

Úskalí diagnostiky lymské boreliózy LB

Diagnostika lymské boreliózy patří mezi nejfrekventovanější vyšetření antiinfekční imunity na oddělení Imunologie v laboratořích EUC.

1) V posledních deseti letech výrazně vzrostl počet osob s onemocněním lymskou boreliózou. Čím je to způsobeno?

Lymská borelióza je nejčastěji přenášeným onemocněním klíšťaty. Kromě lymské boreliózy klíšťata přenášejí v regionu České republiky klíšťovou encefalitidu, zřídka další onemocnění – anaplazmózu, babeziózu, rickettsiózu, Q horečku a další. Otázkou je, zda skutečně přibývá počet onemocnění, nebo zda je jenom v důsledku medializace častěji vyžadována lékaři jejich diagnostika.

Výrobci diagnostik uvádějí na trh stále nové diagnostické testy - kromě ELISA testů, kde jsou již využívány testy 3. generace s vysokou citlivostí a specifitou, které zkracují „diagnostické okno“, se používají imunoblotty s různými kombinacemi specifických antigenů, k dispozici jsou i různá doplňková vyšetření.

V České republice se vyskytuje zhruba 5-20% klíšťat nakažených LB. Tato klíšťata se v důsledku průměrných teplot a častějšímu pohybu lidí v přírodě rozšiřují na větší území a vyskytují se již i v nadmořské výšce přes 1000m nm. Klíšťata mohou být aktivní a přenášet nákazu při teplotě 0- 30°C, tedy vzhledem k mírným zimám se prodlužuje i období, kdy může dojít k nákaze.

2) Jak je tato nemoc standardně diagnostikována?

Diagnostika LB je v našich laboratořích prováděna v souladu s doporučením „Společnosti infekčního lékařství České lékařské společnosti J.E: Purkyně“, které bylo publikováno v roce 2011.

Prvním krokem je vždy serologické vyšetření protilátek proti *Borrelia burgdorferi sensu lato*. Tato druhová skupina bakterií zahrnuje kmeny s častým výskytem v Evropě, resp. Na území ČR – *Borrelia garinii*, kmen, který bývá často spojován s neurologickými poruchami, *Borrelia afzelii* - spojován s kožním postižením a vzácněji se vyskytující *Borrelia burgdorferi sensu stricto* postihující převážně klouby. Vyšetřují se protilátky třídy IgG a IgM.

V případě positivity je provedena confirmace metodou Western blot. Zde jsou detekovány protilátky proti konkrétním antigenům. V případě negativního výsledku serologického vyšetření je nutné výsledek interpretovat komplexně s klinickými projevy pacienta. Protilátky se tvoří zhruba 3-6 týdnů po nákaze, u většiny klinicky manifestních infekcí jsou přítomny IgG protilátky. Pokud klinické projevy přetrvávají a

ukazují na infekci, serologii je doporučeno opakovat za 2-3 týdny. V takovém případě je možné vyšetření doplnit o testy detekující přítomnost patogenu, většinou se provádí PCR test, případně test detekce přítomnosti spirochet pomocí elektronové mikroskopie, nebo v některých případech ELISPOT, založený na měření produkce cytokinu (Interferon gama) po stimulaci boreliovými antigeny.



3) Jak postupujete v případě, že pozitivní výsledek sérologie není potvrzen Western Blotem?

S takovým výsledkem je potřeba počítat. Primárně se doporučuje považovat tento výsledek za pravděpodobně negativní v důsledku falešné positivity ELISA. Při interpretaci je potřeba myslet jednak na možnost zkřížené reaktivity s treponemami, leptospirami aj. Kromě toho také existují Borelie (*Borrelia recurrentis*), které se vyskytují v dutině ústní, ale nezpůsobují multiorgánové postižení jako je lymská nemoc, ale rekurentní horečky. Falešná pozitivita u IgM může být způsobena i přítomností revmatoidního faktoru, polyklonální aktivací protilátek, u polyvalentních alergiků aj. Bylo publikováno, že v České republice prokážeme protilátky u 5-10% zdravých osob. Proto by přítomnost protilátek bez klinického obrazu LB měla být bezvýznamná a neměla by být důvodem k antibiotické léčbě. Často jsou diskutovány na odborných konferencích zkušenosti kliniků se serologickými nálezy u chronických infekcí, neuroborelióz a artritid. Například u dětských neuroborelióz hladina IgM mizí rychle s odeznívajícími klinickými příznaky, IgG přetrvává většinou po dobu až jednoho roku. U artritid až u 50% pacientů přetrvávají po léčbě protilátky až několik

let. Takové sporné výsledky jsou poměrně časté a musí být vždy hodnoceny v kontextu s klinickým obrazem.

4) Je důležitý výběr antigenů pro serologické testy EIA (ELISA)? Liší se antigeny použité pro EIA testy a antigeny použité pro Immunoblot?

V nabídce výrobců jsou testy využívající pro ELISA testy směs rekombinantních antigenů proti *Borrelia burgdorferi sensu lato*. Obecně jsou obsaženy povrchové antigeny Osp, které jsou označovány A-F, antigeny bičíkového flagelinu FlaA,B, neproteinové p100 a antigen VlsE. Každý výrobce používá trochu jinou směs určující specifitu a citlivost souprav. Pro časnou fázi infekce jsou charakteristické protilátky proti flagelinu p41 a povrchovému antigenu OspC, které jsou přítomny ve většině směsí rekombinantních antigenů pro detekci IgM. Pro protilátkovou odpověď typu IgG je významný VlsE (variable major protein like sequenced expressed antigen).

Testy 3. generace s rekombinantními antigeny výrazně zvyšují specifitu EIA metod, snižuje se počet falešně pozitivních nálezů ve screeningových testech. Immunoblots zahrnují širší spectrum antigenů, kromě základních antigenů použitých pro screeningový test se používají další proteinové i neproteinové antigeny časně, akutní i pozdní fáze, heat shock proteiny a v neposlední řadě i antigeny vylučující falešnou pozitivitu v důsledku zkřížené reaktivity s jinými agens. V Immunoblotech bývají použity recombinantní antigeny p44 vylučující zkříženou reaktivitu s *Anaplasma*, nebo antigen TpNI7 vylučující zkříženou reaktivitu s *Treponema pallidum*.



Laboratoř EUC nabízí screeningové vyšetření protilátek metodou ELISA, využíváme ELISA se směsí rekombinantních antigenů. Specifita i diagnostická citlivost tohoto testu je vyšší než 95%. Vyšetření je akreditované a je prováděno na výkonném automatickém analyzátoru AGILITY. Pro konfirmaci používáme Immunoblots stejného výrobce zpracované na analyzátoru Roboblot s kamerou.

5) V souvislosti s infekcí boreliemi byly zmíněny neurologické potíže. Jak se postupuje v tomto případě?

Neuroborelióza je závažné onemocnění a může se objevit týdny, měsíce až roky po nákaze. Časná neuroborelióza se projevuje nejčastěji aseptickou meningitidou, nebo parézou lícního nervu. Pro diagnostiku neuroboreliózy by měla být splněna 3 základní kritéria – klinický neurologický nález, biochemické vyšetření s přítomností lymfocytární pleyocytózy a průkaz intratekální syntézy boreliových protilátek v mozkomíšním moku. Průkaz intratekální syntézy je specializované vyšetření a u nás v laboratoři není běžně prováděno. Provádí se většinou v likvorologických laboratořích. Likvor se ředí většinou 50x méně než krevní plazma, nebo sérum a nalezené hladiny protilátek jsou hodnoceny podle Reiberova indexu. Pro Reiberův výpočet je potřeba znát nejen hladinu protilátek v séru, nebo plazmě a v likvoru, ale rovněž celkovou hladinu IgG protilátek v séru a hladinu albuminu.

6) Nabízejí laboratoře nějaká další vyšetření pro diagnostiku chronické boreliózy?

V naší laboratoři nabízíme test, který je k dispozici pro hodnocení účinnosti léčby u pacientů s chronickou boreliózou, kteří jsou léčeni dlouhodobým užíváním antibiotik. Jedná se o stanovení absolutního počtu CD57+NK (natural killer) buněk pomocí metody průtokové cytometrie. I když o diagnostickém významu tohoto testu se vedou v současné době četné polemiky, jsou popsány souvislosti mezi snížením počtu CD57+Nk buněk a chronickou boreliózou. Tento test je prováděn z krve odebrané do zkumavek s EDTA. Vyšetření by mělo být provedeno před podáním antibiotické léčby a opakováno každé 2 měsíce při dlouhodobém užívání antibiotik. Jako referenční mez je určena hodnota 60 buněk/ uL. Hodnoty 20-60 buněk/uL jsou považovány za známku chronické infekce, hodnoty pod 20 buněk/ uL za známku těžké infekce.

Výrobci diagnostik věnují vývoji nových testů pro diagnostiku boreliózy velkou pozornost, možná se brzy dočkáme nových nástrojů pro hodnocení účinnosti léčby chronických borelióz.

Literatura:

- 1) Dlouhý V., Honegr K., Krbková L., Pícha V., Roháčová H., Štruncová V: Lymeská borrelióza: Doporučený postup v diagnostice, léčbě a prevenci; vydáno 5-2011, dostupné na www.infekce.cz
- 2) Bartůněk et al. Lymeská borelióza. 2013; Praha, Grada publishing-4.vydání
- 3) AboT., Baleh CM. A differentiation antigen of human NK and K cells identified by monoclonal antibody HNK-1. J.immunol.1981