

Spis treści

Wykaz stosowanych skrótów.....	15
Wstęp.....	17
1. <i>Borrelia burgdorferi</i> jako czynnik chorobotwórczy i element ekosystemów	21
1.1. Epidemiologia zakażeń <i>Borrelia burgdorferi</i>	21
1.2. Charakterystyka taksonomiczna <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato, geograficzne występowanie krętków i organizmów wektorowych.	25
1.3. <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato jako element ekosystemów w zakresie gatunków rezerwuuarowych i dróg transmisji	26
1.4. Gatunki <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato jako czynnik patogenny dla człowieka	29
1.5. Morfologia i elementy budowy komórki <i>Borrelia burgdorferi</i>	31
1.5.1. Białka antygenowe <i>Borrelia burgdorferi</i>	33
1.5.1.1. Ekspresja antygenów Osp <i>Borrelia burgdorferi</i> w trakcie zmiany żywiciela	34
1.5.1.2. Białka antygenowe <i>Borrelia burgdorferi</i> ekspresjonowane <i>in vivo</i> podczas zakażenia człowieka	35
1.5.1.2.1. Białka CRASPs jako białka ekspresjonowane <i>in vivo</i>	38
1.5.1.2.2. Inne białka <i>Borrelia burgdorferi</i> ekspresjonowane <i>in vivo</i>	38
1.6. Odpowiedź humoralna na zakażenie <i>Borrelia burgdorferi</i>	39
2. Relacje pomiędzy patogenem, a gospodarzem – patomechanizm zakażenia krętkami <i>Borrelia</i>	41
2.1. Rozsiew krętków <i>Borrelia burgdorferi</i> po wnikięciu do organizmu człowieka i lokalizacja w tkankach.....	41
2.2. Mechanizmy nieswoiste w eliminacji zakażeń	43
2.2.1. Alternatywna droga aktywacji dopełniacza.....	43
2.2.2. Klasyczna droga aktywacji dopełniacza	45
2.3. <i>Borrelia burgdorferi</i> w konfrontacji z elementami układu dopełniacza	46
2.4. Rola czynnika H układu dopełniacza i jego znaczenie w strategiach obronnych krętków <i>Borrelia burgdorferi</i>	47
2.5. Znaczenie składowych układu dopełniacza i krążących kompleksów immunologicznych w zakażeniu <i>Borrelia</i>	49
2.6. Rola cytokin w odpowiedzi na zakażenie <i>Borrelia burgdorferi</i>	51

3. Eksperymentalne metody badawcze w zakażeniach powodowanych przez <i>Borrelia burgdorferi</i>	53
3.1. Techniki eksperymentalne w badaniach komórek bakterii – mikroskop sił atomowych AFM (Atomic Force Microscope)	53
3.1.1. Moduł Young’a	54
3.1.2. Współczynnik adhezji	54
4. Objawy zakażenia <i>Borrelia burgdorferi</i> s.l.	57
4.1. Manifestacje skórne boreliozy	57
4.2. Borelioza stawowa	58
4.3. Neuroborelioza	59
5. Diagnostyka boreliozy i eksperymentalne metody badawcze w zakażeniach powodowanych przez <i>Borrelia burgdorferi</i>.....	61
5.1. Diagnostyka serologiczna	61
5.2. Metody molekularne w diagnostyce boreliozy	63
5.3. Diagnostyka mikrobiologiczna – hodowle <i>Borrelia burgdorferi</i> s.l. z materiałów klinicznych	64
5.4. Leczenie zakażeń <i>Borrelia</i>	65
5.5. Post-treatment Lyme Disease Syndrom (PTLDS)	65
6. Cel pracy	67
7. Materiał i metody	69
7.1. Grupa badana	69
7.2. Rodzaje badań w zakresie podstawowej diagnostyki serologicznej zakażeń <i>Borrelia burgdorferi</i>	70
7.3. Rodzaje badań w zakresie rozszerzonej diagnostyki serologicznej zakażeń <i>Borrelia burgdorferi</i>	70
7.3.1. Oznaczenia przeciwciał IgG dla białek antygenowych <i>Borrelia burgdorferi</i> z grupy <i>in vivo</i>	70
7.3.2. Oznaczenia przeciwciał IgM/IgG dla białek antygenowych wybranych gatunków <i>Borrelia</i>	71
7.4. Rodzaje badań w zakresie odpowiedzi immunologicznej na zakażenie <i>Borrelia burgdorferi</i>	71
7.4.1. Badania krążących kompleksów immunologicznych.....	71
7.4.2. Badania składowych układu dopełniacza	71
7.4.3. Badania poziomu cytokin	71
7.5. Materiał i testy stosowane do badań serologicznych i immunologicznych	72
7.5.1. Materiał do badań serologicznych	72

7.5.2. Testy ELISA do oznaczania przeciwciał IgM/IgG anty- <i>Borrelia</i>	72
7.5.3. Testy Western blot do oznaczania przeciwciał IgM/IgG anty- <i>Borrelia</i>	72
7.5.4. Testy stosowane w oznaczeniu krążących kompleksów immunologicznych (CIC)	74
7.5.5. Testy stosowane w oznaczeniu poziomu składowych dopełniacza	74
7.5.6. Testy stosowane w oznaczeniu poziomu cytokin	74
7.6. Badania doświadczalne obejmujące analizę wpływu czynników potencjalnie litycznych w warunkach <i>in vitro</i> na komórki krętków <i>Borrelia burgdorferi</i> s.s. B31	75
7.6.1. Aparatura i materiał wykorzystany do oceny wpływu czynników litycznych na krętka <i>Borrelia burgdorferi</i> s.s. B31 w warunkach <i>in vitro</i>	75
7.6.1.1. Mikroskop sił atomowych (Atomic Force Microscope, AFM)	75
7.6.1.2. Bakterie wykorzystane w doświadczeniu	76
7.6.1.3. Przygotowanie próbek kontrolnych <i>Borrelia burgdorferi</i> s.s. B31 do obserwacji w AFM	76
7.6.1.4. Przygotowanie próbek <i>Borrelia burgdorferi</i> s.s. B31 poddawanych działaniu czynników potencjalnie litycznych do obserwacji w AFM	77
7.6.1.5. Pozyskanie osocza z aktywnym układem dopełniacza	77
7.6.1.6. Pozyskanie osocza z aktywnym układem dopełniacza i przeciwciałami klas IgM i IgG anty- <i>Borrelia</i>	77
7.6.1.7. Pozyskanie osocza z nieaktywnym układem dopełniacza i przeciwciałami klas IgM i IgG anty- <i>Borrelia</i>	77
7.6.1.8. Inkubacja <i>Borrelia burgdorferi</i> s.s. B31 z osoczem będącym źródłem czynników potencjalnie litycznych	77
7.6.2. Parametry oceniane w mikroskopie sił atomowych (AFM)	78
7.6.3. Analiza procesu przygotowania próbek do obserwacji w AFM	78
7.7. Analiza statystyczna	80
8. Analiza wyników	81
8.1. Wyniki testu przesiewowego ELISA i testu potwierdzenia Western blot w kierunku obecności IgM/IgG anty- <i>Borrelia</i> uzyskane w grupie osób zawodowo narażonych na pokłucia przez kleszcze (leśnicy i rolnicy) i w grupie kontrolnej	81
8.2. Zawodowe czynniki narażenia na zakażenie <i>B. burgdorferi</i> w świetle wyników uzyskanych w testach ELISA i Western blot	84
8.3. Analiza wyników Western blot (Wb) pod względem klasy immunoglobulin	85
8.4. Analiza wczesnej, zaawansowanej i późnej odpowiedzi na zakażenie <i>B. burgdorferi</i> z uwzględnieniem przeciwciał dla specyficznych białek antygenowych krętka	86
8.4.1. Wczesna odpowiedź immunologiczna na zakażenie <i>Borrelia burgdorferi</i>	86

8.4.2. Zaawansowana odpowiedź immunologiczna na zakażenie <i>Borrelia burgdorferi</i>	86
8.4.3. Późna odpowiedź immunologiczna na zakażenie <i>Borrelia burgdorferi</i>	87
8.5. Białka antygenowe <i>B. burgdorferi</i> z grupy <i>in vivo</i> nie stosowane w rutynowej diagnostyce boreliozy	89
8.6. Gatunki <i>Borrelia burgdorferi</i> s.l. w generowaniu odpowiedzi immunologicznej	92
8.7. Przeciwciała dla wybranych gatunków <i>Borrelia burgdorferi</i> s.l. uznanych za patogenne	92
8.8. Analiza wyników potencjalnie negatywnych uzyskanych w dwuetapowym schemacie diagnostycznym z zastosowaniem testu ELISA i Western blot	96
8.9. Analiza dynamiki pojawiania się i zanikania przeciwciał dla specyficznych białek antygenowych <i>Borrelia burgdorferi</i> s.l. u pracowników leśnych na podstawie badań wykonanych w 2009 i 2012 roku	100
8.10. Próba interpretacji sytuacji niejasnych diagnostycznie związanych z obecnością przeciwciał anty- <i>Borrelia</i>	106
8.10.1. Krążące kompleksy immunologiczne	106
8.11. Pośrednie metody oceny wpływu składowych dopełniacza na proces zakażenia krętkami <i>Borrelia burgdorferi</i>	108
8.11.1. Rola czynnika H w zakażeniu <i>Borrelia burgdorferi</i>	108
8.11.2. Ocena poziomu składowych układu dopełniacza C3a, C4a, C5a w odpowiedzi immunologicznej na zakażenie <i>B. burgdorferi</i>	110
8.11.2.1. Poziom składowej C3a w zakażeniu <i>B. burgdorferi</i>	110
8.11.2.2. Poziom składowej C4a w zakażeniu <i>B. burgdorferi</i>	111
8.11.2.3. Poziom składowej C5a w zakażeniu <i>B. burgdorferi</i>	112
8.11.2.4. Korelacje poziomów C3a i C4a w zależności od rodzaju wykrywanych przeciwciał anty- <i>Borrelia</i>	114
8.11.2.5. Korelacje poziomów C3a i C4a u osób nie wykazujących obecności przeciwciał anty- <i>Borrelia</i>	116
8.12. Ocena poziomu cytokin prozapalnych i przeciwzapalnych w zakażeniu <i>B. burgdorferi</i>	117
8.12.1. Poziom TNF- α w zakażeniu <i>B. burgdorferi</i>	117
8.12.2. Poziom IFN- γ w zakażeniu <i>B. burgdorferi</i>	117
8.12.3. Poziom IL-6 w zakażeniu <i>B. burgdorferi</i>	119
8.12.4. Poziom IL-10 w zakażeniu <i>B. burgdorferi</i>	119
8.13. Bezpośrednie metody oceny wpływu czynników potencjalnie litycznych jak składowe dopełniacza i swoiste przeciwciała na komórki krętków <i>Borrelia burgdorferi</i> s.s. B31	121
8.13.1. Analiza topografii <i>Borrelia burgdorferi</i> s.s. B31 nie poddawanych działaniu czynników litycznych	121
8.13.2. Pomiary średnicy komórek <i>Borrelia burgdorferi</i> s.s. B31	123

8.13.3. Pomiary wysokości komórek <i>Borrelia burgdorferi</i> s.s. B31	124
8.13.4. Pomiary średnicy włókien obserwowanych przy komórkach <i>Borrelia burgdorferi</i> s.s. B31 w AFM.....	127
8.13.5. Pomiary wysokości włókien obserwowanych przy komórkach <i>Borrelia burgdorferi</i> s.s. B31 w AFM.....	130
8.13.6. Pomiary długości krętków <i>Borrelia burgdorferi</i> B31	130
8.13.7. Analiza własności mechanicznych krętków <i>Borrelia burgdorferi</i> B31 wyrażona modułem Young'a i współczynnikiem adhezji pod wpływem działania czynników litycznych	132
8.13.7.1. Moduł Young'a i współczynnik adhezji wyznaczony dla krętków <i>Borrelia burgdorferi</i> s.s. B31 nie poddawanych działaniu czynników litycznych.....	133
8.13.7.2. Moduł Young'a i współczynnik adhezji wyznaczony dla krętków <i>Borrelia burgdorferi</i> s.s. B31 poddawanych działaniu osocza z aktywnym układem dopełniacza i brakiem specyficznych IgM/IgG anty- <i>Borrelia</i>	135
8.13.7.3. Moduł Young'a i współczynnik adhezji wyznaczony dla krętków <i>Borrelia burgdorferi</i> s.s. B31 poddawanych działaniu osocza z aktywnym układem dopełniacza i obecnymi specyficznymi przeciwciałami IgM/IgG anty- <i>Borrelia</i>	137
8.13.7.4. Moduł Young'a i współczynnik adhezji wyznaczony dla krętków <i>Borrelia burgdorferi</i> s.s. B31 poddawanych działaniu osocza z zablokowanym układem dopełniacza i obecnymi specyficznymi przeciwciałami IgM/IgG anty- <i>Borrelia</i>	137
8.13.8. Porównanie wartości modułu Young'a dla powierzchni <i>B. burgdorferi</i> s.s. B31 poddawanej działaniu czynników litycznych.....	138
8.13.8.1. Moduł Young'a dla <i>Borrelia burgdorferi</i> s.s. B31 poddanych działaniu komplementu	140
8.13.8.2. Moduł Young'a dla <i>Borrelia burgdorferi</i> s.s. B31 poddanych działaniu komplementu i przeciwciał IgM/IgG anty- <i>Borrelia</i>	140
8.13.8.3. Moduł Young'a dla <i>Borrelia burgdorferi</i> s.s. B31 poddanych działaniu przeciwciał IgM/IgG anty- <i>Borrelia</i>	142
8.13.9. Porównanie wartości współczynnika adhezji dla powierzchni <i>B. burgdorferi</i> s.s. B31 poddawanej działaniu czynników litycznych	144
8.13.9.1. Współczynnik adhezji dla <i>Borrelia burgdorferi</i> s.s. B31 poddanych działaniu komplementu	144
8.13.9.2. Współczynnik adhezji dla <i>Borrelia burgdorferi</i> s.s. B31 poddanych działaniu komplementu i przeciwciał IgM/IgG anty- <i>Borrelia</i>	146
8.13.9.3. Współczynnik adhezji dla <i>Borrelia burgdorferi</i> s.s. B31 poddanych działaniu przeciwciał IgM/IgG anty- <i>Borrelia</i>	146
8.13.10. Wizualizacja uszkodzeń powierzchni krętków <i>Borrelia burgdorferi</i> s.s. B31 w wyniku kontaktu z czynnikami potencjalnie litycznymi	147
8.13.10.1. Zmiany wysokości <i>Borrelia burgdorferi</i> s.s. B31 poddanych działaniu czynników potencjalnie litycznych	148

9. Dyskusja	151
9.1. Zawodowe narażenie na zakażenie <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato.....	154
9.2. Ekspresja przeciwciał anty- <i>Borrelia</i> wśród osób zawodowo narażonych na zakażenia <i>B. burgdorferi</i> s.l.....	155
9.2.1. Białka CRASP w strategiach krętków	156
9.2.2. Gatunki <i>Borrelia</i> wywołujące zakażenie w aspekcie istotności klinicznej. Znaczenie <i>B. spielmanii</i> i <i>B. bavariensis</i> w zakażeniach u ludzi.....	157
9.3. Krążące kompleksy immunologiczne i ich znaczenie w diagnostyce boreliozy	159
9.4. Aktywacja produkcji cytokin prozapalnych i przeciwzapalnych w zakażeniu <i>B. burgdorferi</i>	161
9.5. Znaczenie układu dopełniacza w eliminacji zakażenia w aspekcie strategii obronnych krętków <i>Borrelia burgdorferi</i> s.l.....	163
9.5.1. Rola czynnika H w zakażeniu <i>Borrelia</i>	164
9.6. Wizualizacja i pomiary skutków uszkodzeń powierzchni <i>Borrelia burgdorferi</i> s.s. B31 pod wpływem dopełniacza i specyficznych przeciwciał.....	165
9.7. Znaczenie adhezji w kolonizacji tkanek przez <i>B. burgdorferi</i>	166
9.8. Mikroskop sił atomowych jako narzędzie w badaniu morfologii mikroorganizmów.....	166
10. Wnioski	169
11. Streszczenie	171
12. Spis rycin	177
13. Spis tabel.....	181
14. Bibliografia	183