



**MASARYKOVA UNIVERZITA  
V BRNĚ  
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA  
Ústav Biochemie**



## **Srovnání metod DNA detekce rodu Borrelia**

*Bakalářská práce*

Vedoucí práce: **Doc. RNDr. Omar Šerý, Ph.D.**

#### Poděkování:

Rád bych tímto poděkoval panu docentovi za odborné vedení práce, dále pak doc. RNDr. Aleně Žákové, Ph.D. a Mgr. Lukášovi Častulíkovi za ochotnou pomoc při řešení problémů se zpracováním práce. V neposlední řadě bych chtěl poděkovat rodině a přátelům za vydatnou psychickou podporu a vytvoření zázemí pro vypracování práce.

Prohlašuji, že jsem uvedenou bakalářskou práci vypracoval sám pouze s pomocí uvedené literatury.

Ondřej Bonczek

## Obsah

1. Úvod .....	5
2. Teoretická část .....	6
2.1 Borrelia burgdorferi .....	6
2.1.1 Obecná charakteristika .....	6
2.1.2 Systematické zařazení .....	7
2.1.3 Přenašeči a hostitelé .....	8
2.1.4 Přenos do hostitele .....	8
2.1.5 Biochemické a molekulárně biologické vlastnosti .....	9
2.1.6 Odpověď imunitního systému .....	10
2.2 Lymeská borelióza .....	11
2.2.1 Historie .....	11
2.2.2 Klinický obraz .....	12
2.2.3 Léčba .....	16
2.2.4 Očkování, prevence .....	17
2.2.5 Výskyt a promořenost .....	19
2.2.6 Diagnostika .....	21
3. Praktická část .....	23
3.1 Materiál a Metody .....	23
3.1.1 Použité vzorky, přístroje, kity .....	23
3.1.2 Izolace DNA .....	23
3.1.3 DNA diagnostika EliGene® Borrelia pro LightCycler® .....	24
3.1.4 DNA diagnostika EliGene® Borrelia pro RealTime Sytem (ABI 7300) .....	26
3.2 Výsledky a vyhodnocení .....	28
3.2.1 Amplifikační křivky z LightCycler® a jejich interpretace .....	28
3.2.2 Amplifikační křivky z RealTime Sytem (ABI 7300) a jejich interpretace .....	30
3.2.3 Tabulka souhrnného vyhodnocení .....	33

4. Diskuze.....	34
5. Závěr .....	35
6. Souhrn/Summary.....	36
7. Použitá literatura.....	37

## 1. Úvod

Tato bakalářská práce byla zpracována za účelem shrnutí a srovnání diagnostických metod DNA detekce borélií v biologickém materiálu v praxi. Pro srovnání byly zvoleny dva systémy pro PCR v reálném čase - LightCycler® a ABI RealTime System 7300.

Přestože je v podvědomí široké veřejnosti lymeská borelióza (LB) dobře známá, řada aspektů není ještě zcela nebo vůbec objasněna. Proto je toto téma i nadále aktuální a je ještě co prozkoumat a diskutovat.

LB patří mezi nejrozšířenější antropozoonózy a je nepříjemným a houževnatým multisystémovým onemocněním postihujícím každoročně mnoho lidí na celém světě. Od prvních zmínek o příznacích tehdy ještě neznámé nemoci na konci 19. století již uběhla řada let, a proto je již dobře prozkoumána a zavedena rutinní klinická diagnostika (PCR, ELISA, Western blott ad.) a léčba antibiotiky. Jisté mezery v našich vědomostech však jsou, ať už v podrobném mechanismu přenosu, hostitelích, či obraně borélií před imunitním systémem hostitele aj. Velká pozornost je věnována i vyvinutí účinné očkovací látky pro humánní použití, což by výrazně přispělo k minimalizaci a možná až úplnému vymýcení obav z této zákeřné nemoci.

## 2. Teoretická část

### 2.1 *Borrelia burgdorferi*

#### 2.1.1 Obecná charakteristika

*Borrelia burgdorferi sensu lato* (Bbsl) „v širším slova smyslu“ patří mezi gramnegativní, mikroaerofilní spirochéty. Buňka se vyznačuje tenkým, spirálovitým tvarem o rozměrech 0,2 µm x 4-30 µm. Má pravidelné závit, kterých je 4-15 a jsou od sebe vzdáleny přibližně 2,2 µm. Pohybuje se rotací kolem podélné osy nebo smršťováním a natahováním. Pohyb umožňujících bičíků je 7-9, na rozdíl od jiných patogenních borelií (*B.recurrentis*, *B.hermsi*). Bičíky se vypínají mezi oběma konci buňky z bazálních disků, umístěných v cytoplazmatické membráně, a obtáčejí tělo buňky pod vnější buněčnou stěnou. (Hulínská, 2006).

Vnější buněčná stěna se jako obecně u gramnegativních bakterií sestává ze 3 vrstev:

- vnitřní peptidoglykanová
- střední lipopolysacharidové
- vnější lipoproteinové

a má spolu s bičíkovými antigeny největší význam co se týče virulence, jak bude rozebráno později. Stěna je oddělena periplazmatickým prostorem od cytoplazmatické membrány.

Doposud jediným všeobecně po celém světě známým a uznávaným přenašečem patogenních druhů Bbsl je i v našich podmínkách klíště rodu *Ixodes*.

Nakažená klíšata jsou nemocná, jejich střevní buňky se vlivem pomnožení patogenních borelií rozpadají, což může zapříčinit smrt klíšete. Kompetentní boj mezi druhy Bbsl je ve střevě experimentálních klíšat tak velký, že přežijí, při dvojité nebo trojitě infekci, pouze ty nejvíce virulentní druhy borelií. Kompetentní selekce při kultivaci 4 druhů *in vitro* BSK (Barbour-Stoener-Kelly) půdě v následných pasážích zachová pouze nejvíce virulentní druh (Hulínská, 2006).

## 2.1.2 Systematické zařazení

*Borrelia burgdorferi* řadíme mezi jednobuněčné organismy s nediferencovaným jádrem do říše *Procaryotae* a dále podle stavby buněčné stěny mezi gramnegativní bakterie *Gracilicutes*, následuje taxonomické zařazení:

doména: **bakterie**

kmen XII: **spirochety**

třída: **Spirochaetales**

řád: **Spirochaetales**

čeleď I: **Spirochaetaceae**

rod: **Borrelia** 30 spp.

Brevinema 1 sp.

Clevelandina 1 sp.

Cristispira 1 sp.

Diplocalyx 1 sp.

Hollandia 1 sp.

Pillotina 1 sp.

Spirochaeta 14 spp.

Treponema 18 spp.

čeleď II: Serpulinaceae

rod: Branchyspira 5 spp.

Serpulina 6 spp.

čeleď III: Leptospieaceae

rod: Leptonema 1 sp.

Leptospira 12 spp.

(Bergey's Manual of Systematic Biology, 2000) (Tortora et al. 2001)

### 2.1.3 Přenašeči a hostitelé

Při přenosu borélií hrají významnou roli krevsající členovci, zejména klíšťata, z nichž nejdůležitějšími jsou zástupci rodu *Ixodes*. Hlavním vektorem borélií je v Evropě *I. ricinus*, *I. persulcatus* v Asii, a *I. scapularis* a *I. pacificus* v Severní Americe (Gern 2001). *I. ricinus* je hlavním vektorem tří pro člověka prokázaně patogenních druhů - *B. b. s.s.*, *B. garinii* a *B. afzelii* v Evropě (Gern et al.1993). Borélie byly detekovány i u jiných hematofágních členovců, např. u komárů. V infikovanosti byl však zjištěn statisticky významný rozdíl mezi klíšťaty a komáry (u komárů daleko méně) (Pejchalová, 2001)

Různorodost obratlovců, kteří jsou přirozeně infikováni Bbsl, je mnohem větší než typy hostitelů infikovaných jinými druhy borélií. Tato rozmanitost je pravděpodobně ovlivněna nejen druhy obratlovců, které jsou spirochéty schopny kolonizovat, ale daleko více odlišností životního cyklu klíšťat rodu *Ixodes* - každé ze tří stádií (larva, nymfa, imago) sají krev na odlišném spektru hostitelů. Larvy a nymfy preferují malé hlodavce a ptáky, dospělci pak primárně sají na větších savcích, včetně domácích zvířat. Studie poukazují na prevalenci *B. afzelii* u hlodavců (např. myšice, hraboši, potkan, krysa), *B. garinii* je převážně detekována u ptactva (např. u bažantů, kosů a ostatních druhů zpěvných ptáků), *B. burgdorferi sensu stricto* (Bbss) se vyskytuje jak u hlodavců, tak u ptáků (Janovská, 2006).

### 2.1.4 Přenos do hostitele

U infikovaného, nenasátého klíštěte se Bbsl usídí v jeho střevní stěně. Během sání se borélie množí a pronikají skrze střevní stěnu a hemolymfou se roznášejí ke všem orgánům, včetně slinných žláz. Slinami pak mohou být Bbsl v pozdějším stadiu sání přeneseny na hostitele. Některé studie ukazují, že k přenosu Bbsl zřídka dochází během prvních 24-36 hodin sání klíštěte. Pravděpodobnost infekce tedy stoupá s délkou sání. Regurgitace střevního obsahu do místa přisání se také považuje za potenciální způsob přenosu, stejně jako zanesení trusu klíšťat do rány (např. při nešetrném odstraňování (Janovská, 2006)



## 2.1.5 Biochemické a molekulárně biologické vlastnosti

Genom bakterie *B. burgdorferi* (B31) obsahuje lineární chromozom složený z 910 725 bp a nejméně 17 lineárních a kruhových plazmidů se společnou velikostí více než 533 000 bp, na genomu se nacházejí sekvence kódující lipoproteiny vnější membrány, tzv. vnější povrchové proteiny (Osp - outer surface protein) řady A až F (Fraser et al. 1997). Bylo upřesněno, že extrachromozomální DNA se celkem skládá z 12 lineárních a 9 kruhových plazmidů s celkovou velikostí 610 694 bp, což dohromady dává největší počet známý pro bakterie. Tímto byl kompletně ukončen projekt sekvenování této bakterie s konečným výsledkem pro velikost genomu 1 521 419 bp (plus asi 2000 bp nedefinovaných telomerických sekvencí) (Casjens et al. 2000).

Antigenní struktury můžeme rozdělit do následujících 3 skupin plus zvláštní skupinu „teplotních proteinů“ Hsp (heat shock proteins):

- Ag vnější (lipoproteinové) membrány - Osp (A-F)
- intracelulární Ag (groEI-faktor)
- bičíkový Ag (flagellin)

**Osp A** je adhesin, který se selektivně váže na endotelové buňky střeva klíštěte, což bylo prokázáno adhezí ke střevnímu extraktu z klíštěte metodou ELISA (Pal et al. 2000). Bylo zjištěno, že může být využit pro vývoj vakcíny, ovšem vzhledem ke složitosti faktorů ovlivňujících jeho expresi, mj. také záleží na době přísátí klíštěte, ukázala se účinná jen v raných fázích infekce a to ještě značně nestabilně (de Silva, 1996)

U **Osp C** se předpokládá, že je důležitý pro přechod borélií ze střeva do hemocoelu a slin. Před tím, než klíště nasaje krev, je populace bakterií homogenní a produkuje převážně OspA. Během sání začínají některé spirochéty produkovat OspA i OspC, jiné jen jeden z Osp a nebo žádný, čímž se populace stává značně heterogenní, což by také mohlo souviset s připraveností infikovat hostitele. (Ohnishi et al, 2001)

Další povrchové proteiny jsou u jednotlivých kmenů odlišné co do velikosti i antigenní reaktivity.

Spirochéty však vlastní i regulační geny - *Borrelia* direkt repeat (**Bdr**). Proteiny určené těmito geny jsou mezidruhově i vnitrodruhově rozdílné, uložené v cytoplazmatické membráně nejsou ovlivnitelné antibiotiky ani protilátkami. Mají

velkou funkci ve variabilitě BbsI a přizpůsobení se změnám prostředí, nemalou funkci je také řízení genů pro OspA a OspC proteiny (Hulínská, 2006)

Proti **flagellinu** tvoří hostitel protilátky třídy IgM v časně fázi infekce (Hulínská, 2006).

**GroEL**-faktor umožňuje unikání borélií proti buněčné i humorální obraně hostitele, je podobný lidským stresovým proteinům, které se uvolňují při poškozená tkáň (Hulínská, 2006)

**Hsp** má pravděpodobně vztah k teplotním změnám, kterým je spirochéta po přísátí klíštěte vystavena a může vést k patologickým reakcím vzhledem k přítomnosti homologního proteinu v organismu hostitele - savce (Hulínská, 2006)

### 2.1.6 Odpověď imunitního systému

Komplement zprostředkující lýzu organismu může být první obranou reakcí hostitele. Spirochetální lipoproteiny a ostatní signály aktivují makrofágy, což vede k produkci silně prozánětlivých cytokinů, jako jsou TNF- $\alpha$  a IL-1 $\beta$ . Makrofázi pohltí spirochety a degradují je na intracelulární části. Spirochetální lipoproteiny, které jsou B-buněčnými mitogeny, současně stimulují adaptivní T-buňky nezávislé na B-buněčné odpovědi. Odpověď humorální imunity na nelipidované proteiny bakterie je pravděpodobně závislá na T buňkách. Hlavní roli u *B. burgdorferi* hrají specifické CD4+ Th1 buňky, které vytváří T-buňky závislé na odpovědi B-buňek a antigen - specifické CD8+ T-buňky, které mohou být významným zdrojem IFN- $\gamma$ . Protilátkově zprostředkovaná smrt spirochet nastane fixací komplementem a následnou opsonizací (Steere et. al, 2004).

## 2.2 Lymeská borelióza

### 2.2.1 Historie

První zmínku o příznacích, považovaných za vlastní lymeské borelióze i dnes, učinil již v roce 1883 Buchwald, popsal je jako „idiopatické změny kůže“, později označené jako *Acrodermatitis chronica atrophicans* (ACA). O několik let poté (1909) popisuje Afzelius zánětlivé změny kůže - *Erythema chronicum migrans* (EM), a v roce 1921 se také zmiňuje o souvislosti mezi přisátím klíštěte a EM. Rok na to Garin a Bujadoux publikují postižení centrálního nervového systému, kterému předcházelo EM. Následuje řada let, kdy je publikováno mnoho poznatků a souvislostí, ovšem bez jasných důkazů.

Za jeden ze zlomových objevů se dá považovat úspěšná léčba penicilinem ACA Herxheimerem v roce 1946, což naznačovalo, že původcem onemocnění je pravděpodobně bakterie, to bylo také potvrzeno histologickým průkazem z EM, který o dva roky později provedl Lenhoff.

Neméně důležité bylo také zavedení techniky kultivace borélií Kellym v roce 1971.

V roce 1975 učinil zásadní objev Steer, který se svými spolupracovníky zaměřil pozornost na epidemický výskyt juvenilní revmatoidní artritidy u dětí v oblasti poblíž města Lyme (Connecticut), pozornosti neunikl ani předcházející erytém u pacientů. Do souvislosti byl dán také fakt, že oblast byla charakteristická vysokým výskytem klíštěte *Ixodes damini*, souhrn příznaků byl popsán jako lymeská nemoc.

Nedlouho poté v roce 1982 izoluje tehdy ještě neznámou spirochétu Burgdorfer v klíštěti *Ixodes damini*, spirochéta je byla zařazena mezi borélie a pojmenována po svém objeviteli *Borelia burgdorferi*.

Název lymeská borelióza (LB), jak ho známe dnes je doporučen na III. mezinárodní konferenci v New Yorku v roce 1987.

V České republice publikovali EM, ACA a vztah mezi EM a sezónním výskytem klíštěte *Ixodes* roku 1960 Sedláček a Danda. Problematikou LB v pediatrii se zabýval Doutlík, který taky sérologicky prokázal LB v roce 1986 u dětí a o rok později Jirouš u dospělých (Bartůněk, 2006).

## 2.2.2 Klinický obraz

Jak již bylo řečeno, LB je multisystémovým onemocněním postihujícím organismus buď lokalizovaně, nebo systémově - většinou pozdních fázích. Na základě diagnostiky příznaků u pacientů bylo stanoveno třídění průběhu onemocnění na 3 fáze a to na **časnou lokalizovanou** formu, **časnou diseminovanou** a **pozdní diseminovanou** (latentní) fázi.

První dvě jsou charakteristické pro projevy LB v prvních týdnech či měsících, poslední se může rozvinout i po několika letech bez předchozího zjištění. Důležité je včasné zjištění a diagnostika a nasazení správné léčby pro daný příznak a rozvinutí choroby.

Mezi nejčastější projevy LB patří postižení kůže (EM, ACA), kloubů, nervového systému, srdce, vzácněji oka. Nyní k jednotlivým pasážím:

### a) Klinický obraz kožních forem

Základními kožními formami boreliózy jsou EM, *lymphocytoma borreliensis* - boreliový lymfocytom (BL) a ACA, jejich rozdělení ukazuje následující tabulka:

**Tabulka klasifikace kožních forem LB**

<b>Stadium</b>		<b>Kožní forma</b>		
Časné	lokalizované	erythema migrans primarium	anulare	
			maculare	
			concentricum	
	diseminované	lymphocytoma borreliensis	papulare	
infiltratum				
Pozdní	diseminované	erythema migrans secundarium		
		acrodermatitis chronica atrophicans	inflammatoria	maculare
				oedematosa
				fibromatosa
		atrophicans	atrophicans	teleangiectatica
sensu stricto				

Pro kožní projevy je charakteristické, že se mohou vyskytovat ve všech třech stádiích nemoci, ale každá klinická forma v konkrétním stadiu. V 1. stadiu časně lokalizované infekce nacházíme na kůži EM nebo BL a současně může být přítomna regionální lymfadenitida, ve 2. stadiu časně diseminované infekce se mohou spolu s chřipkovými příznaky objevit na kůži sekundární léze EM, jež mohou být dále komplikovány i jinými mimokožními projevy - akutní neuroboreliózou, myokarditidou, akutní artritidou aj., a ve 3. stadiu pozdní infekce je typickou kožní manifestací ACA (Hercogová, 2006).

**Erythema migrans** vzniká obvykle za 3-30 dnů od přisátí klíštěte, typický je několikadenní odstup mezi přisátím klíštěte a vznikem erytému. Zarudnutí je ploché, homogenní nebo s prstencovitým lemem, šíří se do periferie a v centru bledne. Průměr erytému je obvykle nad 5 cm, mnohdy dosahuje značných rozměrů, vznik erytému mohou provázet celkové chřipkové příznaky s bolestmi hlavy, kloubů a svalů, s únavou a subfebrilitami (Dlouhý, 2002).

Klinicky rozlišujeme 3 základní typy EM:

- a) **anulární (*erythema migrans anulare*)** - EM, jenž se šíří do okolí živě červeným lemem s hladkým povrchem a jenž se hojí v centru, proto se objeví centrální výbled,
- b) **homogenní (*erythema migrans maculare*)** - EM se může nebo nemusí šířit do okolí a jeho centrum zůstává zarudlé po celou dobu trvání, povrch makuly je opět hladký,
- c) **terčovitě, irisovitě (*erythema migrans concentricum*)** - EM se vytváří koncentrickou konfigurací, může mít podobu dvou nebo i více soustředěných kruhů, kdy se střídají mezikruží světle červená, tmavě červená a barvy kůže.

**Boreliový lymfocytom**, je papule (*lymphocytoma borreliensis papulare*) nebo plak (*lymphocytoma borreliensis infiltratum*) temně červené až fialové barvy s hladkým lesklým povrchem, velikosti od několika mm do 3-5 cm, který se objevuje hlavně u dětí za několik týdnů infekce, nejčastěji na boltci ucha, špičce nosu, méně často na dvorcí prsní bradavky a na skrotu.

**Acrodermatitis chronica atrophicans** je projevem 3. stadia. Od přisátí klíštěte do vzniku projevů uplyne řada let. Mohou předcházet projevy jednoho, dvou i všech tří stádií boreliózy, jindy představuje ACA první manifestaci choroby. Přichází nejprve ve formě akutního zánětu kůže (**ACA inflammatoria**), který se projevuje červenými makulami na akrolních částech (**ACA maculare**) s prosáknutím až těstovitou konzistencí. Pokud převažuje edém, červenofialové zbarvení je méně

patrné (**ACA oedematosa**). V průběhu zánětlivé fáze se mohou tvořit na ulnární straně předloktí, nad lokty, nad drobnými ručními klouby tuhé papule a uzly barvy kůže, průměru od jednoho do několika cm, bez subjektivních příznaků, jejichž histopatologickým podkladem je koncentricky uspořádané kolagenní vazivo (**ACA fibromatosa**). Po měsících přechází zánětlivá fáze v atrofickou, kůže nabývá postupně vzhledu cigaretového papíru s vymizením elastických vláken a dilatací cév (**ACA teleangiectatica, ACA sensu strictiori**). Predilekční lokalizací jsou extenzorové části končetin. Na dolních končetinách bývá hlavně v oblasti nártů a kolen, na horních končetinách nad loktem a nad hřbetem ruky, nikdy nepostihuje dlaně a plosky, maximum změn je nad klouby a kostními prominencemi (Hercogová, 2006).

## b) Postižení kloubů

Termín **lymeská artritida** (LA) zahrnuje široké spektrum změn a projevů v oblasti pohybového aparátu, ke kterým dochází ve stadiu časně nebo pozdní diseminované infekce.

V časném stadiu se objevují zejména epizody bolestí různých struktur pohybového aparátu - **artralgie**. Mohou být jediným projevem onemocnění nebo později přecházet do akutně chronicky probíhajícího zánětu některého z kloubů - **artritida**.

Pod pojem LA dále patří i zánětlivé projevy dalších struktur pohybového aparátu. Jde zejména o záněty šlach a jejich projevy - **tendinitidy, tendovaginitidy a tendosynovitidy**, úponů vazů a šlach do kostí - **enteritidy**, kloubních pouzder - **kapsulitidy**, burz - **burzitidy**, svalů - **myozitidy**.

Předpokládá se, že nejprve dochází k rozpoznání receptorů vhodných pro přilnutí borélie, a to na endotelových buňkách, na bazálních membránách nebo extracelulárních matricích. Schopnost adheze na základě rozeznání orgánově specifických receptorů je pravděpodobně zodpovědná za tkáňový tropismus borélií. Například v oblasti pohybového aparátu hrají významnou úlohu cukerné složky proteoglykanů - chondroitinsulfát a keratansulfát, stavební kameny kolagenu, na jejichž vazebné molekuly jsou borélie schopny se navázat.

Projevy postižení pohybového aparátu v průběhu jednotlivých stádií LB mají různý charakter a je možné je rozdělit do tří skupin:

a) artralgie - muskuloskeletální bolest bez objektivního nálezu na kloubu a jeho okolí

- b) artritida - kloubní zánět s objektivním fyzikálním nálezem zhrubění nebo zesílení synoviální membrány a/nebo kloubního výpotku
- c) chronické změny kloubů a kostí pod ACA
- (Valešová, 2006)

### c) Neuroborelióza

Při nedostatečně léčené boreliové infekci se může dostavit poškození nervového systému, přičemž zejména u dětí je častá periferní obrna lícního nervu, jež se může kombinovat projevy kraniálních neuritid, projevujících se různorodým postižením mozkových nervů.

U dospělých osob představuje patognomickou, nadále však opomíjenou klinickou jednotku **meningomyeloradikuloneuritida**, označovaná jako **Bannwarthův syndrom**. Vyznačuje se krutými, často nesnesitelnými neurogenními bolestmi, které jsou podmíněny zánětem míšních kořenů a mozkomíšních plen.

Z pozdní fáze diseminované infekce můžeme jmenovat postižení nervového systému jakými jsou **encefalopatie, myelopatie, poruchy kognitivních, paměťových a exekutivních funkcí, poruchy extrapyramidového systému, emocí a poruchy nervově-svalového přenosu při neuroborelióze** (Bojar, 2006).

Důležitými faktory pro patogenezí neuroboreliózy se ukazují toll-like receptory, zejména TLR 1,2,5 a 9 (Bernardino et al, 2008).

### c) Postižení oka

Oční projevy LB jsou velmi různorodé a mohou se objevit ve všech fázích nemoci, nejčastěji však ve 2. a 3. fázi. Řada očních postižení však zůstává zřejmě nediodagnostikovaná.

Mezi známé oční projevy LB patří např.: **konjunktivitida, episkleritida, edém víček, uveitida, odchlípení sítnice, neuropatie očního nervu ad.**

Většina očních postižení LB přichází v pozdních fázích nemoci, přesto mohou být prvním příznakem (uveitida, okohybné poruchy). Patogeneticky se častěji uplatňuje imunoalergická reakce, méně často přímé napadení očních tkání borélií. Tak jako při ostatních projevech LB je potřeba myslet na možnou séronegativitu v některých fázích choroby a difference ve výsledcích různých laboratoří.

Konečně je nutné myslet na riziko přeceňování infekce a možnost jiného paralelně probíhajícího onemocnění (Diblík, 2006).

#### d) Postižení srdce

**Lymeská karditida** (LK) je označována pro postižení srdce, ke kterému dochází v 2. stadiu LB, zpravidla v odstupu 2 týdnů až 5 měsíců po vstupu infekce. Mezi nejčastější symptomy patří zejména poruchy srdečního rytmu, perikarditida (s výpotkem nebo bez něj), myokarditida (s recentním srdečním selháním nebo bez něj) a dilatovaná kardiomyopatie jako pozdní projev manifestace. Uvedené projevy jsou zdrojem palpitací, bolestí na hrudníku, dušnosti (Bartůněk, 2006).

#### 2.2.3 Léčba

K léčbě LB je vhodná řada antibiotik, zejména tetracykliny, peniciliny, makrolidy a cefalosporiny. Jednotlivý druh antibiotik se volí podle stadia a orgánového postižení. Nejúčinnější v časně fázi se ukázal **Doxycyklin**, jehož výhodou je dobrý průnik do tkání, vysoké vstřebávání po perorálním užití a možnosti dlouhodobého užívání, nevýhodou je fotosenzitivita a dráždění žaludeční sliznice. **Amoxycilin** se podává tam, kde jsou tetracykliny kontraindikované, tj. u těhotných a kojících žen, u dětí do 8 let věku a u alergií na tetracykliny. **Erytromycin** a **azitromycin** mohou užívat těhotné a kojící ženy a děti do 8 let, které jsou alergické na peniciliny. **Ceftriaxon**, **cefotaxim** a **penicilin G** jsou vhodné k léčbě nervových, kloubních a srdečních manifestací 2. a 3. stadia, díky vysoké účinnosti a průniku do tkání. Pro eliminaci cyst se doporučuje přidávat k penicilinovým antibiotikům **metronidazol** (Hercogová, 2006).

Protože je celé onemocnění komplexní, je potřeba optimalizovat postupy a vytvořit ucelený systém diagnostických nástrojů, který bude citlivý a specifický, a který zahrnuje i komplementární a alternativní medicínu (Complementary and Alternative Medicine - CAM). Je nutné obrátit pozornost také na přírodní a výživové doplňky, které mohou být podávány současně s antibiotiky a přispívají tak rychlejší regeneraci a celkové účinnosti (Vojdani et al, 2007).



## 2.2.4 Očkování, prevence

Současná vakcína **Lymerix** je připravována z vnějšího membránového lipoproteinu rOspA bakterie *Borrelia burgdorferi sensu stricto*. Tento protein se získává rekombinantně expresí v bakterii *Escherichia coli*. Antigen rOspA je vysoce imunogenní a je dostatečný pro indukci specifických protilátek, které zabrání vzniku tohoto infekčního onemocnění. Vakcína je adsorbována na hliníkový nosič. V posledních letech se registruje další vakcína **ImuLyme**, která je podle klinických studií snad dokonce více imunogenní, neboť stejný rekombinantní antigen (jako v případě vakcíny Lymerix) je vázán na jiný nosič než je hydroxid hlinitý. Oba typy vakcín jsou vhodné jen pro oblasti Severní Ameriky, kde se převážně vyskytuje pouze *Borrelia burgdorferi sensu stricto*. Naopak v Evropě nebo v Asii jsou obě vakcíny prakticky neúčinné, neboť zde převažují jiné typy *B.burgdorferii*: *afzelii* a *garinii*, vůči kterým vakcinační antigen Lymerixu nebo ImuLymu nevyvolá protektivní imunitní odpověď. Očkovací látka vhodná pro imunizaci v Evropě nebo Asii se teprve vyvíjí, i když některé klinické studie s lipoproteiny analogickými OspA nebo OspC již proběhly.

Vakcína proti lymeské borelióze se používá pro aktivní imunizaci osob starších 15 let a mladších 70 let. Přestože dochází relativně k vysoké incidenci i u dětí mladších 15 let, účinnost a bezpečnost vakcíny nebyla dlouhodobě sledována u této věkové skupiny, a proto se této skupině z důvodu nedostatečné zkušenosti zatím toto očkování nedoporučuje.

Očkování se doporučuje cíleně zejména osobám, které žijí v oblastech s vysokou incidencí tohoto infekčního onemocnění a existuje u nich vysoké riziko možné expozice (lesní dělníci, lidé na rekreaci apod.). Očkování se doporučuje rovněž osobám, které již v minulosti prodělaly nekomplikovanou lymeskou boreliózu a u nichž přetrvává riziko možné reexpozice. Naopak osoby, které jsou léčeny na rezistentní typ lymeské artritidy by neměly být očkovány z důvodu možné imunitní reaktivity vůči OspA.

Očkování se doporučuje provádět tak, aby očkováná osoba získala poslední dávku před zahájením sezóny (obvykle do dubna).

Jedna dávka vakcíny proti lymeské borelióze má objem 0,5 ml. Primární imunizace je prováděna třemi dávkami podávanými v 0., 1., 12. měsíci. I když lze částečnou protekci dosáhnout již po podání 2. vakcinační dávky (50% sérokonverze),

doporučuje se pro dosažení optimální ochrany dokončit očkování podáním 3. vakcinační dávky. Toto očkování se u nás dosud neprovádí, neboť vakcína není vhodná pro očkování v Evropě. Vakcína se podává intramuskulárně nejčastěji do deltoidní oblasti.

I když očkování vůči lymeské borelióze vyvolává více než 98% sérokonverzí po podání 3. dávky, nelze toto očkování považovat za kompletně protektivní. Protektivní účinnost vůči asymptomatické infekci je 83% v prvním roce a 100% ve 2. roce, zatímco protektivní účinnost vůči tzv. "definitivní" lymeské borelióze (tj. s přítomností erythema migrans nebo s neurologickými muskuloskeletálními či kardiovaskulárními projevy lymeské boreliózy, které jsou potvrzeny kultivacemi, PCR pozitivitou nebo WB sérokonverzí) je 76%.

Rozsáhlé klinické studie potvrdily, že hladiny IgG protilátek specifických vůči OspA vyšší než 1200 EU/ml korelují s imunoprotekcí vůči lymeské borelióze.

Osobám se změněnou imunitou, s muskuloskeletálním onemocněním nebo s chronickým kloubním či neurologickým onemocněním po prodělání lymeské borelióze, stejně jako osobám s léčbou s rezistentní lymeskou artritidou je očkování proti lymeské borelióze kontraindikováno, neboť stávající zkušenosti jsou malé nebo žádné.

Dětem mladším 15 let nebo osobám starším 70 let se toto očkování nedoporučuje, neboť dosavadní zkušenosti očkování těchto věkových skupin jsou malé nebo žádné.

Souběžné očkování proti lymeské borelióze s ostatním očkováním se nedoporučuje, neboť dosud nejsou k dispozici kompletní studie vylučující interferenci simultánního očkování (URL 1, 2006).

Bioveta, a. s. izolovala genovou sekvenci pro OspA a OspC antigeny *Borrelia afzelii*, *Borrelia burgdorferii sensu stricto* a *Borrelia garinii*. Současně připravila rekombinantní proteiny odpovídající těmto sekvencím a vlastní technologický postup výroby rekombinantních proteinů určených pro přípravu vakcíny proti borelióze pro humánní použití. Tyto výsledky jsou součástí složitého a náročného projektu vývoje humánní vakcíny (URL 2, 2008).

Účinná vakcína proti borelióze u psů existuje v ČR např. taktéž od firmy Bioveta, a. s. a to Biocan B *inj. ad us. vet.*

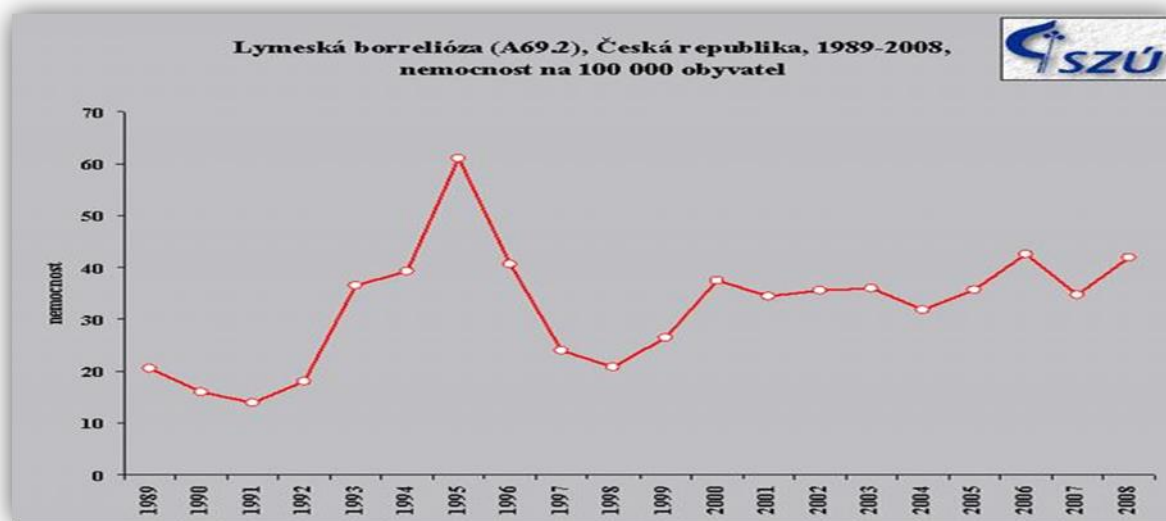
Nejúčinnější a nejjednodušší prevencí v endemických oblastech tedy v humánní oblasti nadále zůstává používání repelentních prostředků, při pohybu v přírodě se pohybovat v dlouhých kalhotách a tričku, po příchodu z přírody se

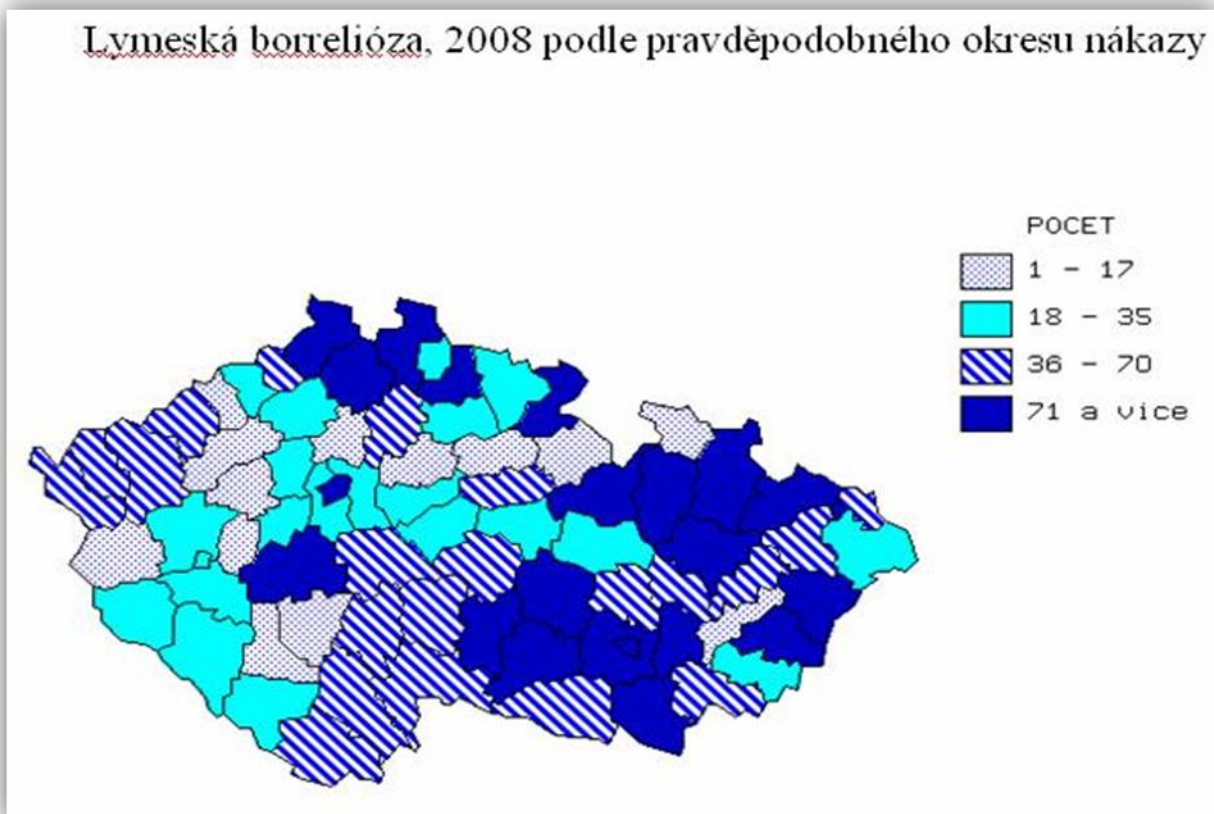
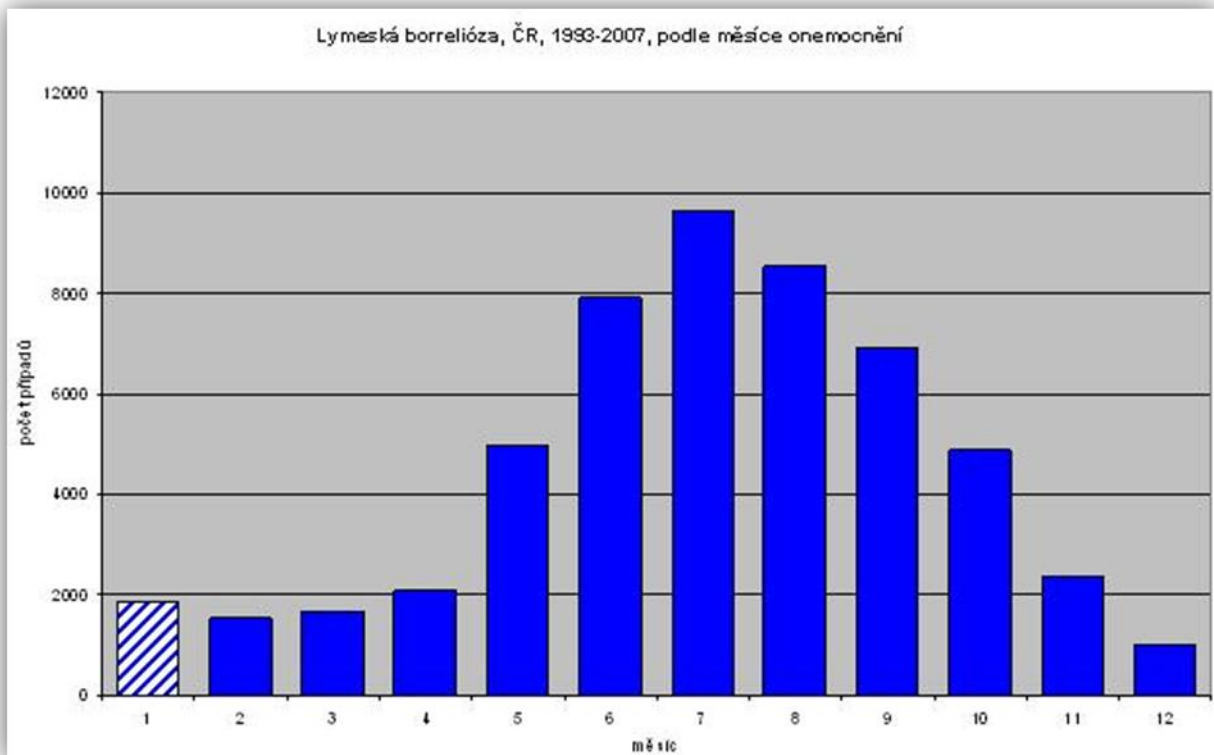
pečlivě prohlédnout a případná přistátá klíšťata vyklavými pohyby opatrně odstranit, v žádném případě by nemělo dojít k usmrcení klíštěte, aby nedošlo ke kontaminaci boréliemi a místo zasažení důkladně vydezinfikovat, neméně důležité je také pravidelně prohlížet případná domácí zvířata.

### 2.2.5 Výskyt a promořenost

Trend výskytu LB v České republice v letech 1989-2008 je uveden na následujícím grafu. Spolehlivé údaje o výskytu LB jsou k dispozici až od začátku devadesátých let. Počet případů stoupal až do roku 1995, kdy dosáhl vrcholu. Po následujícím poklesu a stagnaci začátkem nového století kulminoval v roce 2006. V roce 2008 bylo v České republice hlášeno 4 350 případů LB, což reprezentuje nemocnost 41,6/100 000 obyvatel.

Sezónní výskyt LB kulminoval v letech 1993 – 2007 v červenci, nicméně nová onemocnění se vyskytovala i v zimních měsících. Je to způsobeno jednak delší inkubační dobou, která může dosáhnout až 3 měsíců ( průměrně 5 týdnů) a jednak i tím, že prvním příznakem onemocnění mohou být u části případů až kloubní či neurologické komplikace. Příznivé klimatické podmínky roku 2006 ovlivnily jednak přežívání a vývoj klíšťat a jednak i společenské a sportovní aktivity osob, které se díky teplému a suchému počasí (a růstu hub) častěji pohybovaly v oblastech vysokého výskytu klíšťat i v podzimních měsících.





Z věkového rozdělení případů onemocnění LB je zřejmé, že postiženy jsou zejména dětské věkové skupiny s nejvyšší nemocností ve věkové skupině 5-9letých

a věkové skupiny dospělých starších 45 let. Příčinou tohoto rozdělení jsou pravděpodobně rekreační a sportovní aktivity osob (*Doc.MUDr.Bohumír Kříž,CSc, MUDr.Čestmír Beneš CEM-SZÚ, URL 3*).

Co se týče celosvětového měřítka musíme uvážit i vliv globální změny klimatu, která má vliv na vektor LB, což zapříčiňuje jeho rozšíření do severnějších poloh a vyšších nadmořských výšek než dříve. Dopad může být pozorován i v sezónní aktivitě klíšťat (Gray, 2009).

## 2.2.6 Diagnostika

Metody detekce borélií se rozdělují na nepřímé a přímé. Mezi nepřímé patří ELISA, Western Blot, imunofluorescence IFA, mezi přímé pak světelná mikroskopie v zástinu, kultivace a polymerázová řetězová reakce PCR, ať už v reálném čase, či např. Nested PCR.

### ELISA

Z angl. Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay, někdy také označovaná jako EIA (Enzyme Immunoassay) je jednou z nejpoužívanějších imunologických metod sloužících k detekci protilátek. Metoda funguje na bázi imunoenzymatické reakce a lze s ní rovněž detekovat i antigen. ELISA využívá dvou základních vlastností imunoglobulinů. Za prvé je to schopnost proteinů (tedy imunoglobulinů) vázat se na povrch umělých hmot (např. polystyrenu) a v druhé řadě pak schopnost vázat enzymy na Fc fragmenty imunoglobulinových molekul (URL 4).

Jako rutinní diagnostická laboratorní metoda byla zavedena již v r. 1984, používá se k průkazu protilátek třídy IgG a IgM v krevním séru, v mozkomíšním moku a v synoviální tekutině (Hulínská, 2006).

### Western Blot

Je technika na bázi elektroforézy a enzymatické reakce. Oproti běžným sérologickým metodám jako je ELISA, je Western Blot sice časově náročnější a dražší, ale za to přesnější (větší specifita). Princip spočívá v tom, že každý infekční agens má svůj specifický antigen proti němuž vznikají zcela specifické protilátky. Příbuzné druhy bakterií či virů mají řadu podobných antigenů či sdílejí

stejné epitopy (konkrétní místo antigenu, kam se váží protilátky). To se v praxi projeví tím, že u běžných sérologických metod vznikají zkřížené reakce. To znamená, že třeba antigen jednoho druhu viru (patogenní) může reagovat s protilátkami proti zcela nepatogennímu viru, což vede k chybné diagnostice onemocnění. Je-li znám konkrétní protein („band“) který je specifický pro daný druh viru, bakterie či parazita, je možné právě metodou Western Blotu tento specifický protein detekovat a vyloučit tak jiné příbuzné druhy patogenů (URL5).

### **Mikroskopie v zástinu**

Je jednou z nejstarších mikroskopických metod a používá se k pozorování malých nebo pohyblivých objektů. Využívá tzv. Tyndalova jevu, což prakticky znamená, že objekt není přímo osvětlován, ale dopadá na něj světlo z boku, čímž se vytváří efekt záření mikroskopovaného objektu, v našem případě spirochét.

### **PCR (polymerase chain reaction)**

V našem případě jsme využili polymerázovou řetězovou reakci v „reálném čase“, což je modifikace klasické PCR s tím rozdílem, že můžeme sledovat kontinuálně přírůstek DNA během celého procesu na základě přírůstku fluorescence s přibývajícím syntetizovanou nukleovou kyselinou (NK).

Tato metoda má řadu výhod, ke kterým nesporně patří kvantifikace (čím větší množství NK, tím rychlejší přírůstek fluorescence), vysoká specifita, rychlost, citlivost a poměrně nenáročná manuální požadavky.

## 3. Praktická část

### 3.1 Materiál a Metody

#### 3.1.1 Použité vzorky, přístroje, kity

Cílem bakalářské práce bylo srovnat dvě diagnostické metody DNA detekce a to PCR v reálném čase na dvou přístrojích - LightCycler® a RealTime ABI 7300 (Applied Biosystems). K detekci byly použity tři vzorky klíštěte obecného označené jako V134, V135 a V136. K izolaci DNA borélie z klíštěte byl použit kit UltraClean™ Blood Spin DNA (Mo-Bio). Dále byly potřeba soupravy EliGene® Borrelia RT určený pro ABI 7300 a EliGene® Borrelia LC pro LightCycler® obě slouží pro detekci bičíkového antigenu flagellinu pro patogenní druhy borélií *B. granii*, *B. afzelii* a *B. b. s. s.* z izolované DNA. Na systému ABI 7300 byla detekce provedena se sedmidenním zpožděním, kdy byly vzorky uchovány při 4° C v lednici a mohlo dojít k částečné degradaci DNA.

#### 3.1.2 Izolace DNA

Do mikrozkušavky bylo napipetováno **20 µl proteinázy K**, **200 µl roztoku B1** a **20 µl IC DNA 01**. Klíště bylo dáno do mikrozkušavky a pomocí sterilní injekční jehly „rozcupováno“ o stěnu mikrozkušavky, zkušavka uzavřena a jemným vortexováním opláchnuty stěny zkušavky a promíchána směs ve zkušavce. Mikrozkušavku jsme vložili do termotřepačky a inkubovali 10 minut. Poté se mikrozkušavka silně zvortexovala a krátce zcentrifugovala. Dále bylo **přidáno 200 µl roztoku B2**, silně zvortexováno, krátce zcentrifugováno. Veškerý obsah mikrozkušavky byl přenesen do kolonky a centrifugován 1 min při 13 000 x g, kolonka byla po centrifugaci přendána do nové mikrozkušavky. Dále byla kolonka promývána následujícím postupem:

Do kolonky **přidáno 500 µl roztoku B3**. Centrifugace 30 sekund při 13 000 x g.

Vyjmutí kolonky z mikrozkušavky, obsah mikrozkušavky vylit do odpadu a kolonka vrácena do mikrozkušavky.

Do kolonky **přidáno 500 µl roztoku B4**. Centrifugace 30 sekund při 13 000 x g .  
Opět vyjmutí kolonky z mikroskopu, obsah mikroskopu vylit do odpadu a kolonka vrácena do mikroskopu.

Znovu centrifugace 30 sekund při 13 000 x g.

Poté byla opatrně vyjmuta kolonka a přenesena do nové mikroskopu, aniž by se dotkla roztoku B4 na dně původní mikroskopu.

**Roztok B5 byl inkubován asi 5 minut na termotřepačce při 65°C. Do středu kolonky bylo napipetováno 100 µl roztoku B5 předehřátého na 65°C.**

Centrifugovali jsme 1 min při 13 000 x g.

Nakonec se odstranila kolonka a zavřelo víčko mikroskopu. Nyní byla genomická DNA připravena pro diagnostiku.

### 3.1.3 DNA diagnostika EliGene® Borrelia pro LightCycler®

Kit obsahuje směs primerů a prób, které jsou specifické k již zmíněným třem druhům borélií a má vysokou senzitivitu - zachytí 1-10 borélií v 5 µl klinického vzorku (v našem případě DNA vyizolovaná z klíštěte). Je také možné použít vyizolovanou DNA z krve, moči, mozkomíšního moku, synoviální tekutiny nebo tkání.

#### Nastavení přístroje LightCycler® před započítím přípravy mixů:

95° C 15 s

1x 95° C 10min 50x 55° C 20 s - zapnutí odečtového režimu (acquisition mode on)

72° C 25 s

Signál se odečítá při druhém kroku, tedy při 55° C. Teplota pro úvodní vyhledávání vzorků (sample seeking) je dobré nastavit na 80° C, protože defaultní nastavení vyhledávání vzorků na 30° C může způsobit, že některé vzorky vložené do přístroje nemusejí být přístrojem nalezeny.

V soupravě jsou použity primery a hybridizační značené próby (Molecular Beacons hybridization probes). Fluorescenční signál je snímán LASERem. Citlivost



metody je především závislá na zpracování klinického vzorku - izolaci DNA v předešlé kapitole.

#### Složení kitu:

**Borrelia LC Mix**

**Taq DNA polymeráza**

Pozitivní kontrola DNA - **PC DNA Borrelia**

Interní kontrola DNA - **IC DNA 01**

#### Pracovní postup:

1. Před izolací DNA bylo k vzorku přidáno **20 µl IC DNA 01**, jak již bylo zmíněno v kapitole izolace DNA.
  - A) Příprava mastermixu pro 10 reakcí se uskutečnila smícháním **Borrelia LC Mixu**, který byl předem rozmražen při pokojové teplotě a krátce zcentrifugován, a **Taq DNA polymerázy** - to vše jemně promícháno.
  - B) Příprava reakčního mixu se provedla tak, že se napipetovalo **15 µl mastermixu** do skleněné kapiláry určené k amplifikaci a k němu bylo přidáno **5 µl vyizolované DNA**. Nevyužitý mastermix se znovu nezmrazuje, ale může se skladovat při 4° C po dobu maximálně 14 dní.
2. Příprava pozitivní kontroly je obdobná s přípravou reakčního mixu s tím rozdílem, že se nepřidává vyizolovaná DNA, nýbrž **PC DNA Borrelia**. Všechny kapiláry se utěsní víčkem a zcentrifugují, čímž jsou plně připraveny na přemístění do karuselu přístroje LightCycler®, kde probíhá vlastní detekce.
3. Abychom mohli výsledek charakterizovat jako pozitivní, musí narůstat signál v kanálu 705. V případě, že k amplifikaci nedošlo, vzorek je negativní. Vnitřní kontrola by měla mít nárůst v signálu 530 vždy, jinak proběhla v průběhu postupů chyba.

### 3.1.4 DNA diagnostika EliGene® Borrelia pro RealTime Sytem (ABI 7300)

Tato souprava má též vysokou senzitivitu - udává se zachycení 5 borélií ve 200 µl klinického vzorku. Možnosti použití DNA jsou identické jako v případě kitu pro LightCycler®.

#### Nastavení přístroje pro RealTime před započítím přípravy mixů:

						95° C 15 s	
1x	50° C	2 min	1x	95° C	10min	45x	55° C 20 s
							72° C 25 s

Pro detekci je využita próba typu TaqMan a to konkrétně FAM (abs. 494 nm - emise 525 nm), pro inhibiční kontrolu Yakima Yellow. Emisní signál se odečítá v druhém kroku tj. 55° C. Signál je na rozdíl od LightCycler® snímán CCD kamerou.

#### Složení kitu:

##### **Borrelia Mix**

Inhibiční kontrola Mix - **IC MIX Borrelia**

Pozitivní kontrola DNA - **PC DNA Borrelia**

Inhibiční kontrola DNA - **IC DNA**

#### Pracovní postup:

1. Před izolací DNA bylo k vzorku přidáno **20 µl IC DNA**, jak již bylo zmíněno v kapitole izolace DNA.
2. Příprava mixu pro vlastní detekci se provádí tak, že se smíchá v amplifikační mikrozkuhavce **20 µl Borrelia mix s 5 µl vyizolované DNA**. Obdobně jako při první diagnostické metodě se nespoteřebovaný Borrelia mix uskládňuje v lednici při 4 ° C v temnu.

3. Pozitivní kontrola je vytvořena stejně jako mix pro detekci, jen místo DNA se přidá **5 µl PC DNA**
4. Ke každému vzorku, ke kterému se provádí detekce, je třeba ještě provést inhibiční kontrolu. Což se provádí tak, že do amplifikační zkumavky se nepipetuje po rozmrazení **20 µl IC MIX Borrelia** a **5 µl vyizolované DNA**. Nespotřebovaný IC MIX Borrelia se uskladňuje stejně jako Borrelia mix v kroku č. 2.
5. Nyní je vše připraveno na vložení do přístroje pro RealTime a spuštění programu.

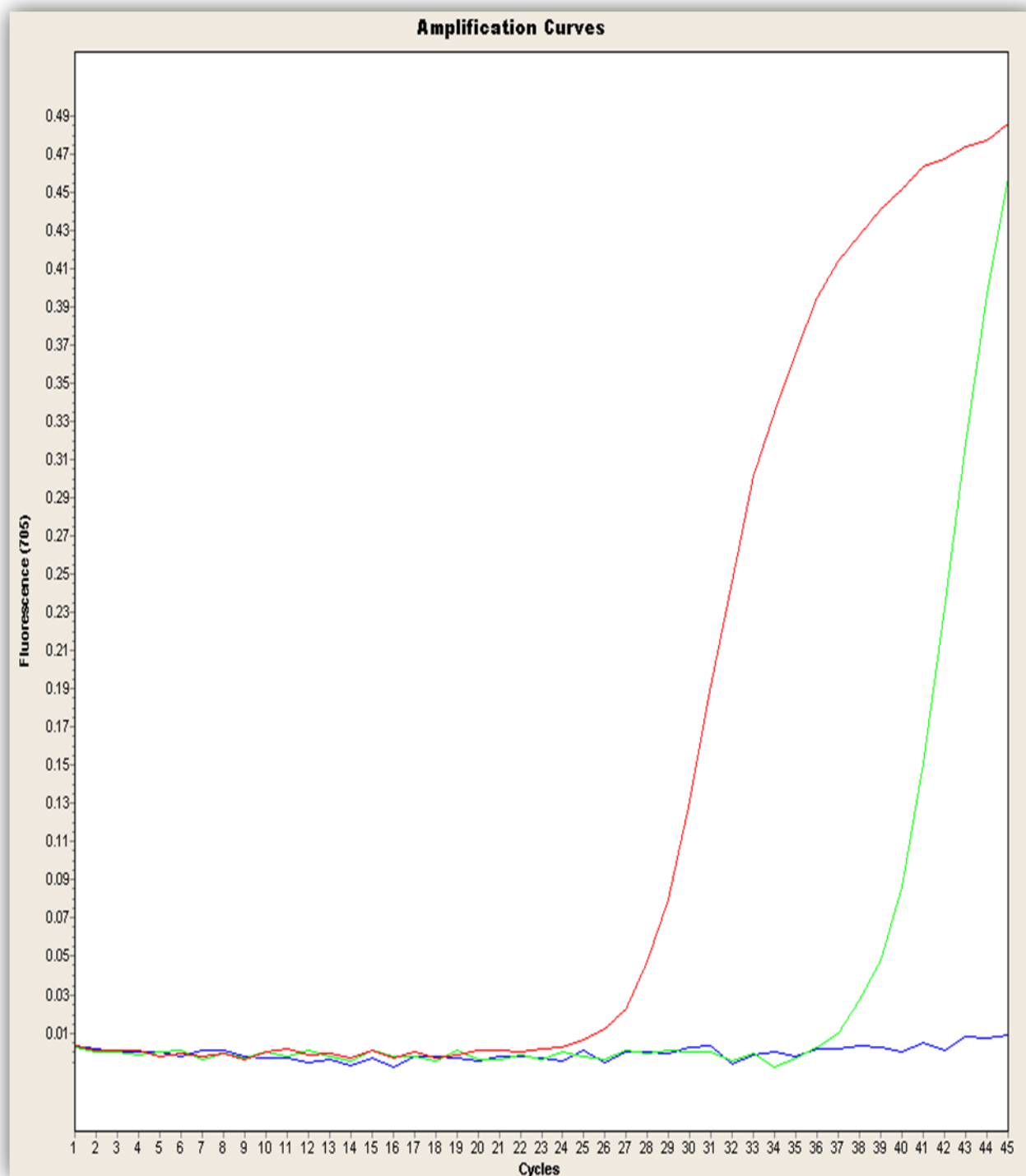
#### Odečítání výsledků:

Pozitivní výsledek je charakterizován amplifikací a nárůstem emisního spektra charakteristického pro FAM v mikrozukmavce s Borrelia mix. V případě, že je výsledek negativní, je třeba zkontrolovat, jestli v mikrozukmavce s IC MIX Borrelia došlo k nárůstu emisního spektra pro Yakima Yellow (event. VIC) a tedy amplifikaci vnitřní kontroly

U každého pozitivního vorku je nutné vyhodnotit tvar amplifikační křivky!

## 3.2 Výsledky a vyhodnocení

### 3.2.1 Amplifikační křivky z LightCycler® a jejich interpretace



Na výstupu z LightCycler® vidíme 3 křivky původně označených vzorků V134 - V136 a to modrý pro V134, zelený pro V135 a červený pro V136. Svislá osa znázorňuje nárůst amplifikace v emisním spektru při 705 nm, vodorovná osa ukazuje počet cyklů.

Abychom mohli interpretovat výsledek jako pozitivní, musí být zřetelný amplifikační nárůst před 45. cyklem a signál pro pozitivní kontrolu musí být pozitivní.

Na základě těchto předpokladů můžeme považovat za **pozitivní** vzorky označené jako **V135** a **V136**, tedy červenou a zelenou křivku. U V136 dochází k nárůstu již v 26. cyklu, z čehož můžeme usuzovat na vysokou koncentraci borélií ve vzorku. V135 se začíná amplifikovat v 37. cyklu, čímž jej můžeme považovat za pozitivní, ale s daleko menší koncentrací borélií.

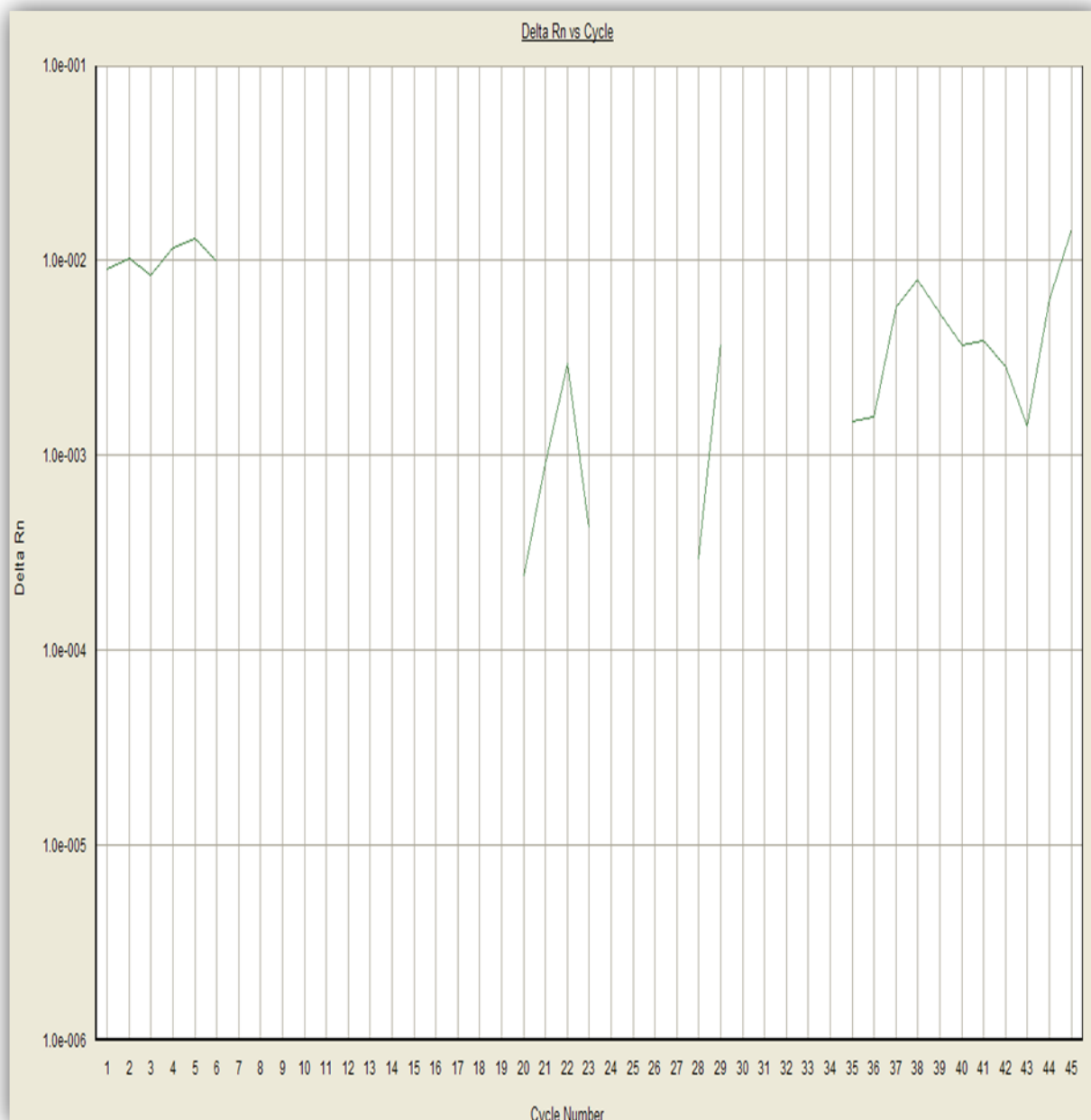
Vzorek **V134** je **negativní**, nedochází zde k žádnému nárůstu ani náznaku nárůstu emisního spektra před 45. cyklem.

Pozitivní kontrola byla pozitivní, tzn. že nám potvrdila správnost naměřených výsledků.

Detekce byla prováděna v programu LightCycler Software (verze 4.1.1.21).

### 3.2.2 Amplifikační křivky z RealTime Sytem (ABI 7300) a jejich interpretace

V134

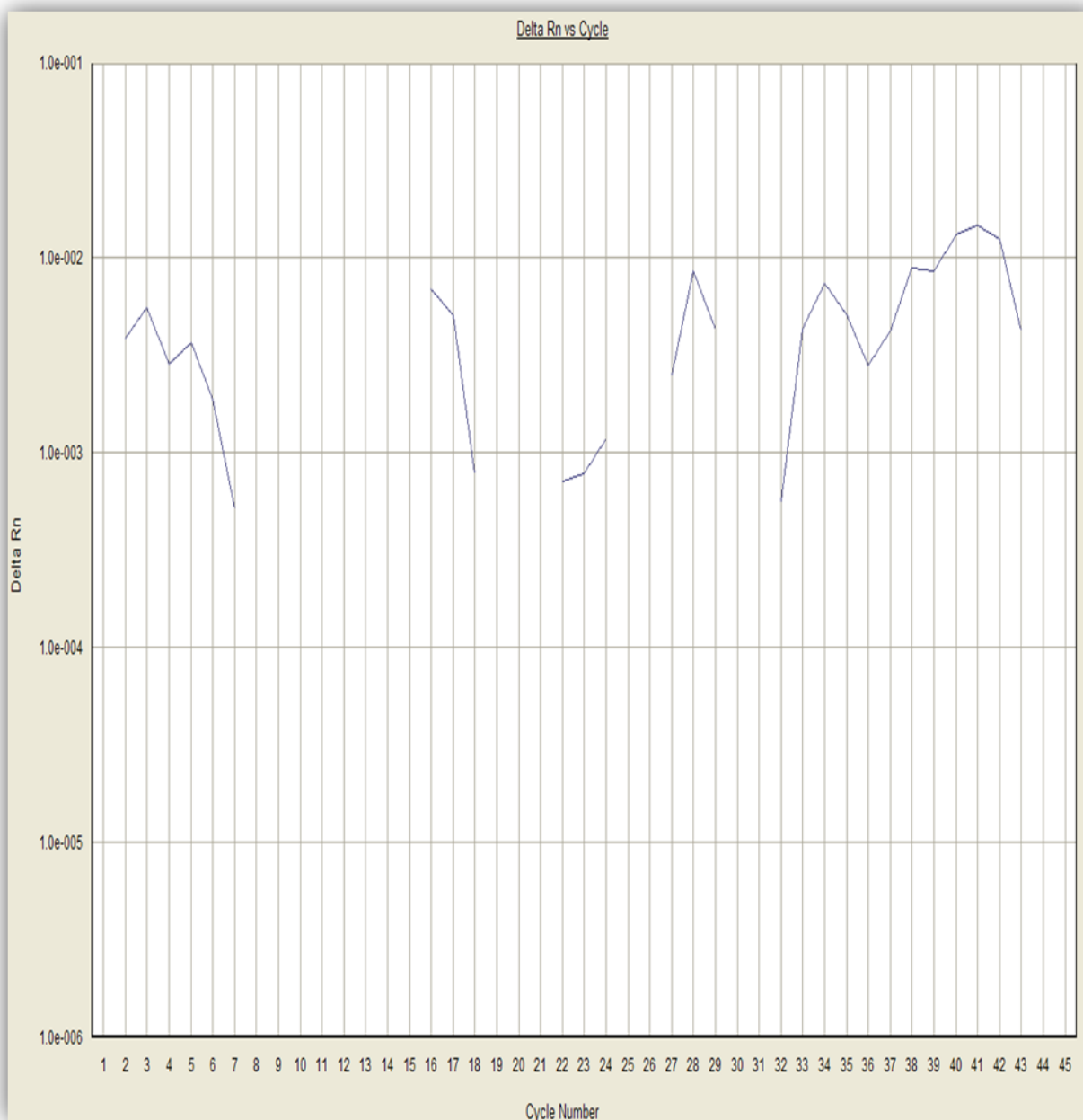


Na tomto obrázku výstupu pro V134 z RealTime System 7300 vidíme stejně jako u výstupu z LightCycler® svislou osu s nárůstem emisního spektra a vodorovnou osu s počtem cyklů.

Pozitivitu výsledku potvrzuje exponenciální nárůst křivky (strmě stoupající tvar v počátku) amplifikace pro daný vzorek před 45. cyklem a signál pro inhibiční kontrolu musí být taktéž pozitivní.

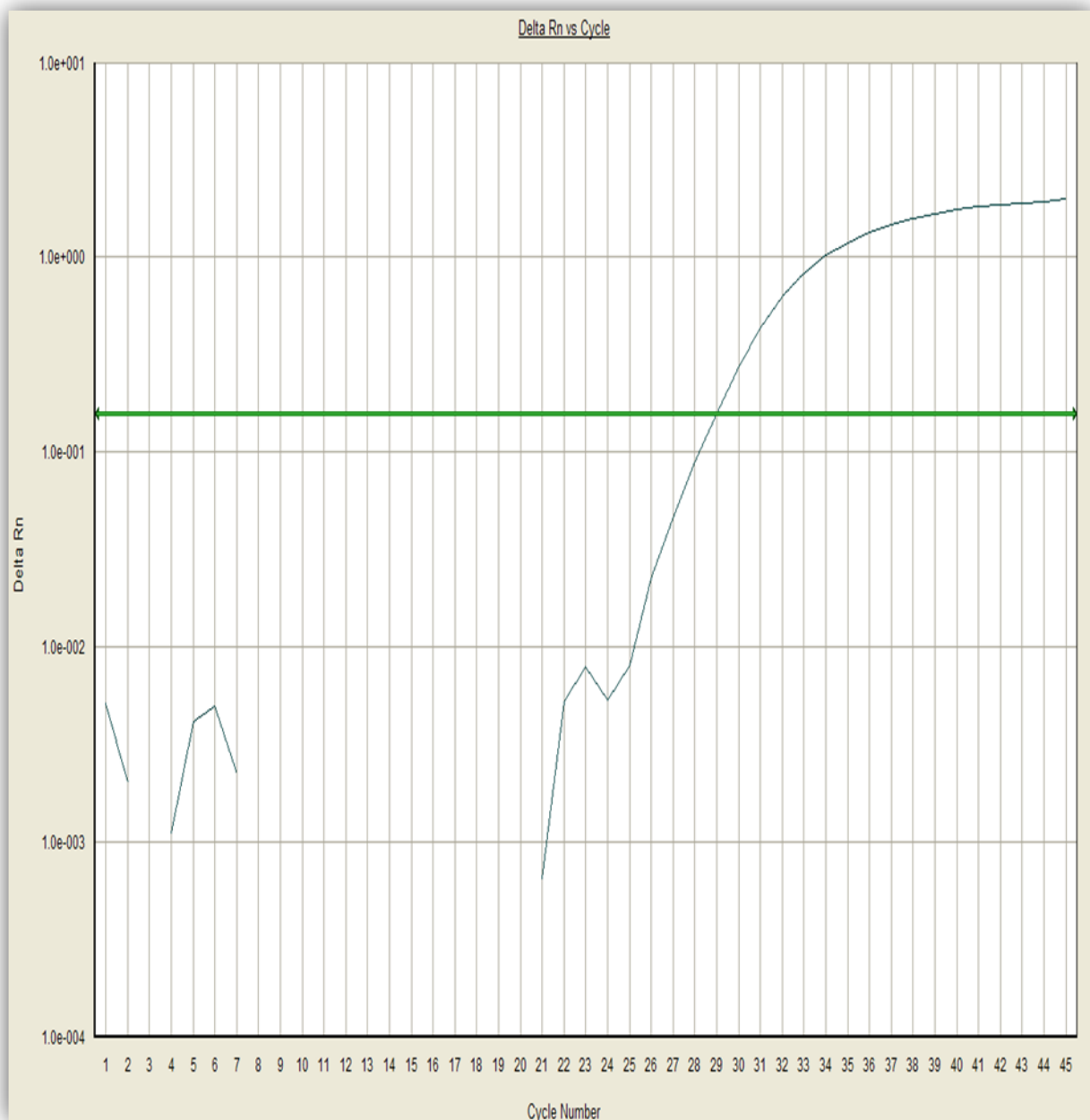
Jak je zřejmé pro **V134** nedošlo k žádnému znatelnému nárůstu emisního spektra před 45. cyklem, můžeme jej tedy označit za **negativní**.

## V135



**V135** lze považovat podle RealTime Systemu 7300 za **negativní**, nedošlo zde k žádnému exponenciálnímu nárůstu amplifikace.

## V136



Konečně **V136** se nám krásně amplifikoval se zdatelným exponenciálním nástupem v počátku a ve 29. cyklu nám protíná křivka tzv. „base line“ (na obrázku vodorovná přímka zelené barvy), která nám značí „jasně“ **pozitivní** vzorek.

Jako vyhodnocovací software pro RealTime Systemu 7300 byl použit 7300 System SDS Software (Absolute Quantification).

Signál pro inhibiční kontroly byl ve všech případech pozitivní, což potvrzuje správnost výsledků.



### 3.2.3 Tabulka souhrnného vyhodnocení

<i>Diagnostický systém/vzorek</i>	V134	V135	V136
RealTime System 7300	negativní	negativní	pozitivní
LightCycler®	negativní	pozitivní	pozitivní

Závěrem lze k vyhodnocení říci, že V134 byl detekován jako negativní na obou systémech, V135 byl detekován jako pozitivní u LightCycler®, ale negativní u RealTime System 7300 a V136 byl označen jako pozitivní při obou diagnostikách.

## 4. Diskuze

V praktické části této bakalářské práce jsme provedli detekci 3 vzorků izolátů DNA z klíštěte obecného. Pro srovnávání byly vybrány dva RealTime PCR přístroje a to konkrétně LightCycler® a ABI RealTime System 7300. Předpokládala se vyšší senzitivita u přístroje LightCycler®.

V případě dvou vzorků V134 a V136 byl zjištěn shodný verdikt positivity/negativity, u vzorku V135 bylo zaznamenáno odlišné znění výsledku a to pozitivní u LightCycler® a negativní u ABI RealTime System 7300. Ovšem i v případě shodně určené positivity V136 byl znatelný rozdíl. Při diagnostice na ABI RealTime System 7300 je pozitivita určena 29. cyklem u LightCycler® je tomu již v 26. cyklu reakce. U negativity V134 nelze nikterak určit rozdíly v citlivosti.

Nabízí se otázka a tím pádem i jeden z cílů bakalářské práce - objasnění možných rozdílů mezi metodami a jejich možné slabiny či výhody.

Prvním možným kamenem úrazu mohl být hned první krok a to izolace DNA z klíšťat, kde mohlo dojít k neopatrné manipulaci s materiálem a možné kontaminaci vzorku nežádoucí DNA (NK) z prostředí, kde je velmi důležitá sterilita práce a opatrnost při pipetování.

Protože se detekce na LightCycler® prováděla o sedm dní dříve než na ABI RealTime System 7300, je nutné vzít v patrnost možnou částečnou degradaci DNA během uskladnění DNA v lednici a následném použití.

Neméně důležitými faktory jsou samotné rozdíly mezi danými přístroji a kity pro vlastní detekci. U ABI RealTime System 7300 je využita próba TaqMan typu a jako snímač CCD kamera, oproti tomu LightCycler® používá značenou hybridizační próbu typu Molecular beacons. U kitu pro System 7300 je udávaná výrobcem senzitivita záchytu 5 borélií ve 200  $\mu$ l, pro LightCycler® 1 - 10 borélií v 5  $\mu$ l.

PCR v reálném čase není využívána příliš dlouho, spíše se využívala dříve Single Tube Nested PCR, kde podle Mejzlíkové (2003) metoda kultivace patogenů následovaná PCR je citlivější než samotná PCR bez kultivace spirochét, totéž potvrzují i práce Mejzlíkové (2001) a Janouškovcové (2004).

## 5. Závěr

Lymeská borelióza způsobená patogenními druhy *B. burgdorferi* je mimořádně houževnatá a nepříjemná nemoc, oproti tomu včasná diagnostika a správné určení antibiotické léčby zaznamenává vysoké procento plného uzdravení bez chronických následků.

Od objevení patogenu LB na konci 20. století neuběhlo mnoho let a v současné době již dokážeme spolehlivě několika diagnostickými metodami vyšetřit pacienta na přítomnost borélií. Je však možné, že důsledkem teplejšího počasí a mírnějších zim dochází k vyššímu výskytu klíšťat a jejich promořenosti boréliemi, což má za následek určitý tlak na vývoj spolehlivé očkovací látky a vývoj jednoznačné, rychlé a levné diagnostiky.

Naděje se skýtá v PCR v reálném čase, kdy po odběru klinického vzorku může mít pacient výsledek prakticky do několika málo hodin a může být nasazena konkrétní léčba. Jediným problémem v rutíně zaběhlé PCR diagnostiky se zdá být odlišná citlivost a spolehlivost interpretace výsledků na různých přístrojích.

Důkazem toho je praktická část bakalářské práce, kde už na 3 vzorcích byla zjištěna různá senzitivita a následná různá pozitivita/negativita u jednoho ze vzorků.

Je samozřejmostí, že studie provedená na 2 přístrojích s použitím 3 vzorků není zcela relevantní, ale i tak poukazuje na možné rozdíly, které mohou vzniknout např. při poslání vzorků do laboratoří s odlišnou diagnostickou vybaveností.

Jako výsledek bakalářské práce můžeme říci, že byla potvrzena původní domněnka, že detekce na LightCycler® bude zřejmě citlivější než na systému ABI 7300.

Do budoucna bude nutné provést další studie s více vzorky a na více přístrojích, aby se zvýšila relevance dosažených výsledků a bylo tak možno najít nejlepší metodu DNA diagnostiky rodu *Borrelia*.

## 6. Souhrn/Summary

### SOUHRN

Infekčním agens lymeské boreliózy v Evropě je bakterie *Borrelia burgdorferi*, která v endemických oblastech cirkuluje mezi klíštětem *Ixodes ricinus* a velkým počtem hostitelů, na kterých se klíště žíví. Pouze 3 druhy *B. burgdorferi* jsou patogenní - *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii* a *B. afzelii*.

Detekovali jsme 3 vzorky DNA (izolované z klíšťat) na dvou přístrojích - LightCycler® a ABI RealTime System 7300. Při měření bylo zjištěno, že LightCycler® by mohl být citlivější než ABI RealTime System 7300.

### SUMMARY

In Europe, *Borrelia burgdorferi sensu lato* the infect agent of Lyme borreliosis circulates in endemic areas between *Ixodes ricinus* ticks and a large number of vertebrate hosts upon which ticks feed. Only 3 species of *B. burgdorferi* are pathogenic - *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii*, *B. afzelii*.

We detected 3 samples of DNA (isolated from ticks) on two apparatuses - LightCycler® and ABI RealTime System 7300. By measuring was detected, that LightCycler® could be more sensitive than ABI RealTime System 7300.

## 7. Použitá literatura

- Bartůněk P.:** Historie, pp. 11-12, Postižení srdce, pp. 101-105 *In* Bartůněk P., **Bartůněk P. et al.:** Lymeská borrelióza, Grada Publishing, Praha, 3.vyd., 2006.
- Lymeská borrelióza, Grada Publishing, Praha, 3.vyd., 2006.
- Bernardino A. L., Myers T. A., Alvarez X., Hasegawa A., Philipp M. T.:** Toll-like receptors: insights into their possible role in the pathogenesis of Lyme neuroborreliosis, *Infect Immun.*, 76(10):4385-95. Epub, 2008.
- Bojar M.:** Neuroborrelióza - postižení nervového systému, pp. 80-98, *In* Bartůněk P., Lymeská borrelióza, Grada Publishing, Praha, 3.vyd., 2006.
- Casjens S., Palmer N., van Vugt R., Huang W. M., Stevenson B., Rosa P., Lathigra R., Sutton G., Peterson J., Dodson R.J., Haft D., Hickey E., Gwinn M., White O., Fraser C. M.:** A bacterial genome in flux: the twelve linear and nine circular extrachromosomal DNAs in an infectious isolate of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi.*, *Mol. Microbiol.*, 35:490-516, 2000.
- de Silva A. M., Telford S. R 3rd, Brunet LR, Barthold S. W, Fikrig E.:** *Borrelia burgdorferi* OspA is an arthropod-specific transmission-blocking Lyme disease valine, *J Exp Med.*, 183(1):271-5, 1996.
- Diblík P.:** Postižení oka, pp. 107-108, *In* Bartůněk P., Lymeská borrelióza, Grada Publishing, Praha, 3.vyd., 2006.
- Dlouhý P.:** Lymeská borelióza, Doporučené postupy pro praktické lékaře, ČLS JEP., 2002.
- Fraser C. M., Casjens S., Huang W. M., Sutton G. G., Clayton R., Lathigra R., White O., Ketchum K. A., Dodson R., Hickey E. K., Gwinn M., Dougherty B., Tomb J. F., Fleischmann R. D., Richardson D., Peterson J., Kerlavage A. R., Quackenbush J., Salzberg S., Hanson M., van Vugt R., Palmer N., Adams M. D., Gocayne J., Venter JC.:** Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*, *Nature*, 390: 580-586, 1997.
- Gern L., Burgdorfer W., Aeschlimann A., Krampitz H. E.:** The ecology of Lyme borreliosis in Europe, p. 59-69. *In* K. Weber and W. Burgdorfer (ed.), *Aspects of Lyme borreliosis*. Springer-Verlag KG, Berlin, Germany, 1993.

**Gray J. S., Dautel H., Estrada-Peña A., Kahl O., Lindgren E.:** Effects of Climate Change on Ticks and Tick-Borne Diseases in Europe 2009, Hindawi Publishing Corporation, 2009.

**Hercogová J.:** Postižení kůže, pp. 62-70, *In* Bartůněk P., Lymeská borrelióza, Grada Publishing, Praha, 3.vyd., 2006.

**Hulínská D.:** Mikrobiologie, pp. 14-22, Laboratorní diagnostika, pp. 50-59 *In* Bartůněk P., Lymeská borrelióza, Grada Publishing, Praha, 3.vyd., 2006.

**Janouškovcová E.:** Sledování přítomnosti spirochét a jejich identifikace u hemtofágních a nehemtofágních členovců a obratlovců v ČR, dizertační práce, PŘF MU Brno, Brno, 2004.

**Janovská D.:** Epidemiologická situace v České republice, pp. 14-22, *In* Bartůněk P., Lymeská borrelióza, Grada Publishing, Praha, 3.vyd., 2006.

**Mejzlíková M.:** PCR - detekce patogenních spirochét v klíšťatech, diplomová práce, PŘF MU Brno, Brno, 2003.

**Ohnishi J., Piesman J., de Silva A. M.:** Antigenic and genetic heterogeneity of *Borrelia burgdorferi* populations transmitted by ticks, *Proc Natl Acad Sci USA*, 16;98(2):670-5, 2001.

**Pal U., de Silva A. M., Montgomery R. R., Fish D., Anguita J., Anderson J. F., Lobet Y., Fikrig E.:** Attachment of *Borrelia burgdorferi* within *Ixodes scapularis* mediated by outer surface protein A, *J Clin Invest.*, 106(4): 561–569, 2000.

**Pejchalová K.:** Dynamika výskytu a identifikace spirochet v hematofágních členovcích, diplomová práce, PŘF MU Brno, Brno, 2001.

**Steere AC, Coburn J, Glickstein L.:** The emergence of Lyme disease, *J Clin Invest.*, 113(8):1093-101, 2004.

**Tortora G. J. Funke B. R., Case Ch. L.:** Microbiology: an introduction. Benjamin Cummings, 2001.

**Valešová M.:** Postižení kloubů, pp. 72-78, *In* Bartůněk P., Lymeská borrelióza, Grada Publishing, Praha, 3.vyd., 2006.

**Vojdani A., Hebroni F., Raphael Y., Erde J., Raxlen B.:** Novel Diagnosis of Lyme Disease: Potential for CAM Intervention, *eCAM Advance Access*, 2007.

Internetové odkazy:

URL 1: [www.bioveta.cz/cs/veterinarni-divize/o-spolecnosti/co-je-u-nas-noveho/vyvoj-vakciny-proti-lymske-borrelioze-pro-humanni-pouziti.html](http://www.bioveta.cz/cs/veterinarni-divize/o-spolecnosti/co-je-u-nas-noveho/vyvoj-vakciny-proti-lymske-borrelioze-pro-humanni-pouziti.html)

URL 2: <http://www.vakciny.net/budoucnost/lymd.html>

URL 3: <http://www.szu.cz/tema/prevence/lymeska-borrelioza-epidemiologicka-data>

URL 5: [http://cs.wikipedia.org/wiki/Western\\_blot](http://cs.wikipedia.org/wiki/Western_blot)

URL 4: <http://cs.wikipedia.org/wiki/ELISA>

Obrázky použité na stranách č. 18-19 jsou použity z internetových stránek SZÚ viz odkaz URL 3.