



STÁTNÍ ZDRAVOTNÍ ÚSTAV

## Diagnostika lymeské borreliózy v NRL LB

V laboratorní diagnostice lymeské borreliózy v akutní i pozdní (diseminované) fázi musí předcházet klinické posouzení. Vzhledem k problematice tohoto víceorganového onemocnění se symptomy podobnými jiným nemocem je v některých případech laboratorní průkaz nepostradatelný.

### 1. Kultivace ve speciálním médiu

Borrelie jsou vysoce nutričně náročné, k růstu vyžadují půdy obohacené o vitamíny, enzymy, růstové faktory a esenciální soli. BSK I (Barbour-Stoener-Kelly) půdu připravujeme z CMRL 1066 bez glutaminu zředěného 1: 9 vodou, která obsahuje další složky. Glutamin dodáváme jako 200 mM roztok spolu s peptonem, tryptonem, proteasou a N-acetyl-d-glukosaminem nutným pro růst. Běžné kultivace z klíšťat provádíme v BSK-H mediu (Sigma) doplněném 6% králičím sérem. Generační doba růstu *Borrelia* ve speciálním BSK medium je 12 hod a rostoucí populace je nesynchronní - obsahuje směs různě velkých, starých a přežití schopných jedinců, včetně mladých cyst. Podobný růst *Borrelia* je v krvi pacientů v různých orgánech (játra, srdce, mozek)

Elektronmikroskopické zobrazení cyst a mladých spirochet.

Průřez krevní cévou v játrech, obsahuje erytrocyty a mezi nimi spirochety.

Růst mladé borrelie z cysty.

In vitro a in vivo podstupují *Borrelia* při růstu mezidruhový kompetentní boj tj. ze 2-3 patogenních druhů, přenesených vektorem, vyroste pouze jeden a to většinou fylogeneticky nejmladší druh *B. burgdorferi* sensu stricto, rozšířený v USA, méně v Evropě a v Asii. Kultivace je úspěšná při 34 °C za 6-14 dní v akutní fázi infekce z kůže při erytému v 40-60 %, z krve v 15-22 % při opakovaném odebrání 10-15 ml krve, v 8-10 % z likvoru a nebyla dosud úspěšná ze synovia a synovialní tekutiny.

Ve sbírce NRL je 31 kmenů 4 druhů z pacientů, nejčastěji *B. garinii*, následované *B. afzelii*, *B. burgdorferi*, *B. valaisiana*, *B. bissetti*, *B. miyamotoi* a další. Při růstu v teplotě pod 30 °C dochází v 9-10 pasáži u



virulentních kmenů k vymizení povrchových OspA a OspC proteinů a ke ztrátě virulence.

Kultivace je jedinou metodou, která prokáže přítomnost živých borrelií ve vzorcích.

U léčených pacientů je negativní, proto ji nelze použít jako kontrolu léčby.

Metoda byla akreditována CIA pod č.1206.4 dle CSN EN ISO/IEC 17025 apod.č.8002 dle CSN ISO 15189.

## 2. Isolace a incidence *Borrelia v Ixodes ricinus*

Ve sbírce NRL je 131 kmenů 8 druhů *Borrelia* izolovaných z klíšťat . Vzácné dvojnásobné nebo ojediněle trojnásobné infekce byly zjištěny pouze u klíšťat a to těch druhů *Borrelia*, které jsou

společně rezistentní k složkám krve (komplementu) určitého hostitele (např ptáků x hlodavců). Ve slinných žlázách *Borrelia* svléká z svého povrchového obalu vesikly s obsahem OspA antigenu, který převládá na povrchu borrelia ve střevu klíštěte. Borrelie jsou schopné přejít z klíštěte do teplokrevného hostitele pouze když vytvoří pod vlivem přijímané krve v povrchovém obalu OspC antigen teplotního šoku. Borrelie nepřipravené na změnu teplot a chemismus krve se mění v cysty nebo zahynou. Proces řídí regulační geny (BdR). Malé borrelie (velké 1-2 um) s počtem 1-4 bičíků rostou z cyst až po vymizení nevhodných podmínek. Podobný proces probíhá i v krvi pacientů.

. [\(kliknutím obrázek zvětšíte\)](#)

Pod vlivem antibiotik nebo bakteriocidních protilátek se borrelie v krvi rozpadne na množství váčků a cyst.

. [\(kliknutím obrázek zvětšíte\)](#)

Elektronmikroskopický snímek klíštěte.

Sezónní výskyt ukazuje během šesti let maximum v jarních měsících.

Výsledky pozitivních izolací z klíšťat pomocí kultivace kolísaly v závislosti na druhu *Borrelia* a na infikovanosti hostitelů. Nejvíce kmenů bylo izolováno v r. 2004 a v r. 2006 (neukázáno).



Nejčastějším isolátem byla *B. garinii*, následovaná *B. afzelii* a méně kmeny *B. burgdorferi* s.s., které se liší v 4 nukleotidech od srovnávacího kmene B31 z USA.

Vyšetření borrelií u různých druhů zvířat v jarních měsících.

Nejvyšší promořenost klíšťat borreliemi (27 %) byla zjištěna v r. 2006 ve středočeském kraji ( lužní lesy Mladá Boleslav, Lysá nad Labem) a v moravskoslezském kraji ( Frýdek Místek, Nový Jičín).

Průměrná infikovanost klíšťat v r. 2004 byla 12.8 %. Nejvíce byla infikována klíšťata v středočeském kraji (27 %), v jihomoravském a moravskoslezském kraji (18-25 %). V r. 2006 byla průměrná infikovanost vyšší, 14.5 % s maximální hodnotou v červenci, což bylo zjištěno poprvé za 10 let. V předchozích letech byly dva vrcholy, v jarních měsících vyšší a v podzimních nižší. Během teplého léta ( červenec-srpen) byly pouze larvy klíšťat s minimální infikovaností jak Bb tak HGA. Proto udávaný stupeň 3 (meterologické hlášení) je v těchto měsících

V NRL jsou vyšetřována rezervoárová zvířata tj, ptáci a hlodavci. Promořenost v jarních a podzimních měsících v r. 2006 odpovídala infikovanosti klíšťat. Nejvíce infikováni byli ptáci (kormorán, bažant, racek) a prokázány byly *Borrelia garinii*, subtyp 3, 5 a 6. Nejčastěji přenášený klíšťaty byl subtyp 5.

Dále byli v r. 2006-07 vyšetřováni psi a další domácí zvířata ( krávy, koně) na přítomnost *Borrelia* a *Anaplasma* sp. Psi byli více infikováni *A. phagocytophilum*, méně *B. garinii*. Klíšťata byla v r.2007 infikována borreliemi v 15.5 % a anaplasmou v 3,7 %.

### 3. Sérologické metody

V NRL v ELISA testech a ve Western blotech užíváme endemické antigeny *B. garinii* subtypy 5 , 4. a *B. burgdorferi* s.s., které byly nejčastěji u pacientů s neuroborreliózou, dále antigeny *B. afzelii*, které byly izolovány z pacientů s kožními změnami (erytém a klíšťový lymfocytom) po infestaci klíšťětem. Antigeny jsou získány z celobuněčných kultur po krátké kultivaci, rozbití metodou ultrazvuku a čištění filtrací. Kmeny borrelií se značně liší v složení a hmotnosti vnějších povrchových antigenů (OspA,B, D, F, C, P14, MEP). Pouze OspA a OspC antigeny mají bakteriocidní účinek.



Kmeny borrelií izolované z mozkomíšního moku a z krve s různým obsahem povrchových antigenů.

Pod vlivem protilátek i v nevhodných kultivačních podmínkách se *Borrelia* mění a rozpadá na vesikly, které pokrývá pouze OspA, C a F protein a které obsahují plasmidovou výbavu. Obrázek ukáže charakter těchto vesiklů, které lze využít k přípravě čistých přirozených, antigenů, na rozdíl od syntetických, rekombinantních, které se připravují klonováním.

Sérologické metody podporují klinická vyšetření a v případě IgM specifických protilátek, verifikovaných metodou WB umožňují lékařům zahájit léčbu, i když pacient neměl erytém (erythema migrans) po zákusu klíštěte. Výsledky se uvádějí v hodnotách absorbance. Pro IgM protilátky v sérech je pozitivita nastavena od 1000 a pro IgG protilátky od 900. Při interpretaci výsledků je třeba brát v úvahu pomalou tvorbu protilátek v časném stádiu onemocnění, možnost ovlivnění tvorby protilátek předchozím podáváním antibiotik, séro-negativitu u malého procenta nemocných, možnost zkřížených reakcí u osob s jiným onemocněním. Výsledky je proto vždy nutné srovnávat s klinickými údaji.

Klinické formy borreliózy, které jsme potvrdili sérologicky se lišili procentuálním zastoupením v různých letech a v různých krajích. Graf ukazuje incidenci v roce 2006.

## Referenční činnost v sérologii

### Externí hodnocení kvality (EHK)

Sérologická laboratoř připravuje vzorky sér pro vnější kontrolu kvality vyšetření v rámci EHK - organizovaného SZÚ. Každá série obsahuje 5 kontrolních vzorků sér. Hodnotí se antiborreliové protilátky IgM i IgG soupravami ELISA. V současné době připravujeme vzorky pro 130 laboratoří. Každá laboratoř dostává vzorky A-E, které jsou individuálně přečíslovány v jiné odborné skupině, která vzorky balí a rozesílá. Z každého vzorku uchazeč dostane 0.5 ml. Z toho je zřejmé, že čísla 1-5 se pro jednotlivé uchazeče neshodují z důvodu opisování výsledků. Dále je zřejmé, že výsledky mají být provedeny metodou ELISA a množství 0.5 ml séra. Laboratoř vyhodnocuje výsledky, které NRL zná pouze pod čísly, které jsou publikovány v časopise Zprávy Centra epidemiologie a mikrobiologie (viz.literatura).



## **Nepřímá sérologická metoda IFA**

### **Imunofluorescenční vyšetření sér pacientů na protilátky proti *Borrelia burgdorferi* s.l. a *Anaplasma phagocytophilum***

Průkaz IgG a IgM metodou nepřímé imunofluorescence IFA umožňuje zjistit rozdíly v titrech protilátek akutních a kovalescentních sér. Vyšetření provádíme při podezření na akutní infekci před léčbou a po léčbě. Průkaz protilátky IgG zjišťuje možnost styku s patogenem, protilátky IgM prokazují aktivní infekci. Výhodou imunofluorescenční metody je možnost práce s různými druhy a subtypy, které uchováváme zmrazené a používáme k přípravě skel pro fluorescenci. Další výhodou je rychlé zjištění titru protilátek v sérech řaděných geometrickou řadou, dále při přípravě EHK vzorků (externí hodnocení kvality) a pro zjištění pozitivních intracelulárních kultivací. Nevýhodou je subjektivní hodnocení fluorescence.

### **Vyšetření krevních nátěrů pacientů na přítomnost *Borrelia* sp. a *Anaplasma phagocytophilum*.**

Pomocí této metody stanovujeme přítomnost patogenů v periferní krvi zvířat a pacientů. Krevní nátěr barvíme použitím barviva Giemsa-Romanowski, které diferencuje jednotlivé krevní buňky. Následně se na preparátu mikroskopicky vyhledávají např. moruly *Anaplasma phagocytophilum* ve vakuolách neutrofilních leukocytů nebo spirochety ve fibroblastech, monocytech a pod. Zjištění pozitivního výsledku se porovná s imunofluorescenčním vyšetřením séra a klinickými příznaky pacienta .

## **4. Přímý průkaz *Borrelia burgdorferi* identifikací specifické DNA v materiálu**

Zavedení molekulárně genetických metod do diagnostiky původců infekčních nemocí v devadesátých letech minulého století zásadním způsobem pomohlo i při průkazu původce lymeské borreliózy *B. burgdorferi* sensu lato. Na rozdíl od ostatních bakteriálních a virových původců je množství organismů *B. burgdorferi* s.l. v tělních tekutinách velmi malé (i pod 10 jedinců v 1 ml), což přináší potíže v diagnostice. Pro svoji citlivost je často východiskem v přímé diagnostice imunoelektronová mikroskopie a průkaz specifické DNA pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR).

Kolísání pozitivity DNA *Borrelia burgdorferi* s.lato během kalendářního roku 2004

V současné době je prováděno vyšetření akreditovanou metodou (SOP-NRL/LB-01-01).

Certifikát 021/2002, lab. 1206.4, Czech Accreditation Institute Praha.

Kontrola kvality: Certifikát (T4764 z 4.5.2005) Institut f.Standardisierung und Dokumentation im medizin. Laboratorium, Instant e.V.Ringvrsuche, Dusseldorf.



STÁTNÍ ZDRAVOTNÍ ÚSTAV

## Genomová DNA

Genomová DNA získaná pomocí komerčního kitu je směs nukleových kyselin. V prvním sledu se používá primerů odvozených z genu 16SrRNA nebo recA. Citlivost reakce při použití PCR s horkým startem a s optimalizovaným teplotním profilem reakce je 40-400 fg v 1 ml vzorku. Citlivost závisí na množství přítomné hostitelské DNA, přítomnosti inhibitorů reakce i na způsobu odběru a podmínkách transportu vzorků. Při reakci se používá kontrola citlivosti reakce, negativní kontrola ve formě lidské DNA bez specifické sekvence a kontrola negativity ředidla použitého pro přípravu mixu. Dále se používá kontrola přítomnosti inhibitorů ve vzorku. Při přípravě DNA se používá cyklicky negativní a pozitivní kontrola přípravy DNA. Též se používá kontrola specifičnosti reakce zařazením DNA *Escherichia coli*.

Pozitivní genomová DNA svědčí pro přítomnost spirochét v tělních tekutinách a tkáních (živých i mrtvých) a je indikací pro léčbu. Genomová DNA je nalézána ve vyšších koncentracích (silnější reakce) u akutních stádií lymeské borreliózy, ale slabší je u chronických forem onemocnění. Nejčastější průkaz je v synoviální tekutině a v kůži.

## Plasmidová DNA

Plasmidová DNA *Borrelia burgdorferi* se liší v různých druzích, ale je lépe identifikovatelná pro vyšší koncentraci ve vzorcích (větší počet plasmidů proti 1 kopii genomu). Problémem může být výběr primerů a příprava plasmidové DNA. Pro naši diagnostiku je významný průkaz přítomnosti DNA genu OspA nebo OspC, který potvrzuje akutní infekci. U léčených pacientů rychle mizí, u chronického onemocnění většinou schází. Identifikace OspB je citlivá reakce pro určení *Borrelia burgdorferi sensu stricto* i v pozdní fázi.

### Určení druhů borrelií

Určení genodruhů je významné při studiu vztahu různých druhů borrelií ke klinickým symptomům. Průkaz predilekčního místa a tropismu borrelií k různým tkáním a může pomoci při odhalení chronické borreliózy. U pozitivních vzorků, které jsou archivovány (při -80°C) se následně identifikuje genomspeciés pomocí druhově specifických primerů, pomocí OspA primerů a sekvence a pomocí analýzy real-time PCR (rt-PCR).



Podle dlouhodobého rozboru průkazu specifické DNA (ze statisticky významného počtu vzorků) je zřejmé, že procento výskytu DNA *Borrelia burgdorferi* s.l. kolísá jak v jednotlivých letech, tak i v jednotlivých měsících kalendářního roku.

#### Užití LightCycler PCR v reálném čase

Tato metoda nám umožňuje citlivě a specificky identifikovat DNA borrelií různých druhů ve velmi krátkém čase za 30-40 min při použití specifických sond nebo TaqMan sondy. Metoda je citlivá při obsahu 0.42 pg DNA/ ml nebo 450 fg čisté DNA kultury.

Při práci v uzavřených skleněných kapilárách je zprostředkována rychlá výměna teplot denaturace, amplifikace a prodloužení. Sběr fluorescenčně značených amplikonů probíhá v intervalech 01 až 02 Co/sec. Měření amplifikační křivky podle teploty tání např. genu *rec A* umožní rozlišit *B. garinii* od *B. afzelii* během 40 min u 30 vzorků. Užití TaqMan *OspA* a 16S-23S sondy umožní rozlišit vzácněji se vyskytující *B. valaisiana*, *B. bissetti* a dalších.

Nevýhodou PCR v reálném čase je vysoká náročnost na dovednosti experimentátora, čistota vzorků, včetně čistoty izolované DNA.

Doporučení je užívat kity od firmy, která přístroj vyvinula, užívat primery s nízkým bodem tání a o malém obsahu G, čistit vzorky před užitím jako pro sekvenace (Beckman kity).

Amplifikační křivka nested 16S měřená dosažená měřením teploty tání ze vzorků pacientů a referenčních kmenů.

Průkaz DNA borrelie u pacientů pomocí real-time PCR.

#### Doporučení pro PCR:

- V akutní fázi spirochetémie, **bez léčby**.
- V aktivní fázi **diseminované infekce** (tj. při kulminaci suspektních příznaků)
- **Krev pro PCR a EIM nesrážlivou**, nejlépe citrátovou, EDTA, minimálně 3 ml plasmy.
- Mok bez aditiv, **nejméně 1 ml, nezmražený**
- Tkáň ve sterilním fyziol. roztoku **tkáň cca 2x2 mm** z více ložisek.
- Moč nevyšetřujeme pro inhibitory a kontaminaci bakteriemi.
- Materiál **dodávat vždy chlazený** / ne zmražený!/, do 48 hodin do laboratoře.
- Málo materiálu, sérum, materiál zmražený a **starší než 48 hodin jsou vhodné**.
- Materiál od **chronických pacientů je problematický**, vliv léčby, protilátek nepřítomnost genomové



STÁTNÍ ZDRAVOTNÍ ÚSTAV

- DNA atd., je možno zkoumat v EIM/
- Materiál pro PCR musí být odebrán do samostatné zkumavky, označen a doprovázen samostatnou žádankou. Výsledek je k dispozici maximálně do 14 dnů.
  - Materiál je zpracováván **ihned při dodání odpondělí do středy**, materiál dodávaný v dalším dnu týdne je před izolací DNA koncentrován. Materiál obdrženy **vpátek po 12 hodině** je obtížně standardně zpracováván.
  - Vyplňujte **čitelně žádanky**, uvádějte všechny náležitosti, piště druh vyšetřovaného materiálu a řádně označujte zkumavky, uvádějte čitelně lékaře a adresu kam má být výsledek zaslán.
  - Veškerý materiál je vyšetřován pro retrospektivní studii, proto je vhodné **uvádět jeden zhlavních symptomů**.

Další podrobnosti o metodě se můžete dozvědět na této adrese:

<http://www.oeghmp.at/eucalb/>

#### Vyšetření klíšťat, která sála na pacientech.

Klíšťata, jsou vyšetřována na přítomnost borrelií v jejich tělním obsahu v temném poli světelného mikroskopu. Klíšťata musí být před vyšetřením z těla hostitele odstraněna pouze mechanickou cestou. To znamená vytočením pomocí navlhčeného smotku vaty či pomocí pinzety bez použití chemikálií. Následně se umístí spolu se stéblem trávy či listem, pro udržení vlhkosti, do uzavíratelné nádoby a přinesou do NRL pro LB. Zde jsou živá klíšťata v zápětí vyšetřena. Ranka v pokožce se vydezinfikuje jodovou tinkturou či jinou dezinfekcí. Obecně platí, že čím je délka přísátí klíštěte na těle kratší, tím je riziko nákazy lymeskou borreliózou menší. Bylo prokázáno, že borrelie prodělávají ve střevě klíštěte při styku s krví teplokrevného hostitele vývoj. Mění se imunologicky, geneticky i morfologicky.

## 5. Vědecko-výzkumná činnost

#### Sběr klíšťat pro zjištění promořenosti borreliózou ve středočeském kraji.

Pomocí metody smýkání jsou v terénu sbírána klíšťata všech vývojových stádií. Pro zjištění aktuální promořenosti jsou mikroskopicky, kultivačně i pomocí PCR vyšetřována na přítomnost borrelií. Výsledné procento pozitivních klíšťat v daném kraji je zaneseno do celostátní mapy promořenosti borreliemi.

#### Chov klíšťat - *Ixodes ricinus* - v laboratorních podmínkách.

Převážně pro interní výzkumné účely NRL pro LB jsou v laboratorních podmínkách chována všechna vývojová stadia klíštěte *Ixodes ricinus*. Jsou krmena na zvířecím modelu a uchovávána ve sterilním prostředí. Klíšťata prokazatelně nejsou nakažena patogeny *Borrelia* sp. ani *Anaplasma phagocytophila*.





**STÁTNÍ ZDRAVOTNÍ ÚSTAV**

#### **Infikace laboratorních zvířat borreliemi.**

Na laboratorních myších (SPF i konvenčních) je zkoumán přenos borrelií přísátím potenciálně nakažených klíšťat z různých endemických oblastí lymeské borreliózy. Laboratorní SPF myši jsou injikovány subkutánně a intramuskulárně virulentními kmeny borrelií. Následně se nákaza zjišťuje pomocí přímých i nepřímých diagnostických metod. Přenos borreliové infekce z nakažených myší na klíšťata z chovu.

Infikace chovných nymf klíšťat pomocí kapilár přispělo ke studiu účinku vakciny při challenge infekci.

Imunofluorescenční vyšetření sér zvířat na protilátky proti *Anaplasma phagocytophilum* a *Borrelia burgdorferi*

Pomocí nepřímé imunofluorescence se zjišťuje nákaza zvířat, hlavně psů, koní, myší a lovné zvěře patogeny *Anaplasma phagocytophilum* a *Borrelia burgdorferi*. Jedná se o průkaz protilátek IgG v krevním séru zvířecích dárců. Použitím screeningového ředění konjugátu se určuje intenzita infekce.

## **Expertizní činnost v sérologii**

#### **Testování ELISA souprav**

Pro tuzemské dodavatele ELISA souprav k detekci IgG a IgM antiborreliových protilátek sérologická laboratoř testuje tyto soupravy. Každoročně se otestuje kolem 13 souprav výrobce TEST-LINE, Clinical Diagnostics, spol.s.r.o. Brno s různými antigeny: B.garinii, B.afzelii, B.recombinant, B.b.sensu lato, B.b.sensu stricto. Byly testovány i soupravy Euroimmun, Virion rekombinantní Bag, Invitrogen, DAKO, Viramed, Biowestern a další. Vždy bylo prokázáno, že čím vyšší je sensitivita, tím nižší je specifita. Při hodnocení souprav jsou využívána referenční séra NRL, WHO a CDCP s jasným stanovením kliniky pacientů. Všechna séra jsou čištěna centrifugací a filtry Milipore.

#### **Vyšetřování sér krevních dárců**

Testem ELISA jsou sledovány protilátky proti borreliím u krevních dárců z oblasti Mladá Boleslav každoročně v období jara a podzimu. V této endemické oblasti lymeské borreliózy je zjištěno vysoké procento promořenosti klíšťat borreliemi. Výsledky vyšetření sér krevních dárců jsou porovnávány s vyšetřovanými pacienty.



#### **Testování setu Quick ELISA C 6 borrelia kit**

Použití celobuněčných sonifikovaných antigenů *B.burgdorferi* může vést k falešně pozitivním výsledkům. Ty mohou být způsobeny zkříženou reakcí. C6 ELISA užívá peptid VlsE. Je to zevní povrchový lipoprotein, který má hlavní význam v imunitní odpovědi proti LB. Tento syntetický peptid nebo rekombinantní antigen je vhodným markrem pro laboratorní diagnostiku časně i pozdní IgG imunitní odpovědi a má vysokou senzitivitu a specifitu. Zkoušíme vlastnosti genu pro VlsE u různých kmenů hyperimunním králičím sérem.

#### **Konfirmační a výzkumná metoda imunosorbentní elektronové mikroskopie**

Metoda je využívána k rychlé a vysoce specifické detekci borrelií nebo jejich zbytků v tkáňových tekutinách pacientů a k výzkumu struktury izolovaných kmenů a jejich povrchových antigenů

#### **Metoda imunocytochemie**

Metoda je užívána ke studii přítomnosti borrelií v různých tkáních pacientů a zvířat, včetně klíšťat

Tyto metody a jejich referenční a výzkumné využití jsou součástí práce jiné skupiny a NRL pro přímou detekci borrelií, bakterií, virů a cizorodých buněk pomocí elektronové mikroskopie, v jejichž náplni budou podrobnosti uvedeny.