkého povrchu (horší zachycení klíštěte na oděvu) a šaty z tkaniny o velké hustotě (klíště je pak hůře propustné). Důležitá je pevná obuv, vysoké ponožky, dlouhé kalhoty, košile s dlouhým rukávem. Pro pravidelný pohyb v přírodě se jako ochrana před klíšťaty může použít impregnace oděvů nebo pro příležitostné cesty ošetřit kůži repelentem (např. Diffusil H, OFF!, Autan, Repel, Pif Paf). Po návratu z přírody se musí důkladně prohlédnout tělo (Dlouhý, 1996).

## 8 Klinický obraz

Klinický průběh onemocnění můžeme rozdělit do 3 stádií, jejichž závažnost se stupňuje od lehkého průběhu až k těžkým formám s možnými trvalými následky. Příznaky jsou velmi individuální, protože ne každý pacient prodělá všechna stadia. Onemocnění má velkou tendenci k sebeúzdavě (Havlík, 2002).

### 8.1 Časné lokalizované stadium-1. stadium

Po minimální době 24 – 48 hodin, která je nezbytná k přenosu borrelií, dochází k jejich průniku do kůže (Hercogová, 2006). Stadium je charakterizováno vytvořením EM na kůži v místě zákusu klíštěte, které vzniká během několika dnů až týdnů (Havlík, 2002). Představuje až 85% všech kožních projevů. Každé přisátí klíštěte však nepůsobí kožní projevy, EM vzniká asi u poloviny infikovaných



Obr. 5 – *Erythema migrans*

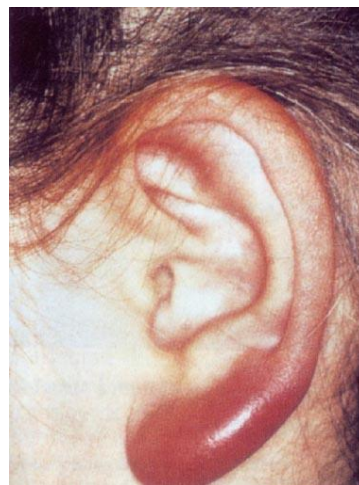
pacientů. Na druhé straně 30 – 50% pacientů s EM nemá v anamnéze přisátí klíštěte nebo poštípání hmyzem. EM se projevuje jako červená okrouhlá nebo oválná skvrna (v průměru nejméně 5 cm), která se zvětšuje, šíří do okolí, ale nebolí (Hercogová, 2006). Vymizí spontánně i bez léčby většinou během několika týdnů. Spolu s EM mohou být přítomny chřipkové příznaky, lymfadenitida aj (Havlík, 2002).

(zdroj: <http://lymepedia.org/lyme-disease-bullseye-rash-erythema-migrans-rarely-seen-during-relapse-in-chronic-cases-of-the-disease/>)

Klinicky rozlišujeme tři základní typy EM. Anulární typ (EM *anulare*) se šíří do okolí živě červeným lemem s hladkým povrchem, hojí se v centru, proto se objeví centrální výbled. Homogenní typ (EM *maculare*) se může nebo nemusí šířit do okolí a jeho centrum zůstává zarudlé po celou dobu trvání, povrch makuly je hladký. Terčovitý, irisovitý typ (EM *concentricum*) vytváří koncentrickou konfiguraci, může mít podobu dvou nebo i více soustředných kruhů, kdy se střídá světle červený kruh, tmavě červený kruh a barva kůže (Hercogová, 2006).

## 8.2 Časné diseminované stadium-2. stadium

Borrelie se během několika dnů, maximálně několika týdnů šíří hematogenně po celém organismu. (Bojar, 1996) K projevům druhého stadia dochází v odstavu týdnů až měsíců po infekci (Havlík, 2002). Ve 2. stadiu se mohou vyskytovat sekundární mnohočetné léze EM. Častým projevem v ČR je postižení nervové soustavy, hlavně nehnisavý zánět mozkových blan u dětí (serózní meningitida), zánět nervových kořenů (meningoradikulitida – parézy hlavových nervů), paréza lícního nervu (Bannwarthův syndrom). Dále



**Obr. 6 – Borreliový lymfocytom**

(zdroj:<http://www1.lf1.cuni.cz/~hrozs/zoopch1.htm>)

může dojít k postižení srdce, kdy je narušena srdeční frekvence (Bartůněk, 1996). I v tomto stadiu se vyskytuje kožní postižení, které se nazývá borreliový lymfocytom, kdy pacient nachází zduření na ušním lalůčku, prsní bradavce, špičce nosu nebo skrotu. Borreliový lymfocytom má červenofialovou barvu, je nebolestivý nebo jen lehce citlivý. Je zahájena syntéza především IgM protilátek (Havlík 2002).

## 8.3 Pozdní perzistentní stadium-3. stadium

Rozvoj nastává po měsících až letech po infekci. Stadium se projevuje chronickými změnami orgánů, jejichž příčinou není pouze bakterie samotná, ale uplatňují se i imunopatologické změny. Dochází k postižení nervové soustavy (chronická encefalitida, presenilní demence, chronická polyneuritida), velkých kloubů



**Obr. 7 – Acrodermatitis chronica atrophicans**

(zdroj:<http://www1.lf1.cuni.cz/~hrozs/zoopch1.htm>)

(lymeská artritida) a kůže. Kožní manifestace v podobě ACA je typickým projevem 3. stadia. ACA je lokalizována hlavně na akrálních částech rukou a nohou. První fáze je erytematózní, kdy je kůže lehce napnutá s mírným

prosáknutím a může být citlivější. Po čase přechází do stadia atrofického, kdy má kůže vzhled cigaretového papíru s vymizením kolagenních vláken a dilatací cév. Zarudnutí bledne, kůže je citlivější a namodralá (Havlík, 2002).



## 9 Léčba

Podle nejnovějších poznatků lékařské vědy se doporučuje následující postup. Po odstranění klíštěte je možnost klíštěte zaslat do laboratoře, které se specializují na diagnostiku LB, kde se zjistí, zda bylo klíštěte nakažené. V případě pozitivních testů, nebo pokud se projeví příznaky LB (EM, příznaky chřipky) je nutné co nejdříve zahájit preventivní antibiotickou léčbu, která by měla trvat minimálně 2 týdny. Vyšetření protilátek se neprovádí dříve jak za 6 týdnů, do té doby budou výsledky testů negativní, i když už jsou borrelie v organismu přítomné. Doporučuje se nečekat, než se nemoc rozšíří (internet 9).

Pro terapii je vhodná řada ATB, zejména tetracykliny, peniciliny, makrolidy a cefalosporin. Citlivost Bb je uniformní, a tak není potřeba v jednotlivých případech testovat citlivost pacientova kmene. Podle zasaženého orgánu a stadia onemocnění se volí typ ATB, způsob podání a doba léčby.

Doxycyklin (tetracykliny) je včasné fázi a v prevenci chronicity onemocnění nejúčinnější ATB. Mezi jeho přednosti patří dobrý průnik do tkání, vysoké vstřebávání po p.o. užití a možnost dlouhodobého podávání. Působí ale nežádavě a pro jeho fotosenzitivitu je zakázáno slunění. Při podezření na koinfekci s ehrlichii je lékem volby. Amoxicilin podáváme v případě kontraindikace u tetracyklinů, např. těhotné a kojící ženy, děti do 8 let, alergie na tetracykliny. Erytromycin a azitromycin jsou určeny pro těhotné ženy, kojící ženy a pro děti do 8 let, které mají alergii na peniciliny. Ceftriaxon, cefotaxim a penicilin G jsou indikovány při léčbě nervových, kloubních a srdečních manifestací 2. a 3. stadia díky vysoké účinnosti a průniku do likvoru a synoviální tekutiny. Metronidazol se užívá pro eliminaci cyst v kombinaci s penicilinovými ATB (Hercogová, 2006).

Hodnocení efektu ATB léčby probíhá na základě zmírnění nebo vymizení klinických projevů. Koncentrace protilátek není hodnotícím parametrem účinnosti léčby, protože jejich pokles lze očekávat za několik měsíců, někdy i let. U diseminované a pozdní formy klesají hladiny velmi pomalu a přetrvávají i po skončení ATB léčby. Vzácně naopak dochází k perzistenci borrelií při poklesu protilátek. Opakování léčby probíhá u pacientů, kteří byli léčeni méně než 6 dnů, při reinfekci, při rozvoji diseminovaného stadia po terapii EM a při pozitivě

protilátek bez klesající tendence při současných klinických potížích. Z důvodu pouze pozitivní sérologie se ATB terapie nezahajuje (Krbková, 2007).

Po odléčení se nemocný sleduje v intervalech 3 měsíců, kdy se vyšetřují protilátky v korelaci s klinickým stavem pacienta. Sledování by mělo trvat 2 roky, pokud je pacient bez potíží, dispenzarizace se ukončí (Havlík, 2002).

Tab. 4: Doporučená antibiotika při léčbě LB

<b>Erythema migrans, borreliový lymfocytom</b>		
<b>Doxycyklin</b>	100 mg po 12 h p. o.	14 dní
<b>Amoxicilin</b>	500 mg po 8 h p. o.	14 dní
<b>Erythromycin</b>	500 mg po 6 h p. o.	14 dní
Mezi méně používaná ATB, která mají dobrou účinnost, patří cefuroxim axetil, azitromycin, ceftriaxon aj., která by v ČR měla být podávána jen při nesnášenlivosti preparátů základní řady. Vzhledem k dobré citlivosti na všechna uvedená ATB je třeba vzít v úvahu i ekonomický faktor.		
<b>Acrodermatitis chronica atrophicans</b>		
<b>Doxycyklin</b>	100 mg po 12 h p. o.	21-28 dní
<b>Amoxicilin</b>	500 mg po 8 h p. o.	21-28 dní
<b>Ceftriaxon</b>	2000 mg po 24 h i.m., i.v.	21-28 dní
<b>Neuroborrelioza</b>		
<b>Ceftriaxon</b>	2000 mg po 24 h i.v., i.m.	21 dní
<b>Cefotaxim</b>	2000 mg po 8 h i. V.	21 dní
<b>PNC krystal.</b>	5 mil. J. po 6 h i. V.	21 dní (u chronických forem 28 dní)
<b>Kloubní forma</b>		
<b>Doxycyklin</b>	100 mg po 12 h p. o.	21-28 dní
<b>Amoxicilin</b>	500 mg po 8 h p. o.	21-28 dní
<b>Ceftriaxon</b>	2000 mg po 24 h i.v., i.m.	14-21 dní
<b>PNC krystal.</b>	5 mil. J. po 6 h i. V.	14-21 dní

Zdroj: (Havlík, 2002)

## 10 Diagnostika

Diagnostika LB je velmi obtížná. V současné době totiž neexistuje laboratorní test, který by potvrdil nebo naopak vyvrátil přítomnost LB. Diagnostika je vždy individuální a provádí se na základě klinického obrazu, anamnéze přísátí klíštěte (okolo 60% případů), eventuálně jiného hmyzu a laboratorní diagnostice (Bolehovská a kol., 2009).

Pro vyšetření onemocnění se používají laboratorní metody především nepřímé, kdy se zjišťuje přítomnost specifických protilátek. Ale mezi hodnotami laboratorních testů a aktivitou infekce neexistuje souvislost. Pokles protilátek neznamena uzdravení a naopak zvýšení protilátek neznamena zhoršení stavu. Také neplatí, že by pacient s vyššími hodnotami trpěl vážnějším onemocněním než pacient, který má hodnoty nižší (internet 10).

Infekci mohou s jistotou potvrdit jen přímé metody, kdy se prokazuje přítomnost patogenu v organismu. Metody přímého průkazu borrelií jsou ale vyhrazeny specializovaným laboratořím a jejich výsledky slouží hlavně pro výzkumné účely. Nejsou vhodné pro běžnou praxi pro svou náročnost (Krbková, 2007). Přímé metody jsou málo citlivé a produkují velké množství falešně negativních výsledků. Laboratorní testy tedy mohou podpořit diagnózu, ale nejsou směrodatné pro léčbu a vývoj nemoci.

Hlavní výzkumné pracoviště pro diagnostiku LB je Národní referenční laboratoř ve Státním zdravotním ústavu (NRL v SZÚ), vedené dříve RNDr. Hulínskou. V současné době bohužel ztratila laboratoř zkušené vedení a i další pracovníky a používá běžné komerční testovací metody. SZÚ vydal vyhlášku, která upravuje diagnostický postup LB. Důležitou zásadou je povinnost testovat pacienta s negativními protilátkami v testu ELISA, který má ale příznaky onemocnění, přesnější metodou Western blot. Navzdory nespolehlivosti je laboratorní testování důležité. Při váhání nad diagnózou a způsobem léčby dají laboratorní výsledky jistotu, že je to správná cesta. Během léčby chronické borreliózy mohou protilátky vzrůst, protože se organismus brání infekci. Během uzdravování by měly hodnoty protilátek IgM klesat a protilátky IgG stoupat, poté IgM vymizí a IgG klesají. To je ale ideální případ při správné léčbě a plně funkčním IS (internet 10).

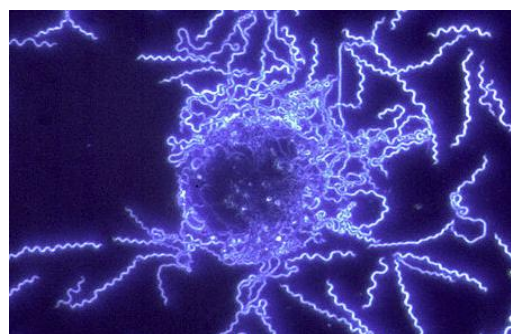
## 10.1 Nepřímé metody

Metody jsou založené na detekci specifických protilátek třídy IgM a IgG. Protilátky jsou tvořeny B-lymfocyty a to nejdříve během 3 – 6 týdnů po štípnutí. V případě okamžitého nasazení ATB léčby, vyvázání protilátek do imunokomplexů nebo imunodeficience (např. chemoterapie) se vůbec nemusí protilátky začít vytvářet (Durovska, 2010). U většiny imunitních infekcí se začínou tvořit nejprve protilátky typu IgM a až za několik týdnů protilátky IgG. U některých infekcí jsou IgG protilátky přítomné ještě po dobu několika let. LB může probíhat v chronické formě a pacient by měl mít především protilátky typu IgG, ale častějším nálezem jsou protilátky IgM. Borrelie mají schopnost měnit svou antigenní strukturu, čímž se brání proti zásahu IS a organismus tak vytváří stále nové protilátky. Obecně tedy platí, že je nejdůležitější, jak se člověk cítí, laboratorní výsledky nejsou obrazem samotné nemoci (internet 10).

Sérologické vyšetření anti-borreliových protilátek se provádí metodou IFA (imunofluoroanalýza), ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) a WB (Western blot). ELISA test by měl být prováděn jako první. Jeho pozitivitu je potřeba konfirmovat metodou WB. Pozitivní výsledky testů podporují diagnózu. Pokud se vyskytnou klinicky jasné příznaky onemocnění (EM, BL), není potřeba provádět sérologické vyšetření.

### 10.1.1 Nepřímá imunofluorescence

Nepřímá imunofluorescence je metoda, která slouží k detekci specifických protilátek. Princip metody spočívá v navázání antigenu na pevný nosič. Poté se aplikuje sérum nebo homogenizovaná tkáň obsahující první protilátku (lidská). Dojde k vytvoření komplexu s antigenem. Následně se přidá druhá protilátka (zvířecí), která je značená fluoreskující látkou. Intenzita fluorescence se stanoví pomocí UV



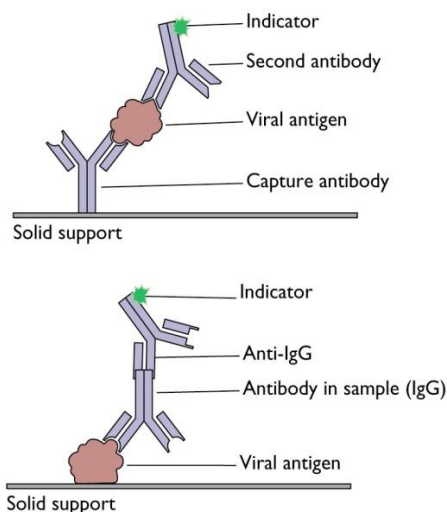
**Obr. 8 – Pozitivní imunofluorescence**

(zdroj: <http://www.tumblr.com/tagged/borrelia>)

fluorescenčního mikroskopu nebo automatického přístroje. Je méně citlivá a specifická než ELISA (internet 11).

### 10.1.2 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

ELISA je nejpoužívanější sérologický test. Není příliš přesný ani citlivý, ale je cenově dostupný. Slouží k měření množství antigenu (přímá ELISA) nebo protilátek (nepřímá ELISA) v biologickém materiálu (internet 12). Pro stanovení množství protilátek se užívá následující princip. Antigen se naváže na dno zkumavky, přidá se vzorek a dojde k inkubaci (antigen se váže na protilátku). Nenavázaný antigen se vymyje. Přidá se druhá protilátka, která obsahuje kovalentně vázaný enzym, naváže se na stejný antigen. Opět proběhne inkubace s promytím nadbytečné protilátky s enzymem (křenová peroxidáza, alkalická fosfatáza, glukosaoxidasa). Navázaný enzym zpracuje substrát, který je přidán do reakční směsi, na barevný produkt. Výsledné zbarvení se změří spektrofotometricky. Při pozitivním výsledku se musí provést konfirmace pomocí WB (internet 13).

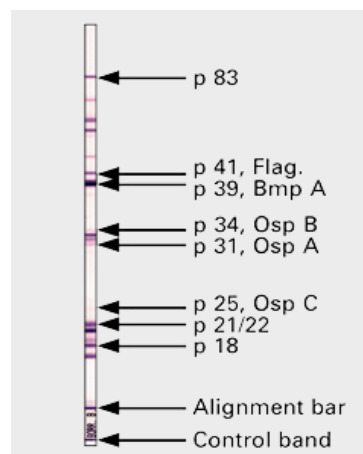


**Obr. 9 – Princip metody ELISA**

(zdroj:<http://www.virology.ws/2010/07/16/detection-of-antigens-or-antibodies-by-elisa/>)

### 10.1.3 Western blot (WB)

WB je daleko přesnější, citlivější a finančně náročnější než ELISA (internet 3). Borreliové antigeny se elektroforeticky oddělí a poté se přenesou na membránu (nitrocelulósová nebo nylonová). Z membrány se vytvoří stripy (proužky), které se inkubují se sérem pacienta. Dojde k navázání specifických protilátek na konkrétní antigeny. Dále



**Obr. 10 – Western blot**

(zdroj:<http://ioei.org/index.php?id=1273&L=0>)

dochází k navázání další protilátky, která je značená enzymem (=konjugát). Konjugát se naváže na místa s navázanou protilátkou a po inkubaci proběhne přeměna substrátu na produktu a vzniká barevná reakce. (internet 14) Pokud se v těle vytvoří protilátka proti specifickému antigenu, znamená to, že je protilátka přímým důkazem přítomnosti LB. Mezi specifické antigeny patří např. OspC, OspA, OspB, BmpA (39 kD), p100 (83 kD + 93 kD), VlsE (internet 3).

## 10.2 Přímé metody

U obtížně rozpoznatelných případů s nevýraznými multiorgánovými projevy jsou metody přímého průkazu borrelií v tkáních a tekutinách obratem v diagnostice. Přímé metody ovšem nejsou rutinními postupy a používají je většinou jen některá klinická pracoviště pro přesnější diagnostiku u nejasných a komplikovaných případů (např. NRL v SZÚ). V budoucnosti se ale špičková pracoviště neobejdou bez vyšetření PCR a bez metod přímého průkazu borrelií (Bojar, 1996). Přímé metody jsou závislé na odběru materiálu, ve kterém se právě v daném čase borrelie vyskytují a ten správně vyšetřit. V případě borreliózy je to dost obtížné (internet 10).

### 10.2.1 Kultivace

Kultivace borrelií z klinických vzorků nebo klišát je složitá, technicky a časově náročná vzhledem k malému počtu Bb ve vzorku a alteraci Bb protilátkami nebo ATB při léčbě. Kultivace trvá 7-14 dní (až 3 měsíce). Je potřeba vysoce obohacených kultivačních půd, sterilní koňské a králičí sérum prosté protilátek proti společným bakteriálním antigenům a protilátek proti spirochétám, které ovlivňují růst Bb (Hulínská, 2006; Votava, 2003).

Výtěžnost závisí na výběru vhodných půd pro uspokojení nutričních požadavků bakterií, na vhodném vzorku a době odběru. Modifikace Barbour-Stoener-Kelly (BSK) půdy jsou rutinně používány k izolaci Bbsl (M-BSK, BSK-H, Sigma, EMEM apod.) V akutní fázi LB je nejčastější záchyt z kůže, při EM až v 68%. Izolace z mozkomíšního moku (CSF) a krve závisí na podchycení borreliemie, které jsou v akutní fázi limitovány ATB (Hulínská, 2000). Dlouhodobá kultivace borrelií může vést ke ztrátě některých plazmidů, změny

v expresi proteinů a ztráta schopnosti infikovat laboratorní zvířata (internet 2). Růst Bb ovlivňuje teplota (34-35 °C), osmotický tlak, sluneční světlo, UV záření, pH prostředí (pH 7,5), oxidoredukční potenciál (Eh +0,1 do 0,1 – 0,2) (Hulínská, 2006).

### 10.2.2 Histologický průkaz

Pro získání vzorku (např. z EM) se provede biopsie. Vytvořené roztěry se speciálně obarví Giemsou a toluidinovou modří nebo stříbřením s 1% dusičnanem stříbrným po natrávení amylázou. Pod mikroskopem se hledají spirochéty. Může dojít k záměně s jiným druhem spirálovitých bakterií (např. *Treponema*) (Hulínská, 2006).

### 10.2.3 Světelná mikroskopie v zástinu

Metoda, která se používá pro rychlý důkaz přítomnosti spirochét v klíštěti. Hodnotí se infikovanost klíšťat v různých vývojových stádiích, v různých lokalitách a možné riziko pro lidi (Hulínská, 2006).

### 10.2.4 Elektronoptický průkaz

Je založen na zhodnocení morfologie bakterie a na imunocytochemické reakci antigenu se specifickou monoklonální protilátkou. K negativnímu barvení se užívá 1% fosfowolframová kyselina nebo 1-8 % uranylacetát. Imunosorbentní elektronová mikroskopie (ISEM) je založena na reakci antigenu s monoklonální protilátkou (králičí) na pevném sorbentu. Následně dochází ke konjugaci s monoklonální protilátkou, která je značená zlatem. Jedná se o jednoznačný průkaz infekce i u séronegativních pacientů. V krevních vzorcích a moku byla ISEM pozitivní v 9-23 % v akutní fázi infekce. V pozdní diseminované fázi Bb většinou alterované, fenotyp lze určit pouze v reakci s monoklonální protilátkou proti p39 a OspA, protože borrelie ztratily bičíky (Hulínská, 2006).

### 10.2.5 DNA-hybridizace

Technika se používá k vyhledávání a charakterizaci specifických nukleotidových sekvencí v DNA nebo RNA (vyskytuje se ve vzorku ve větším množství kopií). Využívá se synteticky zhotovené sondy, která je radioaktivně značená a váže se na známou sekvenci DNA Bb. Dochází k přímé detekci nukleových kyselin Bb (Hulínská, 2006).

### 10.2.6 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

PCR diagnostika je mnohem citlivější. Dokáže hodnotit i méně než 10 borrelií ve vzorku (Hulínská 2006). Je jedinou klinicky využitelnou metodou přímé diagnostiky a doplňuje rutinně používané sérologické testy. Je to doplňková metoda, protože není standardizována a komerční sety jsou určeny pro výzkumné účely. Umožňuje průkaz patogenu v prakticky jakémkoliv typu klinického materiálu (srážlivá krev nevhodná). V primární akutní fázi se používají vzorky kožních biopsií a později, ve fázi hematogenního rozsevu i při relapsu onemocnění, mohou být prokázány ve vzorcích krve a moči. V pozdějších fázích LB je PCR používána pro detekci borrelií v mozkomíšním moku nebo v synoviální tekutině. V případě oční borreliózy se vyšetřuje tekutina sklivce (internet 15).

Metoda je založena na principu neomezené amplifikace chromozomálního genu. Užívají se primery, odvozené od 16S-rRNA. Proces probíhá v opakovaných reakčních cyklech. Každý cyklus vyžaduje jinou teplotu. První fází je denaturace, kdy dojde ke zvýšení teploty na 92-95 °C, dojde k disociaci dsDNA na jednotlivé řetězce. Druhá fáze je annealing (hybridizace primerů), kdy se teplota sníží na 45-60°C a navážou se synteticky připravené oligonukleotidy (primery) na známé okrajové sekvence řetězců DNA. Velmi důležitá je optimalizace pro každou reakci. Při nižší teplotě by totiž vznikaly nespecifické produkty a při naopak vyšší teplotě by byl výtěžek nízký. Třetí fáze se nazývá extenze (polymerace), kdy dochází k vlastní syntéze nových řetězců. Nukleotidy se navazují na 3'-konce primerů. Reakce je katalyzována Taq polymerázou při teplotě 72°C. Cyklus se opakuje 20-40 krát a probíhá v termocykleru (světelný termocykler u real-time



PCR). Detekce produktu PCR probíhá pomocí gelové elektroforézy. Zjišťuje se přítomnost určitého úseku DNA v analyzovaném vzorku. Pokud je úsek přítomný projeví se v gelu jedním specifickým proužkem („band“). V případě nově zavedené metody real-time PCR se měří nárůst koncentrace amplifikačního produktu v průběhu PCR pomocí fluorescenčně značené sondy (Šimůnek, prezentace z předmětu molekulární biologie).

## **ANALYTICKÁ ČÁST**

## 11 Zpracování dat

Analytická část práce spočívá ve statistickém zpracování datového souboru. Jedná se o výsledky vyšetření protilátek proti borreliím metodou ELISA od pacientů, jejichž vzorky byly testovány na pracovišti Ústavu klinické mikrobiologie Fakultní nemocnice Hradec Králové v období září roku 2011 až srpen roku 2012, tzn. v průběhu jednoho roku. Soubor obsahoval následující informace:

- datum odběru
- měsíc a rok narození pacienta (z důvodu citlivosti osobních dat jsem neměla k dispozici celé rodné číslo)
- pohlaví
- základní diagnóza
- typ odebraného biologického materiálu
- výsledek vyšetření protilátek IgM a IgG

Informace jsem uspořádala podle data odběru v programu Microsoft Excel a následně jsem je zpracovala ve statistickém programu SPSS 15,0 for Windows.

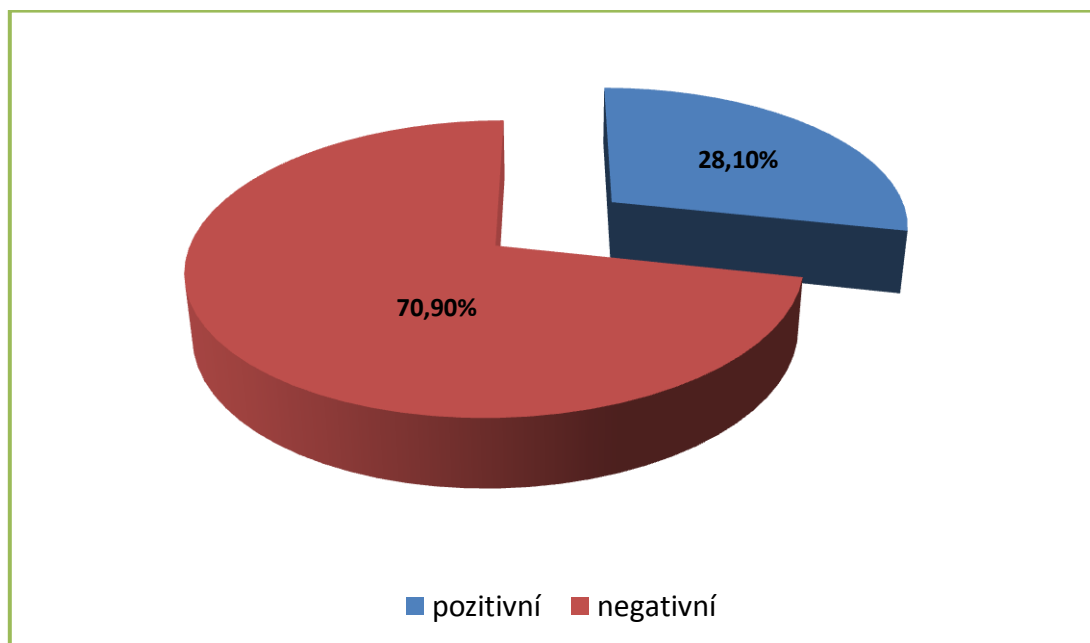
## 12 Výsledky

### 12.1 Určení počtu pozitivních a negativních výsledků vyšetření

Soubor obsahoval celkem 7136 vyšetření. U 69 případů nebyl uveden výsledek vyšetření (jednalo se o kontroly), tyto případy jsem do statistiky nezahrnula. Tabulka č. 5 uvádí rozdělení výsledků všech vyšetření metodou ELISA na dvě skupiny – pozitivní a negativní výsledky vyšetření. Rozdělení pozitivních pacientů podle typu pozitivních protilátek je uvedeno v další části práce. Z důvodu lepší přehlednosti uvádím k tabulce procentuální rozložení ve výšečovém grafu č. 2. Pro hodnocení a interpretaci výsledků se zavedl index pozitivity (IP=1). Hodnoty výsledků menší než jedna byly započítány mezi negativní, hodnoty výsledků vyšší než jedna (včetně) mezi pozitivní.

Tab. 5: Rozdělení výsledků vyšetření na pozitivní a negativní

skupiny	počet	počet v %
pozitivní	2007	28,1
negativní	5060	70,9
celkem	7067	100,0



Graf 2: Rozdělení výsledků vyšetření na pozitivní a negativní

Z celkového počtu 7067 vyšetření převažuje počet negativních případů (70,9 %). Vzhledem k tomu, že metoda ELISA není příliš přesná ani citlivá, nemusí negativita vyšetření znamenat nepřítomnost onemocnění. Při diagnostice hrozí riziko falešně negativních nebo falešně pozitivních výsledků.

## 12.2 Rozdělení pozitivních výsledků vyšetření podle stadia onemocnění

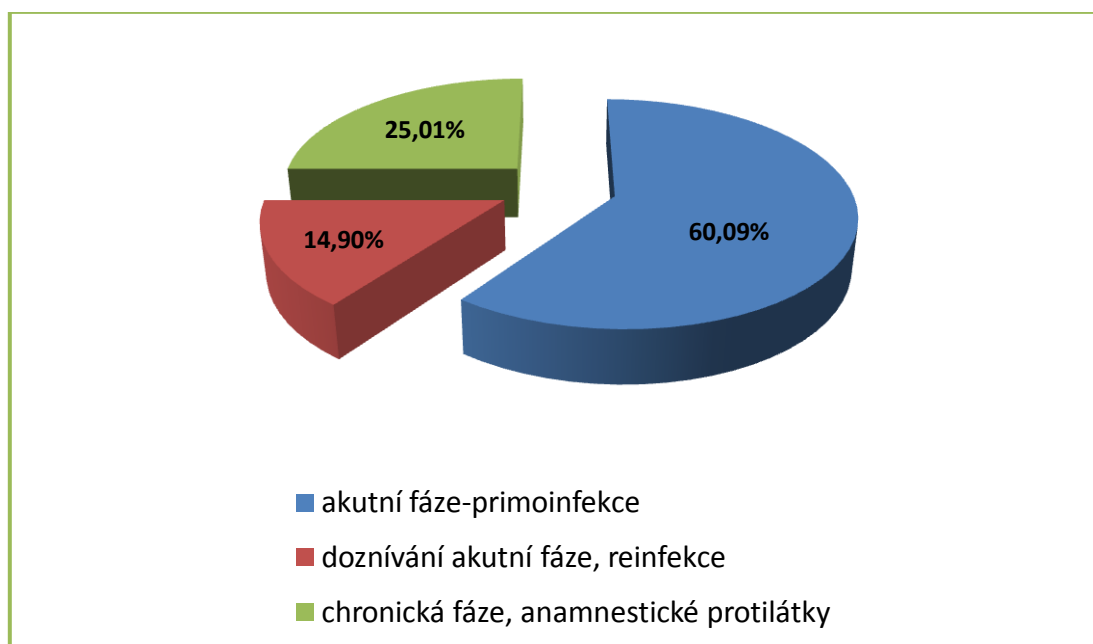
Celkový počet pozitivních případů jsem roztřídila podle výsledku vyšetření do tří skupin, které odpovídají následujícím stadiím onemocnění:

- akutní fáze – primoinfekce (IgM+/IgG-)
- doznívání akutní fáze onemocnění nebo reinfekce (IgM+/IgG+)
- anamnestické protilátky, případně chronická fáze (IgM-/IgG+)

Případy v jednotlivých stadiích onemocnění jsem sečetla a uvedla do tabulky č. 6 a doplnila procentuálním rozložením v grafu č. 3.

Tab. 6: Rozdělení pozitivních výsledků vyšetření podle stadia onemocnění

stadium	počet	počet v %
akutní fáze - primoinfekce	1206	60,1
doznívání akutní fáze, reinfekce	299	14,9
chronická fáze, anamnestické protilátky	502	25,0
celkem	2007	100,0



Graf 3: Rozdělení pozitivních výsledků vyšetření podle stadia onemocnění

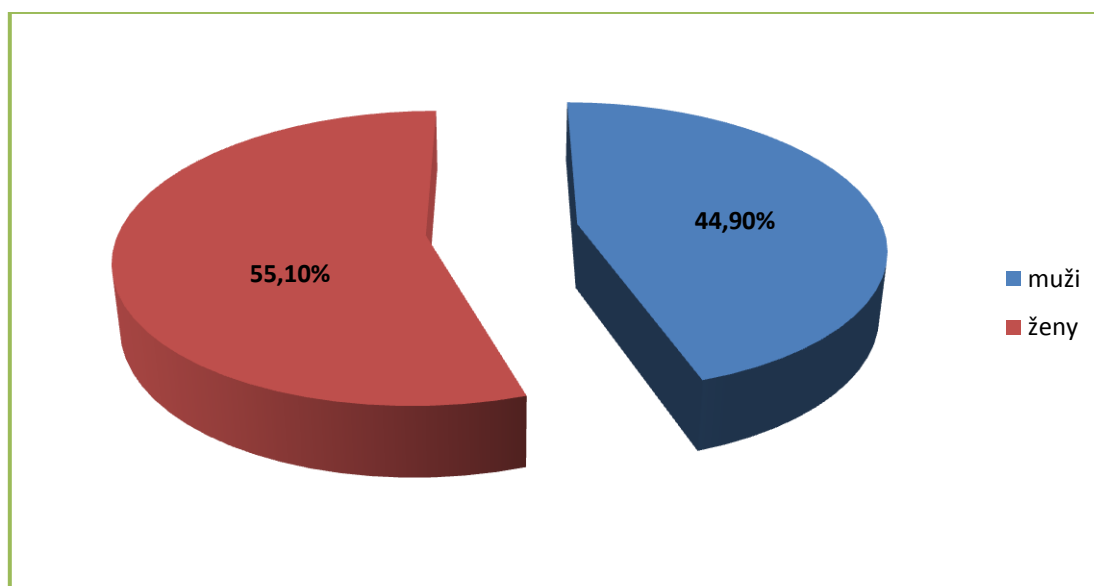
U rozdělení pozitivních výsledků vyšetření podle stadia onemocnění převládala z velké části akutní fáze – primoinfekce (60,1 %). Vysoké zastoupení akutní fáze infekce si lze vysvětlit tím, že vyšetření na průkaz protilátek proti borreliím bylo provedeno častěji u pacientů, u kterých se projeví typické příznaky primoinfekce. Takovým příznakem je EM. EM vzniká během několika dnů až týdnů po přisátí klíštěte. Lékař by měl ihned nasadit léčbu ATB a poslat pacienta na vyšetření nejdříve za 3-6 týdnů, kdy bude možné protilátky třídy IgM sérologickými testy detekovat. Typické příznaky onemocnění (EM, borreliový lymfocytom, ACA) nezpůsobují diagnostické problémy. Naopak u nespecifických potíží je diagnostika komplikovaná. Sérologické výsledky mohou být zavádějící, musí se zohlednit klinické projevy.

## 12.3 Rozdělení pozitivních výsledků vyšetření podle pohlaví

Pozitivní výsledky vyšetření jsem rozčlenila v závislosti na pohlaví a v tabulce č. 7 uvedla počet pozitivních mužů a žen. Počet pozitivních mužů a žen jsem vyjádřila také v procentech, která jsem znázornila v grafu č. 4.

Tab. 7: Rozdělení pozitivních výsledků vyšetření podle pohlaví

pohlaví	počet	počet v %
muži	902	44,9
ženy	1105	55,1
celkem	2007	100,0



Graf 4: Rozdělení pozitivních výsledků vyšetření podle pohlaví

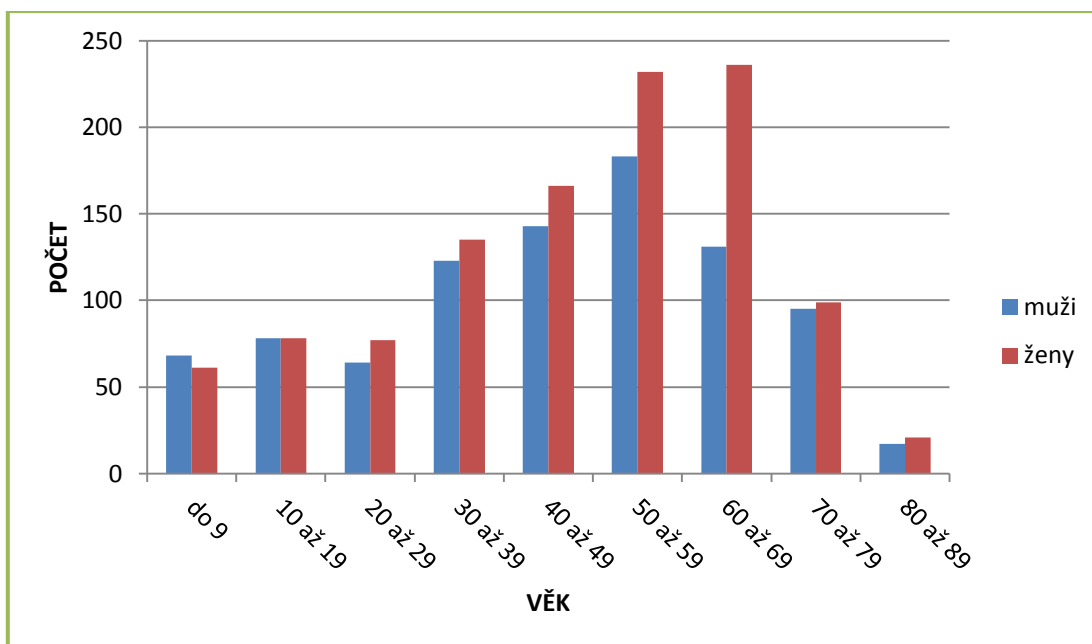
Literární zdroje uvádějí (např. Janovská, 2006), že LB mohou onemocnět lidé bez rozdílu v pohlaví. LB postihuje muže i ženy. Všeobecně ale platí, že jsou ženy postiženy častěji než muži v poměru muži/ženy 1:1,7. Tato skutečnost se potvrdila i v analýze dat, kdy bylo postiženo 55,1 % žen a 44,9 % mužů.

## 12.4 Rozdělení pozitivních výsledků vyšetření podle věku a pohlaví

Pro rozdělení pozitivních výsledků vyšetření v závislosti na věku a pohlaví jsem zavedla pro lepší přehlednost věkové kategorie po desetiletích a k jednotlivým kategoriím uvedla počet případů v závislosti na pohlaví. Výsledky jsem uspořádala do tabulky č. 8. Následně jsem vytvořila rozložení výsledků v grafu č. 5.

Tab. 8: Rozdělení pozitivních výsledků vyšetření podle věku a pohlaví

<b>věková kategorie</b>	<b>muži</b>	<b>ženy</b>	<b>celkem</b>
do 9 let	68	61	129
10 až 19 let	78	78	156
20 až 29 let	64	77	141
30 až 39 let	123	135	258
40 až 49 let	143	166	309
50 až 59 let	183	232	415
60 až 69 let	131	236	367
70 až 79 let	95	99	194
80 až 89 let	17	21	38
	902	1105	2007



Graf 5: Rozdělení pozitivních výsledků vyšetření podle věku a pohlaví

LB postihuje všechny věkové kategorie. Odborníci uvádějí (např. Janovská, 2006), že po 30. roce života dochází k výraznému vzestupu. Tuto skutečnost potvrdila i analýza. Dále se píše, že vrchol nastává mezi 45. až 49. rokem života a pak nastává pozvolný pokles. V analýze dat byl nejvyšší počet postižených žen LB v období září roku 2011 až říjen 2012 v Hradci Králové ve věku 60 až 69 let. Druhá největší skupina postižených žen byla ve věku 50 až 59 let. Muži byli nejčteněji postiženi ve věku 50 až 59 let. U obou pohlaví v dětském věku byl počet případů vyrovnaný.

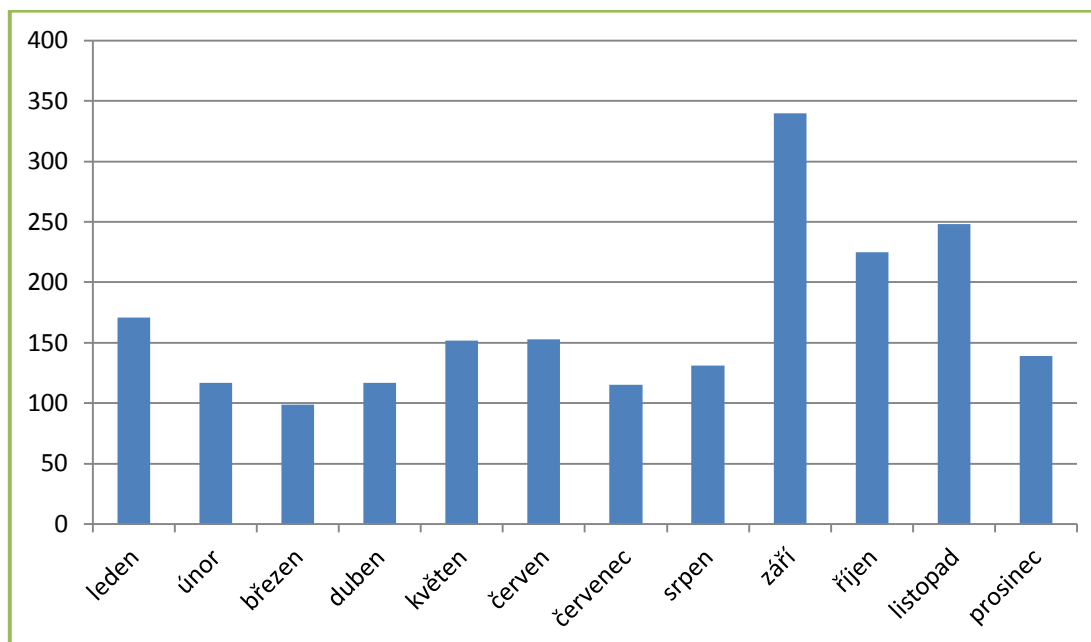
## 12.5 Rozdělení pozitivních výsledků vyšetření podle měsíce odběru

LB je onemocnění se sezónním výskytem. Výskyt je tedy závislý na ročním období a na zvýšeném pohybu lidí v přírodě. Počet pozitivních výsledků vyšetření jsem rozdělila v tabulce č. 9 do jednotlivých měsíců podle data odběru a doplnila grafickým znázorněním (graf č. 6).



Tab. 9: Rozdělení pozitivních výsledků podle měsíce odběru

měsíc	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
počet	171	117	99	117	152	153	115	131	340	225	248	139



Graf 6: Rozdělení pozitivních výsledků podle měsíce odběru

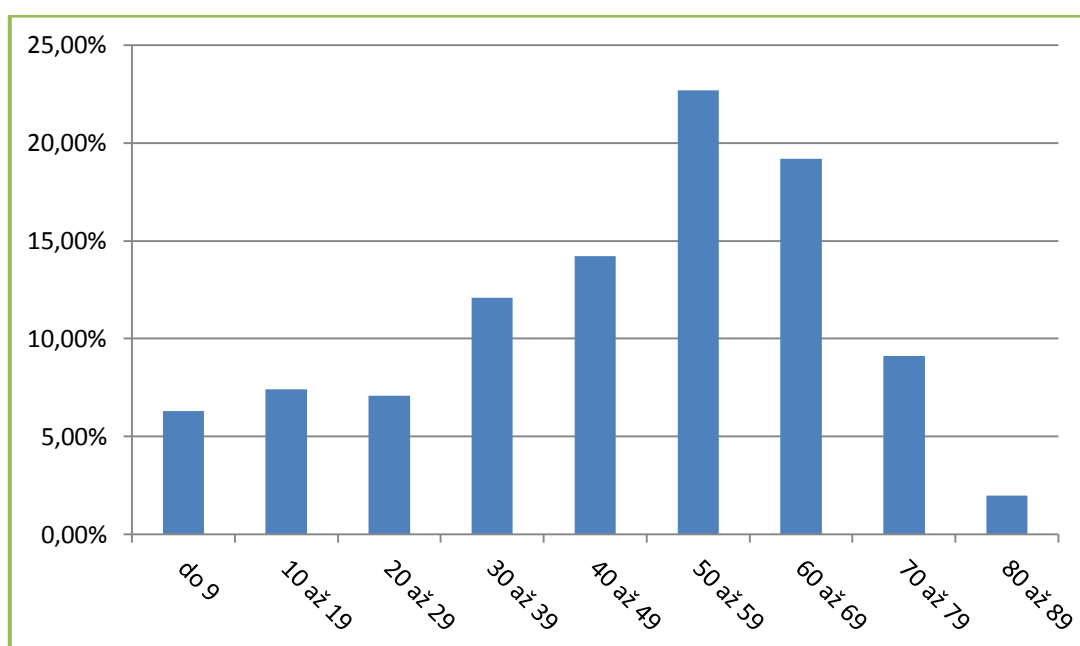
Dlouhý (1996) uvádí, že sezónní aktivita klíšťat ve střední Evropě začíná v březnu a končí v listopadu. Aktivita klíšťat má dva vrcholy. Nejvyšší výskyt jedinců je ze začátku léta (květen, červen) a menší vrchol přichází ještě s teplým a vlhkým podzimem (září). Nákaza je ovšem diagnostikována během celého roku. V analýze vyšel jako nejčastější měsíc odběru září, dále listopad a říjen. Výsledky analýzy jsou ovšem relativní vzhledem k inkubační době a různým klinickým projevům nákazy.

## 12.6 Rozdělení pozitivních výsledků vyšetření s diagnózou A69.2 podle věku

Z celkového počtu pozitivních výsledků vyšetření bylo 1100 pacientů s diagnózou A69.2 (lymeská nemoc). Rozdělení pacientů s diagnózou A69.2 v závislosti na věku znázorňuje graf č. 7 a konkrétní počty jsem uspořádala do tabulky č. 10.

Tab. 10: Rozdělení pozitivních výsledků vyšetření s diagnózou A69.2 podle věku

věková kategorie	počet	počet v %
do 9 let	69	6,3
10 až 19 let	81	7,4
20 až 29 let	78	7,1
30 až 39 let	133	12,1
40 až 49 let	156	14,2
50 až 59 let	250	22,7
60 až 69 let	211	19,2
70 až 79 let	100	9,1
80 až 89 let	22	2,0
Celkem	1100	100,0



Graf 7: Rozdělení pozitivních výsledků vyšetření s diagnózou A69.2 podle věku

Diagnóza A69.2 se nejvíce vyskytovala u pacientů ve věkové kategorii 50 až 59 let.

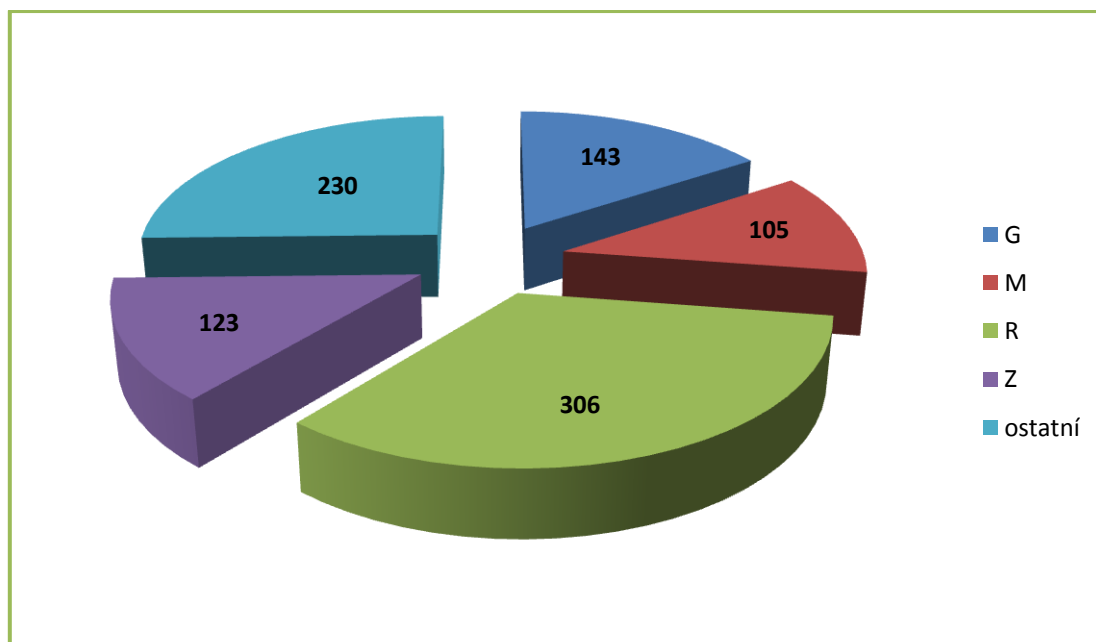
## 12.7 Rozdělení pozitivních výsledků vyšetření s diagnózou jinou než A69.2

V následujícím rozdělení uvádím četnost výskytu diagnóz jiných, než byla A69.2. Diagnózy, které byly méně frekventované, jsem zařadila do skupiny ostatní. Z důvodu výskytu velkého množství různých typů diagnóz byla skupina ostatní druhou nejčastější skupinou. Nejpočetnější byla skupina diagnóz R (příznaky, znaky a nálezy nezařazené jinde), kde byla dominantní diagnóza R69

(neznámé a neurčené příčiny nemoci). Dále převažovala skupina G (nemoci nervové soustavy), u které byly nejčastější diagnózy G35 (roztroušená skleróza) a G98 (jiné poruchy nervové soustavy nezařazené jinam). U skupiny Z (faktory ovlivňující zdravotní stav) byla hojně zastoupena diagnóza Z039 (pozorování pro podezření na nemoc nebo patologický stav) a u skupiny M (nemoci svalové a kosterní soustavy) to byly M2550 (bolest v kloubu, mnohočetné lokalizace) a M2559 (bolest v kloubu, lokalizace NS).

Tab. 11: Rozdělení pozitivních výsledků vyšetření s diagnózou jinou než A69.2

diagnóza	G	M	R	Z	ostatní	celkem
počet	143	105	306	123	230	907



Graf 8: Rozdělení pozitivních výsledků vyšetření s diagnózou jinou než A69.2

## 12.8 Určení nejčastěji odebíraného materiálu k vyšetření

Při určení biologického materiálu, který byl k vyšetření nejčastěji odebrán, jsem brala v úvahu i případy, u kterých byl výsledek vyšetření negativní. Ve výsledcích analýzy jasně převládalo sérum, které je nejčastěji odebíraným biologickým materiálem k vyšetření metodou ELISA. K vyšetření může být odebrán i punktát kloubu, který ovšem není ve výsledkové tabulce (tabulka č. 12)

uveden. Případy, u kterých byl odebrán punktát kloubu, patřily totiž mezi 69 vyškrtnutých případů z analýzy z důvodu absence výsledku vyšetření.

Tab. 12: Druhy odebraného biologického materiálu a jejich počet

<b>materiál</b>	<b>počet</b>	<b>počet v %</b>
<b>sérum</b>	6663	94,3
<b>likvor</b>	398	5,6
<b>plazma</b>	6	0,1
<b>celkem</b>	7067	100,0

## 13 Diskuze

V České Republice je LB nejčastějším onemocněním přenášené klíšťaty. V roce 2012 bylo hlášeno přibližně 3 304 případů. LB by neměla být podceňována vzhledem k poměrně častému výskytu, možným závažným komplikacím, problematické diagnostice a léčbě. Očkování proti nemoci dosud neexistuje.

Teoretickou část práce jsem zaměřila na obecnou charakteristiku infekčního agens, epidemiologii, patogenezi, prevenci, klinický obraz, diagnostiku a léčbu LB. Větší pozornost jsem věnovala typům laboratorní diagnostiky a její problematice, protože průkaz původce (Bbsl) je velmi obtížný. Metody laboratorní diagnostiky jsou přímé nebo nepřímé. Pouze přímé metody jsou ovšem schopny potvrdit přítomnost bakterie. Přímé metody jsou složité, časově náročné a určené pouze pro specializované laboratoře (např. Národní referenční laboratoř ve Státním zdravotním ústavu) a výzkumné účely. Ve většině laboratoří se k vyšetření používají nepřímé metody. Nejčastěji používanou metodou je ELISA. ELISA detekuje přítomnost antiborreliových protilátek třídy IgM, které se vytvářejí první (3 – 6 týdnů po kousnutí klíštětem) a jsou následovány protilátkami třídy IgG. Protilátky se vyšetřují v krvi, likvoru a synoviální tekutině. Dnes je k dispozici mnoho druhů komerčně vyráběných souprav, které využívají k detekci různé druhy antigenů. Konfirmace metodou Western blot by se měla provést v případě pozitivního nebo hraničního výsledku testu ELISA a u negativních pacientů s odpovídajícími klinickými příznaky. Western blot je přesnější a citlivější metoda než ELISA.

U sérologických vyšetření je nutné počítat s možným výskytem falešně pozitivních i falešně negativních výsledků. Falešně pozitivní výsledky mohou nastat v těchto případech:

- zkřížená reakce s jinými spirochétami (leptospira, treponema, babesia)
- gravidita
- přítomnost revmatoidního faktoru nebo antinukleárních protilátek
- protilátky se nacházejí u 10% zdravé populace

Příčin falešné negativity může být mnoho:

- nepřilíh velká citlivost a přesnost metody ELISA
- koncentrace protilátek je příliš nízká pro detekci
- včasné zahájení antibiotické léčby

- test proběhl v době, kdy ještě nebyly protilátky v biologickém materiálu detekovatelné
- tvorba imunokomplexů antigen-protilátka
- slabší imunitní odpověď organismu
- laboratorní chyba (internet 16).

Během uzdravování dochází k poklesu IgM protilátek a protilátky IgG narůstají, poté IgM vymizí a IgG klesají. Ve většině případů se ale nacházejí kolísavé nálezy. IgG protilátky mohou přetrvávat v těle několik let po infekci. U některých případů s chronickým průběhem nemoci může dojít k nálezu IgM protilátek místo očekávaných IgG protilátek, protože bakterie má schopnost obměňovat svou antigenní strukturu a zmást tak organismus. Dalším důvodem obtížné diagnostiky je heterogenita borrelií v Evropě, která je příčinou vysoké variability antigenů u borrelií (internet 10).

V některých případech se protilátky nemusejí vůbec začít tvořit. Takovým případem je včasné nasazená léčba, vyvázání protilátek do imunokomplexů nebo porucha obranyschopnosti (Durovska, 2010).

V analytické části práce jsem provedla statistickou analýzu výběrového souboru výsledků vyšetření protilátek proti borreliím metodou ELISA a provedla ověření základních charakteristik nákazy. Z celkového počtu vyšetření (7067) byla zjištěna séronegativita u přibližně 70 % případů. Negativní výsledek nemusí znamenat nepřítomnost onemocnění. Je nutné brát v úvahu možný výskyt falešně negativních výsledků, jejichž příčiny jsem uvedla výše. Pozitivní výsledky vyšetření jsem rozdělila podle typu pozitivity protilátek do stádia akutní fáze (IgM+/IgG-), doznívání akutní fáze onemocnění nebo reinfekce (IgM+/IgG+) a chronické fáze (IgM-/IgG+). Z 60 % se akutní fáze ukázala jako převládající stádium onemocnění. Dominující akutní stádium si lze vysvětlit častějším vyšetřením u případů s typickými projevy primoinfekce. Takové projevy jsou snadněji diagnostikovány na rozdíl od nescifických potíží u chronické fáze onemocnění.

Odborníci uvádějí (např. Janovská, 2006), že LB častěji postihuje ženy než muže v poměru 1:1,7. Dále se uvádí, že vrchol nastává mezi 45. až 49. rokem života a poté nastává mírný pokles. Analýza prokázala, že byly skutečně častěji postiženy ženy (55%). Věková kategorie s nejčastějším výskytem choroby byla u

žen ve věku 60 až 69 let a u mužů ve věku 50 až 59 let. V dětském věku byl výskyt v závislosti na věku a pohlaví vyrovnaný.

Diagnostika nákazy se provádí během celého roku. Největší množství případů nákazy je hlášeno v teplých měsících, ale lymeská borrelióza nemá tak úplně typický sezónní výskyt kvůli různé inkubační době a různým klinickým projevům. V analýze jsem vyhodnotila jako nejčastější měsíc odběru září.

Z celkového počtu pozitivních výsledků se ukázala jako převládající diagnóza A69.2 (lymeská nemoc). U zbylých případů se vyskytovalo velké množství různých diagnóz: neznámé a neurčené příčiny nemoci, roztroušená skleróza, jiné poruchy nervové soustavy, pozorování pro podezření na nemoc nebo patologický stav, nemoci svalové a kosterní soustavy, bolest v kloubu a další. Svědčí to o různých klinických projevech nákazy.

Vysoký výskyt, závažnost nemoci, neexistující očkování, různý klinický obraz, komplikovaná diagnostika a léčba vytváří z LB onemocnění, které je stále předmětem intenzivního výzkumu.

## 14 Závěr

Jedním z cílů bakalářské práce bylo vytvořit shrnutí hlavních dosud známých poznatků o LB. Zaměřila jsem se především na možnosti dnešní laboratorní diagnostiky LB a úskalí, která komplikují průkaz nemoci. Základem diagnostiky je vyšetření protilátek proti borreliím metodou ELISA, která se provádí ve většině laboratoří. Pozitivní testy vyšetření by měly být následně potvrzeny pomocí WB. Největší šanci na uzdravení mají pacienti, u kterých je onemocnění diagnostikováno včas a je ihned zahájena léčba pomocí ATB. Chronický průběh onemocnění se vyznačuje rozličnými klinickými projevy, je hůře diagnostikován a léčen. Diagnóza je vždy individuální a měla by vycházet z výsledků laboratorních vyšetření a potíží pacienta.

Dalším cílem bylo pomocí popisné statistiky vyhodnotit datový soubor výsledků vyšetření protilátek proti borreliím metodou ELISA od pacientů, kteří byli vyšetřeni ve Fakultní nemocnici Hradec Králové v období září roku 2011 až srpen 2012. Vypracovala jsem přehled o stavu onemocnění v Hradci Králové a jeho blízkém okolí. Porovnála jsem výsledky analýzy s obecně známými poznatky o nemoci, které se v analýze podařilo potvrdit.



## 15 Použitá literatura a zdroje

- BARTŮNĚK, P.: *Historie* in: BARTŮNĚK, P. a kol. (2006): *Lymeská borelióza*, 3., přepracované a doplněné vydání, Grada, Praha, ISBN 80-247-1543-0, [s. 11]
- BARTŮNĚK, P. a kol. (2006): *Lymeská borelióza*, 3., přepracované a doplněné vydání, Grada, Praha, ISBN 80-247-1543-0
- BARTŮNĚK P. (1996): *Lymeská karditida*, Grada, Praha, ISBN 80-7169-357-X, [s. 23]
- BARTŮNĚK, P.: *Prevence* in: BARTŮNĚK, P. a kol. (2006): *Lymeská borelióza*, 3., přepracované a doplněné vydání, Grada, Praha, ISBN 80-247-1543-0, [s. 60]
- BOJAR, M. (1996): *Lymeská borrelióza: diagnostika, léčba, postižení nervového systému*, Maxdorf Jessenius, Praha, ISBN 80-85800-35-7, [s. 19, 20, 23, 35, 36, 45, 192]
- BOLEHOVSKÁ, R., PLÍŠEK, S., PLÍŠKOVÁ, L., ČERMÁKOVÁ, Z., PALIČKA, V., (2009): *Lymeská borelióza*, Klin. Biochem. Metab., roč. 17, č. 1, [s. 24-28]
- DLOUHÝ, P. (1996): *Lymeská borelióza v praxi*, Psychiatrické centrum, Praha, ISBN 80-85121-40-9, [s. 11, 12, 14, 16-19]
- DUROVSKA, J., BAZOVSKA, S., ONDRISOVA, M., PANCAK, J. (2010): *Our experience with examination of antibodies against antigens of Borrelia burgdorferi in patients with suspected Lyme disease*, Bratisl Lek Listy, roč. 111, č. 3, [s. 153]
- FRASER, M. CLAIRE et al. (1997): *Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, Borrelia burgdorferi*, Nature, roč. 390, č. 11, [s. 580-586]
- HAVLÍK, J. et al. (2002): *Infekční nemoci*, druhé rozšířené vydání, Galén, Praha, [s. 119, 121, 122]
- HERCOGOVÁ, J.: *Postižení kůže* in: BARTŮNĚK, P. a kol. (2006): *Lymeská borelióza*, 3., přepracované a doplněné vydání, Grada, Praha, ISBN 80-247-1543-0, [s. 62, 63, 64, 68]
- HULÍNSKÁ, D.: *Laboratorní diagnostika* in: BARTŮNĚK, P. a kol. (2006): *Lymeská borelióza*, 3., přepracované a doplněné vydání, Grada, Praha, ISBN 80-247-1543-0, [s. 53, 55]
- HULÍNSKÁ, D.: *Mikrobiologie* in: BARTŮNĚK, P. a kol. (2006): *Lymeská borelióza*, 3., přepracované a doplněné vydání, Grada, Praha, ISBN 80-247-1543-0, [s. 14-20]
- HULÍNSKÁ, D., DŘEVOVÁ, H., GODOVÁ, T., (2000): *Kultivace a identifikace Borrelia burgdorferi sensu lato z klinického materiálu*, Zprávy CEM, roč. 9, č. 12, [s. 491-495]

- JANOVSÁ, D.: *Epidemiologická situace v České republice* in: BARTŮŇEK P a kol. (2006): *Lymeská borelióza*, 3., přepracované a doplněné vydání, Grada, Praha, ISBN 80-247-1543-0, [s. 26-30, 38]
- KRBKOVÁ, L. (2007): *Lymeská borrelióza*, Med. Pro Praxi, č. 5, [s. 200-203]
- KŘUPKA, M., RAŠKA, M., WEIGL, E. (2009): *Lymeská borelióza – biologie, patogeneze, diagnostika a léčba*, Dermatológia pre prax, roč. 3, č. 1, [s. 236-239]
- PÍCHA, D.: *Patogeneze* in: BARTŮŇEK, P. a kol. (2006): *Lymeská borelióza*, 3., přepracované a doplněné vydání, Grada, Praha, ISBN 80-247-1543-0, [s. 45]
- ROHÁČOVÁ, H. (2005): *Lymeská borelióza, farmakoterapie pro praxi*, Jessenius Maxdorf, Praha, ISBN 80-7345-071-2, [s. 13]
- ŠIMŮNEK, T., přednáška Izolace DNA – molekulární biologie, UK FAF HK
- VOTAVA, M. a kol. (2003): *Lékařská mikrobiologie speciální*, Neptun, Brno, ISBN 80-902896-6-5, [s. 195]
- (internet 1) <http://www.borreliie.cz/>
- (internet 2) <http://www.biopticka.cz/sluzby/molekularni-genetika/vyzkum-BB.html>
- (internet 3) [http://www.borelioza.cz/cs/test\\_western\\_blot/](http://www.borelioza.cz/cs/test_western_blot/)
- (internet 4) [http://www.dynex.cz/files/download/EUROLINE-WB\\_VlsE\\_cz\\_OBR1432.pdf](http://www.dynex.cz/files/download/EUROLINE-WB_VlsE_cz_OBR1432.pdf)
- (internet 5) *Lymeská borrelióza-epidemiologická data do roku 2011*, Státní zdravotní ústav, dostupné z: <http://www.szu.cz/tema/prevence/lymeska-borrelioza-epidemiologicka-data>
- (internet 6) *Vybrané infekční nemoci v ČR v letech 2003-2012-relativně*, Státní zdravotní ústav, dostupné z: <http://www.szu.cz/publikace/data/vybrane-infekcni-nemoci-v-cr-v-letech-2003-2012-relativne>
- (internet 7) *Vybrané infekční nemoci v ČR v letech 2003-2012-absolutně*, Státní zdravotní ústav, dostupné z: <http://www.szu.cz/publikace/data/vybrane-infekcni-nemoci-v-cr-v-letech-2003-2012-absolutne>
- (internet 8) <http://www.borelioza.cz/cs/prevence/>
- (internet 9) [http://www.borelioza.cz/cs/lecba\\_boreliozy/](http://www.borelioza.cz/cs/lecba_boreliozy/)
- (internet 10) <http://www.borelioza.cz/cs/diagnostika/>
- (internet 11) [http://atlases.muni.cz/atlases/kuze/atl\\_cz/main+uvod+immunofluor.html](http://atlases.muni.cz/atlases/kuze/atl_cz/main+uvod+immunofluor.html)
- (internet 12) [http://www.borelioza.cz/cs/test\\_elisa/](http://www.borelioza.cz/cs/test_elisa/)
- (internet 13) <http://www.wikiskripta.eu/index.php/ELISA>

- (internet 14) [http://old.lf3.cuni.cz/mikrobiologie/bak/vseob/P2v/serologie\\_vs\\_tisk.pdf](http://old.lf3.cuni.cz/mikrobiologie/bak/vseob/P2v/serologie_vs_tisk.pdf)
- (internet 15) <http://laborator.nemsne.cz/metody/laboratorni-metody/soubory/borreliab.pdf>
- (internet 16) <http://www.ou-nem.cz/lab/prirucka/HVEZDALAMG.htm>

# Seznam obrázků, tabulek a grafů

## OBRÁZKY

Obr. 1 – Objevitel původce LB – Willy Burgdorfer .....	14
Zdroj: <a href="http://www.niaid.nih.gov/topics/lymedisease/research/pages/cause.aspx">http://www.niaid.nih.gov/topics/lymedisease/research/pages/cause.aspx</a>	
Obr. 2 – Buněčná struktura <i>Borrelia burgdorferi</i> .....	15
Zdroj: <a href="http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Borrelia_burgdorferi_NEU2011">http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Borrelia_burgdorferi_NEU2011</a>	
Obr. 3 – Klíště rodu <i>Ixodes</i> .....	24
Zdroj: <a href="http://www.biolib.cz/cz/taxonimage/id23480/?taxonid=76144">http://www.biolib.cz/cz/taxonimage/id23480/?taxonid=76144</a>	
Obr. 4 – Samička sající krev z hostitele.....	27
Zdroj: <a href="http://www.hafbezobav.cz/clanek-2009032701-Lymska-borelioza.html">http://www.hafbezobav.cz/clanek-2009032701-Lymska-borelioza.html</a>	
Obr. 5 – <i>Erythema migrans</i> .....	30
Zdroj: <a href="http://lymepedia.org/lyme-disease-bullseye-rash-erythema-migrans-rarely-seen-during-relapse-in-chronic-cases-of-the-disease/">http://lymepedia.org/lyme-disease-bullseye-rash-erythema-migrans-rarely-seen-during-relapse-in-chronic-cases-of-the-disease/</a>	
Obr. 6 – Borreliový lymfocytom .....	31
Zdroj: <a href="http://www1.lf1.cuni.cz/~hrozs/zoopch1.htm">http://www1.lf1.cuni.cz/~hrozs/zoopch1.htm</a>	
Obr. 7 – <i>Acrodermatitis chronica atrophicans</i> .....	31
Zdroj: <a href="http://www1.lf1.cuni.cz/~hrozs/zoopch1.htm">http://www1.lf1.cuni.cz/~hrozs/zoopch1.htm</a>	
Obr. 8 – Pozitivní imunofluorescence .....	36
Zdroj: <a href="http://www.tumblr.com/tagged/borrelia">http://www.tumblr.com/tagged/borrelia</a>	
Obr. 9 – Princip metody ELISA.....	37
Zdroj: <a href="http://www.virology.ws/2010/07/16/detection-of-antigens-or-antibodies-by-elisa/">http://www.virology.ws/2010/07/16/detection-of-antigens-or-antibodies-by-elisa/</a>	
Obr. 10 – Western blot.....	37
Zdroj: <a href="http://ioei.org/index.php?id=1273&amp;L=0">http://ioei.org/index.php?id=1273&amp;L=0</a>	

## TABULKY

Tab. 1 – Přehled druhů Bbsl a jejich výskyt .....	17
Zdroj: Roháčová, 2005	
Tab. 2 – Typizace Bbsl – vztah mezi druhy borrelií, typem OspA a OspC.....	22
Zdroj: Janovská, 2006	

Tab. 3 – Počet hlášených případů onemocnění LB v letech 1986-2012.....	23
Zdroj: Janovská, 2006 a <a href="http://www.szu.cz/publikace/data/vybrane-infekcni-nemoci-v-cr-v-letech-2003-2012-absolutne">http://www.szu.cz/publikace/data/vybrane-infekcni-nemoci-v-cr-v-letech-2003-2012-absolutne</a>	
Tab. 4 – Doporučená antibiotika při léčbě LB .....	34
Zdroj: Havlík, 2002	
Tab. 5 – Rozložení výsledků vyšetření na pozitivní a negativní.....	44
Zdroj: vlastní	
Tab. 6 – Rozložení pozitivních výsledků vyšetření podle stadia onemocnění...	45
Zdroj: vlastní	
Tab. 7 – Rozložení pozitivních výsledků vyšetření podle pohlaví.....	46
Zdroj: vlastní	
Tab. 8 – Rozložení pozitivních výsledků vyšetření podle věku a pohlaví .....	47
Zdroj: vlastní	
Tab. 9 – Rozložení pozitivních výsledků vyšetření podle měsíce odběru .....	49
Zdroj: vlastní	
Tab. 10 – Rozložení pozitivních výsledků vyšetření s diagnózou A69.2 podle věku.....	50
Zdroj: vlastní	
Tab. 11 – Rozložení pozitivních výsledků vyšetření s diagnózou jinou než A69.2 .....	51
Zdroj: vlastní	
Tab. 12 – Druhy odebraného biologického materiálu a jejich počet .....	52
Zdroj: vlastní	

## GRAFY

Graf 1 – Incidence LB v České republice v letech 1986-2012.....	24
Zdroj: Janovská, 2006	
Graf 2 – Rozložení výsledků vyšetření na pozitivní a negativní.....	44
Zdroj: vlastní	
Graf 3 – Rozdělení pozitivních výsledků vyšetření podle stadia onemocnění ..	45
Zdroj: vlastní	

Graf 4 – Rozdělení pozitivních výsledků vyšetření podle pohlaví .....	46
Zdroj: vlastní	
Graf 5 – Rozdělení pozitivních výsledků vyšetření podle věku a pohlaví.....	48
Zdroj: vlastní	
Graf 6 – Rozdělení pozitivních výsledků vyšetření podle měsíce odběru .....	49
Zdroj: vlastní	
Graf 7 – Rozdělení pozitivních výsledků vyšetření s diagnózou A69.2 podle věku.....	50
Zdroj: vlastní	
Graf 8 – Rozdělení pozitivních výsledků vyšetření s diagnózou jinou než A69.2 .....	51
Zdroj: vlastní	