

FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví B5345

Eliška Čadová

Studijní obor: Zdravotní laborant 5345R020

DIAGNOSTIKA LYMSKÉ BORELIÓZY

Bakalářská práce

Vedoucí práce: Mgr. Petra Soušková

PLZEŇ 2017

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

V Plzni dne

.....

vlastnoruční podpis

Poděkování

Chtěla bych poděkovat především Mgr. Petře Souškové za její vstřícnost, velmi cenné rady a trpělivost při tvorbě této bakalářské práce a za čas, který mi byla ochotna věnovat.

Anotace

Příjmení a jméno: Čadová Eliška

Katedra: Katedra teoretických oborů

Název práce: Diagnostika lymfské boreliózy

Vedoucí práce: Mgr. Petra Soušková

Počet stran – číslované: 39

Počet stran – nečíslované: 20

Počet příloh: 5

Počet titulů použité literatury: 29

Klíčová slova: *Borrelia burgdorferi*, borelie, *erythema migrans*, bakterie, spirochety, ELISA, Westernblot

Souhrn:

Tato bakalářská práce se zaměřuje na metody vyšetření nemoci lymfská borelióza. Skládá se ze dvou hlavních částí – teoretické a praktické. Teoretická část popisuje základní charakteristiku nemoci a vysvětluje, jaké metody se používají v laboratorní diagnostice tohoto onemocnění. Praktická část je zaměřena na šetření a vlastní výsledky, které jsou zaznamenány ve formě grafů. Při zpracování této bakalářské práce byla použita odborná literatura podle uvedeného seznamu.

Annotation

Surname and name: Čadová Eliška

Department: Department of Theoretical Fields

Title of thesis: Diagnosis of lyme disease

Consultant: Mgr. Petra Soušková

Number of pages – numbered: 39

Number of pages – unnumbered: 20

Number of appendices: 5

Number of literature items used: 29

Keywords: *Borrelia burgdorferi*, *Borrelia*, *erythema migrans*, bacterium, spirochetes, ELISA, Westernblot

Summary:

This Bachelor's thesis is concentrated on laboratory diagnostic methods of lyme disease. It consists of two main parts - theoretical and practical one. The theoretical part describes the basic character of disease and explains what methods are used in laboratory diagnostics of this disease. The practical part is focused on investigation and own results which are recorded in form of graphs. The specialized and reference literature by presented list was used during processing of this thesis

OBSAH

ÚVOD	10
TEORETICKÁ ČÁST	11
1 HISTORIE.....	11
2 ETIOLOGIE	12
2.1 Borrelia burgdorferi sensu lato (Bbsl).....	12
2.2 Přenašeči lymeské boreliózy a jejich výskyt.....	13
2.3 Vztah mezi klíštětem a bakterií	14
3 KLINICKÝ OBRAZ	15
3.1 Stádia lymeské boreliózy	15
3.1.1 Časně lokalizované stádium.....	16
3.1.2 Diseminované stádium	16
3.1.3 Pozdní perzistentní stádium	16
3.2 Postižení kůže.....	16
3.3 Postižení kloubů.....	17
3.4 Postižení nervového systému	18
3.5 Postižení dalších orgánů.....	19
4 TERAPIE	20
4.1 Druhy antibiotik	20
4.1.1 Léčba postižení kůže.....	20
4.1.2 Léčba postižení kloubů.....	21
4.1.3 Léčba postižení nervového systému	22
4.1.4 Léčba postižení ostatních orgánů.....	22
4.2 Přírodní léčba lymeské boreliózy	23
5 PREVENCE	24
6 DIAGNOSTIKA	25

6.1	Metody přímé	25
6.1.1	Kultivace borelií	25
6.1.2	Světelná mikroskopie v zástínu	26
6.1.3	Elektronoptický průkaz	26
6.1.4	DNA - hybridizace.....	27
6.1.5	Polymerázová řetězová reakce (PCR)	27
6.2	Metody nepřímé	27
6.2.1	Nepřímá imunofluorescence.....	27
6.2.2	ELISA	28
6.2.3	Westernblot (WB).....	28
	PRAKTICKÁ ČÁST	29
7	CÍLE PRÁCE	29
8	METODIKA.....	30
8.1	Biologický materiál	30
8.2	ELISA test	30
8.2.1	Princip testu EIA.....	30
8.2.2	Potřebné vybavení a reagentie	31
8.2.3	Příprava pracovních roztoků a ředění vzorků	33
8.2.4	Pracovní postup.....	33
8.2.5	Vyhodnocení	34
8.3	Westernblot.....	35
8.3.1	Princip metody.....	35
8.3.2	Potřebné vybavení a reagentie	35
8.3.3	Příprava pracovních roztoků a ředění vzorků	37
8.3.4	Pracovní postup.....	37
8.3.5	Vyhodnocení	38
9	VLASTNÍ VÝSLEDKY.....	42

10	DISKUZE.....	47
	ZÁVĚR.....	48
	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ.....	49
	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	52
	SEZNAM TABULEK.....	53
	SEZNAM GRAFŮ.....	54
	SEZNAM OBRÁZKŮ.....	55
	SEZNAM PŘÍLOH.....	56
	PŘÍLOHY.....	57

ÚVOD

Téma své práce jsem zvolila hlavně proto, že mám s lymfskou boreliózou vlastní zkušenost. Sama jsem si tímto onemocněním prošla a proto jsem posbírala informace, které jsou zaznamenány v této práci. Cílem práce je čtenáře seznámit s problematikou onemocnění lymfská, jinak také lymeská borelióza, které představuje nejrozšířenější antropozoonózu v ČR. Toto onemocnění má vysokou incidenci a jeho diagnostika není vždy jednoduchá, proto i léčba může být problematická. Dalším cílem je představit způsoby diagnostiky boreliózy, hlavní klinické příznaky a v neposlední řadě také možnosti terapie a prevence.

TEORETICKÁ ČÁST

1 HISTORIE

Nejstarší zmínka o lymeské borelióze pochází z 19. století, kdy v roce 1883 dermatolog Buchwald popsal *acrodermatitis chronica atrophicans* (ACA). O několik let později, roku 1909 byla popsána charakteristická *erythema migrans* a lymfocytom. Stejný vědec, tedy Afzelius, pak roku 1921 přišel na souvislost mezi skvrnou a přisátím klíštěte. *Erythema migrans* pak byla spojována také s poškozením nervového systému, čímž se zabývali Garin a Bojadoux. Ve 40. letech 20. století se pak Bannwarth zabýval řadou souvislostí mezi erythemou a multifokálním postižením nervového systému, stejně tak přibyla řada dalších různých názorů na tento problém, avšak nikdo nezjistil pravou příčinu vzniku. V roce 1948 přišel Lenhoff se speciální technikou průkazu spirochet v kožní biopsii a s tvrzením, že tyto bakterie mohou mít určitý podíl na vzniku *erythemy migrans* a ACA. Jeho názor byl však opuštěn, jelikož žádný z vědců jeho teorii nepotvrdil. Název onemocnění lymeská borelióza pochází z projektu, na který se v 80. letech 20. století zaměřil Steere. Probíhal nedaleko městečka Lyme. Steere se spolu se svými spolupracovníky zaměřil na epidemický výskyt zánětlivé artropatie u 39 dětí a 12 dospělých. Asi 59 % dětí tenkrát splňovalo kritéria pro juvenilní revmatoidní artritidy. Výsledkem bylo také potvrzení, že nemoc přenáší klíště typu *Ixodes dammini*. O pár let později byl objeven původce tohoto onemocnění, spirocheta, později pojmenovaná podle svého původce jako *Borelia burgdorferi*. Na III. mezinárodní konferenci v New Yorku, která se věnovala této problematice v roce 1987, byl pak doporučen název lymeská borelióza. První sérologický průkaz boreliózy u dětí proběhl v České republice v roce 1986 a hned o rok později také u dospělých. Později se u nás zkoumalo postižení srdce v rámci lymeské boreliózy a v roce 1995 Doc.MUDr. Bartůněk spolu s RNDr. Hulínskou prokázali borelie v myokardu. (1)

2 ETIOLOGIE

Lymeská borelióza patří mezi onemocnění bakteriální. Jejím původcem je bakterie spirocheta, která patří mezi jedny z nejstarších bakterií žijících na Zemi. Zde se vyskytují o miliardy let déle než lidé. Spirocheta v doslovném překladu znamená "svinutý vlas", jehož podobu tato bakterie skutečně má. Vlastní tenké tělo se spirálovitě vinutým tvarem. Spirochety se vyskytují v osmi různých rodech, kterými jsou: *Borrelia*, *Brachyspira*, *Brevinema*, *Cristispira*, *Leptonema*, *Leptospira*, *Spirochaeta* a *Treponema*. Z těchto rodů bylo prozatím identifikováno kolem 200 druhů těchto bakterií, pravděpodobně jich ale je něco kolem tisíce. Předpokládá se, že právě tyto, ještě neprobádané druhy spirochet jsou původcem spousty onemocnění, jejichž příčina dosud nebyla odhalena. Avšak ne všechny spirochety musí být zdraví škodlivé. Existují také druhy, které žijí například ve střevních traktech živočichů či člověka. Zajímavými druhy spirochet jsou ty, které žijí ve střevech termitů, kde pomáhají při trávení dřevěných vláken, která jsou termity pojídána. Lymeská borelióza je způsobována spirochetami z rodu *Borrelia*. I zde je více druhů bakterií, které jsou schopny přivodit toto infekční onemocnění. K těm nejvýznamnějším patří: *Borrelia burgdorferi*, *Borrelia afzelii* a *Borrelia garinii*. Existuje ale celá řada dalších druhů těchto bakterií, které jsou schopny vyvolat infekci, například *Borrelia japonica*, *Borrelia lonestari*, *Borrelia spielmanii* a jiné. Všechny tyto druhy jsou souhrnně označovány jako *Borrelia burgdorferi sensu lato* (tedy jako borelie "v širším slova smyslu"). (1, 3, 4)

2.1 *Borrelia burgdorferi sensu lato* (Bbsl)

Jedná se o skupinu gram-negativních bakterií, které se vyznačují tenkým, spirálovitě vinutým tvarem se závity, které jsou od sebe vzdáleny 2,2 μm a obvykle jich je 4-15. Jejich velikost je v řádech mikrometrů, nejčastěji o rozměrech 0,2 μm x 4-30 μm . Pohyb těchto bakteriálních buněk je umožňován bičíky, kterých se na nich vyskytuje 7-12 (některé patogenní druhy jich mají až 20). Bičíky vycházejí z obou pólů buňky bazálních disků, které jsou umístěny v cytoplazmatické membráně a obtáčejí tělo bakterie pod vnější buněčnou stěnou. Vnitřní i vnější strana bičíku je tvořena

glykoproteinem zvaným flagelin. Buněčná stěna je tvořena celkem třemi vrstvami: lipoproteinovou, která je vnější, dále střední tvořenou z lipopolysacharidů a vnitřní peptidoglykanovou. Je oddělena od cytoplazmatické membrány prostorem vyplněným periplazmou, která vyčnívá až za cylindrický prostor cytoplazmatické membrány. Vzdálenost mezi cytoplazmatickou membránou a vnějším obalem membrány je závislá na počtu bičíků. Vnitřní (peptidoglykanová) membrána je jednovrstevná, ostatní dvojevrstevné. Někdy může cytoplazma vytvářet výběžky z cylindrického prostoru do prostoru polárního. V případě vysunutí bičíků jsou z membrány vylučovány vezikuly, které podle některých zdrojů obsahují plasmidovou DNA. Schopnost vysouvání bičíků v distálním i proximálním směru udává flexibilitu membrány. Pohybem vnější membrány dochází také k posunu antigenních molekul proteinů a glykosaminopeptidových receptorů, které jsou v ní uloženy. Tento posun pomáhá při adhezi těchto bakterií k buňce hostitele. Bakterie infikují nejprve kůži, ze které se pak šíří do celého těla. (1, 2, 7)

2.2 Přenašeči lymeské boreliózy a jejich výskyt

K nejčastějšímu přenašeči lymeské boreliózy patří klíště *Ixodes ricinus*, tedy klíště obecné. Nelze ale vyloučit, že je možný přenos také od jiných živočišných druhů. Spekuluje se o tom, že by přenašečem mohl být komár, muchničky nebo roztoči. U nich ale přenos prokázán nebyl. Klíště obecné (*Ixodes ricinus*) je členovec řadící se mezi roztoče. Obvykle se vyskytuje v blízkosti listnatých lesů, kde trpělivě čeká na svého hostitele ve vysoké trávě či na nízkých keřích. Samička naklade oplozená vajíčka, ze kterých se vyvíjí larvy. Ty jsou velmi malé, přesto jsou ale schopny sát. Dalším vývojovým stádiem je tzv. nymfa, která je pro člověka z hlediska přenosu nemocí nejvíce nebezpečná. Posledním krokem vývojového cyklu klíštěte je tzv. imago, tedy dospělé klíště. Samec v dospělosti krev již nesaje, ale samice musí získat dostatek své potravy, aby mohla naklást vajíčka. Ve stádiu imaga je klíště velice odolné proti hladu (v některých případech dokáže hladovět až více než jeden rok). Jeho tělo je pokryto zřasenou kožovitou kutikulou, která mu umožňuje zvětšovat svůj objem. Proces sání je zajištěn bodavě sacím ústrojím, které se nazývá hypostomus. Je opatřen sensorickými brvami, jimiž klíště hledá vhodné místo

k přisátí. Než zvolí správné místo ke svému uchycení, může uplynout několik desítek minut až hodin. Současně se zabodnutím hypostomu do kůže hostitele vypouští enzym ixodin, který brání srážení krve. (5, 9, 10)

2.3 Vztah mezi klíštětem a bakterií

Jak již bylo zmíněno, vývojový proces klíštěte lze rozdělit do třech částí: jsou jimi larva, nymfa a imago. V každém z těchto stádií klíštěť sají pouze jednou, po úplném nasycení se přemění ve stádium následující (jedná-li se o larvu či nymfu) nebo naklade vajíčka v případě již dospělého klíštěte. Přenos borelií je prakticky možný do každého vývojového stádia klíštěte, dokonce i do nakladeného vajíčka, ten ale nebývá tak častý. V případě larev dochází k infikování 1-4% jejich celkového počtu. Jakmile se larvy přisají na svého hostitele, čímž je nejčastěji nějaký hlodavec, vypouštějí do jeho těla spolu se svými slinami směs chemických látek, které slouží jako signál pro borelie. Ty vstupují do krevního řečiště a putují do místa přisátí larvy, kudy se dostávají spolu s jejich potravou (krví) do střevní tkáně klíštěte, kterou okamžitě kolonizují. Klíšťata vlastní speciální receptor (TR) a obsahují látku TROSPA. Receptor se váže s proteiny, které se nacházejí na povrchu borelií. K nakažení klíštěte může prakticky dojít v jakékoliv fázi jeho života. Za několik hodin po přisátí nakaženého klíštěte na člověka se pak borelie dostávají do kůže hostitele. Ve chvíli, kdy tělo zaznamená přítomnost bakterií, se spustí zánětlivá reakce např. v podobě typické skvrny zvané *erythema migrans*. Pokud borelie v těle hostitele přežijí, začnou se šířit do jeho různých částí, nejčastěji do kloubů, nervů, mozku či srdce. (1, 4, 10, 11)

3 KLINICKÝ OBRAZ

Bakterie rodu *Borrelia* mají významnou schopnost rozpoznat prostředí, ve kterém se právě vyskytují. Jsou velice citlivé na změny, ke kterým v daném prostředí dochází. Tato schopnost může být z části dána procesem tzv. chemotaxe. Spirochety jsou velice citlivé na chemické změny, ať už jsou jimi přitahovány, nebo naopak odpuzovány. Rozlišují látky, které jsou potřebné pro jejich obživu, tedy cukry, tuky atd. i látky, které jsou pro ně škodlivé, například vysoké koncentrace kyslíku. Další zajímavou schopností je to, že borelie jsou schopny rozlišit různé druhy buněk svého hostitele, což jim také umožňuje vybrat si tkáň, ve které se usadí. Obvykle se jedná o klouby, oční sklivec, mozkové pleny nebo srdeční tkáň, tedy hlavně tkáně bohaté na kolagen.

Výskyt tohoto onemocnění je hlášen celoročně zejména kvůli své inkubační době, která trvá od 1 do 300 dnů. Nejvíce se ale objevuje v letním období, tedy od června do září. Postihnout může kteréhokoliv člověka v jakémkoliv věku, ať už se jedná o muže či ženu. (1, 2, 7, 9, 13, 14)

3.1 Stádia lymeské boreliózy

Nejčastěji se lymeská nemoc rozděluje do tří stádií: rané neboli časně lokalizované, diseminované a pozdní perzistentní. Rané stádium se projevuje během několika dnů či týdnů od počátku infekce. Borelie jsou v těle jen málo rozšířené a příznakem zde může být například typické *erythema migrans* neboli "býčí oko". V diseminovaném stádiu se pak bakterie postupně šíří do celého organismu. V této fázi onemocnění se již vytvářejí protilátky, na počátku IgM a později, cca po šesti týdnech IgG protilátky. Během pozdního stádia se může začít projevovat tzv. *acrodermatis chronica atropicans* (ACA), tedy poškození kůže, které se vyznačuje významnou atrofií. Průběh onemocnění je ale u každého člověka individuální. Některé fáze onemocnění mohou chybět nebo k nim může docházet až po měsících či letech od počátečního infikování klíštětem. (1, 15, 16)

3.1.1 Časně lokalizované stádium

Pro časně lokalizované neboli rané stádium lymeské boreliózy je nejtypičtějším znakem *erythema migrans* (viz příloha 1), které se vyskytne zanedlouho po proniknutí borelií do těla. Objevuje se ale pouze u některých pacientů, a pokud není zahájena léčba, skvrna časem sama vymizí. Další možností je výskyt příznaků nápadně podobných chřipce, jako je nevolnost, únava, nadměrné pocení, bolest hlavy a další. (15, 17, 18)

3.1.2 Diseminované stádium

V tomto stádiu, ke kterému dochází obvykle po několika týdnech, se bakterie dostává do mnoha orgánů v lidském těle. Infekce je schopna se manifestovat v nervovém systému, kde způsobuje například vznik meningitidy, encefalitidy nebo tzv. Banwarthova syndromu. Může také docházet k dalším kožním projevům nebo k zánětům šlach, svalů a kloubů nebo dochází ke konjunktivitidě neboli zánětu spojivek. Asi u 8% pacientů se pak borelióza může projevit jako kardiální onemocnění. (17, 18)

3.1.3 Pozdní perzistentní stádium

Příznaky pozdního stádia se mohou projevit po měsících, někdy až letech. Téměř vždy zde dochází ke vzniku polyneuropatií a poškození kloubů, nejčastěji kolena, loktu nebo ramena. Může docházet také k postižení kůže, konkrétně se jedná o ACA objevující se nejčastěji na akrálních částech končetin. K tomuto stádiu dochází většinou pouze výjimečně, například u pacientů, kteří současně trpí ještě jiným onemocněním. (16, 19, 20, 21)

3.2 Postižení kůže

Ve chvíli, kdy se borelie dostávají do těla hostitele, se začnou šířit tkáněmi. Jejich pohyb se projevuje již zmíněnou typickou skvrnou zvanou *erythema migrans* (viz příloha 1). Tento znak se ale nevyskytuje u všech pacientů. Nicméně když se typické *erythema* objeví, téměř jistě se jedná o lymeskou boreliózu. Obvykle je zbarvené do světle červené barvy, výjimečně pak do modrofialova. Vzniká v místě, kde došlo k přísátí klíštěte, a může dosahovat značných rozměrů. Má obvykle ostré ohraničení s centrálním

výbledem. Někdy je doprovázeno nízkou horečkou, mírnou zimnicí a únavou. Většinou je erytém pouze počátečním upozorněním na rozbíhající se boreliózu. Může tedy sám odeznít i bez léčby antibiotiky. Je známo více druhů *erythema migrans*: anulární (viz příloha 1), makulární a koncentrický. Kromě této skvrny může docházet také k jiným kožním projevům tohoto onemocnění. Dalším příkladem je tzv. boreliový lymfocytom, který lze jinak také nazvat *lymphocytoma cutis* a objevuje se v podobě modročervených uzlíků. U dětí se lymfocytom vyskytuje nejčastěji na ušním lalůčku (viz příloha 2), u dospělých pak na prsní bradavce, kde může způsobovat bolest. V postižených oblastech dochází k nahromadění lymfocytů a dalších zánětlivých buněk. Lymfocytom může být projevem i jiných případů, například často vzniká po očkování či tetování. V případě lymeské boreliózy se vyskytuje méně často než ostatní kožní projevy, avšak zaznamenán byl zejména ve východní Evropě. Posledním kožním příznakem lymeské boreliózy je tzv. acrodermatitis chronica atrophicans (ACA), která se častěji rozvíjí u žen než u mužů. U dětí se projevuje pouze výjimečně. Nejčastěji se vyskytuje ve formě kožního zánětu předloktí, nohou či prstů. Po několika měsících bez léčby může zánětlivá fáze přecházet ve fázi atrofickou, ve které je kůže velmi slabá až průsvitná. V postiženém místě se pak snižuje počet mazových a potních žláz a přestávají zde růst chlupy. Oblast je velice citlivá i na malé ranky, které mohou způsobit špatně se hojící vředy. Zmíněné kožní projevy jsou nejčastěji způsobeny druhem *Borrelia afzelii*. (1, 7, 14, 22)

3.3 Postižení kloubů

K dalším projevům lymeské nemoci patří postižení kloubů. Tato forma je nejčastěji způsobována druhem *Borrelia burgdorferi sensu stricto*. Bakterie se dostávají pod synoviální membránu kloubu, kde následně aktivují leukocyty a vyvolávají aktivitu zánětlivých cytokinů (jako je IL-1 či TNF- α) a hydrolytických enzymů. Vlivem působení zmíněných látek pak dochází k ničení buněk kloubní chrupavky. V případě, že v této fázi nejsou borelie zničeny příslušnými antibiotiky, může onemocnění přejít v perzistující infekci, která vyvolává opakované záněty kloubů či jejich přechod do chronického stádia. Nejčastěji jsou zasažené oblasti velkých kloubů jako je koleno, hlezno, rameno, zápěstí či loket. Postiženy mohou být ale také například šlachy.

Přemnožené borelie se v těchto oblastech projevují třemi různými způsoby. K bolestivým stavům může docházet například bez jakýchkoliv nálezů na kloubu či jeho okolí. Tento stav se označuje jako artralgie. Může být občasná, migrující i trvalá a téměř vždy ji doprovází únava, slabost, nevykonnost, někdy i horečnaté stavy. Dalším klinickým projevem může být artritida, což je kloubní zánět doprovázený otokem způsobeným zmnožením kloubního výpotku či zesílením kloubního pouzdra, způsobující bolest a omezení pohybu napadeného kloubu (viz příloha 3). Artritida se může projevit jak v časně fázi, tak v pokročilejších stádiích infekce. Ve stádiu pozdní diseminované infekce, které probíhá s odstupem několika měsíců až roků, pak může přecházet v chronickou formu. K tomu dochází nejčastěji u pacientů, u kterých byla léčba antibiotiky neúspěšná nebo nelze přítomnost borelií prokázat. Současně s artralgií i artritidou může probíhat již zmíněná ACA nebo změny struktury kostí jako je např. ztluštění periostu, které lze prokázat rentgenem. (1, 4, 7)

3.4 Postižení nervového systému

Spirochety způsobující lymeskou boreliózu mohou napadat také nervový systém. V takovém případě vzniká tzv. neuroborelióza, která je nejčastěji způsobována bakterií *Borrelia garinii*. Po průniku do nervového systému, kde bakterie se pohybují v mozkomíšním moku, poškozují neurony, mozkomíšní pleny i míšní kořeny. Kromě centrální nervové soustavy můžou borelie napadat také periferní nervy. Klinické příznaky neuroboreliózy mohou být různé. Vznikat může již do jednoho měsíce od nákazy. Pokud se nemoc objeví v časném diseminovaném stádiu onemocnění, projevuje se nejčastěji obrnou lícního a statoakustického nervu či pozánětlivým poškozením nervu zrakového. V případě, že se nevyskytne pro boreliózu typické *erythema migrans*, bývá příčina obrny zaměňována za izolovanou idiopatickou periferní obrnu lícního nervu a boreliová infekce zůstává neléčena. V časném diseminovaném stádiu lymeské nemoci pak často, hlavně u dospělých osob, dochází ke vzniku tzv. Bannwarthova syndromu. Ten se projevuje bolestmi hlavy a nervových kořenů, zejména v oblasti krční páteře. Někdy jej může provázet obrna svalů nebo hlavových nervů, nechutenství a únava. V pozdním diseminovaném stádiu

pak může docházet ke vzniku víceložiskového postižení nervového systému. Nejčastěji se popisuje vznik myelopatie či encefalopatie. (1, 3)

3.5 Postižení dalších orgánů

Kromě již zmíněných orgánů, mohou borelie postihovat také oči, uši nebo srdce. Do srdce se borelie dostávají ve druhém stádiu boreliózy a klinické příznaky jsou velmi podobné jiným onemocněním kardiovaskulárního systému. Typické jsou například poruchy srdečního rytmu, myokarditida nebo perikarditida. Tyto projevy pak způsobují bolesti na hrudi, dušnost nebo podmiňují vznik synkop. Dalším projevem lymeské boreliózy může být postižení oka, které bývá velmi různorodé a jeho výskyt je možný v každém stádiu onemocnění. V časném stádiu onemocnění dochází nedlouho po výskytu erythema migrans k tzv. konjunktivitidě, tedy zánětu spojivek, která je často doprovázena edémem víček. V pokročilejších stádiích je možný vznik závažnějších poruch funkce oka, mezi které patří například parézy okulomotorických nervů, neuropatie optického nervu, uveitida či městnavá papila. Ta může doprovázet meningitidu, při které dochází k nitrolební hypertenzi, vlivem čehož pak papila vzniká. I když k většině očních projevů lymeské nemoci dochází až v pokročilejších stádiích, v případě výskytu během časného stádia lze prokázat přítomnost bakterie přímo v oku. Pokud se bakterie dostane do uší, často zde způsobuje hučení nebo šelest. Někdy v důsledku tohoto problému dochází ke vzniku závratě. (1, 2, 18, 14)

4 TERAPIE

Léčba lymeské boreliózy, stejně jako léčba kterékoliv jiného onemocnění, by měla být zahájena co nejdříve od vzniku infekce. Ne vždy je ale tato nemoc odhalena již v raném stádiu, proto je léčba jednotlivých fází onemocnění často odlišná. (4)

4.1 Druhy antibiotik

Ideální čas pro nasazení antibiotik je období dělení bakterií, nemoc ale mohou vyvolávat také spící zárodky, které nemusejí být jednorázovou léčbou zničeny. Proto je někdy potřeba léčebný antibiotický proces opakovat. Typ antibiotik se volí podle toho, který orgán je bakteriemi napaden a o které stádium onemocnění se jedná. (1, 5)

V případě, že je onemocnění zjištěno již v rané fázi, podává se obvykle doxycyklin. Užívá se perorálně a v případě potřeby se může podávat i dlouhodobě. Také ale může dráždit žaludeční sliznici. U těhotných a kojících žen a dětí do 8 let se užívá amoxicilin. Lze jim podat také erytromycin či azitromycin, které jsou citlivější pro děti s alergií na některou ze složek antibiotik - například tetracykliny nebo peniciliny. V případě postižení kloubů nebo nervového systému se díky účinnému průniku do likvoru a synoviální tekutiny podává ceftriaxon, cefotaxim nebo penicilin G. K užívaným penicilinovým antibiotikům se pak přidává ještě metronidazol, který snižuje možnost výskytu cyst. (1, 6, 7)

4.1.1 Léčba postižení kůže

V případě postižení kůže je nutné rozlišit, o které ze třech zmíněných se konkrétně jedná. Erythema migrans a lymphocytoma boreliensis se obvykle léčí po dobu 14-21 dní. Všechny formy antibiotik jsou v tomto případě podávány perorálně. Rozdílné jsou také způsoby dávkování :

Amoxicilin 3 krát 1 g po 8 hodinách.

Doxycyklin 2 krát 100 mg po 12 hodinách nebo jednorázově 200 mg.

Fenoxymetyl penicilin se užívá 3 krát po 1000 mg

Cefuroxim axetil 2 krát po 500 mg.

Acrodermatitis chronica atrophicans (ACA) může být залéčena také amoxicilinem nebo doxycyklinem se stejným dávkováním jako v případě ostatních kožních poškození (viz výše). Doba léčby zde ale trvá 21-28 dní. Další možností léčby ACA je intravenózní podání ceftriaxonu 1x 2000 mg, cefotaximu 3 krát 2000 mg po 8 hodinách nebo penicilinu 4 krát 5 mil.j. po 6 hodinách. Intravenózní léčba se provádí po dobu 14 - 21 dní. (1, 14, 18)

4.1.2 Léčba postižení kloubů

V případě lymeské artritidy, tedy postižení kloubů, je doba léčby minimálně 4 týdny. Nejprve se podává Doxycyklin 2 krát denně po 100 mg. Pokud jej pacient špatně snáší nebo se u něj projevuje alergická reakce, mění se na amoxicilin v dávce 3 krát 500-1000 mg denně, nebo na cefuroxim, který se užívá 2 krát 500 mg denně. V případě, že léčba perorálními antibiotiky nezabírá, použije se aplikace intravenózní. Doba léčby je v tomto případě 15-30 dnů. O selhání terapie lymeské artritidy lze uvažovat až za delší časové období, tedy například po 2 - 3 měsících od skončení antibiotické léčby. Pokud se od počátku jedná o závažnější postižení, které je doprovázeno i dalšími systémovými projevy boreliózy, volí se ihned léčba parenterální. Jedná se o draselnou sůl benzylpenicilinu 20 mil.j./den, která je rozdělena do 4 dávek nebo o tzv. cefalosporiny 3. generace. To je typ antibiotik, která mají širší záběr než cefalosporiny ostatních generací, proto se v běžné praxi nepoužívají. Parenterální léčba je sice neúčinnější, ale také ekonomicky nejnáročnější. Obvykle trvá 14-28 dní, podává se ceftriaxon v jedné dávce a množství 2 g/den nebo cefotaxim, který je rozdělen do tří dávek po 8 hodinách a množství 6 g/den. (1, 2, 4, 6)

Postižení kloubů, ať už artritidy nebo artralgie, odeznívají po dobu několika měsíců. Je tedy možné, že někteří pacienti mají přetrvávající problémy i nějaký čas po zaléčení infekce antibiotiky. Opakování léčby by se mělo zvažovat až ve chvíli, kdy lze s jistotou říci, že se jedná o perzistující boreliovou infekci. Vhodné je také doplnit běžnou antibiotickou terapii fyzioterapeutickým cvičením a cílenou rehabilitací postižených kloubů. (2, 18)

4.1.3 Léčba postižení nervového systému

Pokud je postižení nervového systému, tedy neuroborelióza, potvrzena typickým nálezem bakterií v moku a dalšími metodami, kterými jsou například sérologie či PCR, ihned se nasadí parenterální léčba. Jedná se o ceftriaxon v dávce 2 g/den, který je podáván po dobu dvou týdnů. V případě dalších potíží či pozitivním nálezů v mozkomíšním moku lze podávat i po dobu třech týdnů. Další z možností parenterální léčby je cefotaxim nebo ceftizoxim po dobu dvou týdnů. U lymeské boreliózy, zejména pak pokud postihuje právě nervový systém, mohou vznikat obavy z perzistence bakterií. Proto se po skončení parenterální léčby často nasazují další antibiotika. Může se jednat například o doxycyklin, který se podává po dobu 14-21 dnů v dávce 200 mg/den. Další možností doléčení je perorální podání cefuroxim v dávce dvakrát 500 mg/den. V některých případech se zkoušely různé druhy chemoterapeutik, například metronidazol nebo některá antimalarika. K neuroborelióze patří také typický únavový syndrom, který lze řešit podáním imunomodulancií, kterými jsou například prinozin, levamizol a další. V některých případech se připouští i krátkodobé užívání kortikosteroidů, které mají protizánětlivé a imunosupresivní účinky. Pokud je neuroborelióza provázena nějakým typem deprese, mohou pacientům ulevit antidepresiva. (1, 4, 7, 9)

V případě rozvinuté neuroboreliózy, která je provázena depresemi a případně také poškozením pohybového aparátu s poruchami hybnosti, často pomáhají pacientům pobyty v lázních. Příznivě působí lázně, které mají zkušenosti s léčbou nemocných, jež trpí potížemi po prodělaných infekčních chorobách. Příkladem takových zařízení na našem území jsou například lázně v Bardějově, Jeseníku, Karviné, Teplicích, Třeboni nebo Janské Lázně. Pozitivní léčebné účinky přináší ale také lázně na Slovensku, například ve vyhlášených Piešťanech. (4)

4.1.4 Léčba postižení ostatních orgánů

Jak již bylo zmíněno, borelie mohou postihovat také další orgány. Pokud je bakteriemi napadeno srdce, jedná se o tzv. lymeskou karditidu. Ta je obvykle léčena doxycyklinem po dobu 14-21 dní, jedná-li se o lehčí formu. V případě těžších forem se podává penicilin-G v dávce třikrát 3 g/den po stejnou dobu jako doxycyklin. Další léčba je pak udávána podle typu postižení srdce.

V některých případech je nutná dočasná zevní kardiostimulace. Pokud se jedná například o tachyarytmii, jsou podávána antiarytmika a současně se provádí kontinuální monitorace. V případě srdeční nedostatečnosti musí být navozena vazodilatační a diuretická léčba spolu se současnou oxygenoterapií. (1, 4, 7)

4.2 Přírodní léčba lymeské boreliózy

Kromě antibiotické léčby je známo také pár účinných bylin, které mohou posloužit jako léčba doplňková. K úplnému léčebnému režimu jej užívají hlavně lidé, kterým antibiotická léčba selhala, odmítají antibiotika užívat nebo k nim mají špatnou snášlivost, avšak není vědecky prokázáno, že léčba pomocí bylin pravdu funguje. U některých jedinců může například docházet k potížím v gastrointestinálním traktu, hlavně podráždění žaludku. Proto je velmi důležité i zde dodržovat přesné dávkování a při případných potížích jej snížit. Další kontraindikací přírodní léčby může být také těhotenství. Pro podporu léčby lymeské boreliózy jsou známy hlavně tři byliny: právenka latnatá (*Andrographis*), křídlatka japonská (*Polygonum cuspidatum*) a kočičí dráp (*Uncaria tomentosa*). K doplňkovým bylinám pak patří kozinec a smilax. (4)

5 PREVENCE

Nejlepší prevencí onemocnění lymeskou boreliózou je vyhýbání se klíšťatům a jejich přisátí. Proto je více než vhodné se například před výpravou do lesa chránit použitím repelentů a nosit zde oblečení, které nám co nejvíce zakrývá kůži. V případě, že k přisátí klíštěte i přes tato opatření dojde, je vhodné jej odstranit co nejdříve. Nejprve se místo přisátí vydezinfikuje. Vhodný je například přípravek Jodisol, použít se ale může i běžná dezinfekce jako je například Septonex. Poté se pomocí pinzety a krouživého pohybu klíště pomalu snažíme odstranit, aniž bychom jej přetrhli nebo nějak poškodili. Po odstranění se postižené místo opět dezinfikuje a po několik dalších dní, raději však týdnů se sleduje, jestli zde nedochází k zarudnutí či tvorbě erytému (viz příloha 4). (2, 5, 10, 12)

První zkušenost s vakcínou proti lymeské borelióze proběhla v roce 1990 v USA, ta se dala ale použít jen na psy a nebyla doporučována k humánním účelům. Až v roce 1998 byla opět v USA nalezena možnost vakcinace, tentokrát také člověka. Navzdory její funkčnosti byla v roce 2002 její výroba zastavena. Jako důvod byla uvedena nedostatečná poptávka po vakcíně. Skutečným důvodem bylo ale údajně to, že vakcína způsobovala u některých očkovaných jedinců projevy tohoto onemocnění a měla negativní účinky na srdeční činnost. (1, 10)

V současné době se do vývoje vakcíny proti lymeské nemoci zapojuje také Česká republika. V roce 2014 vyhrál projekt s názvem "Rekombinantní vakcína proti lymeské borelióze" 3. místo v soutěži Nejlepší spolupráce roku. Jedná se o vakcínu, která navozuje dostatečnou hladinu protilátek u myší, psů a koček proti třem základním kmenům bakterií způsobujících toto onemocnění. Na trhu by se měla objevit v roce 2019, prozatím ale pouze pro veterinární účely. (8)

6 DIAGNOSTIKA

Stejně jako řada dalších onemocnění i diagnostika lymeské boreliózy má určitá úskalí. Například to, že protilátky ve třídě IgM mají pouze krátký biologický poločas, často tedy signalizují akutní fázi infekce. V krvi se manifestují během třetího týdne od počátku infekce, k jejich vrcholu dochází obvykle kolem šestého týdne a od osmého týdne opět mizí. Naopak protilátky IgG mohou přetrvávat v těle mnohem déle, roky až desetiletí a to i po úspěšně zaléčené infekci. (1, 7)

K diagnostice lymeské boreliózy se využívají řady metod, které fungují na principu přímém či nepřímém. (15)

6.1 Metody přímé

Přímé metody diagnostiky slouží k průkazu borelií v biologickém materiálu, kterým může být například moč, likvor, krev, kloubní výpotek nebo tekutina sklivce v případě postižení oka. K přímému průkazu se využívají metody kultivace, světelné nebo elektronové mikroskopie, histologický průkaz nebo metody DNA-hybridizace a polymerázová řetězová reakce. Obecně se však pro nízkou záchytnost v běžné praxi používají méně než metody nepřímé. (1, 2)

6.1.1 Kultivace borelií

Kultivace těchto bakterií se obvykle využívá zejména pro výzkumné účely. V klinické praxi se užívá většinou pouze pro potvrzení diagnózy. Jedná se o poměrně náročnou metodu. Kultivační půdy pro růst borelií musí být obohacené o králičí nebo koňská séra, která jsou zbavena protilátek proti nim. Současně jsou do půd přidávány aminokyseliny a vitaminy. Nejprve se provádí kultivace statická po dobu 14 dnů, kdy dochází u bakterií k intenzivnímu nárůstu. Poté se přechází na kultivaci kontinuální s použitím nových půd a čtyřdenním intervalem. Růst bakterií je ovlivněn spoustou fyzikálních i chemických faktorů jako je osmotický tlak, sluneční světlo, ultrafialové záření, oxidoredukční potenciál, pH, které by mělo být 7,5 a samozřejmě teplota, která by se měla pohybovat kolem 34-35°C. Odběry pro kultivaci bakterií se musí

provádět vždy za sterilních podmínek, ať už se jedná o jakýkoliv biologický materiál. V některých případech se podařilo bakterie vykultivovat přímo z klíštěte. (1, 2, 7)

6.1.2 Světelná mikroskopie v zástínu

Tato metoda se nejčastěji používá k průkazu pohyblivých borelií přímo v klíštěti. Její pomocí lze stanovit, v jakém vývojovém stádiu se klíště nachází a jak moc infikované je. Mikroskopicky se vyšetřují hlavně klíšťata z určitých lokalit, která jsou dodávána například z hygienických stanic. Pozitivní nálezy jsou pak ještě ověřovány pomocí PCR metody. (1, 2)

Dalším mikroskopickým vyšetřením je metoda podle Larssona a Bergstroma, která je založena na dvoufázové optimalizované centrifugaci spirochet z krve nebo nasátých klíšťat. První centrifugování je prováděno při 500 g a trvá 5 minut. Supernatant je tak zbaven erytrocytů a většina borelií zůstane v plazmě, která se přenesse do nové zkumavky. Druhá centrifugace probíhá při 5000 g po dobu 10 minut. Vzniklý pelet se pak může rozetřít na sklíčko, obarvit a mikroskopovat nebo jej lze použít ke kultivaci či PCR metodě. (1, 24)

6.1.3 Elektronoptický průkaz

Pomocí elektronového mikroskopu se stanovuje zejména morfologie bakterie, tzn. její stavba, počet bičků a stavba buněčné membrány. Principem elektronoptického průkazu je reakce antigenu s monoklonální protilátkou. Používaným materiálem mohou být tenké ultrařezy nebo buněčný sediment, který se získává centrifugací. K barvení se využívá 1% kyselina fosfowolframová nebo 1-8% uranylacetát.

Imunosorbentní elektronová mikroskopie (ISEM) využívá specifickou protilátku, která je navázána na pevném sorbentu. Tím je v tomto případě mikroskopická síťka s formvarovou blankou. S touto protilátkou pak antigen reaguje. Následně dochází k další reakci antigenu, tentokrát s monoklonální protilátkou, která je označena imunohistochemicky nebo barvena koloidním zlatem. (1, 2, 7, 24)

6.1.4 DNA - hybridizace

Metoda DNA-hybridizace přímo prokazuje přítomnost deoxyribonukleové kyseliny (DNA). Využívá se próba, která je uměle vytvořená z DNA mikroba a označená radioaktivním izotopem se známou sekvencí. Próba je fixována na membránovém nosiči, kterými jsou nejčastěji nitrocelulóza nebo čipy. Materiálem k provedení této metody bývá nejčastěji krev, izolovat se může ale také z likvoru, moče nebo kloubního výpotku. (1,2)

6.1.5 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Jedná se o metodu, která je mnohem citlivější než DNA-hybridizace. I zde se prokazuje DNA borelií. K nejúspěšnějším záchytům dochází hlavně v případě vyšetření kloubního výpotku, méně úspěšné jsou pak záchyty v mozkomíšním moku. PCR využívá cyklické střídání teplot, při kterém se mnohonásobně množí cílová DNA-sequence. K provedení metody je potřeba enzymu DNA -polymeráza a také příslušných primerů. Nevýhodou je hlavně to, že velmi snadno dochází ke kontaminaci vzorku, proto se musí dbát na přípravnou fázi vyšetření. (1, 25)

6.2 Metody nepřímé

Nepřímé metody diagnostiky lymeské boreliózy jsou mnohem citlivější, tedy i využívanější v rutinní praxi než metody přímé. Na principu imunoenzymatického průkazu specifických antiboreliových protilátek funguje metoda ELISA nebo nepřímá imunofluorescence IFA. Další z nepřímých metod je takzvaný Westernblot (WB), který se považuje za nejspolehlivější. V současné době se diagnostika lymeské boreliózy opírá právě o tyto sérologické metody, přímé metody pak slouží spíše jako doplňkové nebo se využívají k výzkumným účelům. (1, 23)

6.2.1 Nepřímá imunofluorescence

Nepřímá imunofluorescence je založena na principu reakce protilátek IgM a IgG se substrátem, který obsahuje borelie a je nanesen na sklíčku. Protilátky značené fluorescenčním barvivem se pak projevují buď zeleně, při pozitivním nálezu borelií, nebo červeně v případě negativity. V běžné praxi se ale

imunofluorescence neužívá, hlavně proto, že má výrazně nižší senzitivitu i specificitu než ostatní nepřímé metody. (1, 2)

6.2.2 ELISA

ELISA je jeden z nejužívanějších sérologických testů, zejména díky své vysoké citlivosti. Funguje na principu průkazu specifických antiboreliových protilátek IgM i IgG imunoenzymatickou reakcí. Protilátky lze prokázat v krevním séru, likvoru nebo kloubním, tedy synoviálním výpotku pacienta. V současné době se na trhu vyskytuje řada komerčních souprav umožňujících použití této metody, například soupravy od firmy Test-Line, Abott, Euroimmun atd. Soupravy často využívají antigen OspA (31, 32, 32,5 kD), OspC (22, 23, 25 kD) a další. Nevýhodou využití těchto antigenů je jejich schopnost způsobit zkříženou reaktivitu s jinými viry nebo bakteriemi jako je například *Treponema pallidum* způsobující onemocnění syfilis. Vlivem této vlastnosti pak může docházet k falešně pozitivním výsledkům. (1, 2, 23)

Senzitivita ELISA metod se zvýšila díky vytvoření testů s rekombinantními antigeny VlsE, OspA, OspC, OspE a DbpA. Výhodou použití těchto antigenů je i potlačení zkřížené reaktivity. Nevýhodná je ale jejich nedostatečná specificita pro různé druhy borelií a také protilátky proti jednotlivým antigenům, které se v některých případech objevují později nebo je nelze stanovit vůbec. K vyloučení falešně negativních či pozitivních výsledků se využívá metoda Westernblot. (1, 7)

6.2.3 Westernblot (WB)

Westernblot je metoda, kterou se potvrzují všechny pozitivní a hraniční protilátky. Často se provádí společně s vyšetřením ELISA. Ta slouží zejména k vyhledávání, WB je pak metodou ověřovací. Aby tedy byla diagnostikována lymeská borelióza, musí vyjít pozitivně vyšetření u obou těchto metod a zároveň lékař musí posoudit klinické projevy onemocnění. Bohužel i zde se hůře zachycují protilátky, které se vyskytují později nebo vůbec, i přesto je ale WB citlivější než metoda ELISA. Funguje na stejném principu, v případě Westernblotu ale nejsou využívány mikrotitrační destičky, ale antigeny jsou navázány na imunoblotových stripech. (1, 25)

PRAKTICKÁ ČÁST

7 CÍLE PRÁCE

Jako cíle své práce jsem zvolila:

Shromáždit a zpracovat informace o daném tématu

Připravit přehled o možnostech průkazu lymeské boreliózy

Vyhodnotit vzorky pacientů vybranými metodami

Získat přehled o problematice a možnostech průkazu tohoto onemocnění

8 METODIKA

8.1 Biologický materiál

Výsledky vyšetření obsahují patientské vzorky z celého roku 2016. Vyšetření se prováděla ve Fakultní nemocnici Plzeň na oddělení sérologie a parazitologie. Použitým materiálem byl punktát, sérum a likvor. Vyšetřovalo se metodami Westernblot a ELISA.

8.2 ELISA test

Test ELISA je založen na reakci antigenu s protilátkou. Je známo více druhů tohoto testu, v tomto případě byla využívána tzv. sandwichová ELISA. Ta obsahuje pevnou fázi v podobě mikrotitrační destičky, na kterou jsou navázány specifické antigeny. Pokud příslušný vzorek obsahuje protilátky, které stanovujeme, dochází k reakci antigen-protilátka po přidání vzorku do jamek destičky. Součástí je také značená protilátka. (26, 27)

8.2.1 Princip testu EIA

K provedení testu se využívá mikrotitrační destička, v jejichž jamkách jsou navázány antigeny, na které se váží specifické protilátky obsažené ve vzorku. Poté se na tento komplex váže přidaná zvířecí protilátka proti lidskému séru (IgG, IgM), která je označena křenovou peroxidázou. Tato reakce je pak detekována pomocí chromogenního substrátu s TMB (tetramethylbenzidin). Jedná-li se o pozitivní výsledek, dojde k modrému zbarvení. Následně se přidá tzv. zastavovací roztok kyseliny, který jej změní na žlutou barvu. Intenzita zbarvení se měří na fotometru při vlnové délce 450 nm a je úměrná koncentraci specifických protilátek IgG/IgM ve vzorku.

V případě, že se stanovuje antiboreliová protilátka třídy IgG, využívá testovací souprava kombinaci antigenů *Borrelia burgdorferi* s.l.: VlsE, p83, vnitřního flagelinu – p41i, p39, OspC a p17. Pokud je testovanou protilátkou IgM, využívají se antigeny: OspC, vnitřního flagelinu-p41i a p39. (26, 27)

8.2.2 Potřebné vybavení a reagentie

Používané, komerčně dostupné soustavy jsou tvořeny :

Potaženou mikrotitrační destičkou s navázaným antigenem 12 x 8 jamek.
Po dvou kusech se sušidlem.

Negativní kontrolou, kterou je roztok bez specifických lidských protilátek proti boreliím, ve 2 ml.

Cut - off, tedy roztok obsahující specifické lidské protilátky proti borelióze v hraničních koncentracích, ve 3 ml.

Pozitivní kontrolu se specifickými lidskými protilátkami proti boreliím ve 2 ml.

Konjugát, což je roztok se zvířecím imunoglobulinem proti lidským IgG nebo IgM. Značený je křenovou peroxidázou a je zde obsažen ve 28 ml.

Ředící roztok - pufr obsahující stabilizátory bílkovin, 1 x 105 ml.

TMB - Complete, jednosložkový substrátový roztok, který obsahuje tetramethylbenzidin a peroxid vodíku. Vyskytuje se v objemu 28 ml.

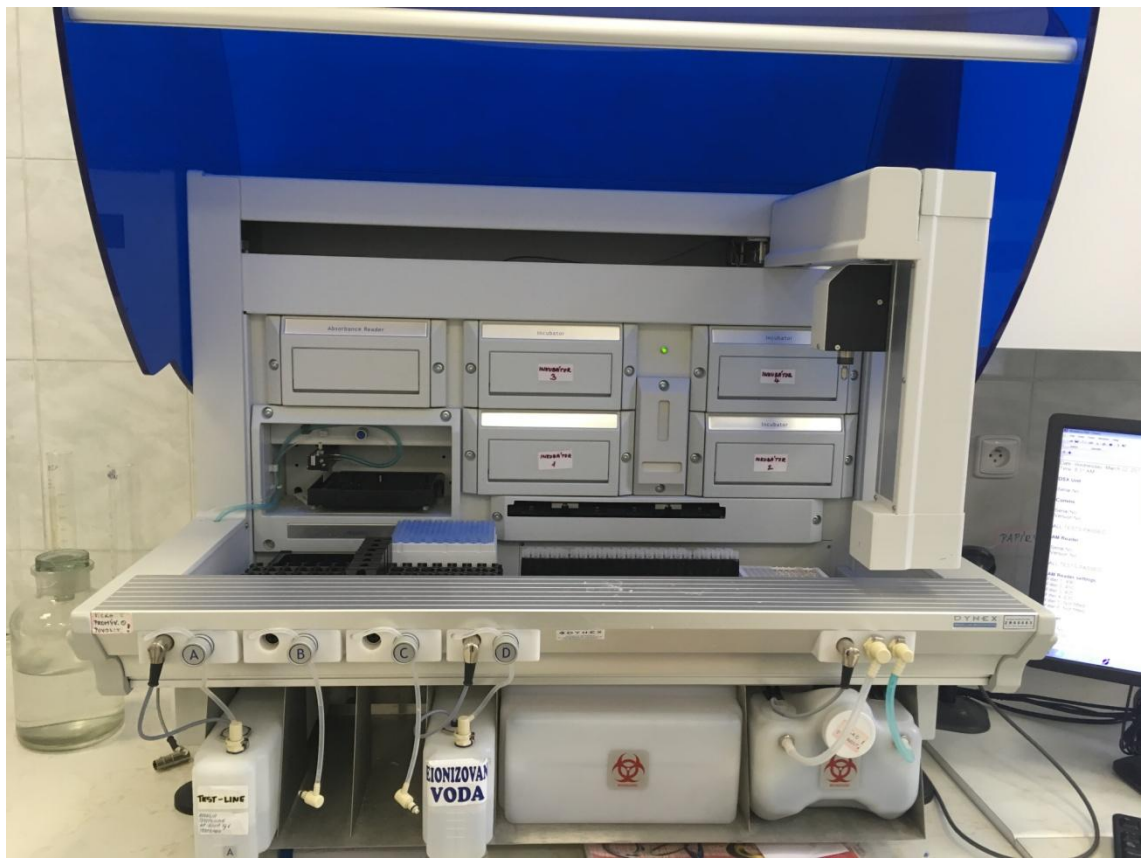
Promývací roztok, koncentrovaný pufr, 2 x 75 ml.

Zastavovací roztok, který obsahuje kyselinu, ve 28 ml.

(26, 27)

Testy EIA byly prováděny na analyzátoru DSX ve Fakultní nemocnici Plzeň.

Obr. č. 1: Analyzátor DSX pro test ELISA



Zdroj: Foceno ve Fakultní nemocnici Plzeň Bory

Pokud není k dispozici analyzátor a metoda se provádí manuálně, je kromě přístrojového vybavení je potřeba využít také :

Termostat

Stopky

Promývací zařízení

Jedno a vícekanálové pipety od 10 do 1000 μ l

Fotometr

(26, 27)

8.2.3 Příprava pracovních roztoků a ředění vzorků

Promývací roztok se ředí v poměru 1+19. V případě, že se v něm vytvoří krystalky solí, je potřeba jej zahřát a rozpustit ve vodní lázni před provedením testu. Konjugát ani TMB - Complete se dále neředí.

Pozitivní ani negativní kontrola se již neředí, stejně tak Cut - off. Vzorky sér se ředí pomocí ředícího roztoku v poměru 1+100. Pokud je testovaným materiálem mozkomíšní mok (likvor), ředí se v poměru 1+1 s ředícím roztokem. V případě stanovení specifických protilátek ze synoviální tekutiny kloubů se ředí v poměru 1+20 a 1+40 s ředícím vzorkem. (26,27)

8.2.4 Pracovní postup

V dnešní době se využívá spíše automatizovaných postupů, ale test lze provádět i ručně:

1) Po naředění vzorků příslušným roztokem je potřeba připravit mikrotitrační destičku podle příslušného pracovního schématu :

První jamka, tedy A1 zůstává prázdná. Využívá se jako blank neboli slepá zkouška.

Do druhé jamky, kterou je B1, napipetujeme 100 µl negativní kontroly.

Ve třetí a čtvrté jamce, tedy C1 a D1 bude po 100 µl Cut - off.

Do jamky E1 se pak napipetuje 100 µl pozitivní kontroly.

Zbývající jamky se vyplní příslušnými, správně naředěnými vzorky, které se také pipetují po 100 µl.

2) Destička se přikryje víčkem a nechá se inkubovat 30 minut při 37°C

3) Po skončení inkubace se obsah jamek odsaje a pomocí promývacího roztoku se 5 krát promyje. Je potřeba jamky plnit až po okraj, aby došlo k důkladnému promytí.

4) Následně se do všech jamek kromě jamky A1, ve které je umístěn blank, napipetuje po 100 µl konjugátu.

5) Opět se destička přikryje víčkem a dochází ke druhé inkubaci. Opět se jedná o 30 minut při 37°C.

6) Poté se opět odsaje obsah jamek a promyje se, opět 5 krát.

7) Nyní se do všech jamek včetně A1, ve které je umístěn blank, napipetuje 100 µl substrátu TMB - Complete.

8) Dochází ke třetí inkubaci, tentokrát ale jen po dobu 15 minut při 37°C.

9) Po skončení inkubace se do všech jamek přidá zastavovací roztok, opět 100 µl.

10) Ideálně do 30 minut po přidání zastavovacího roztoku se měří intenzita zbarvení roztoků v jamkách na fotometru při vlnové délce 450 nm proti blanku, který je umístěn v jamce A1. (26, 27)

8.2.5 Vyhodnocení

Výsledky testu u sér a likvorů se hodnotí pomocí indexu positivity (IP), který se počítá dělením absorbance příslušného testovaného vzorku průměrnou absorbancí Cut - off. Pokud je index positivity menší než 0,9, pak je výsledek negativní. Vyjde-li v rozhraní mezi 0,9 - 1,1 jde o hraniční hodnocení. V případě, že je IP vyšší než 1,1, je výsledek pozitivní.

Pokud vyjde hraniční výsledek, je potřeba test zopakovat za 3 - 6 týdnů z nového odběru materiálu. (26, 27)

V případě vyšetření ze synoviální tekutiny (punktátu) je potřeba vyhodnotit index pozitivitu ze dvou různých ředění vzorku: 1+20 a 1+40. Hodnotí se podle následující tabulky :

Tab. 1 Interpretace výsledků vyšetření synoviální tekutiny

Vzorek	Ředění 1+20	Ředění 1+40	Celkové hodnocení
	IP	IP	
Vzorek X	< 1,0	< 1,0	negativní
Vzorek Y	> 1,0	< 1,0	hraniční
Vzorek Z	> 1,0	> 1,0	pozitivní

Zdroj : TEST LINE- návod na provedení EIA *Borrelia recombinant* IgG/IgM.

8.3 Westernblot

Jedná se o velmi citlivou metodu, která je schopna zachytit i velice malé množství specifické protilátky ve vzorku. Je náročnější na provedení než ELISA a využívá se zejména tehdy, když při vyšetření metodou EIA vyjde hraniční či pozitivní výsledek, tedy hlavně jako metoda potvrzovací. V současnosti je dostupná v mnoha komerčních soupravách, které snižují její náročnost, ale jsou poměrně nákladné.

8.3.1 Princip metody

Součástí komerční soupravy značky EUROLINE jsou testovací stripy, které jsou potaženy antigeny. V prvním kroku dochází k inkubaci vzorků společně se stripy, a pokud jsou ve vzorku přítomné protilátky IgG či IgM, navazují se na příslušné antigeny. Ty se pak detekují pomocí protilátek proti lidským IgG nebo IgM, které jsou značené enzymem a jsou schopny vyvolat barevnou reakci. (28, 29)

8.3.2 Potřebné vybavení a reagentie

Komerčně dostupné soupravy obsahují :

Testovací stripy, které jsou potaženy antigeny, po 32 ks.

V případě testování protilátek IgM jsou využívány antigeny: p41, p39, OspC Ba, OspC Bb, OspC Bg a VlsE. (28)

V případě testování protilátek IgG jsou to: p18, p19, p20, p21, p58, OspC (p25), p39, p83, LBb, LBa, VlsE Bg, VlsE Bb a VlsE Ba. (29)

Pozitivní kontrolu, což je lidská protilátka IgM či IgG a je 50 krát koncentrovaná - 2x 0,04 ml.

Enzymový konjugát, kterým je 10 krát koncentrované anti-lidské IgG/IgM značené alkalickou fosfatázou. V objemu 2x3 ml

Univerzální pufr, který je koncentrovaný 10 krát, ve 100 ml

Substrátový roztok - 2x 30ml

(28, 29)

Obr. č. 2: Vyhodnocení metody Westernblot pomocí EUROLiNEscan-Protokol

EUROLiNEscan - Protokol

Strana 1 1

Protokol: WB Lyme Datum: _____
 Operátor: _____ Tisk: _____

Č	Patient / Test	Lot	Strip
1	BorrEL_IgM		Bor-M/ 08-104
2	BorrEL_IgG		Bor-G/ 64-39
3	BorrEL_IgM		Bor-M/ 08-105
4	BorrEL_IgG		Bor-G/ 64-40
5	BorrEL_IgM		Bor-M/ 08-106
6	BorrEL_IgG		Bor-G/ 64-41
7	BorrEL_IgM		Bor-M/ 08-107
8	BorrEL_IgG		Bor-G/ 64-42
9	BorrEL_IgM		Bor-M/ 22-17
10	BorrEL_IgG		Bor-G/ 57-16
11	BorrEL_IgM		Bor-M/ 22-18
12	BorrEL_IgG		Bor-G/ 57-17
13	BorrEL_IgM		Bor-M/ 22-19
14	BorrEL_IgG		Bor-G/ 57-18

EUROLiNE Borrelia IgM
 Značka, Kontrola, Anti-human-IgM, Anti-human-IgG, OspC Borrelia garinii, OspC Borrelia burgdorferi, OspC Borrelia afzelii, BmpA, Flagelin, VlsE Borrelia burgdorferi

EUROLiNE Borrelia IgG
 Značka, Kontrola, Anti-human-IgM, Anti-human-IgG, BB_P38, BB_N38, BB_Q03, BB_K53, BB_A34, OspC, BmpA, Flagelin, p83, Lipid Borrelia burgdorferi, Lipid Borrelia afzelii, VlsE Borrelia garinii, VlsE Borrelia burgdorferi, VlsE Borrelia afzelii

Zdroj: Foceno ve Fakultní nemocnici Plzeň Bory

8.3.3 Příprava pracovních roztoků a ředění vzorků

Před počátkem ředění je potřeba nechat všechny reagenty alespoň 30 minut vytemperovat na pokojovou teplotu, která se pohybuje od 18 do 25°C. Poté je potřeba naředit univerzální pufr, který je 10 krát koncentrovaný a ředí se destilovanou vodou v poměru 1+10. Pomocí naředěného pracovního pufru se pak ředí další roztoky. Kontrola, která je 50 krát koncentrovaná se ředí v poměru 1+50 s univerzálním pufrům a enzymový konjugát (10 krát koncentrovaný) se s pufrům ředí v poměru 1+10. Substrátový roztok se ředit nemusí, ale je potřeba ho po použití ihned zavřít, jelikož jeho složky jsou citlivé na světlo.

Kromě reagentů je potřeba naředit také vzorky. K tomu slouží naředěný univerzální pufr. Pacientským vzorkem je nejčastěji sérum, které se ředí v poměru 1+50, méně punktát v poměru 1+5 nebo likvor v poměru 1+4. (28, 29)

8.3.4 Pracovní postup

Test probíhá na analyzátoru Profiblot a kromě bodu 1 a napipetování vzorků v bodě 4 se vše provádí automaticky.

1) Z dodávaných komerčních setů se vyjme potřebný počet stripů. Ty se pak umístí do prázdných žlábků vaničky. Je potřeba, aby byl každý strip důkladně popsán.

2) Poté se do inkubační vaničky napipetuje 1,5ml univerzálního roztoku a nechá se inkubovat 15 minut za stálého kývání při pokojové teplotě.

3) Po 15 minutách se odsaje ze žlábků všechn obsah.

4) Pak se každý žlábek naplní naředěnými vzorky. Přidávají se také v objemu 1,5 ml a nechají se inkubovat 30 minut při pokojové teplotě za stálého kývání.

5) Po skončení inkubace se veškerá tekutina ve žlábcích opět odsaje. Je potřeba jednotlivé žlábky promýt. To se provádí pomocí univerzálního pufru v objemu 1,5 ml za stálého kývání. Celkem dochází k promytí 3 krát po 5 minutách.

6) Dále se do žlábků přidá enzymový konjugát a opět se nechá inkubovat za stálého kývání 30 minut při pokojové teplotě.

7) Vše se opět odsaje a promyje univerzálním puforem za stálého kývání 3 krát po 5 minutách.

8) Poslední pipetovanou reagensí je roztok substrátu opět v objemu 1,5 ml. Ten je potřeba inkubovat za stálého kývání pouze 10 minut.

9) Pak dochází ke stopovací reakci. Znovu se odsají veškeré roztoky a dochází k promývání 3 krát po 1 minutě. Tentokrát k promytí poslouží destilovaná voda.

10) Na závěr se testovací stripy přemístí na vyhodnocovací protokol, kde se nechají uschnout a poté se vyhodnotí pomocí příslušného softwaru.

(28, 29)

8.3.5 Vyhodnocení

Výsledky tohoto testu se hodnotí pomocí softwaru EUROLiScan. To, že test proběhl tak, jak měl, lze poznat podle zabarvení kontrolních proužků (kontrola provedení testu a kontrola příslušné třídy – IgG nebo IgM). Pokud je hodnocení proužku negativní, pak je potřeba test zopakovat. Vyhodnocení u protilátek IgM a IgG se liší. (28, 29)

Na stripech jsou v případě testování protilátek IgM umístěny antigeny :

VisE Bb, vysoce purifikovaný antigen *Borrelia burgdorferi* (Bb), který je rekombinantně vyrobený.

P41 Ba, což je nativní flagellin (p41) a **p39**, nativní BmpA (p39) *Borrelia afzelii* (Ba).

OspC Ba, **OspC Bb** a **OspC Bg**, purifikované, vysoce specifické nativní antigeny OspC (p25) *Borrelia afzelii* (Ba), *Borrelia burgdorferi* (Bb) a *Borrelia garinii* (Bg).

Kontrolní proužky IgG nebo IgM, tedy anti-lidské IgG nebo anti-lidské IgM, k určení přítomnosti vyšetřované třídy protilátky k rozpoznání jedinců se syndromem protilátkové nedostatečnosti.

Inkubační kontrola, která indikuje správné provedení inkubace.

(28)

Pokud vyjde pozitivita u antigenů OspC Ba, OspC Bb nebo OspC Bg, jde o pozitivní výsledek protilátek IgM. Může docházet k vzácným případům, kdy v časných stádiích infekce dochází ke slabé nebo negativní reakci protilátek IgM a antigenu OspC. To se pak řeší následovným postupem :

Tab. 2 Vyhodnocení protilátek IgM metodou Westernblot

Výsledek protilátek		Specifické antigenní proužky: p39, VlsE Bb	
		1 proužek pozitivní	žádný proužek
OspC Ba nebo OspC Bb nebo OspC Bg	proužek antigenu pozitivní	Pozitivní	pozitivní
	OspC Ba nebo OspC Bg slabě pozitivní	Pozitivní	hraniční
	proužek antigenu negativní	Pozitivní	negativní

Zdroj : EUROIMMUN - Návod k testu pro *Anti-Borrelia* EUROLINE-RN-AT (IgM)

V případě IgG jsou na stripech umístěny antigeny:

VlsE Ba, VlsE Bb a VlsE Bg, což jsou rekombinantně vyrobené a vysoce purifikované antigeny. VlsE z *Borelia afzelii* (Ba), *Borelia burgdorferi* (Bb) a *Borelia garinii* (Bg).

Z membránové frakce byly extrahovány **lipidy** *Borelia afzelii* (Ba) a *Borelia burgdorferi* (Bb). Protilátky proti lipidům *Borelia* se často vyskytují v pozdní fázi infekce.

Elektroforeticky purifikovaný nativní protein **p83** z *Borelia afzelii* (Ba).

Elektroforeticky purifikovaný nativní **flagelin** (p41) a nativní **BmpA** (p39) z *Borelia garinii* (Bg).

Elektroforeticky purifikovaný, vysoce specifický nativní **OspC** (p25) z *Borelia garinii* (Bg).

Rekombinantně vyrobené, vysoce specifické antigeny *Borelia burgdorferi*, čištěné afinitní chromatografií. Jméno antigenu a genové umístění: **p58, p21, p20, p19 a p18**.

Kontrolní proužky IgG nebo IgM, tedy anti-lidské IgG nebo anti-lidské IgM, určení přítomnosti vyšetřované třídy protilátky k rozpoznání jedinců se syndromem protilátkové nedostatečnosti.

Inkubační kontrola indikující správné provedení inkubace.

(29)

Pokud vyjde pozitivita u antigenu VlsE, jedná se o pozitivní výsledek IgG. V časných, občas ale i pozdních stádiích lymeské boreliózy dochází ke slabě pozitivní nebo negativní reakci IgG protilátek s antigenem VlsE. V takových případech se postupuje následovně :

Tab. 3: Vyhodnocení protilátek IgM metodou Westernblot

Výsledek protilátek		Specifické proužky antigenu: p18, p19, p20, p21, p58, OspC (p25), p39, p83, Lipid Bb, Lipid Ba		
		2 nebo více proužků pozitivních	1 proužek pozitivní	žádný proužek
VlsE Ba nebo VlsE Bb nebo VlsE Bg	Proužek antigenu pozitivní	pozitivní	Pozitivní	pozitivní
	Proužek antigenu slabě pozitivní	pozitivní	Pozitivní	negativní
	Proužek antigenu negativní	pozitivní	Hraniční	negativní

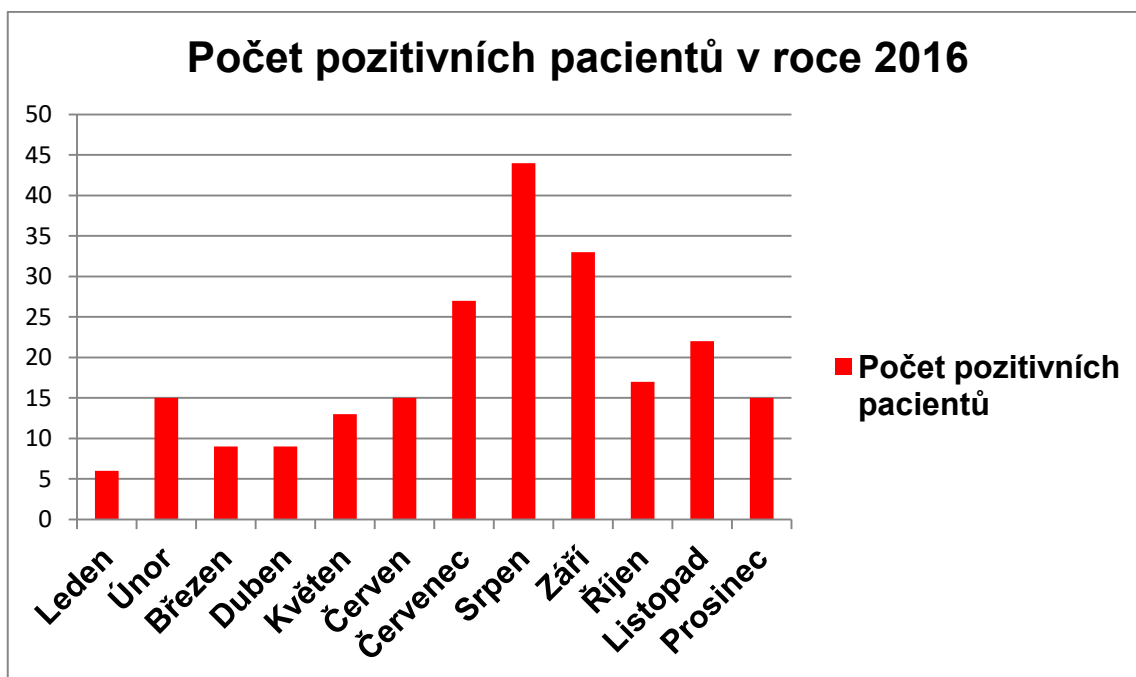
Zdroj: EUROIMMUN - Návod k testu pro *Anti-Borrelia* EUROLINE-RN-AT (IgG)

9 VLASTNÍ VÝSLEDKY

Materiál ke zpracování mi byl poskytnut ve Fakultní nemocnici Plzeň na oddělení sérologie a parazitologie. Jedná se o vzorky séra, punktátu i likvoru z celého roku 2016. Vzorky byly vyšetřeny metodami ELISA a Westernblot.

Následující graf zachycuje pozitivitu onemocnění v roce 2016. Výsledky byly potvrzeny testy ELISA i Westernblot. Testování se provádělo zvlášť pro protilátky IgM a IgG. U některých jedinců bylo tedy onemocnění zachyceno v počátcích, u některých déle.

Graf 1 : Počet pozitivních pacientů (IgG nebo IgM) v roce 2016

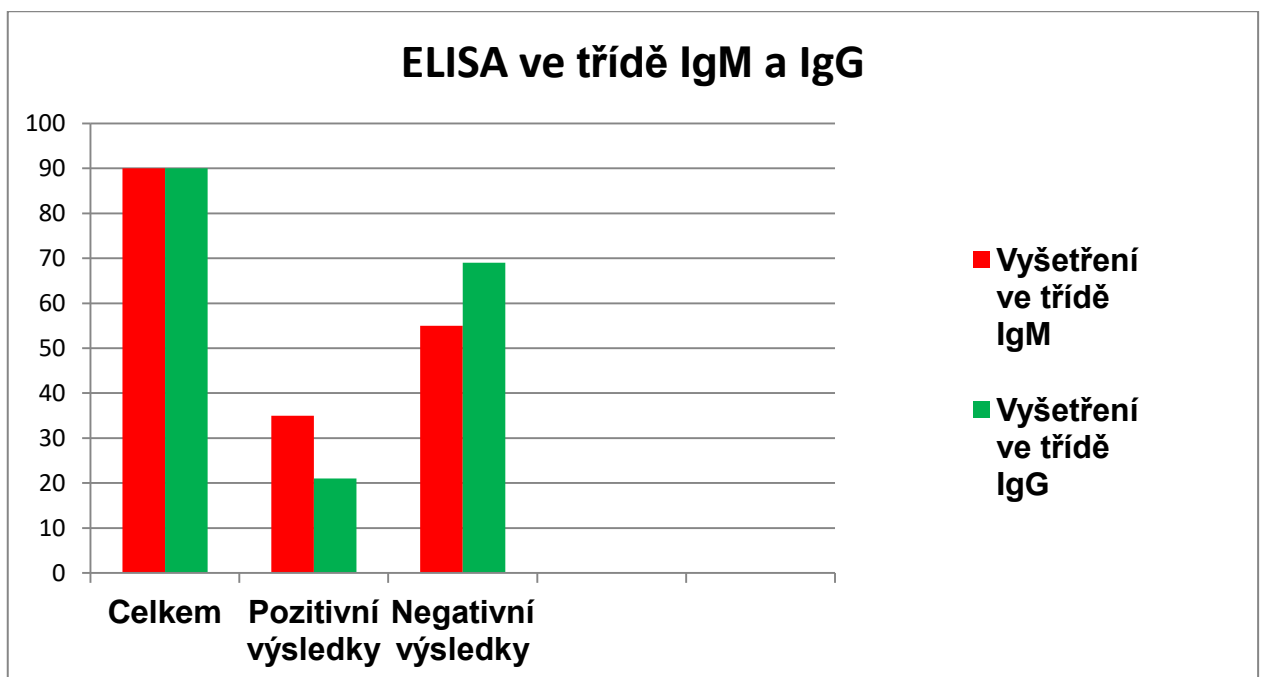


Zdroj : Vlastní

Graf 1 udává počet nemocných v období roku 2016. Největší počet pozitivních výsledků byl hlavně v letních a podzimních měsících, zejména proto, že klíšťata rodu *Ixodes* jsou v tomto období nejvíce aktivní. Nevylučují se ale ani pozitivní vyšetření po zbytek roku, jelikož infekce nemusí být odhalena ihned. Z toho důvodu mohou být někteří pacienti vyšetřováni několikrát.

V následujícím grafu jsou zachyceny výsledky vyšetření, které bylo provedeno metodou ELISA. Jedná se o měsíc červenec, srpen a září, kdy byl zachycen nejvyšší počet pozitivních výsledků (viz graf č. 1). V grafu je zobrazeno vyšetření protilátek IgM a IgG u celkem 90 pacientů. Ve třídě IgM vyšel pozitivní výsledek u 35 pacientů, tedy u necelých čtyřiceti procent vyšetřovaných. V IgG třídě byl počet pozitivních výsledků menší, pouze 21, což je necelých 25%.

Graf 2 : Výsledky testu ELISA



Zdroj: Vlastní

Graf číslo 3 udává procentuální zastoupení použitého materiálu v testu ELISA. Nejvíce využívaným i dostupným materiálem je sérum, méně pak likvor a punktát.

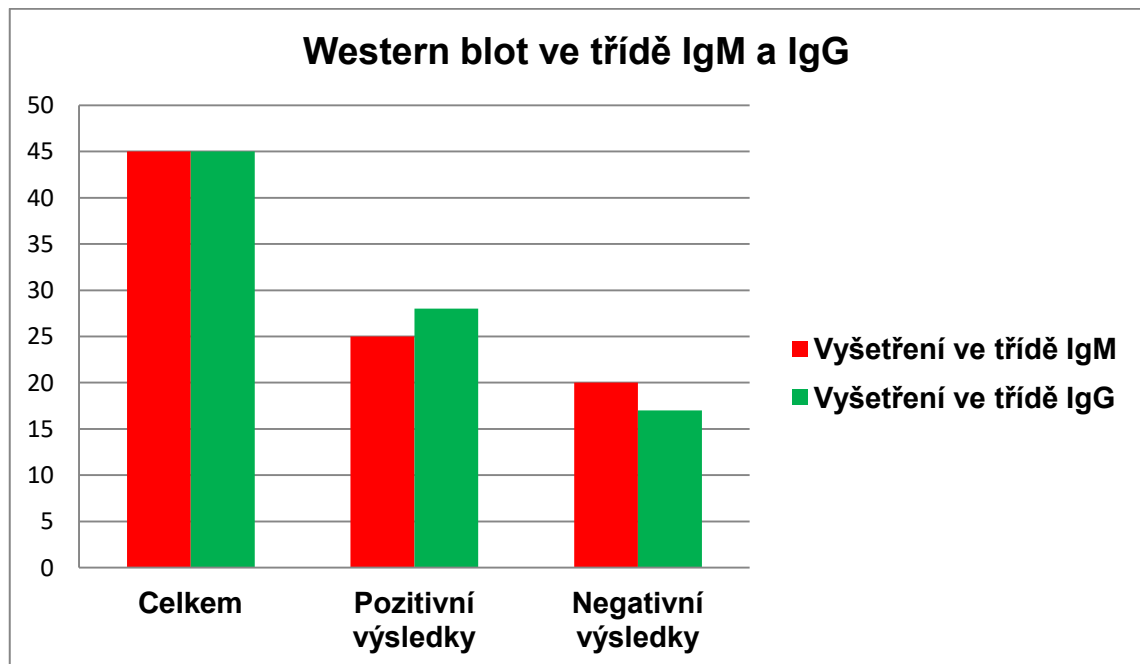
Graf 3: Vyšetřovaný materiál metodou ELISA



Zdroj: Vlastní

V grafu číslo 4 jsou zaznamenány výsledky metody Westernblot. Touto metodou bylo zkoumáno celkem 45 vzorků, které byly také odebrány v červenci, srpnu nebo září. Vyšetření bylo provedeno na přítomnost protilátek IgM i IgG. Ve třídě IgM vyšel pozitivní výsledek u 25 pacientů, což odpovídá zhruba 55%. Třída IgG obsahovala o tři pozitivní výsledky více.

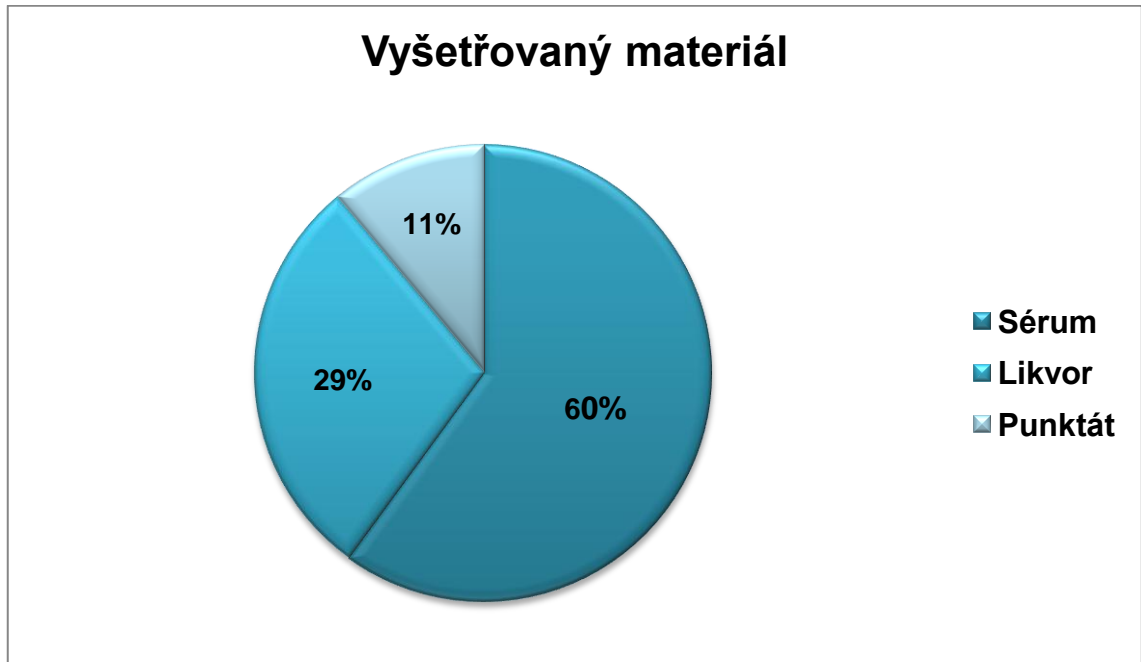
Graf 4: Výsledky testu Westernblot



Zdroj: Vlastní

Graf číslo 5 udává přehled využitého materiálu k vyšetření. Procentuálně opět vede sérum, stejně jako tomu je u metody ELISA.

Graf 5: Vyšetřovaný materiál metodou Westernblot



Zdroj: Vlastní

10 DISKUZE

Při diagnostice lymeské boreliózy je více než důležité vzájemné posouzení výsledků sérologických testů s klinickými projevy onemocnění. V případě, že se u pacienta projeví jeden či více příznaků typických pro lymeskou nemoc, jako je například erythema migrans nebo boreliový lymfocytom, lékař není povinen čekat na výsledky vyšetření a může zahájit antibiotickou léčbu ihned. V některých případech však lékař stanoví odlišnou diagnózu i tehdy, kdy vyjdou testy pozitivní.

Je třeba si uvědomovat také možný vznik tzv. zkřížené reaktivity, ke které dochází například s bakteriemi rodu *Treponema* nebo *Leptospira*. Falešně pozitivní výsledky IgM protilátek pak mohou vznikat také v důsledku infekční mononukleózy nebo u autoimunitních onemocnění, kterým je například systémový lupus erythematosus.

Často dochází také k tomu, že protilátky IgM i IgG se vyskytují i v séru zdravých pacientů, kteří nákazu nikdy neprodělali nebo u těch, jejichž nemoc již byla diagnostikována a залéčena. V některých případech jsou protilátky prokazatelné i řadu let po prodělání infekce.

Diagnostika lymeské boreliózy má řadu úskalí, zejména v případě, že se u pacienta nevyskytují typické klinické příznaky tohoto onemocnění, a i přesto, že testy vycházejí pozitivně, mohlo by se jednat o jiné onemocnění. Proto je velmi důležité dbát na srovnání výsledků s klinickými příznaky.

Potíže může způsobit například fakt, že protilátky IgM se v séru vyskytují v počátku infekce pouze u poloviny postižených. Pokud se hladina IgM protilátek u některých jedinců nezvýší a jsou v tomto období testování na boreliózu, hrozí, že testy vyjdou negativní a infekce nebude odhalena.

Naopak protilátky IgG mohou přetrvávat v těle mnohem déle, roky až desetiletí, a to i po úspěšně залéčené infekci. V tomto případě naopak hrozí, že budou za pozitivní označeni i ti, kteří nemocí netrpí.

ZÁVĚR

Lymeská borelióza patří mezi jedny z nejvíce rozšířených antropozoonóz v Evropě. Jedná se o onemocnění přenášené v ČR klíštětem rodu *Ixodes*, které do těla hostitele v případě nákazy přenáší spirochetální bakterie rodu *Borrelia*, způsobující toto onemocnění.

Mezi nejvíce ohrožené jedince patří hlavně lidé, kteří se často pohybují v přírodě, především v lese. V současné době neexistuje žádná účinná vakcína proti lymeské nemoci, avšak některé vědecké instituce se zabývají její tvorbou. Prevencí je především vhodné oblečení, které zakrývá většinu kůže, a použití repelentních přípravků.

Diagnostikovat toto onemocnění lze přímými i nepřímými metodami. Nejvíce jsou využívány nepřímé, sérologické metody, kterými jsou ELISA a Westernblot. Léčba lymeské boreliózy se řeší podáním antibiotik.

SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

1. BARTŮNĚK, Petr. *Lymeská borelióza*. 4., přeprac. a dopl. vyd. Praha: Grada, 2013. ISBN 978-80-247-4355-4.
2. ROHÁČOVÁ, Hana. *Lymeská borelióza: průvodce ošetřujícího lékaře*. Praha: Maxdorf, c2005. Farmakoterapie pro praxi. ISBN 80-7345-071-2.
3. ČERNÝ, Zdeněk. *Infekční nemoci*. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 1997. ISBN 80-7013-241-8.
4. BUHNER, Stephen Harrod. *Borelióza: přírodní prevence a bylinná léčba lymeské boreliózy a jejích koinfekcí*. Praha: Triton, 2014. ISBN 978-80-7387-780-4.
5. BORELIOZA.CZ. *Informační web Borelioza.cz* [online]. Praha: Občanské sdružení Borelioza CZ o.s., 2003 [cit. 2017-01-26]. Dostupné z: <http://www.borelioza.cz>
6. KENNETH B. SINGLETON a FOREWORD BY JAMES A. DUKE. *The Lyme disease solution*. Charleston, SC: BookSurge, 2008. ISBN 9781439226988.
7. BARTŮNĚK, Petr. *Lymeská borelióza*. 3., dopl. a přeprac. vyd. Praha: Grada, 2006. ISBN 80-247-1543-0.
8. APLIKOVANÝ VÝZKUM V ČR, Vakcína proti lymeské borelióze. In: *Youtube* [online]. 2005 [cit. 2017-02-20]. Dostupné z: <https://www.youtube.com/watch?v=jr4qUAu5jdc>
9. BUCHANCOVÁ, J., H. HUDEČKOVÁ a L. MURAJDA. *Pracovní Lékařství*. č.2. Bratislava, 2009. ISSN 0032-6291.
10. KŘUPKA, Michal, Milan RAŠKA a Evžen WEIGL. *LYMSKÁ BORELIÓZA – BIOLOGIE, PATOGENEZE, DIAGNOSTIKA A LÉČBA* [online]. 2008, (2) [cit. 2017-01-21]. Dostupné z: <http://www.dermatologiepropraxi.cz/pdfs/der/2008/05/07.pdf>
11. SEDLÁK, Kamil a Markéta TOMŠÍČKOVÁ. *Nebezpečné infekce zvířat a člověka*. Praha: Scientia, 2006. Biologie pro všední den. ISBN 80-86960-07-2.
12. PÍCHA, D. *Infekce přenášené klíšťaty*. Postgraduální medicína. 2006. č. 3.
13. PÍCHA, D. *Lymeská borelióza*. Postgraduální medicína. 2009. č. 8.

14. DLOUHÝ, P., et al. *Lymeská borrelióza: Doporučený postup v diagnostice, léčbě a prevenci*. [online] 2011. Dostupné z : <http://www.infekce.cz/DoporLB11.htm>
15. BOLEHOVSKÁ, R., et al. *Lymeská borelióza*. Klin. Biochem. Metab. 2009. č. 17.
16. LOBOVSKÁ, Alena. *Infekční nemoci*. Praha: Karolinum, 2001. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. ISBN 80-246-0116-8.
17. KIMMIG, Peter, Rüdiger BRAUN a Dieter HASSLER. *Klíšťata: Nepatrné kousnutí s neblahými následky*. Praha: Pragma, c2003. ISBN 80-7205-881-9.
18. ROZSYPAL, Hanuš. *Základy infekčního lékařství*. V Praze: Univerzita Karlova, nakladatelství Karolinum, 2015. ISBN 9788024629322.
19. STAŇKOVÁ, Marie, Vilma MAREŠOVÁ a Jiří VANIŠTA. *Infekční lékařství: minimum pro praxi*. 2. vyd. Praha: Triton, 2002. Levou zadní. ISBN 80-7254-236-2.
20. ROHÁČOVÁ, H. *Lymeská borelióza v ordinaci PL z pohledu infektologa*. Practicus. 2004. č. 6.
21. VOTAVA, Miroslav. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun, 2003. ISBN 80-902896-6-5.
22. GURČÍK, L. *Súčasné trendy v diagnostike a liečbe neuroboreliózy*. Neurol. prax. 2009. č. 3.
23. HEJNAR, P. *Specifika nepřímé diagnostiky toxoplazmózy a lymeské boreliózy u dětí*. Pediatrie pro praxi. 2001. č. 2.
24. LITZMAN, Jiří. *Základy vyšetření v klinické imunologii*. Brno: Masarykova univerzita, 2007. ISBN 978-80-210-4227-8.
25. BARTŮŇKOVÁ, Jiřina a Milan PAULÍK. *Vyšetřovací metody v imunologii*. 2., přeprac. a dopl. vyd. Praha: Grada, 2011. ISBN 978-80-247-3533-7.
26. TEST LINE. *EIA Borrelia recombinant IgG*. Výrobce: TestLine Clinical Diagnostics s.r.o.
27. TEST LINE. *EIA Borrelia recombinant IgM*. Výrobce: TestLine Clinical Diagnostics s.r.o.
28. Western blot. *Návod k testu pro Anti-Borrelia* EUROLINE-RN-AT. Protilátky proti Borrelia (IgM). EUROIMMUN.

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

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ACA	acrodermatitis chronica atrophicans (chronické onemocnění kůže)
Bbsl	Borrelia burgdorferi sensu lato
IL-1	Interleukin 1
TNF- α	tumor necrosis factor α , tedy faktor nádorové nekrózy
IFA	nepřímá imunofluorescence
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
WB	Westernblot
EIA	Enzyme immunoassay
TMB	tetramethylbenzidin
ks	kus

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Interpretace výsledků vyšetření synoviální tekutiny

Tabulka 2: Vyhodnocení protilátek IgM metodou Westernblot

Tabulka 3: Vyhodnocení protilátek IgG metodou Westernblot

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Počet pozitivních pacientů (IgG nebo IgM) v roce 2016

Graf 2: Výsledky testu ELISA

Graf 3: Vyšetřovaný materiál metodou ELISA

Graf 4: Výsledky testu Westernblot

Graf 5: Vyšetřovaný materiál metodou Westernblot

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Analyzátor DSX pro test ELISA

Obrázek 2: Vyhodnocení metody Westernblot pomocí EUROLinScan-Protokol

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1: Typické *erythema migrans*.

Příloha 2: Boreliový lymfocytom (*lymphocytoma cutis*) na ušním lalůčku dítěte.

Příloha 3: Oteklé koleno v důsledku lymeské artritidy.

Příloha 4: Správný postup při odstraňování klíštěte.

Příloha 5: Povolení sběru informací ve Fakultní nemocnici Plzeň.

PŘÍLOHY

Příloha 1: Typické *erythema migrans*.



Zdroj: (<https://osuemed.wordpress.com/tag/erythema-migrans/>)

Příloha 2: Boreliový lymfocytom (*lymphocytoma cutis*) na ušním lalůčku dítěte.



Zdroj: (<http://www.remedia.cz/Images/Articles/Main/vtextu20060412055949.jpg>)

Příloha 3: Oteklé koleno v důsledku lymeské artritidy.



Zdroj: (<http://www.remedia.cz/Images/Articles/Main/vtextu20060412060342.jpg>)

Příloha 4: Správný postup při odstraňování klíštěte.



1. Nejprve si připravte speciální kleštičky nebo pinzetu a navlékněte si gumové rukavice.



2. Klíště zakápněte desinfekcí.



3. Pak ho uchopte pinzetou co nejbližší k povrchu kůže a viklavými pohyby jej pomalu a opatrně vytáhněte z kůže. Snažte se, abyste ho nepřetrhli.



4. Místo přisátí je vhodné opět potřít desinfekcí. Klíště zlikvidujte bezpečným způsobem (např. spláchnutím do WC, nebo spálením).

Zdroj: www.pozorkliste.cz

FSME-IMMUN 0,5 ml BAXTER, FSME-IMMUN 0,25 ml BAXTER.
Vakcína proti klíšťové encefalitidě. Léčivá látka: Virus encephalitis inactivatum purificatum.
Výdej léčivého přípravku (vakcíny) je vázán na lékařský předpis. Vakcíny aplikuje lékař. Pečlivě pročtěte příbalovou informaci.

2012098

Zdroj: (<http://www.pozorkliste.cz/jak-spravne-odstranit-kliste>)

Příloha 5: Povolení sběru informací ve Fakultní nemocnici Plzeň



FAKULTNÍ NEMOCNICE PLZEŇ

Útvar náměstka pro ošetrovatelskou péči

Edvarda Beneše 13, 305 00 Plzeň - Bory
305 00 Plzeň - Bory, 305 00 Plzeň - Luchtán
IČO 00000000, tel.: 377 401 111, 377 402 111

Vážení paní
Eliška Čadová
Studentka oboru Zdravotní laborant
Fakulta zdravotnických studií, Katedra teoretických oborů
Západočeská univerzita v Plzni

Povolení sběru informací ve FN Plzeň

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

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

- Vrchní zdravotní laborantka MIKRO souhlasí s Vaším postupem.
- Osobně provedete svoje šetření.
- Vaše šetření nenasadí 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, pod přímým vedením oprávněného zdravotnického pracovníka, kterým je Mgr. Petra Souškové, odborný pracovník v laboratorních metodách MIKRO FN Plzeň.**

Po zpracování Vašimi zjištěných údajů poskytnete zdravotnickému oddělení / klinice či organizačnímu celku FN Plzeň záznamy 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. Zvěřilová **Čadovou**,
manažerka pro učební činnost v Ústavu
občulupj@fnplzeň.cz
občulupj@fnplzeň.cz

Útvar náměstka pro oš. péči FN Plzeň
tel. 377 402 200, 377 402 207
e-mail: obc@ovna.fnplzeň.cz

3. 11. 2016