ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI
FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2020 **Eliška Jará**

FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví B5345

Eliška Jará

Studijní obor: Zdravotní laborant 5345R020

DIAGNOSTIKA LYMESKÉ BORELIÓZY

Bakalářská práce

Vedoucí práce: Mgr. Petra Soušková

PLZEŇ 2020

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně, uvedla všechny použité prameny v seznamu použitých zdrojů a uvedla veškeré použité citace.

V Plzni dne 31. 3. 2020

.....

vlastnoruční podpis

Abstrakt

Příjmení a jméno: Jará Eliška

Katedra: Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví

Název práce: Diagnostika lymeské boreliózy

Vedoucí práce: Mgr. Petra Soušková

Počet stran – číslované: 54

Počet stran – nečíslované: 19

Počet příloh: 1

Počet titulů použité literatury: 39

Klíčová slova: Lymeská borelióza, diagnostika, vyšetřovací metody, *Borrelia burgdorferi*, ELISA, Western Blot, Microblot-Array, PCR

Souhrn:

Tato bakalářská práce seznamuje čtenáře s charakteristikou lymeské boreliózy, její nesnadnou diagnostikou a ne vždy úspěšnou léčbou. Hlavním pilířem práce je ale diagnostika tohoto onemocnění, která není tak jednoznačná, jako u ostatních infekčních onemocnění. Kapitoly o diagnostice a léčbě lymeské boreliózy jsou rozděleny na dvě části, kdy je v práci popsána diagnostika a léčba v České republice i Německu. Důvodem pro srovnání diagnostiky a léčby v těchto dvou zemích je fakt, že někteří nemocní jedinci po neúspěšné léčbě v České republice vyhledávají kliniku v Německu. Z Německa totiž proudí mylné informace, jako je léčba delší než 3 týdny.

Abstract

Surname and name: Jará Eliška

Department: Department of Rescue Services and Technical Fields

Title of thesis: Diagnostics of Lyme borreliosis

Consultant: Mgr. Petra Soušková

Number of pages – numbered: 54

Number of pages – unnumbered (tables, graphs): 19

Number of appendices: 1

Number of literature items used: 39

Keywords: Lyme borreliosis, diagnostics, investigative methods, *Borrelia burgdorferi*, ELISA, Western Blot, Microblot-Array, PCR

Summary:

This bachelor thesis introduces to the reader characteristics of Lyme borreliosis, its difficult diagnosis and not always succesful treatment. The main pillar of the thesis is the diagnostics of this disease, which is not as conclusively as that of other infectious diseases. Chapters on diagnostics and treatment of Lyme borreliosis are divided into two parts, where diagnostics and treatment are described in the Czech republic and Germany. The reason for comparing diagnostics and treatment in these two countries is the fact that some sick people are looking for a clinic in Germany after a failed treatment. There are mistaken information from Germany such as treatment for more than 3 weeks.

Předmluva

Tato bakalářská práce je zaměřena na onemocnění nazývané jako lymeská borelióza, především tedy na její diagnostiku v laboratoři. V práci je popsáno mnoho způsobů možné diagnostiky tohoto onemocnění, některé způsoby diagnostiky se ale nepoužívají. Hlavním cílem práce je tedy seznámit čtenáře s touto chorobou, se všemi možnými způsoby diagnostiky lymeské boreliózy a zvláště v praktické části poukázat na metody rutinně používané v laboratoři při diagnostice onemocnění.

Práce zahrnuje i poznatky z jiné země – Německa, kde vznikla speciální klinika zabývající se diagnostikou a léčbou především tohoto onemocnění. V práci je zahrnuta proto, že někteří jedinci po neúspěšné léčbě v České republice vyhledávají právě tuto kliniku s očekáváním plného uzdravení.

Poděkování

Děkuji Mgr. Petře Souškové za odborné vedení této bakalářské práce, za poskytování materiálů a cenných rad při zpracování, za veškerý čas poskytnutý ke konzultacím a kontrole práce. Velké díky patří také mým rodičům, kteří mi studium umožnili a bez kterých by tato práce nevznikla.

OBSAH

SEZNAM GRAFŮ 10
SEZNAM OBRÁZKŮ 8
SEZNAM TABULEK 9
SEZNAM ZKRATEK 10
ÚVOD 15
TEORETICKÁ ČÁST 16
1 Charakteristika lymeské boreliózy 16
1.1 Historie 17
1.2 Projevy onemocnění 17
1.3 Etiologické agens 19
1.4 Patogeneze 23
1.5 Způsob přenosu 24
1.6 Epidemiologická situace 26
1.7 Klinické formy 27
1.7.1 Postižení kůže 28
1.7.2 Postižení nervového systému 28
1.7.3 Postižení muskuloskeletálního systému 29
1.7.4 Postižení srdce 30
1.7.5 Postboreliový syndrom 30
1.8 Prevence 30
2 LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA 32
2.1 Česká republika 32
2.1.1 Metody nepřímé 32
2.1.1.1 ELISA 33
2.1.1.2 Western Blot 35
2.1.1.3 Microblot-Array (MBA) 36
2.1.1.4 Nepřímá imunofluorescence (IFA) 37
2.1.2 Metody přímé 37
2.1.2.1 Mikroskopický průkaz 38
2.1.2.2 Kultivace 38
2.1.2.3 Histologický průkaz 39
2.1.2.4 DNA-hybridizace 39
2.1.2.5 Polymerázová řetězová reakce (PCR) 39
2.2 Německo 41
2.2.1 ELISA 41
2.2.2 Imunoblot 42
2.2.3 EliSpot a LymeSpot 42
2.2.4 Průtoková cytometrie 43
2.2.5 Polymerázová řetězová reakce (PCR) 44
3 LÉČBA 45
3.1 Česká republika 45
3.1.1 Léčba v časně lokalizovaném stádiu 45

3.1.2 Léčba v časně diseminovaném stádiu 46
3.1.3 Léčba v pozdním diseminovaném stádiu 46
3.2 Německo 47
3.2.1 Klasická léčba antibiotiky 47
3.2.2 Alternativní léčba 47
3.2.3 Kompaktní léčba 48
PRAKTICKÁ ČÁST 49
4 CÍL PRAKTICKÉ ČÁSTI 49
5 METODIKA 49
6 VLASTNÍ PRAKTICKÁ ČÁST 50
6.1 Biologický materiál pro vyšetření 50
6.2 Postup metody ELISA 50
6.2.1 Souprava k vyšetření IgM a IgG protilátek 50
6.2.2 Vybavení pro manuální provedení testu 51
6.2.3 Příprava reagencií 51
6.2.4 Ředění pacientských vzorků 51
6.2.5 Postup 52
6.2.6 Vyhodnocení výsledků 52
6.3 Postup metody Western Blot 53
6.3.1 Souprava pro vyšetření IgM a IgG protilátek 53
6.3.2 Příprava reagencií 54
6.3.3 Ředění pacientských vzorků 54
6.3.4 Postup 54
6.3.5 Vyhodnocení výsledků 55
6.4 Postup metody Microblot-Array 55
6.4.1 Souprava pro vyšetření specifických IgM a IgG protilátek 56
6.4.2 Ředění pacientských vzorků 56
6.4.3 Postup 56
6.4.4 Vyhodnocení výsledků 57
6.5 Výsledky 57
6.5.1 Nejpoužívanější biologické materiály 2018 a 2019 57
6.5.2 Výsledky ELISA IgM v letech 2018 a 2019 58
6.5.3 Výsledky ELISA IgG v letech 2018 a 2019 59
6.5.4 Výsledky WB/MBA IgM v letech 2018 a 2019 60
6.5.5 Výsledky WB/MBA IgG v letech 2018 a 2019 61
6.6 Srovnání výsledků metody ELISA v letech 2018-2019 62
6.6.1 IgM protilátky 62
6.6.2 IgG protilátky 63
6.7 Srovnání výsledků WB/MBA v letech 2018-2019 64
6.7.1 IgM protilátky 64
6.7.2 IgG protilátky 64
DISKUZE 66
ZÁVĚR 68
CITOVANÁ LITERATURA 69

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Počet hlášených případů LB v ČR v letech 1988-2014 27
Graf 2: Nejpoužívanější materiály ve FN Plzeň v letech 2018-2019 58
Graf 3: Vyšetření IgM protilátek metodou ELISA - rok 2018 58
Graf 4: Vyšetření IgM protilátek metodou ELISA - rok 2019 59
Graf 5: Vyšetření IgG protilátek metodou ELISA - rok 2018 59
Graf 6: Vyšetření IgG protilátek metodou ELISA - rok 2019 60
Graf 7: Vyšetření IgM protilátek metodou WB - rok 2018 60
Graf 8: Vyšetření IgM protilátek metodou WB a MBA - rok 2019 61
Graf 9: Vyšetření IgG protilátek metodou WB - rok 2018 62
Graf 10: Vyšetření IgG protilátek metodou WB a MBA - rok 2019 62
Graf 11: Srovnání pozitivních výsledků ELISA IgM 2018-2019 63
Graf 12: Srovnání pozitivních výsledků ELISA IgG 2018-2019 63
Graf 13: Srovnání pozitivních výsledků WB/MBA IgM 2018-2019 64
Graf 14: Srovnání pozitivních výsledků WB/MBA IgG 2018-2019 65

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Formy erythema migrans 18
Obrázek 2: Stavba *Borrelia burgdorferi* 20
Obrázek 3: Pleomorfní formy *Borrelia burgdorferi* 22
Obrázek 4: Prevalence infekce různými druhy *Borrelia burgdorferi* sensu lato u nymf Ixodes ricinus. Prevalence znázorněna na 100 % 25
Obrázek 5: Klinické formy LB a druh borelií s nimi spojených 28
Obrázek 6: Princip ELISA metody v mikrotitrační destičce 34
Obrázek 7: Vyšetření Western Blot u pacientů s LB 36
Obrázek 8: Mikrotitrační destička pro Microblot-Array 36
Obrázek 9: LymeSpot test 43
Obrázek 10: Mikrotitrační destička použitá k měření ELISA 53
Obrázek 11: Vyhodnocovací protokol WB 55

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Patogenní druhy *Borrelia burgdorferi* sensu lato a jejich výskyt 19
Tabulka 2: Druhy klíšťat rodu *Ixodes* a jejich výskyt..... 24
Tabulka 3: Ředící poměry vzorků pro ELISA metodu..... 51
Tabulka 4: Ředící poměry vzorků pro Microblot-Array metodu 56

SEZNAM ZKRATEK

ACA ..... Acrodermatitis chronica atrophicans
AD ..... Alzheimerova choroba
Bbsl ..... Borrelia burgdorferi sensu lato
BL ..... Boreliový lymfocytom
BosR ..... Stress related geny
BSK ..... Barbour-Stoener-Kellyho médium
CD ..... Cluster of differentiation
CMV ..... Cytomegalovirus
CO_2 ..... Oxid uhličitý
CSF ..... Likvor
CT ..... Compact treatment
ČR ..... Česká republika
DNA ..... Deoxyribonukleová kyselina
EBV ..... Epstein-Barrové virus
EIA ..... Enzymová imunoanalýza
ELISA ..... Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EliSpot ..... Enzyme-Linked Immunosorbent Spot Assay
EM ..... Erythema migrans
FITC ..... Fluoresceinthiokyanát
FN Plzeň ..... Fakultní nemocnice Plzeň
HEB ..... Hematoencefalická bariéra
HIV ..... Human immunodeficiency virus
HSV ..... Herpes simplex virus
IFA ..... Indirect Immunofluorescence Assay
IgA ..... Imunoglobulin A
IgG ..... Imunoglobulin G
IgM ..... Imunoglobulin M
IL-2 ..... Interleukin 2
ILADS ..... International Lyme and Associated Diseases Society
ISEM ..... Imunosorbentní elektronová mikroskopie
LA ..... Lymeská artritida
LB ..... Lymeská borelióza

LPS .....Lipopolysacharid

MBA .....MicroBlot-Array

MKP .....Modified-Kelly-Pettenkoferovo médium

NB .....Neuroborelióza

NK buňky .....Natural Killers

Osp .....Outer surface protein

PCR .....Polymerázová řetězová reakce

PerR .....Peroxid related geny

RNA .....Ribonukleová kyselina

Rt-PCR .....PCR v reálném čase

SDS-PAGE .....Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu s dodecylsulfátem sodným

TMB .....Tetramethylbenzidin

WB .....Western Blot

WHO .....World Health Organization

ÚVOD

Lymeská borelióza patří mezi poměrně často diskutované a stále objevované choroby. Tato antropozoonóza, přenosná pouze z vektoru na člověka, komplikuje život nemalému počtu nakažených jedinců. Jedná se o celkem obtížně diagnostikovatelnou a léčebně ovlivnitelnou chorobu, i přes skutečnost, že existuje mnoho způsobů detekce patogena odpovědného za onemocnění i léčba různým spektrem antibiotik. Důvodem může být různá antigenní výbava agens a tím i různé klinické formy onemocnění.

Diagnostika lymeské boreliózy je založena na kombinaci klinických nálezů s detekcí specifických protilátek IgM a IgG. Problémy s diagnostikou vznikají hlavně u pacientů s nespecifickými příznaky (nejčastěji příznaky podobné chřipce) a pozitivní sérologií IgG.

V malém množství neléčených případů se mohou vyskytnout závažné následky tohoto onemocnění, ale lymeská borelióza sama o sobě nezpůsobuje smrt. Na úkor komplikací klasické léčby antibiotiky, neúspěšné léčby nebo přetrvávajících obtíží nakažených jedinců se objevily kliniky specializující se přímo na onemocnění přenášené vektory.

Tyto kliniky, zabývající se chorobami způsobenými hlavně přenosem agens z klíštěte, se specializují nejen na diagnostiku onemocnění, ale také na vhodnou léčbu pacientů. Je známo, že lymeská borelióza je léčitelné onemocnění, ale je třeba si uvědomit, že opakované podávání antibiotik neznamená úplné vyléčení pacienta.

TEORETICKÁ ČÁST

1 CHARAKTERISTIKA LYMESKÉ BORELIÓZY

Navzdory zlepšení prevence, diagnostiky i léčby je lymeská borelióza (dále jen LB) stále považována za nejčastější chorobu přenášenou členovci v mírném pásu severní polokoule. Riziko infekce je spojeno s povoláním (například u lesníků) i rekreačním pobytem v přírodě. (Halperin, a další, 2018)

V Evropě je toto onemocnění způsobeno jedním či více patogenními druhy *Borrelia burgdorferi* sensu lato, které jsou do těla hostitele přenášeny vektorem - klíšťaty rodu *Ixodes*. LB se podobá v Evropě i Severní Americe, ale větší rozmanitost genospecies borelií v Evropě vede k důležitým rozdílům klinických projevů. Rozdílem je například acrodermatitis chronica atrophicans či boreliový lymfom vyskytující se v USA jen zřídka, oproti tomu v Evropě se vyskytují častěji a jsou velmi dobře diagnostikovatelné. (Stanek, a další, 2018) Onemocnění může mít cyklický průběh, který je způsobený antigenní proměnlivostí borelií nebo obranyschopností hostitelského organismu. (Bartůněk, 2013)

Typickými projevy tohoto onemocnění je vytvoření erythema migrans (EM), boreliového lymfocytomu (BL) a chronické atrofické akrodermatitidy (ACA). Ačkoliv je v dnešní době tato infekční choroba dobře známa, některé její formy se obtížně diagnostikují a i přes léčbu se nedaří ji pořádně vyléčit. (Roháčová, 2005)

Inkubační doba se pohybuje od 1 dne až téměř do 1 roku (kolem 300 dnů) i přes skutečnost, že většina nakažených onemocní zhruba do 2 měsíců. V populaci se vyskytuje kolem 10 % zdravých jedinců s pozitivními antiboreliovými protilátkami s neprokázanou diagnózou lymeské boreliózy. (Bartůněk, 2013)

Široké spektrum klinických příznaků u LB může být projevem infekcí různých orgánů. Mezi ně patří infekce centrální i periferní nervové soustavy, svalů, kloubů, či kůže a dalších orgánů. Toto poškození orgánů je způsobené invazivní schopností borelií pronikat do různých tkání či orgánů. Akutní příznaky mohou trvat týdny, dokonce až měsíce. (Stanek, a další, 2018)

Jako u jednoho z mála onemocnění vzniká u LB mnoho otázek ohledně diagnostiky a vyšetřovacích metod. Důvody jsou různé. Mohou to být nevýrazné nálezy z laboratorních vyšetření krve, likvoru a punktátu, nebo proměnlivé nálezy při séro-

gických vyšetřeních, u kterých je nutno brát ohled na možné výsledky jak falešně negativní, tak falešně pozitivní. (Bartůněk, 2013)

Lymeská borelióza není smrtelným onemocněním, ale v chronické fázi onemocnění může komplikovat a zhoršovat kvalitu života jedince, či způsobit jeho invaliditu. (Křupka, a další, 2014)

1.1 Historie

Lymeská borelióza je řazena mezi poměrně nedávno objevené onemocnění rozšířené na území několika kontinentů, vyskytující se i na území Evropy, včetně České republiky (ČR). První zmínka o LB pochází z roku 1883, kdy německý lékař Alfred Buchwald označil kožní změny u nemocného jako tzv. acrodermatitis chronica atrophicans (dále jen ACA). Skutečná podstata boreliózy je známa ale až od 80. let dvacátého století. (Bartůněk, 2013) V té době se LB považovala za vzácné onemocnění, ale během několika let se změnil pohled na tuto chorobu a stala se nejrozšířenější antropozoonózou u nás.

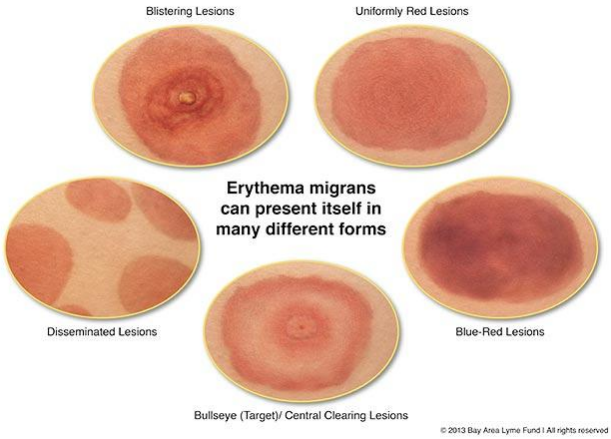
Nemoc byla pojmenována podle města Old Lyme v Connecticutu, kde došlo v polovině 70. let dvacátého století ke geografickému seskupení podezřelých případů juvenilní revmatoidní artritidy, u kterých se prokázala spojitost s přisátím klíštěte. (Stanek, a další, 2011) Oblast městečka Old Lyme byla charakterizována přítomností a rozšířením klíšťat rodu *Ixodes dammini.* Kromě artritidy, neurologických a kožních postižení byly pozorovány nové znaky onemocnění, jako například abnormality srdečního vzruchu. (Bartůněk, 2013)

V roce 1982 izoloval W.Burgdorfer a kolektiv spirochetální bakteriální druhy z dospělých klíšťat rodu *Ixodes dammini* v endemické oblasti. Tyto bakterie vykazovaly specifickou vazbu na imunoglobuliny pacientů zotavujících se z LB. Spirocheta byla pojmenována jako *Borrelia burgdorferi.* (Alasel, a další, 2018)

1.2 Projevy onemocnění

Nejčastějším projevem tohoto onemocnění je vznik erythema migrans (EM) v místě po přisátí klíštěte s odstupem několika dnů až týdnů. (Bartůněk, 2013) V Evropě je EM způsobeno bakterií *Borrelia afzelii,* na rozdíl od USA, kde je stejný projev způsoben *Borrelia burgdorferi* sensu stricto. U amerických pacientů jsou však častější systémové příznaky a séroreaktivita. (Stanek, a další, 2011)

EM je erytematózní kožní léze, která se vyvíjí dny až týdny od přenosu borelií přisátím klíštěte. (Stanek, a další, 2018) Jedná se o nebolestivý projev na kůži a dosahovat může až několika cm, v dětském věku se objevuje méně často. (Bartůněk, 2013) Léze obvykle začíná jako makula nebo papula a rozšiřuje se během několika dní až týdnů se vznikem centrálního zblednutí, nebo i bez něj (obrázek 1). To se děje pravděpodobně proto, že se spirochety šíří odstředivě kůží. Pro spolehlivou diagnózu musí léze dosáhnout průměru ≥ 5 cm. Léze < 5 cm se využívá k diagnostice tehdy, vyvíjí-li se v místě po přisátí klíštěte a je-li časový interval nejméně 2 dny od zvětšení léze. (Stanek, a další, 2018)



Obrázek 1: Formy erythema migrans
Zdroj: (BayAreaLyme, 2014)

Dalším projevem může být boreliový lymfocytom (BL). Jedná se o vzácný projev evropské boreliózy, který je častěji pozorován u dětí než u dospělých. U dětí je nejčastěji lokalizován na ušním lalůčku, u dospělých v oblasti bradavky prsu nebo šourku. (Stanek, a další, 2018) BL je bezbolestný, modravě až červeně zbarvený uzlík s infiltrací B lymfocytů. (Bartůněk, 2013) Při neadekvátní léčbě může přetrvávat měsíce a mohou následovat i další projevy LB, ale také může spontánně vymizet bez léčby, stejně jako EM. (Stanek, a další, 2018) Pacienti s BL jsou obvykle během diagnostiky séropozitivní. BL má typický histologický vzhled s intenzivním polyklonálním B-lymfocytárním infiltrátem. Při diagnostické nejistotě je zapotřebí histologie k vyloučení kožního lymfomu či jiných malignit. (Stanek, a další, 2011)

Acrodermatitis chronica atrophicans (ACA) je kožní forma LB, objevující se téměř výhradně v Evropě. (Stanek, a další, 2018) Diagnostikována je převážně u dospělých, více však u žen. (Bartůněk, 2013) Léze je nejčastěji lokalizována na akrálních částech těla, obvykle extenzorové plochy rukou či nohou. (Stanek, a další, 2018) Pokud

nejsou léčeny, stávají se atrofickými. (Stanek, a další, 2011) V séru je přítomen vysoký titr IgG protilátek proti Bbsl. (Bartůněk, 2013)

V Evropě se u vyššího počtu pacientů vyskytuje neuroborelióza, oproti tomu v USA se zdá častějším projevem lymeská artritida. (Stanek, a další, 2011)

Choroba může u některých jedinců probíhat i asymptomaticky. V USA může borélie způsobit asymptomatickou infekci u přibližně 10 % pacientů. Při studii séroprevalence ve Švédsku si více než polovina séropozitivních jedinců nepamatovala symptomy lymeské boreliózy. (Stanek, a další, 2018)

1.3 Etiologické agens

Původcem infekce lymeské boreliózy je druhový komplex bakterií rodu *Borrelia burgdorferi* sensu lato (dále jen Bbsl), ve kterém je známo asi 19 genospecies borelií. (Mannelli, a další, 2012) Dříve se věřilo, že se jedná pouze o jeden druh borelie způsobující toto onemocnění. Dnes už je ale známo několik patogenních druhů borelií, lišících se od sebe svou antigenní výbavou. (Roháčová, 2005) V Evropě se vyskytují všechny patogenní druhy, na rozdíl od USA, kde se objevuje pouze *Borrelia burgdorferi* sensu stricto. V tabulce 1 jsou uvedeny prokázané patogenní druhy *Borrelia burgdorferi* sensu lato a jejich výskyt ve světě.

Tabulka 1: Patogenní druhy Borrelia burgdorferi sensu lato a jejich výskyt

***Borrelia* species**	**Výskyt**
Borrelia burgdorferi sensu stricto	Evropa a Severní Amerika
Borrelia garinii	Evropa a část Asie
Borrelia afzelii	Evropa a část Asie

(Roháčová, 2005)

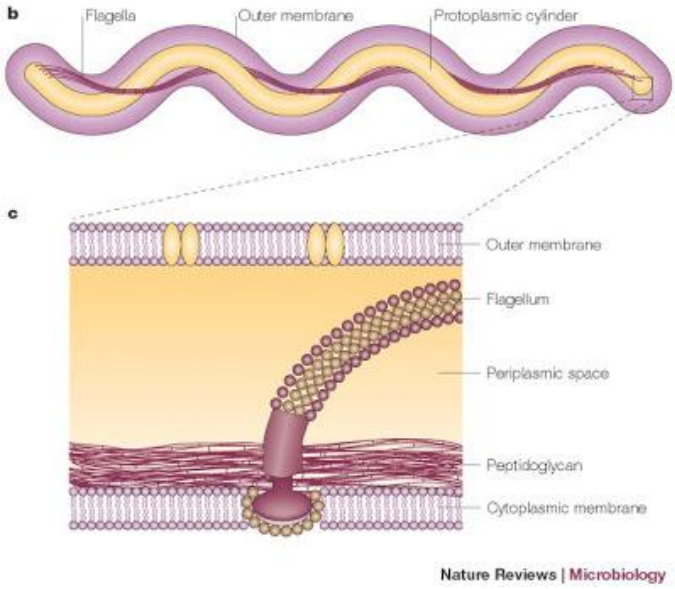
„Podle sekvenčního uspořádání chromozomové DNA v pulzní gelové elektroforéze byly spirochety Bbsl rozlišeny na druhy *Borrelia burgdorferi* sensu stricto (všechny americké kmeny) a *B. afzelii, B. garinii, B. japonica.* V Asii byly dále izolované *B. turdi, B. tunuki* a *B. sinica.*“ (Bartůněk, 2013)

Jedná se o mikroaerofilní, gram-negativní spirochetální bakterie o délce 10-30 μm a 0,5 μm v příčném průměru. (Stanek, a další, 2018) Borelie jsou řazeny do kmenu spirochet a s ostatními spirochetami mají společné strukturní charakteristiky, jakými je šroubovitě tvarovaná buňka a pohyblivost třemi způsoby pohybu – tzv. vývrtkovitý pohyb, kdy spirocheta rotuje kolem své osy; natahování a smršťování.

(Roháčová, 2005) Od ostatních spirochet se odlišují přítomností tvz. intramembranózních tělísek, kterými se mohou borelie chránit v nevhodném prostředí. (Bartůněk, 2013)

Bakterie mají tvar šroubovice s 3-10 nerovnoměrnými záhyby. (Roháčová, 2005) Buněčná stěna (vnější membrána) borelií je oddělena od cytoplazmatické membrány (vnitřní membrána) periplazmatickým prostorem na povrchu protoplazmatického válce (obrázek 2). (Bartůněk, 2013) Vnější membrána neobsahuje lipopolysacharidy, ale je vybavena vnějšími povrchovými lipoproteiny, tzv. Osp proteiny (outer surface protein). (Stanek, a další, 2018) Je známo, že borelie mají atypickou gram-negativní buněčnou membránu. (Meriläinen, a další, 2015) Mezi vnitřní a vnější membránou se nachází periplazmatický prostor, obsahující peptidoglykanovou vrstvu a flagelární vlákna (endoflagely), neboli bičíky. (Roháčová, 2005)

Flagely hrají zásadní roli v motilitě a morfologii borelií, udržují tvar bakterie. (Meriläinen, a další, 2015) Počet flagel kolísá mezi 7-11, jsou neopouzdřené a duté, tvořeny proteinem zvaným flagellin. (Roháčová, 2005) Jsou napnuty mezi oběma konci bakterie v bazálních discích a obtáčí celou buňku (obrázek 2). Vysouváním flagel do proximálního a distálního prostoru dochází k uvolňování membranózních vezikul (tzv. blebs). (Bartůněk, 2013) Tyto vezikuly mají podobnou stavbu jako buněčná stěna a obsahují plazmidovou DNA. (Roháčová, 2005) Borelie potřebují k syntéze DNA a růstu bakterie zinek. Při posunu antigenních molekul proteinů a glykosaminopeptidových receptorů uvnitř povrchové membrány dochází k adhezi borelií k buňkám hostitele. (Bartůněk, 2013)



Obrázek 2: Stavba Borrelia burgdorferi
Zdroj: (SpirochetesUnwound, 2009)

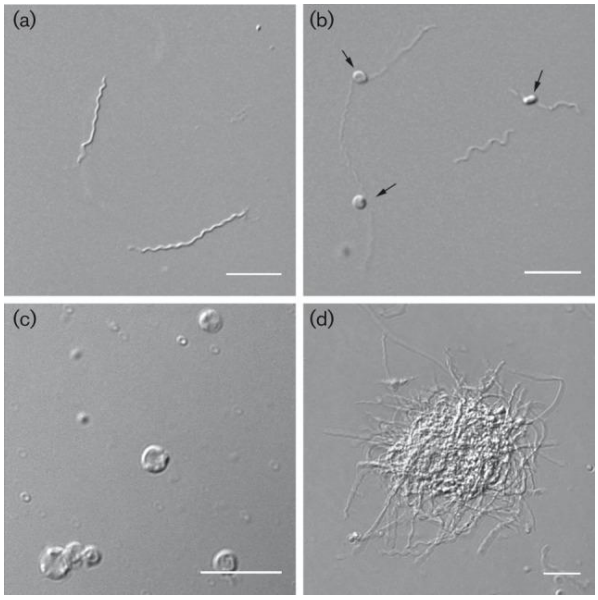
V časné fázi infekce dochází v hostitelském organismu k tvorbě IgM protilátky proti flagellinu (proteinu bičíků) a vnějšímu povrchovému proteinu OspC borelií. Monoklonální protilátka, namířena proti bičíkovému proteinu borelií, může též reagovat s nervovými vlákny, nebo myosinem. IgG protilátka, namířena proti flagellinu, může být nespecifická a také může způsobovat zkříženou reakci s axonálním proteinem nervových buněk (HSP60). Tyto mechanismy tak mohou být zodpovědny za vznik autoimunitních onemocnění, či chronické artritidy. (Bartůněk, 2013)

Borelie obsahují malý lineární chromozóm a několik lineárních a kruhových plazmidů kódujících příslušné Osp. (Stanek, a další, 2018) Plazmidy obsahují většinu genů nezbytných pro infekci hostitelů a vektorů, tedy klíšťat. Borelie v laboratorní kultuře rychle plazmidy ztrácí, což vede ke ztrátě genů, která nesouvisí s fenotypem pozorovaným v přírodě. (Khatchikian, a další, 2015) Významnými geny borelií jsou PerR (peroxid related geny) a BosR (stress related geny) umožňující překonání oxidativního stresu a dýchání borelií v mikroaerofilním prostředí. (Bartůněk, 2013) V genomu komplexu Bbsl chybí mnoho nezbytných house-keeping genů, což dělá z borelií obligátního parazita, který musí využívat obratlovce i klíšťata jako hostitele pro přežití. (Coipan, a další, 2016) Struktura DNA Bbsl a dalších borelií je totožná s jinými spirochetami. (Roháčová, 2005)

Antigenní analýzou borelií byly zjištěny 2 hlavní antigeny – p41 a p60. P41 je bičíkový antigen; p60 cytoplazmatický, zkříženě reagující antigen. Dalšími hlavními antigeny jsou povrchové proteiny, označující se jako OspA, OspB, OspC. Proti antigenu p41 a OspC je namířena časná imunitní odpověď. OspE a OspF jsou dalšími povrchovými proteiny borelií. (Roháčová, 2005)

Borrelia burgdorferi sensu lato je pleomorfní bakterie schopna změny své morfologie v reakci na podmínky prostředí. Existence pleomorfismu mezi mnoha bakteriálními druhy je známa více než století. Dnes je známo, že některé bakterie mohou spontánně nebo po stimulaci změnit svou morfologii in vivo i in vitro. Objevuje se stále více důkazů, že pleomorfismus může boreliím i jiným bakteriím pomoci vyhnout se imunitnímu systému, nebo snížit citlivost na antibiotika, stejně jako změnit jeho patogenní mechanismy. Mezi pleomorfní formy borelií (obrázek 3) patří normální spirochetální buňka (a), spirocheta s membránovými vezikulami (b), cystické formy (c) a aglomerace spirochet do kolonií podobných biofilmu (d). (Meriläinen, a další, 2015) Mikrovezikuly produkované gram-negativními bakteriemi jsou významné pro transport toxinů, mezibakteriální přenos proteinů a transport bakteriálních produktů do eukaryotických buněk.

Atypické pleomorfní cysty i vezikuly byly zjištěny v mozku chronicky infikovaných pacientů. (Bartůněk, 2013)



Obrázek 3: Pleomorfní formy Borrelia burgdorferi

(a) spirochetální buňka

(b) spirocheta s membránovými vezikulami

(c) cystické formy

(d) aglomerace spirochet do kolonií podobných biofilmu

Zdroj: (Meriläinen, a další, 2015)

Jednotlivé druhy borelií se od sebe liší svou antigenní výbavou i genotypem. Z toho vyplývají odlišné patogenní a imunogenní vlastnosti borelií. (Bartůněk, 2013) Charakteristika borelií z imunologického hlediska je důležitá pro určení patogeneze, sérodiagnostiky a pro v budoucnu možnou profylaxi očkovací látkou. (Roháčová, 2005) Borelie se mohou odlišovat sérotypy v rámci jednoho druhu na podkladě Osp proteinů – u *Borrelia garinii,* nacházející se hlavně na území Evropy, bylo zjištěno pět OspA subtypů. (Bartůněk, 2013)

Borelie jsou antigenně nestálé, vlivem opakované infekce, ale i antibiotik může dojít postupně ke ztrátě plazmidů a tak i Osp antigenů. (Bartůněk, 2013) Především dochází ke ztrátě kratších plazmidů. Borelie také mohou během subkultivace měnit své proteiny. (Roháčová, 2005)

Vývoj a růst borelií v klíštěti (vektoru) probíhá v jeho střevě a k předání infekce je závislý přechod borelií do slinných žláz. Ve střevě klíštěte dochází ke kompetitivnímu boji mezi různými druhy Bbsl. Při dvojité infekci je tento boj tak velký, že dochází

k přežití pouze nejvíce virulentních borelií. Sáním krve klíšťaty probíhá fenotypová přeměna Bbsl, která je závislá na genech pro změnu teploty nebo pH. Udává se, že pouze třetina všech klíštat, které jsou nakaženy boreliemi, je schopna předat infekci a infikovat hostitele. (Bartůněk, 2013)

1.4 Patogeneze

Klíšťata, která obsahují různé druhy borelií, nemusí být nutně zdrojem nákazy. (Roháčová, 2005) Patogenita byla prokázána pouze u *Borrelia afzelii, Borrelia burgdorferi* sensu stricto a *Borrelia garinii.* Další borelie, *Borrelia bavariensis* a *Borrelia spielmanii,* byly izolovány u symptomatických pacientů. (Bartůněk, 2013) Je známo, že *Borrelia afzelii* je spojena s erythema migrans a acrodermatitis chronica atrophicans. (Coipan, a další, 2016) Důležitou roli hraje imunitní systém hostitele jako makroorganismu a antigenní výbava borelií. Důležitá je také schopnost mikroorganismů unikat fagocytóze či pronikat do epitelových a mozkových buněk. (Roháčová, 2005) K mezilidskému přenosu infekce nedochází, proto je člověk tzv. „slepou uličkou" infekce. (Bartůněk, 2013)

U borelií, obzvlášť u *Borrelia afzelii*, byla zjištěna schopnost vytvářet určitou látku (faktor) inhibující složku komplementu – C3b. Také byla sledována aktivace T-lymfocytů, B-lymfocytů a makrofágů spirochetami in vitro. (Bartůněk, 2013) In vivo po infekci spirochety aktivují i NK buňky. (Roháčová, 2005)

Genetická výbava borelií umožňuje komplikovaný vývojový cyklus střídáním hostitelů, studenokrevných i teplokrevných. (Bartůněk, 2013) Zdá se, že genetické složení patogenních spirochet určuje symptomatologii, kterou způsobují. (Coipan, a další, 2016)

Po přisátí klíštěte a proniknutí borelií do kůže dochází k jejich množení. Mohou se množit v místě přisátí a vést ke vzniku erythema migrans, nebo se mohou dostat do mízních uzlin, kde vyvolají imunitní odpověď. Přítomnost spirochet v krvi není dlouhodobou záležitostí. Brzy totiž pronikají do orgánů, ale i přes hematoencefalickou bariéru (HEB) a napadají glie a nervové buňky. (Roháčová, 2005) Pokud jsou borelie přítomny ve tkáních, může dojít k jejich perzistenci měsíce až roky. (Bartůněk, 2013)

Imunitní odpověď a tvorba protilátek začíná několik dní po infekci, ale prokazatelné jsou protilátky až za několik týdnů. (Bartůněk, 2013) Ve druhém až čtvrtém týdnu po infekci se vytváří specifické protilátky IgM, které jsou zaměřeny proti p41 (flagelár-

nímu antigenu). Specifické IgG protilátky se objevují po šesti až osmi týdnech po infekci. (Roháčová, 2005)

Borelie přežívají v tvz. imunologicky privilegovaných místech, jako je oko, kloub, nebo nervová tkáň. Toto přežívání borelií je významné pro vznik orgánového postižení. (Bartůněk, 2013) U určitých forem orgánových postižení jsou nalézány infiltráty různými buňkami. Jsou tedy nalézány znaky zánětlivého postižení orgánů. (Roháčová, 2005)

1.5 Způsob přenosu

Bbsl je mikroorganismus přenášený vektorem – nemůže dojít k přenosu mezi obratlovci bez přítomnosti vektoru, tedy klíštěte. Ve světě je hlavním vektorem patogenních Bbsl klíště rodu *Ixodes*. (Coipan, a další, 2016) Z nich jsou známy pouze čtyři druhy napadající člověka s potenciálem přenosu onemocnění. (Bush, a další, 2018) Klíšťata jsou pravděpodobně vnímavá k určitým druhům borelií podle oblasti, kde se nacházejí, a některé mohou být vázané i na určitý druh klíštěte. (Bartůněk, 2013)

Druhy klíšťat, které jsou uzpůsobeny pro přenos borelií, odpovědných za lymeskou boreliózu u lidí, jsou zobrazeny v tabulce č. 2.

Tabulka 2: Druhy klíšťat rodu Ixodes a jejich výskyt

Druh	**Výskyt**
Ixodes scapularis	jihovýchodní, střední a severní část USA
Ixodes pacificus	západní část USA
Ixodes ricinus *Ixodes persulcatus*	Evropa a Asie

(Bush, a další, 2018)

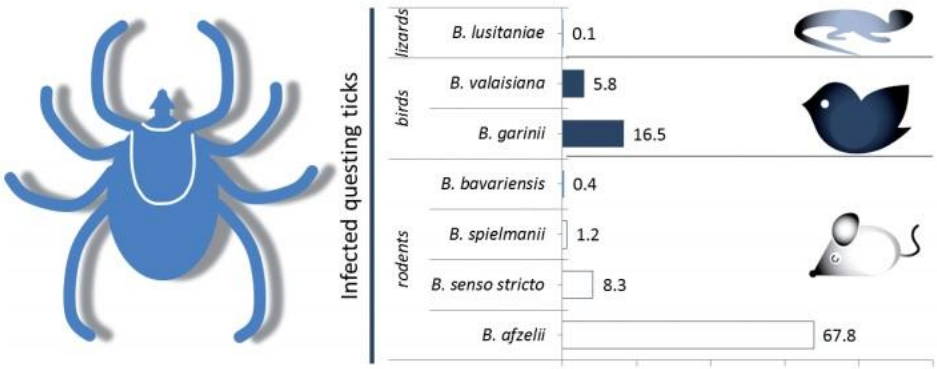
Klíšťata patří do kmene členovců, mají vysokou reprodukční schopnost, široký rozsah hostitelů a schopnost odolat nebo obejít většinu přírodních vlivů. I když jsou klíšťata ovlivněna různými faktory, mají mimořádně dlouhou životnost až několika let. (Földvári, 2016) V Evropě je hlavním vektorem *Ixodes ricinus*, neboli klíště obecné, které je označováno jako tříhostitelské. (Coipan, a další, 2016) To znamená, že každé stádium klíštěte (larva, nymfa, dospělec) saje krev na jiném typu hostitelů. (Bartůněk, 2013) *Ixodes ricinus* bylo poprvé pojmenováno v 18. století, ale první detailní studie proběhly až mezi roky 1930-1950, většinou ve vztahu k chovu ovcí na farmách ve Vel-

ké Británii. Největší pozornost získalo v roce 1983, kdy bylo prokázáno, že se jedná o vektor spirochet zodpovědných za lymeskou boreliózu. (Földvári, 2016)

Ixodes ricinus má tři životní etapy – larvu, nymfu a dospělce. Každé stádium vyžaduje krev obratlovců, aby se dostalo do dalšího vývojového stádia, nebo aby samičky produkovaly vejce. (Hofmeester, a další, 2016) Larvy jsou malé a mají šest nohou stejně jako nymfy, dospělí jedinci mají nohou osm. Malé larvy se živí krví myší, hlodavců, ježků, krys nebo ptáků. Již v tomto stádiu se klíšťata mohou nakazit boreliemi. Nymfy sají krev také hlodavcům. Dospělí jedinci už ale parazitují na větších savcích (psi, jeleni, lidé). Samička potřebuje krev k dozrání vajíček, zatímco sameček umírá ihned po oplození. Životní cyklus klíšťat může probíhat 1-3 roky. (Storl, 2012)

Borelie se vyvíjejí ve střevě klíštěte a přecházejí do slinných žláz, odkud mohou být přeneseny hostiteli. Ve střevě může docházet ke kompetentnímu boji borelií, kdy přežijí pouze druhy borelií, které jsou nejvíce virulentní. K selekci druhů borelií dochází i vlivem komplementu hostitele při sání krve. (Bartůněk, 2013)

Malí savci, ptáci a ještěrky jsou považováni nejen za rezervoáry infekce, ale jsou to i amplifikační hostitelé pro Bbsl. (Coipan, a další, 2016) Na obrázku číslo 4 jsou vyobrazeny nejčastější druhy borelií a jejich rezervoár (zaměřeno pouze na nymfy). Jako většina členů čeledi *Ixodidae* stráví *Ixodes ricinus* 90-99 % života mimo hostitele. (Földvári, 2016)



Obrázek 4: Prevalence infekce různými druhy Borrelia burgdorferi sensu lato u nymf Ixodes ricinus. Prevalence znázorněna na 100 %
Zdroj: (Coipan, a další, 2016)

Nejvýznamnějším faktorem životního prostředí pro klíšťata je relativní vlhkost, která by po delší dobu neměla klesnout pod 80 %. Tento faktor a nutná přítomnost obratlovců jako hostitelů znamená, že *Ixodes ricinus* se vyskytuje hlavně v listnatých lesích s malými savci a jeleny. V oblastech s dostatečnými srážkami se mohou vyskytovat

i v otevřených biotopech jako jsou vřesoviště a louky, kde mohou napadat i hospodářská zvířata. (Földvári, 2016) Klíšťata nemají ráda sluneční světlo, proto čekají ve vlhkém křoví nebo vysoké trávě na svého hostitele. (Storl, 2012)

Dosud nebyl potvrzen možný přenos onemocnění pomocí jiného vektoru (např. hmyzu), než klíštěte. (Bartůněk, 2013)

1.6 Epidemiologická situace

Lymeská borelióza se objevuje v mnoha zemích i kontinentech, kde se mohou vyskytovat různí přenašeči, antigenní výbava borelií, druh borelií a příznaky onemocnění. (Roháčová, 2005) Mezi faktory ovlivňující incidenci LB patří různá genospecies borelií a jejich výskyt v závislosti na geografické poloze, stravovací návyky a množství vektorů. (Halperin, a další, 2018) Objevují se i jiné druhy borelií, které mohou vyvolat onemocnění podobné LB – mezi tyto borelie patří *Borrelia miyamotoi* a *Borrelia lonestari* (USA). (Bartůněk, 2013)

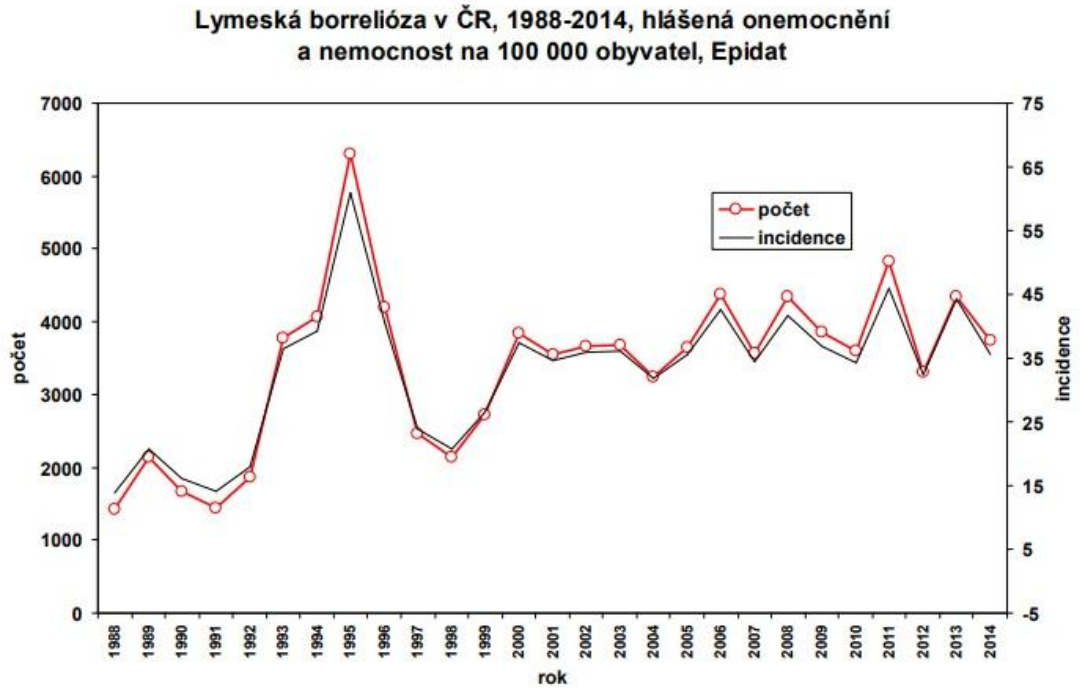
Geografická distribuce vektorů s potenciálním vznikem LB se nachází na území Evropy, Asie a Severní Ameriky. (Halperin, a další, 2018) Podle WHO jsou onemocnění LB v Evropě hlášena z Německa, Švédska, Slovenska, České republiky, Rakouska, Francie a Bulharska. LB se nachází ale i v dalších oblastech, jako například v Rusku, Japonsku, Číně, nebo Velké Británii. (Roháčová, 2005)

Více případů onemocnění je diagnostikováno hlavně v letních měsících, kdy mají lidé tendenci trávit více času v přírodě a nymfy i dospělá klíšťata jsou aktivnější. (Gerstenblith, a další, 2014) Přesto se onemocnění diagnostikuje i během celého roku, vzhledem k odlišným inkubačním dobám u různých forem a stádií onemocnění. Proto se LB neřadí mezi typické sezónní onemocnění. (Roháčová, 2005) Nakaženi mohou být jednotlivci jakéhokoli věku, nejčastěji se ale onemocnění objevuje u osob ve věku 5-9 let a 55-59 let. (Gerstenblith, a další, 2014)

Poprvé se LB v ČR vyskytla v roce 1986 a od té doby se borelióze věnuje značná pozornost. Přibližně v témže roce se objevují výzkumy hlavního vektoru na přítomnost spirochet. (Roháčová, 2005) ČR je ideálním biotopem pro rozšíření vektoru *Ixodes ricinus* v mírném pásu. (Bartůněk, 2013) Klíšťata na území ČR jsou z 2-22 % promořena. (Roháčová, 2005)

Absolutní počty nahlášených případů onemocnění LB v ČR v letech 1988-2014 jsou znázorněny v grafu 1. (Kříž, a další, 2015) Nejvíce nahlášených případů je zaznamenáno v roce 1995, kdy počet dosáhl 6 302 případů onemocnění. (Bartůněk, 2013) Po roce 1998 dochází ke střídání jak minimální, tak maximální hodnoty nemocnosti s mírně vzestupným trendem. (Kříž, a další, 2015)

Graf 1: Počet hlášených případů LB v ČR v letech 1988-2014



Zdroj: (Kříž, a další, 2015)

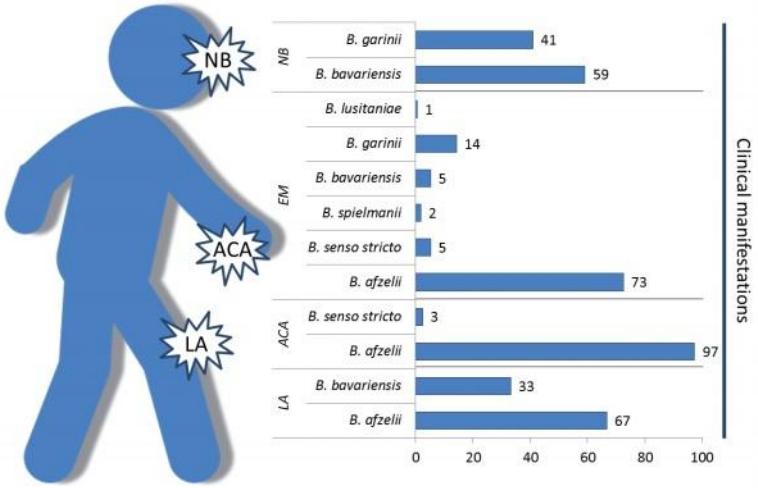
1.7 Klinické formy

Většina infikovaných osob v určitém okamžiku vykazuje jeden nebo více klinických příznaků LB. Klinické příznaky se vyskytují v různých fázích onemocnění. (Bush, a další, 2018) Některé klinické formy mají typické příznaky a není tedy pochyb, že se jedná o LB. Existuje ale i celá řada klinických forem, jejichž příznaky nejsou specifické a je velmi obtížné stanovit, že se jedná o LB. (Roháčová, 2005)

Rané stádium boreliózy může mít příznaky typické pro fibromyalgii a mírnou depresi, zatímco pozdní stádium se může projevit encefalopatií, charakterizovanou poruchami paměti, únavou, prostorovou dezorientací a poruchami nálady. Chronická lymeská borelióza je termín používaný k diagnostice širokého spektra různorodých, lékařsky nevysvětlitelných příznaků. (Makara-Studzinska, a další, 2017)

LB se dělí do tří stádií: časné lokalizované stádium zahrnující erythema migrans; časné diseminované stádium zahrnující neuroboreliózu, lymeskou karditidu, lymeskou artritidu, boreliový lymfocytom a oční formy LB; pozdní diseminované stádium zahrnující pozdní lymeskou artritidu, pozdní neuroboreliózu a acrodermatitis chronica atrophicans. (Prokeš, 2015) (Krbková, a další, 2018)

Klinické formy LB mohou být způsobeny různými druhy borelií, vyskytujícími se na určitém území. (Coipan, a další, 2016) Obrázek 5 zobrazuje nejčastější klinické formy LB a nejčastější druh borelie způsobující toto postižení.



Obrázek 5: Klinické formy LB a druh borelií s nimi spojených

NB = neuroborelióza,
EM = erythema migrans, EM není na obrázku lokalizováno, objevuje se v místě přisátí klíštěte
ACA = acrodermatitis chronica atrophicans,
LA = lymeská artritida

Zdroj: (Coipan, a další, 2016)

1.7.1 Postižení kůže

Kožní formy patří mezi nejvíce charakteristické znaky onemocnění lymeské boreliózy. Nejčastějším postižením kůže je erythema migrans, druhým nejčastějším je boreliový lymfocytom a vzácným postižením kůže je acrodermatitis chronica atrophicans (viz 1.2). (Roháčová, 2005)

1.7.2 Postižení nervového systému

U 15-30 % pacientů s LB dochází k postižení nervového systému, které se nazývá v rámci lymeské boreliózy jako neuroborelióza. (Bartůněk, 2013) K postižení může dojít v centrálním nervovém systému i periferním nervovém systému. Borelie v krvi

prochází hemoencefalickou bariérou. (Roháčová, 2005) Neuroborelióza se objevuje většinou během prvních několika týdnů až měsíců po infekci, vzácně se objevuje později v průběhu LB. (Stanek, a další, 2018) Zasažení nervového systému může mít projevy jako bolest hlavy, únava, bolest kloubů i svalů a může se objevit i encefalopatie. (Bartůněk, 2013)

Mezi akutní formy postižení nervového systému v rámci LB může patřit akutní meningitida a encefalitida, které splývají v jednotku zvanou meningoencefalitida. Tyto formy postižení jsou doprovázeny obrnou hlavových nervů, nejčastěji obrnou lícního nervu (*nervus facialis*). Postižením více hlavových nervů se jedná o neuritis cranialis multiplex. (Roháčová, 2005) Další formou postižení je meningoradikulitida nazývaná jako Garinův-Bujadouxův-Bannwarthův syndrom, kdy dochází k postižení periferního nervového systému s periferními parézami. (Bartůněk, 2013) Polyradikuloneuritida, neboli Guillainův-Barrého syndrom, je obtížně odlišitelná od meningoradikulitidy. (Roháčová, 2005) Vzácně se také mohou objevovat formy neuroboreliózy, jako je například pseudotumor cerebri, encefalomyelitida či rhombencefalitida. (Bartůněk, 2013)

Mezi pozdní formy neuroboreliózy patří pozdní encefalopatie, u které chybí známky tkáňového zánětu a stavy s ní spojené mohou být poruchy paměti i stavy zmatenosti. (Bartůněk, 2013) Chronické formy neuroboreliózy mohou přetrvávat až několik měsíců a projevují se jako diseminovaná encefalitida. Ta může mít obraz demyelizačních lézí, které jsou podobné postižení při roztroušené skleróze. (Roháčová, 2005)

U lymeské boreliózy se mohou během rané fáze objevit duševní poruchy, které jsou považovány za přímé následky zánětlivého stavu nervové tkáně a psychické hledisko u chronické fáze LB. (Makara-Studzinska, a další, 2017)

Zánětlivé procesy v nervové tkáni také hrají klíčovou roli ve vývoji Alzheimerovy choroby (dále AD). Bakterie nebo bakteriální složky (například bakteriální lipopolysacharid – LPS) jsou silnými aktivátory zánětlivých procesů a je známo, že stimulují amyloidogenezi, která je patogenním mechanismem vzniku AD. Chronické bakteriální infekce způsobené spirochetami jsou spojeny s chronickými neuropsychiatrickými poruchami, včetně demence. (Miklossy, a další, 2004)

1.7.3 Postižení muskuloskeletálního systému

Lymeská borelióza nezpůsobuje jen postižení kloubů, ale i postižení svalů, jejich šlach a fascií během kterékoliv fáze onemocnění. K zánětům v postižených místech

dochází na podkladě infekce, ale uplatňuje se i zkřížená autoimunitní reakce. (Roháčová, 2005)

Lymeská artritida postihuje především velké klouby, nejčastěji kolenní, loketní, hlezenní či ramenní kloub. (Roháčová, 2005) Zánět se ale může objevit i v menších kloubech, kde je důkazem spíše revmatologického onemocnění. Klouby bývají zarudlé, oteklé a synoviální tekutina obsahuje polymorfonukleární leukocyty. (Bartůněk, 2013) Chronická lymeská artritida může být špatně ovlivnitelná léky a patologické změny v kloubech trvají i po eliminaci borelií. (Roháčová, 2005)

1.7.4 Postižení srdce

Lymeská karditida je vzácná forma onemocnění, která je častější u mužů než u žen. (Bartůněk, 2013) Nejčastějšími příznaky karditidy jsou poruchy srdečního rytmu, které vznikají na podkladě poruchy tvorby a vedení srdečního vzruchu. (Roháčová, 2005) Vyskytuje se v časné fázi infekce, přibližně 3-5 týdnů po infekci. (Bartůněk, 2013) Mezi nejčastější projevy karditidy patří mírné závratě, synkopa, dyspnoe, palpitace a bolest na hrudi. (Stanek, a další, 2018) Může se také stát, že pacient nemá žádné obtíže a na poruchy srdečního rytmu se přijde náhodou, například při preventivní prohlídce u lékaře. (Roháčová, 2005)

Diagnóza karditidy vyžaduje prokázání boreliové infekce, v praxi je nejspolehlivější přítomnost typických projevů LB jako je erythema migrans nebo neuroborelióza pacienta. Diagnóza by měla být dále doložena absencí nebo vyloučením jiných srdečních abnormalit. (Stanek, a další, 2018)

1.7.5 Postboreliový syndrom

Jedná se o soubor příznaků, které navazují na již prodělanou infekci. (Bartůněk, 2013) Označuje se tak tedy stav po léčbě, kdy nedochází k vymizení obtíží nebo může dojít i ke zhoršení obtíží. (Roháčová, 2005) Léčení jedinci mají i po léčbě nespecifické příznaky jako bolesti hlavy, celkovou únavu, deprese, úzkosti, změny nálad. (Bartůněk, 2013) V praxi se některé případy nedají vyšetřovacími metodami od sebe odlišit. (Roháčová, 2005)

1.8 Prevence

I přes pokusy v roce 1998 s očkovací látkou v USA a přes její vysokou úspěšnost, byla výroba a distribuce této látky v USA zastavena. (Roháčová, 2005) V Evropě

není dosud k dispozici žádná očkovací látka proti lymeské borelióze, proto jedinou formou prevence proti této infekci je ochrana před klíšťaty. (Bartůněk, 2013)

Nejlepším způsobem, jak se vyhnout riziku lymeské boreliózy, je vyhýbat se oblastem zamořeným klíšťaty. Praktickým doporučením je nošení ochranného oděvu a používání přípravků (repelentů) zejména osobami, jejichž profese nebo volný čas probíhá v oblastech zamořených klíšťaty. (Stanek, a další, 2018) Důležitou prevencí je také vyhýbání se křovinám a porostům na okraji listnatých lesů, protože klíšťata se mohou nacházet i ve výšce až 1,5 metru. (Bartůněk, 2013)

2 LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA

2.1 Česká republika

Základem diagnózy lymeské boreliózy bývají hlavně klinické příznaky, nejvíce přítomnost erythema migrans v místě po přisátí klíštěte. Důležité také je, zda si pacient vybavuje přisátí klíštěte, nebo nikoliv. (Křupka, a další, 2014) Borelióza se vyznačuje širokým spektrem příznaků, kdy může dojít k postižení různých orgánů, jako jsou svaly, klouby, kůže, centrální a periferní nervová soustava a další. (Bartůněk, 2013) I přesto však mohou být v některých případech nesignifikantní výsledky laboratorních vyšetření krve, likvoru nebo punktátu. (Roháčová, 2005) U sérologických vyšetření se mohou objevovat kolísavé nálezy a také je nutné si uvědomovat možné výsledky falešně negativní i falešně pozitivní. (Bartůněk, 2013) Lymeské borelióza je sice bakteriální onemocnění, ale nedochází k výraznému zvýšení hladin zánětlivých parametrů. (Roháčová, 2005)

K diagnostice *Borrelia burgorferi* se využívají přímé nebo nepřímé metody. (Křupka, a další, 2014) Metody nepřímého průkazu jsou založeny na principu zjišťování antiboreliových protilátek třídy IgM a IgG a metody přímého průkazu prokazují etiologické agens v krvi, likvoru nebo ve tkáních. (Bartůněk, 2013)

2.1.1 Metody nepřímé

Do těchto metod patří tzv. sérologická diagnostika, u které vyšetřujeme přítomnost antiboreliových specifických protilátek třídy IgM a IgG v krevním séru, likvoru, nebo také v synoviální tekutině a jiných biologických materiálech. (Bartůněk, 2013) Sérologické testy však někdy neodliší probíhající infekci od již proběhlé infekce. (Prokeš, 2015) V nepřímé diagnostice se využívá hlavně imunoenzymatických testů (ELISA), nepřímé imunofluorescence a Western Blotu. (Bartůněk, 2013) Sérodiagnostika LB je v současné době založena na dvouúrovňovém postupu testování, což znamená, že pozitivní výsledky a výsledky blížící se pozitivitě v metodě ELISA jsou testovány navíc imunoblotovými testy. (Stanek, a další, 2018)

Lymeská borelióza a syfilis jsou infekční onemocnění způsobené bakteriemi patřícími mezi spirochety. Vzhledem k jejich fylogenetické podobnosti existuje určitý potenciál pro zkříženou reaktivitu (tzv. cross-reaktivitu) sérologického testu. Pacienti se

syfilitickou infekcí mohou mít vysokou pravděpodobnost falešně pozitivního screeningu na lymeskou boreliózu. (Patriquin, a další, 2016)

Falešně negativní výsledek sérologického vyšetření nevylučuje onemocnění LB. V časné fázi onemocnění je většina výsledků negativních z důvodu pozdější tvorby protilátek, nebo může vzorek obsahovat protilátky v množství, které není detekovatelné. Naopak falešně pozitivní výsledky sérologického vyšetření se mohou objevit při zkřížené reaktivitě. K falešně pozitivním výsledkům však může dojít i v přítomnosti autoimunitních chorob (systémový lupus, revmatoidní artritida), nebo u onemocnění jater (hepatitida). (Zajkowska, 2014)

2.1.1.1 ELISA

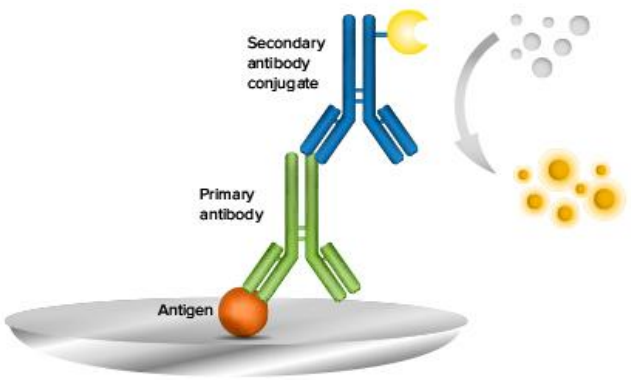
ELISA, neboli Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay je imunoenzymový test, pomocí kterého se zjišťují specifické protilátky typu IgM i IgG. (Roháčová, 2005) Jedná se o primární test pro hodnocení obvykle krevních vzorků, někdy je používán jako samostatný test, nebo jako první etapa dvouúrovňového testu. (Cook, a další, 2016) Vyšetřovat se může i z likvoru, nebo synoviální tekutiny. (Roháčová, 2005) ELISA test může být jak kvalitativní, tak semikvantitativní i kvantitativní. (Zajkowska, 2014)

V roce 1971 došlo ke zvratu v laboratorní diagnostice - byla objevena možnost navázání enzymu na molekulu specifické protilátky. Pokusy byly prováděny pomocí enzymů křenové peroxidázy a alkalické fosfatázy. Reakce enzymu s protilátkou jsou ovlivněny důležitými faktory, jako například velikostí molekuly enzymu či možností navázat se na specifické místo na molekule protilátky. Jedná se o tzv. EIA metodu (enzymová imunoanalýza), kdy ELISA je speciálním druhem této imunoanalýzy. (Bartůňková, a další, 2011)

Existuje řada provedení základní technologie používané ve výzkumných a komerčních testovacích soupravách. Jsou založeny na použití nativních antigenů získaných z buněčných extraktů, rekombinantních antigenů (například OspA, OspC, OspE, OspF) nebo syntetických peptidů. (Cook, a další, 2016) Využívají se antigeny různých kmenů, druhů a sérotypů Bbsl. (Roháčová, 2005) Problematičností rekombinantních antigenů je malá specifita pro různé druhy borelií, ale i protilátky proti těmto antigenům – objevují se pozdě, nebo se vůbec nevytvoří. (Bartůněk, 2013) Testy jsou kvantitativní a udávají koncentraci protilátek ve vzorku. (Cook, a další, 2016)

V případě nekompetitivního testu ELISA je imobilizovaný antigen navázán na stěnu mikrotitrační destičky o 96 jamkách. Po přidání pacientského vzorku se celý sys-

tém inkubuje. Po inkubaci se nenavázané látky odmyjí a přidá se tzv. sekundární protilátka, která je značena enzymem (vzniká tzv. konjugát). Po následné inkubaci a promytí se do reakce přidává substrát, který je štěpen enzymem přítomným na sekundární protilátce (obrázek 6). (Bartůňková, a další, 2011) Reakce mezi substrátem a enzymem proběhne během 30–60 minut. Jako enzymy mohou být použity glukózooxidáza, β-galaktosidáza, peroxidáza nebo alkalická fosfatáza. (Suleyman, 2015) Vzniká barevný komplex v jamce mikrotitrační destičky a barevná reakce se měří fotometricky při vlnové délce 400–600 nm. Koncentrace produktu je přímo úměrná koncentraci protilátek ve vzorku pacienta. (Bartůňková, a další, 2011)



Obrázek 6: Princip ELISA metody v mikrotitrační destičce
Zdroj: (MolecularDevices)

Základním přístrojem pro ELISA analýzu je ELISA-reader – ve své podstatě se jedná o modifikovaný spektrofotometr, umožňující měření barevného komplexu vzniklého v mikrotitrační destičce, při různých vlnových délkách. (Bartůňková, a další, 2011) Ihned po přidání „stop“ roztoku musí být výsledky na ELISA-readeru odečteny do 10 minut při 450 nm. (Suleyman, 2015)

Přestože je ELISA vysoce senzitivní metoda, mohou se objevit výsledky falešně negativní i falešně pozitivní. Tyto výsledky mohou být, stejně jako ostatní metody, ovlivněny laboratorními chybami, ale také může dojít ke zkřížené reaktivitě s jinými spirochetami. (Roháčová, 2005) U necelých 10 % zdravých jedinců v populaci, bez jakýchkoli příznaků, byly zjištěny pozitivní specifické antiboreliové protilátky. (Bartůněk, 2013) Falešně negativní výsledky se mohou objevit v počátku infekce, kdy protilátky ještě nejsou detekovatelné sérologickými metodami. (Roháčová, 2005)

ELISA metoda je výhodná z důvodu její dostatečné specifičnosti, citlivosti a reprodukovatelnosti. (Bartůňková, a další, 2011) Výhodou je i spotřeba malého množství vzorků a mikrotitračních destiček. (Zajkowska, 2014)

2.1.1.2 Western Blot

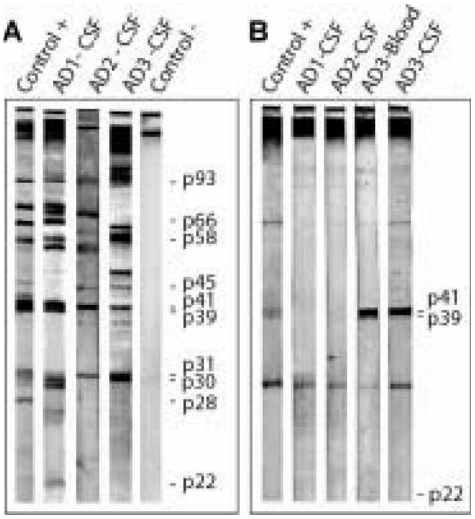
Druhý test v diagnostice LB, používaný pro potvrzení diagnózy, je tzv. Western Blot (dále jen WB). Jedná se o metodu, která byla poprvé popsána v roce 1979 a v současné době je používána k identifikaci specifických proteinů (antigenů) v pozitivních směsích vzorků. Kombinuje elektroforetickou separaci s imunoanalýzou. (Jin, a další, 2015) Soupravy WB se používají jako samostatné jednotky, nebo jako druhý stupeň dvoustupňového protokolu (prvním stupněm může být například ELISA metoda). (Cook, a další, 2016)

V medicíně se Western Blot využívá jako diagnostický nástroj pro několik onemocnění, jako je lymeská borelióza. (Jin, a další, 2015) Pro interpretaci IgM testu je vyžadováno, aby alespoň dvě nebo více kritických pásem bylo pozitivních. Pro interpretaci IgG testu někteří výrobci uvádějí, že pět nebo i více z deseti kritických pásem musí být kladných, aby byl test považován za pozitivní. (Cook, a další, 2016)

Proteiny jsou děleny podle velikosti za použití elektroforézy na polyakrylamidovém gelu s dodecylsulfátem sodným (SDS-PAGE). Poté jsou tyto oddělené proteiny přeneseny na membránu pro blotting. Membrána je poté upravena blokovacím roztokem a postupně dochází k detekci primární a sekundární antiboreliovou protilátkou specifickou pro daný antigen. (Jin, a další, 2015) Po inkubaci za použití substrátu, který se po reakci zbarví, může být komplex antigen-protilátka vizualizován. Pásy membrány mohou být porovnávány se standardem poskytnutým výrobcem a mohou být posouzeny jako pozitivní, pokud je hustota větší, než v referenčním pásmu. (Cook, a další, 2016) Dalšími modifikacemi WB může být WB s kapilární elektroforézou, nebo s využitím tzv. mikrofluidních čipů. (Jin, a další, 2015)

Jedná se o spolehlivou a široce používanou metodu. Výhodou této metody je možnost detekovat protilátky proti jednotlivým specifickým antigenům v pacientském vzorku. (Bartůňková, a další, 2011)

Problémem testů je použití různých Bbsl kmenů, které je složitější v Evropě než v USA, kde se vyskytuje na rozdíl od Evropy pouze jeden druh borelie, tedy pouze *Borrelia burgdorferi* sensu stricto. (Roháčová, 2005)



Obrázek 7: Vyšetření Western Blot u pacientů s LB

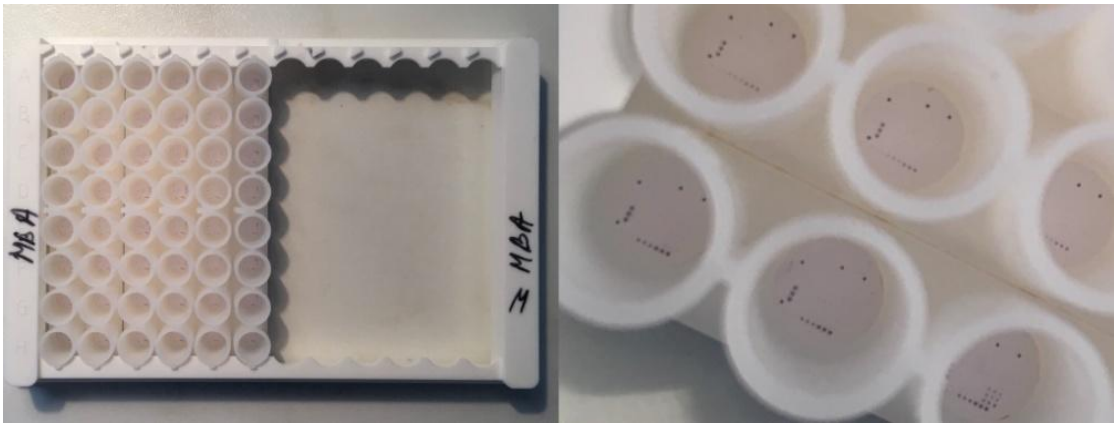
A: Pozitivní kontrola, AD1 + AD2 + AD3 (vyšetření likvoru), negativní kontrola

B: Pozitivní kontrola, AD1 + AD2 (vyšetření likvoru), AD3 (vyšetření krve i likvoru)

Zdroj: (Miklossy, a další, 2004)

2.1.1.3 Microblot-Array (MBA)

Microblot-Array metoda je podobná Western Blotové metodě, ale narozdíl od WB probíhá ve formátu mikrotitrační destičky. Jamku této destičky tvoří nitrocelulózová membrána, na kterou jsou naneseny specifické rekombinantní antigeny ve formě spotů v tripletech (viz obrázek 8). (TestLine, 2019)



Obrázek 8: Mikrotitrační destička pro Microblot-Array
Zdroj: vlastní

Jako rekombinantní antigeny jsou použity k testu povrchové antigeny borelií (Osp proteiny, VlsE povrchový lipoprotein), bičíkové antigeny borelií (např. p41), ne-

utrofily aktivující protein A (NapA) a aspartátový zbytek (Asp52). Celkově je použito 22 antigenů. (TestLine, 2019)

Výhodou této metody je větší specifita pro vyšetření borelií díky paralelnímu vyšetření více markerů současně. Jelikož jsou antigeny na membráně spotovány v tripletech, je menší pravděpodobnost chyby provedení testu. Dalšími výhodami je také nízká spotřeba vzorku a vysoká citlivost metody. (TestLine, 2019)

Soupravy jsou zpracovávány stejně jako při provádění ostatních imunoenzymatických metod s využitím přístrojové techniky ELISA. Vyhodnocení výsledků umožňuje speciální Microblot-Array Software. (TestLine, 2019)

2.1.1.4 Nepřímá imunofluorescence (IFA)

Imunofluorescence je metoda, která je založena na principu vizualizace reakce antigen-protilátka. Nepřímá imunofluorescence je dvoustupňová reakce, kdy v první fázi dochází k navázání specifické antiboreliové protilátky ze séra pacienta k struktuře přítomné na podložním sklíčku a ve druhé fázi dochází k detekci protilátky pomocí sekundární protilátky, značené vhodným fluorochromem. Sekundární protilátkou je nejčastěji protilátka, která je zaměřena přímo proti Fc části lidského imunoglobulinu. (Bartůňková, a další, 2011)

Jako antigen se dříve používala *Borrelia recurrentis*. V současnosti se využívá jako antigen *Borrelia burgdorferi* sensu lato. (Roháčová, 2005) Jako fluorochrom se obvykle používá fluoresceinthiokyanát (tzv. FITC). Tato fluorescenční látka při vlnové délce 490 nm emituje zelené záření o vlnové délce 517 nm. Jako další fluorochrom se může využívat i tetramethylrhodamin emitující červené světlo. (Bartůňková, a další, 2011)

Výsledkem této metody je pouze kvalitativní zhodnocení, zda preparát svítí. V současnosti je většina substrátů pro imunofluorescenci dodávána komerčními výrobci ve formě souprav. (Bartůňková, a další, 2011)

2.1.2 Metody přímé

Přímé metody slouží k průkazu Bbsl jako antigenu v organismu pacienta. Mezi metody přímého průkazu patří metody mikroskopické, histologické, kultivační, metody molekulární biologie (PCR) a sekvenace. (Roháčová, 2005)

2.1.2.1 Mikroskopický průkaz

Z mikroskopického průkazu se mohou používat metody, jako je elektronová mikroskopie, imunofluorescence nebo barvení metodou Warthin-Starry. Mikroskopie borelií je ale obtížná. Důvodem je nízká hustota borelií v některých tkáních a jejich špatná vizualizace. (Křupka, a další, 2014)

K rychlému průkazu pohyblivých borelií v klíštěti slouží tzv. světelná mikroskopie v zástinu. Užívá se k hodnocení infikovanosti klíšťat v endemických oblastech v různých stádiích klíšťat. Pozitivní vzorky jsou ověřeny pomocí PCR. (Bartůněk, 2013)

K diagnostice LB se využívá elektronová mikroskopie, která umožňuje detailní pozorování borelií. Sleduje se počet bičíků, velikost buňky, přítomnost cystických forem a blebs obsahujících plazmidovou DNA. Použít se může i tzv. imunosorbentní elektronová mikroskopie (ISEM), při které dochází k reakci protilátky s antigenem při nízkých koncentracích borelií ve vzorcích. (Roháčová, 2005)

2.1.2.2 Kultivace

Kultivace borelií je velice obtížnou metodou identifikace. (Roháčová, 2005) Pro kultivaci jsou nutné speciální, vysoce obohacené půdy, jako například Barbour-Stoener-Kellyho médium (BSK) nebo Modified-Kelly-Pettenkoferovo médium (MKP). (Margos, a další, 2015) Tato média se liší koncentrací některých složek, ale všechny používají jako základní látku 6 % králičí nebo koňské sérum. (Bartůněk, 2013) I když byly různé druhy borelií kultivovány v BSK a jiných modifikovaných kultivačních mediích, některé druhy nerostly uspokojivě. (Margos, a další, 2015) Kultivace borelií je také závislá na druhu kultivovaného vzorku. (Roháčová, 2005) Borelie jsou lépe kultivovány (tedy rychleji rostou) z tkáňových struktur (kůže, svaly) než z tělesných tekutin (krev, likvor). (Bartůněk, 2013) Odběr vzorku pacienta na kultivaci borelií musí být proveden za vysoce sterilních podmínek. (Roháčová, 2005)

Statická kultivace se provádí v počátku za 1–14 dní doby růstu borelií a dochází ke změně prostředí. Kontinuální kultivace následuje po 14 dnech v podmínkách s novou půdou se čtyřdenními intervaly. (Bartůněk, 2013) Důležité je zajištění vhodné atmosféry pro růst borelií, tedy zvýšení CO_2, protože se jedná o mikroaerofilní bakterie. Zvýšení CO_2 je zajištěno v tzv. kultivačních nádobách. (Margos, a další, 2015)

Kultivace a obecně i růst borelií je ovlivněn pH prostředí (7,5), teplotou (34-35 °C), oxidoredukčním potenciálem, slunečním zářením, ultrafialovým zářením i os-

motickým tlakem. (Bartůněk, 2013) V ČR není kultivace borelií běžně dostupná. (Prokeš, 2015)

Kultivační průkaz je důležitým diagnostickým krokem pro prokázání živých borelií v organismu pacienta, k potvrzení diagnózy LB a zhodnocení proběhlé infekce nebo perzistence borelií v různých orgánech. (Bartůněk, 2013)

2.1.2.3 Histologický průkaz

Ojediněle se v diagnostice využívá histologického průkazu s použitím mikroskopie. (Roháčová, 2005) Průkaz je možný v nátěrech po nabarvení toluidinovou modří, Giemsou či stříbrem. Tyto metody se používají v řezech tkáně zalitých do pryskyřic či parafínu. Specifita průkazu borelií je zvýšena přidáním monoklonální protilátky proti povrchovému antigenu. (Bartůněk, 2013)

Sledovány mohou být různé struktury, jako například povrchové nebo hluboké perivaskulární polymorfní infiltráty neutrofilů, plazmatických buněk, lymfocytů, eosinofilů a mastocytů. Borelie mohou být identifikovány pomocí barvení stříbrem nebo imunocytochemie jako dlouhé spirální bakterie s relativně pravidelnými záhyby. V krvi se borelie nevyskytují v takových koncentracích, aby je bylo možné pozorovat v periferním nátěru krve. (Soni, a další, 2016)

2.1.2.4 DNA-hybridizace

Tato metoda je založena na principu detekce nukleových kyselin (DNA). (Roháčová, 2005) Probíhá tak, že klonovaná DNA borelie (nebo obecně jakéhokoliv mikroba), která je označena některým radioaktivním izotopem, se váže na známou sekvenci borelie fixovanou na membránový nosič (například čip). (Bartůněk, 2013) Metoda byla modifikována na průkaz RNA, protože se ve větším množství objevuje více RNA borelií než DNA. (Roháčová, 2005)

2.1.2.5 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

PCR je technika založena na přímé detekci DNA (například mikroba) cyklickou amplifikací (zmnožením) malých množství fragmentů DNA ze vzorku pacienta a jeho porovnání se známou sekvencí DNA. (Cook, a další, 2016) Metodou PCR lze vyšetřit velký rozsah biologických materiálů. Vhodným materiálem pro toto vyšetření je synoviální tekutina, likvor, dále je možné použití i plodové vody. Z krve lze také vyšetřovat

metodou PCR, ale záchyt borelií není tak běžný, jelikož borelie pronikají do různých tkání a orgánů. (Roháčová, 2005)

Nejprve musí dojít k rozštěpení dvouřetězce DNA (denaturaci) při 95 °C na dva jednoduché řetězce, kdy na každý řetězec se při teplotě 50–60 °C naváží na okrajové sekvence primery. Dochází k syntéze komplementárního vlákna v přítomnosti volných nukleotidů ve vzorku DNA polymerázou při teplotě 72 °C (renaturace). Takto vzniklé dvouřetězce jsou dále denaturovány při teplotě 95 °C a dochází tak k cyklickému namnožení této sekvence DNA, dokud se nedosáhne požadovaného množství. (Bartůňková, a další, 2011) Následně dochází k dehydrataci těchto nově vzniklých dvouřetězců DNA, které jsou v dostatečném množství, pro další metody jako je průkaz hybridizací, sekvenací nebo gelovou elektroforézou. (Bartůněk, 2013) Při gelové elektroforéze pohybem těchto molekul v přítomnosti elektrického pole dochází k separaci podle jejich molekulové hmotnosti. (Bartůňková, a další, 2011)

Pro tento proces je nutná přítomnost určitých látek nezbytných pro proběhnutí této reakce. Těmito důležitými látkami jsou: vzorek DNA obsahující zkoumanou sekvenci, synteticky vyrobené primery, směs nukleotidů, DNA polymeráza, PCR pufr a hořečnaté ionty. (Bartůňková, a další, 2011) OspA a VlsE jsou vhodnými primery k průkazu borelií v různých tkáních. (Bartůněk, 2013)

Tato metoda má několik nevýhod. Hlavní nevýhodou je snadná kontaminace vzorků, dalšími nevýhodami je vysoká cena vyšetření, nebo rozdílná citlivost plazmidové a genomové DNA. (Roháčová, 2005) Diagnostika pomocí PCR v Evropě je obtížnější kvůli odlišným sekvencím DNA různých druhů borelií. (Bartůněk, 2013)

Existuje celá řada modifikací této metody včetně kvantitativní PCR a PCR v reálném čase (Rt-PCR). (Cook, a další, 2016) Rt-PCR je metoda založena na principu použití fluorescenčně označených sond s přítomností detekční soustavy schopné měřit intenzitu vzniklé fluorescence. Výsledkem je přímá úměra intenzity fluorescence a produktu PCR a pomocí sestavené standardní křivky se může kvantifikovat přesné množství cílové DNA v pacientském vzorku. (Bartůňková, a další, 2011) Výhodná je rychlost Rt-PCR pohybující se kolem 30 cyklů za 40 minut, snížení možnosti kontaminace opakovanou reakcí ve stejné kapiláře a optické značení více barvami. (Bartůněk, 2013)

Před použitím Rt-PCR nebylo možné rozlišit, zda borelie ve vzorku pacienta jsou živé, nebo mrtvé. Až s použitím PCR v reálném čase s určitou barvou prostupující nukleové kyseliny bylo zjištěno, že lze rozlišit některé mrtvé buňky od živých. Bakterie, na které byl tento pokus prováděn, se nazývá *Legionella pneumophila.* (Bartůněk, 2013)

K dispozici je několik technik PCR lišících se z hlediska citlivosti, specifity a detekčního spektra. V současnosti je komerčně dostupných několik PCR souprav. Přímou detekci pomocí PCR by měly provádět pouze akreditované a specializované laboratoře. (Eldin, a další, 2019)

Metoda PCR je spolu s metodou WB vhodná pro vyšetřování tkání i synoviální tekutiny a jsou zároveň doporučenými metodami pro diagnostiku meningoencefalitidy a lymeské artritidy. (Bartůněk, 2013) Negativní výsledek testu nevylučuje diagnózu LB. (Eldin, a další, 2019) PCR je doporučena pouze ve vybraných situacích a měla by se používat v kombinaci se sérologií pro podporu diagnózy. (Zajkowska, 2014)

2.2 Německo

Lymeská borelióza a další infekční onemocnění spojené s klíšťaty se objevují na území Evropy, včetně České republiky i Německa. Na základě rozšíření onemocnění vznikla v Německu v roce 2006 soukromá specializovaná klinika, zabývající se onemocněními přenášenými klíšťaty, hlavně lymeskou boreliózou. BCA klinika se nachází v německém městě Augsburg a zaměřuje se jak na komplexní diagnostiku, tak i na speciální léčbu lymeské boreliózy i souvisejících infekčních onemocnění. (BCA-clinic, 2019)

BCA klinika je rozdělena na dvě hlavní části: *BCA-laboratoř* důležitá pro diagnostiku patogena a stanovení správné diagnózy; *BCA-klinika* zaměřující se na léčbu a rehabilitaci pacientů. Obě části kliniky jsou pod vedením specializovaných odborných lékařů. (BCA-clinic, 2019)

Diagnostika LB probíhá na klinice podobně jako v České republice (ELISA, imunoblot, PCR), ale objevují se i metody, které se v ČR rutinně neprovádí. Těmito metodami je například EliSpot, LymeSpot a průtoková cytometrie. Jelikož se jedná o soukromou kliniku, vše si pacient hradí sám a celkové vyšetření na lymeskou boreliózu zahrnující vyšetření LymeSpot, EliSpot, průtokovou cytometrii, ELISA test a Imunoblot vyjde pacienta na 718,18 Euro (cca 18 600 Kč). Vyšetřit se může i stav imunitního systému, za který si laboratoř účtuje 315,66 Euro (cca 8 200 Kč). (BCA-lab, 2019)

2.2.1 ELISA

Tato metoda funguje na stejném principu, jako je popsáno v kapitole 2.1.1. ELISA je tedy imunoenzymový test, pomocí kterého se zjišťují specifické antiboreliové protilátky typu IgM a IgG. (Roháčová, 2005)

Jelikož se jedná o soukromou laboratoř, BCA-laboratoř si účtuje poplatek 5,30 Euro (cca 140 Kč) za testovací sadu pro ELISA vyšetření jakéhokoliv vzorku. Vyšetření antiboreliových protilátek IgM a IgG metodou ELISA vyjde pacienta na 69 Euro (cca 1 800 Kč) a výsledek vyšetření laboratoř vydává do 2 dnů. BCA-laboratoř dále vyšetřuje metodou ELISA i protilátky proti dalším možným patogenům, jako je: *Anaplasma, Bartonella, Babesia, Chlamydia pneumoniae + trachomatis, Mycoplasmata, Yersinie, Ricketsie, EBV, HSV, CMV* a *Toxoplasma.* (BCA-lab, 2019)

2.2.2 Imunoblot

Imunoblot poskytuje vysoce specifické informace o přítomnosti protilátkové odpovědi proti testovanému patogenu (borelie). Detekce IgM protilátek nejčastěji udává čerstvou infekci LB, mohou však přetrvávat po dlouhou dobu u chronických forem onemocnění. IgG protilátky se vyskytují 1–2 měsíce po infekci a jsou zvláště přítomny u chronických forem LB. (BCA-lab, 2019)

Blotový proužek obsahuje jednotlivé separované antigeny borelií, na které se naváží protilátky IgM či IgG z krve pacienta a místo reakce antigen-protilátka je na blotovém proužku zbarveno. Podle délky infekce v těle pacienta se liší počet detekovaných pásů. Imunoblot také zahrnuje povrchový marker tzv. VlsE, který vykazuje nejvyšší citlivost pro detekci borelií. (BCA-lab, 2019)

Výsledky vyšetření je laboratoř schopna vydat do 2–3 dnů. Stejně jako u ELISA testu si laboratoř účtuje 5,30 Euro (cca 140 Kč) za testovací sadu pro Imunoblot a celková cena vyšetření je 139,88 Euro (cca 3 700 Kč). (BCA-lab, 2019)

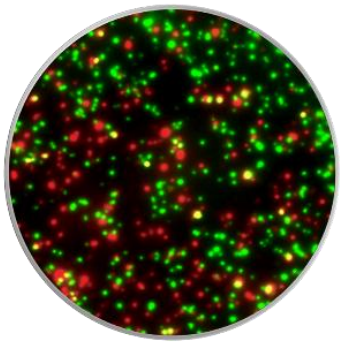
2.2.3 EliSpot a LymeSpot

EliSpot test, neboli Enzyme-Linked Immunosorbent Spot Assay, je metoda, při níž se měří počet aktivovaných T lymfocytů, které produkují cytokiny (interferon γ) proti příslušnému antigenu. Jedná se o buněčný test pro stanovení infekce způsobené boreliemi a různými ko-patogeny. EliSpot v kombinaci s průtokovou cytometrií (stanovení CD3- a CD57+ buněk) poskytuje důležité informace o probíhající nebo proběhlé infekci. (BCA-lab, 2019) V praxi se však objevují u tohoto testu falešně negativní výsledky. To je způsobeno tím, že LB nezahrnuje pouze imunitní odpověď, ale i reakci na zánět. Klinické projevy (bolest kloubů, svalů) jsou způsobeny zánětem, nikoliv infekcí jako takovou. Konečným výsledkem může být špatná diagnóza, která může vést k rokům fyzického i duševního trápení pacientů. (BCA-clinic, 2019)

LymeSpot, neboli nový EliSpot test, poskytuje informace o aktivitě infekce a možném zánětu. Také tento test může rozlišit, zda je přítomna aktivní (specifické efektorové buňky) nebo latentní (specifické paměťové buňky) infekce. To umožňuje vyhodnotit současně zánětlivé, infekční a autoimunitní procesy. (BCA-lab, 2019)

EliSpot je založen výhradně jen na produkovaném interferonu γ, zatímco LymeSpot je založen i na cytokinu IL-2. Tyto testy pracují na principu semaforu (obrázek 8) – výsledkem aktivní infekce je zelené zbarvení v testu. Červené označení v testu udává předpokládané latentní onemocnění změnou vztahu mezi Interferonem γ a IL-2. (BCA-lab, 2019)

Stejně jako u ELISA testu a Imunoblotu si laboratoř účtuje 5,30 Euro (cca 140 Kč) za testovací soupravy. Vyšetření borelií testem EliSpot vyjde pacienta na 184,49 Euro (cca 4 800 Kč) a vyšetření borelií testem LymeSpot vyjde pacienta na 217,86 Euro (cca 5 700 Kč). Výsledky jsou laboratoří vydány do 3 dnů. (BCA-lab, 2019)



Obrázek 9: LymeSpot test
Zelená barva – efektorové buňky
Červená barva – paměťové buňky
Zdroj: (BCA-clinic, 2019)

2.2.4 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie je metoda, která slouží k analýze buněk v buněčné suspenzi, která se označí monoklonální protilátkou s navázaným fluorochromem. Suspenze buněk je pomocí hydrodynamické fokusace usměrněna tak, aby jednotlivé buňky putovaly za sebou, nikoliv vedle sebe. Každá buňka je poté jednotlivě proměřena laserovým paprskem a podle odrazu a rozptylu světla se buňky rozdělí na základě požadovaných parametrů. (Bartůňková, a další, 2011)

U LB se měří buňky imunitního systému CD57+ (NK buňky, neboli přirození zabíječi), které se měří za použití průtokové cytometrie. CD57+ buňky mohou korelovat s patogenní aktivitou a indikovat oslabení imunitního systému. (BCA-lab, 2019)

Laboratoř si stejně jako u každého testu účtuje 5,30 Euro (cca 140 Kč) za testovací soupravy. Cena vyšetření průtokovou cytometrií je 106,68 Euro (cca 2 700 Kč). Pacient může požádat i o vyšetření stavu imunitního systému průtokovou cytometrií, za které si laboratoř účtuje 315,66 Euro (cca 8 200 Kč). (BCA-lab, 2019)

2.2.5 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

PCR je molekulárně biologická metoda pro přímou detekci patogenních nukleových kyselin v pacientském vzorku. Pozitivní výsledek poskytuje přímý průkaz přítomnosti infekce. (BCA-lab, 2019) Princip a průběh PCR metody je popsán v kapitole 2.1.2.5.

Pro detekci borelií byl vyvinut vlastní PCR testovací systém, založený na několika následných PCR reakcích a detekující s vysokou citlivostí. BCA-laboratoř je jednou z mála laboratoří, která dokáže detekovat bakterii *Borrelia miyamotoi*. (BCA-lab, 2019)

3 LÉČBA

3.1 Česká republika

Jelikož se jedná o bakteriální infekční onemocnění, léčba LB probíhá pomocí podávání antibiotik a měla by být zahájena při klinických projevech LB. (Krbková, a další, 2018) Běžná léčba antibiotiky by neměla trvat déle než 3 týdny a prodlužuje se pouze v případě prodlevy záhájení terapie. (Roháčová, 2005) Dlouhodobější užívání antibiotik u perzistující formy LB je neúčinné. (Křupka, a další, 2014)

Zvolené antibiotikum k léčbě by mělo být dobře tolerované tělem pacienta, bezpečné a schopné udržovat svou léčebnou hladinu v celém průběhu léčby. Pokud jsou antibiotika podávána pro léčbu neuroboreliózy, je důležité si uvědomit, že antibiotika musí proniknout přes hematoencefalickou bariéru. (Krbková, a další, 2018)

U chronických forem onemocnění je úspěšnost léčby antibiotiky poměrně nižší. (Krbková, a další, 2018) Proto někteří jedinci přes přetrvávající obtíže vyhledávají kliniky zabývající se tímto onemocněním. Jak bylo zmíněno v kapitole 2.2, mohou se pacienti nechat vyšetřit a léčit na BCA klinice v Německu (kapitola 3.2). Od září roku 2015 se BCA klinika nachází i v Luhačovicích v České republice. BCA klinika v Luhačovicích je sesterskou klinikou BCA kliniky v Augsburgu. Třítýdenní léčba pacienta v Luhačovicích se pohybuje kolem 100 000 Kč (dvakrát menší částka, než by pacient zaplatil na klinice v Německu), což si pacient musí hradit sám. (Synek, 2014)

Antibiotická léčba je indikována podle rozdělení LB dle doporučení infektologické společnosti do tří stadií: časné lokalizované stádium, časné diseminované stádium a pozdní diseminované stádium. (Prokeš, 2015)

3.1.1 Léčba v časně lokalizovaném stádiu

K projevům časně lokalizovaného stádia LB patří erythema migrans. (Prokeš, 2015) K léčbě v časné fázi onemocnění dospělých se používá jako lék první volby antibiotikum doxycyklin (denně 200 mg), který je ale kontraindikován pro těhotné ženy a děti do 8 let. (Křupka, a další, 2014) K léčbě dětí se používá antibiotikum amoxicilin, který je dávkován podle váhy dítěte (50 mg/kg). (Roháčová, 2005)

3.1.2 Léčba v časně diseminovaném stádiu

K projevům časně diseminovaného stádia LB patří časná neuroborelióza, lymeská karditida, lymeská artritida, boreliový lymfocytom a oční formy LB. (Prokeš, 2015) (Krbková, a další, 2018) Antibiotická léčba neuroboreliózy je indikována po pozitivním nálezu antiboreliových protilátek v likvoru a měla by trvat přibližně 21 dní. Antibiotikem vhodným pro léčbu neuroboreliózy u dospělého pacienta je krystalický penicilin, u dětí cefotaxim. Tato antibiotika jsou podávána intravenózně a cefotaxim se může podávat i intramuskulárně. (Roháčová, 2005)

Antibiotická léčba lymeské karditidy je indikována po pozitivním nálezu antiboreliových protilátek v séru, eventuelně biopsii a měla by trvat stejně jako u neuroboreliózy 21 dní. (Roháčová, 2005)

Antibiotická léčba u ostatních forem časně diseminovaného stádia (oční, kožní forma) je indikována po pozitivním nálezu antiboreliových protilátek v séru a měla by trvat přibližně 21 dní. U těchto forem by měla být provedena další vyšetření – například u oční formy by mělo být provedeno oftalmologické vyšetření a u boreliového lymfocytomu provedení biopsie kvůli vyloučení neoplastických změn. Používají se antibiotika jako u časně lokalizovaného stádia (doxycyklin, amoxicilin). (Roháčová, 2005)

3.1.3 Léčba v pozdním diseminovaném stádiu

K projevům pozdního diseminovaného stádia patří pozdní lymeská artritida, pozdní neuroborelióza a acrodermatitis chronica atrophicans. (Prokeš, 2015) U tohoto stádia LB je největším rizikem selhání antibiotické léčby. Může docházet k přetrvávání obtíží i přes léčbu, nebo se po vyléčení mohou znovu objevit obtíže. Opakovaná léčba je vhodná pouze při recidivě onemocnění či špatném efektu léčby (například špatně zvoleném podání léku)

Antibiotická léčba u všech těchto tří forem tohoto stádia je indikována po pozitivním nálezu antiboreliových protilátek v séru (akrodermatitida), likvoru (neuroborelióza) či synoviální tekutině (artritida) a měla by trvat 28 dní. (Roháčová, 2005)

3.2 Německo

Na BCA klinice v Německu sdílejí názor, že chronická forma LB může být dlouhodobou léčbou úspěšně vyléčena. V ČR naopak specialisté na LB mají opačný názor – léčba LB delší než 3 týdny je neúčinná.

Každý pacient na klinice obdrží individuální léčebný plán podle jeho výsledků vyšetření. Hlavním pilířem terapie je léčba vysokými dávkami antibiotik - cílem je zničit patogeny, nebo snížit počet těchto patogenů v těle pacienta. Současně by měl být posílen i imunitní systém pacienta. Důležitým prvkem léčby je také podávání probiotik pro snížení možných vedlejších účinků. Pro pacienty, kteří z různých důvodů nemohou využít antibiotickou léčbu (alergie, špatné krevní hodnoty), klinika umožňuje využít alternativní naturopatickou léčbu. (BCA-clinic, 2019)

3.2.1 Klasická léčba antibiotiky

Borelie jsou bakterie s dlouhým životním cyklem, proto je pro LB doporučena dlouhodobá léčba, stejně jako u tuberkulózy. Délka léčby však závisí na individuálních podmínkách každého pacienta. Také se objevují studie, podle kterých je kombinační terapie antibiotiky užitečná pro léčbu LB. Společnosti ILADS a German Borreliosis Society proto doporučují dlouhodobou a kombinovanou léčbu antibiotiky. (BCA-clinic, 2019)

Ceftriaxon je podáván pacientům s LB vzácně, protože bylo zjištěno, že podporuje perzistenci borelií. Ceftriaxon a doxycyklin jsou vhodnými antibiotiky pro spirální formu borelií, ne však pro perzistující formy, intracelulární patogeny, biofilm a koinfekční agens. (BCA-clinic, 2019)

3.2.2 Alternativní léčba

Pro pacienty, kteří nechtějí nebo nemohou využít antibiotickou léčbu, nabízí BCA klinika naturopatickou alternativní léčbu LB. Po této léčbě musí být pacient každých 4–6 měsíců speciálně testován laboratorním vyšetřením (EliSpot, CD57+ NK buňky). Klinika doporučuje tato vyšetření provést v jejich laboratoři. Výsledky jsou tak snadněji srovnatelné, protože každá laboratoř má jiné referenční meze. (BCA-clinic, 2019)

3.2.3 Kompaktní léčba

Ředitel BCA kliniky založil nový speciální léčebný program, který se nazývá Compact Treatment (CT). CT nabízí klasickou léčbu antibiotiky nebo naturopatickou léčbu s bylinnými antiinfekčními látkami v kombinaci s podpůrnou terapií. V případě potřeby je poskytována také terapie bolesti, aby se pacienti uzdravovali účinněji a rychleji. Cílem programu je: pomoci pacientovi snižovat stres, terapie léčby bolesti nebo trénink výživy a cvičební programy. (BCA-clinic, 2019)

PRAKTICKÁ ČÁST

4 CÍL PRAKTICKÉ ČÁSTI

Druhá polovina práce, tedy praktická část bakalářské práce, je zaměřena na rutinní metody používané k diagnostice lymeské boreliózy ve Fakultní nemocnici Plzeň (dále jen FN Plzeň). Cílem praktické časti je:

- Získat ucelený přehled o lymeské borelióze a její diagnostice
- Popsat vyšetřovací metody pro toto onemocnění používané v mikrobiologické laboratoři FN Plzeň
- Statisticky zpracovat výsledky vzorků vyšetřených ve FN Plzeň v letech 2018 a 2019 a získaná data vyhodnotit

5 METODIKA

Data použitá ke zpracování praktické části bakalářské práce byla získávána po dobu dvou let v laboratoři FN Plzeň na pracovišti sérologie a parazitologie. Výsledky byly zaznamenávány laboratoří a autorkou následně zpracovány pro tuto práci. Aby výsledky vyšetření mohly být použity k vytvoření této práce, musely být nejdříve vyhodnoceny na základě hodnot na pozitivní, hraniční a negativní. V práci jsou zahrnuty pouze pozitivní a hraniční výsledky, negativní výsledky jsou započítávány pouze do počtu celkových vyšetření a použitých materiálů pro vyšetření.

Výsledky metody ELISA byly vyjádřeny ve formě indexu pozitivity, tzn. jako čísla udávajícího poměr naměřené optické denzity k hodnotě cut-off. U každého výsledku bylo určeno, zda dosáhl pozitivní, hraniční nebo negativní hodnoty. Negativní hodnoty indexů se pohybovaly od 0,000 až do 0,899, hraniční hodnoty v rozsahu 0,900-1,100 a pozitivní hodnoty nad 1,101. Metody WB a MBA byly hodnoceny slovně, nebylo tedy potřeba rozdělovat výsledky podle čísel.

6 VLASTNÍ PRAKTICKÁ ČÁST

6.1 Biologický materiál pro vyšetření

Materiály používanými v diagnostice lymeské boreliózy metodami ELISA, WB a MBA ve FN Plzeň byly sérum, punktát nebo likvor. Na základě náročnosti odběru ale největší část materiálu tvoří vyšetření séra, dále pak likvor a nejméně punktát. Lékař pro potvrzení diagnózy může indikovat i vyšetření více materiálů zároveň a posoudit tak, zda borelie pronikly do CNS (v případě likvoru) či do kloubů (např. v případě punktátu).

6.2 Postup metody ELISA

Pro vyšetření specifických protilátek IgM a IgG se používá tzv. sandwichová metoda (nekompetitivní), viz kapitola 2.1.1.1. Značenou protilátkou je zde zvířecí imunoglobulinová frakce proti IgM nebo IgG protilátce, která je konjugována křenovou peroxidázou. Ke zvýraznění peroxidázové aktivity se využívá substrát s TMD (tetramethylbenzidin) – po jeho přidání se v případě pozitivity změní zabarvení roztoku na modrou barvu. Po inkubaci se do jamek přidá zastavovací roztok a tím dochází ke změně barvy z modré na žlutou. Měří se intenzita tohoto zbarvení pomocí fotometru při vlnové délce 450 nm. Intenzita je přímo úměrná koncentraci specifických IgM či IgG protilátek ve vzorku pacienta.

K vyšetření IgM protilátek se používá kombinace rekombinantních antigenů OspC, OspE, VlsE, p17, p39, P41i (inertní flagellin).

K vyšetření IgG protilátek se používá kombinace rekombinantních antigenů VlsE, OspA, OspB, OspC, OspE, p17, p39, p41i (inertní flagelin), p83a NapA.

6.2.1 Souprava k vyšetření IgM a IgG protilátek

Souprava k vyšetření specifických protilátek obsahuje:

- Potaženou mikrotitrační destičku o 96 jamkách s navázaným rekombinantním antigenem
- Negativní kontrolu 5 U/ml – neobsahuje specifické lidské protilátky
- CUT-OFF 20 U/ml – roztok se specifickými lidskými protilátkami v hraniční koncentraci
- Pozitivní kontrolu 200 U/ml – roztok se specifickými lidskými protilátkami

- Konjugát – roztok se zvířecím imunoglobulinem proti lidskému IgM/IgG, značený peroxidázou
- Ředící roztok vzorků – pufr se stabilizátory bílkovin
- TMB substrát – jednosložkový substrátový roztok, který obsahuje TMB/H_2O_2
- Promývací roztok – 20× koncentrovaný roztok
- Zastavovací roztok – roztok kyseliny

6.2.2 Vybavení pro manuální provedení testu

K provedení testu manuálně je potřeba souprava pro vyšetření specifických protilátek, stejně jako u automatizované metody, ale navíc je potřeba: jedno a vícekanálové pipety se špičkami na jedno použití, promývací zařízení, stopky, termostat (na 37 °C) a fotometr pro titrační destičku (ELISA-reader).

6.2.3 Příprava reagencií

Pro použití některých reagencií je nutné tyto látky nejdříve naředit. Promývací roztok se ředí v poměru 1:20, tedy 1 díl promývacího roztoku ku 19 dílům destilované vody. V lahvičce s roztokem je možné vytvoření krystalů. Pokud objevíme před použitím krystaly v lahvičce, rozpustíme je zahřátím lahvičky ve vodní lázni.

Kontroly, konjugát i TMB substrát používané v testu se neředí, jsou již naředěné výrobcem.

6.2.4 Ředění pacientských vzorků

K ředění vzorků pacientů se používá ředící roztok obsahující stabilizátory bílkovin. Jednotlivé ředící poměry pro vzorky séra, likvoru a punktátu ku ředícímu roztoku jsou popsány v tabulce 3.

Tabulka 3: Ředící poměry vzorků pro ELISA metodu

Vzorek	Poměr
Krevní sérum	1:101
Likvor	1:2
Synoviální tekutina (punktát)	1:21, 1:41

Zdroj: (TestLine, 2019)

6.2.5 Postup

Před samotným použitím všech reagencií je nutné nechat tyto látky vytemperovat na laboratorní teplotu, po vytemperování se musejí všechny reagencie důkladně promíchat.

Prvním krokem je napipetování kontrol a naředěných vzorků podle schématu. Do destičky se pipetuje tak, že první jamka (A1) se ponechá prázdná jako blank, dále se napipetuje do 1 jamky 100 µl negativní kontroly, do 2 jamek 100 µl CUT-OFF roztoku, do dalších 2 jamek 100 µl pozitivní kontroly a na konec se v dubletu pipetují pacientské vzorky po naředění do zbývajících volných jamek.

Po napipetování všech reagencií a vzorků je důležité překrýt destičku víčkem či lepící fólií a nechat inkubovat 30 minut v termostatu při teplotě 37 °C.

Po inkubaci se odsaje nezreagovaný obsah jamek a 5× se promyje pracovním promývacím roztokem. Pro usnadnění promývání se může použít automat - promývačka. Po důkladném promytí je nutné vyklepat zbytky promývacího roztoku.

Do všech jamek mikrotitrační destičky (mimo blank – jamku A1) se napipetuje 100 µl konjugátu. Destička se znovu překryje víčkem a inkubuje v termostatu při 37 °C.

Po uplynutí inkubace je nutné znovu obsah v jamkách odsát, 5× promýt pracovním promývacím roztokem. Zbytky roztoku v destičce se musí vyklepat.

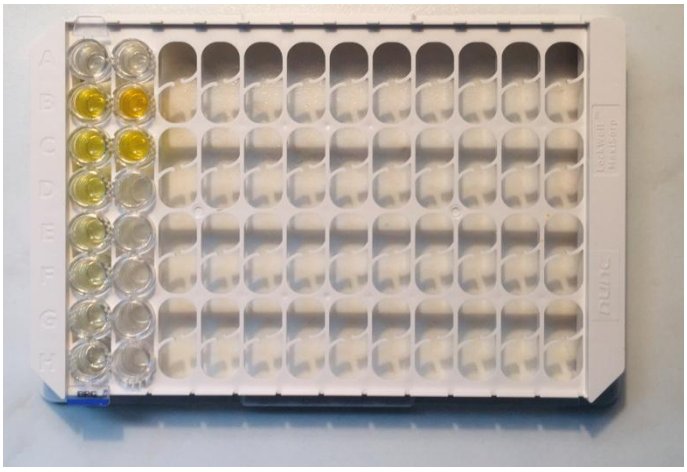
Do všech jamek se napipetuje 100 µl TMB substrátu, destička se překryje víčkem a inkubuje se 15 minut opět v termostatu a temnu při 37 °C.

Po uplynutí inkubace se zastaví reakce peroxidázy přidáním 100 µl zastavovacího roztoku ve stejném pořadí, jako byl dávkován TMB substrát.

Připravená destička (obrázek 10) se měří na přístroji (fotometru) při vlnové délce 450 nm. Měří se intenzita zbarvení roztoků ve srovnání s blankem do 30 minut po přidání zastavovacího roztoku.

6.2.6 Vyhodnocení výsledků

Jsou dány 2 možné způsoby, jak vyhodnotit výsledky testu: semikvantitativně v indexech pozitivity, nebo kvantitativně v jednotkách U/ml. V mikrobiologické laboratoři FN Plzeň se používá semikvantitativní hodnocení v indexech pozitivity. Výsledky se hodnotí jako pozitivní, hraniční a negativní.



Obrázek 10: Mikrotitrační destička použitá k měření ELISA
Zdroj: vlastní

6.3 Postup metody Western Blot

Testovací souprava pro vyšetření IgM a IgG protilátek pomocí WB testu obsahuje testovací stripy, které jsou potaženy purifikovanými antigeny – ty byly separovány pomocí gelové elektroforézy. Prvním krokem testu je inkubace naředěných vzorků pacientů (sérum, likvor, punktát) s imunoblotovými stripy. Pokud je reakce pozitivní, specifické protilátky IgM nebo IgG se navazují na odpovídající antigeny stripu. Pro detekci navázaných protilátek zachycených na stripu slouží druhá inkubace s protilátkou proti lidským protilátkám IgM či IgG, která je značena enzymem schopným vyvolat barevnou reakci na stripu.

6.3.1 Souprava pro vyšetření IgM a IgG protilátek

Souprava k vyšetření specifických protilátek obsahuje:

- Testovací stripy potažené antigeny
  - Pro vyšetření protilátek IgM se používají stripy potažené antigeny OspC (Ba, Bb, Bg) p39, P41 a VlsE.
  - Pro vyšetření IgG protilátek se používají stripy potažené antigeny VlsE (VlsE Bg, VlsE Bb, VlsE Ba), OspC, p18, p19, p20, p21, p39, p58, p83, LBa, LBb.
- Pozitivní kontrola – 50× koncentrovaná; obsahuje lidské IgM/IgG
- Enzymový konjugát – 10× koncentrovaný; obsahuje alkalickou fosfatázu, která je značena anti-lidským IgM/IgG

- Univerzální pufr – 10× koncentrovaný roztok
- Substrátový roztok – roztok NBT/BCIP, který je připraven k použití

6.3.2 Příprava reagencií

Před provedením testu se musí reagencie nechat 30 minut vytemperovat na laboratorní teplotu. Důležité je před použitím každou reagencii promíchat.

Univerzální pufr je 10× koncentrovaný: ředí se v poměru 1:10 destilovanou vodou. Kontrola je 50× koncentrovaná: pro přípravu požadovaného množství kontroly se ředí v poměru 1:51 univerzálním pufrem. Enzymový konjugát je 10× koncentrovaný: pro přípravu požadovaného množství se ředí v poměru 1:10 s naředěným univerzálním pufrem. Potažené testovací stripy i substrátový roztok jsou připraveny k použití bez jakékoliv úpravy.

6.3.3 Ředění pacientských vzorků

Ke stanovení přítomnosti specifických protilátek se nejčastěji využívá sérum, likvor nebo punktát. Pacientské vzorky jsou ředěny v poměru 1:51 s naředěným univerzálním pufrem.

6.3.4 Postup

Připravené testovací stripy se umístí do prázdného žlábku vaničky. Inkubační žlábky se naplní podle počtu vzorků séra 1,5 ml naředěného univerzálního pufru. Inkubuje se 15 minut na třepačce při laboratorní teplotě. Po inkubaci se ze žlábků odsaje veškerá tekutina.

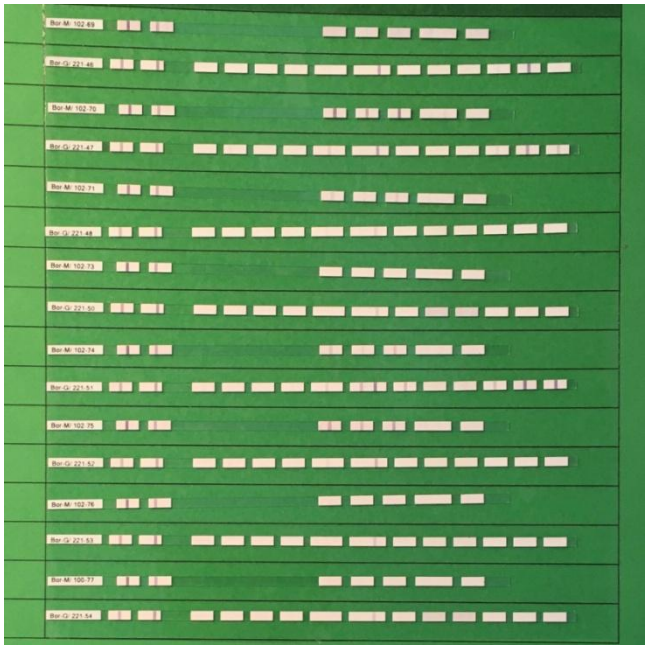
Každý žlábek se naplní 1,5 ml naředěného pacientského vzorku a inkubuje se při laboratorní teplotě na třepačce po dobu 30 minut. Po této inkubaci se odsaje kapalina z každého žlábku. Následuje 3× promývání žlábku po 5 minutách 1,5 ml univerzálního pufru za stálého třepání na třepačce.

Do každého žlábku se napipetuje 1,5 ml ředěného enzymového konjugátu a inkubuje se při laboratorní teplotě na třepačce po dobu 30 minut. Po uplynutí inkubace se znovu odsaje všechna tekutina ze žlábků a promyje se 3× po 5 minutách 1,5 ml univerzálním pufrem za stálého třepání na třepačce.

Do každého žlábku se napipetuje 1,5 ml substrátového roztoku a inkubuje se na třepačce při laboratorní teplotě po dobu 10 minut. Po inkubaci se odsaje veškerá tekutina ze žlábků a žlábky se promyjí 3× po dobu 1 minuty destilovanou vodou.

6.3.5 Vyhodnocení výsledků

Po dokončení promývání se testovací stripy přemístí na vyhodnocovací protokol a vyhodnocují se podle zbarvení testovacích stripů (obrázek 11). Pro vyhodnocení se používá speciální software.



Obrázek 11: Vyhodnocovací protokol WB
Zdroj: vlastní

6.4 Postup metody Microblot-Array

Souprava pro testování pomocí Microblot-Array je založena na principu imunoblotu podobnému WB, ale test je převeden do formátu mikrotitrační destičky. Rekombinantní antigeny jsou naneseny formou spotů (mikroteček) na nitrocelulózovou membránu na dně jamky destičky. Během testu dochází k navázání specifických protilátek ze vzorku na příslušné antigeny. Další postup je podobný ELISA testu, ale reakce se zastavuje přidáním destilované vody. Intenzita zbarvení antigenních spotů je měřena pomocí speciálního readeru a softwaru.

Tuto metodu zavedla mikrobiologická laboratoř FN Plzeň od 8. 3. 2019 náhradou za metodu WB z důvodu větší specifity pro vyšetření lymeské boreliózy, vyššího počtu použitých antigenů, přísnějších hodnotících kritérií (požadováno klinickými lékaři) a možnosti zpracování metody na analyzátoru pro ELISA metody.

6.4.1 Souprava pro vyšetření specifických IgM a IgG protilátek

Souprava pro vyšetření specifických protilátek obsahuje:

- Destička s nanesenými rekombinantními antigeny
    - Pro vyšetření protilátek IgM i IgG se používají stripy potažené těmito antigeny: VlsE (VlsE Bg, VlsE Bb, VlsE Ba), OspB, OspA (OspA Ba, OspA Bg, OspA Bs), OspC (OspC Ba, OspC Bg, OspC Bs, OspC Bsp), OspE, NapA, OmpA, Asp62, p17, p39, p41 (p41 Ba, p41 Bs), p44, p58, p83.
- Pozitivní kontrola – roztok se specifickými protilátkami
- Konjugát – roztok se zvířecím imunoglobulinem značeným alkalickou fosfatázou
- Substrátový roztok – pufr s BCIP/NBT
- Univerzální roztok – pufr používaný k ředění vzorků a promývání testovacích stripů

Dalším vybavením pro provedení testu jsou jedno a vícekanálové pipety se špičkami pro jednorázové použití, stopky, zkumavky pro ředění vzorků, promývačka, destilovaná voda, odsávací zařízení, Microblot-Array reader a PC s vyhodnocovacím softwarem.

Všechny použité reagencie jsou již naředěné od výrobce, ředí se pouze pacientské vzorky použité k analýze.

6.4.2 Ředění pacientských vzorků

Vzorky krevního séra, likvoru a punktátu se po důkladném promíchání ředí univerzálním roztokem v poměrech, viz tabulka 4.

Tabulka 4: Ředící poměry vzorků pro Microblot-Array metodu

Vzorek	Poměr
Krevní sérum	1:51
Likvor	1:3
Synoviální tekutina (punktát)	1:17,5

Zdroj: (TestLine, 2017)

6.4.3 Postup

Před použitím všech reagencií je nutné nechat tyto látky vytemperovat alespoň 60 minut při laboratorní teplotě. Destička se skládá ze 12 oddělitelných testovacích stri-

pů, které se volí podle počtu vzorků. Pozitivní kontrola se používá pouze v případě validace stanovení.

Do každé jamky se napipetuje 150 µl univerzálního roztoku a nechá se smáčet 10 minut při laboratorní teplotě. Po 10 minutách se odsaje z jamek univerzální roztok a napipetuje se 100 µl naředěných pacientských vzorků do každé jamky. Inkubuje se 30 minut při laboratorní teplotě.

Naředěné vzorky se odsají a jamky se propláchnou univerzálním roztokem, dále se jamky 3× promyjí 150 µl univerzálního roztoku po dobu 5 minut. Po promytí jamek se do každé inkubační jamky napipetuje 100 µl konjugátu a nechá se inkubovat při laboratorní teplotě po dobu 30 minut. Po inkubaci se roztok konjugátu odsaje z jamek a ty se propláchnou univerzálním roztokem. Jamky se 3× promyjí 150 µl univerzálního roztoku po dobu 5 minut.

Do každé inkubační jamky se napipetuje 100 µl substrátového roztoku a inkubuje se po dobu 15 minut při laboratorní teplotě. Po inkubaci se substrátový roztok odsaje z jamek a jamky se propláchnou destilovanou vodou. Jamky se 2× promyjí 200 µl destilované vody po dobu 5 minut.

Po posledním promytí se nechá destička vysušit na vzduchu po dobu minimálně 90 minut, tato doba lze ale zkrátit použitím termostatu (37 °C) na 60 minut.

6.4.4 Vyhodnocení výsledků

Vyhodnocení výsledků probíhá pomocí Microblot-Array readeru a speciálního vyhodnocovacího softwaru. Výsledky se mohou, stejně jako výsledky ELISA, udávat v jednotkách (U/ml), pomocí indexu pozitivity, ale pro vyhodnocení MBA lze použít i vyhodnocení intenzity spotů.

6.5 Výsledky

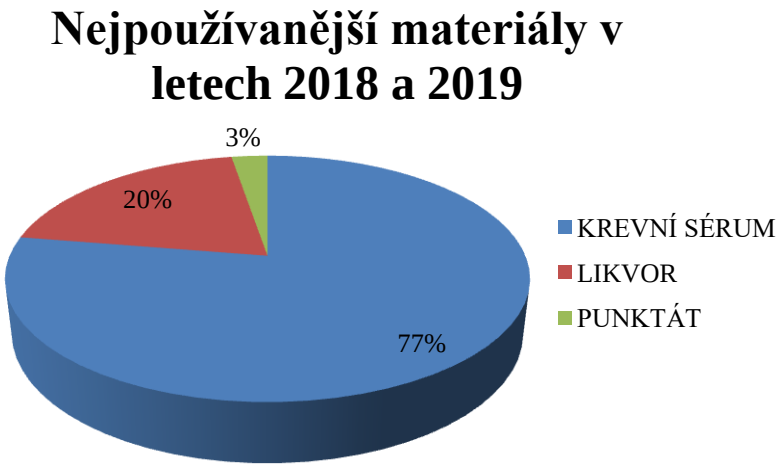
Výsledky použité v této bakalářské práci pocházejí z mikrobiologické laboratoře FN Plzeň a byly získány v letech 2018 a 2019. V grafech pozitivních výsledků IgM a IgG protilátek jsou zachyceny i výsledky hraniční.

6.5.1 Nejpoužívanější biologické materiály 2018 a 2019

Obecně je pro diagnostiku LB nejvíce zastoupeno vyšetření séra díky snadnějšímu získání vzorku krve, na rozdíl od likvoru a punktátu. Ve FN Plzeň se v letech 2018 a 2019 provádělo nejvíce vyšetření ze séra, které tvoří 77 % všech vyšetřených materiá-

lů. Od roku 2018 do roku 2019 bylo provedeno 7 469 vyšetření protilátek ze séra. Dalších 20 % tvoří vyšetření z likvoru, kterých bylo v letech 2018–2019 provedeno 1 920. Nejméně vyšetřovaným materiálem je punktát (synoviální tekutina), který zaujímá pouze 3 % všech vyšetřených materiálů (viz graf 2).

Graf 2: Nejpoužívanější materiály ve FN Plzeň v letech 2018-2019

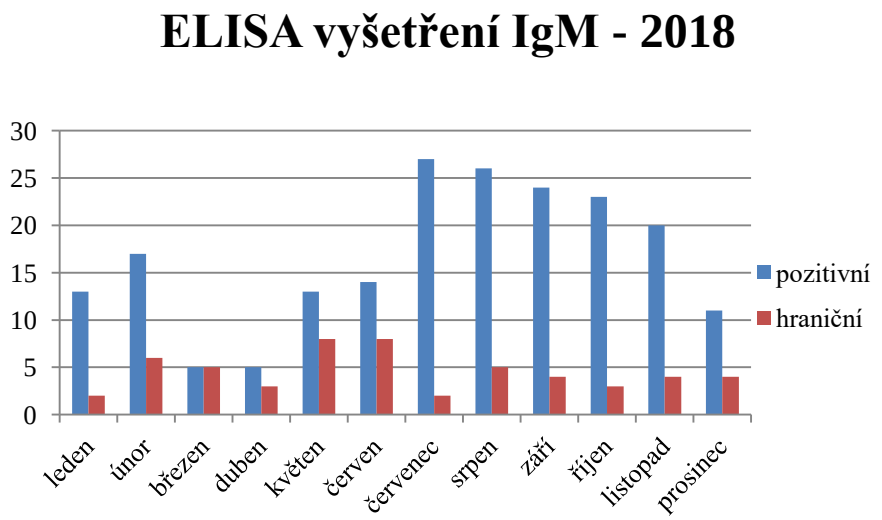


Zdroj: vlastní

6.5.2 Výsledky ELISA IgM v letech 2018 a 2019

V roce 2018 bylo provedeno 1 775 vyšetření IgM protilátek pomocí ELISA testu, z toho bylo 11 % zaznamenaných výsledků pozitivních. Nejvíce pozitivních výsledků se zachytilo v červenci, kdy pozitivní test ELISA byl zjištěn u 14 % vyšetření (viz graf 3). Z grafu 3 je zřetelné, že nejvíce pozitivních výsledků bylo zachyceno v červenci a jejich počet postupně klesal až do prosince. Nejméně záchytů bylo v březnu a dubnu.

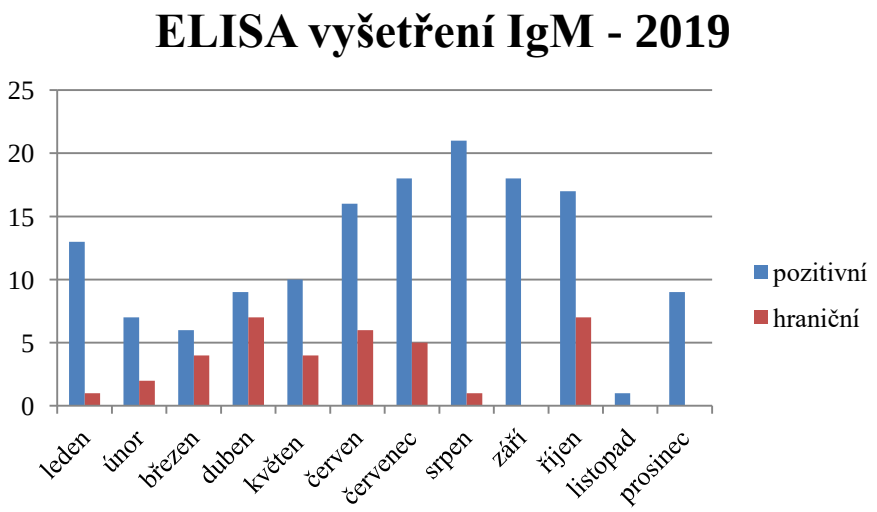
Graf 3: Vyšetření IgM protilátek metodou ELISA - rok 2018



Zdroj: vlastní

V roce 2019 bylo provedeno 1 471 vyšetření IgM protilátek testem ELISA, z toho bylo 10 % zaznamenaných výsledků pozitivních. Nejvíce pozitivních výsledků bylo zachyceno v srpnu, kdy pozitivní ELISA test byl zaznamenán u 13 % vyšetření (viz graf 4). Z grafu 4 je zřejmé, že nejvyšší záchyt pozitivních výsledků byl zjištěn od června do října. Nejméně záchytů bylo v únoru, březnu, dále pak v listopadu.

Graf 4: Vyšetření IgM protilátek metodou ELISA - rok 2019

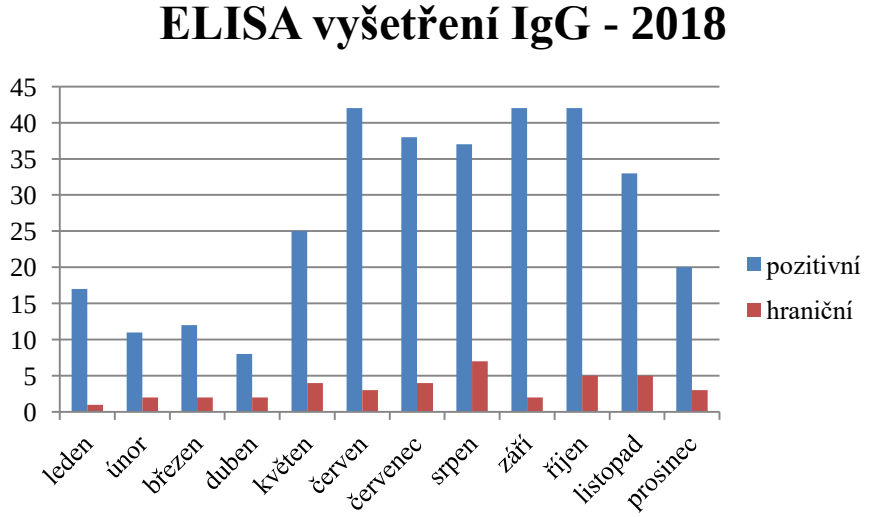


Zdroj: vlastní

6.5.3 Výsledky ELISA IgG v letech 2018 a 2019

V roce 2018 bylo provedeno 1 775 vyšetření IgG protilátek, z toho bylo 18 % výsledků pozitivních. Nejvíce pozitivních výsledků se zachytilo v rozmezí od května do listopadu s maximy v červnu, září a říjnu, kdy bylo v každém měsíci nalezeno 23 % pozitivních výsledků, nejnižší záchyt byl od února do dubna (viz graf 5).

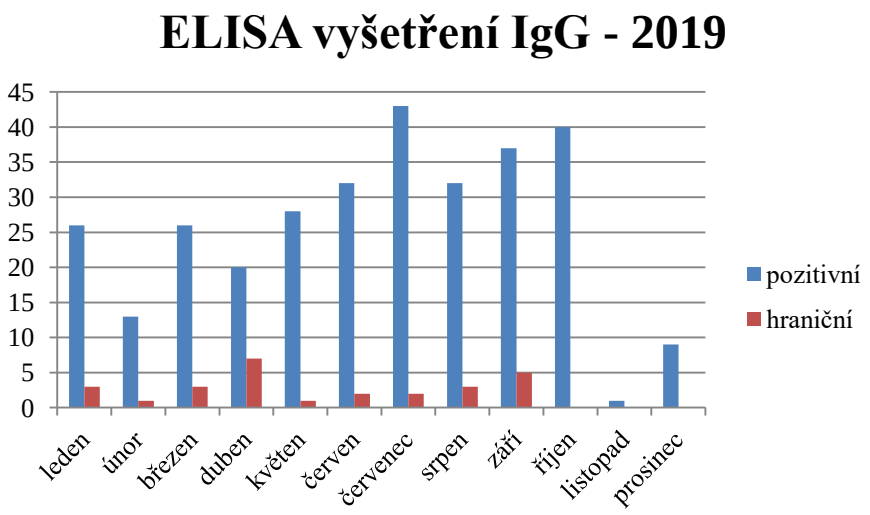
Graf 5: Vyšetření IgG protilátek metodou ELISA - rok 2018



Zdroj: vlastní

V roce 2019 bylo provedeno 1 471 vyšetření IgG protilátek ELISA testem, z toho bylo zaznamenáno 21 % výsledků pozitivních. Nejvíce pozitivních výsledků bylo zachyceno od května do října s maximem v červenci, kdy byl pozitivní ELISA test u 23 % výsledků, naopak v listopadu byl zachycen jeden pozitivní výsledek (viz graf 6).

Graf 6: Vyšetření IgG protilátek metodou ELISA - rok 2019

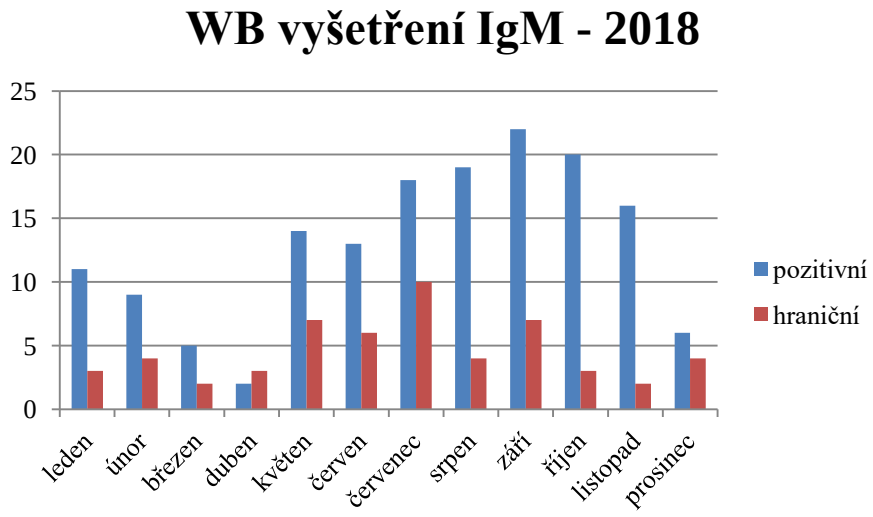


Zdroj: vlastní

6.5.4 Výsledky WB/MBA IgM v letech 2018 a 2019

V roce 2018 bylo pomocí testu Western Blot provedeno 647 vyšetření IgM protilátek, z toho bylo zaznamenáno 24 % výsledků pozitivních. Nejvíce jich bylo zachyceno od května do listopadu s maximem v září, naopak nejméně jich bylo v březnu a dubnu (viz graf 7).

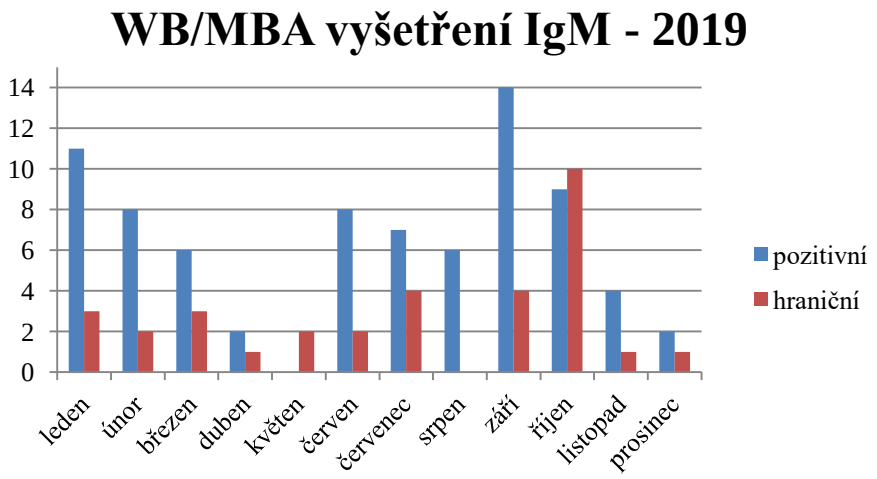
Graf 7: Vyšetření IgM protilátek metodou WB - rok 2018



Zdroj: vlastní

Od 8. 3. 2019 vyšetřuje mikrobiologická laboratoř FN Plzeň protilátky proti LB metodou Microblot-Array (MBA) místo metody WB. V roce 2019 bylo provedeno celkem 433 vyšetření ve třídě IgM, z toho 64 vyšetření metodou WB a 369 vyšetření metodou MBA. Bylo zachyceno 18 % pozitivních výsledků s maximem v září. V říjnu převažovaly hraniční výsledky testu nad pozitivními a v květnu se neobjevil dokonce žádný pozitivní výsledek, pouze hraniční (viz graf 8).

Graf 8: Vyšetření IgM protilátek metodou WB a MBA - rok 2019



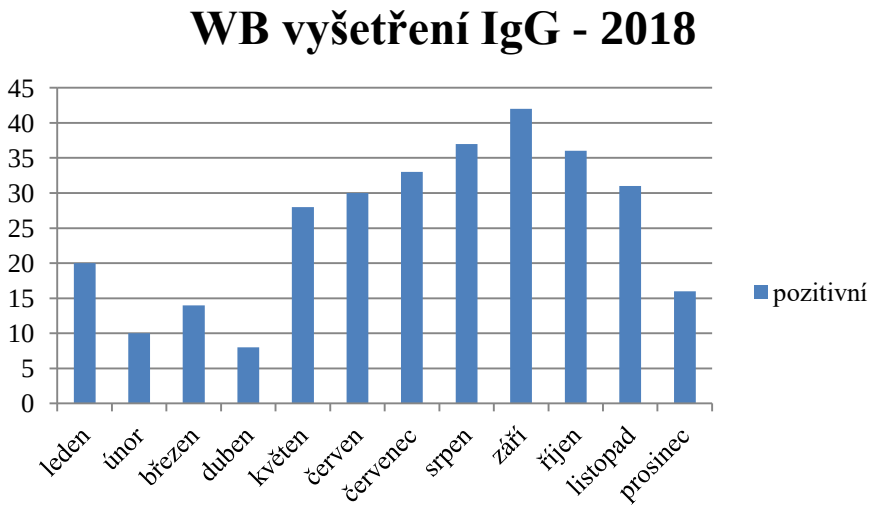
Zdroj: vlastní

6.5.5 Výsledky WB/MBA IgG v letech 2018 a 2019

V roce 2018 bylo provedeno 647 vyšetření IgG protilátek WB testem, z toho bylo zaznamenáno 47 % výsledků pozitivních. V tomto roce nebyly zjištěny žádné hraniční výsledky, proto v grafu chybí. Nejvíce pozitivních vyšetření bylo zachyceno v září, kdy se zaznamenalo 63 % pozitivních výsledků (viz graf 9). Vyšetření má pyramidový charakter od května do listopadu.

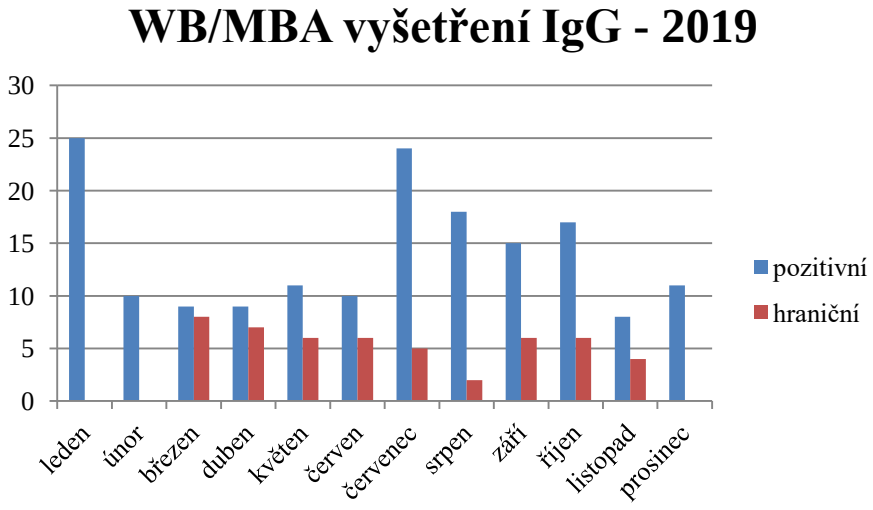
V roce 2019 přešla mikrobiologická laboratoř FN Plzeň z metody WB na MBA metodu. Od ledna do března bylo provedeno 64 vyšetření na protilátky IgG metodou WB, od března do prosince bylo metodou MBA provedeno 368 vyšetření, celkem tedy 432 vyšetření, z toho se zachytilo 39 % pozitivních výsledků. Nejvíce jich bylo v lednu, kdy se zaznamenalo 45 % pozitivních případů a v červnu, kdy se zachytilo 41 % pozitivních případů (viz graf 10).

Graf 9: Vyšetření IgG protilátek metodou WB - rok 2018



Zdroj: vlastní

Graf 10: Vyšetření IgG protilátek metodou WB a MBA - rok 2019



Zdroj: vlastní

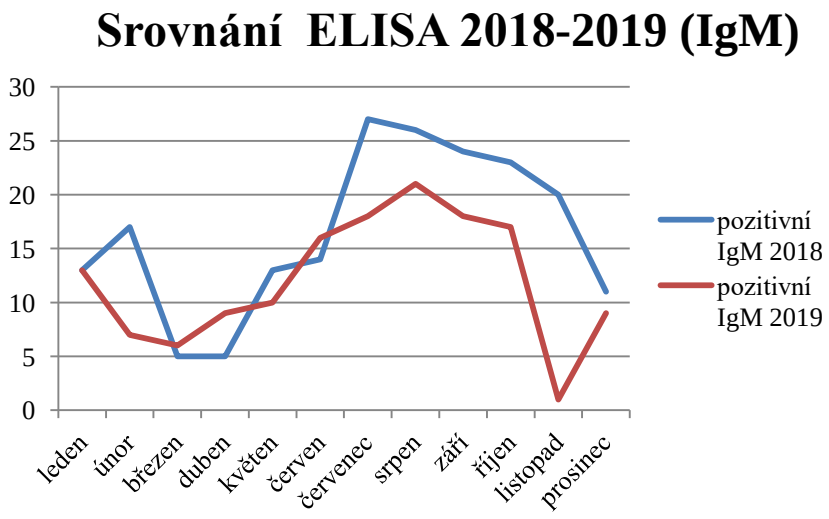
6.6 Srovnání výsledků metody ELISA v letech 2018-2019

6.6.1 IgM protilátky

V roce 2018 bylo zachyceno téměř o pětinu více pozitivních výsledků než v roce 2019, i přes to jsou si křivky velmi podobné. Sezóna záchytu pozitivních výsledků je v rozmezí května až října, malý vzestup je pak i v zimních měsících.

Podíl pozitivních výsledků na ročním počtu vyšetření nevykazuje významný rozdíl. V roce 2018 činil tento podíl 11 %, v roce 2019 činil 10 %. Tento podíl se neliší ani u měsíců s maximálními záchyty, který v roce 2018 dosahoval v měsíci červenci 14 % a v roce 2019 v měsíci srpnu 13 %.

Graf 11: Srovnání pozitivních výsledků ELISA IgM 2018-2019

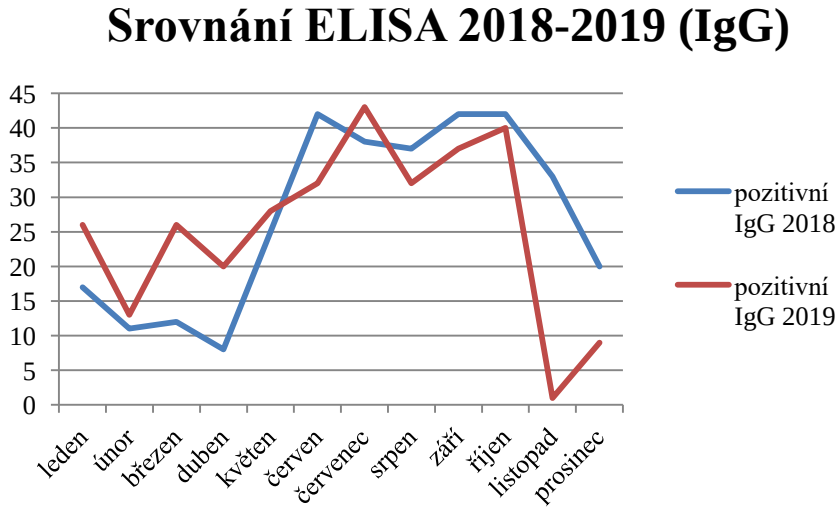


Zdroj: vlastní

6.6.2 IgG protilátky

Výrazné změny nebyly zjištěny ani u IgG protilátek vyšetřených metodou ELISA. V roce 2018 i 2019 bylo zachyceno nejvíce pozitivních výsledků od května do října (viz graf 12). V roce 2018 byla maxima dosažena v červnu, září a říjnu, v roce 2019 v červenci. Podíl pozitivních výsledků na ročním počtu vyšetření byl v obou letech shodný a činil 23 %.

Graf 12: Srovnání pozitivních výsledků ELISA IgG 2018-2019



Zdroj: vlastní

6.7 Srovnání výsledků WB /MBA v letech 2018-2019

6.7.1 IgM protilátky

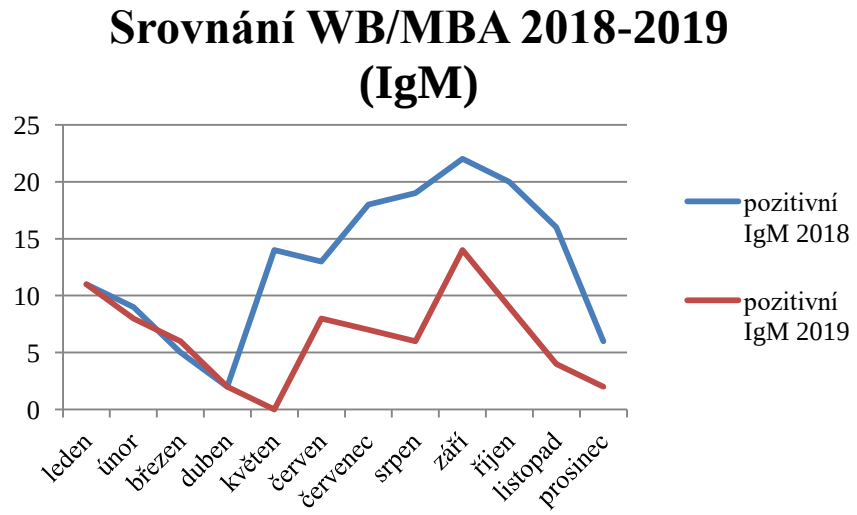
Od ledna roku 2018 počty pozitivních výsledků klesaly až do dubna, v květnu se počet prudce zvýšil a nejvíce pozitivních výsledků bylo zaznamenáno v letních měsících, maximum dokonce v září. Celkově podíl pozitivních výsledků na počtu vyšetření činil 24 %. Vyšetření byla prováděna metodou WB.

V roce 2019 rovněž počty pozitivních výsledků klesaly až do května, ve kterém nebyl zachycen žádný pozitivní výsledek. Největší počet zachycený v roce 2019 byl také v září. Podíl pozitivních výsledků na počtu vyšetření byl o něco nižší, činil 18 % (viz graf 13). Vyšetření byla prováděna metodou MBA od března.

6.7.2 IgG protilátky

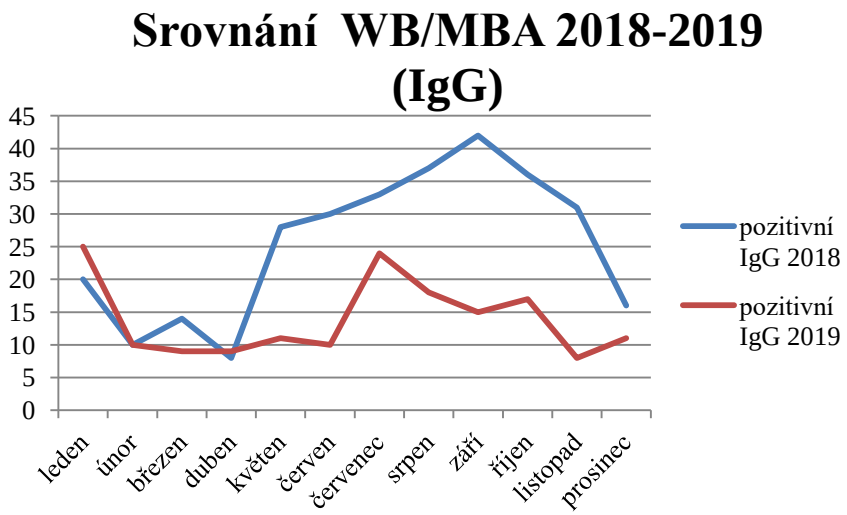
Od května roku 2018 stoupal počet pozitivních výsledků až do září, kdy byl zaznamenán největší počet případů, který činil 63 %. Od září hodnoty opět klesaly. Ve srovnání s rokem 2018 jsou rozdíly mezi jednotlivými měsíci v roce 2019 setřeny a křivka nevykazuje tak rozkolísaný charakter. Také výskyt maxim pozitivních výsledků je odlišný. Nejvíce jich bylo zachyceno v měsíci lednu, kdy dosahovaly 45 % a v červnu, kdy dosahovaly 41 %. Nejméně jich bylo zachyceno v listopadu (viz graf 14)

Graf 13: Srovnání pozitivních výsledků WB/MBA IgM 2018-2019



Zdroj: vlastní

Graf 14: Srovnání pozitivních výsledků WB/MBA IgG 2018-2019



Zdroj: vlastní

DISKUZE

Cílem práce bylo získat přehled o onemocnění LB a její diagnostice (teoretická část), popsat vyšetřovací metody používané v mikrobiologické laboratoři FN Plzeň a statisticky zpracovat a vyhodnotit data získaná v letech 2018-2019 (praktická část).

Výsledky získané zpracováním dat z vyšetření protilátek IgM a IgG v Plzeňské nemocnici v letech 2018-2019 vykazují pokles jak absolutního počtu vyšetření, tak počtu pozitivních výsledků.

V roce 2018 bylo provedeno 1 775 vyšetření protilátek proti lymeské borelióze metodou ELISA, v roce 2019 pouze 1 471 vyšetření, tedy o 17 % méně. Důvod snížení počtu požadovaných vyšetření ze strany žadatelů nelze jednoznačně určit - pravděpodobně k lékařům dorazilo méně pacientů, u nichž by bylo potřeba toto vyšetření provést. Aktivita klíšťat v roce 2019 mohla být díky např. suššímu počasí nižší a méně osob tak vykazovalo příznaky boreliové infekce.

U konfirmační metody (WB, MBA) bylo v roce 2018 provedeno 647 vyšetření, v roce 2019 pouze 432 vyšetření, tedy o 33 % méně. V roce 2018 byla všechna vyšetření provedena metodou WB, v roce 2019 byla převážná část provedena metodou MBA (vyšetření metodou WB probíhalo pouze v lednu, únoru a první týden v březnu). Dle doporučení České infektologické společnosti změnila v roce 2019 mikrobiologická laboratoř FN Plzeň postup u konfirmační metody – v roce 2018 byla provedena všechna požadovaná vyšetření bez ohledu na výsledek metody ELISA, v roce 2019 byla provedena pouze u pozitivních a hraničních výsledků získaných metodou ELISA – i díky tomu mohl být počet vyšetření v roce 2019 nižší.

Podíly pozitivních výsledků u metody ELISA (IgM i IgG) byly v obou letech podobné – podíly u protilátek IgM 11 % a 10 %, u protilátek IgG 18 % a 21 %. U konfirmační metody už se podíly pozitivních výsledků lišily více – podíly u protilátek IgM 24 % a 18 %, u protilátek IgG 47 % a 39 %. Nižší podíl pozitivních výsledků konfirmační metody v roce 2019 oproti roku předešlému mohl být způsoben i tím, že nová metoda MBA má přísnější hodnotící kritéria.

Další příčinou nižšího počtu absolutních i pozitivních výsledků může být i to, že se lidé dozvídají o povaze této nemoci, její schopnosti přecházet do chronicity a napadat celé systémy orgánů. Lidé více dbají na prevenci, i když ta zahrnuje pouze ochranu, nikoliv očkování. Nejedná se o jediné onemocnění přenášené klíšťaty, ale přesto patří LB mezi onemocnění, která nejsou tak snadno diagnostikovatelná a léčitelná tak, jako

některá běžně se vyskytující onemocnění. Právě z tohoto důvodu je možné, že lidé berou na vědomí tuto skutečnost, neboť prevence před tímto onemocněním je velmi důležitou a jedinou možností profylaxe.

Důvodem poklesu pozitivních případů může být i absence příznaků u pacientů v akutní fázi infekce. V tomto případě záleží na individualitě organismu, jak a jestli se akutní příznaky vůbec projeví, a také jestli je pacient nepřehlíží a dostaví se k lékaři. U některých jedinců může dojít k diagnostice tohoto onemocnění až v chronické fázi infekce, kdy už borelie osidlují různé orgány a způsobují pozdní obtíže. V této fázi infekce jsou diagnostikovány hlavně protilátky IgG, u kterých byl zaznamenán větší počet pozitivních výsledků v obou letech, než u vyšetření protilátek IgM. Na základě toho tedy můžeme říci, že většina pacientů je s ohledem na vyšší počet pozitivních případů protilátek IgG diagnostikována spíše v pozdní fázi infekce.

Výsledky ELISA metody mohou být vyhodnoceny i jako tzv. hraniční hodnoty. U těchto hodnot se index pozitivity pohybuje mezi 0,900-1,100. Nelze tedy přesně říci, zda je výsledek spíše pozitivní nebo spíše negativní. V tomto případě (i v případech ostatních), je nutné výsledek vyšetření posoudit ve vztahu ke klinickému stavu pacienta a přítomným příznakům onemocnění, případně zvolit vyšetření jiného biologického materiálu (např. likvor nebo punktát) nebo opakovat vyšetření s odstupem znovu.

Důležité je si uvědomit, že výsledky získané, zpracované a hodnocené v této práci pochází pouze z Plzně a jejího okolí, tedy oblasti Plzeňského kraje. Neznamená to tedy, že došlo k poklesu pozitivních případů v celé České republice. K tomuto závěru by bylo zapotřebí získat data o pozitivních výsledcích ze všech krajů a teprve poté zhodnotit dynamiku onemocnění (tedy nárůst a pokles pozitivity) na území celé ČR.

Získaná data nás informují o počtu pozitivních výsledků protilátek LB u pacientů v letech 2018-2019. Srovnáním výsledků z tohoto období můžeme zjistit, zda se onemocnění objevuje v populaci více či méně. Nelze opominout význam prevence – ta je totiž jediným možným řešením v předcházení tomuto onemocnění.

ZÁVĚR

Lymeská borelióza je jedním z onemocnění, na které stále neexistuje vakcinační látka a jedinou možnou prevencí tak je ochrana před klíšťaty. Z tohoto důvodu jsou každoročně diagnostikovány stovky (v celé republice tisíce) nemocných pacientů ve fázi akutní či chronické boreliózy. U některých pacientů nemusí mít toto onemocnění v akutní fázi výrazné příznaky jako například erythema migrans. Příznaky se mohou objevit až v dalším průběhu onemocnění, kdy už se borelie usídlí například v kloubech nebo centrální nervové soustavě. Hraje zde roli individualita každého organismu - jak a zdali se vůbec projeví příznaky onemocnění v akutní fázi. Jedná se také o onemocnění, které není tak snadno léčitelné. Etiologickým agens jsou bakterie, léčí se tedy antibiotiky – názory na dávkování a dobu podávání antibiotik ale nejsou jednotné. Na klinice v Německu se specializují na léčbu těchto onemocnění podáváním vysokých a drahých dávek antibiotik pacientům po dobu delší než tři týdny, což je v rozporu s postupem uznávaným v České republice.

CITOVANÁ LITERATURA

Alasel, Mohammed a Keusgen, Michael. 2018. ScienceDirect. *Promising alternatives for one-tier testing of Lyme borreliosis.* [Online] duben 2018. [Citace: 4. 4 2019.] https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000989811830038X.

Bartůněk, Petr. 2013. *Lymeská borelióza.* Praha : Grada, 2013. 978-80-247-4355-4.

Bartůňková a kolektiv, Paulík. 2011. *Vyšetřovací metody v imunologii, 2. přepracované a doplněné vydání.* Praha : Grada, 2011. 978-80-247-3533-7.

BayAreaLyme. 2014. Bay Area Lyme. [Online] Bay Area Lyme, 12. září 2014. [Citace: 8. červenec 2019.] https://www.bayarealyme.org/blog/lyme-disease-bullseye-rash/.

BCA-clinic. 2019. BCA-clinic Augsburg . *BCA-clinic Augsburg Holistic Lyme Disease Treatment.* [Online] 2019. [Citace: 10. červenec 2019.] https://www.bca-clinic.de/klinik/.

BCA-lab. 2019. BCA-clinic Augsburg. *BCA-clinic Augsburg Holistic Lyme Disease Treatment.* [Online] 2019. [Citace: 11. červenec 2019.] https://www.bca-clinic.de/en/bca-lab-home/.

Bush a Vazquez-Pertejo. 2018. ScienceDirect. *Tick borne illness—Lyme disease.* [Online] 2018. [Citace: 2. červenec 2019.] https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0011502918300075. https://doi.org/10.1016/j.disamonth.2018.01.007.

Coipan a Sprong. 2016. Wageningen Academic Publishers. *Ecology and prevention of Lyme borreliosis.* [Online] 2016. [Citace: 29. červen 2019.] https://www.wageningenacademic.com/. DOI 10.3920/978-90-8686-838-4_4.

Cook a Puri. 2016. International Journal of General Medicine. *Commercial test kits for detection of Lyme.* [Online] 18. listopad 2016. [Citace: 6. červenec 2019.] https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5125990/. doi:10.2147/IJGM.S122313.

Eldin, a další. 2019. ScienceDirect. *Values of diagnostic tests for the various species of spirochetes.* [Online] Elsevier, 11. únor 2019. [Citace: 9. červenec 2019.] https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0399077X18309636. https://doi.org/10.1016/j.medmal.2019.01.009.

EUROLINE. Návod k testu pro Anti-Borrelia EUROLINE-RN-AT IgM/IgG. [Online] [Citace: 21. únor 2020.]

Földvári, Gábor. 2016. Wageningen Academic Publishers. *Life cycle and ecology of Ixodes ricinus: the roots of public health importance.* [Online] 28. listopad 2016. [Citace: 3. červenec 2019.] https://www.wageningenacademic.com/doi/abs/10.3920/978-90-8686-838-4_3. https://doi.org/10.3920/978-90-8686-838-4.

Gerstenblith a Stern. 2014. Psychosomatics. *Lyme Disease: A Review of Its Epidemiology, Evaluation, and Treatment.* [Online] 2014. [Citace: 3. červenec 2019.] https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0033318214000413. https://doi.org/10.1016/j.psym.2014.02.006.

Halperin a J., John. 2018. *Lyme Disease, 2nd Edition: An Evidence-based Approach.* Boston : CABI, 2018. 1786392070.

Hofmeester, a další. 2016. IOPscience. *Few vertebrate species dominate the Borrelia burgdorferi s.l. life cycle.* [Online] 20. duben 2016. [Citace: 3. červenec 2019.] https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1748-9326/11/4/043001. doi:10.1088/1748-9326/11/4/043001.

Jin a Kennedy. 2015. ScienceDirect. *New developments in Western blot technology.* [Online] duben 2015. [Citace: 7. červenec 2019.] https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1001841715000339. https://doi.org/10.1016/j.cclet.2015.01.021.

Khatchikian, a další. 2015. Trends in Genetics - SicenceDirect. *Evolution and population genomics of the Lyme borreliosis pathogen, Borrelia burgdorferi.* [Online] duben 2015. [Citace: 29. červen 2019.] https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168952515000335. https://doi.org/10.1016/j.tig.2015.02.006.

Krbková, Lenka, a další. 2018. infekce.cz. *Doporučený postup diagnostiky a léčby lymeské borreliózy.* [Online] 30. září 2018. [Citace: 12. červenec 2019.] https://www.infekce.cz/DPLB18.htm.

Kříž a Gašpárek, Kolektiv pracovníků SZÚ. 2015. Státní zdravorní ústav. *Lymeská borrelióza – epidemiologická data za rok 2014.* [Online] září 2015. [Citace: 3. červenec 2019.] http://www.szu.cz/uploads/Epidemiologie/Lymeska_borrelioza/Lymeska_borelioza_CR_data_do_roku_2014.pdf.

Křupka, Michal, Strojil, Jan a Raška, Milan. 2014. Solen. *Současné možnosti diagnostiky, léčby a prevence.* [Online] 2014. [Citace: 3. červenec 2019.] http://www.solen.sk/pdf/1aa0fda0c2fa89309accbe3fbd7889ad.pdf.

Makara-Studzinska, a další. 2017. The European Journal of Psychiatry. *Anxiety and depression in patients infected with Borrelia burgdorferi.* [Online] 13. březen 2017. [Citace: 4. červenec 2019.] https://www.elsevier.es/en-revista-european-journal-psychiatry-431. http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpsy.2017.09.003.

Mannelli, a další. 2012. FEMS Microbiology Reviews. *Ecology of Borrelia burgdorferi sensu lato in Europe: transmission dynamics in multi-host systems, influence of molecular processes and effects of climate change.* [Online] červenec 2012. [Citace: 27. červen 2019.] https://academic.oup.com. https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00312.x.

Margos, a další. 2015. ScienceDirect. *Long-term in vitro cultivation of Borrelia miyamotoi.* [Online] březen 2015. [Citace: 8. červenec 2019.] https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1877959X14002192. https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2014.12.001.

Meriläinen a al., et. 2015. National Center for Biotechnology Information. *Morphological and biochemical features of Borrelia burgdorferi pleomorphic forms.* [Online] březen 2015. [Citace: 29. červen 2019.] https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4339653/. doi:10.1099/mic.0.000027.

Miklossy, a další. 2004. Journal of Alzheimer's disease. *Borrelia burgdorferi persists in the brain in chronic lyme neuroborreliosis and may be associated with Alzheimer disease.* [Online] 2004. [Citace: 8. červenec 2019.] https://www.researchgate.net/publication/8067017_Borrelia_burgdorferi_persists_in_the_brain_in_chronic_Lyme_neuroborreliosis_and_may_be_associated_with_Alzheimer_disease. DOI: 10.3233/JAD-2004-6608.

MolecularDevices. Molecular Devices. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA).* [Online] [Citace: 4. březen 2020.] https://www.moleculardevices.com/applications/enzyme-linked-immunosorbent-assay-elisa#gref.

Patriquin, a další. 2016. Diagnostic Microbiology and Infectious disease. *Cross-reactivity between Lyme and syphilis screening assays: Lyme disease does not cause false-positive syphilis screens.* [Online] březen 2016. [Citace: 6. červenec 2019.]

https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0732889315004344. https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2015.11.019.

Prokeš, Zdeněk. 2015. Dermatologie pro praxi. *Lymeská borrelióza.* [Online] březen 2015. [Citace: 5. červenec 2019.] https://www.dermatologiepropraxi.cz/magno/der/2015/mn1.php.

Roháčová, Hana. 2005. *Lymeská borelióza: průvodce ošetřujícího lékaře.* Praha : Maxdorf, 2005. 80-7345-071-2.

Soni a Slominski. 2016. Pathology Outlines. *Skin inflammatory (nontumor), Infectious disorders, Lyme disease.* [Online] Pathology Outlines, 1. únor 2016. [Citace: 9. červenec 2019.] http://www.pathologyoutlines.com/topic/skinnontumorlymedisease.html.

SpirochetesUnwound. 2009. Spirochetes Unwound. *Viewing the arrangement of Borrelia burgdorferi flagella by electron cryotomographyViewing the arrangement of Borrelia burgdorferi flagella by electron cryotomography.* [Online] 22. únor 2009. [Citace: 8. červenec 2019.] http://spirochetesunwound.blogspot.com/2009/02/viewing-arrangement-of-borrelia.html.

Stanek a Strle. 2018. Lyme borreliosis–from tick bite to diagnosis and treatment. *Microbiology reviews.* [Online] 23. 2 2018. [Citace: 9. 5 2019.] https://academic.oup.com/femsre/article/42/3/233/4904097.

Stanek, a další. 2011. ScienceDirect. *Lyme borreliosis: Clinical case definitions for diagnosis and management in Europe.* [Online] 2. 2 2011. [Citace: 4. 4 2019.] https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1198743X14609162#ceab10.

Storl, Wolf-Dieter. 2012. *Přírodní léčba boreliózy.* Praha : Pragma, 2012. 978-80-7349-356-1.

Suleyman. 2015. ScienceDirect. *A short history, principles, and types of ELISA,and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA.* [Online] říjen 2015. [Citace: 7. červenec 2019.] https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S019697811500131X. https://doi.org/10.1016/j.peptides.2015.04.012.

Synek, Nikola. 2014. Luhačovice.cz. *Luhačovice.* [Online] 16. prosinec 2014. [Citace: 12. červenec 2019.] http://www.luhacovice.cz/26967n-nova-klinika-se-venuje-zejmena-lecbe-boreliozy.

TestLine. 2019. Návod pro použití EIA Borrelia recombinant IgM/IgG. *TestLine.* [Online] červen 2019. [Citace: 21. únor 2020.]

—. 2017. Návod pro použití Microblot-Array Borrelia IgM/IgG . [Online] 2017. [Citace: 21. únor 2020.]

TestLine, Clinical Diagnostics s.r.o. 2019. TestLine Clinical Daignostics. [Online] 2019. [Citace: 7. listopad 2019.] https://www.testlinecd.com/.

Zajkowska, Joanna. 2014. Antibody Technology Journal. *Antibody-based techniques for detection.* [Online] Antibody Technology Journal, 30. červenec 2014. [Citace: 9. červenec 2019.] https://search.proquest.com/openview/d92e19bc15be79517f570e8322a45325/1?pq-origsite=gscholar&cbl=3933204. DOI:10.2147/ANTI.S39718.

FAKULTNÍ NEMOCNICE PLZEŇ
Útvar náměstka pro ošetřovatelskou péči
Edvarda Beneše 13, 305 99 Plzeň - Bory
alej Svobody 80, 304 60 Plzeň - Lochotín
IČO 00669806 tel.: 377 401 111, 377 103 111

Příloha 1

Vážená paní
Eliška Jará
Studentka 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 ošetřovatelskou péči FN Plzeň **uděluji souhlas** se sběrem informací o laboratorních metodách / analýzách a výsledcích těchto metod, používaných v *Ústavu mikrobiologie (MIKRO) FN Plzeň*. Tento souhlas je vydáván, při splnění níže uvedených podmínek, v souvislosti s vypracování Vaší bakalářské práce s názvem *„Diagnostika lymeské boreliózy“.*

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

- Vrchní zdravotní laborantka MIKRO souhlasí s Vaším postupem.
- Osobně povedete 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 na MIKRO, pod přímým vedením oprávněného zdravotnického pracovníka, kterým je paní ***Soušková Petra, Mgr., odborný pracovník v laboratorních metodách a přípravě léčivých přípravků, 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@fnplzen.cz

20. 1. 2020