

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



Diagnostika Lymeské borreliózy

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Vedoucí bakalářské práce: PharmDr. Barbora Voxová

HRADEC KRÁLOVÉ 2015

Kateřina Bařtová

„Prohlašuji, že tato 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 jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové dne 18.8.2015

Děkuji PharmDr. Barboře Voxové za odborné vedení bakalářské práce.
Děkuji také RNDr. Petru Kodymovi, RNDr. Kateřině Kybicové, Ph.D.
a Mgr. Lence Uherkové, Ph.D. za cenné rady při zpracování této práce a za
poskytnutí fotodokumentace.

Abstrakt

Lymeská borrelióza je multisystémové infekční onemocnění přenášené spirochetou *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Přenos je uskutečněn kousnutím klíštěte rodu *Ixodes*, které se vyskytuje v Evropě, Spojených státech a v Asii. Během třech stádií onemocnění se vyskytuje široká řada klinických příznaků. Prvním příznakem může být rozvoj kruhového exantému, erythema migrans nebo borreliový lymfocytom. Často pozorovaným průvodním jevem jsou příznaky podobné chřipkovému onemocnění. Dominují bolesti hlavy a svalová slabost. Mezi nejčastější projevy dalších stádií onemocnění patří meningitida, lymeská artritida, lymeská karditida a acrodermatitis chronica atrophicans. Vzhledem ke zvyšující se incidenci, obtížné interpretaci laboratorních výsledků a problematické léčbě představuje lymeská borrelióza výrazný zdravotní a socioekonomický problém. Základem pro určení správné diagnózy je klinické vyšetření pacienta a správná interpretace výsledků laboratorního vyšetření. V laboratorní diagnostice je využíváno metod přímého i nepřímého průkazu patogenního agens.

Mezi přímé diagnostické metody patří kultivace ve speciálním tekutém médiu, mikroskopie v zástině, elektronová mikroskopie, histologické metody a molekulárně biologické metody (např. polymerázová řetězová reakce PCR, sekvenace, hybridizace). Metody nepřímého průkazu jsou založené na detekci anti-borreliových protilátek IgM a IgG. Patří k nim imunochemické metody (ELISA), Western blot a nepřímá fluorescenční metoda IFA. V doporučeném diagnostickém postupu je metodou první volby ELISA. Pozitivní výsledky této metody by vždy měly být potvrzeny Western blotem z téhož vzorku. PCR metody by měly být využívány k vyšetřování bioptických vzorků a synoviální tekutiny. Ostatní metody slouží především k vědeckým účelům.

Klíčová slova: lymeská borrelióza, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, klíště, klinické příznaky, laboratorní diagnostika

Abstract

Lyme disease is a multisystem infectious disease transmitted by the *Borrelia burgdorferi* sensu lato spirochete. Transmission is effected by the bite of the genus *Ixodes* tick, which naturally occurs in Europe, the United States and Asia. During the three stages of the disease a wide variety of clinical symptoms occur. The first symptom may be the development of a circular rash, erythema migrans or borreliolymphocytoma. A frequently observed side effect is the flu-like symptoms of the disease, dominated by headache and muscle weakness. The most common manifestations of the further stages of the disease include meningitis, Lyme arthritis, Lyme carditis and acrodermatitis chronica atrophicans. Because of the increasing incidence of difficult to interpret laboratory results and problematic treatment, Lyme disease is a major health and socioeconomic problem. The basis for determining the correct diagnosis is a clinical examination of the patient and the correct interpretation of the laboratory test results. The laboratory diagnosis utilizes methods of direct and indirect proof of the presence of pathogenic agents.

The direct diagnostic methods include culturing in a special liquid medium, dark field microscopy, electron microscopy, histological methods and molecular biological methods (e.g. polymerase chain reaction PCR, sequencing, hybridization). Indirect methods are based on the detection of anti-IgM and IgG *Borrelia* antibodies. These include immunochemical methods (ELISA), Western blot and the indirect fluorescence method (IFA). In the recommended diagnostic procedure, ELISA is the first choice. Positive test results obtained by using this method should, however, always be confirmed by Western blot analysis of the same sample. PCR methods should be used for the investigation of biopsy samples and synovial fluid. Other methods are used primarily for scientific purposes.

Keywords: Lyme disease, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, tick, clinical symptoms, laboratory diagnostics

Obsah

Úvod.....	7
Cíl práce.....	8
1. Původce onemocnění.....	9
1.1. Anatomie a morfologie.....	9
1.2. Genom bakterie <i>Borrelia burgdorferi</i>	10
1.3. Antigenní struktura.....	12
1.4. Povrchové antigeny Osp.....	12
1.5. Další antigeny borrelíí.....	13
1.6. <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato – genospecies.....	15
1.7. Způsob přenosu.....	16
2. Vektor onemocnění.....	18
2.1. Životní cyklus klíštěte.....	18
2.2. Výskyt klíšťat.....	19
2.3. Předpověď aktivity klíštěte obecného na území České republiky.....	19
2.4. Prevence napadení klíštětem a přenosu infekce.....	20
2.5. Odstranění a likvidace přisátého klíštěte.....	21
3. Klinické příznaky lymeské borreliózy.....	22
3.1. Časné lokalizované stádium.....	22
3.2. Časné diseminované stádium.....	23
3.2.1. Kožní projevy.....	23
3.2.2. Neurologické projevy.....	24
3.2.3. Muskuloskeletární projevy.....	24
3.2.4. Oční projevy.....	25
3.3. Pozdní stádium.....	25
3.3.1. Kožní projevy.....	25
3.3.2. Neurologické projevy.....	26
3.3.3. Oční projevy.....	26
3.4. Lymeská borrelióza v těhotenství.....	27
4. Laboratorní diagnostika lymeské borreliózy.....	28
4.1. Metody přímého průkazu.....	28
4.1.1. Mikroskopie v zástinu.....	29
4.1.2. Kultivace.....	30
4.1.3. PCR.....	31
4.1.4. ELEKTRONOVÁ MIKROSKOPIE.....	35
4.2. Metody nepřímého průkazu.....	36
4.2.1. IFA.....	36
4.2.2. ELISA.....	37
4.2.3. WESTERN BLOT.....	38
4.3. Další laboratorní parametry pozorované u Lymeské borreliózy.....	39
5. Diskuze.....	40
Závěr.....	42
Seznam obrázků.....	43
Seznam zkratk.....	44
Seznam literatury.....	46

Úvod

Lymeská borrelióza (LB) je infekční multisystémové onemocnění vyvolané mikroaerofilní, gramnegativní spirochetou *Borrelia burgdorferi* sensu lato přenášenou především klíšťaty rodu Ixodes. Toto onemocnění je rozšířené v Evropě, Asii a Severní Americe. V české republice patří k nejrozšířenějším antropozoonózám.

V současnosti představuje lymeská borrelióza výrazný zdravotní a socioekonomický problém. Je to způsobeno především zvyšující se incidencí, obtížemi v interpretaci výsledků laboratorního vyšetření, problematickou léčbou a možností přechodu k chronickému onemocnění s relapsy tzv. Post-Lyme Disease Syndrome¹. Příčina relapsů zatím nebyla objasněna, proto se současná diagnostika v těchto případech zaměřuje především na možnost perzistence malého množství intracelulárních borrelií a na imunitní odpověď organismu.

Základem pro diagnostiku tohoto onemocnění je klinické vyšetření pacienta a laboratorní výsledky. Samotné určení diagnózy „lymeská nemoc (A69.2)“ je velmi náročné vzhledem k vysoké variabilitě klinických obtíží a genotypové i fenotypové heterogenitě borrelií. Další komplikací ve stanovení diagnózy je nízký počet borrelií v tělesných tekutinách a změny exprese antigenů v závislosti na prostředí. V laboratorní diagnostice využíváme metody přímého i nepřímého průkazu. Mezi přímé metody patří kultivace ve speciálním tekutém médiu, mikroskopie v zástínu, elektronová mikroskopie (ELM), histologické metody a molekulárně biologické metody (PCR, sekvenace, hybridizace). V běžné laboratorní praxi se více využívají metody nepřímé, založené na detekci protilátek. Patří k nim ELISA, Western blot a IFA.

Terapie lymeské borreliózy by měla být zahájena až po celkovém zhodnocení stavu pacienta. Nedoporučuje se nasadit léčbu na základě průkazu protilátek bez klinických příznaků, nebo pouze preventivně po přisátí klíštěte. V terapii lymeské borreliózy se uplatňují především antibiotika (ATB). Přestože je *Borrelia burgdorferi* sensu lato poměrně citlivá na řadu ATB, výsledky léčby tomu v mnoha případech neodpovídají. Obecně platí, že při časném záchytu tohoto onemocnění stoupá pravděpodobnost úspěchu terapie. V souvislosti s ATB léčbou existují problémy s citlivostí borrelií *in vivo* a *in vitro*. V pozdních stádiích může aplikovaná léčba zmírnit progresi onemocnění, ale nastalé morfologické změny jsou již ireverzibilní.

Cíl práce

Cílem práce bylo podat ucelený obraz onemocnění lymeská borrelióza, upozornit na úskalí laboratorní diagnostiky tohoto onemocnění a zaměřit se na nové trendy ve vyšetřování na specializovaných pracovištích.

1. Původce onemocnění

Původcem lymeské borreliózy je *Borrelia burgdorferi* sensu lato patřící do čeledi *Spirochaetaceae*, řád *Spirochaetales*. Pojmenovaná byla podle francouzského mikrobiologa A. Borrela, který na počátku 20. století publikoval několik prací o *Spirillum gallinarum* (dnes *Borrelia burgdorferi*)².

1.1. Anatomie a morfologie

Borrélie je pohyblivá, mikroaerofilní, gramnegativní spirocheta vyznačující se tenkým, spirálově vinutým tvarem o průměru cca 0,2 μm a délkou 4-30 μm . Obsahuje 4-15 nepravidelných závitů ve vzdálenosti kolem 2,2 μm . Na obou koncích buňky vystupují z bazálních disků umístěných v cytoplazmatické membráně bičíky, které obtáčí tělo borrelié pod vnější buněčnou stěnou. Borrélie se pohybují rychlým rotačním pohybem či smršťováním a natahováním. Tento aktivní pohyb jim umožňuje překonat epiteliální i hemoencefalickou bariéru. Borrélie pronikají též do dendritických buněk, fibroblastů a makrofágů, kde jsou schopny přežívat. Buněčnou stěnu mají složenou ze tří vrstev. Vnitřní peptidoglykanová, střední polysacharidová a vnější lipoproteinová. Stěna je oddělena periplazmatickým prostorem od cytoplazmatické membrány. Buněčná stěna se vyznačuje velkou flexibilitou jednotlivých vrstev, což umožňuje vysunutí bičíků jak v proximálním, tak i v distálním směru, tvorbu cyst a vylučování membranózních vezikulů, které mají stejnou stavbu jako cytoplazmatická membrána a obsahují plasmidovou výbavu. Fluidita vnější membrány umožňuje posun antigenních molekul a buněčných receptorů významných pro adhezi k buňkám hostitele. Od ostatních spirochet se odlišuje přítomností intramembranózních tělísek v podobě fibrilárních a vezikulárních útvarů podobných glykokalyxu buněk, které byly prokázány v ELM (obrázek 1, citace^{3,4}).



Obrázek č. 1. *Borrelia burgdorferi* v elektronovém mikroskopu (RNDr. Dagmar Hulínská, CSc., SZÚ)

V suboptimálních podmínkách tvoří borrelie non-spirální formy – cysty a L formy se sníženou metabolickou aktivitou (Obrázek 2).



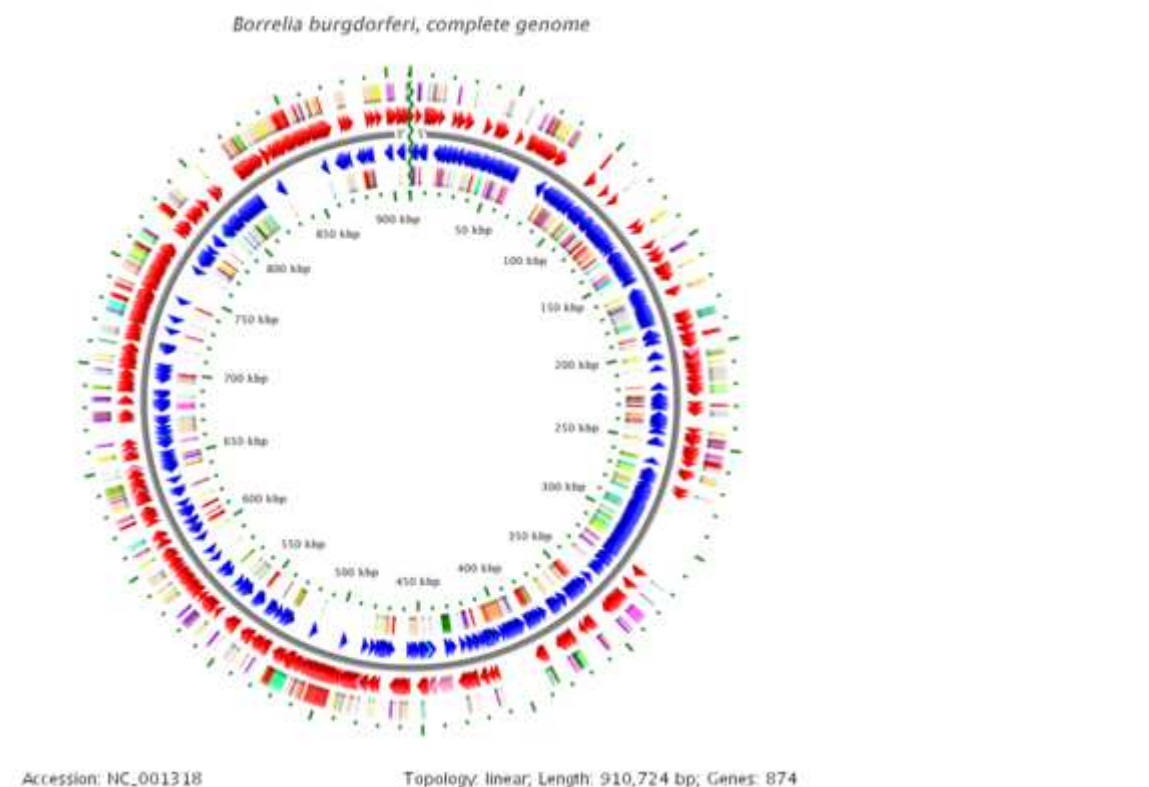
Obrázek č. 2. Růst mladé borrelie z cysty, ELM (RNDr. Hulínská, CSc., SZÚ)

1.2. Genom bakterie *Borrelia burgdorferi*

Borrelia burgdorferi (Bb) je jedním z organismů, u kterého je známa sekvence celého genomu. V roce 1997 byly publikovány první výsledky sekvenace⁵. V roce 2000 bylo sekvenování dokončeno (obrázek 3, citace⁶). Na lineárním chromozomu Bb sekvenovaného kmene B31 o délce 910 725 párů bází bylo lokalizováno 853 genů kódujících proteiny pro replikaci, transkripci, translaci, transport solí a energetický metabolismus. Genom obsahuje sekvence pro syntézu lipoproteinů vnější membrány, ale sekvence pro biosyntézu složek této membrány – aminokyselin (AMK) a mastných kyselin, a dále nukleotidů a kofaktorů enzymů chybí. Tyto složky musí Bb získávat

z hostitelského organismu. Tímto se mohou vysvětlovat vysoké nároky borrelíí na kultivaci *in vitro*. Borrelie jsou typické omezenou metabolickou výkonností. Primárním zdrojem energie je glukóza. Glykolýzou však mohou být využity i další sacharidy (fruktóza, maltóza) glukosamin a glycerol. Produkt glykolýzy (pyruvát) je přeměňován na laktát. Geny kódující proteiny oxidativní fosforylace či Krebsova cyklu nebyly dosud identifikovány. Produkci ATP dosahuje borrelie substrátovou fosforylací. Průměrná molekulová hmotnost proteinů kódovaných na chromosomu je 37 529.

Osekvenovaný kmen B31 obsahuje minimálně 17 plasmidů, 9 lineárních (pro OspA, OspB a VlsE antigeny) a 12 cirkulárních (pro OspC antigen). Některé plasmidy se mohou během kultivace ztrácet. Ztrátou plasmidů dojde ke ztrátě vnějších variabilních proteinů a tedy i ke ztrátě virulence.



Obrázek č. 3. Kompletní genom bakterie *Borrelia burgdorferi* (http://en.citizendium.org/wiki/File: Borrelia_genome.png)

1.3. Antigenní struktura

Bb má celou řadu povrchových antigenů proteinové i neproteinové povahy. Identifikace těchto antigenů je velmi důležitá, protože povrchové antigeny jsou zodpovědné za imunitní odpověď hostitele – vyvolávají tvorbu protilátek. Tohoto principu se využívá jak v diagnostice (metody ELISA, WB a IFA), tak ve výzkumu pro vývoj vakcíny. Imunizace proteiny OspA, OspB, OspC nebo OspF zajišťuje efektivní ochranu zvířat v experimentu. Jednotlivé antigeny se liší svou molekulovou hmotností udávanou v kDa. Geny kódující tyto proteiny jsou lokalizované na plasmidech a vykazují vyšší stupeň heterogenity, než geny kódované na chromosomech. Stupeň exprese může být redukován ztrátou plasmidů. Snahou je proto identifikovat chromosomálně kódovaný povrchový antigen, který bude poskytovat širokou imunizační ochranu.

1.4. Povrchové antigeny Osp

Mezi nejvíce prostudované antigeny patří Osp (Outer surface protein) antigeny vnější membrány⁷. Jsou odpovědné za imunitní odpověď hostitele. Popis Osp antigenů je uveden v tabulce 1.

Tabulka č. 1. Přehled povrchových antigenů Osp

Povrchový antigen	Molekulová hmotnost	Lokalizace genů
OspA	31 kDa	lineární plasmid
OspB	34 kDa	lineární plasmid
OspC	21 až 25 kDa	cirkulární plasmid
OspD	28 kDa	lineární plasmid
OspE	19 kDa	cirkulární plasmid
OspF	26 kDa	cirkulární plasmid

OspA antigen patří k nejdůležitějším membránovým antigenům borrelií. Rozlišujeme 8 variant tohoto antigenu. OspA váže borrelii ke střevu klíštěte. Po nasátí klíštěte je produkce OspA borrelií potlačena vlivem teploty a pH, borrelii opouští

střevo, přesouvá se do slinných žláz klíštěte a odtud na hostitele. OspA se váže k plazminogenu hostitele a usnadňuje jeho aktivaci, čímž dochází k degradaci vysokomolekulárních glykoproteinů, jakým je například fibronectin, a tím zvyšuje invazivnost borrelií⁸. Při opakovaném pasážování virulentních kmenů bylo v Národní referenční laboratoři pro lymeskou borreliózu SZÚ pozorováno vymizení tohoto antigenu v roce 2005. OspA antigen má vliv i na pozdní komplikace onemocnění lymeskou borreliózou. Tento antigen pocházející z pozůstatků borrelií nebo vázaný v imunokomplexech slouží v případě perzistence v kloubech jako ohnisko pro vznik artritidy vlivem lokální aktivace T-lymfocytů. Může být vyvolána autoimunitní reakce⁹. **OspB** je produkován spíše americkými než evropskými kmeny borrelií. Protilátky proti tomuto antigenu se tvoří v pozdějších stádiích infekce.

Při sání klíštěte dochází k potlačení produkce OspA antigenu, jak již bylo zmíněno, a stoupá produkce **OspC**, který je důležitý pro přechod borrelií do slinných žláz klíštěte a pro jejich adaptaci v hostiteli. OspC se váže ve slinách na protein Salp15, který inhibuje aktivaci T-lymfocytů blokací funkce Lck kinázy v kaskádě přenosu signálu z receptoru CD4¹⁰. Rozlišujeme 24 invazivních kmenů Bb z 69 typů OspC. OspC je hlavním membránovým antigenem v časném stádiu infekce, kdy je vysoce stabilní. Naopak v přirozené populaci borrelií vykazuje značnou variabilitu. Skupiny A, B, D a K se nejčastěji vyskytují při infekcích u člověka. Antigen OspC je zkoumán v souvislosti s vývojem očkovacích vakcín. Byla u něj prokázána možnost indukce protektivní odpovědi.

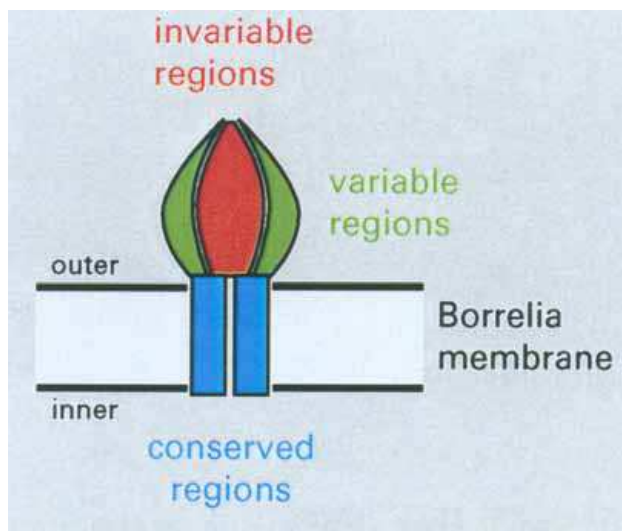
OspD je důležitý pro perzistenci borrelií v hostitelských buňkách, protože se účastní procesu adheze na jejich receptory. Pravděpodobně má toxické účinky⁶.

OspE a OspF jsou antigeny patřící do rodiny povrchově exponovaných Erp (surface exposed outer membrane proteins) lipoproteinů. Borrelie je syntetizují během časných infekcí u savců¹¹. Obecně Erp proteiny váží faktor H, který je součástí komplementové kaskády a brání bakterii před opsonizací a fagocytózou¹².

1.5. Další antigeny borrelií

VlsE (variable major protein-like sequence, expressed; obrázek 4) je povrchový protein *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Antigen VlsE je klíčový pro přežití borrelie. Po vniknutí do hostitelského organismu mění borrelie své povrchově exprimované VlsE a tak se brání rozpoznání a eliminaci imunitním systémem¹³. Gen pro VlsE se skládá z 15

spících genových kazet a jednoho expresního místa. Rekombinací mezi jednotlivými kazetami vznikne funkční gen jako zdroj antigenní variability. Rekombinace nastává pouze *in vivo*. Po zpracování borrelie antigen-prezentujícími buňkami je kompletní VlsE prezentován imunitnímu systému a indukuje tvorbu protilátek přímo proti konstantním a chráněným oblastem VlsE. Čehož se využívá v diagnostice, protože nezáleží na druhu borrelie^{14,15}.



Obrázek č. 4. Struktura VlsE antigenu (návod k Euroimmun anti-borrelia WB 2006)

Na stavbě bičíku borrelíí se podílí **flagelin A** o molekulové hmotnosti 41 kDa, který tvoří obalovou vrstvu bičíku a **flageliny skupiny B** tvořící jádro. Flagelin bývá využíván jako marker v diagnostických soupravách. Protilátky proti tomuto antigenu se tvoří v časných fázích onemocnění. Není příliš specifický a může být zdrojem falešně pozitivních reakcí, proto současně dokazujeme i OspC antigen, který se rovněž uplatňuje v časně imunitní odpovědi.

DbpA a **DbpB** (decorin binding protein) jsou adheziny vážící se ke kolagenu v pojivové tkáni přes proteoglykan dekorin. Umožňují borrelíím adhezi k hostitelským buňkám.

Skupina proteinů **CRASPs** (Complement regulator acquiring surface proteins) je zodpovědná za interakci s faktorem H komplementu a inaktivují C3b, složku komplementu. Borrelie jsou tak chráněné před opsonizací. Skupina těchto proteinů byla poprvé prokázána u druhu *Borrelia afzelii*¹⁰.

Proteiny **Bdr** (Borrelia direct repeat protein) se nacházejí v cytoplazmatické membráně a nejsou ovlivnitelné protilátkami ani antibiotiky. Hrají roli při přenosu

signálu z okolního prostředí a jejich produkce je ovlivněna rozdílnými okolními podmínkami¹¹.

Mezi další antigeny borrelií patří například Fibronectin binding proteins, p66, Vmps (Variable major proteins), p20 a p22⁸.

1.6. *Borrelia burgdorferi* sensu lato – genospecies

Na základě genetických, fenotypových a imunologických vlastností dělíme komplex *Borrelia burgdorferi* sensu lato na devatenáct hlavních druhů – genospecies (tabulka 2).

Tabulka č. 2. Genospecies *Borrelia burgdorferi*

Genospecies	Geografické rozšíření	autor	Patogenita
<i>B. afzelii</i>	Evropa, Asie	Canica a kol. 1993	lymeská borrelióza kožní léze, ACA
<i>B. americana</i>	USA	Rudenko a kol. 2009	nepatogenní
<i>B. andersonii</i>	Sev.Amerika	Marconi a kol. 1995	nepatogenní
<i>B. bavariensis</i>	Evropa	Margos a kol. 2009	patogenní
<i>B. bissetti</i>	Sev.Amerika, Evropa	Postic a kol. 1998	nepatogenní?
<i>B. burgdorferi s.s.</i>	Evropa, USA	Baranton a kol. 1992	lymeská borrelióza myokarditis
<i>B. californiensis</i>	USA	Postic a kol. 1997	nepatogenní
<i>B. carolinensis</i>	USA	Rudenko a kol. 2009	nepatogenní
<i>B. finlandensis</i>	Evropa	Casjens a kol. 2011	nepatogenní
<i>B. garinii</i>	Evropa, Asie	Baranton a kol. 1992	lymeská borrelióza neurologické manifestace
<i>B. japonica</i>	Japonsko	Kawabata a kol. 1993	nepatogenní
<i>B. kurtenbachii</i>	USA	Margos a kol. 2011	nepatogenní
<i>B. lusitaniae</i>	Evropa,Sev.Amerika	Le Fleche a kol. 1997	patogenní
<i>B. sinica</i>	Čína	Masuzawa a kol. 2001	nepatogenní
<i>B. spielmanii</i>	Evropa	Richter a kol. 2006	patogenní
<i>B. tanukii</i>	Japonsko	Fukunaga a kol. 1996	nepatogenní

Tabulka č. 2. Genospecies *Borrelia burgdorferi* – pokračování ze strany 15

Genospecies	Geografické rozšíření	autor	Patogenita
<i>B. turdii</i>	Japonsko	Fukunaga a kol. 1996	nepatogenní
<i>B. valaisiana</i>	Evropa, Asie	Wang a kol. 1997	provází B.g., EM
<i>B. yangzte</i>	Asie	Chu a kol. 2011	nepatogenní

Toto rozdělení však není konečné, protože některé izolované kmeny nemohly být zařazeny do žádné jmenované skupiny. Z uvedených druhů jsou prokázánymi původci lymeské borreliózy *B. burgdorferi*, *B. afzelii*, *B. garinii* a *B. bavariensis*. *B. valaisiana*, *B. japonica* a *B. bissetti* byly prokázány v klinickém materiálu. Jednotlivé druhy borrelií se liší kombinací plasmidů, skladbou antigenů, zastoupením strukturních složek a jejich funkčními aktivitami.

Borreliie se sice vyskytují v mnoha oblastech světa (Sev. Amerika, Asie, Evropa, Afrika i Austrálie), ale liší se v druzích a antigenních vlastnostech. V Evropě převládá jako původce lymeské borreliózy *B. burgdorferi* s.s. V České republice jsou původcem především *B. afzelii*, která má afinitu k postižení kůže a *B. garinii* se vztahem k postižení CNS.

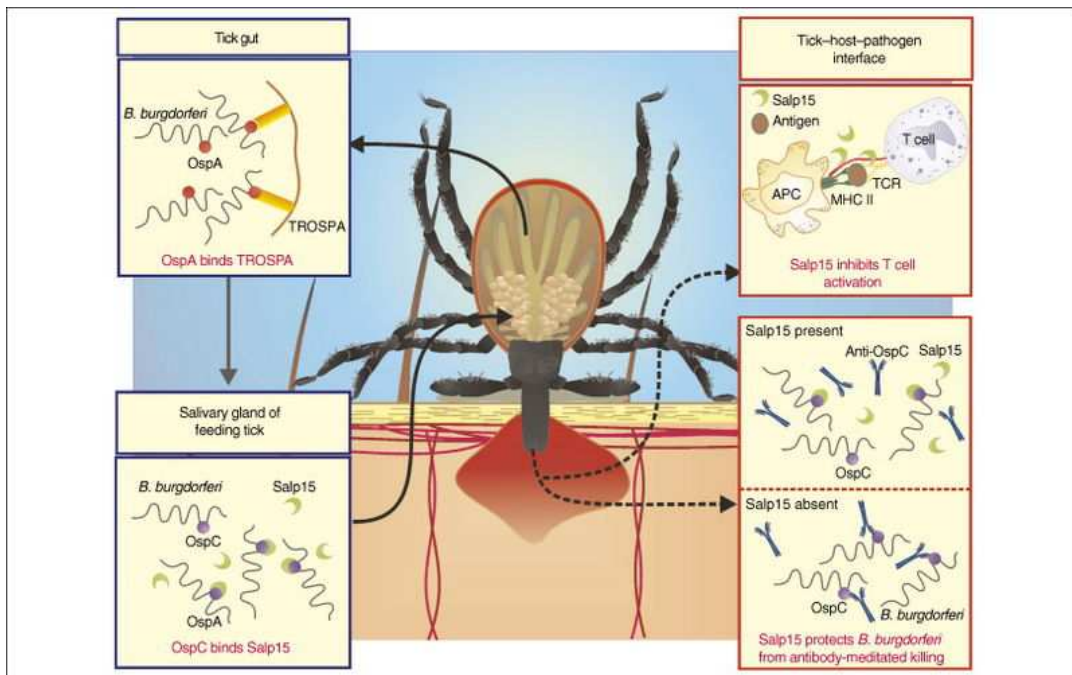
1.7. Způsob přenosu

Borrelióza je přenášená biologickým přenosem klíšťaty rodu *Ixodes*. Principem biologického přenosu je pomnožení agens nebo prodělání části svého vývojového cyklu v těle klíštěte. Přenos borrelií na hostitele je uskutečněn přes slinné žlázy klíštěte při jeho sání na hostiteli. Tato cesta nákazy předpokládá delší dobu sání kvůli přechodu borrelií ze střev klíštěte do jeho slinných žláz. K dřívějšímu přenosu nákazy může dojít přímo ze střev klíštěte při jeho nesprávném odstraňování a poškození⁷.

Orientační doba přenosu borrelií z klíštěte na hostitele je u klíštěte *Ixodes scapularis* a *Ixodes persulcatus* asi 36 hodin a u *Ixodes ricinus* asi 17 hodin. Z toho vyplývá, že včasné odstranění přísátého klíštěte může výrazně ovlivnit přenos infekce a následný rozvoj onemocnění.

Borreliie se v těle klíštěte vyskytují nejčastěji v zadní části střeva, méně pak ve slinných žlázách, hemolymfě aj. V obdobích mimo sání se vyskytují v epitelálních buňkách střevních záhybů, které jim poskytují ochranu před nepříznivým prostředím

střeva. Jak již bylo zmíněno, důležitou úlohu při osidlování střeva hraje klíčový protein OspA, který umožňuje ukotvení borrelií v epitelu střeva. V období sání klíštěte na hostiteli klesá exprese OspA, borrelie se odpoutají od stěny střeva a putují do slinných žláz (obrázek 5). V této fázi se exprimuje OspC nutný k přechodu borrelií přes hemolymfu do slinných žláz, odkud mohou být přeneseny na hostitele⁸.



Obrázek č. 5. Expresa antigenů při sání klíštěte
(https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Borrelia_burgdorferi_and_Lyme_Disease)

Kolem prisátého klíštěte se objevuje erytém. Tato reakce může přetrvávat i dlouhou dobu po odstranění klíštěte. Pro diagnostiku onemocnění je důležité erytém odlišit od *erythema migrans*, které je větší, s centrálním výbledem a má tendenci se rozšiřovat.

Mimo již zmiňovanou lymeskou borreliózu může klíště přenášet také další onemocnění. V České republice se jedná zejména o ehrlichiózu (lidská granulomatózní anaplasmóza), bartonellózu (bacilární pelióza a bacilární angiomatóza), babesiózu, rickettsiózu a klíšťovou encefalitidu.

2. Vektor onemocnění

Hlavním vektorem onemocnění jsou klíšťata rodu *Ixodes*. Jsou to krev sající ektoparaziti. Jejich zařazení v živočišné říši ukazuje tabulka 3.

Tabulka č. 3. Taxonomie klíšťat

říše	<i>Animalia</i>
kmen	<i>Arthropoda</i>
podkmen	<i>Chelicerata</i>
třída	<i>Arachnida</i>
řád	<i>Acarina</i>
čeleď	<i>Ixodidae</i>
rod	<i>Ixodes</i>

2.1. Životní cyklus klíštěte

Klíště obecné je v České republice nejrozšířenějším zástupcem čeledi *Ixodidae*. Během životního cyklu projde třemi vývojovými stádii a vystřídá tři hostitele, protože přeměna v další vývojové stádium vyžaduje nasátí krve a po nasátí klíště hostitele opouští. Na člověku sají všechna vývojová stadia - larva (6 nohou), nymfa (8 nohou) a imago (obrázek 6). Životní cyklus klíštěte v přírodě trvá 2 až 6 let. Zimování klíšťat může probíhat jak v nasátém, tak nenasátém stavu. Larvy se živí 2-3 dny, nymfy 3-5 dní, samice 5-10 dní. Kladení vajíček samicí (až 5 000 vajíček) nastává až po příjmu krve. U *Borrelia burgdorferi* sensu lato na rozdíl od *Borrelia myamotoi* nebyl prokázán transovariální přenos.



Obrázek č. 6. Vývojová stadia klíštěte (Foto Půta, SZÚ)

2.2. Výskyt klíšťat

Typickým biotopem klíštěte jsou listnaté a smíšené lesy a porosty křovin s bylinným patrem, zejména jejich okraje, dále porosty na okrajích vodních toků. Často se klíšťata vyskytují i v parcích, zahradách a na neudržovaných pastvinách. Výrazně méně jich je v jehličnatých lesích, hlavně jsou-li bez podrostu, a v kamenitém prostředí s minimem porostu. V zemědělských kulturách se nevyskytují. Vzhledem ke specifickým nárokům na vlhkost prostředí nejsou klíšťata na otevřených, osluněných suchých místech a také na rašeliništích a v trvale podmáčeném terénu. S nadmořskou výškou sice velikost populace klíštěte klesá, nicméně na našem území byl jeho výskyt v posledních desetiletích zaznamenán i v horských polohách až na horní hranici lesa.

2.3. Předpověď aktivity klíštěte obecného na území České republiky

Odbor klimatologie Českého hydrometeorologického ústavu vydává ve spolupráci se SZÚ každé pondělí a čtvrtek aktuální předpověď aktivity klíštěte obecného na území ČR. Tato předpověď je dostupná široké veřejnosti na webových stránkách Ministerstva zdravotnictví a ČHMÚ. Předpověď je poskytována od dubna do října. Základem předpovědi je monitoring aktivity klíštěte obecného na pokusných plochách o přesné výměře prováděný v letech 2001-2006. Klimatologická data byla převzata z databáze ČHMÚ v Praze - Libuši.

Mikroklimatologická data byla registrována pracovníky ČHMÚ přímo v místech monitoringu aktivity klíšťat. Na základě těchto vstupních dat byly vypracovány matematické modely vlivu meteorologických faktorů na aktivitu klíšťat ve fázi vyhledávání hostitelů. ČHMÚ a SZÚ společně vyvinuli počítačový program TICKPRO, který umožňuje vydávat předpovědi pro širokou veřejnost. Protože změny aktivity klíšťat podmiňují i změny rizika napadení a s tím spojené riziko infekce některou z nemocí klíšťaty přenášených, pomáhá program TICKPRO toto riziko minimalizovat vydáváním výstrah ke zvýšené pozornosti obyvatelstva v kritických obdobích. Stupnice ohrožení má škálu od 1 do 10, kdy 1 představuje malé a 10 nejvyšší riziko.

Aktuální odkazy na předpověď aktivity klíšťat na webových stránkách:

http://www.mzcr.cz/Verejne/obsah/predpoved-aktivity-klistat_1099_5.html

http://www.chmi.cz/portal/dt?menu=JSPTabContainer/P9_0_Predpovedi/P9_1_Pocasi/P9_1_1_Cesko/P9_1_1_6_Klistata

2.4. Prevence napadení klíštětem a přenosu infekce

Státní zdravotní ústav vydal na svých oficiálních webových stránkách doporučení, jak se předem připravit a jak se chovat při návštěvě lokalit s předpokládaným výskytem klíšťat. Mezi nejdůležitější body patří:

- zvolení vhodného oblečení, především dlouhých kalhot. Ideálně by měl být oděv ze světlé látky bez vlasu
- zvolení vhodného repelentního přípravku a sledovat dobu účinku vyznačenou na obale
- pohybovat se po cestách, neusedat do vegetace, a to především rozhraní louka-les
- občas prohlédnout spodní části oděvu a eventuálně sejmout přichycená klíšťata
- po návratu domů pečlivě prohlédnout celé tělo

Mezi nejčastější místa přisátí klíštěte patří podkolenní jamka, podpaží, třísla, za ušima a zvláště u dětí pak ve vlasech. Klíště ale může sát na kterémkoli místě těla včetně intimních partií. Vzhledem k tomu, že na člověku mohou sát všechna vývojová stádia klíštěte (vývojová stádia viz obrázek č. 6), je nutné provádět kontrolu velmi pečlivě. Nenasátá larva či nymfa mají v průměru kolem 1 mm. Prohlídku je třeba opakovat i následující den, protože klíště se může pohybovat i několik hodin, než se přisaje. Důležitá je i kontrola oblečení, ve kterém může být klíště přichyceno.

Jak je zřejmé z kapitoly 1.5 Způsob přenosu, včasné odstranění klíštěte výrazně ovlivňuje pravděpodobnost nákazy. V první fázi sání je klíště přichyceno pouze zoubky na sacím ústrojí. V další fázi již se kolem sacího ústrojí vytvoří tzv. cementový obal a odstranění klíštěte je obtížnější¹⁶.

2.5. Odstranění a likvidace přisátého klíštěte

- místo přisátí desinfikovat vhodným desinfekčním prostředkem. Pokud pacient nemá alergii na jód, jsou doporučované jódové preparáty, které dobře pronikají do tkání.
- klíště odstranit viklavým pohybem navlhčenou textilií, nebo opatrně podebrat a vytáhnout měkkou pinzetou. Pro tyto účely jsou i komerčně vyráběné pinzety. Klíště nevytáčíme, sací ústrojí neobsahuje vruty a hrozí riziko odtržení přední části klíštěte.
- místo po přisátém klíštěti znovu desinfikovat
- klíště je potenciálně infekční materiál, proto musíme dbát zvýšené pozornosti při jeho likvidaci, aby nedošlo k potřísnění rukou a okolí. Vhodným způsobem likvidace je např. spláchnutí do toalety. Klíště nerozmačkáváme holou rukou, ale můžeme jej umístit do igelitového sáčku. Pálení klíštěte je vhodné pouze v obalu (papír, noviny). Jinak může dojít k přenosu infekce při vystříknutí prudce zahřátého obsahu klíštěte.

3. Klinické příznaky lymeské borreliózy

Vzhledem k různým genospecies, které lymeskou borreliózu vyvolávají, jsou i klinické příznaky této nemoci velmi rozmanité. Dochází k postižení různých orgánů. Onemocnění může probíhat i zcela asymptomaticky nebo s mírnými příznaky, kterých si pacient nemusí všimnout. Lymeská borrelióza je onemocnění, které podobně jako další spirochetální infekce (syfilis) probíhá ve fázích. Jedná se o časné lokalizované stádium, časné diseminované stádium a pozdní stádium.

3.1. Časné lokalizované stádium

Typickým příznakem tohoto raného stádia je výsev erytému (obrázek 7), jehož minimální průměr je 5 cm. Objevuje se přibližně za 3 až 30 dnů (v ojedinělých případech i později) v místě přisátí klíštěte. Další erytémová ložiska se mohou objevit i vzdáleně od prvního výsevu. Odtud pochází označení *erythema migrans* (EM). Tyto skvrny se kruhovitě zvětšují a mívají ohraničený lem s centrálním výbledem. EM je nebolestivé, nesvědí. Velikost EM závisí na množství borrelií v těle a imunitním systému pacienta. Klinicky rozlišujeme tři základní typy EM: anulární, homogenní a homogenní s lemem. Výskyt EM u pacientů se pohybuje mezi 70 a 80 %.

V tomto stádiu se objevují nespecifické „chřipkové příznaky“ jako bolest hlavy, febrilie, subfebrilie, nechutenství, zvýšená únavovost, bolest svalů a kloubů, třesavka apod. Vzhledem k nespecifickým příznakům, absence EM u některých pacientů a nezaznamenání klíštěte v anamnéze nebývá vždy možno včas borreliózu odhalit a léčit.



Obrázek č. 7. *Erythema migrans* - ilustrační foto (přednáška RNDr. Kateřiny Kybicové, PhD., SZÚ 2015)

3.2. Časné diseminované stádium

Časné diseminované stádium nastává týdny až měsíce po nákaze. V tomto stádiu jsou borrelie hematogenní cestou diseminovány do celého organismu. Nastává imunitní odpověď. Tvorba protilátek začíná zhruba ve třetím až čtvrtém týdnu po vstupu borrelií do organismu. Nejprve nastává tvorba IgM a posléze IgG, které mohou perzistovat i řadu let. Je vhodné provést dva odběry s cca 4týdenním rozestupem, abychom mohli pozorovat sérokonverzi nebo signifikantní vzestup titru protilátek. V tomto stádiu se můžeme setkat s projevy různého druhu.

3.2.1. Kožní projevy

Mezi kožní projevy patří především borreliový lymfocytom, uzlík tmavorudé či tmavofialové barvy lokalizovaný nejčastěji na ušních lalůčcích, na nose a prsní bradavce (obrázek 8). Diagnóza je v tomto stádiu především klinická. Při výskytu lymfocytomu u dítěte se antibiotická léčba nasazuje bezodkladně. Séropozitivita podpoří klinickou diagnózu, ale řada pacientů ještě v tomto stádiu nemusí mít protilátky vytvořeny. V případě pochybností se doplňuje histologické vyšetření.



Obrázek č. 8. Lymfocytom - ilustrační foto (přednáška RNDr. Kateřiny Kybicové, PhD., SZÚ 2015)

3.2.2. Neurologické projevy

Neurologické projevy jsou způsobené přímým toxickým a zánětlivým působením borrelií. Perzistence borrelií v nervové tkáni může být příčinou i autoimunitních pochodů, které poškozují neurony, glii i nervová vlákna, což může vést k demyelizaci.

Druhé stádium je charakterizováno meningitidou, kraniální neuritidou a polyradikuloneuritidou. Nastává za několik týdnů až měsíců po infekci borreliemi. Druhé stadium se často projevuje jako aseptická meningitida. V mozkomíšním moku bývá pozorována lymfocytární pleiocytóza, ale nebývají zde detekovatelné mikroorganismy. Pacienti bývají afebrilní, nejčastěji jsou přítomny pouze známky meningeální iritace⁶. V Evropě se vyskytuje obraz Bannwarthova syndromu, který se projevuje ostrou mučivou bolestí hlavy. Symptomy jsou kolísající, mohou trvat měsíce a přejít do chronicity.

3.2.3. Muskuloskeletární projevy

Objevuje se postižení kloubů (lymeská artritida) a to především kolenního, loketního a hlezenního. Projevuje se stěhovavou bolestí s opakujícími ataky. Postižené klouby bývají oteklé a horké. Mezi další projevy patří zánětlivé procesy struktur pohybového aparátu jako záněty šlach (tenditidy, tendovaginitidy, tenosynovitidy), záněty vazů (entesitidy), záněty kloubních pouzder (kapsulitidy, bursitidy) a svalů (myalgie, myositidy).

Postižení srdce, ke kterému dochází v tomto stádiu, označujeme jako lymeskou karditidu (LK). Objevuje se zpravidla 2 týdny až 5 měsíců po vstupu infekce. Výskyt LK u pacientů s LB se v Evropě odhaduje na cca 4 %, při čemž poměr nemocných mužů a žen LK činí 3:1. Symptomy LK se podobají symptomům jiných oběhových onemocnění. Mohou se projevovat jako dušnost, bolest na hrudníku, palpitace (bušení srdce), synkopa, závratě apod. Zdrojem jsou arytmie, perikarditidy, myokarditidy a dilatované kardiomyopatie jako pozdní projev manifestace.

3.2.4. Oční projevy

Častěji než přímé napadení očních tkání patogenním agens se v patogenezi uplatňuje imunologická reakce. Některé nálezy jsou obdobné jako při syfilitické infekci. Oční projevy jsou velmi rozmanité, nejčastěji se objevují ve II. a III. stádiu, ale mohou být i prvním příznakem infekce. Toto se týká především konjunktivitidy, episkleritidy nebo edému víček, které se objevují v prvním stádiu choroby několik dní po EM. Zde je však nutné rozlišit, zda nejde o koinfekci. Nejspolehlivějším ukazatelem je v tomto případě pozitivní reakce na ATB léčbu. Po měsících až letech od prvního projevu nemoci se objevuje stromální či epiteliální keratitida, nejprve však musíme vyloučit virovou či treponemovou etiologii. Terapie se zde uplatňuje steroidová. ATB léčba bývá bez odezvy, což podporuje teorii o imunologickém původu potíží. Mezi další oční projevy patří: exudativní odchlípení sítnice, městnavá papila, neuropatie optického nervu či parézy okulometrických nervů.

3.3. Pozdní stádium

Borrélie dokáží dlouho perzistovat v organismu a unikat imunitní odpovědi. Není však doposud známo, zda pozdní projevy onemocnění s touto perzistencí souvisí, nebo jde o zkřížené reaktivity proti borreliovým antigenům. U borrelií nebyly dosud identifikovány faktory virulence, jako jsou toxiny nebo enzymy. Přitom antigeny lipopolysacharidového charakteru vyvolávají podobné reakce, jako po vniknutí endotoxinu do organismu. Tyto mechanismy se prokazatelně podílejí na poškození kloubů při lymeských artritidách a mají podíl i na nespecifických horečnatých stavech.

Pozitivní nálezy borrelií v likvoru, synoviálních tekutinách či lymfatických uzlinách byly dokumentovány i u séronegativních pacientů. To je důkazem, že součástí klinického obrazu lymeské borreliózy nemusí být vždy protilátková odpověď. Standardní výskyt protilátek v tomto období jsou protilátky řádu IgG stimulované borreliovými antigeny p18, p39 a p100.

3.3.1. Kožní projevy

V tomto stádiu se může objevovat ACA (*acrodermatitis chronica atrophicans*; obrázek 9). Dělíme ji na dvě fáze – zánětlivou a atrofickou. Zánětlivá fáze začíná

obvykle několik měsíců po přisátí klíštěte jako akutní zánět kůže. Na pokožce jsou viditelné temně červené neohraničené skvrny často doprovázené edémem. Lokalizované jsou především na obličeji, trupu nebo dorzální straně končetin. Atrofická fáze postihuje cca 8 % pacientů a projevuje se jako ztenčení kůže s prosvítáním žilní kresby. V bioptických vzorcích pacientů s ACA byly borrelie prokázány elektronovou mikroskopií i kulturačně jako jasný důkaz etiologie.



Obrázek č. 9. Projevy ACA - ilustrační foto (přednáška RNDr. Kateřiny Kybicové, PhD., SZÚ 2015)

3.3.2. Neurologické projevy

V pozdním stádiu se může jednat o encefalomyelopatii, radikuloneuropatii a poruchy svalové činnosti v důsledku poškození nervových vláken. Může se objevit hydrocefalus, mozková atrofie s poruchami paměti i chování napodobující parkinsonovu chorobu. U těžších případů nastává víceložiskové poškození imitující roztroušenou sklerózu. Pozdní stádium neuroborreliózy má společné rysy s neurosyfilitidou (progresivní demence).

3.3.3. Oční projevy

V pozdním stádiu se objevuje většinou pouze v mírných formách uveitida jako pozdní projev imunologické reakce. Na lymeskou borreliózu je třeba myslet u všech nevysvětlitelných uveitid, neboť může být jejím prvním projevem. Terapie je lokální podávání ATB a steroidů, které je třeba opakovat. Někdy pozorujeme i přechodné zhoršení po ATB terapii.

3.4. Lymeská borrelióza v těhotenství

Transplacentární přenos Bb s. l. nebyl ještě dostatečně prozkoumán. Borrelióza prodělaná a zaléčená před těhotenstvím by zřejmě neměla mít na vývoj plodu vliv. Pokud dojde ke vzplanutí infekce v období gravidity, je pravděpodobné, že může dojít k různě závažným poškozením plodu či k jeho odumření. Borreliie byly prokázány v odumřelých plodech matek, u nichž se prokázala lymeská borrelióza v I. trimestru, a to v mozku i parenchymových orgánech. U dětí séropozitivních matek byly detekovány IgG protilátky, což poukazuje na možnost transplacentárního přenosu. IgG pozitivní děti mohou být bez klinických příznaků, protilátky vymizí za cca 9 až 17 měsíců. Stále však není přesně známo, jaký vliv má infekce na plod. Gravidní ženu je při vzplanutí infekce nutné zaléčit vhodným ATB, které nepoškozuje plod. Pacientka by měla být sledována po celou dobu těhotenství až do porodu, kdy je odebírána žilní krev matky, pupečnicková krev a vzorek placenty na ELM, PCR, WB a ELISA. Matka i dítě by nadále měly být zařazeni do dispenzární péče. V současné době se problematikou lymeské borreliózy u dětí a těhotných věnuje MUDr. Lenka Krbková, CSc. z Kliniky dětských infekčních onemocnění při Fakultní nemocnici v Brně.

4. Laboratorní diagnostika lymeské borreliózy

Stanovení diagnózy lymeské borreliózy by mělo být komplexní. Vycházet má zejména z klinických příznaků pacienta, jeho celkové anamnézy a výsledků laboratorních vyšetření. Mezioborová spolupráce je u lymeské borreliózy klíčová, protože jak již bylo uvedeno, onemocnění se projevuje širokou škálou klinických příznaků. V laboratorní diagnostice vyvstává problém s interpretací výsledků vyšetření. Společnost infekčního lékařství České lékařské společnosti J. E. Purkyně v roce 2011 vydala doporučený postup v diagnostice, léčbě a prevenci lymeské borreliózy.

Spektrum laboratorního vyšetření je velmi pestré. Zahrnuje metody přímého i nepřímého průkazu. K přímým metodám se řadí mikroskopické vyšetření v zástinu, elektronová mikroskopie, kultivace, PCR metody a sekvenace. Mezi nepřímé metody patří ELISA, IFA a WB. Všechny zmiňované metody popsané v této práci jsou vztaheny k pracovišti Národní referenční laboratoře pro lymeskou borreliózu ve Státním zdravotním ústavu v Praze.

4.1. Metody přímého průkazu

Metody přímého průkazu jsou založeny na přímé detekci patogenních agens. Průkaz se provádí z klinického materiálu i v klíšťatech. Metody přímého průkazu většinou nebývají metodou první volby pro jejich finanční nákladnost a náročnost provedení. Využívají se při sporných výsledcích sérologie a pro výzkumné účely.

Druh vyšetřovaného materiálu je vybírán na základě klinických obtíží pacienta a stádia onemocnění. Tedy z klinického materiálu, kde lze přítomnost patogenního agens očekávat. V akutním stádiu jsou to biopsie z místa přisátí klíšťete nebo z oblasti okrajů *erythema migrans*. Ve fázi hematogenního rozsevu je to periferní krev. Při neurologických obtížích likvor, který je odebírán společně s periferní krví. U kloubního postižení je to odběr synoviální tekutiny. Pro správnou laboratorní diagnostiku je nezbytný správný odběr, transport a skladování vzorku.

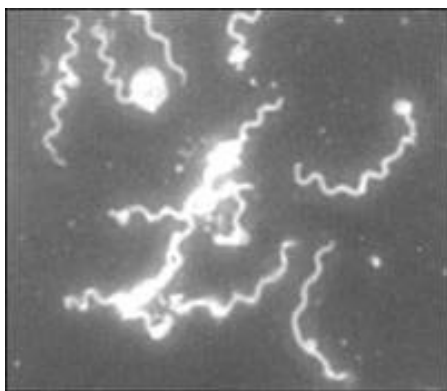
Nejčastěji vyšetřovaným materiálem je:

- nesrážlivá periferní žilní krev
- likvor sterilně odebraný lumbální punkcí

- synoviální tekutina
- biopsie kůže, svalu a srdce
- placenta po porodu
- oční sklivec
- klíště

4.1.1. Mikroskopie v zástinu

Borrélie jsou obtížně barvitelné běžnými barvivy. Je možné provést barvení Giemsovým barvivem po dobu 24 h. Vhodnější metodou je mikroskopie v zástinu, která umožní identifikovat nativní borrelié nejen podle tvaru, ale i podle jejich charakteristického pohybu (obrázek 10). Tato metoda není vhodná pro vyšetření z klinického materiálu vzhledem k malému počtu borrelií v tělesných tekutinách a krátkodobému výsevu v periferní krvi. Dostatečnou koncentraci lze nalézt pouze v těle klíštěte nebo narostlém kultivačním médiu. Z toho důvodu se mikroskopie v zástinu využívá především ke kontrole růstu borrelií v médiu a orientačnímu sledování promořenosti všech vývojových stádií klíšťat za různých klimatických podmínek. Touto metodou se provádí i komerčně využívané vyšetření klíštěte pro širokou veřejnost. Doporučuje se kontrola klíšťat, která sála na rizikových skupinách pacientů. Jde především o malé děti, těhotné nebo chronicky nemocné pacienty.



Obrázek č. 10. Vizualizace borrelié metodou mikroskopie v zástinu (foto RNDr. Hulínská, CSc., SZÚ)

Pro mikroskopické vyšetření klíštěte je nutné vyjmout členovce z rány na sucho a teprve pak ránu desinfikovat, protože desinfekční prostředky mohou klíště vysušit a znemožnit tak další diagnostiku. Pro transport klíštěte do laboratoře je nejvhodnější jej

umístit do uzavřené nádoby s navlhčeným vatovým tampónem nebo čerstvou trávou. Není-li možný rychlý transport, skladujeme klíště v lednici při 2-8°C.

Výhodou této metody je jednoduchost provedení, nízké náklady a rychlost. Výsledky vyšetření jsou dostupné v řádech minut. Nevýhodou je nemožnost automatizace a pouze orientační výsledky vyšetření.

4.1.2. Kultivace

Borrélie nelze kultivovat na běžných kultivačních půdách. Jejich vysoké nutriční požadavky byly uvedeny v kapitole 1.2. Genom *Borrelia burgdorferi*. Proto pro kultivaci využíváme vysoce obohacené Barbour-Stoener-Kelly (BSK-H) médium s různými kombinacemi sterilního koňského nebo králíčího séra. Tato séra musí být inaktivovaná a zbavená protilátek proti společným bakteriálním antigenům p60-66, p16 a protilátek proti spirochétám p41, p56. Doporučuje se kultivační půdu i používaná séra filtrovat. Velmi důležitý je vyvážený obsah albuminu a vápenatých a fosfátových solí. Pro aktivaci cyst se půda obohacuje 6% koňským sérem a aminokyselinou alaninem¹⁷.

Růst borrelíí v médiu ovlivňují tyto faktory: teplota, osmotický tlak, sluneční světlo, pH prostředí a oxidoredukční potenciál, jehož snížení můžeme docílit přidáním aminokyseliny cysteinu. Optimální podmínky klíčových faktorů jsou uvedeny v tabulce 4.

Tabulka č. 4. Optimální hodnoty faktorů ovlivňujících kultivaci *B. burgdorferi*

teplota	32-35°C
pH prostředí	7,5
redox potenciál	Eh+0,1 do 0,2

Příprava a odběr klinického materiálu vyžadují přísně sterilní podmínky, aby nedošlo ke kontaminaci jiným bakteriálním kmenem. Materiál je po příjmu ihned zpracován. Není-li možné materiál ihned zpracovat, je nutné jej skladovat v lednici při 2-8°C. Tekutý klinický materiál se inokuluje sterilní jehlou, pevný materiál je očkován sterilními chirurgickými nástroji. Při kultivaci z klíšťat je tělo členovce sterilizováno oplachem v 70% ethanolu. pH upravujeme pomocí pufru o hodnotě 7,2±0,5. Chitinová

kostra klíštěte je narušena a tělní obsah je resuspendován do kapky BSK-H média. Následně je získaný materiál inokulován shodně jako tekutý klinický materiál¹⁸.

První fáze kultivace se nazývá statická. Trvá 1 až 14 dní. Příčinou změn metabolické aktivity a růstu borrelií jsou především změny prostředí vyvolané samotnými borreliemi. Po tomto intervalu provádíme v podmínkách nové půdy ve čtyřdenních intervalech kultivaci kontinuální. Teprve po 3. pasáži lze hovořit o izolaci kmene.

Kultivace je jediná metoda, která prokazuje přítomnost živých agens ve vzorku, umožňuje zkoumání růstových vlastností a uchovává borreliie pro budoucí zkoumání. Nevýhodou je časová náročnost a vysoké finanční náklady. Největší význam pro získávání nových kmenů borrelií a jejich antigenů pro další využití v laboratorních metodách mají metody ELISA, WB a IFA.

4.1.3. PCR

Polymerázová řetězová reakce, PCR - z anglického originálu polymerase chain reaction, se využívá pro přímý průkaz původce lymeské borreliózy - spirochét *Borrelia burgdorferi* sensu lato v klinickém materiálu a v klíšťatech. Genomová DNA je izolována z testovaného vzorku po lýze buněčných elementů, deproteinovaná, přečištěná a koncentrovaná ve vhodné formě pro (identifikaci) analýzu. Za přítomnosti druhově specifických oligonukleotidů je amplifikován specifický produkt sekvence DNA až do množství, které je možno po elektroforéze a obarvení identifikovat v UV světle. Porovnáním s kontrolami a DNA markery lze prokázat přítomnost hledané, specifické DNA ve vzorku¹⁹.

IZOLACE DNA

Prvním krokem PCR je úspěšná izolace DNA borrelií ze vzorku. Při izolaci z tělních tekutin jde o rozpuštění biomembrán a denaturaci proteinů. Při izolaci z pevných tkání musíme použít mechanickou sílu (drcení tkání, vortex). Před izolací je nutné členovce zbavit kontaminant ze zevního prostředí a uvolnit obsah střev a slinných žláz. Nožičky a chitinový skelet je odstraněn promýváním v mezikroku izolace²⁰. Mezi hlavní typy izolace patří fenolchloroformová extrakce a adsorpce na silikagel, ale fenolchloroformová extrakce je nevhodná z hlediska své pracnosti. V současnosti je tedy nahrazena adsorpcí na silikagel. Tohoto principu využívají i výrobci komerčně

vyráběných souprav pro izolaci DNA. Kity jsou standardní pro specifický druh a množství vzorku (příklad viz obrázek 11). Obvykle využívají nástavce do mikrozkušavek s jemným filtrem zachycující částice silikátu pro ještě větší urychlení metody. Izolace se provádí v laminárním boxu. Součástí každé soupravy je i negativní kontrola izolace²¹.



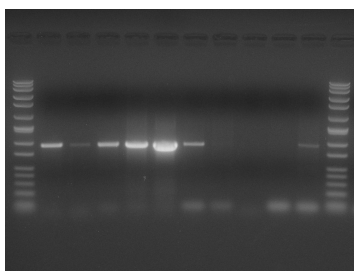
Obrázek č. 11. Příklad standardního komerčně dostupného kitu - Izolační kit QIAamp DNA Mini kit (QIAGEN) (foto výrobce)

VLASTNÍ PCR REAKCE

Vlastní reakci tvoří cyklické opakování tří základních kroků²²

- **teplotní denaturace DNA** - oddělení vláken dvoušroubovice teplotou vyšší než 92°C
- **annealing** – připojení primerů ke komplementárním úsekům jednovláknové DNA nebo RNA (při teplotě 50-60 °C)
- **elongace** - prodloužení připojených primerů termostabilní DNA polymerázou (při 70-75 °C)

Výsledek PCR amplifikace je nutno detekovat. Pro tyto účely se běžně využívá detekce na agarózovém nebo polyakrylamidovém elektroforetickém gelu pomocí UV světla (obrázek 12).



Obrázek č. 12. Vizualizace PCR (foto RNDr. Kybicová, Ph.D., SZÚ)

REAL-TIME PCR

Další možností je provedení tzv. real-time PCR detekce genu 16S rDNA *Borrelia burgdorferi* sensu lato²³. Zkoušku je v Referenční laboratoři pro lymeskou boreliózu prováděna použitím kitu GeneProof Borrelie burgdorferi. Tato souprava detekuje druhy *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. valaisiana*, *B. lusitaniae*, *B. andersonii*, *B. bissettii*, *B. japonica*, *B. tanukii*, *B. turdii*, *B. sinica*. Principem je amplifikace chromozomálního genu kódujícího 16S rDNA metodou PCR a měření nárůstu koncentrace amplifikačního produktu v průběhu PCR pomocí fluorescenčně značené sondy. Přítomnost DNA borrelíí ve vzorku je indikována nárůstem fluorescence fluoroforu FAM. V reakční směsi je zabudován interní standard (IS), kontrolující možnou inhibici PCR reakce a účinnost izolačního procesu. Pozitivní amplifikace IS je detekována ve fluorescenčním kanálu pro fluorofor JOE. Detekční souprava využívá technologii „hot start“ minimalizující nespécifické reakce a obsahuje uracil-DNA-glykosylázu (UDG) kontrolující možnou kontaminaci PCR reakce amplifikačními produkty. Vyšetřovaným materiálem je likvor, plasma, synoviální tekutina a tkáňové biopsie. Metoda umožňuje kvalitativní detekci DNA. Real-time PCR metody umožňují i kvantitativní detekci vstupní DNA ze vzorku. Pro účely diagnostiky lymeské boreliózy však nejsou využívány, protože pozitivní nález DNA borrelíí i v nepatrném množství představuje riziko onemocnění.

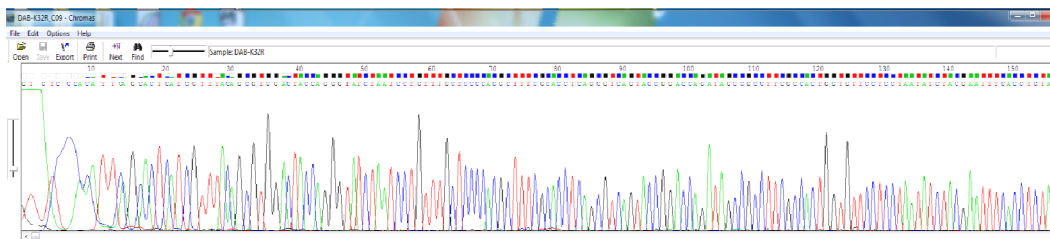
DETEKCE OspA genu metodou NESTED PCR

Test se provádí podle publikované původní metody „Detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in lesional skin of patients with erythema migrans and acrodermatitis chronica atrophicans by ospA-specific PCR“ (citace²⁴). Publikovaná metoda je kvalitativní, s detekcí na gelu. Principem metody je PCR amplifikace OspA genu kódujícího povrchový antigen OspA, kde pro zvýšení výtěžnosti je metoda

provedena jako nested tj. ve dvou PCR reakcích navazujících na sebe. Část PCR produktu z první reakce je použita jako templát pro druhou reakci. V první reakci mohou vzniknout i ne zcela specifické produkty. Aby se ve druhé PCR amplifikovaly jen žádoucí, specifické fragmenty, používá se jiný pár primerů, který leží mezi primery použitými pro první amplifikaci. Přítomnost DNA *OspA* borrelií ve vzorku je indikována přítomností specifického proužku na gelu, který je ověřen sekvenací. Metoda umožňuje detekci *OspA* genu *B. burgdorferi* sensu lato v izolátech z různého biologického materiálu (likvor, synoviální tekutina, plasma, tkáňová biopsie).

SEKVENOVÁNÍ

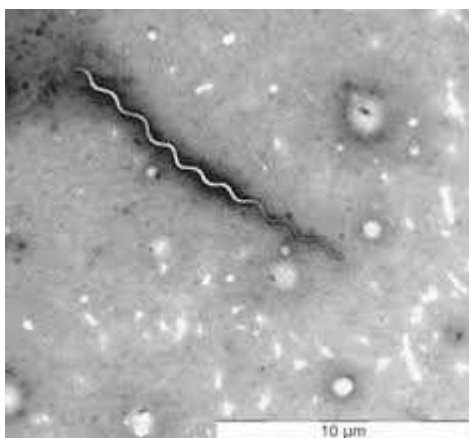
Sekvenování umožňuje zjištění pořadí bazí (A, C, T, G) v úseku DNA *Bb* sensu lato. Principem je modifikovaná PCR reakce, při které je použit pouze jeden sekvenační primer a PCR produkt jako templát. Nedochozí tedy k exponenciální, ale pouze k lineární amplifikaci templátu. Kromě klasických dNTP jsou v sekvenační směsi přítomny i ddNTP (2',3'-dideoxynukleotidtrifosfáty). Ty jsou fluorescenčně značeny (každá báze jinou barvou) a při inkorporaci do vznikajícího řetězce DNA zamezí jeho dalšímu prodlužování. Výsledkem sekvenační reakce je tak směs různě dlouhých řetězců DNA a každý je fluorescenčně označen barvou podle toho, kterou bází končí. Tyto produkty jsou pak elektroforeticky rozděleny na automatickém sekvenátoru a je možno přečíst posloupnost jednotlivých bazí. Sekvenuje se vždy jen s jedním primerem. Před sekvenací je nutné PCR produkt purifikovat (metodika je zavedená v SZÚ v Národní referenční laboratoři pro lymeskou borreliózu) a purifikace PCR produktu je nutno ověřit elektroforeticky. Pro Národní referenční laboratoř pro lymeskou borreliózu v Praze probíhá sekvenační reakce a sekvenační analýza na automatickém sekvenátoru v laboratoři sekvenace DNA na Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy (<https://www.natur.cuni.cz/biologie/servisni-laboratore/laborator-sekvenace-dna>). Výsledky jsou prohlíženy v programu Chromas (<http://chromas-lite.software.informer.com/2.1/>; obrázek 13). Vyhodnocení a porovnání výsledků se provádí v databázi NCBI BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).



Obrázek č. 13. Analýza sekvenování DNA v programu Chromas

4.1.4. ELEKTRONOVÁ MIKROSKOPIE

Průkaz elektronovou mikroskopií je založen na zhodnocení morfologie borrélií (např. rozměry, počet bičků, cysty, granula) a na imunocytochemické reakci antigenu s monoklonální protilátkou. Pro vyšetření se využívá ultratenkých tkáňových řezů či buněčného sedimentu získaného centrifugací. K negativnímu barvení se používá 1% kyselina fosfowolframová. Tkáň i sediment je doporučováno fixovat v paraformaldehydu. Další možností je imunisorbentní elektronová mikroskopie (ISEM), která je založená na reakci antigenu se specifickou protilátkou. Reakce se provádí na pevném sorbetu, nosičem je zde mikroskopická síťka s formvarovou blankou. Následuje konjugace adsorbovaného antigenu s monoklonální protilátkou značenou zlatem²⁵. Vyšetřovaným materiálem může být krevní plasma, mozkomíšní mok, synoviální tekutina, tkáňové řezy či izolované kultury a extrakty z klíšťat. Pozitivní výsledek této metody je jednoznačným průkazem probíhající infekce i u séronegativních pacientů. Příklad obrazu z ELM je uveden na obrázku 14.



Obrázek č. 14. Borrélie v ELM (foto RNDr. Radko Novotný, Ph.D.)

4.2. Metody nepřímého průkazu

Mezi rutinně zavedené metody nepřímého průkazu se řadí nepřímá imunofluorescence (IFA), imunoenzymatická metoda (ELISA) a vysoce citlivý western blot (WB). Všechny zmiňované metody jsou založeny na průkazu specifických antiborreliových protilátek v třídách IgM a IgG. Obecně lze říci, že IgM jsou protilátky časně fáze a IgG protilátky rekonvalescentní. Avšak interpretace laboratorních výsledků je v případě lymeské borreliózy velmi obtížná a budeme se jí věnovat více u jednotlivých metodik.

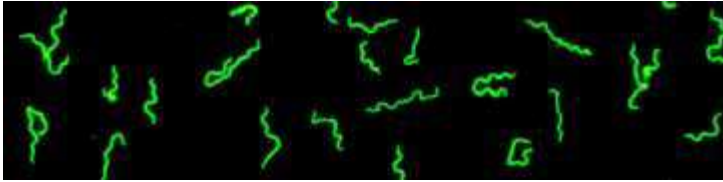
Vhodným materiálem pro vyšetření je:

- periferní žilní krev srážlivá (sérum)
- mozkomíšní mok
- synoviální tekutina

Důležitý je správný výběr klinického materiálu pro vyšetření. Např. u pacientů s kloubní formou lymeské borreliózy se doporučuje odebrat souběžně s vyšetřením séra i výpotek postiženého kloubu, abychom se vyhnuli špatné diagnóze na základě séronegativity. Při diagnostice neuroborreliózy opět souběžně se vzorkem séra vyšetřuje i mozkomíšní mok.

4.2.1. IFA

Imunofluorescenční analýza je založena na reakci protilátek ve třídě IgM a IgG s antigenem, v podobě buněk infikovaných borreliemi nebo samotných borrelií, naneseným na podložní sklíčka (obrázek 15). Reakce protilátek je variabilní a závisí na druhu borrelií²⁶. Testovaný vzorek pacienta nanášíme na sklíčko v roztoku obsahujícím antigeny z nepatogenních spirochét *Treponema phagedenis* pro vysycení nespecifických protilátek. Metoda je dvoukroková, kdy v první fázi reagují protilátky ze vzorku s antigenem a dochází k vytvoření komplexu antigen-protilátka a ve druhé fázi se na tento komplex navazuje fluoresceinem značené specifické antisérum proti lidskému imunoglobulínu. V proudu modrofialového světla fluorescenčního mikroskopu za přítomnosti specifických protilátek dochází k fluoreskovaní antigenních částic²⁷. Nevýhodou této metody je subjektivní hodnocení a nemožnost automatizace. Výhodou je, že ředěním vzorků lze identifikovat titr přítomných protilátek.



Obrázek č. 15. Imunofluorescenční analýza *B. burgdorferi* (foto Mgr. Uherková, SZÚ)

4.2.2. ELISA

ELISA patří mezi nejčastěji využívané sérologické metody ke stanovení specifických protilátek. Jedná se o metodu screeningovou, protože ani její specifita, ani senzitivita není pro detekci lymeské borreliózy optimální. Výsledky testů se liší podle antigenu použitého v diagnostické soupravě. V České republice je na trhu velké množství diagnostických souprav komerčních firem, které používají antigeny různých druhů, kmenů a možných heterogenních sérotypů *B. burgdorferi* sensu lato (např. celobuněčné antigeny, rekombinantní antigeny, VlsE antigen). Dle doporučení WHO by se pro diagnostiku lymeské borreliózy měly využívat kmeny vyskytující se v dané oblasti, nejlépe z pozitivních kultivací tuzemských pacientů. V ČR je to kmen *B. garinii* a *B. afzelii*. V diagnostice lymeské borreliózy se doporučuje uplatňovat dvojstupňové sérologické vyšetření zahrnující confirmaci výsledků ELISA testem WB.

ELISA test je určen k detekci antiborreliových protilátek IgM a IgG v lidském séru, likvoru a synoviální tekutině typem sandwich, tj. pevná fáze – antigen – protilátka – značená protilátka. Kdy pevnou fází představuje jamka mikrotitrační destičky s navázaným antigenem a protilátky jsou stanoveny ve vyšetřovaném vzorku pacienta. Značenou protilátkou je zvířecí anti-lidský imunoglobulin anti-IgM nebo anti-IgG konjugovaný s křenovou peroxidázou. Stanovení peroxidázové aktivity se provádí pomocí substrátového roztoku např. s o-phenylen-diaminem. Pozitivita se pak projevuje červenohnědým zabarvením, jehož intenzita se stanoví změřením absorbance na fotometru²⁸.

ELISA metodou je možné stanovovat i specifické antiborreliové protilátky navázané v cirkulujících imunokomplexech pomocí PEG ELISY (polyethylenglykol ELISA). Tato reakce přispívá k upřesnění diagnostiky, neboť se ukázalo, že Ig v imunokomplexech (zvláště IgM) jsou přítomny hlavně v časných fázích onemocnění, při

reaktivaci onemocnění, a jejich perzistence je klinicky významná. Kompletované protilátky je možno detekovat i u jinak séronegativních pacientů²⁹.

Nevýhodou ELISA testu je jeho poměrně nízká výpovědní hodnota pro klinické využití. Důvodem je existence zkřížených reaktivit specifických protilátek, falešná pozitivita, která se může objevit u některých onemocnění jako syfilis, infarkt myokardu, revmatoidní artritidy s pozitivním revmatoidním faktorem, roztroušené sklerózy (RS) apod.³⁰ Negativní odpověď může být v časném stádiu infekce či u imunodeficientních pacientů, u nichž není nastartována tvorba protilátek.

4.2.3. WESTERN BLOT

Western blot (WB) je vysoce specifická a senzitivní metoda pro detekci protilátek. Využívá se zejména jako konfirmační metoda k pozitivním či hraničním ELISA testům či v případě negativních výsledků ELISA, IFA testům za současného výskytu klinických příznaků u pacienta. V testu stanovujeme specifické protilátky IgM a IgG proti jednotlivým antigením strukturám lišících se svou molekulovou hmotností.

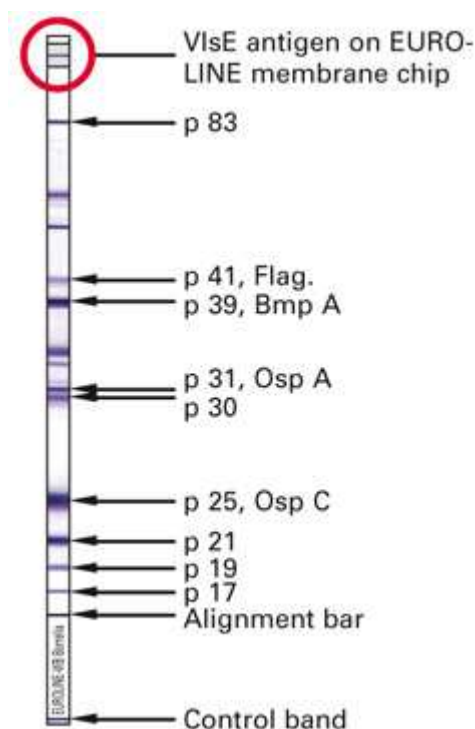
Ve Western blotu se používají antigeny *B. burgdorferi* sensu lato elektroforeticky rozdělené v SDS-PAGE gelu (polyakrylový gel s přídavkem dodecylsíranu sodného) a přenesené na imobilizované nitrocelulózoové membrány. Konečnou fází výroby WB testu je nařezání membrány na jednotlivé proužky – stripy³¹.

Vlastní reakce se skládá ze tří kroků:

- 1) reakce specifických anti-boréliových IgM nebo IgG protilátek s antigenními epitopy proteinů různé molekulové hmotnosti
- 2) reakce komplexu antigen-protilátka (Ag-Ab) se zvířecím konjugátem značeným enzymem (po odmytí nenavázaných zbytků protilátek)
- 3) po reakce enzymu se substrátem za vzniku zabarvení komplexu (po odmytí nenavázaného zbytku konjugátu)

Po vysušení odečítáme podle přiložených kontrolních stripů s vyznačenou polohou jednotlivých specifických linií (obrázek 16). Pro ověření validity testu obsahují stripy kontrolní linii sloužící ke kontrole funkčnosti a citlivosti soupravy a cut-off linii. U některých souprav je možné intenzitu linií provádět softwarově. Obdobně jako je tomu

u ELISA metod i na WB existuje řada komerčně vyráběných souprav a obě metody je možné automatizovat.



Obrázek č. 16. Kontrolní strip EUROLINE-WB: „Anti-Borrelia“ s vyznačeným VlsE antigenem (https://www.euroimmun.com/index.php?id=westernbl_euroline-wb_beschreib)

4.3. Další laboratorní parametry pozorované u Lymeské borreliózy

V diagnostice lymeské borreliózy se uplatňují i další vyšetřovací metody. Po vzoru sousedních zemí se v České republice zavedl test transformace lymfocytů prováděný na imunologických pracovištích. Při diagnostice neuroborreliózy se uplatňuje vyšetření intrathekální syntézy protilátek a cytologické a biochemické vyšetření likvoru. Při neuroborrelióze můžeme sledovat pleocytózu (zejména zvýšení polymorfonukleárních buněk) a zvýšenou hodnotu celkové bílkoviny či zvýšení gamaglobulinů. U cca 20 % pacientů s lymeskou borreliózou se objevuje lehká hepatopatie se zvýšením aminotransferáz (AST, ALT). V moči nacházíme lehkou proteinurii. Z hematologických vyšetření bývá zvýšená sedimentace erytrocytů. U kardiologických pacientů pozorujeme změnu v diferenciálním počtu bílých krvinek. U některých pacientů se objevuje lehká anémie a trombocytopenie³²³³.

5. Diskuze

Laboratorní diagnostika lymeské borreliózy má řadu úskalí především v interpretaci jejích výsledků. V laboratorní diagnostice lymeské borreliózy by metodou první volby měla být ELISA. Pozitivní výsledky je nutné konfirmovat další sérologicky zaměřenou metodou - Western blotem, který je využíván k detekci anti-borreliových protilátek v séru pacienta a který vykazuje vyšší senzitivitu i specifitu než imunoafinitní metoda ELISA. Při stanovení diagnózy je nutné brát v úvahu následující fakta: přítomnost protilátek proti lymeské borrelióze je možné prokázat i v těle/séru zdravých osob a pacientů s borreliózou, kteří nemají klinické příznaky, ale není důvodem pro zahájení léčby. Protilátky se začínají tvořit 3-6 týdnů po nákaze, dřívější testování tedy může vést k falešně negativním závěrům. Titr protilátek není kvantitativní a neodpovídá závažnosti onemocnění. Stejně tak neinformuje o délce trvání infekce, její závažnosti, ani o prognóze onemocnění. Komerčně dostupné vyšetřovací soupravy nejsou standardizované a výsledky různých laboratoří se proto mohou i významně lišit. Dlouhodobě setrvávající protilátková odpověď nemusí být tedy známkou přetrvávajícího onemocnění ani selhání léčby. Při interpretaci sérologického vyšetření je důležité si uvědomit, že se může jednat o zkříženou reakci s jinými bakteriálními či virovými agens. Zkříženě reagující protilátky se mohou objevit i u pacientů s autoimunitním onemocněním či u alergiků. Naopak negativní nález protilátek u pacientů se zcela jasnými klinickými příznaky jako je *erythema migrans* či lymfocytom nesmí ohrozit nasazení léčby.

Jasným průkazem *B. burgdorferi* sensu lato v klinickém materiálu je nález borrelií nebo jejich fragmentů pomocí elektronové mikroskopie. Tato metoda je však pro svou náročnost a finanční nákladnost vyhrazena pouze specializovaným pracovištím. Metoda PCR je vhodná pro průkaz původce lymeské borreliózy ve vhodném klinickém materiálu, kde lze jeho výskyt očekávat. Opět má ale metoda PCR u komerčně vyráběných setů úskalí v neexistenci standardizace.

Postupy uvedené v rámci této bakalářské práce se shodují s doporučením Společnosti infekčního lékařství České lékařské společnosti J. E. Purkyně vydaného v roce 2011³⁴. Směrnice Deutsche Borreliose Gesellschaft vydané německou lékařskou společností pro lymeskou borreliózu aktualizované v roce 2011 vydávají shodné postupy jako výše uvedená česká společnost³⁵. Německá směrnice je rozšířena o test

transformace lymfocytů, který je zde zahrnut do doporučených vyšetřovacích metod.
Dle těchto postupů se PCR diagnostika doporučuje provádět ze všech biopsií a punkcí.

Závěr

Cílem této práce bylo podat ucelený obraz onemocnění lymeskou borreliózou, protože rozpoznání (a pochopení) různých stádií onemocnění a variability klinických příznaků jsou zásadní pro správnou laboratorní diagnostiku, celkové zhodnocení stavu pacienta a následnou léčbu onemocnění.

Laboratorní diagnostika lymeské borreliózy má k dispozici širokou škálu vyšetřovacích metod. Základní screeningové metody (ELISA, WB) jsou dostupné pro většinu laboratoří v České republice. Problém však nastává při interpretaci výsledků těchto vyšetření. I metody molekulární biologie se začínají dostávat do základních vyšetřovacích panelů. Dochází k tomu především v komerčních laboratořích, které navíc nabízejí vyšetřování klíšťat od pacientů za přímou finanční úhradu. Vedle základních screeningových a molekulárních metod jsou další metody (IFA, ELM, kultivace) využívány především k vědeckým účelům.

Seznam obrázků

Obrázek č. 1. *Borrelia burgdorferi* v elektronovém mikroskopu (RNDr. Dagmar Hulínská, CSc., SZÚ)

Obrázek č. 2. Růst mladé borrelie z cysty, ELM (RNDr. Hulínská, CSc., SZÚ).

Obrázek č. 3. Kompletní genom bakterie *Borrelia burgdorferi*
(http://en.citizendium.org/wiki/File:Burrelia_genome.png)

Obrázek č. 4. Struktura VlsE antigenu, návod k Euroimmun anti-borrelia WB 2006

Obrázek č. 5. Expres antigenů při sání klíštěte
(https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Borrelia_burgdorferi_and_Lyme_Disease).

Obrázek č. 6. Vývojová stádia klíštěte. Foto Půta, SZÚ

Obrázek č. 7. *Erythema migrans* - ilustrační foto, přednáška RNDr. Kateřiny Kybicové, PhD., SZÚ 2015

Obrázek č. 8. Lymfocytom - ilustrační foto, přednáška RNDr. Kateřiny Kybicové, PhD., SZÚ 2015

Obrázek č. 9. Projevy ACA - ilustrační foto, přednáška RNDr. Kateřiny Kybicové, PhD., SZÚ 2015

Obrázek č. 10. Borrelie v zástinu, foto RNDr. Hulínská, CSc., SZÚ

Obrázek č. 11. Izolační kit QIAamp DNA Mini kit (QIAGEN),
<https://www.qiagen.com/cz/shop/sample-technologies/dna-sample-technologies/plasmid-dna/qiaamp-dna-mini-kit>

Obrázek č. 12. Vizualizace PCR, foto RNDr. Kybicová, Ph.D., SZÚ

Obrázek č. 13. Analýza sekvenování DNA v programu Chromas

Obrázek č. 14. Borrelie v ELM, foto RNDr. Radko Novotný, Ph.D.
(<http://www.dermatologiepraxi.cz/pdfs/der/2008/05/07.pdf>)

Obrázek č. 15. Imunofluorescenční analýza *B. burgdorferi* (foto Mgr. Uherková, SZÚ)

Obrázek č. 16. Kontrolní strip EUROLINE-WB: „Anti-Borrelia“ s vyznačeným VlsE antigenem (https://www.euroimmun.com/index.php?id=westernbl_euroline-wb_beschreib)

Seznam zkratek

Ab.....	z angl. antibodies (protilátka)
ACA.....	z angl. Acrodermatitis Chronica Atrophicans
Ag.....	antigen
AMK	aminokyseliny
AO.....	autoimunitní onemocnění
ATB	antibiotikum
ATP.....	adenosintrifosfát
Bb.....	<i>Borrelia burgdorferi</i>
B.a.....	<i>Borrelia afzelii</i>
B.g.....	<i>Borrelia garinii</i>
Bb s.l.....	<i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato
Bb.s.s.....	<i>Borrelia burgdorferi</i> sensu stricto
Bdr	z angl. Borrelia direct repeat protein
CNS.....	centrální nervová soustava
BSA.....	bovinní sérový albumin
BSK.....	Barbourova-Stoenerova-Kellyho půda
CRASPs	z angl. complement regulator acquiring surface proteins
ČHMÚ	Český hydrometeorologický ústav
Dbp.....	z angl. decorin binding protein
DNA.....	deoxyribonukleová kyselina
dNTP.....	dideoxynukleotidtrifosfát
Dpb.....	decorin binding protein
ELISA	z angl. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (imunoenzymatická metoda)
ELM.....	elektronová mikroskopie
EM	erythema migrans
Erp.....	z angl. exposed outer membrane proteins
Fla	flagelin
IFA	nepřímá imunofluorescence
IgG	imunoglobulin G
IgM.....	imunoglobulin M

LAlymeská artritida
LBlymeská borrelióza
LKlymeská karditida
NRLNárodní referenční laboratoř
Ospz angl. outer surface protein (povrchové proteiny)
PCRpolymerázová řetězová reakce
pHvodíkový exponent
PEGpolyethylenglykol
RNAribonukleová kyselina
RSroztroušená skleróza
SDS-PAGEelektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného
SZÚStátní zdravotní ústav
UDGuracil DNA glykosyláza
Vmpsz angl. variable major proteins
VlsEantigen variabilní systém
WBWestern blot
WHOsvětová zdravotnická organizace

Seznam literatury

¹Daňková, R. (2008). Lymeská borrelióza: materiál použitý z diplomové práce [online]. Ostrava:Ostravská univerzita, Zdravotně sociální fakulta. Dostupné (17.08.2015) z <http://www.onkologickecentrum.cz/downloads/clanky/lymeska-borrelioza.pdf>.

² Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., De Vos, P., Kersters, K., & Swings, J. (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiological Reviews*, 60(2), 407-438.

³Votava, M. (2001). Lékařská mikrobiologie obecná. Brno:Neptun, ISBN 80-902896-2-2.

⁴Votava, M. a kol. (2003). Lékařská mikrobiologie speciální. Brno: Neptun, dotisk 2006. ISBN 80-902896-6-5.

⁵Casjens, S., Palmer, N., Van Vugt, R., Huang, W. M., Stevenson, B., Rosa, P., . . . Fraser, C. M. (2000). A bacterial genome in flux: The twelve linear and nine circular extrachromosomal DNAs in an infectious isolate of the lyme disease spirochete borrelia burgdorferi. *Molecular Microbiology*, 35(3), 490-516.

⁶ Fraser, C. M., Casjens, S., Huang, W. M., Sutton, G. G., Clayton, R., Lathigra, R., . . . Venter, J. C. (1997). Genomic sequence of a lyme disease spirochaete, borrelia burgdorferi. *Nature*, 390(6660), 580-586.

⁷ Pulzova, L., & Bhide, M. (2014). Outer surface proteins of borrelia: Peerless immune evasion tools. *Current Protein and Peptide Science*, 15(1), 75-88.

⁸ Boyle, M. D. P., & Lottenberg, R. (1997). Plasminogen activation by invasive human pathogens. *Thrombosis and Haemostasis*, 77(1), 1-10.

⁹ Bartůněk, P. a kol. (2006). lymeská borrelióza. 3. přepracované. a doplněné vydání Praha: Grada Publishing. ISBN 80-247-1543-0.

¹⁰Kybicová, K. (2015). Přírodně ohniskové infekce. Přednáška kurzu Lékařská bakteriologie, 19.2.2015 SZÚ.

¹¹ Stevenson, B., Tilly, K., & Rosa, P. A. (1996). A family of genes located on four separate 32-kilobase circular plasmids in borrelia burgdorferi B31. *Journal of Bacteriology*, 178(12), 3508-3516.

-
- ¹²Hellwage, J., Meri, T., Heikkilä, T., Alitalo, A., Panelius, J., Lahdenne, P., . . . Meri, S. (2001). The complement regulator factor H binds to the surface protein OspE of *Borrelia burgdorferi*. *Journal of Biological Chemistry*, 276(11), 8427-8435.
- ¹³Roberts, D. M., Caimano, M., McDowell, J., Theisen, M., Holm, A., Orff, E., . . . Marconi, R. T. (2002). Environmental regulation and differential production of members of the bdr protein family of *Borrelia burgdorferi*. *Infection and Immunity*, 70(12), 7033-7041.
- ¹⁴Bařtová, K. (2009). Detekce antiborreliových protilátek IgG pomocí VlsE antigenu: Absolventská práce VOŠ Alřovo nábřeží.
- ¹⁵Blot *Borrelia b. sensu stricto* VlsE IgG: WB souprava k detekci specifických protilátek IgG proti separovaným kmenům *B. b. sensu stricto* v lidském séru nebo plasmě; návod na analýzu, Brno: Test-Line s.r.o. Clinical Diagnostics, 2008.
- ¹⁶Hulínská, D., Dřevová, H. (2001). *Chraňte se před klíšťaty* Praha: SZÚ.
- ¹⁷Hulínská, D. (2008). Diagnostika lymeské borreliózy v NRL LB [online]. Praha:SZÚ, NRL pro LB. Dostupné (17.08.2015) z www.szu.cz/tema/prevence/diagnostika-lymeske-borreliozy-v-nrl-lb.
- ¹⁸SOP-NRL/LB-06-01: Kultivace *Borrelia* sp. Ve specifickém BSK-H médiu, SZÚ 2004.
- ¹⁹Raclavský, V. (2003). *Metody molekulární biologie:učební text* [online]. Olomouc:Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci, Ústav biologie. Dostupné (17.08.2015) z www.biologie.upol.cz/metody.
- ²⁰SOP-NRL/LB-03-14: Příloha1_Izolace bakteriální DNA z tělních tekutin, SZÚ 2014.
- ²¹Hulínská, D., Dřevová, H., Votýpka, J. (1999). PCR v laboratorní diagnostice. *Zprávy CEM* 10(8), 384-389.
- ²²SOP-NRL/LB-03-13: Průkaz DNA *Borrelia burgdorferii* sensu lato metodou PCR, SZÚ 2013.
- ²³Maurin, M. (2012). Real-time PCR as a diagnostic tool for bacterial diseases. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 12(7), 731-754.
- ²⁴Moter, S. E., Hofmann, H., Wallich, R., Simon, M. M., & Kramer, M. D. (1994). Detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in lesional skin of patients with erythema migrans and acrodermatitis chronica atrophicans by ospA- specific PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 32(12), 2980-2988.

²⁵SOP-NRL/LB-08-01:Přímý průkaz *Borrelia* pomocí imunisorbentní elektronové mikroskopie, SZÚ 2001.

²⁶ Merljak Skočir, L., Ružić-Sabljić, E., Maraspin-Čarman, V., Lotrič-Furlan, S., Logar, M., & Strle, F. (2008). Comparison of different *borrelia burgdorferi* sensu lato strains for detection of immune response in patients with erythema migrans. *International Journal of Medical Microbiology*, 298(5-6), 493-504.

²⁷SOP-NRL/LB-07-01:Kvantitativní stanovení antigenu a protilátek proti *Borrelia* a *Ehrlichia* pomocí imunofluorescence, SZÚ 2001.

²⁸SOP-NRL/LB-03-01:ELISA (enzyme-linked immunoassay), sérologický průkaz specifických protilátek LB, SZÚ 2005.

²⁹Kurzová, Z., Hulínská, D., Baštová, K., Švecová, I. (2009). Sérologie lymeské borreliózy. Zprávy epidemiologie a mikrobiologie, SZÚ 18(6), 236.

³⁰Jansson, C. (2005). Analysis of *Borrelia burgdorferi* IgG antibodies with a combination of IgG ELISA and VlsE C6 peptide ELISA. *Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, CMI, 11, 145 – 163.

³¹SOP-NRL/LB-05-01:Western blot, konfirmace specifických anti *Borrelia garinii*, *Berelia afzelii* protilátek, SZÚ 2001.

³²Janovská, D. (2005). Lymeská borrelióza v České republice. Studijní materiály 3. Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze. Dostupné (17.08.2015) z http://old.lf3.cuni.cz/studium/materialy/epidemiologie/epivyukcz/Lymeska_borrelioza_epid.pdf.

³³ SOP-NRL/LB-03-14: Průkaz ospA genu *Borrelia burgdorferii* sensu lato metodou PCR, SZÚ 2014.

³⁴Dlouhý, P., Honegr, K., Krbková, L., Pícha, D., Roháčová, H., Šruncová, V. (2011). Lymeská borrelióza: Doporučený postup v diagnostice, léčbě a prevenci. Společnost infekčního lékařství J.E. Purkyně. Dostupné (17.08.2015) z <http://www.infekce.cz/DoporLB11.htm>.

³⁵Diagnosis and treatment of Lyme borreliosis - guidelines of the German Borreliosis Society (2010). Deutsche Borreliose – Gesellschaft. Dostupné (17.08.2015) z <http://www.borreliose-gesellschaft.de/Texte/guidelines.pdf>.