Diagnostické metody

NRL pro lymeskou borreliózu

- Popis
- Pracovníci
- Nabídka služeb
- Lymeská borelióza
- Diagnostické metody
- Publikace
- Výzkumné projekty
- Surveillance
- Nemoci přenášené hmyzem a roztoči

Nepřímá diagnostika

Nepřímá diagnostika LB je založena na průkazu časných (IgM) a pozdních (IgG) imunoglobulinů. Časné protilátky se tvoří nejčastěji 3. až 6. týden od přisátí klíštěte, poté jejich hladina v krvi většinou klesá. U řady nemocných s LB nejsou však IgM protilátky prokazatelné. Pozdní protilátky se tvoří přibližně v 6. až 10. týdnu od přisátí klíštěte a mohou přetrvávat i řadu let po infekci. U kožních forem LB erythema migrans (EM) a borreliového lymfocytomu (BL) však tvorba časných i pozdních protilátek může zcela chybět. U pozdní klinické manifestace acrodermatitis chronica atropicans (ACA) jsou ve většině případů přítomné IgG protilátky.

Sérologická diagnostika LB spočívá v dvoustupňovém testování. Prvním krokem je vyhledávací test, dnes většinou enzymová nebo *chemiluminiscenční* imunoanalýza, dříve nepřímá imunofluorescence. V případě pozitivního či hraničního výsledku je potřeba provést druhý konfirmační krok metodou Immunoblot ve třídách IgM a IgG. Jako vhodný materiál pro sérologickou diagnostiku je možné využít sérum, mozkomíšní mok či synoviální tekutinu. Srážlivou krev je nutno dopravit do laboratoře do 72 hodin při teplotě 2 až 8°C. Sérum, likvor a synoviální tekutinu do 5 dnů při teplotě 2 až 8°C. a při delším skladování je třeba vzorek zamrazit na -20°C.

Limity sérologických metod

Při hodnocení laboratorních výsledků je nutno počítat s tím, že až u desetiny procent zdravých osob v ČR prokážeme přítomnost protilátek a to i vysokých titrů. Výška titru protilátek neznačí vážnost infekce. Pozitivní sérologické výsledky pouze podpoří diagnózu a bez klinického obrazu LB je zjišťování protilátek bezvýznamné a není důvodem k léčbě. U klinicky jasných případů LB jako je EM a BL nejsou sérologická vyšetření k zahájení léčby potřebná. Sérologické metody mohou být falešně negativní při brzkém vyšetření pacienty nebo u EM či časné neuroborreliózy. V některých případech a při včasném podání antibiotik může scházet sérokonverze a pozdní IgG protilátky se vůbec nevytvoří. Protilátky mohou přetrvávat řadu let po nákaze, ale jejich přítomnost neznačí přetrvávání infekce. Při hodnocení výsledků je také třeba myslet na

možnou zkříženou reaktivitu testů s jinými bakteriemi nebo falešnou pozitivitu IgM protilátek při pozitivním revmatoidním faktoru či při jiných autoimunních onemocněních. Testy nejsou standardizovány a různé laboratoře mohou dojít u stejného vzorku k jiným výsledkům.

Nepřímá imunofluorescence - IFA

V dnešní době se již málo používá pro diagnostiku LB. Princip testu spočívá v navázání antiborreliových protilátek v séru pacienta na borrelie fixované na sklíčku a v následném navázání fluorescenčně značeného antiséra proti lidskému imunoglobulinu. Vizualizace testu se provádí pod fluorescenčním mikroskopem. Výhodou testu je zjištění titru protilátek. Nevýhodou metody je subjektivní hodnocení, různá reakce dle genodruhu borrelie. Metoda je pracná, nákladná a nelze ji automatizovat.

Enzymová imunoanalýza - ELISA, EIA

Principem testu je navázání hledané protilátky v séru pacienta na antigen, který je vázán na dně jamky mikrotitrační destičky. Na antiborreliovou protilátku se pak váže protilátka proti lidskému imunoglobulinu, na kterou je navázaný enzym. Ten pak štěpí substrát za vzniku barevného produktu. Vizualizace se provádí spektrofotometricky. Na trhu je dnes mnohou souprav s celobuněčným lyzátem antigenů nebo s rekombinantními antigeny, či kombinací obou. Výhodou metody je objektivní semikvantitativní hodnocení a možná automatizace. Nevýhodou je možná falešná pozitivita u autoimunních chorob a zkřížená reakce s jinými mikroorganismy (EBV, CMV, Mykoplasma, Treponema).

Imunoblot - Western Blot (WB)

Imunoblot je technika používaná k detekci specifický protilátek v séru pacienta na antigeny vázané na nitrocelulosovou membránu. Na rozdíl od ELISA testu je WB časově náročnější, dražší a vyžaduje větší množství vzorku. Výhodou je vyšší senzitivita i specificita díky individuálním antigenům. Dnes je na trhu mnoho souprav využívající jak individuální antigeny po separaci na SDS-PAGE elektroforéze, tak i rekombinantní antigeny. Nejčastějšími antigeny v soupravách jsou OspC, p41 a p39 pro IgM a VlsE, p83, p41, p39, OspB, OspA, OspC, p58, BBK32 a DbpA pro IgG. Hodnocení WB se liší v Evropě a ve Spojených státech amerických (USA). Zatímco v Evropě k pozitivnímu výsledku IgM dostačuje pozitivní OspC antigen, tak v USA je nutná pozitivita alespoň dvou ze tří antigenů. Pro pozitivní IgG výsledek v Evropě dostačují dva pozitivní antigeny, v USA je potřeba pět pozitivních antigenů z deseti.

Vysoce imunogenní antigeny časné infekce jsou zejména p41, OspC a p39. Antigen p41 (fla B - flagelin) je kódovaný na chromosomu a kvůli zkřížené reaktivitě se využívá interní fragment tohoto proteinu. Antigen OspC (Outer Surface Protein C- vnější povrchový protein) je kódovaný na plasmidu, je faktorem invazivity a diseminace, má mnoho sérotypů a jeho expresi ovlivňuje teplota a pH. Antigen p39 (BmpA) je glykosaminopeptidový receptor, je exprimován během růstu borrelií a je faktorem virulence.

Nejdůležitějšími vysoce imunogenními antigenny rozvinuté infekce jsou VlsE, DbpA, p83 a další vnější povrchové proteiny Osp A a OspB. Antigen VlsE (Variable major protein - Like Sequence) je povrchovým proteinem s vysokou antigenní variabilitou. Lokus *vls* má expresní místo *vlsE* a 15 spících kazet mezi kterými může libovolně přepínat. Antigen DbpA (Decorin Binding Protein- p17) má výrazný tkáňový tropismus a jeho regulace je ovlivňována teplotou 35°C. DbpA je antigenem konfirmujícím rozvinutou

infekci. Rovněž OspA a OspB je exprimováno s pozdní fázi lymeské borreliózy.

MicroBlot Array (MBA)

MBA je novinkou v nepřímé diagnostice, využívá výhod obou předchozích metod ELISA a WB. Výhodou je hodnocení velkého množství antigenů v tripletech, vysoká citlivost a automatizace. Antigeny jsou stejné pro IgM i IgG, neboť i antigeny časné infekce mohou být imunogenní ve třídě IgG a naopak. Využívá se malý objem vzorku. Dostupné komerční kity s individuálními rekombinantními antigeny ve spotech v tripletech na nitrocelulósové membráně využívají barevnou reakci se subtrátem jak tomu bylo v předchozích metodách. Hodnocení výsledků je semikvantitativní (intenzita spotů, index pozitivity) či kvantitativní (hladina protilátek). Nevýhodou je, že metoda není standardizována. Metoda využívá stejné antigeny jako u WB. Navíc se využívají antigeny p58 - OppA II (oligopeptidová permeáza 2) membránový transportér a marker diseminované LB a NapA antigen - neutrofilní aktivační protein A, rovněž marker pozdní LB.

Intratekální syntéza specifických protilátek IgG a IgM (dle Reibera)

Průkaz intratekální syntézy borreliových protilátek je jednou z nutný podmínek pro stanovení diagnózy neuroborreliózy. Výpočet antibody indexu (AI) dle Reibera je poměr koncentrace specifických protilátek v likvoru a séru ve vztahu ke stavu hematolikvorové bariéry a koncentraci celkových imunoglobulinů v likvoru a séru. Pokud je AI vyšší než 1.5, hodnotí se jako pozitivní. Párové vzorky séra a likvoru musí být odebrány současně. V časné fázi neuroborreliózy může být AI negativní a proto je potřeba neopomenout i přímé metody PCR a kultivace, které mohou být v této fázi průkaznější.

Přímá diagnostika

Přímá diagnostika LB spočívá v přímém průkazu borrelií metodami mikroskopickými, histologickými či kultivačními nebo v průkazu nukleových kyselin (DNA) molekulárními metodami. Metody mikroskopické a histologické jsou pouze doplňkové, nejsou standardizovány a jsou spíše používány pro výzkumné účely. Ve světelném mikroskopu v temném poli tzv. Dark Field je možné sledovat pouze velké množství spirochét v kulturách borrelií příp. ve střevě infikovaného klíštěte. Pomocí elektronové mikroskopie lze pro výzkumné účely pozorovat spirochéty v mozkomíšním moku při značení monoklonální protilátkou. Histologické metody jsou používány při potvrzení suspektního borreliového lymfocytomu či ACA. Preparáty lez barvit stříbřením či Giemsou.

Molekulární metody

Nejčastěji využívanou molekulární metodou je polymerázová řetězová reakce (PCR). Metoda PCR může být konvenční jednokroková či dvoukroková (nested) s detekcí na gelu nebo real-time PCR, která monitoruje fluorescenci vyzařovanou v průběhu reakce jako indikátor tvořeného amplikonu v každém cyklu PCR. Detekce fluorescence umožňuje kvantifikaci v reálném čase. Real-time PCR je možný provést buď s fluorescenčním barvivem vázajícím se na dvouřetězcovou DNA (např. SYBR Green) nebo za použití fluorescenční sondy. Vhodným materiálem pro přímou diagnostiku je synoviální tekutina, biopsie tkání či mozkomíšní mok. Metody PCR je třeba provádět nejlépe ihned po izolaci DNA nebo DNA zamrazit, neboť

DNA borrelií je málo stabilní.

Pro izolaci nukleových kyselin je dnes na trhu mnoho souprav ať pro manuální (sikilagelové kolonky) či automatickou izolaci (magnetické částice) jejichž výhodou je čistá DNA. Pro výzkumné účely je také možné použít levnou metodu fenol-chloroformové extrakce, která je však časově náročná a DNA takto získaná není příliš kvalitní. PCR i real-time PCR kity pro detekci borrelií jsou nyní dostupné na trhu a to také s CE IVD. Rovněž je možné použití vlastní in house metody, kde si sami navrhneme primery či sondy anebo použijeme již dříve otestované a publikované. Nejčastěji používané geny pro amplifikaci DNA borrelií jsou geny chromosomální: 16S rRNA, spacer 5S-23S rRNA, *flaB*, *recA* a *p66* a geny plasmidové: *ospA*, *ospC*.
V průběhu PCR reakce je nutné rovněž používat interní kontroly běhu PCR, neboť v klinickém materiálu jsou přítomné PCR inhibitory a mohou reakci zabránit. Senzitivita PCR se liší u různých diagnóz a materiálů, nejvyšší je u lymeské artritidy ze synoviální tekutiny cca 78%. Vysoká senzitivita je i u kožních forem z tkáňových vzorků: u EM 69% a u ACA 76%. Nižší senzitivita je pak z mozkomíšního moku 32% a nejnižší je z krve 21%.

Kultivace

Kultivace borrelií je časově a finančně náročná metoda. Využívá se pro výzkumné účely, nikoli pro rutinní diagnostiku. Borrelie jsou nutričně náročné a kultivují se ve speciálních tekutých médiích (MKP, BSK-H) v mikroaerofilních podmínkách při teplotě 34°C. Úspěšná kultivace může trvat 4 až 12 týdnů, neboť borrelie mají dlouho generační dobu (7 až 20 hodin). BSK-H médium podporuje rychlý počáteční růst, ale pak následuje deformace buněk a smrt. MKP medium se jeví výhodnější z hlediska úspěšnosti míry izolace, morfologie a pohyblivosti buněk. Vizualizace kultury během růstu se provádí mikroskopicky v temném poli a rovněž se úspěšnost kultivace kontroluje pomocí PCR. Materiál vhodný pro kultivaci jsou biopsie tkání a tělní tekutiny jako synoviální tekutina, mozkomíšní mok a krev.

Literatura:

Bartůněk P. Lymeská borrelióza. 3. vydání, Praha, Grada Publishing 2006.

Beneš J. Infekční lékařství, Lymeská borrelióza. 1. vydání, Praha, Galén 2009: 289-292.

Votava M. Lékařská mikrobiologie speciální. 2. vydání, Brno, Neptun 2006.

Státní zdravotní ústav ČR, www. szu.cz (Kříž B., 2017).

Boštíková V, Salavec M, Špliňo M, et al. Lymeská borrelióza - významný problém nejen v České republice. Vakciniologie 2014; 8(1): 11-19.

Dlouhý P, Honegr K, Krbková L, et al. Lymeská borrelióza doporučený postup v diagnostice, léčbě a prevenci. Klinická mikrobiologie a infekční lékařství 2011; 17(4): 144-149.

Krbková L, Náterová Z, Erythema migrans. Klinická mikrobiologie a infekční lékařství 2012; 18(6): 172-179.

Prokeš Z. Lymeská borrelióza, Dermatol. praxi 2015; 9(1): 36-39.

Valešová M. Lymeská artritida, Praha, Grada Publishing 1999.

Samuels DS and Radolf JD. Borrelia: Molecular Biology, Host Interaction and Pathogenesis. The University of Montana, Missoula, USA and University of Connecticut Health Center, Farmington, USA, Caister Academic Press 2010.

Auwaeter PG. Lyme disease and other infections transmitted by Ixodes scapularis. Philadelphia, USA, Elsevier 2015.

Gray J. Lyme borreliosis: biology, epidemiology and control. Wallingford, UK, CABI Publishing 2002.

Barbour AG. Lyme disease. Baltimore, USA, Johns Hopkins University Press 2015, p.315.Ruz"Iić-Sabljić E, Maraspin V, Stupica D, Rojko T, Bogovič P, Strle F, Čedar T. Comparison of MKP and BSK-H media for the cultivation and isolation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. PLOS ONE February 7, 2017, p.1-11. 2.

Ruz"Iić-Sabljić E, Maraspin V, Cimperman J, Strle F, Lotrič-Furian S, Stupica D and Cerar T. Comparison of isolation rate of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in two different culture media, MKP and BSK-H. Clinical Mikrobiology and Infection, Volume 20 Number 7, July 2014, p.636 - 641.