

Fakulta zdravotnických studií  
Studijní program: Specializace ve zdravotnictví B5345

**Čejka Jan**

Studijní obor: Zdravotní laborant 5345R020

**LYMSKÁ BORELIÓZA**

**Bakalářská práce**

Vedoucí práce: Mgr. Petra Soušková

PLZEŇ 2018

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

V Plzni dne 28.3. 2018

.....  
vlastnoruční podpis

**Poděkování:**

Chtěl bych poděkovat vedoucí mé bakalářské práce Mgr. Petře Souškové za velmi ochotný přístup, cenné rady, profesionální přístup a především za trpělivost při tvorbě této práce.

## **Anotace**

Příjmení a jméno: Jan Čejka

Katedra: Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví

Název práce: Lymfská borelióza

Vedoucí práce: Mgr. Petra Soušková

Počet stran – číslované: 58

Počet stran – nečíslované: 19

Počet příloh: 3

Počet titulů použité literatury: 29

Klíčová slova: *Borrelia burgdorferi*, ELISA, Western blot, erytema migrans, imunoglobuliny

### **Souhrn:**

Tato bakalářská práce je zaměřena na problematiku lymfské boreliózy. Je rozdělena do dvou částí – teoretické a praktické. Teoretická část se zabývá charakteristickými příznaky, přenašečem, epidemiologií, postboreliovým syndromem a diagnostikou. Praktická část je zaměřena na diagnostické postupy, statistické zpracování výsledků do grafů, diskuze a závěru.

## **Annotation**

Surname and name: Jan Čejka

Department: Department of Rescue Services, Diagnostics Fields and Public Health

Title of thesis: Lyme disease

Consultant: Mgr. Petra Soušková

Number of pages – numbered: 58

Number of pages – unnumbered: 19

Number of appendices: 3

Number of literature items used: 29

Key words: *Borrelia burgdorferi*, ELISA, Western blot, erythema migrans, immunoglobulins

### Summary:

This Bachelor's thesis is focused on Lyme disease. It's divided into two parts – theoretical and practical. The theoretical part deals with characteristics symptoms, transducer, epidemiology, post - Lyme boreliosis syndrom and diagnostics. Practical part is focused on diagnostic procedures, statistical processing of results in graphs, discussion and conclusion.

# OBSAH

ÚVOD .....	10
TEORETICKÁ ČÁST .....	11
1 HISTORIE .....	12
2 BORELLIA BURGDORFERI.....	13
2.1 Biologie Borrelia burgdorferi.....	13
3 PŘENAŠEČ BORELLIA BURGDORFERI .....	15
3.1 Ixodes ricinus .....	15
3.2 Biologie klíšťat.....	15
3.3 Přisátí klíštěte .....	16
3.4 Přenos borelií .....	16
4 EPIDEMIOLOGIE LYMSKÉ BORELIÓZY .....	18
4.1 Epidemiologická opatření .....	18
4.1.1 Preventivní opatření.....	18
4.1.2 Represivní opatření.....	19
5 KLINICKÝ OBRAZ.....	20
5.1 Poškození kůže.....	21
5.2 Neuroborelióza.....	22
5.2.1 Charakteristika neuroboreliózy .....	22
5.2.2 Patogeneze neuroboreliózy .....	23
5.2.3 Prognóza neuroboreliózy .....	23
5.3 Postižení kloubů.....	24
5.3.1 Charakteristika.....	24
5.3.2 Projevy kloubního postižení .....	24
5.4 Postižení očí .....	25
5.5 Postižení srdce.....	25
6 POSTBORELIOVÝ SYNDROM.....	26
7 DIAGNOSTIKA .....	27
7.1 Metody přímé .....	27
7.1.1 Kultivace borelií .....	27
7.1.2 Světelná mikroskopie v zástinu .....	28
7.1.3 PCR.....	28
7.1.4 DNA hybridizace .....	28
7.1.5 Histologický průkaz .....	29
7.1.6 Elektronoptický průkaz.....	29
7.2 Metody nepřímé .....	29
7.2.1 Imunofluorescenční testy IF a IFA .....	29
7.2.2 ELISA .....	30
7.2.3 Western blot .....	30
8 LÉČBA LYMSKÉ BORELIÓZY .....	32
8.1 Léčba postižení kůže .....	32
8.2 Léčba neuroboreliózy.....	33
8.3 Přírodní léčba lymfské boreliózy.....	33
PRAKTICKÁ ČÁST .....	35
9 CÍLE PRÁCE.....	36
10 HYPOTÉZY.....	37
11 METODIKA .....	38
11.1 Biologický materiál .....	38
11.2 ELISA.....	38
11.2.1 Princip testu EIA.....	38
11.2.2 Reagencie a vybavení .....	39

11.2.3	Skladování a expirace setu.....	41
11.2.4	Vzorky vhodné k vyšetření.....	41
11.2.5	Příprava pracovních roztoků.....	42
11.2.6	Ředění a příprava vzorků.....	42
11.2.7	Pracovní postup.....	42
11.2.8	Validita testu.....	44
11.2.9	Zhodnocení výsledků.....	44
11.3	Western blot.....	46
11.3.1	Princip testu Western blot.....	46
11.3.2	Reagencie a vybavení.....	46
11.3.3	Skladování a expirace soupravy.....	48
11.3.4	Příprava pracovních roztoků a vzorků.....	48
11.3.5	Pracovní postup.....	48
11.3.6	Vyhodnocení výsledků.....	49
11.3.7	Vyhodnocení Western blotu IgG.....	51
11.4	Microblot-Array.....	53
11.4.1	Princip metody.....	53
11.4.2	Vyhodnocení testu.....	53
12	VLASTNÍ VÝSLEDKY.....	54
13	DISKUZE.....	64
14	ZÁVĚR.....	67
	SEZNAM POUŽITÉ LITERAURY.....	68
	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	71
	SEZNAM TABULEK.....	72
	SEZNAM GRAFŮ.....	73
	SEZNAM OBRÁZKŮ.....	74
	SEZNAM PŘÍLOH.....	75
	PŘÍLOHY.....	76

## ÚVOD

Lymfská borelióza je komplexní onemocnění vyvolané mikroaerofilní, pohyblivou, gramnegativní spirochétou *Borellia burgdorferi*. Lymfská borelióza v České republice patří mezi nejčastější antropozoonózy přenášené klíštětem rodu *Ixodes*. Lymfská borelióza je multisystémové onemocnění napadající kůži, kloubní systém, nervový systém, srdce, oči a může být nebezpečné i v těhotenství. Příčinou multisystémových onemocnění je značná variabilita *Borellia burgdorferi*, jejímž následkem jsou netypické příznaky, které mohou imitovat mnohá jiná onemocnění a tím znesnadňovat její diagnostiku. Lymfská borelióza se může velice lehce vyvinout do chronicity, která je provázena klinickými i laboratorně prokazatelnými relapsy. Díky těmto faktům je toto onemocnění tolik komplikované.

Ohrožení jsou nejvíce lidé, kteří dlouhodobě pobývají v přírodě. Jen u malé části populace se po infikování projeví klinické příznaky lymfské boreliózy. Do povědomí lékařů se toto onemocnění dostalo koncem 70. let 20. století. (Bartůněk, 2006)



## **TEORETICKÁ ČÁST**

# 1 HISTORIE

První zmínka o lymfské borelióze se objevila v roce 1883. Za jejího objevitele se považuje dermatolog Buchwald, který ji popsal jako *acromadermatitis atrophicans* (ACA). Roku 1921 byla zveřejněna Jessnerova publikace o postiženém s ACA spolu s laryngitidou (Bartůněk, 2006). O rok později Garin a Bujadoux referovali o případě meningopolyneuritidy ve spojení s erytema migrans (EM). Ve 40. letech 20. století Bannwarth popsal řadu nemocných, kteří měli multifokální postižení nervového systému po přisátí klíštěte. Schaltenbrand popsal roku 1966 vztah erytema migrans s meningitidou a Lonhoff upozornil na možnou účast spirochét při erytema migrans a acromadermatitis atrophicans. EM bylo uznáno jako samostatné onemocnění v 60. – 70. letech 20. století, ale bez známého původce. V 80. letech byla pojmenovaná lymfská nemoc podle městečka Lyme v Connecticutu, kde Steere a spol. zachytili zvýšený výskyt zánětlivé artropatie s předcházejícím erytémem u 59 % dětí. Také tato oblast byla charakteristická přemnožením klíštěte *Ixodes dammini*. K objevení spirochéty jako původce infekce, zařazení mezi borelie a pojmenování *Borellia burgdorferi* došlo v roce 1982. O pět let později na 3. mezinárodní konferenci v New Yorku vzniklo označení lymfská borelióza (Bartůněk, 2006; Bartůněk, 2013)

## 2 BORELLIA BURGdorFERI

Lymeská borelióza je způsobena bakterií rodu *Borellia*, konkrétně bakterií *Borellia burgdorferi*. Existuje však více druhů bakterií rodu *Borellia*, které se liší od *B. burgdorferi* stavbou, patogenitou i výskytem jako například: *B. recurrentis*, *B. hermsi*. V rámci *Borellia burgdorferi* sensu lato se rozlišují druhy např. *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. afzelii* a *B. garinii*, u nichž je jasně prokázána patogenita ve spojitosti s lymeskou boreliózou. (Bartůněk, 2013)

### 2.1 Biologie *Borellia burgdorferi*

*Borellia burgdorferi* sensu lato je bakteriální komplex více než jedenácti ověřených a pojmenovaných genospecies. Jsou to gramnegativní, mikroaerofilní spirochéty patřící mezi jedny z nejstarších bakterií žijících na Zemi. Jsou typické svým vinutým tvarem, který vyplývá již z názvu *spirochéta* neboli „svinutý vlas“. Rozměry *Borellia burgdorferi* jsou 0,2  $\mu\text{m}$  na šířku a 4-30  $\mu\text{m}$  na délku. Buňky jsou pravidelně po 2,2  $\mu\text{m}$  spirálovitě stočené s pravidelnými závitmi, kterých má každá bakterie 4-15. *Borellia burgdorferi* sensu lato se pohybuje za pomoci 7-12 bičíků, což ji odlišuje od ostatních patogenních borelií, které mají bičíků výrazně více a to 15-20 (Křupka a kol., 2008; Bartůněk a kol., 2013). Bičíky mají vnitřní kanálky vyplněné dřeví tzv. vnitřní flagelin. Vinou se z obou konců buněk a obtáčí celé tělo spirochéty, vychází z bazálních disků situovaných v cytoplazmatické membráně. Jejich rozměry jsou 11,8-12,0 nm. Díky bičíkům je možný pohyb borelií ve velice viskózním prostředí, ve kterém se nejčastěji vyskytují. Cytoplazmatická membrána bakterie se skládá ze tří vrstev a to z vnitřní, střední a vnější. Vnitřní je vrstva peptidoglykanová, střední je tvořena lipopolysacharidy a vnější z lipoproteinů. Střední a vnější vrstva je dvouvrstvá a vnitřní je jako jediná pouze jednovrstevná. Vnější membrána vyčnívá nad cytoplazmatický cylindr. Při vysunutí bičíků do proximálního a distálního prostoru se uvolňují membranózní vezikuly. Podle některých autorů tyto vezikuly obsahují plasmidovou DNA. Generační doba in vivo je 6-12 hodin, po tomto čase je možné pozorovat dělicí se buňky. In vitro je doba růstu o něco delší a to 12-14 hodin. Během dělení přichází mateřská borelie o polovinu bičíků. Háčky a disky jsou zachovány pro dceřiné buňky, ze kterých vyrostou bičíky nové. (Buhner, 2014; Bartůněk, 2013)

U borelií byla objevena zajímavá a dosud nevysvětlená vlastnost a to, že je schopna tvořit různé non-spirální formy. Tyto cystické formy jsou boreliemi tvořeny při vystavení suboptimálním podmínkám pro jejich život, jako například pokles pH nebo osmotického tlaku. Tímto chováním se brání a ukrývají před nepříznivými podmínkami a nejspíše také před antibiotickou léčbou. Z cystické formy jsou schopny se vrátit do spirální aktivní formy. (Křupka, 2008; Buhner, 2014; Bartůněk, 2013)

## 3 PŘENAŠEČ BORELLIA BURGDORFERI

### 3.1 Ixodes ricinus

*Ixodes ricinus* je druh klíštěte nacházející se na našem území nejhojněji. Nejčastěji ho nalezneme od března do října v listnatých a smíšených lesích a také na loukách ve vysoké trávě. Je u nás nejvýznamnějším přenašečem lymfské boreliózy. V Americe je více častý druh klíštěte *Ixodes pacificus* nebo *Ixodes scapularis*. Klíště se živí sáním hostitelovy krve, které trvá až několik dní a klíště při tom mnohonásobně zvětší svůj objem. Není však jediným organismem, u kterého byla prokázána přítomnost bakterií rodu *Borellia*. Jsou jimi i například komáři, u nichž však nikdy nebyl dokázán přenos infekce na člověka. (Jirásková, 2014; Bartůněk, 2013)

### 3.2 Biologie klíšťat

Klíšťata patří do kmene parazitických členovců, konkrétně pavoukoců společně s roztoči. Dospělí jedinci mají osm končetin, jejich larvy mají o dvě nohy méně. Jako u většiny druhů hmyzu a parazitů je i u klíšťat rozdíl ve velikosti samic a samců: samičky mohou dorůst do velikosti okolo 5 milimetrů, samečci jsou o něco menší. Jejich tělo je chráněno chitinovou schránkou, která je brání před vnějším mechanickým poraněním měkkého těla. U klíšťat je na první pohled rozpoznatelné tělo a hlava s párem kusadel. Larvy se líhnou z vajíček a začínají růst po prvním přijetí potravy, kterou je krev hostitele. Rostou během procesu sání krve z larvy přes nymfu až k dospělému jedinci.

Klíšťata žijí podle rychlosti sání a dostupnosti hostitele, do úplné dospělosti se vyvíjí od jednoho a půl roku do pěti let díky své schopnosti hladovět. Hlavními hostiteli jsou hlodavci, domácí zvířata a lidi. Přisávají se pomocí *hypostomu* – bodacího ústrojí se dvěma kusadly a zpětnými háčky. Klíšťata lze rozdělit na jednohostitelská, dvouhostitelská a trojhostitelská. Takto je rozdělujeme kvůli počtu hostitelů, který napadnou za svůj život.

Klíšťata se vyskytují hlavně v listnatých lesích a travnatých porostech, především v nížinách. Podle výšky výskytu ve vegetaci můžeme rozlišit jednotlivá stádia. Larvy se pohybují zásadně do výšky maximálně 15 centimetrů kvůli jejich

hlavním hostitelům, jimiž jsou hlodavci. Nymfy se objevují ve výšce 15-30 centimetrů a dospělci v 1 metru. Mnoho lidí si myslí, že klíšťa lezou po stromech a skáčou na lidi, což je naprosto zavádějící myšlenka. Svého hostitele cítí díky vibracím, které vznikají při chůzi hostitele, tepla a koncentraci vydechovaného oxidu uhličitého. (Kimming, 2003; Bednář, 1996)

### 3.3 Přisátí klíšťete

Klíšťe čeká na hostitele a na správný okamžik přisedlé na stéblech trávy. Pokud se hostitel dostane do blízkosti klíšťete, klíšťe se přichytí a najde ideální místo pro prisátí. Po nalezení vhodného místa klíšťe začne provrtávat epidermis, pod jejímž povrchem prochází cévy. Do místa porušení kůže klíšťe vypouští své sliny, které obsahují velké množství mléčného pojiva, díky němuž se místo zpevní a funguje pro něj jako velice funkční těsnění proti úniku krve a pro jeho udržení na hostiteli. Ve škáře si klíšťe vytvoří prohlubeň připomínající bazén. Tento „bazén“ nechává klíšťe naplnit krví a dle potřeby ji vysává: tato fáze může mít různě dlouhé trvání, záleží na vývojové formě klíšťete. V časových intervalech se střídá fáze sání krve a fáze vypouštění slin. Sliny neobsahují jen mléčné pojivo, ale i mnoho dalších farmakologicky aktivních látek působících proti imunitě hostitele jako je například histamin a bradykinin, namířené proti protizánětlivým látkám, antiimunitní složky, které zpomalují nebo úplně blokují funkci imunoglobulinů IgG, neutrofilů a alternativní cestu aktivace komplementu, a v neposlední řadě antihemostatické sloučeniny blokující tvorbu adenosindifosfátu. Právě tyto látky napomáhají tomu, že si hostitel prisátého klíšťete ihned nevšimne, protože je potlačena imunita a hemostáza, ale hlavně svědění v místě prisátí. Díky potlačenému svědění získá klíšťe čas na sání dostatečného množství krve a zároveň se spirochéty přesunou ze střev svého hostitele (tj. klíšťete) do jeho slinných žláz, odkud už přímo putují do krevního oběhu člověka nebo zvířat. Člověk je v koloběhu života borelií jen slepým článkem. (Buhner, 2014)

### 3.4 Přenos borelií

Signálem pro borelie, že se mají přesunout ze střední části střeva (midgut) do slin klíšťete, je změna teploty a pH. Klíšťa r. *Ixodes* jsou organismy studenokrevné, to znamená, že mají stejnou teplotu jako jejich okolí, která není konstantní. Při sání krve se teplota klíšťete rapidně zvýší a zůstane na stejné hladině. Jeho pH se sníží ze

zásaditých 9,5 přibližně na 7,4. Po změně těchto veličin se borelie připraví na opuštění hostitele a napadení dalšího. Jsou závislé na dokonalé regulaci exprese povrchových proteinů, takzvaných *outer surface proteins* (Osp) (Buhner, 2014; Křupka, 2008). Během pobytu borelie v trávicím traktu klíštěte jsou exprimovány hlavně proteiny OspA a OspB, které zastupují funkci adhezivních molekul. Při přesunu do slinných žláz je tím nejzásadnějším OspC. OspC má schopnost vázat imunoregulační protein Salp15 obsažený ve slinách klíštěte, čímž pomáhá boreliím přežít imunitní reakci v časně fázi infekce hostitele. Aby se mohly borelie přesunout do těla hostitele, je potřeba obvykle alespoň 24 hodin. (Buhner, 2014; Křupka, 2008; Roháčová 2010)

Studie prokázaly skutečnost, že infekce neprobíhá tak agresivně a její úroveň prudce klesá, pokud se udržuje hladina interleukinů a interferonu gama v krvi laboratorních hlodavců ve vysokých hodnotách. Čím vyvinutější je imunita hostitele, tím má klíště menší šanci na dokonalé přisátí a stoupá šance hostitele na odvržení klíštěte ještě před infiltrací klíštěte do škáry. U jedince se sníženou imunitou je riziko infikování těla boreliemi mnohem vyšší než u úplně zdravého jedince. (Buhner, 2014)

Svou roli zde také hraje vývojové stadium infikovaného klíštěte. Stoupá směrem od larev přes nymfy až k dospělcům v intervalu od 5-45%. To znamená, že až polovina dospělých klíšťat je přenašečem lymfské boreliózy. (Bartůněk, 2013)

## 4 EPIDEMIOLOGIE LYMSKÉ BORELIÓZY

Lymeská borelióza se objevuje tam, kde žijí klíšťata, což je celý mírný pás. Rezervoárem borelií jsou teplokrevná zvířata jako například drobní zemní savci a vysoká zvěř. Vysoká promítenost je i u černé zvěře, kde je infikováno až 13% z celkového počtu zvěře. V České republice je během jednoho roku nahlášeno mezi 3-5 tisíci případy lidí nakažených lymeskou boreliózou (LB). Nejčastějšími pacienty jsou ženy, které jsou postiženy LB až dvakrát více než muži. Nevyšší výskyt je u věkové skupiny od 45 do 54 let (Göpfertová, 2013). Nemocnost dosahuje nejvyššího bodu v červenci díky častému pohybu lidí v přírodě. Od roku 1998 se objevuje mírný vzestupný trend nemocnosti a meziroční střídání nejvyšší a nejnižší nemocnosti. Průměrný počet vzájemně souvisí s počtem nakažených klíšťovou encefalitidou, který je však až osmkrát větší než počet nakažených lymeskou boreliózou. Příkladem je rok 2008, kdy bylo hlášeno 4350 infikovaných pacientů, rok poté nastal mírný pokles a to na 3863 případů onemocnění lymeské boreliózy. Vnímavost je u každého jedince jiná. V populaci má až 20 % obyvatelstva v krvi přítomné protilátky. U osob s časným začleněním antibiotiky je vysoké riziko reinfekce. (Göpfertová, 2013; Kříž, 2015)

V České republice patří lymeská borelióza mezi povinně hlášená onemocnění. Lékaři jsou povinni nahlásit každý diagnostikovaný případ společně s datem, kdy bylo onemocnění zjištěno, informacemi o místě nakažení, hospitalizaci, propuštění a případně o datu a důvodu úmrtí. Všechny tyto informace se shromažďují na krajských hygienických stanicích, ze kterých se dále odesílají jednou týdně do úložiště dat MZČR a poté do Státního zdravotního ústavu. Jednou za měsíc se pravidelně zveřejňují na internetových stránkách ústavu a časopisu Zprávy CEM. (Göpfertová, 2013; Kříž, 2015; Roháčová, 2010)

### 4.1 Epidemiologická opatření

Soubor epidemiologických opatření proti šíření lymeské boreliózy se dělí do dvou skupin: *preventivní* opatření a *represivní* opatření. (Göpfertová, 2013)

#### 4.1.1 Preventivní opatření

První skupinou jsou opatření preventivní, která předchází a zabraňují vzniku onemocnění. Doposud nejefektivnějším opatřením je vyhýbání se lokalit s výskytem



klíšťat rodu *Ixodes*. Také je velice účinné nosit v přírodě kalhoty s dlouhými nohavicemi, používat repelent a po každém příchodu domů se důkladně prohlédnout a včas odstranit přisáté klíště. Dalším je zdravotní výchova obyvatel týkající se prevence napadení klíštětem: jeho časně a správně odstranění a následná péče o místo, kde bylo klíště přisáto. Velkou úlohu také hraje mapování a sledování ohnisek nákazy. V dřívějších letech bylo do těchto opatření řazeno i očkování komerčními vakcínami. V roce 1998 byla zavedena na trh vakcína Lymerix, která však byla stažena z trhu kvůli autoimunitním reakcím. Několik pacientů, kteří užili tuto vakcínu, dokonce zažalovalo výrobce, protože se u nich projevila revmatoidní artritida a další příznaky podobné lymfské borelióze. Očkování je v dnešní době dostupné jen pro zvířata, ale dodnes stále pokračuje výzkum vakcín, které by byly využitelné pro člověka. (Göpfertová, 2013; Křupka, 2008; <http://www.borelioza.cz>, on-line)

#### **4.1.2 Represivní opatření**

Druhou skupinou opatření jsou opatření represivní. Zaobírají se především lidmi, kteří už jsou infikováni boreliemi. Zahrnují hlášení onemocnění, správný postup odběru vhodného vzorku a jeho transport do laboratoře. Mezi represivní opatření patří i edukace nemocných o tom, co by po prodělání nemoci neměli dělat, jako například darování krve, plazmy a kostní dřeně po dobu dvou let. (Göpfertová, 2013; Křupka, 2008; <http://www.borelioza.cz>, on-line)

## 5 KLINICKÝ OBRAZ

Lymfská borelióza je multiorgánové onemocnění, které se může projevovat rozmanitou škálou příznaků, ale i asymptomaticky. Nejčastějším příznakem je poškození kůže v podobě erytema migrans, které postihuje 65-67% postižených. Dalším příznakem je poškození muskuloskeletárního systému (17%) a poškození funkce nervového systému (12-14%). (Jirásková, 2014)

Podle klinických příznaků se lymfská borelióza rozděluje do tří stádií.

1. Časná lokalizace
2. Časná diseminace
3. Pozdní diseminace

Každý autor stádia pojmenovává různě, výše uvedené názvy jsou převzaty z doporučeného postupu v diagnostice, léčbě a prevenci lymfské boreliózy (Dlouhý, 2011). První dvě stádia jsou akutní a třetí chronické. První a druhé je způsobeno samotnou bakterií, ve třetím stádiu už se projevují imunopatologické změny. Hlavním příznakem prvního stádia je erytema migrans – typický erytém na kůži (EM). Vedlejšími příznaky mohou být cefalgie, chřipkovité příznaky, lymfadenitida. EM je sice charakteristickým příznakem, ale objevuje se až po několika dnech po přísátí klíštěte.

Pro druhé stádium je typický boreliový lymfocytom, což je červenofialové zduření, které je nebolestivé a typické pro dětský věk. Nejčastější lokalizací je nos, ucho, podpaží, prsní bradavka a šourek. Dalšími příznaky jsou tengovaginitida, bursitydy, poruchy srdečního rytmu atd. Inkubační doba je několik týdnů až měsíců.

Poslední, chronické stádium se projevuje po několika měsících až letech. Pacient v chronické fázi trpí nejčastěji poškozením kloubů hlavně loketního a ramenního a chronickou atrofickou akrodermatitidou (ACA), při níž kůže ztrácí svou elasticitu. (Roháčová, 2012; Rozsypal, 2015; Dlouhý, 2011)

## 5.1 Poškození kůže

Po proniknutí do těla se borelie začnou aktivně šířit tkáněmi. Používají mnoho způsobů pro usnadnění pohybu kůží, protože v ní je mnoho překážek, kterými musí proniknout. Borelie narušují buněčný cytoskelet, který je mnohokrát špatně prostupný i pro malé molekuly. Rozkládají strukturu tkání a zabraňují hojení. Tyto mechanismy napomáhají prostupu borelií do intracelulárních prostor mezi endotelovými buňkami a pod monomolekulární vrstvy. Tento proces se nazývá transendoteliální migrace. Bakterie se v endoteliálních prostorech seskupí a dohromady začnou tvořit proteiny potřebné pro iniciaci infekce. Poškození kůže způsobuje především *Borrelia afzelii*. (Buhner, 2014)

Hlavním poškozením kůže, které je na první pohled u lymfské boreliózy viditelné, je erytema migrans. Průměrně se objevuje po 7 dnech od přisátí klíštěte. Po týdnu se vytvoří červená, zpravidla kulatá nebo okrouhlá skvrna dosahující postupně až několik desítek centimetrů v průměru. Může se vyskytnout v podstatě kdekoli na těle. Klinicky jsou rozlišovány tři základní typy:

1. Anulární (EM anulare) – červeně zbarvený šířící se lem do okolí s centrálním vyblednutím, hladkým povrchem, hojící se v centru.
2. Homogenní (EM maculare) – nemusí se šířit do okolí, bez centrálního výbledu, s hladkým povrchem.
3. Irisovité (EM concentricum) – vyznačuje se dvěma nebo i více soustřednými kruhy, které jsou oddělené světlým mezikružím a zdravou barvou kůže. (Bartůněk, 2013; Buhner, 2014)

Projevy erytema migrans mohou být svědivé nebo citlivé na dotek, nejsou však bolestivé. Oblast postižená EM je palpačně teplejší než okolní tkáň. EM není pro pacienta příznakem zásadně ohrožujícím a vymizí sám během několika týdnů až měsíců bez léčby. Pokud je lymfská borelióza antibioticky léčena, může EM vymizet během několika dní.

Boreliový lymfocytom je papula nebo plak velký 3-5 cm s lesklým povrchem temně červené až fialové barvy. Objevuje se především u dětí po několika týdnech od proběhnutí infekce. Nejčastější lokalizací je ušní boltec, špička nosu, někdy i dvorec

prsní bradavky nebo skrotum. Boreliový lymfocytom může být doprovázen místní lymfadenitidou. (Roháčová, 2010; Bartůněk, 2013)

Acrodermatitis chronica atropicans (ACA) je známkou třetího stádia neléčené nemoci objevující se po 6 až 36 měsících. Prvním symptomem je místní zduření. Projevuje se akutním zánětem kůže s modročervenými puchýři na akrálních částech těla, především na nártách, kolenou, nad hřbetem ruky a loktem. ACA zpravidla zasahuje jen jednu stranu těla, výjimečně obě. Kůže postupně ztrácí elasticitu a dochází k dilataci cév z důvodu hromadění mononukleárního infiltrátu v okolí cév, který se rozšiřuje mezi kolagenovými vlákny. Postupně dochází k zeslábnutí kůže, ztrátě vlasů nebo chlupů a částečnému vymizení potních a mazových žláz. Bez antibiotické léčby není ACA vyléčitelná. Antibiotika jsou u tohoto projevu velmi účinná. (Buhner, 2014; Bartůněk, 2013; Roháčová, 2010)

## **5.2 Neuroborelióza**

### **5.2.1 Charakteristika neuroboreliózy**

Neuroborelióza je označení pro několik různých poškození nervového systému způsobené lymfskou boreliózou. Větší riziko je u nemocných infikovaných *B. garinii* a *B. afzelii*, menší pravděpodobnost propuknutí neuroboreliózy je u infikovaných *B. burgdorferi* sensu stricto. Z toho vyplývá, že častější výskyt neuroboreliózy je v Evropě než v Americe díky zastoupení borelií ve světě. V Evropě propuká u 10-40% pacientů s neléčeným erytema migrans. Neuroborelióza zahrnuje encefalitidu, meningoencefalitidu, obrny hlavových nervů a to hlavně lícního. Při postižení nervového systému je likvor často abnormální, objevuje se pleocytóza, zvýšená hodnota bílkovin nebo jen gamaglobulinů, ale je i možnost fyziologického likvoru. Neuroborelióza je poškozením projevujícím se v pokročilém stádiu po několika týdnech až měsících od projevení erytema migrans. (Roháčová, 2012)

Pro dospělé jedince je charakteristická lymfocytární meningomyeloradikuloneuritida nazývaná jako Garin-Bujadoux-Bannwarthův syndrom. Je typická kořenovými bolestmi, defektem kožního cití, parézami končetin a oboustrannými obrnami *nervus facialis*. Vzácným projevem jsou symetrické polyneuropatické obrazy, naopak časté jsou asymetrické polyneuropatické projevy které vznikají na základě asociované vaskulitidy a perineuritidy. Bolesti postihující pacienta

se zhoršují především v noci a nereagují na terapii běžnými analgetiky a antirevmatiky. (Ambler, 2013; Roháčová, 2012; Dlouhý, 2011)

Během pozdní neuroboreliózy se vzácně mohou projevit poruchy paměťových, kognitivních funkcí a emocí. Tyto poruchy jsou významným diagnostickým problémem a jsou často zaměňovány za jiné choroby. Pro určení správné diagnózy je nutné kvalitativní vyšetření likvoru, které by mělo být doplněno o sérologické vyšetření a vyšetření metodou polymerázové řetězové reakce. Vědci si už několik let pohrávají s myšlenkou, že by mohla být lymská borelióza primární spouštěčem roztroušené sklerózy a Parkinsonovy choroby. (Bartůněk, 2013)

### **5.2.2 Patogeneze neuroboreliózy**

Borelie významně poškozují centrální nervovou soustavu (CNS) přímým zánětem i toxickým působením. Přímé poškození je způsobeno průnikem bakterií přes hematoencefalickou bariéru a vstupem do nervové soustavy, kde narušují neurony a glie. Také jsou schopné prostoupit do likvoru a pohybovat se perineurálně. Může dojít k poškození míšních kořenů a mozkomíšních plen. (Buhner, 2014; Bartůněk, 2013)

Kromě přímého poškození CNS je také uvolňována kyselina chinolinová, která působí jako toxin a silně ovlivňuje funkce centrální nervové soustavy. V mozku se nachází mikroglie, které se považují za významné makrofágy v mozku. Mikroglie jsou převážně neaktivní, ale pokud je mozek napaden mikrobiální infekcí, mikroglie se zburcují a stávají se velice aktivními. Svoji aktivací se začnou dělit a tvořit vysoké hladiny kyseliny chinolinové. Testováním dopadu kyseliny chinolinové bylo potvrzeno, že způsobuje úbytek neuronů. (Buhner, 2014; Bartůněk, 2013)

### **5.2.3 Prognóza neuroboreliózy**

Prognóza neuroboreliózy je při rychlé diagnóze a správné léčbě velmi pozitivní. Jako u většiny příznaků lymské boreliózy je riziko relapsů, při kterých je nutné opakování léčby. Také je zde riziko, že ne všechna neurologická poškození se vrátí do fyziologického stavu, velmi záleží na pokročilosti poškození nervového systému. Až 20% pacientů s neuroboreliózou zůstávají trvalé následky v podobě poruch motorických, senzorických a kognitivních funkcí. U nemocných s premorbidními predispozicemi se mohou spustit rozmanité psychické poruchy. (Ambler, 2012)

## 5.3 Postižení kloubů

### 5.3.1 Charakteristika

LB byla nejprve mylně přiřazována k revmatickým chorobám z důvodu kloubního zánětu, který se později identifikoval jako pouze jeden z projevů infekční choroby. Borelie vyvolávají změny v pohybovém aparátu vedoucí k lymbské artritidě a artralgií, která se manifestuje v časném stádiu. Lymbská artritida (LA) patří v Evropě k málo se objevujícím příznakům LB, zatímco v USA je LA téměř pravidlem, což vypovídá o zastoupení různých genospecies ve světě. Evropě se LA projeví u 15% všech případů. (Buhner, 2014; Bartůněk, 2013)

Hlavní příčinou LA je přítomnost borelií v kloubním prostředí. Poškození kloubů se rozvíjí z důvodu přetrvávání infekce a díky imunopatologickým dějům navozeným infekcí. I v tomto případě hraje roli, jakým druhem borelie je člověk infikován. Patologii kloubů vyvolává převážně *B. burgdorferi* sensu stricto, neurologické poškození *B. garinii* a kožní projevy *B. afzelii*.

Borelie se hromadí zejména v synovii kloubů, tvoří mikrokolonie a vážou se silně na kolagenové mřížky. V průběhu vazebného děje se vytváří unikátní molekula Oms28-porin. Již podle názvu lze poznat, že molekula má vztah k pórům, tvoří totiž na vnější buněčné membráně póry, kterými je umožněn prostup borelií tkáněmi. Vědci zjistili, že lze rozvoj lymbské artritidy zpomalit díky potlačení syntézy metaloproteináz, které uvolňují glykosaminyglykan (CAG) a mají velký podíl na poškození kloubů. (Buhner, 2014; Bartůněk, 2013)

### 5.3.2 Projevy kloubního postižení

Nejčasnějším projevem je bolest svalů a kloubů. Během náhlých a prudkých ataků klouby mohou otékat do troj- až čtyřnásobných velikostí, než je jejich fyziologický rozměr. Synoviální tekutina se nejčastěji hromadí v kolenním kloubu a může přecházet do formy Bakerovy pseudocysty v podkolenní jamce a perforovat. Ataky se zeslabují a zesilují, ale stále probíhají v pravidelných časových intervalech. (Dlouhý, 2011; Buhner, 2014)

## 5.4 Postižení očí

Následkem boreliózy může být postižení očí jako například sklivcové vločky, poruchy vidění, onemocnění očního nervu, keratitida, episkleritida a uveitida. Jsou to různorodé projevy projevující se v jakémkoliv stádiu choroby.

Podle American Journal of Ophthalmology jsou během prvního stádia nemoci nejobvyklejší konjunktivitida, episkleritida a edém víček. Mohou se objevit již při prvních dnech od projevení erytema migrans. Konjunktivitida je název pro obecně známý zánět očních spojivek a episkleritida je zánět v oblasti skléry vypadající jako červená až fialová skvrna. Závažným projevem, který bývá jedním z prvních příznaků lymské boreliózy, je paréza okulomotorických nervů, především VI., VII., méně často III. a IV. periferního nervu. Následkem poškození těchto nervů je zhoršený pohyb oka. (Bartůněk, 2013; Ambler, 2013)

V pokročilých stádiích se může v lehké podobě objevit uveitida jako příznak imunoalergické reakce. Uveitidu je nutné léčit kombinací antibiotik a steroidů lokálně a je nutné tuto léčbu často opakovat. Po několika měsících až létech po vypuknutí nemoci se u některých jedinců může objevit epiteliální či stromální keratitida, která se také považuje za imunoalergickou reakci kvůli nefunkčnosti léčby antibiotiky. Lokální podání steroidů je ale dobře účinné. U druhého ze jmenovaných projevů je častá recidiva po předčasném vysazení léčby steroidy. (Bartůněk, 2013)

## 5.5 Postižení srdce

Postižení srdce způsobené lymskou boreliózou se nazývá lymská karditida. Jde o zánět srdečního svalu, zánět perikardu, poruchy srdečního rytmu a dilatační kardiomyopatie. Dochází k ní během druhého stádia časně diseminace po cca 5 měsících od propuknutí infekce. Lymská karditida může být příčinou synkop, únavy, dušnosti a závratí. Pacienti, kteří prodělají synkopu či pociťují bolest na hrudi, by měli být hospitalizováni a monitorováni 24 hodin denně. Pokud by nastaly výrazné potíže se srdečním rytmem, je potřeba použití dočasného pacemakeru. (Bartůněk, 2013; Dlouhý, 2011)

## 6 POSTBORELIOVÝ SYNDROM

Objektivní příznaky lymfské boreliózy jako je erytema migrans, meningitida nebo artritida ve většině případů vymizí po léčbě antibiotiky. Avšak u mnoha pacientů, kteří prodělali lymfskou boreliózu a prošli podle všeho úspěšnou léčbou, přetrvávají subjektivní obtíže. Pokud přetrvávají více jak šest měsíců, hovoříme již o postboreliovém syndromu. Únava, muskuloskeletální bolesti, problémy s koncentrací a pamětí jsou hojně se objevujícími projevy při postboreliovém syndromu. U pacientů s těmito symptomy by měla být opětovně provedena laboratorní diagnostika pro potvrzení postboreliového syndromu. (Stanek, 2011)

V některých studiích překročila frekvence symptomů po šesti i více měsících po léčbě frekvenci symptomů u kontrolních vzorků bez lymfské boreliózy. Pouze jedna studie provedená ve Slovinsku prospektivně zhodnotila pacienty s lymfskou boreliózou i kontrolní vzorky. V uvedené studii frekvence subjektivních projevů u léčených s erytema migrans nepřevýšila frekvenci u kontrolních pacientů a to ani po šesti měsících, ani po jednom roce sledování. Navíc subjektivní problémy u pacientů, u kterých se objevovaly, byly jen mírné a nezasahovaly do každodenního života ani nezhoršovaly kvalitu života. Některé důkazy naznačují, že četnost výskytu postboreliových symptomů je častější u dospělých jedinců převážně léčených s lymfskou neuroboreliózou. (Stanek, 2011)

Příčina postboreliového syndromu zatím nebyla stoprocentně prokázána. Mikrobiologické studie nevedly jasný důkaz, že borelie jsou u těchto pacientů perzistentní. (Stanek, 2011)



## 7 DIAGNOSTIKA

Lymfská borelióza je velmi složité onemocnění, které se u každého jedince může projevit jinak a ani diagnostika není úplně jednoduchá, proto se v ní často chybuje. V diagnostice lymfské boreliózy se užívá mnoho metod, ale některé se užívají jen v experimentální medicíně a výzkumu, kde je k dispozici dostatek času. V praxi je však nutné vyhodnotit výsledek co nejrychleji. Využívá se dvou základních skupin vyšetření a to přímé a nepřímé metody. Nejčastější je využití metod nepřímých, které detekují protilátky. První metoda, která byla použita pro diagnostiku lymfské boreliózy, je imunofluorescence. Protože tato metoda má nízkou specifitu a senzitivitu, pomalu se od ní upouštělo. Stejně tak od metody nepřímé hemaglutinace. V dnešní době jako první na řadu přichází metoda ELISA vyšetřující protilátky IgG a IgM z krve, likvoru a punktátu. ELISA je prvním testem prováděným při detekci lymfské boreliózy, musí však být potvrzena dodatečným vyšetřením a to metodou Western blot. Do přímých metod řadíme PCR, světelnou mikroskopii v zástinu, kultivaci, histologický průkaz, DNA hybridizaci a několik dalších. (Bartůněk, 2013; Roháčová, 2010; Dlouhý, 2011; International Musician, 2016)

### 7.1 Metody přímé

#### 7.1.1 Kultivace borelií

Pro kultivaci borelií se využívá několika půd (EMEM, Sigma, BSK-2) s přidaným koňským nebo králičím sérem a vitamíny. Kultivace začíná statickou fází, při které dojde k velkému nárůstu kolonií bakterií a trvá 14 dní. Po dvou týdnech přijde na řadu fáze kontinuální. Borelie namnožené ve statické fázi se přesunou na novou půdu a tento proces se provádí v pravidelných čtyřdenních intervalech. Tyto přesuny na nové půdy musí probíhat za přísně sterilních podmínek, aby se zabránilo možné kontaminaci. Pro růst borelií je nutné dodržet několik faktorů potřebných pro jejich růst. Těmito faktory jsou: teplota pohybující se v rozmezí 34-35°C, konstantní pH 7,5 a oxiredukční potenciál 0,1 - 0,2. Kultivací dokážeme určit, zdali jsou v těle pacienta živé borelie, v praxi je však téměř nemožné ji použít, a proto se využívá hlavně pro výzkumné účely. (Bartůněk, 2013; <http://www.borelioza.cz>, on-line)

### **7.1.2 Světelná mikroskopie v zástinu**

Principem světelné mikroskopie v zástinu je sledování pohyblivých borelií přímo v klíštěti pomocí mikroskopu. Hlavním úkolem této metody je sledování infikovanosti klíšťat nacházejících se na našem území a to jak u nymf, tak larev i dospělých jedinců. Vyšetřovaným materiálem jsou klíšťata dodávaná krajskými hygienickými stanicemi. Klíšťata *Ixodes ricinus* jsou sbírána především v rekreačních oblastech s vysokým výskytem lidí a to hlavně v letních měsících. Zpracované výsledky se ještě dále zpracovávají metodou PCR pro confirmaci pozitivního výsledku. Mikroskopické metody se stále vyvíjí a není tomu jinak ani u diagnostiky borelií. Nyní se provádí i nová metoda vymyšlená Larssonem a Bergstromem, využívající dvojí centrifugace. První centrifugace probíhá při 500 g po dobu 5 minut, aby se oddělily erytrocyty a plazma, ve které zůstanou spirochéty. Plazma se odsaje a dá se do nové zkumavky, která se opět vloží do centrifugy a točí se při 5000 g po dobu 10 minut. V takto zpracované plazmě vznikne pelet, jež lze nanést na mikroskopické sklo a obarvit nebo lze provést kultivaci s následným dovyšetřením PCR. (Bartůněk, 2013)

### **7.1.3 PCR**

PCR neboli polymerázová řetězová reakce je velice moderní a průkopovou metodou, při které se cyklicky množí sekvence DNA v přístroji zvaném thermo-cycler. Každý cyklus má několik fází. První je štěpení dvoušroubovice DNA, kdy se rozdělí dvouvláknová DNA na jednotlivá vlákna. Ve druhé fázi na vlákno nasedne primer, díky kterému může nasednout na vlákno DNA-syntáza. Třetí fází je elongace neboli prodlužování vlákna a následná dehydratace vzniklých dvoušroubovic. Každá fáze má jasně určenou teplotu a dobu trvání pro správné proběhnutí reakce. DNA namnožená tímto způsobem je vhodná pro kvalitativní vyšetření hybridizací, sekvenací a dalšími metodami. U borelií jsou PCR metodou vyšetřovány OspA produkty a primery recA. (Bartůněk, 2013; Connelly, 2014)

### **7.1.4 DNA hybridizace**

DNA hybridizace je podobnou, ale méně citlivou metodou než je PCR. Principem je přímá detekce DNA. Pro detekci se využívá krev, ale může být použit i likvor a punktát. Klonovaná DNA bakterie se naváže na umělou próbu. Známá

sekvence DNA BbsI je označena radioaktivním izotopem nebo avidinem a je vázána na membránový nosič. (Bartůněk, 2013; Buhner, 2014)

### **7.1.5 Histologický průkaz**

Histologické preparáty lze barvit dvěma postupy: Giemsou a toluidinovou modří, nebo stříbřením s dusičnanem stříbrným s předchozím natrávením amylázou. Oba postupy lze použít i u preparátů zalitých do parafinu či pryskyřic. Vždy je nutné na řez přidat monoklonální protilátky, aby byl průkaz specifický. (Bartůněk, 2013)

### **7.1.6 Elektronoptický průkaz**

Je založen na rozlišení druhu bakterie, který pacienta napadl, a imunocytochemické reakci antigenu s monoklonální protilátkou. Určuje počet bičků a jejich rozměry, což jsou dva znaky, ve kterých se většina druhů liší. V obou metodách se používají ultratenké řezy a buněčný sediment získaný centrifugací. Řezy jsou barveny 1% kyselinou fosfowolframovou nebo 8% uranylacetátem. Fixace probíhá jako u klasických histologických preparátů. V praxi se nepřímá imunofluorescence nepoužívá kvůli nízké specifitě i citlivosti. (Bartůněk, 2013; Buhner, 2014; Litzman, 2007)

## **7.2 Metody nepřímé**

Nejvíce užívanými metodami v praxi jsou metody nepřímé. Jsou velmi citlivé a zároveň nevyžadují příliš mnoho času. V praxi laboratoře provádějí hlavně metodu ELISA, založenou na imunoenzymatickém průkazu specifických antiboreliových protilátek IgG a IgM, metodu Western blot, která je považována za nejspolehlivější, a nepřímou imunofluorescenci. (Dlouhý, 2011; Bartůněk, 2013)

### **7.2.1 Imunofluorescenční testy IF a IFA**

Imunofluorescenční testy jsou nejméně citlivou metodou ze všech nepřímých metod aplikovaných v praxi. Provádějí se z likvoru, kloubního punktátu a především krve. Prokazují aglutinogeny IgM a IgG, které se vážou na těla borelií nebo jen na tělní segmenty. Do vzorku se napipetuje fluoreskující látka, na kterou se následnou reakcí navážou protilátky. Navázané protilátky začnou vazbou s fluoreskující látkou světélkovat a pomocí mikroskopu se hodnota tohoto světélkování zhodnotí. Pokud by

vzorek nesvětélkoval, byl by výsledek negativní, ale musel by být dovyšetřen další citlivější metodou. (Bartůněk, 2013; Dlouhý, 2011; <http://www.borelioza.cz>, on-line )

### **7.2.2 ELISA**

ELISA známá také jako EIA není testem využívaným jen v mikrobiologických laboratořích, ale i v dalších specializovaných laboratořích. Je nejpoužívanějším sérologickým testem. Největší výhodou je nízká cena a snadná interpretace výsledku. Využívá se pro kvantitativní stanovení protilátek. Je založena na principu vazby antigenu a specifické protilátky za působení přidaného enzymu. U lymfické boreliózy jsou sledovanými antigeny OspA, OspC a BamA1-3. Tyto smíšené ELISA testy mají převážně reaktivitu i proti antigenu 41kD a antigenům teplotního šoku. Kvůli těmto antigenům může vznikat zkřížená reaktivita s antigeny *Treponema pallidum* a *Escherichia coli*. (Bartůněk, 2013; Dlouhý, 2011; <http://www.borelioza.cz>, on-line; Dillon, 2007)

Díky technologickému vývoji se stává ELISA stále přesnější metodou. Používáním rekombinantních antigenů se stává více přesným, ale méně citlivým testem. Potlačily se zkřížené reakce s jinými bakteriemi, ale stoupl procento falešně negativních výsledků. Rekombinantními antigeny jsou OspE, DbpA a VlsE. Kvůli zkříženým reakcím a nízké citlivosti je nutné provést další, přesnější test, jinak by mohl být výsledek interpretován jako negativní, i když by se v těle pacienta nákaza šířila. (Bartůněk, 2013; Dlouhý, 2011; <http://www.borelioza.cz>, on-line )

### **7.2.3 Western blot**

Western blot se provádí vždy po zhodnocení testu ELISA jako metoda ověřující správnost pozitivních a hraničních výsledků. Je nejdražší ze všech nepřímých metod (je třikrát až čtyřikrát dražší než ELISA). Pro potvrzení diagnózy je nutné provést oba testy a posoudit klinický obraz lékařem. Pro lékaře je výsledkový protokol často matoucí, protože každá laboratoř používá jiné testovací soupravy od různých výrobců a protokoly nejsou jednotné. Proto by každá laboratoř měla protokol doplnit svým subjektivním zhodnocením. Celkově je neznalost těchto testů u obvodních lékařů dosti vysoká. (Dlouhý, 2011; <http://www.borelioza.cz>, on-line )

Western blot vyšetřuje protilátky tvořené imunitním systémem po celou dobu probíhající infekce, která je způsobena spirochétami. Test nevyšetřuje protilátky proti

směsi antigenů jako ELISA, ale proti jednotlivým boreliovým antigenům: díky tomu je Western blot velice specifický a o dost přesnější než ELISA. Pro potvrzení diagnózy stačí jeden pozitivní specifický antigen a alespoň jeden klinický příznak jako například erytema migrans. (Bartůňková, 2011; <http://www.borelioza.cz>, on-line; Bartůněk, 2013)

## 8 LÉČBA LYMSKÉ BORELIÓZY

Borelióza může způsobit velké poškození fyziologických funkcí, proto by měla být co nejdříve nasazena komplexní a účinná léčba. Primárně se nasazuje antibiotická léčba, ale měla by být doplněna dalšími souběžnými postupy. Podpora imunity, podpora kolagenových tkání a symptomatická léčba. Při antibiotické léčbě záleží na mnoha faktorech, které ovlivní výběr antibiotik. V časně fázi se podává doxycyklin. U pacientů s neurologickými a srdečními příznaky se podávají cefalosporiny 3. generace, těhotným se doporučuje amoxicilin a azithromycin užívají lidé s alergií na penicilin nebo děti. V pokročilých stádiích se podává penicilin G, nebo ceftriaxon. Makrolidová antibiotika se pro léčbu lymfské boreliózy moc nedoporučují, protože jsou málo účinná, ale pro pacienty s alergií nebo intolerancí vůči jiným antibiotikům bývají často jedinou možností. (Roháčová, 2010; Buhner, 2014; Křupka, 2008)

Objevují se i názory, že účinný efekt by mohlo mít i preventivní podání antibiotik konkrétně doxycyklinu v 200 mg dávkách do tří dnů od přisátí klíštěte. Tento názor je však často vyvrácen kvůli stále se zvyšující rezistenci bakterií vůči antibiotické léčbě a zbytečnému zasahování do integrity lidského těla, protože přenos infekce není pravidlem a riziko nakažení lymfskou boreliózou je nízké. (Křupka, 2008)

### 8.1 Léčba postižení kůže

Pokud se po odstranění klíštěte objeví na kůži typické erytéma migrans, okamžitě se nasazují antibiotika bez laboratorního vyšetření jen na základě klinického obrazu. Antibiotika se užívají minimálně dva týdny. První volbou je dobře účinný doxycyklin, který není vhodný jen pro těhotné a děti do 8 let. Jeho výhodami je perorální podání a možnost dlouhodobého užívání. Nevýhodou je fotosenzitivita a podráždění žaludeční sliznice. (Dlouhý, 2011; Bartůněk, 2013)

Dávkování antibiotik:

200 mg doxycyklinu v jedné nebo dvou dávkách za den

500 mg až 1 g amoxicilinu třikrát denně

500 mg cefuroxim-axetilu dvakrát denně

1 až 1,5 mil. j. fenoxymetyl penicilinu třikrát denně

Uvedené hodnoty jsou určeny pro dospělého jedince, který užívá jen jeden druh antibiotik. Nikdy se neužívají všechny naráz. (Dlouhý, 2011)

## 8.2 Léčba neuroboreliózy

Pro nemocné s neuroboreliózou jsou vhodná antibiotika zvaná cefalosporiny 3. generace podávaná intravenózně. Cefalosporiny prostupují hematoencefalickou a hematolivorovou bariérou, proto jsou vhodné pro léčbu neuroboreliózy. Do skupiny cefalosporinů 3. generace patří ceftriaxon podávaný jednou denně v dávce 2 g po dobu až tří týdnů. Dalším zástupcem je cefotaxim podávaný třikrát denně po 2 g dva týdny. Po 14-21 dnech podávání cefalosporinů se ještě nasazuje doxycyklin na další dva týdny pro doléčení a snížení rizika perzistence spirochét. Dávka doxycyklinu je 200 mg jedenkrát denně. (Bartůněk, 2013; Dlouhý, 2011; Buhner, 2014)

Protože neuroborelióza negativně působí na centrální nervovou soustavu, je někdy nutné zapojit i další skupiny léků jako jsou antidepresiva, kortikosteroidy a antiepileptika. U pacientů s prokázanými autoimunitními mechanismy jsou často indikovány kortikosteroidy s protizánětlivým a imunosupresivním účinkem. Antidepresiva se nasazují při somatoformních potížích jen v malých dávkách. Jako doplněk léčby léky je vhodná psychoterapie a lázeňské pobyty. Nejvhodnějšími lázněmi jsou lázně v Bardějově, Teplicích, Piešťanech a Jeseníku, které mají s léčbou neuroboreliózy nejvíce zkušeností. (Bartůněk, 2013; Dlouhý, 2011; Buhner, 2014)

## 8.3 Přírodní léčba lymfské boreliózy

Jako doplňková léčba se užívá přírodní bylinná terapie. Přírodní léčbu často preferují pacienti se zhoršenou snášlivostí antibiotik, která jim způsobují další problémy, a lidé, kteří antibiotika odmítají. Bylinná léčba se užívá zároveň s antibiotiky, protože nejspíše dokáže zlepšit celkovou účinnost antibiotické léčby a eliminovat jejich negativní účinky. Za tři základní byliny se považují právenka latnatá (*Andrographis*), křídlatka japonská (*Polygonum cuspidatum*) a kočičí dráp (*Uncaria tomentosa*). Mezi doplňkové byliny řadíme kozinec a smilax. Tři základní byliny stimulují tvorbu leukocytů CD57 a výrazně snižují negativní působení borelií na centrální nervovou soustavu, srdce a klouby. Jako u každé léčby musí být správně nastaveno dávkování a

doba užívání přírodních léčiv. Vědecky nebyl účinek bylinné léčby potvrzen, a proto o ní často vznikají vášnivé diskuze. (Buhner, 2014)



## **PRAKTICKÁ ČÁST**

## 9 CÍLE PRÁCE

Jako cíle mojí bakalářské práce jsem si stanovil:

Shromáždit a zpracovat informace o lymfské borelióze.

Získat ucelený přehled o onemocnění a jeho diagnostice.

Statisticky zpracovat výsledky vzorků vyšetřených ve Fakultní nemocnici v Plzni.

Zhodnotit zpracované výsledky.

Zhodnotit výsledky navržených hypotéz a porovnat je s odbornou literaturou (hypotéza 1,2,4).

## 10 HYPOTÉZY

Hypotéza 1: Největší záchyt pozitivních testů lymfské boreliózy bude v letních měsících (červenec, srpen).

Hypotéza 2: Vzhledem k vysoké prevalenci *B.afzelii* na území ČR bude nejvyšší počet požadavků na vyšetření z kožní kliniky.

Hypotéza 3: Vzhledem k vysoké prevalenci *B.afzelii* na území ČR bude z materiálů nejčastěji vyšetřováno sérum.

Hypotéza 4: Častěji budou nakaženy ženy.

## 11 METODIKA

### 11.1 Biologický materiál

Výsledky zpracované v mé práci byly získány ve Fakultní nemocnici Plzeň na úseku sérologie a parazitologie. Výsledky vyšetření zahrnují vzorky pacientů z celého roku 2017. Vyšetřovaným materiálem bylo sérum, likvor a punktát. Pro vyšetření se používaly metody ELISA a Western blot.

### 11.2 ELISA

Metoda slouží ke stanovení hladiny specifických protilátek ve třídách IgG a IgM. Test je založen na reakci antigenu a specifické protilátky. Existuje více druhů metody ELISA, ale na úseku sérologie a parazitologie ve FN Plzeň se používá takzvaná sandwichová metoda. Sandwichová metoda využívá mikrotitrační destičky, v jejichž jamkách jsou navázány specifické antigeny a kde se následně vytvoří komplex antigen – protilátka ze vzorku - značená protilátka z konjugátu. Použité komerčních sety EIA *Borrelia recombinant IgM/IgG III.generace* mají v jamkách navázány rekombinantní antigeny všech tří základních genospecies *B.burgdorferi* s.l. (*B.burgdorferi* s.s., *B.garinii*, *B.afzelii*) a vyznačují se vysokou citlivostí (IgM 96%, IgG 95%) i specifitou (IgM 97%, IgG 85%). (TEST LINE, návod diagnostického setu EIA IgG, 2017; TEST LINE, návod diagnostického setu EIA IgM, 2017)

#### 11.2.1 Princip testu EIA

K provedení testu EIA se používá mikrotitrační destička s navázanými antigeny v jednotlivých jamkách, do kterých se přidává patientský vzorek. Pokud vzorek obsahuje specifické protilátky, navážou se na antigeny a vytvoří komplex antigen-protilátka. Na tento komplex se poté naváže přidaná zvířecí protilátka proti lidskému séru (imunoglobuliny IgG a IgM), která je konjugována s křenovou peroxidázou (tzv. konjugát). Peroxidázová aktivita se projevuje po přidání substrátu s TMB (tetramethylbenzidin). Pokud je reakce pozitivní, komplex zmodrá díky uvolněnému TMB. V závěru reakce se přidává zastavovací roztok, který celou reakci ukončí. Díky změně pH se modrá barva změní na žlutou. Intenzita žlutého zbarvení se měří fotometrem při vlnové délce 450 nm a je úměrná koncentraci specifických

protilátek IgG/IgM ve vzorku. (TEST LINE, návod diagnostického setu EIA IgG, 2017; TEST LINE, návod diagnostického setu EIA IgM, 2017)

Při testování vzorků ve třídě IgG se používá kombinace vybraných částí specifických antigenů VlsE, p83, p58, OspC, OspA, OspB, OspE, p39, p17, p41 (interní flagelin) a NapA. Pokud se testuje přítomnost IgM specifických protilátek, využívají se vybrané části specifických antigenů OspC, p39 a p41 (interní flagelin). (TEST LINE, návod diagnostického setu EIA IgG, 2017; TEST LINE, návod diagnostického setu EIA IgM, 2017)

### **11.2.2 Reagencie a vybavení**

Použité komerční soupravy pro test EIA dodávané firmou TestLine obsahují:

**Potažené mikrotitrační destičky** s navázaným antigenem, o velikosti 12 x 8 jamek a dodávané společně se sušidlem po dvou kusech.

**Negativní kontrolu** v podobě roztoku, neobsahujícího specifické lidské protilátky v pracovním ředění, označovanou jako Kalibrátor 1, ve 2 ml balení.

**CUT – OFF** neboli **Kalibrátor 2** ve formě roztoku, s obsahem specifické lidské protilátky v hraniční koncentraci, v ředění určeném k přímému užití v objemu 3 ml.

**Pozitivní kontrolu**, obsahující specifické lidské protilátky, ve 2 ml balení.

**Konjugát** složený ze zvířecího imunoglobulinu proti lidskému IgM nebo IgG, který je značen peroxidázou v 28 ml lahvičce.

**Ředící roztok** ve formě pufru, s přidanými stabilizátory proteinů, určený k ředění vzorků, ve 105 ml balení.

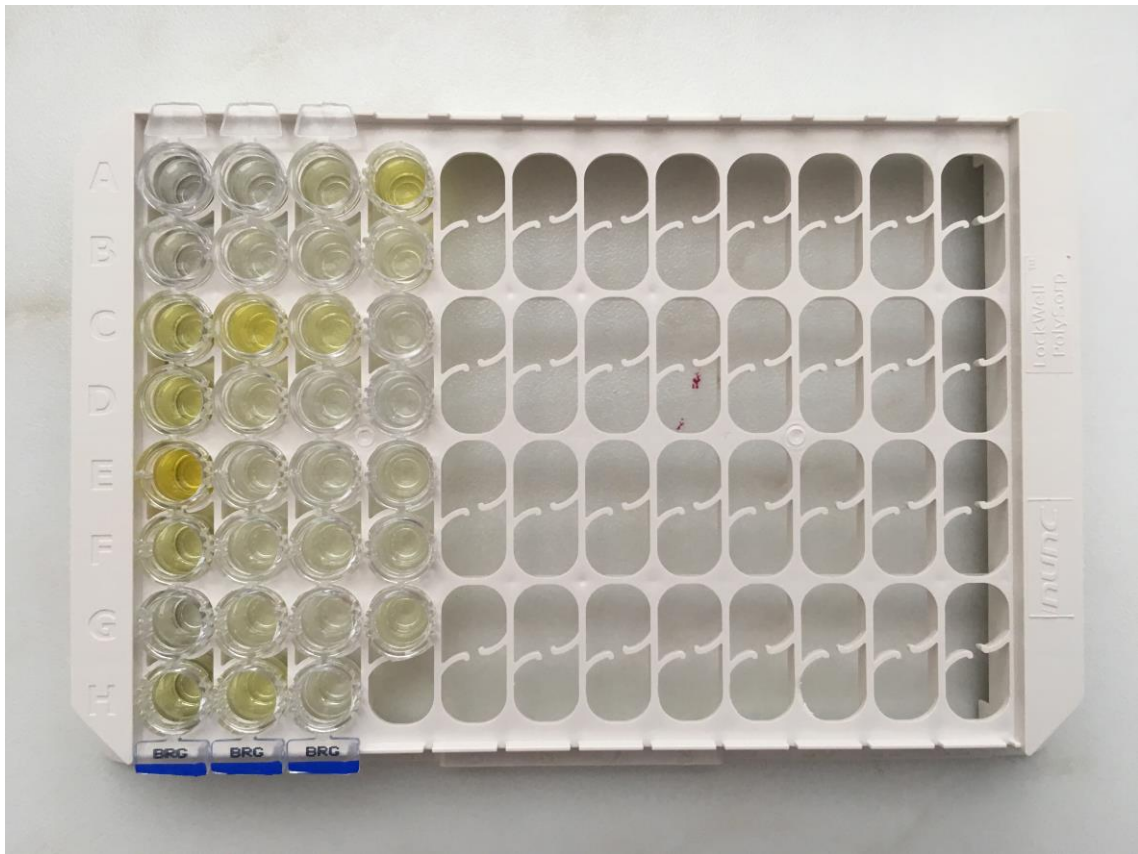
**TMB – Complete 2**, substrátový roztok obsahující TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> v objemu 28 ml.

**Promývací roztok**, kterým je dvacetkrát koncentrovaný.

**Zastavovací roztok** s naředěnou kyselinou v 28 ml lahvičce.

(TEST LINE, návod diagnostického setu EIA IgG, 2017; TEST LINE, návod diagnostického setu EIA IgM, 2017)

**Obrázek 1: Mikrotitrační destička s napipetovanými vzorky a reagensii.**



Zdroj: Vlastní

Pokud v laboratoři není dostupný analyzátor, lze test provést manuálně za pomoci několika pomůcek:

Termostat s teplotou 37°C

Fotometr pro mikrotitrační destičky

Stopky

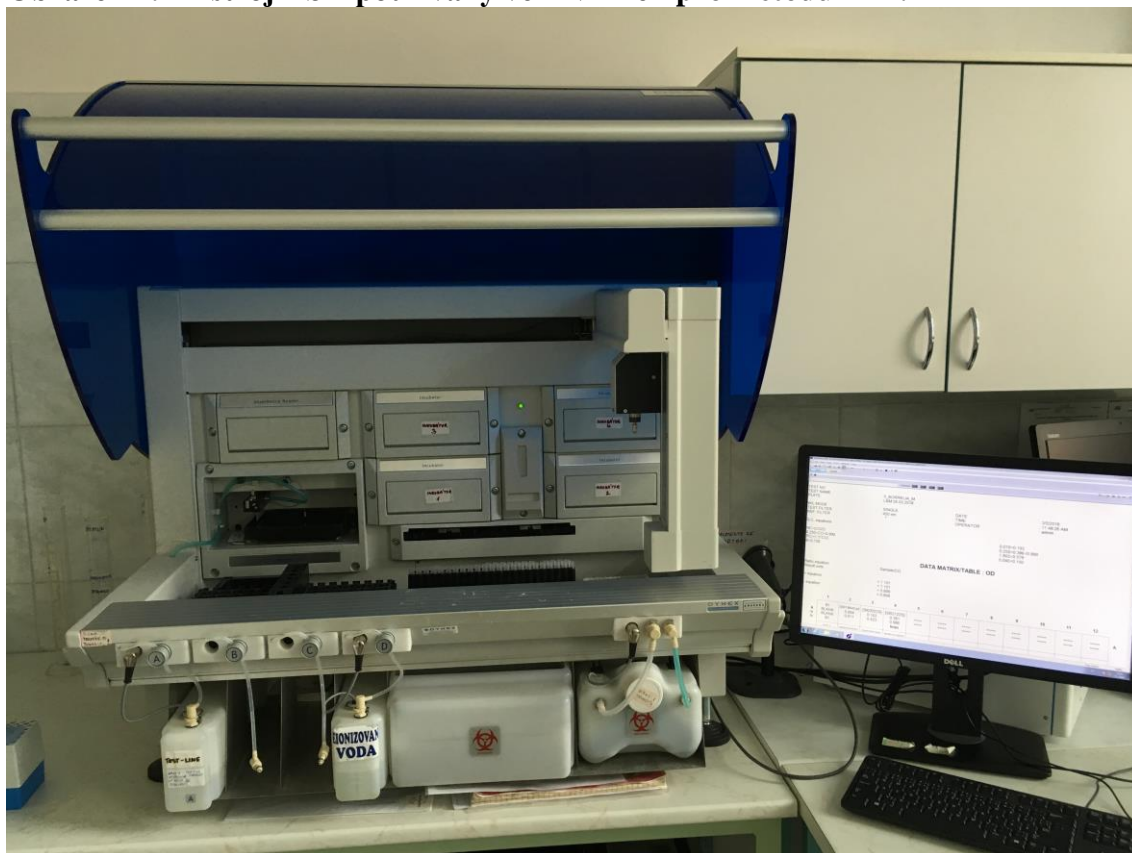
Jedno- a vícekanálové pipety

Promývací zařízení

(TEST LINE, návod diagnostického setu EIA IgG, 2017; TEST LINE, návod diagnostického setu EIA IgM, 2017)

Všechny výsledky testů EIA použité v praktické části bakalářské práce byly analyzovány na přístroji DSX ve Fakultní nemocnici Plzeň.

**Obrázek 2: Přístroj DSX používaný ve FN Plzeň pro metodu EIA.**



Zdroj: Vlastní

### **11.2.3 Skladování a expirace setu**

Komerčně dodávaná souprava by se mělo udržovat při konstantní teplotě od +2 do +8°C. Souprava nesmí být nikdy vystavena mrazu. Datum expirace je uvedeno na obalu - obvykle je souprava použitelná 15 měsíců od data výroby, pokud není otevřená. Pokud už se souprava otevřela, měla by se využít do 3 měsíců. Při nedodržení správného uskladnění a využití ztrácí souprava svojí garantovanou funkčnost. (TEST LINE, návod diagnostického setu EIA IgG, 2017; TEST LINE, návod diagnostického setu EIA IgM, 2017)

### **11.2.4 Vzorke vhodné k vyšetření**

K vyšetření soupravou EIA recombinant IgM/IgG lze použít likvor, lidské sérum, citrátovou plazmu a synoviální tekutinu. Výsledky testu mohou být zkruseny při

přítomnosti antikoagulantů v plazmě, chylózními nebo hemolytickými vzorky a bakteriální kontaminací vzorků. Ideální je vyšetření vzorků co nejdříve po odběru. Pokud nejsou vzorky zpracovány ihned, je možné je uchovávat v lednici po dobu jednoho týdne při teplotě od +2 do +8°C, při delším skladování je nutné vzorky zmrazit na -20°C. (TEST LINE, návod diagnostického setu EIA IgG, 2017; TEST LINE, návod diagnostického setu EIA IgM, 2017)

#### **11.2.5 Příprava pracovních roztoků**

Promývací roztok se ředí destilovanou vodou v poměru 1:20. Promývací roztok je v balení po 75 ml, v tomto případě se k 75 ml promývacího roztoku přidá 1425 ml destilované vody. V promývacím roztoku se mohou vytvořit krystaly solí, které je nutné před provedením testu rozpustit pomocí vodní lázně.

Všechny kontroly v soupravě jsou již připraveny pro přímé použití, neboli jsou v pracovním ředění a nesmí se dále ředit, stejně tak konjugát i substrát s TMB. (TEST LINE, návod diagnostického setu EIA IgG, 2017; TEST LINE, návod diagnostického setu EIA IgM, 2017)

#### **11.2.6 Ředění a příprava vzorků**

Všechny vzorky by se před ředěním měly důkladně a šetrně promíchat, ředící roztok. Sérum a plazma se ředí ředícím roztokem v poměru 1:101, mozkomíšní mok v poměru 1:2 a punktát 1:21 nebo 1:41. Po naředění se opět vše musí důkladně promíchat. (TEST LINE, návod diagnostického setu EIA IgG, 2017; TEST LINE, návod diagnostického setu EIA IgM, 2017)

#### **11.2.7 Pracovní postup**

Před použitím je nutné všechny reagentie vyndat z lednice a vytemperovat je na laboratorní teplotu. Poté se roztoky promíchají a jsou připraveny k použití. Z mikrotitrační destičky se vyjme potřebný počet jamek, které jsou odlamovatelné. Nepoužité stripy je nutné vložit zpět do obalu se sušidlem a hermeticky uzavřít pro další použití.



Pracovní postup se skládá z deseti kroků.

1. Nařed'te vzorky a následně napipetujte kalibrátory, vzorky a kontroly do mikrotitrační destičky podle daného schématu uvedeného v příloženém návodu:
  - a) První jamka A1 se využívá jako blank, proto ji ponechte prázdnou.
  - b) Do jamky B1 napipetujte 100 $\mu$ l negativní kontroly.
  - c) Do jamek C1 a D1 napipetujte 100 $\mu$ l CUT – OFF.
  - d) Do jamky E1 napipetujte 100 $\mu$ l pozitivní kontroly.
  - e) Do zbylých jamek napipetujte vlastní naředěné vzorky o objemu 100 $\mu$ l.
2. Mikrotitrační destičku zakryjte víčkem a inkubujte půl hodiny při 37°C.
3. Po první inkubaci odsajte obsah jamek a 5x je promyjte pomocí promývacího roztoku. Jamky by se měly plnit po okraj, aby bylo promytí dostatečné. Po promytí destičku zbavte zbytků promývacího roztoku důkladným vyklepáním do buničiny.
  4. Do všech jamek kromě A1 napipetujte 100 $\mu$ l konjugátu.
  5. Opět přikryjte destičku víčkem a inkubujte ve stejných podmínkách a při stejném čase jako při inkubaci první (bod 2).
  6. Poté odsajte obsah jamek, opět 5x promyjte promývacím roztokem a vyklepte do buničiny.
  7. Přidejte 100 $\mu$ l substrátového roztoku s TMB
  8. Destičku přikryjte víčkem a inkubujte čtvrt hodiny při 37°C.
  9. Na závěr zastavte probíhající reakci pomocí 100 $\mu$ l zastavovacího roztoku.
10. Změřte intenzitu zbarvení při vlnové délce 450 nm a vypočtete indexu pozitivity. Vzorky musí být změřeny do 30 minut od zastavení reakce. (TEST LINE, návod diagnostického setu EIA IgG, 2017; TEST LINE, návod diagnostického setu EIA IgM, 2017)

### 11.2.8 Validita testu

Test je validní jen v případě, že absorbance blanku je nižší než 0,150, absorbance negativní kontroly je nižší než polovina průměru absorbance CUT – OFF, absorbance pozitivní kontroly je vyšší než 1,5 násobek průměrné absorbance CUT – OFF a průměrná absorbance CUT – OFF je v rozsahu 0,250 - 0,900 (IgM) nebo 0,200 – 0,800 (IgG). (TEST LINE, návod diagnostického setu EIA IgG, 2017; TEST LINE, návod diagnostického setu EIA IgM, 2017)

### 11.2.9 Zhodnocení výsledků

Po změření mikrotitrační destičky ve fotometru získáme absorbanci vyšetřovaných vzorků. Absorbance se poté přepočítává na index pozitivity (IP).

$$IP = \frac{\text{Absorbance séra, likvoru, punktátu}}{\text{Průměrná absorbance CUT – OFF}}$$

Pro použitou metodu EIA jsou stanoveny referenční meze, podle kterých se hodnotí pozitivita, hraniční hodnota a negativita vzorků. Pokud vypočítaný index pozitivity vyjde nižší než 0,9, výsledek je negativní. Hodnoty od 0,9 do 1,1 včetně jsou hraniční a test by měl být proveden znovu po 2 až 6 týdnech z nově odebraného materiálu. Vzorek vyhodnocujeme jako pozitivní při vypočítaném indexu pozitivity nad 1,1.

**Tabulka 1: Referenční meze metody EIA Borrelia recombinant IgM/IgG.**

Index pozitivity (IP)	Hodnocení
nižší než 0,9	negativní
od 0,9 do 1,1	hraniční
vyšší než 1,1	pozitivní

Zdroj: (TEST LINE, návod diagnostického setu EIA IgG, 2017; TEST LINE, návod diagnostického setu EIA IgM, 2017)

Odlišné hodnocení se používá u vyšetření synoviální tekutiny, která se ředí 2x - v poměru 1:21 nebo 1:41. Hodnocení výsledků je založeno na porovnání indexu positivity obou ředění. Pokud je u obou ředění IP nižší než 1,0, je výsledek negativní, pokud vyšší než 1,0, je výsledek pozitivní. Hraniční vzorky mají IP u ředění 1:21 vyšší než 1,0 a u ředění 1:41 nižší než 1,0. (TEST LINE, návod diagnostického setu EIA IgG, 2017; TEST LINE, návod diagnostického setu EIA IgM, 2017)

## 11.3 Western blot

Test Western blot se používá ke confirmaci výsledků zjištěných metodou ELISA, která slouží pro screening. Metoda je náročnější jak finančně, tak i na přípravu a samotný postup, ale dokáže stanovit protilátky proti jednotlivým antigenům, a to i ve velmi malých koncentracích. Provádí se ve třídách IgG a IgM. Použité komerčních sety Anti-Borrelia EUROLINE-RN-AT IgM/IgG mají testovací stripy potažené purifikovanými antigeny všech tří základních genospecies *B.burgdorferi* s.l. (*B.burgdorferi* s.s., *B.garinii*, *B.afzelii*) a vyznačují se vysokou citlivostí (IgM 93%, IgG 89%) i specifitou (IgM 95%, IgG 99%). (EUROIMMUN, návod diagnostického setu IgG, 2017; EUROIMMUN, návod diagnostického setu IgM, 2017)

### 11.3.1 Princip testu Western blot

Principem testu je kvalitativní in vitro detekce lidských protilátek IgM/IgG namířených proti antigenům borelií. Blotové stripy se inkubují společně s patientskými vzorky. Pokud se ve vzorcích nachází protilátky, dojde k jejich navázání na antigeny na stripech. Aby byla pozitivní reakce viditelná, je potřeba využít enzymového konjugátu s anti – lidskými IgM/IgG, který vyvolá barevnou změnu proužků v místě komplexu antigen-protilátka. Po inkubaci se substrátem se měří intenzita zbarvení proužků pomocí softwaru EUROLinScan, který vyhodnotí, zda je vzorek pozitivní, hraniční nebo negativní.

Při testování vzorků ve třídě IgM se používají antigeny VlsE, p41, p39 a OspC, ve třídě IgG pak antigeny VlsE, lipidový antigen, p83, p41, p39, OspC, p58, p21, p20, p19 a p18. (EUROIMMUN, návod diagnostického setu IgG, 2017; EUROIMMUN, návod diagnostického setu IgM, 2017)

### 11.3.2 Reagencie a vybavení

Soupravy komerčně dodávané firmou EUROIMMUN se skládají z celkem šesti komponent potřebných k provedení testu Western blot:

1. **Testovací stripy**, na nichž jsou naneseny antigeny, v počtu 32 kusů.
2. **Pozitivní kontrola**, 50x koncentrované lidské IgM/IgG, 2 x 0,04 ml.

3. **Enzymový konjugát**, složený z anti – lidského IgM/IgG označeného alkalickou fosfatázou, 2 x 3 ml.
4. **Univerzálního pufr**, který je koncentrovaný desetkrát ve 100ml lahvičce.
5. **Substrátový roztok** v pracovním ředění, složený z NBT/BCIP, 2 x 30 ml.

(EUROIMMUN, návod diagnostického setu IgG, 2017; EUROIMMUN, návod diagnostického setu IgM, 2017)

Ve Fakultní nemocnici Plzeň se metoda Western blot provádí na přístroji Profiblot.

**Obrázek 3: Přístroj Profiblot používaný ve FN Plzeň k metodě Western blot.**



Zdroj: Vlastní

### **11.3.3 Skladování a expirace soupravy**

Souprava se musí skladovat při 2 – 8 °C a nikdy nesmí být zmrazena. Reagencie je třeba chránit před kontaminací. Souprava je použitelná do data expirace uvedeného na obale, pokud je uzavřena v originálním balení a jsou dodržena všechna pravidla pro skladování, po otevření 12 měsíců nebo do konce expirace. (EUROIMMUN, návod diagnostického setu IgG, 2017; EUROIMMUN, návod diagnostického setu IgM, 2017)

### **11.3.4 Příprava pracovních roztoků a vzorků**

Enzymový konjugát se ředí v poměru 1:10 univerzálním pufrům: příkladem ředění je 0,30 ml anti – lidského IgM/IgG konjugátu přidaného do 2,7 ml univerzálního pufru v pracovním ředění. Univerzální pufr slouží k ředění enzymového konjugátu a pozitivní kontroly. Před použitím se musí se naředit destilovanou vodou v poměru 1:10. Pufr v pracovním ředění je použitelný po dobu 24 hodin. Substrátový roztok je již připravený v pracovním ředění, proto ho není nutné nijak ředit, jen se musí skladovat mimo dosah světelného záření, protože je citlivý na světlo.

Vyšetřované vzorky séra nebo plazmy se ředí univerzálním pufrům v poměru 1:51, vzorky likvoru 1:2 a synoviální tekutina 1:17,5. Po naředění se musí pečlivě promíchat na vortexu. Nenaředěné vzorky je možné skladovat až dva týdny při 2 – 8°C, déle pak v mrazicím boxu při - 20°C. (EUROIMMUN, návod diagnostického setu IgG, 2017; EUROIMMUN, návod diagnostického setu IgM, 2017)

### **11.3.5 Pracovní postup**

Na začátku je nutné všechny používané reagencie vyndat z lednice a nechat vytemperovat na laboratorní teplotu po dobu 30 minut. Nikdy by se před vytemperováním na doporučenou teplotu neměly otevírat, a to především testovací stripy, které by mohly navlhnout. Nespoteřované stripy je potřeba pevně uzavřít zpět do obalu.

Pracovní postup se provádí v deseti krocích stejně jako metoda ELISA:

1. Vytáhněte testovacích stripy z obalu a vložte je do kanálků inkubační desky číslem nahoru.
2. Napipetujte 1,5 ml naředěného univerzálního pufru do kanálků se stripy.

3. Inkubujte po dobu 15 minut při pokojové teplotě na třepačce.
4. Po inkubaci odsajte z kanálků veškerou tekutinu, naplňte je 1,5 ml naředěných vzorků a inkubujte 30 minut opět při pokojové teplotě.
5. Odsajte všechnu kapalinu a kanálky promyjte 1,5ml univerzálního pufru za stálého kývání 3x5 minut.
6. Napipetujte 1,5ml enzymového konjugátu do všech kanálků a znovu inkubujte na třepačce 30 minut při 18 – 25 °C.
7. Odsajte veškerou tekutinu a všechny kanálky promyjte univerzálním pufrům jako v bodě 5.
8. Přidejte do každého kanálku 1,5ml substrátového roztoku a nechte inkubovat 10 minut za stejných podmínek jako v bodě 6.
9. Odsajte všechnu kapalinu a promyjte každý kanálek 1,5ml destilované vody 3x1 minutu.
10. Přesuňte mokré stripy na vyhodnocovací protokol a vysušte je filtračním papírem. Poté je vyhodnoťte softwarem EUROLiScan.

(EUROIMMUN, návod diagnostického setu IgG, 2017; EUROIMMUN, návod diagnostického setu IgM, 2017)

### **11.3.6 Vyhodnocení výsledků**

Pro správné provedení metody se hodnotí zbarvení kontrolního proužku a pozitivní reakce proužku IgG nebo IgM. Pokud není kontrolní proužek a pozitivní IgG/IgM proužek zbarven, výsledky se nemohou použít a test je nutné opakovat. Pro hodnocení výsledků se používá software od firmy EUROIMMUN EUROLiScan. Všechny proužky se skenují scannerem do softwaru EUROLiScan, který hodnotí intenzitu proužků, jejich počet a kombinaci, a následně vydává pozitivní, slabě pozitivní či negativní výsledky. (EUROIMMUN, návod diagnostického setu IgG, 2017; EUROIMMUN, návod diagnostického setu IgM, 2017)

**Obrázek 4: Vyhodnocovací protokol metody Western blot od firmy EUROIMMUN.**

EUROLineScan - Protokol

Strana 1 1

Protokol: WB Lyme 1.3.2018 Datum: 1.3.2018  
 Operátor: Motisová Tisk: 1.3.2018

Č	Patient / Test	Lot	Strip
1	1643 Hain PUNKT BorEL_IgM		Bor-M/ 73-94
2	1643 Hain PUNKT BorEL_IgG		Bor-G/ 85-44
3	1751 Zachatá BorEL_IgM		Bor-M/ 75-31
4	1751 Zachatá BorEL_IgG		Bor-G/ 99-74
5	1777 Viktorová BorEL_IgM		Bor-M/ 75-32
6	1777 Viktorová BorEL_IgG		Bor-G/ 99-75
7	1868 Krejčová BorEL_IgM		Bor-M/ 75-33
8	1868 Krejčová BorEL_IgG		Bor-G/ 100-82
9	1977 Vaňková BorEL_IgM		Bor-M/ 75-34
10	1977 Vaňková BorEL_IgG		Bor-G/ 100-83
11	2017 Škárka BorEL_IgM		Bor-M/ 75-35
12	2017 Škárka BorEL_IgG		Bor-G/ 100-84
13	2019 Kotzauerová BorEL_IgM		Bor-M/ 75-36
14	2019 Kotzauerová BorEL_IgG		Bor-G/ 100-85
15	1689 Kurt BorEL_IgM		Bor-M/ 75-38
16	1689 Kurt BorEL_IgG		Bor-G/ 100-97
17	7917 Hergelthová PUNKT BorEL_IgM		Bor-M/ 75-39
18	7917 Hergelthová PUNKT BorEL_IgG		Bor-G/ 100-98

*EUROLINE Borrelia IgM*  
 Značka, Kontrola, Anti-human-IgM, Anti-human-IgG, OspC Borrelia garinii, OspC Borrelia burgdorferi, OspC Borrelia afzelii, BmpA, Flagellin, VisE Borrelia burgdorferi

*EUROLINE Borrelia IgG*  
 Značka, Kontrola, Anti-human-IgM, Anti-human-IgG, BB\_P38, BB\_N38, BB\_Q03, BB\_K53, BB\_A34, OspC, BmpA, Flagellin, p83, Lipid Borrelia burgdorferi, Lipid Borrelia afzelii, VisE Borrelia garinii, VisE Borrelia burgdorferi, VisE Borrelia afzelii

Zdroj: Vlastní



### 11.3.7 Vyhodnocení Western blotu IgG

Studiemi provedených firmou EUROIMMUN se prokázalo, že antigeny VIsE Bg, Ba i Bb jsou na detekci protilátek IgG nejcitlivější, proto je možné stripy rychle a přesně vizuálně vyhodnotit. Pokud je antigenový proužek VIsE Ba,Bb nebo Bg pozitivní, výsledkem je vzorek pozitivní na lymfskou boreliózu. V časných fázích onemocnění nemusí být výsledek tak jasný a může vycházet výsledek slabě pozitivní nebo negativní: v takovéto situaci se pokračuje podle tabulky 2. (EUROIMMUN, návod diagnostického setu IgG, 2017; EUROIMMUN, návod diagnostického setu IgM, 2017)

**Tabulka 2: Hodnocení testu Western blot ve třídě IgG.**

výsledek protilátek		specifické proužky	p18, p19, p20, p21, p58,	lipid Ba a Bb, OspC, p83, p39
		2 a více proužků pozitivních	1 proužek pozitivní	žádný proužek
VIsE Ba nebo	proužek pozitivní	pozitivní	pozitivní	pozitivní
VIsE Bg nebo	proužek slabě pozitivní	pozitivní	pozitivní	negativní
VIsE Bb	proužek negativní	pozitivní	negativní	negativní

Zdroj : EUROIMMUN, návod diagnostického setu IgG, 2017

Stejně tak se řídíme tabulkou 3, pokud nám ve třídě IgM vyjdou výsledky hraniční nebo negativní u antigenu OspC, který jinak značí pozitivitu výsledku ve třídě IgM. (EUROIMMUN, návod diagnostického setu IgG, 2017; EUROIMMUN, návod diagnostického setu IgM, 2017)

**Tabulka 3: Hodnocení testu Western blot ve třídě IgM.**

výsledek protilátek		specifické proužky p39 a VIsE Bb	
		1 proužek pozitivní	žádný proužek
OspC Bb nebo	proužek pozitivní	pozitivní	pozitivní
OspC Bg nebo	proužek OspC Ba nebo Bg slabě pozitivní	pozitivní	hraniční
OspC Ba	proužek negativní	negativní	negativní

Zdroj: EUROIMMUN, návod diagnostického setu IgM, 2017

## **11.4 Microblot-Array**

Za účelem zefektivnění metody Western blot byla vyvinuta metoda nové generace, tzv. Microblot-Array (MBA). MBA má kromě vysoké specifity a senzitivity i další nesporné výhody: vyšetření probíhá na analyzátoru pro vyšetření metody ELISA (není potřeba samostatného analyzátoru), má nízkou spotřebu vzorku, antigeny spotované v tripletu minimalizují chybu provedení, zároveň jsou testovány i antigeny, které eliminují zkřížené reakce, a antigeny další infekce přenášené klíšťaty (anaplasmóza). Ve FN Plzeň se tato metoda momentálně testuje a připravuje pro klinické využití. Vzorky z r.2017 hodnocené v této práci nebyly metodou MBA vyšetřeny, proto její výsledky nejsou do statistické části této práce zahrnuty. (TEST LINE, návod diagnostického setu MBA IgG, 2017; TEST LINE, návod diagnostického setu MBA IgM, 2017)

### **11.4.1 Princip metody**

Základem je princip imunoblotu, který je převeden do formátu mikrotitrační destičky. Rekombinantní antigeny se nanášejí v podobě mikroteček na nitrocelózovou membránu. Po nanesení vzorku dochází k vazbě specifických protilátek v patientském vzorku na antigeny v destičce. Stejně jako u metody ELISA a Western blot se využívá konjugátu a alkalické fosfatázy pro zviditelnění reakce. Rozdílem je zastavení reakce obyčejnou destilovanou vodou, které je shodné jako u metody Western blot. Metoda se také provádí ve třídě IgG a IgM. K vyhodnocení testu se používá speciální reader s dodaným softwarem. (TEST LINE, návod diagnostického setu MBA IgG, 2017; TEST LINE, návod diagnostického setu MBA IgM, 2017)

### **11.4.2 Vyhodnocení testu**

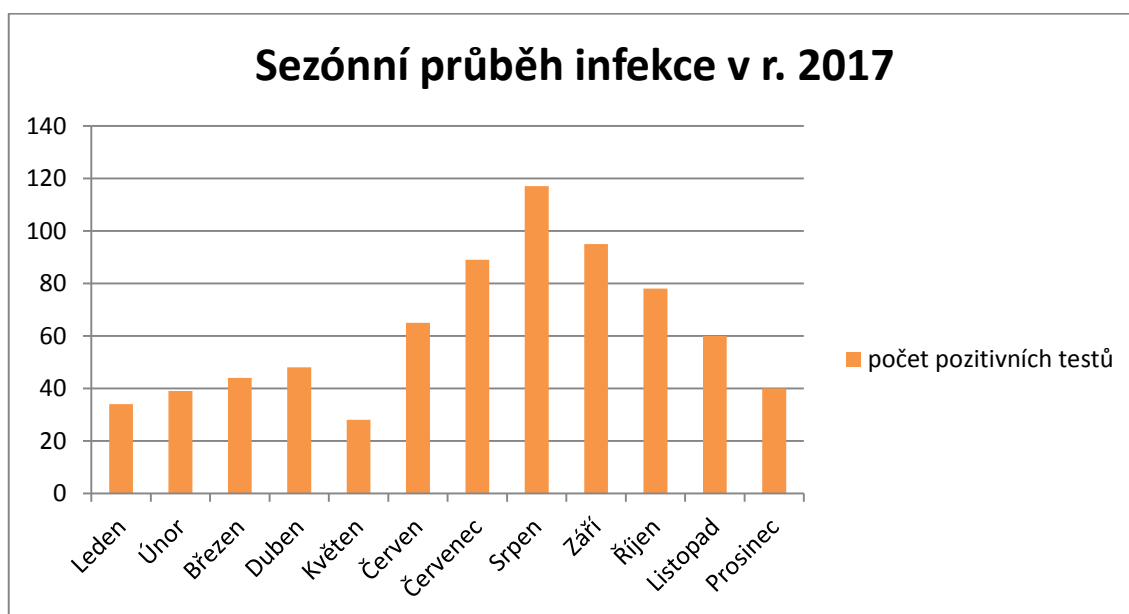
K vyhodnocení se používá Microblot-Array reader a speciální software dodávaný se soupravou, který zjišťuje přítomnost pozitivních antigenních spotů v destičce. Výsledky jsou buďto kvantitativní v jednotkách U/ml, semikvantitativní v indexech pozitivity nebo a jako intenzita spotů v jednotkách AU a interpretují se jako pozitivní, negativní nebo hraniční. (TEST LINE, návod diagnostického setu MBA IgG, 2017; TEST LINE, návod diagnostického setu MBA IgM, 2017)

## 12 VLASTNÍ VÝSLEDKY

Všechny použité výsledky testů ELISA a Western blot prokazující pozitivitu LB, ze kterých jsou vypracovány všechny grafy, mi byly poskytnuty oddělením sérologie a parazitologie ve Fakultní nemocnici v Plzni. Ke každé metodě jsem získal výsledky tří materiálů (sérum, likvor a punktát), které byly vyšetřeny v roce 2017.

Následující graf (1) udává počet pozitivních pacientů během celého roku 2017. LB vykazuje sezónní výskyt v závislosti na ročním období (maximum v letních měsících) i mikroklimatu jednotlivých měsíců (teplo, vlhko). Počet nakažených ovlivňuje aktivita klíšťat i chování lidí v přírodě. LB je nákaza s přírodní ohniskovostí. Se současným oteplováním klimatu stále stoupá nadmořská výška, ve které lze prokázat výskyt klíšťat. Nejnižší počet pozitivních testů zjištěných metodou ELISA i Western byl zachycen v měsíci květnu v celkovém počtu 28. Naopak nevyšší počet pozitivních testů byl zjištěn v srpnu a to 117.

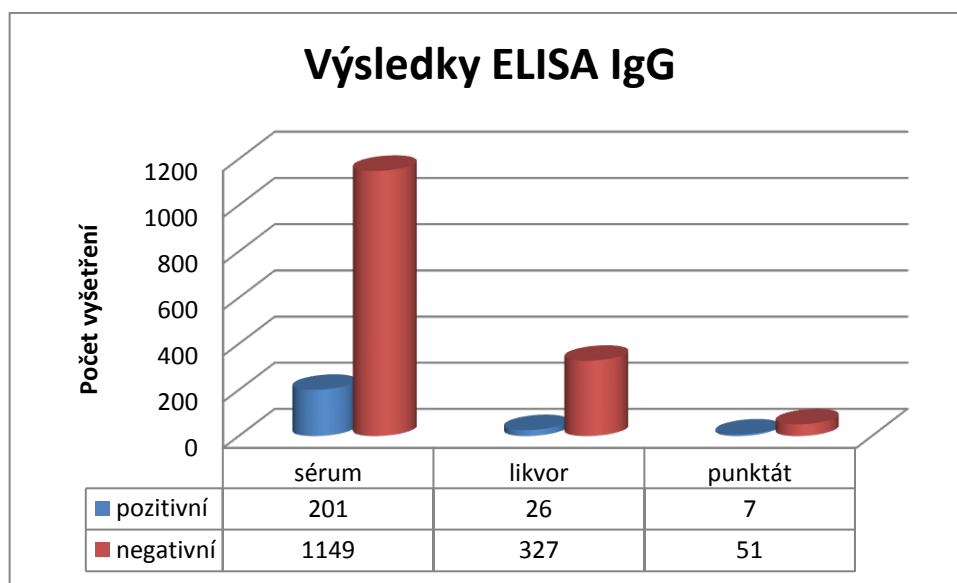
**Graf 1: Lymská borelióza - sezónní průběh infekce v roce 2017.**



Zdroj: vlastní

V grafu 2 je vyobrazen poměr pozitivních a negativních výsledků ve všech třech vyšetřovaných materiálech (sérum, likvor, punktát), kterých bylo vyšetřeno celkem 1785. U sér bylo pozitivních výsledků 201, hraničních 15 a negativních 1149 z celkových 1785 vzorků. Z celkového počtu vzorků bylo sér pozitivních 11,26 %. Druhým vyšetřovaným materiálem byl likvor. Testů z likvoru se provedlo podstatně méně a to celkem 357, z toho 26 pozitivních, 327 negativních a 4 hraniční. Těchto 26 pozitivních výsledků tvoří 1,46 % z celkových 1785 testů. Třetím, nejméně často vyšetřovaným materiálem je punktát, kterého se analyzovalo celkem 63 vzorků a zaznamenaných pozitivních výsledků bylo 0,4 % z celkového počtu vyšetření ELISA IgG. Pozitivních vzorků bylo 13,11 % z celkového počtu vzorků. Hraniční hodnoty nejsou do grafu zahrnuty.

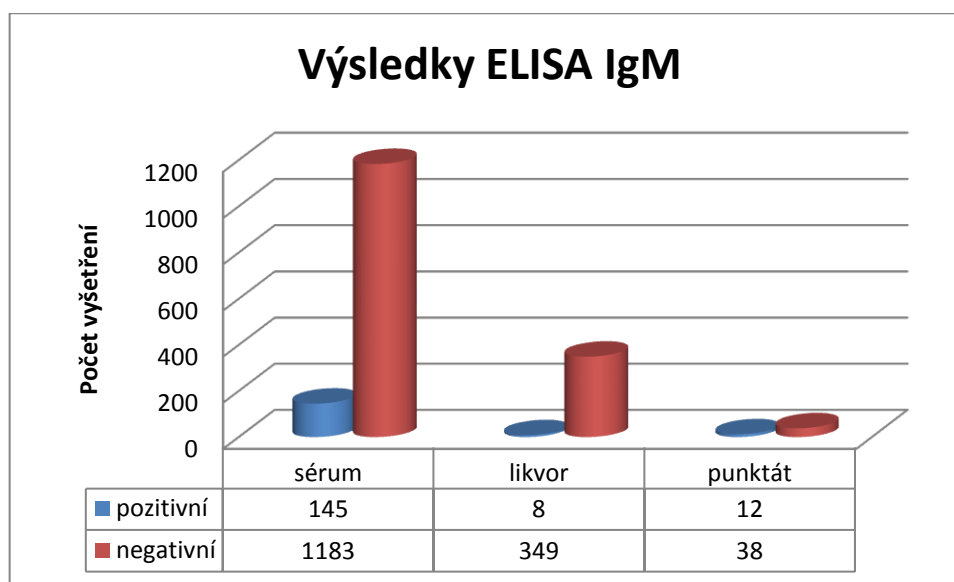
**Graf 2: Výsledky testu ELISA ve třídě IgG ve všech vyšetřovaných materiálech.**



Zdroj: Vlastní

Graf 3 vyobrazuje metodu ELISA ve třídě IgM ve stejných materiálech jako ve třídě IgG. Liší se především menším počtem pozitivních výsledků v séru a likvoru, ale vyšším počtem pozitivních výsledků punktátu. Byl proveden stejný celkový počet testů jako metodou ELISA IgG, tedy 1785 testů. Hraničních výsledků bylo 50 a opět nejsou v grafu uvedeny. V séru bylo 145 pozitivních testů, což je 8,12 % z 1785 provedených testů. V likvoru bylo pozitivních 8 testů, tedy 0,45 % ze všech stanovených vzorků. Punktátů se v této třídě opět vyšetřilo nejméně, jen 63 z toho bylo 12 pozitivních – 0,67 %.

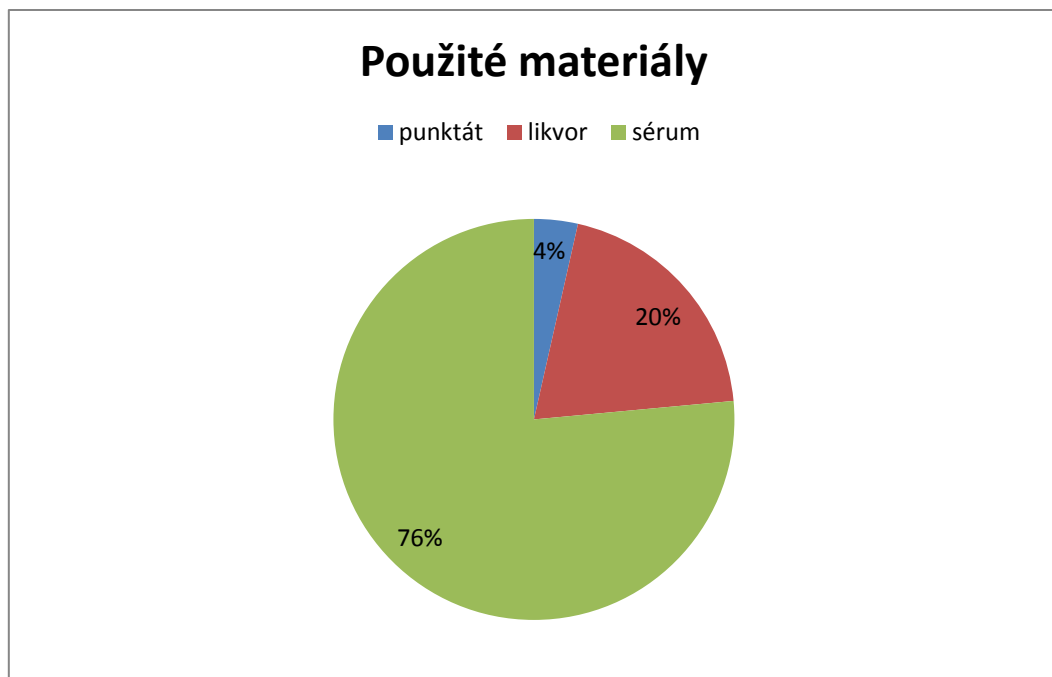
**Graf 3: Výsledky testu ELISA ve třídě IgM ve všech vyšetřovaných materiálech.**



Zdroj: Vlastní

Graf 4 zobrazuje procentuální zastoupení vyšetřovaných materiálů. Nejvíce se vyšetřuje sérum, jednu pětinu vyšetřených materiálů tvoří likvory a jen zlomkem jsou zastoupeny punktáty (4%).

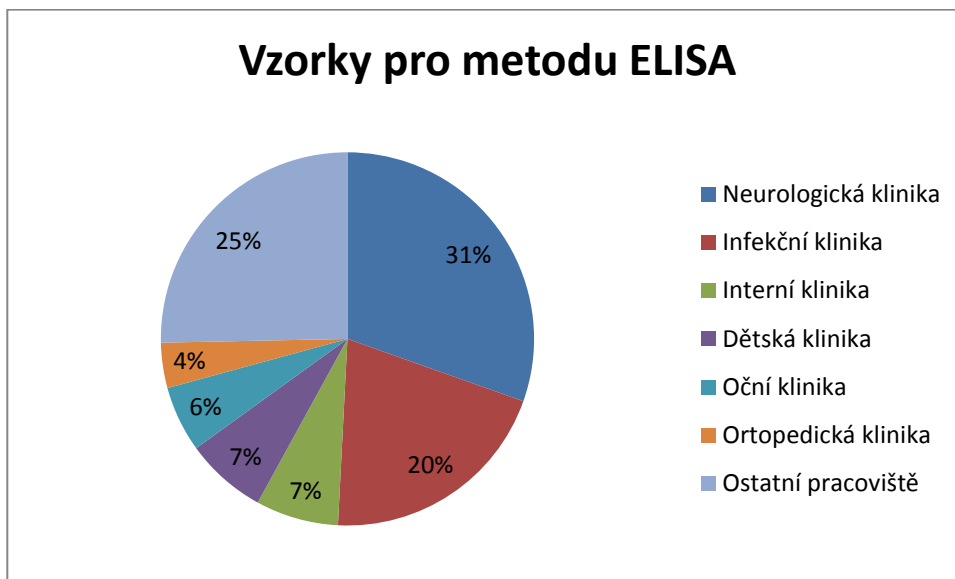
**Graf 4: Procentuální zastoupení vyšetřovaných materiálů pro testy ELISA IgG a IgM.**



Zdroj: Vlastní

Na vyšetření protilátek proti LB metodou ELISA byly vzorky dodávány nejčastěji z šesti pracovišť. Nejvíce vzorků bylo odebráno na neurologické klinice, a to téměř jedna třetina (31%) všech přijatých vzorků. Druhým pracovištěm nejčastěji zasílajícím materiál byla infekční klinika (20%). Kožní klinika poslala minimum vzorků (2%) a v grafu je zahrnuta do části Ostatní pracoviště.

**Graf 5: Pracoviště nejčastěji zasílající vzorky k vyšetření metodou ELISA.**

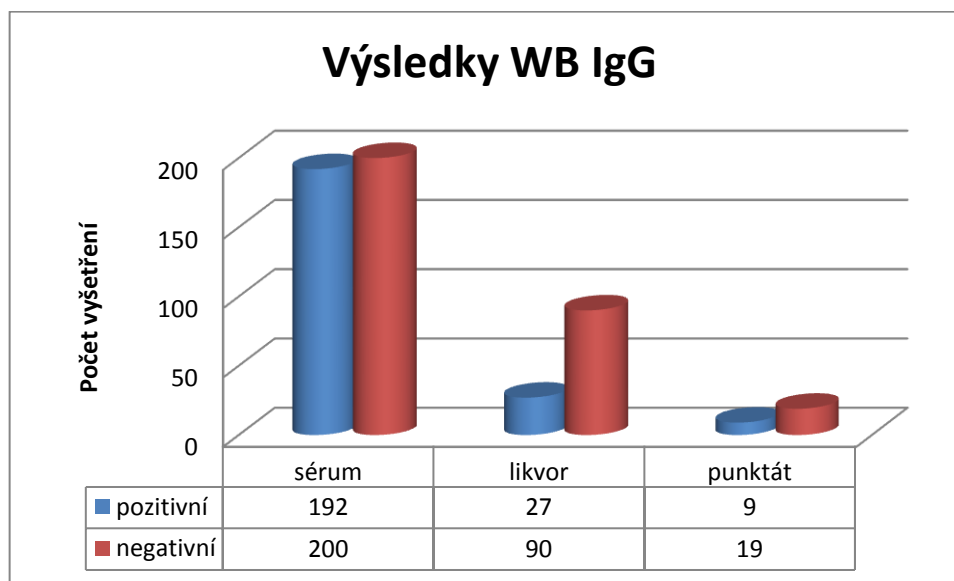


Zdroj: Vlastní



V grafu 6 jsou zaznamenány výsledky metody Western blot ve třídě IgG ve všech třech materiálech – těch bylo vyšetřeno celkem 539. Oproti metodě ELISA se více vyšetřuje likvor a pozitivita je častější. Hraniční byly pouze 2 výsledky. Sér bylo pozitivních 192 (35,62 %) z celkových 539 vyšetření. Likvorů bylo pozitivních 27, což je 5,01 % a punktátů 1,67 % z 539 testů.

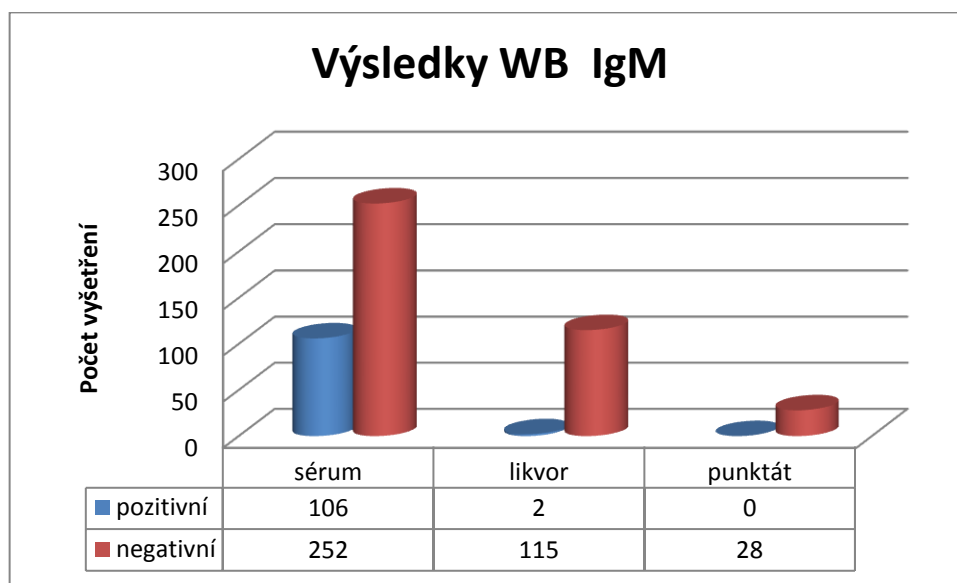
**Graf 6: Výsledky testu Western blot IgG ve všech vyšetřovaných materiálech.**



Zdroj: Vlastní

V grafu 7 jsou vyjádřeny výsledky metody Western blot IgM ve všech třech materiálech, kterých bylo vyšetřeno stejně jako u metody Western blot IgG, tedy 539. Pozitivních sér bylo 19,67 % a likvorů 0,37 %, žádný punktát nebyl pozitivní. Hraničních výsledků bylo 36.

**Graf 7: Výsledky testu Western blot IgM ve všech vyšetřovaných materiálech.**



Zdroj: Vlastní

V grafu 8 je vyznačeno procentuální zastoupení vyšetřovaných materiálů metodou Western blot. Opět je nejpoužívanějším materiálem sérum a nejméně punktát stejně jako u metody ELISA, zde je ale procento punktátů i likvorů o něco vyšší.

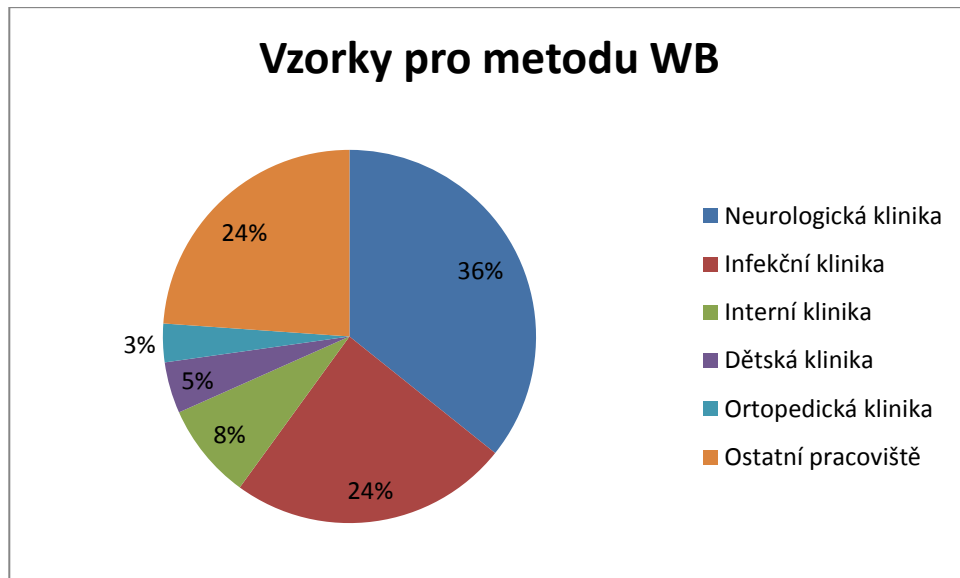
**Graf 8: Procentuální zastoupení vyšetřovaných materiálů pro testy Western blot IgG a IgM.**



Zdroj: Vlastní

V předposledním grafu je zaznamenáno procentuální zastoupení počtu vzorků z jednotlivých klinik. Na prvním místě je stejně jako u metody ELISA klinika neurologická, kterou následuje klinika infekční a interní.

**Graf 9: Pracoviště nejčastěji zasílající vzorky k vyšetření metodou WB.**



Zdroj: Vlastní

V roce 2017 bylo zjištěno 428 pozitivních výsledků u mužů a 307 u žen. Při srovnání promořenosti mezi muži a ženami se ukázalo, že pozitivní muži převažují nad ženami. Rozdíl mezi pohlavími je 16 % (121 pozitivních vzorků).

**Graf 10: Poměr pozitivních mužů a žen.**



Zdroj: Vlastní

## 13 DISKUZE

Diagnostika lymfské boreliózy je velmi obtížná a nese s sebou spoustu problémů, které brání lékařům ve stanovení správné diagnózy. Klinické příznaky lymfské boreliózy jsou velmi rozmanité, některé i nespecifické, a u každého pacienta se tak infekce projevuje rozdílně. Každý lékař by měl zvážit klinické projevy LB u pacienta, zhodnotit jeho anamnézu (pobyt v rizikových lokalitách, přisáté klíště) a event. nechat provést laboratorní vyšetření na protilátky proti infekci. Pouze tehdy, pokud výsledky prokážou pozitivitu protilátek proti LB, která odpovídá přítomnému klinickému obrazu LB u pacienta, může být stanovena diagnóza a nasazena antibiotická léčba. Výjimkou je anulární erytema migrans, při jehož objevení je možné diagnostikovat LB i bez sérologického vyšetření, ale které se bohužel nemanifestuje vždy. Protilátky se začínají tvořit až po několika týdnech od infekce, proto při negativním laboratorním výsledku s klinickými příznaky LB by se diagnostika měla zopakovat s časovým odstupem.

V séru pacienta se mohou objevit protilátky IgG, i když nemá žádné klinické příznaky. Příčinou může být již dříve prodělaná infekce, ať už přeléčená antibiotiky nebo zvládnutá samotným imunitním systémem pacienta, neboť anamnesticke protilátky se v těle mohou udržovat i po velmi dlouhou dobu (až několik let).

Problémem může být také zkřížená reaktivita s bakterií *Treponema pallidum* (třída IgG), virem EBV (třída IgM) a bakterií *Escherichia coli* (obě třídy – bičkový antigen p41), což ztěžuje určení správné diagnózy. Zkříženou reaktivitu se však díky metodě Western blot (p41) a také výzkumu a vývoji nových metod (MBA) daří eliminovat.

Počasí ovlivňuje množství žijících klíšťat, jejich aktivitu a také pohyb lidí v přírodě. S teplejším počasím se počet nakažených LB zvyšuje. Příliš vysoké teploty a s nimi spojené sucho, nebo naopak chladno aktivitu klíšťat tlumí. Hypotéza 1, že nejvyšší záhyt pozitivních pacientů bude v letních měsících, se potvrdila. V roce 2017 byl největší záhyt v měsíci srpnu, následovalo září a červenec. Každým rokem se však tato čísla mohou měnit s ohledem na klimatické podmínky. Lze tedy předpokládat, že vzhledem k teplému pozdnímu létu byly ve sledovaném roce podmínky pro klíšťata příznivé ještě během měsíce září. Výsledek hypotézy se shoduje s odbornou literaturou.

V roce 2017 bylo ve FN Plzeň na protilátky proti LB vyšetřeno 1785 testů ELISA a 539 testů Western blot. Na území ČR má vysokou prevalenci *B.afzelii*, která je známa svou afinitou ke kožní tkáni, proto jsem očekával, že nejvíce vzorků bude pocházet z kožní kliniky (hypotéza 2). Drtivá většina vzorků zaslaných do mikrobiologické laboratoře FN Plzeň ale pochází z neurologické kliniky, na druhém místě je klinika infekční. Hypotézu 2 jsem tedy nepotvrdil. Možným důvodem může být výjimka při diagnostice LB v případě anulárního EM, kdy laboratorní vyšetření není nutné a antibiotika lze nasadit ihned a dále i nižší finanční limity pro vyšetření na kožní klinice. Může se jednat také o nevšimavost lidí, kteří EM přehlédnou, nenavštíví lékaře a přijdou až s pokročilými příznaky LB, se kterými je lékař pošle na specializované pracoviště, např. neurologickou kliniku. Ne u všech pacientů se ale EM vyvine, proto lidé s nespecifickými příznaky a event. anamnézou přísátého klíštěte přijdou spíše na kliniku infekční, kde byl zjištěn i nejvyšší počet pozitivních výsledků.

Vzhledem k vysoké prevalenci *B.afzelii* na území ČR jsem dále předpokládal, že nejčastějším druhem materiálu, který bude vyšetřován, je sérum. Tato hypotéza (hypotéza 3) se potvrdila. Sérum je jednoduché na odběr a příliš nezatěžuje pacienta. Oproti tomu likvor a punktát už není rutinním odběrem, oba materiály lze odebrat pouze na specializovaných pracovištích. Nejen, že kloubní a neurologické potíže u LB se v ČR vyskytují méně často, navíc správně se u kloubních potíží vyšetřuje dvojice sérum-punktát a u neurologických dvojice sérum-likvor. Výsledek hypotézy se shoduje s odbornou literaturou.

Hypotéza 4, že nejčastěji budou nakaženy ženy, se nepotvrdila, nicméně poměr promořenosti mužů a žen vyšetřených ve FN Plzeň nebyl příliš vysoký a dopadl ve prospěch mužů s rozdílem 16 %. Zjištění příčiny této odlišnosti by vyžadovalo hlubší zkoumání, které neodpovídá rozsahu této práce.

V kap.7.2.3 je uvedeno, že cena metody Western blot je třikrát až čtyřikrát vyšší než cena testu ELISA. Od roku 2018 však nastala změna v sazebníku metod a toto tvrzení již neplatí. V předešlých letech bylo bodové ohodnocení diagnostického testu ELISA 486 bodů a testu Western blot 1451 bodů. V letošním roce nastal výrazný pokles bodového ohodnocení metody Western blot o 971 bodů a to na 480 bodů. U metody ELISA je tento pokles o 158 bodů, nynější ohodnocení je tedy 328 bodů. Díky tomuto snížení lze předpokládat, že se v roce 2018 provede více konfirmačních testů WB.

Ve své práci jsem shromáždil informace ohledně lymfské boreliózy včetně jejích původců, přenašečů, epidemiologie, klinických projevů a diagnostiky. Výsledky vzorků sér, likvorů a kloubních punktátů vyšetřených ve FN Plzeň v roce 2017 jsem statisticky zpracoval a vyhodnotil s ohledem na sezónní výskyt infekce, dále jsem zhodnotil výsledky metod ELISA IgG/IgM a Western blot IgG/IgM, zastoupení jednotlivých materiálů, z kterých pracovišť vzorky nejčastěji pocházejí a porovnal prevalence mezi muži a ženami. Dvě z navržených hypotéz jsem potvrdil v souladu s odbornou literaturou, dvě hypotézy nebyly potvrzeny. Práce splnila stanovené cíle.



## 14 ZÁVĚR

Lymfská borelióza je multisystémové onemocnění vyvolané bakterií *Borrelia burgdorferi* s.l. , která zahrnuje více genospecies s různou geografickou distribucí. Ročně se v ČR nakazí lymfskou boreliózou několik tisíc obyvatel. Vektorem přenosu je klíště rodu *Ixodes*, v ČR *Ixodes ricinus*. Projevy infekce jsou velmi rozmanité a zasahují jak tkáň kůže, tak nervovou soustavu, klouby a další orgány. Nejvíce ohroženi jsou lidé, kteří se často pohybují v přírodě. Bohužel není k dispozici očkovací vakcína, existují jen základní preventivní opatření, která je potřeba při ochraně před onemocněním dodržovat. Při diagnostice je potřeba zvážit klinický obraz pacienta, jeho anamnézu a výsledky laboratorních metod, z nichž nejčastěji se používá metoda ELISA a Western blot. Lymfská borelióza se léčí antibiotiky. Po léčbě může někdy vznikat postboreliový syndrom.

## SEZNAM POUŽITÉ LITERAURY

AMBLER, Zdeněk. *Poruchy periferních nervů*. Vyd. 1. Praha: Triton, 2013. ISBN 978-80-7387-705-7.

American Journal of Ophthalmology. *Diagnosis and clinical characteristics of ocular Lyme borreliosis* [online]. Poslední změna 2.1995. [cit. 2.3.2018]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7832219>

BARTŮNĚK, Petr. *Lymeská borelióza*. 3., dopl. A přeprac. vyd. Praha: Grada, 2006. ISBN: 80-247-1543-0.

BARTŮNĚK, Petr a kol. *Lymeská borelióza*. 4., přeprac. A dopl. vyd. Praha: Grada, 2013. ISBN 978-80-247-4355-4.

BEDNÁŘ, Marek, Andrej SOUČEK a Jiří VÁVRA. *Lékařská speciální mikrobiologie a parazitologie*. Praha. Triton, 1994. ISBN 978-80-9015-214-4.

BUHNER, Stephen Harrod. *Borelióza: přírodní prevence a bylinná léčba lymeské boreliózy a jejích koinfekcí*. vyd. 1. Praha: Triton, 2014. ISBN 978-80-7387-780-4.

CONNELLY, Christopher M., Laura R. PORTER a Joel R. TERMAAT. PCR amplification of a triple-repeat genetic target directly from wholeblood in 15 minutes as a proof-of-principle PCR study for direct sample analysis for a clinically relevant target. *BMC Medical Genetics* [online]. 2014, **15**(1), 15-32 [cit. 23.2.2018]. DOI: 10.1186/s12881-014-0130-5. ISSN 14712350.

DILLON, Richard, O'CONNELL, Susan a WRIGHT, Stephen. *Lymedisease in the UK, clinical and laboratory features and response to treatment*. *Clinical Medicine* [online] Poslední změna 20.2.2007. [cit. 18.2.2018]. ISSN 1473-4893.

DLOUHÝ, Pavel., et al. *Lymeská borelióza: Doporučený postup v diagnostice, léčbě a prevenci*. [online] 2011. [cit. 2.1.2018]. Dostupné z: <http://www.infekce.cz/DoporLB11.html>

GÖPFERTOVA, Dana, PAZDIORA, Petr a DÁŇOVÁ, Jana. *Epidemiologie: obecná a speciální epidemiologie infekčních nemocí*. 2., přeprac. vyd. Praha: Karolinum, 2013. ISBN 978-80-2462-223-1.

Informační server o nemoci zvané Lymská borelióza [online]. Dabs: ©2003-2018 [cit. 9.1.2018]. Dostupné z: <http://www.borelioza.cz/cs/prevence/>

Informační server o nemoci zvané Lymská borelióza [online]. Dabs: ©2003-2018 [cit. 9.1.2018]. Dostupné z: [http://www.borelioza.cz/cs/test\\_elisa/](http://www.borelioza.cz/cs/test_elisa/)

Informační server o nemoci zvané Lymská borelióza [online]. Dabs: ©2003-2018 [cit. 9.1.2018]. Dostupné z: [http://www.borelioza.cz/cs/test\\_western\\_blot/](http://www.borelioza.cz/cs/test_western_blot/)

JIRÁSKOVÁ, Alena. *Současný pohled na lymeskou boreliózu a CD57+NK buňky. Alergie*. 2014, roč. 16, č.3, s. 166-171. ISSN 1212-3536.

KIMMIG, Peter, Rüdiger BRAUN a Dieter HASSLER. *Klíšťata: Nepatrné kousnutí s neblahými následky*. Praha: Pragma, 2003. ISBN 80-7205-881-9.

KŘÍŽ, Bohumír, Martin GAŠPÁREK. *Lymeská borrelióza – epidemiologická data za rok 2014* [online]. Poslední změna 15.9.2015. [cit. 25.2.2018]. Dostupné z: [http://www.szu.cz/uploads/Epidemiologie/Lymeska\\_borrelioz/Lymeska\\_borelioza\\_CR\\_data\\_do\\_roku\\_2014.pdf](http://www.szu.cz/uploads/Epidemiologie/Lymeska_borrelioz/Lymeska_borelioza_CR_data_do_roku_2014.pdf)

KŘUPKA, Michal, RAŠKA, Milan RAŠKA a Evžen WEIGL. Lymská borelióza – biologie, patogeneze, diagnostika a léčba. *Dermatologie pro praxi*. 2008, roč. 2, č. 5-6, s.236-239. ISSN 1802-2960.

LITZMAN, Jiří. *Základy vyšetření v klinické imunologii*. Brno: Masarykova univerzita, 2007. ISBN 978-80-210-4227-8.

International Musician. Lyme disease Diagnosis and precautions. 2016, vol. 114, no. 8, s. 15-15. ISSN 0020-8051.

ROHÁČOVÁ, Hana. Lymská borelióza – hodnocení laboratorních výsledků a indikace léčby. *Medicína pro praxi*. 2010, roč. 7, č. 8-9, s. 344-346. ISSN 1214-8687.

ROHÁČOVÁ, Hana. Lymská borelióza – komplexní pohled. *Medicína pro praxi*. 2010, roč. 7, č. 8-9, s. 310-312. ISSN 1214-8687.

ROHÁČOVÁ, Hana. Lymská borelióza. *Interní medicína pro praxi*. 2012, roč. 14, č. 5, s. 203-205. ISSN 1212-7299.

STANEK, Gerold, Gary P WORMSER, Jeremy GRAY, Franc STRLE. *Lyme borreliosis* [online]. 7.7.2011. [cit. 16.2.2018]. DOI:10.1016/S0140-6736(11)60103-7. Dostupné z: [www.thelancet.com](http://www.thelancet.com).

TEST LINE. EIA Borrelia recombinant IgG. Výrobce: TestLine Clinical Diagnostics s.r.o.

TEST LINE. EIA Borrelia recombinant IgM. Výrobce: TestLine Clinical Diagnostics s.r.o.

TEST LINE. Microblot-Array Borrelia IgG. Výrobce TestLine Clinical Diagnostics s.r.o.

TEST LINE. Microblot-Array Borrelia IgM. Výrobce TestLine Clinical Diagnostics s.r.o.

Western blot. Návod k testu pro Anti-Borrelia EUROLINE-RN-AT. Protilátky proti Borrelia (IgM). EUROIMMUN.

Western blot. Návod k testu pro Anti-Borrelia EUROLINE-RN-AT. Protilátky proti Borrelia (IgG). EUROIMMUN.

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

EM	erytema migrans
ACA	acrodermatitis chronica atrophicans
Bbsl	<i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato
LB	lymská borelióza
Osp	outer surface protein
CNS	centrální nervová soustava
CAG	glykosaminglykan
PCR	polymerase chain reaction
LA	lymská artritida
DNA	deoxyribonukleonová kyselina
ELISA	Enzyme Linked Imunosorbent Assay
EIA	Enzyme Imunoassay
WB	Western blot
Bg	<i>Borrelia garinii</i>
Bb	<i>Borrelia burgdorferi</i>
Ba	<i>Borrelia afzelii</i>
TMB	tetramethylbenzidin
MBA	Microblot-Array

## **SEZNAM TABULEK**

Tabulka 1: Referenční meze metody EIA Borrelia recombinant IgM/IgG. ....	44
Tabulka 2: Hodnocení testu Western blot ve třídě IgG. ....	51
Tabulka 3: Hodnocení testu Western blot ve třídě IgM.....	52

## SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Lymfská borelióza - sezónní průběh infekce v roce 2017. ....	54
Graf 2: Výsledky testu ELISA ve třídě IgG ve všech vyšetřovaných materiálech. ....	55
Graf 3: Výsledky testu ELISA ve třídě IgM ve všech vyšetřovaných materiálech. ....	56
Graf 4: Procentuální zastoupení vyšetřovaných materiálů pro testy ELISA IgG a IgM. ....	57
Graf 5: Pracoviště nejčastěji zasílající vzorky k vyšetření metodou ELISA. ....	58
Graf 6: Výsledky testu Western blot IgG ve všech vyšetřovaných materiálech. ....	59
Graf 7: Výsledky testu Western blot IgM ve všech vyšetřovaných materiálech. ....	60
Graf 8: Procentuální zastoupení vyšetřovaných materiálů pro testy Western blot IgG a IgM. ....	61
Graf 9: Pracoviště nejčastěji zasílající vzorky k vyšetření metodou WB. ....	62
Graf 10: Poměr pozitivních mužů a žen. ....	63

## SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Mikrotitrační destička s napipetovanými vzorky a reagensy.....	40
Obrázek 2: Přístroj DSX používaný ve FN Plzeň pro metodu EIA.....	41
Obrázek 3: Přístroj Profiblot používaný ve FN Plzeň k metodě Western blot. ....	47
Obrázek 4: Vyhodnocovací protokol metody Western blot od firmy EUROIMMUN. .	50



## **SEZNAM PŘÍLOH**

Příloha 1: Erytema migrans.

Příloha 2: Spirochéta *Borrelia burgdorferi*.

Příloha 3: Povolení sběru informací ve FN Plzeň.

## PŘÍLOHY

Příloha 1: Erytema migrans.



Zdroj: <https://i0.wp.com/www.fourriversclinic.com/wp-content/uploads/2014/04/Erythema-Migrans.jpg>

Příloha 2: Spirochéta *Borrelia burgdorferi*.



Zdroj: <http://www.bayarealyne.org/wp-content/uploads/2014/08/borrelia-burgdorferi.jpg>

## Příloha 3: Povolení sběru informací ve FN Plzeň.



Vážený pan  
Jan Cejka  
Student oboru Zdravotní laborant  
Fakulta zdravotnických studií, Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví  
Západočeská univerzita v Plzni

### Povolení sběru informací ve FN Plzeň

Na základě Vaší žádosti Vám jménem Útvaru náměstkyně pro ošetrovatelskou péči FN Plzeň **uděluji souhlas** se sběrem a zpracováním anonymizovaných výsledků laboratorních metod, používaných v Ústavu mikrobiologie (MIKRO) FN Plzeň. Tento souhlas je vydáván, při splnění níže uvedených podmínek, v souvislosti s vypracováním Vaší bakalářské práce s názvem „Lymfická borelióza“.

Podmínky, za kterých Vám bude umožněna realizace Vašeho šetření ve FN Plzeň:

- Vrchní zdravotní laborantka MIKRO souhlasí s Vaším postupem.
- Osobně provedete svoje šetření.
- Vaše šetření nenaruší chod pracoviště ve smyslu provozního zajištění dle platných směrnic FN Plzeň, ochrany dat pacientů a dodržování Hygienického plánu FN Plzeň. **Vaše šetření bude provedeno za dodržení všech legislativních norem, zejména s ohledem na platnost zákona č. 372/2011 Sb., o zdravotních službách a podmínkách jejich poskytování, v platném znění.**
- Údaje ze zdravotnické dokumentace pacientů, které budou uvedeny ve Vaší bakalářské práci, musí být anonymizovány.
- Sběr informací budete provádět v době Vaší, školou schválené, odborné praxe a **pod přímým vedením oprávněného zdravotnického pracovníka, kterým je Mgr. Petra Soušková, odborný pracovník v laboratorních metodách MIKRO FN Plzeň.**

Po zpracování Vámi zjištěných údajů poskytnete zdravotnickému oddělení / klinice či organizačnímu celku FN Plzeň závěry Vašeho šetření, pokud o ně projeví oprávněný pracovník ZOK / OC zájem a budete se aktivně podílet na případné prezentaci výsledků Vašeho šetření na vzdělávacích akcích pořádaných FN Plzeň.

Toto povolení nezakládá povinnost zdravotnických pracovníků s Vámi spolupracovat, pokud by spolupráce s Vámi narušovala plnění pracovních povinností zaměstnanců. Spolupráce zaměstnanců FN Plzeň na Vašem šetření je dobrovolná.

Přeji Vám hodně úspěchů při studiu.

Mgr. Bc. Světluše Chabrová,  
manažerka pro vzdělávání a výuku NELZP  
zástupkyně náměstkyně pro oš. péči

Útvar náměstkyně pro oš. péči FN Plzeň  
tel.: 377 103 204, 377 402 207  
e-mail: [chabrovas@fnplzeň.cz](mailto:chabrovas@fnplzeň.cz)

23. 3. 2018