

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD



BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

**LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA LYMSKÉ
NEUROBORELIÓZY**

Ing. Petra Plášková

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Klára Konečná, Ph.D.

Konzultant: MUDr. Radka Gambová

HRADEC KRÁLOVÉ, 2018

Poděkování

Děkuji vedoucí mé bakalářské práce RNDr. Kláře Konečné, Ph.D. za cenné rady a podnětné připomínky. Velice děkuji za pomoc a odborné rady mým kolegyním z Oddělení lékařské mikrobiologie Krajské nemocnice T. Bati a.s. ve Zlíně při tvorbě této bakalářské práce a podporu při celém studiu. Zejména MUDr. Gambové, Mgr. Svoradové, Mgr. Bělákové, Ph.D., MUDr. Liškové, E. Lapčíkové, Ing. Vičíkové, H. Šebákové a A. Šulcové. Také děkuji prim. MUDr. Bartoníkové, že mi umožnila vypracovat tuto bakalářskou práci.

Děkuji i své rodině za podporu a trpělivost při mém dalším studiu.

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové 26.8. 2018

OBSAH

Obsah	4
1. ABSTRAKT	6
2. ABSTRACT	7
3. ÚVOD	8
4. ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE	10
5. TEORETICKÁ ČÁST	11
5.1 Bakteriální původce lymské boreliózy	11
5.2 Klíště Ixodes a borelie	14
5.3 Onemocnění zvané lymská borelióza	15
5.4 Projevy lymské boreliózy	15
5.4.1 Kožní projevy	15
5.4.2 Neuroborelióza	17
5.4.3 Postižení muskuloskeletárního systému	17
5.4.4 Lymská karditida	17
5.4.5 Další projevy lymské boreliózy	18
5.5 Infekce způsobená lymskou boreliózou vs. odezva imunitního systému	19
5.6 Laboratorní diagnostika lymské boreliózy	21
5.6.1 Metody přímé	21
5.6.2 Metody nepřímé	24
5.6.3 Laboratorní diagnostika neuroboreliózy	27
6. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	32
6.1 Použité metody	32
6.1.1 Stanovení protilátek metodou CLIA na analyzátoru LIAISON XL	32
6.1.2 Stanovení protilátek metodou Western blot	36
6.1.3 Vyšetření CXCL13 metodou ELISA	42
6.1.4 Stanovení boreliové DNA pomocí PCR	45
6.2 Soubor pacientů	53
7. VÝSLEDKY	54

7.1	Výsledky všech 249 vzorků.....	54
7.2	Výsledky vzorků vyšetřených v období červen – červenec 2018	56
7.3	Výsledky skupiny dětí do 12 let.....	58
8.	DISKUSE.....	60
9.	ZÁVĚR	63
10.	POUŽITÉ ZKRATKY	64
11.	SEZNAM TABULEK	66
12.	SEZNAM OBRÁZKŮ	67
13.	SEZNAM GRAFŮ	69
14.	SEZNAM PŘÍLOH.....	69
15.	POUŽITÁ LITERATURA	70

1. ABSTRAKT

Cíl práce

Charakterizovat původce lymské boreliózy bakterii *Borrelia burgdorferi* sensu latu, popsat jeho vztah k hostiteli a projevy lymské boreliózy. Vyjmenovat možnosti laboratorní diagnostiky lymské boreliózy a lymské neuroboreliózy (LNB). Hlavním cílem bylo porovnat výhody a nevýhody laboratorních metod využívaných na Oddělení lékařské mikrobiologie v Krajské nemocnici T. Bati a.s. ve Zlíně pro diagnostiku LNB a zhodnotit přínos ve stanovení chemokinu CXCL13 v mozkomíšním moku za účelem potvrzení/vyloučení diagnózy LNB.

Metody

Za období březen 2015 – červenec 2018 bylo vyšetřeno 249 vzorků mozkomíšního moku, u kterých byla stanovena koncentrace chemokinu CXCL13 metodou ELISA (CXCL13-ELISA, Euroimmun, Německo). Dále u nich byly vyšetřeny specifické protilátky třídy IgM a IgG proti boreliím metodou chemiluminiscenční analýzy (CLIA) na analyzátoru LIAISON XL (LIAISON®*Borrelia* IgM Quant a LIAISON®*Borrelia* IgG, DiaSorin S.p.A., Itálie) a konfirmační metodou Western blot (Blot-line *Borrelia*/HGA IgM a Blot-line *Borrelia*/HGA IgG, Testline Clinical Diagnostics s.r.o., Česká republika). U 35 vzorků byl proveden přímý průkaz borelií metodou polymerázové řetězové reakce (Geneproof *Borrelia burgdorferi* PCR kit verze ISEX, GeneProof a.s., Česká republika).

Výsledky

Bylo vyšetřeno 249 vzorků mozkomíšního moku. Skupina zahrnovala 130 mužů a 119 žen ve věku 4 – 88 let. Dvě skupiny byly zpracovány podrobněji. Ve skupině děti do 12 let, kterých bylo 27, bylo diagnostikováno 20 případů LNB. U všech 20 dětí byla koncentrace CXCL13 355 pg.ml⁻¹ a vyšší. U dvou dětí byla stanovením koncentrace CXCL13 diagnóza LNB podpořena, jelikož tyto děti neměly ještě vytvořeny protilátky. Ve skupině 50 pacientů různého věku vyšetřených v období červen – červenec 2018 bylo 8 pacientů s LNB. U všech 8 případů byla stanovena lymfocytární pleocytóza, pozitivní intratekální syntéza protilátek ve třídě IgM i IgG a koncentrace CXCL13 byla vyšší než 250 pg.ml⁻¹.

Závěry

Zařazení vyšetření koncentrace CXCL13 v mozkomíšním moku v KNTB a.s. Zlín je přínosné. Získání všech parametrů potřebných pro výpočet intratekální syntézy protilátek může trvat několik dní, naproti tomu výsledek koncentrace CXCL13 je možno získat během 1 dne, což může diagnostiku LNB urychlit. Navíc může stanovení koncentrace CXCL13 přispět k diagnostice LNB u případů, kdy ještě nejsou vytvořeny protilátky. To se stává zejména u dětí.

Klíčová slova: lymská borelióza, neuroborelióza, CLIA, Western Blot, CXCL13

2. ABSTRACT

Background

To characterize the Lyme borreliosis agent of *Borrelia burgdorferi* sensu lato, describe its relationship to the host and the manifestations of Lyme borreliosis. List the possibilities of laboratory diagnostics of Lyme borreliosis and Lyme neuroborreliosis (LNB). The main objective was to compare the advantages and disadvantages of the laboratory methods used at the Department of Medical Microbiology at the T. Bati a.s. regional hospital in Zlin for LNB diagnosis and to evaluate the benefit in determining CXCL13 chemokine in CSF to confirm/exclude the diagnosis of LNB.

Methods

From March 2015 to July 2018, 249 cerebrospinal fluid samples were examined and the chemotaxin CXCL13 concentration was determined by ELISA (CXCL13-ELISA, Euroimmun, Germany). In addition, these were examined for a specific IgM and IgG antibodies against the *Borrelia* using a method of Chemiluminescence Analysis (CLIA) on the analyzer LIAISON XL (LIAISON®*Borrelia* IgM Quant and LIAISON®*Borrelia* IgG, DiaSorin SpA, Italy) and the Western blot (Blot-line *Borrelia*/HGA IgM and Blot-line *Borrelia*/HGA IgG, Testline Clinical Diagnostics s.r.o, Czech Republic). For 35 samples the direct detection of *Borrelia* using a polymerase chain reaction method (Geneproof *Borrelia burgdorferi* PCR kit version ISEX, GeneProof a.s., Czech Republic) was performed.

Results

249 samples of cerebrospinal fluid were examined. The group included 130 men and 119 women aged 4 - 88. Two specific groups were processed in more detail. 20 cases of LNB were diagnosed in the group of 27 children under the age of 12. For all 20 children, the CXCL13 concentration was 355 pg.ml⁻¹ and higher. For 2 children, LNB diagnosis was supported by using CXCL13 method since these children did not yet have any antibodies. In the group of 50 patients of different age that were examined between June and July 2018 there were 8 patients with LNB. In all 8 cases there were determined lymphocytic pleocytosis, positive intrathecal antibody synthesis in the IgM and IgG class and CXCL13 concentration was greater than 250 pg.ml⁻¹.

Conclusions

Incorporation of CXCL13 concentration test in cerebrospinal fluid in KNTB a.s. Zlin is beneficial. Obtaining all the parameters needed to calculate the intrathecal antibody synthesis can take several days, while the CXCL13 concentration can be obtained within 1 day, which can accelerate LNB diagnosis. Additionally, the determination of CXCL13 concentration can contribute to the diagnosis of LNB in cases where antibodies are not yet established. This is especially true in children.

Keywords: Lyme disease, neuroborreliosis, CLIA, Western Blot, CXCL13

3. ÚVOD

Téma bakalářské práce jsem si vybrala ze dvou důvodů. Prvním důvodem bylo zavedení nové metody na Oddělení lékařské mikrobiologie v Krajské nemocnici T. Bati a.s. ve Zlíně, kde pracuji. Touto metodou bylo stanovení koncentrace chemokinu CXCL13 ve vzorcích mozkomíšního moku, jako nového laboratorního markeru pro diagnostiku lymské neuroboreliózy (LNB). Druhým důvodem bylo, že jsem se chtěla dozvědět o původci lymské boreliózy více informací, protože jeden můj blízký člověk s lymskou boreliózou bojuje již několik let.

Lymská borelióza je nemoc, kterou způsobuje bakterie rodu *Borrelia*. Je známo více druhů borelií způsobující lymskou boreliózu. Tento komplex se nazývá *Borrelia burgdorferi* sensu lato a znamená to *Borrelia burgdorferi* v širším slova smyslu. Hlavním přenašečem borelií je klíště rodu *Ixodes*. [1]

Projevy lymské boreliózy jsou různé a existuje více stádií této nemoci. Časné lokalizované stádium se objevuje po několika dnech až týdnech po nákaze a nejčastěji se projevuje jako erythema migrans (EM), někdy s celkovými chřipkovými příznaky. Časné diseminované stádium se projevuje po týdnech až měsících a může se projevovat mnohočetnými migrujícími erytémy, boreliovým lymfocytomem, akutní LNB, lymskou artritidou či lymskou karditidou. Pozdní diseminované stádium se objevuje po měsících až rocích a projevuje se jako akrodermatitis chronica atrophicans (ACA), pozdní LNB či pozdní lymská artritida. [2,3]

Laboratorní diagnostika lymské boreliózy není jednoduchá vzhledem k antigenní heterogenitě borelií. Rozlišujeme dva základní typy laboratorních metod pro diagnostiku lymské boreliózy – metody přímé a metody nepřímé. Mezi metody přímé patří kultivace, mikroskopie a průkaz boreliové DNA pomocí polymerázové řetězové reakce. Jelikož je citlivost přímých metod nízká, je laboratorní diagnostika lymské boreliózy založena především na metodách nepřímých, tedy stanovení protilátek. [1]

Pokud se borelie dostanou do nervového systému, mohou způsobit LNB. Diagnostika LNB je podle současných evropských směrnic založena na klinických projevech a analýze mozkomíšního moku. Rychlá a spolehlivá diagnostika LNB je pro pacienta zásadní. Při podezření na LNB je mozkomíšní mok vyšetřen cytologicky, biochemicky a stanovují se specifické protilátky třídy IgM a IgG proti boreliím. Poté je možno vypočítat intratekální syntézu protilátek. [3]

Problémem může být diagnostika velmi časného stádia LNB, kdy ještě nejsou detekovatelné protilátky. Navíc specifické protilátky proti boreliím mohou přetrvávat dlouho dobu po léčbě, což komplikuje odlišení akutní reinfekce od stavu po prodělané infekci. [4,5] Hledají se proto nové laboratorní markery, které by tyto stavy pomohly rozlišit.

Jedním z těchto nových laboratorních markerů je stanovení koncentrace chemokinu CXCL13 v mozkomíšním moku. Chemokin CXCL13 slouží jako chemoatraktant pro B lymfocyty, což naznačuje, že se v mozkomíšním moku nachází dříve než B lymfocyty, které produkují

protilátky. [6,7] Při LNB bývá jeho koncentrace značně zvýšená. Problémem je, že ještě není určena mezní hodnota, která by odlišovala pacienty s LNB od ostatních.

Cílem této bakalářské práce je porovnat výhody a případná úskalí laboratorních metod pro diagnostiku LNB a zhodnotit přínos stanovení koncentrace chemokinu CXCL13 v mozkomíšním moku v Krajské nemocnici T. Bati a.s. ve Zlíně.

4. ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE

Cílem této práce je pojednání o původci lymské boreliózy *Borrelia burgdorferi sensu lato* a jeho vztahu k hostiteli, charakterizovat projevy lymské boreliózy a zejména ozřejmit laboratorní diagnostiku lymské boreliózy se zaměřením na laboratorní diagnostiku LNB.

Hlavním cílem práce je porovnat výhody a případná úskalí laboratorních metodických přístupů využívaných v rámci pracoviště Oddělení lékařské mikrobiologie v Krajské nemocnici T. Bati a.s. ve Zlíně pro diagnostiku LNB a zhodnotit přínos ve stanovení chemokinu CXCL13 v mozkomíšním moku za účelem potvrzení/vyloučení diagnózy LNB.

5. TEORETICKÁ ČÁST

5.1 Bakteriální původce lymské boreliózy

Lymská borelióza je nemoc, kterou způsobuje bakterie rodu *Borrelia*, která patří mezi spirochéty. Slovo spirochéta znamená „svinutý vlas“ a spirochéty mají právě takový tvar. Kromě rodu *Borrelia* patří mezi spirochéty také rody *Treponema*, *Leptospira*, *Brachyspira*, *Brevinema*, *Crisispira*, *Leptonema* a *Spirochaeta*. [2]

Dříve si lidé mysleli, že je lymská borelióza způsobena jedním druhem bakterie. V současné době je známo více druhů borelií a tento komplex se nazývá *Borrelia burgdorferi sensu lato*. Znamená to *Borrelia burgdorferi* v širším slova smyslu. Existují tři hlavní druhy vyvolávající lymskou nemoc – *Borrelia burgdorferi sensu stricto* (v užším slova smyslu), *Borrelia garinii* (Bg) a *Borrelia afzelii* (Ba). [1] Jsou známy i další druhy, které vyvolávají infekční onemocnění u lidí - *Borrelia spielmanii* a *Borrelia bavariensis*. Patogenita druhů *Borrelia valaisiana*, *Borrelia lusitaniae*, *Borrelia mayonii* a *Borrelia bissettiae* jsou předmětem diskuze. [8]

Bakterie rodu *Borrelia* jsou mikroaerofilní, gramnegativní spirálovité bakterie o velikosti 0,2 μm x 4 – 30 μm . Pohybují se rotací kolem své osy, smršťováním, natahováním a také pomocí bičíků. [1] Borelie jsou velmi mobilní, kolonizují viskózní prostředí, jako jsou kolagenní tkáň chrupavek či sklivec v oku. [2]

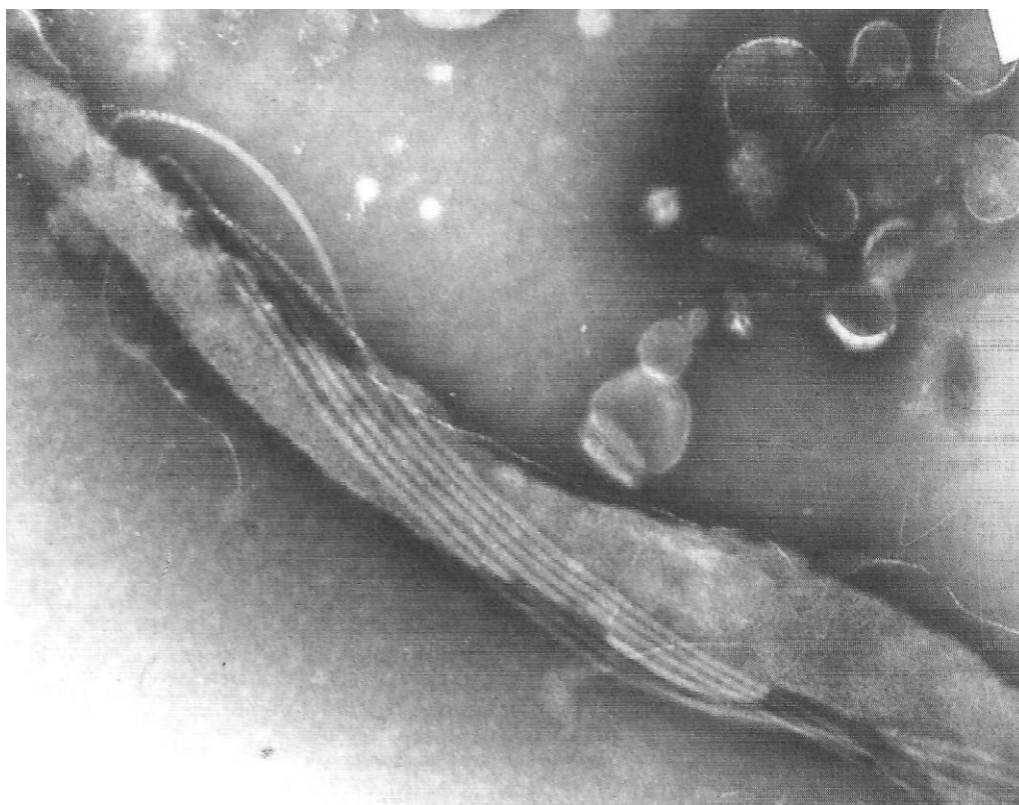


Obrázek 1: *Borrelia burgdorferi sensu lato* zachycená elektronovým mikroskopem (zvětšeno 15 000x).

Převzalo z [3]

Bičíky se vypínají z bazálních disků umístěných v cytoplazmatické membráně, obklopují protoplazmatický válec buňky a nachází se pod vnější buněčnou stěnou. [1] Buněčná stěna se skládá ze tří vrstev – vnitřní peptidoglykanové, střední lipopolysacharidové a vnější lipoproteinové. [9]

Počet bičíků kolísá mezi 7 – 11. [8] Bičíky jsou tvořeny flagelinem – proteinem sestávajícím z vnější části o molekulové hmotnosti 41 kDa a vnitřní části o molekulové hmotnosti 14 kDa. Flagellin je silně imunogenní a v časně fázi infekce tělo hostitele proti němu vytváří protilátky třídy IgM. Protilátky IgG proti flagelinu nemusí být specifické a mohou zkříženě reagovat s lidským axonálním proteinem nervových buněk, což může být příčinou autoimunitních reakcí či chronické artritidy. [1] Vnitřní část molekuly flagelinu je rodově specifická a zkřížených reakcí vykazuje méně než celý protein. [10]



Obrázek 2: Vysunuté bičíky pod ztenčenou povrchovou membránou, ze které jsou vylučovány membránózní vezikuly - zachyceno elektronovým mikroskopem (zvětšení 80 000x)

Převzato z [1]

Buněčná stěna je flexibilní a umožňuje vysouvání bičíků proximálním a distálním směrem. [3] Při vysunutí bičíků jsou vylučovány membránózní vezikuly (tzv. blebs neboli vychlípeniny). Ty mají podobnou stavbu jako buněčná stěna a obsahují plazmidovou DNA. [1]

Borelie nemají enzymy pro syntézu aminokyselin, mastných kyselin a nukleotidů, využívají enzymy hostitele, a jsou na něm zcela závislé. Ve vnějším prostředí nerostou. [11] K růstu a syntéze DNA dále potřebují zinek [1] a jsou přizpůsobeny na nízké hladiny železa. [11]

Při nevhodných podmínkách, jako je nedostatek nutričních zdrojů, nízké pH či nízký osmotický tlak, může dojít k tvorbě bakteriálních cyst či granul. [1] Cysty mají sníženou metabolickou aktivitu a při vhodných podmínkách jsou schopné se přeměnit v plně funkční aktivní formu. Tvorba cyst se může uplatňovat při ukrývání borelií před imunitním systémem hostitele a před antibiotiky. [11] Pokud nepříznivé podmínky trvají příliš dlouho, dojde k vchlípení buněčné stěny dovnitř cysty a povrchovou vrstvu této již mrtvé cysty tvoří zbytky bičíků. Granula vznikají prodlužováním a zaškrcováním distálních a proximálních konců spirochét a pravděpodobně nejsou živá. [1]

Genetický materiál se skládá z lineárního chromozomu (911 kb), 12 lineárních a 9 cirkulárních plazmidů. [3]

Pro výzkum se jedná o náročné bakterie. Je třeba použít speciální kultivační média a dlouhou inkubační dobu, protože jejich generační doba *in vitro* je 12 - 14 hodin. [1]

5.2 Klíště *Ixodes a borelie*

Česká republika se nachází v mírném pásmu, které je ideální pro život hlavního přenašeče lymské boreliózy – klíštěte. [1] Klíšťata *Ixodes* mají tři vývojové stupně – larvu, nymfu a dospělce. V každém stádiu sají pouze jednou, po nasycení krví odpadnou. Larvy a nymfy se vyvíjí v další stádium, dospělci kladou vajíčka zjara. Z vajíčka se vylíhne larva, která měří asi 0,8 mm, má tři páry nohou a většinou se přisává na drobné hlodavce. Larva saje asi 3 dny, poté odpadne, tráví potravu a přeměňuje se na další vývojové stádium zvané nymfa. Přeměna trvá asi 35 dní. Nymfy přezimují a aktivují se na jaře. Nymfa měří 1,2 - 1,5 mm, má čtyři páry nohou a přisává se na zvířata různé velikosti, myši, zajíce, ježky, psy, kočky i člověka. Nymfy se krmí 4 – 5 dnů, poté odpadnou a začnou se přeměňovat v dospělého jedince. To trvá cca 42 dnů. Dospělci se většinou vylíhnou v říjnu či listopadu a hned si hledají potravu. Jejich oběťmi jsou většinou větší živočichové, jako jsou koně, psy, vysoká zvěř a lidé. Sají 7 – 8 dnů, pak se pustí. Dospělci jsou dvoupohlavní, po nasátí dojde ke kopulaci, samečci umírají a samičky se chystají na přezimování. Ty, které si nenašly oběť na podzim, sají na jaře. Na jaře samičky kladou vajíčka, poté hynou. [2]

Jakmile se klíště přisaje, začne do svého hostitele vypouštět směs chemických látek, které slouží mimo jiné (anestetikum, hemostatikum) jako chemoatraktant pro borelie nacházející se v hostiteli. Takto se nakazí spousta larev klíštěte, které nejsou infikovány při svém zrození. [2]

Borelie žijí v hostitelích v různém prostředí a umí se mu přizpůsobit. Teplota klíšťat závisí na teplotě okolí a v jejich žaludku je pH asi 9,5. Savci jsou teplokrevní živočichové, teplota lidského těla je 37°C a pH krve je 7,4. Po přisátí klíštěte se zvýší teplota v žaludku klíštěte a změní se pH, což aktivuje borelie. Ty se začnou přesunovat ke slinným žlázám klíštěte, což nějakou dobu trvá. Proto je důležité klíště odstranit co nejdříve, velice se tím sníží možnost nákazy. [2]



Obrázek 3: *Ixodes ricinus* – vlevo nahoře - dospělá samice, vpravo nahoře – nymfa, vlevo dole – dospělý samec, vpravo dole – larva

Převzato z: <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-016-1389-5>

5.3 Onemocnění zvané lymská borelióza

Většinou se lymská borelióza dělí na 3 stádia – časné lokalizované, časné diseminované a pozdní diseminované. Časné lokalizované stádium se objevuje po několika dnech až týdnech po nákaze a borelie jsou jen málo rozšířeny. Nejčastěji se projevuje jako EM, někdy s celkovými chřipkovými příznaky. Časné diseminované stádium se projevuje po týdnech až měsících, borelie se šíří po těle, ale ještě v něm nejsou trvale usazeny. Mezi příznaky patří mnohočetné migrující erytémy, boreliový lymfocytom, akutní LNB, lymská artritida či lymská karditida. Pozdní diseminované stádium se objevuje po měsících až rocích, borelie jsou rozšířeny v mnoha částech těla a trvale se v nich usadily. Projevuje se jako ACA, pozdní LNB či pozdní lymská artritida. [2,3,12]

Průběh nemoci je však u každého jedince odlišný, takže nelze přesně odlišit jednotlivá stádia nemoci.

5.4 Projevy lymské boreliózy

5.4.1 Kožní projevy

Mezi kožní projevy patří erythema migrans, lymfocytom a acrodermatitis chronica atrophicans.

5.4.1.1 Erythema migrans

EM je nejcharakterističtější příznak prvního stádia onemocnění, ale tvoří se jen u asi 50 % nemocných. Tento migrující erytém se tvoří několik dnů až jeden měsíc po přisátí klíštěte. Jedná se o kruhovitou či oválnou červenou skvrnu, která je nebolestivá, dosahuje velikosti několika desítek cm a časem od středu bledne. Mizí po několika týdnech až měsících i bez léčby. Někdy se objevují i vícečetné sekundární EM, což bývá projevem 2. stadia. [1,3]



Obrázek 4: Erythema migrans

Převzato z: <https://www.prpom.cz/wp-content/uploads/2016/06/erythema-migrans.jpg>

5.4.1.2 Boreliový lymfocytom

Boreliový lymfocytom se objevuje v místě přisátí klíštěte, ale i na jiných částech těla – nejčastěji na ušním lalůčku, nose, šourku či prsní bradavce, za několik týdnů po infekci, hlavně u dětí. Jedná se o nebolestivé zduření červené až fialové barvy. Při boreliovém lymfocytomu můžeme pozorovat místní lymfadenitidu. Bez léčby trvá měsíce až více než rok. [1,3]



Obrázek 5: Boreliový lymfocytom

Převzato z: http://www.borelioza.cz/old_page/img/lymfocytom.jpg

5.4.1.3 Acrodermatitis chronica atrophicans

Acrodermatitis chronica atrophicans, neboli chronická atrofická akrodermatitida (ACA) je projevem 3. stadia a postihuje kůži končetin. Může vzniknout i po několika letech od začátku infekce. Nejdříve se jedná o nebolestivý erytém, který časem přechází do stádia atrofického, kdy dochází k úbytku elastických vláken, kůže se stává nepružnou a má vzhled cigaretového papíru. [1,3]



Obrázek 6: Acrodermatitis chronica atrophicans

Převzato z: <https://www.kup.at/journals/abbildungen/gross/16010.html#start>

5.4.2 Neuroborelióza

Pokud borelie napadnou nervový systém, hovoříme o LNB. Může být postihnut centrální i periferní nervový systém. [12] O postižení nervového systému se zmínili francouzští lékaři Garin a Bujadoux již v roce 1922. Až o 20 let později německý revmatolog Bannwarth rozvinul poznatky francouzských lékařů a popsal příznaky, které jsou dnes známy pod názvem Bannwarthův syndrom. [1]

5.4.2.1 Časná stádium neuroboreliózy

Časná LNB se objevuje 2 – 12 týdnů po nákaze. [12] Jedním z nejčastějších a nejnápadnějších projevů LNB zejména u dětí je periferní paréza lícního nervu. [1] Je často provázena aseptickou meningitidou někdy společně s kraniální neuritidou. [12] Spíše u dospělých osob se můžeme setkat s Garin-Bujadoux-Bannwarthovým syndromem, který se projevuje silnými kořenovými bolestmi v dolních i horních končetinách, které se zhoršují většinou v noci a nereagují na léčbu analgetiky a antirevmatiky. [1] Dále lymfocytární meningoencefalitidou, meningoradikuloneuritidou, myelitidou, kraniální neuritidou či jejich kombinací. [9] Tyto projevy mohou být provázeny nočními stavy neklidu, zmatenosti a obrnami končetin. [1]

5.4.2.2 Pozdní stádium neuroboreliózy

U pozdní LNB můžeme pozorovat polyradikulitidu a polyneuritidu, které se projevují parézami a poruchami cití končetin, bolestí. Může docházet k poruchám paměti, chování, spánku, vědomí, osobnosti či labilitou nálad při progresivní encefalomyelitidě. [12]

5.4.3 Postižení muskuloskeletárního systému

K postižení muskuloskeletárního systému dochází v časném i pozdním diseminovaném stádiu infekce. Jedná se o postižení kloubů – lymská artritida, svalů a jejich úponů, fascií a kloubních výstelek. Zánět vzniká jako přímý důsledek infekce, ale i jako infekcí navozené imunopatologické jevy – autoimunitní onemocnění. V časně diseminované fázi se objevují záněty drobných kloubů, svalů, šlach a jejich obalů. V pozdní fázi bývají postiženy spíše velké klouby – nejčastěji kloub kolenní, ramenní a loketní. [3] Přidružuje se únava, slabost, horečka, noční pocení, nevykonnost. [1]

5.4.4 Lymská karditida

Pojem lymská karditida označuje postižení srdce, ke kterému dochází po 2 týdnech až 5 měsících po vstupu borelií do těla. [1] Nejčastěji dochází k poruchám srdečního rytmu projevující se únavou, dušností, závratěmi, bušením srdce až synkopou. Dále může dojít k perikarditidě, myokarditidě. [3]

5.4.5 Další projevy lymfské boreliózy

Vyskytují se i oční a ušní projevy infekce, které se mohou objevit v kterémkoliv stádiu infekce. Mezi oční problémy patří pocit tlaku v očích, poruchy vidění, světloplachost a slzení. Příčinou mohou být záněty spojivek, rohovky, sklivce, duhovky, cévnatky a jiných částí oka nebo poruchy optického nervu či nervů okohybných. Problémy s ušima a sluchem se projevují hučením či šelestem v uších, zvýšenou citlivostí na zvuk, závratěmi, poruchami rovnováhy, někdy i náhlou nedoslýchavostí. [2]

Lymfská borelióza má velmi různorodé příznaky. Velmi vzácně se může objevit lymfadenitida, orchitida, hepatopatie s hepatomegalií, nefritida, glomerulonefritida, navození autoimunitní odpovědi. [3] Mluví se i o tzv. postboreliovém syndromu, u kterého ani po léčbě nevymizí obtíže, nebo se ještě zhorší. Pacienti si stěžují na únavu, malátnost, bolesti kloubů, svalů, hlavy či poruchy soustředění. Objektivně je však pacient v pořádku a proto někteří lékaři pochybují o existenci tohoto syndromu a hovoří o psychosomatických faktorech a depresi. [12]

5.5 Infekce způsobená lymskou boreliózou vs. odezva imunitního systému

Vzhledem k tomu, že borelie musí přežít ve velmi rozdílných podmínkách, které panují v žaludku klíšťat a v organismu savců či ptáků, jsou borelie vybaveny přesnou regulací exprese genů zejména pro proteiny nacházející se na jejich povrchu. [11] Mezi tyto proteiny patří vnější povrchové proteiny (Outer surface proteins, Osps) kódované geny uloženými na plazmidech. K dnešní době je známo 6 typů těchto proteinů – OspA, OspB, OspC, OspD, OspE a OspF. [8]

OspA (31-32 kDa) a OspB (34-35 kDa) kódované geny na lineárním plazmidu lp54 jsou exprimovány zejména v trávicím traktu klíšťat a fungují zde jako adhezivní molekuly. [11,13] Během sání krve klíštětem a v počáteční fázi infekce jejich exprese klesá. Později jejich exprese roste a hostitel si proti nim vytváří v pozdní fázi protilátky. [10] OspA můžeme nalézt i na povrchu živých cyst, u mrtvých cyst se nachází uvnitř. [1] V USA byl rekombinantní protein OspA využit k výrobě vakcíny Lymerix, která byla licencována v roce 1998, ale v roce 2002 byla její licence ukončena. V dnešní době neexistuje žádná vakcína proti borelióze a je málo pravděpodobné, že bude v blízké budoucnosti vyvinuta. [10,14]

Expese OspC (21-25 kDa) kódovaného genem nacházejícím se na kruhovém plazmidu cp26 se zvyšuje během sání krve klíštětem. OspC je schopen vázat imunoregulační protein Salp15 nacházející se ve slinách klíštěte, který zpočátku chrání borelie před imunitní reakcí hostitele. Proti OspC se tvoří protilátky IgM již v rané fázi infekce. [11,13] Problémem pro diagnostiku je jeho heterogenita. Liší se mezi jednotlivými druhy borelií a navíc například u *B. garinii* bylo identifikováno již 13 různých OspC sérotypů. [8] Při přechodu do diseminované fáze onemocnění exprese OspC klesá. [11]

OspD (26-28 kDa) je kódovaný genem nacházejícím se na lineárním plazmidu lp38. Můžeme ho nalézt na povrchu borelií nacházejících se v klíštěti. Jakmile teplota prostředí při sání krve vzroste, jeho exprese klesá. [13] OspD má lytický účinek a zřejmě díky němu může i malé množství borelií vyvolat infekci. [1] V životním cyklu borelií však není nezbytný. [13]

OspE váže komplementový faktor H nebo mu podobné proteiny, ale není přesně objasněno, jakou roli to hraje v patogenezi lymské boreliózy. Geny pro OspE a OspF se nachází na různých plazmidech. OspE a OspF patří do rodiny Erp proteinů a tvoří se během infekce savců lymskou boreliózou. [1,13]

Na povrchu borelií se také nachází lipoprotein VlsE (Variable major protein-like sequence, expressed; exprimovaná sekvence podobná sekvenci variabilního proteinu) o molekulové hmotnosti 34-35 kDa kódovaný genem nacházejícím se na lineárním plazmidu lp28-1. [10] Objevuje se na povrchu borelie při přechodu do diseminované fáze a umožňuje přechod do chronické fáze tím, že omezuje specifickou imunitní odpověď organismu. [11] Je vysoce imunogenní a vyznačuje se velkou variabilitou. [10]

K adhezi borelií k pojivové tkáni hostitele pomáhají proteiny DbpA, DbpB, BBK32 či vnější povrchový protein P66. Dbp (decorin binding protein, dekorin vázající protein) A či B kódované geny uloženými na lp54 se vážou na dekorin hostitele, což je glykoprotein

interagující s kolagenními vlákny. Expresí proteinu BBK32 (fibronectin binding protein, fibronektin vázající protein) o molekulové hmotnosti 47 kDa kódovaného genu na lp36 a proteinu P66 (66 kDa) kódovaného chromozomální DNA se projevuje během sání krve klíštětem a při infekci savců. BBK32 se váže na glykoprotein nacházející se v extracelulární matrix hostitele zvaný fibronektin. P66 patří mezi integrální proteiny vnější membrány (outer membrane proteins) a váže se na integrin. [1,13]

Jakmile proniknou borelie do kůže, začnou se v ní množit, mohou zůstat v místě vniknutí a vyvolat vznik EM nebo se šíří do mízních uzlin a vyvolávají vznik primární protizánětlivé odpovědi. [3] Šíření lymfatickou cestou či tkáněmi je intenzivnější než šíření krví. Osídlení cílových orgánů (kůže, podkoží, nervové tkáně, kloubů, srdce, vzácně očí) většinou proběhne během 2 – 3 měsíců. V těchto tkáních mohou borelie perzistovat měsíce až roky, způsobovat různé obtíže, mohou se střídát období klidu a relapsů nebo je jejich přítomnost zcela bez příznaků. [1]

Na obraně proti infekci se podílí imunita vrozená i získaná, buněčná i humorální. Imunitní odpověď hostitele vyvolávají zejména povrchové proteiny. V EM se vyskytují lymfocyty T a makrofágy produkující protizánětlivé cytokiny – interferon gama (INF γ), tumor nekrotizující faktor alfa (TNF α), interleukiny IL-1, IL-6, IL-10, IL-11, IL-12, IL-17. Tkáň je dále infiltrována lymfocyty B a plazmatickými buňkami produkující protilátky. Tvorba protilátek třídy IgM začíná již v prvních dnech po infekci, ale prokazatelné pomoci diagnostických souprav jsou až za 2 – 4 týdny. Pacienti s EM často ještě detekovatelné protilátky nemají, a pokud je léčba zahájena včas, nemusí se vůbec vytvořit. Jako antigen slouží v časně fázi OspC a flagelin p41. Ve většině případů protilátky třídy IgM přetrvávají několik týdnů až měsíců a pak vymizí. Protilátky třídy IgG se zpravidla objeví po 6 – 8 týdnech. [1,3]

Pokud nedojde k léčbě nebo si s boreliemi neporadí imunitní systém sám, dojde během několika dnů až měsíců k rozšíření borelií krevní či lymfatickou cestou do různých částí těla. Borelie mají řadu mechanismů, jak uniknout imunitnímu systému. Dokážou regulovat expresi povrchových proteinů – exprese OspC nacházejícího se na povrchu borelií na začátku infekce se postupně snižuje a naopak se zvyšuje exprese VlsE. Protilátky vytvořené proti OspC jsou v pozdějších fázích infekce neúčinné. Nevýhodou pro hostitele je také to, že tyto povrchové proteiny jsou velmi variabilní. Některé druhy borelií jsou schopné inhibovat C3b složku komplementu a tím zabránit aktivaci komplementového systému. Důležité je také to, že se borelie často nacházejí v imunologicky privilegovaných kompartmentech. Význam při úniku před imunitním systémem hostitele může mít i tvorba alternativních životních forem borelií (cysty, granula). [1]

5.6 Laboratorní diagnostika lymfské boreliózy

Laboratorní diagnostika lymfské boreliózy není jednoduchá, protože existuje více druhů borelií a v rámci jednoho druhu navíc několik sérotypů. Borelie se liší genotypem, ale i fenotypem, z čehož vyplývá rozdílná antigenní struktura. Ta má za následek rozdílnou imunologickou odpověď. [1]

Rozlišujeme dva základní typy laboratorních metod pro diagnostiku lymfské boreliózy – metody přímé, dokazující borelie přímo, a metody nepřímé, které jsou založeny na průkazu imunitní odpovědi organismu na přítomnost borelií. [15]

5.6.1 Metody přímé

5.6.1.1 Kultivace

Pro diagnostiku lymfské boreliózy v klinické praxi se kultivace borelií běžně nepoužívá. [16] Tento metodický přístup průkazu borelií je vcelku obtížný a vyžaduje použití vysoce obohacených kultivačních půd s přidavkem zvířecích sér (koňské, králičí). [1] Mezi tyto kultivační půdy patří například Kellyho médium, které bylo dále modifikováno Barbour-Stoenerem. [17] Toto kultivační médium má zkratku BSK (Barbour-Stoener-Kelly) a v současnosti existují jeho další modifikace (BSK II, BSK H). Mezi základní složky BSK II patří CMRL-1066, což je chemicky definované médium vyvinuté v Connaught Medical Research Laboratories a používané pro kultivaci různých typů savčích buněk, dále bovinní sérový albumin sloužící jako zdroj bílkovin a stabilizaci pH, N-acetylglukosamin, králičí sérum, citrát, pyruvát a další. [10]

Kultivace se provádí při teplotách 30 – 34°C za mikroaerofilních podmínek po dobu až 12 týdnů. [10] Na začátku (1 – 14 dní) se provádí kultivace statická, při které dochází k logaritmickému růstu a postupně se mění prostředí. Po 14 dnech se provádí kultivace kontinuální, kdy se použije nové kultivační médium každé 4 dny. Růst borelií je ovlivněn i pH (7,5), slunečním světlem, osmotickým tlakem a oxidačně-redukčním potenciálem (0,1 – 0,2). [1] Narostlé kultury se zkoumají pomocí mikroskopie nebo se provádí průkaz boreliové DNA pomocí PCR (polymerázové řetězové reakce, polymerase chain reaction).

Kultivaci lze provádět z různých vzorků – biopsií z EM či ACA, mozkomíšního moku, krve, synoviální tekutiny, srdeční tkáně, duhovky. [10] Záchyt borelií kultivací závisí na typu vzorku, době kultivace a rapidně klesá po léčbě. [17] V citrátové krvi uchované v lednici přežijí borelie až 9 dní, v mozkomíšním moku 8 dní. [1] Dle evropských studií se citlivost kultivace pohybuje mezi 40 – 90 % u biopsických vzorků z EM a mezi 20 – 60 % u vzorků z ACA. Z mozkomíšního moku byly borelie izolovány v 10 – 26% případů a velmi vzácně ze synoviální tekutiny. Záchyt borelií v krvi je také vzácný. [8] Výtěžnost lze zvýšit větším množstvím materiálu (až 9 ml plazmy), což však není vhodné u malých dětí. [10]

Jelikož má kultivace borelií relativně nízkou citlivost a inkubační doba je dlouhá, využívá se zejména pro výzkumné účely. [16]

5.6.1.2 Mikroskopie

Detekce borelií v klinickém materiálu pomocí mikroskopie má omezené použití z důvodu nerovnoměrného rozložení borelií ve vzorku. [10] Důležité jsou také zkušenosti personálu, který mikroskopii provádí. [18] Navíc ne všechny vzorky mikroskopicky hodnocené jako pozitivní byly potvrzeny PCR metodou. [8]

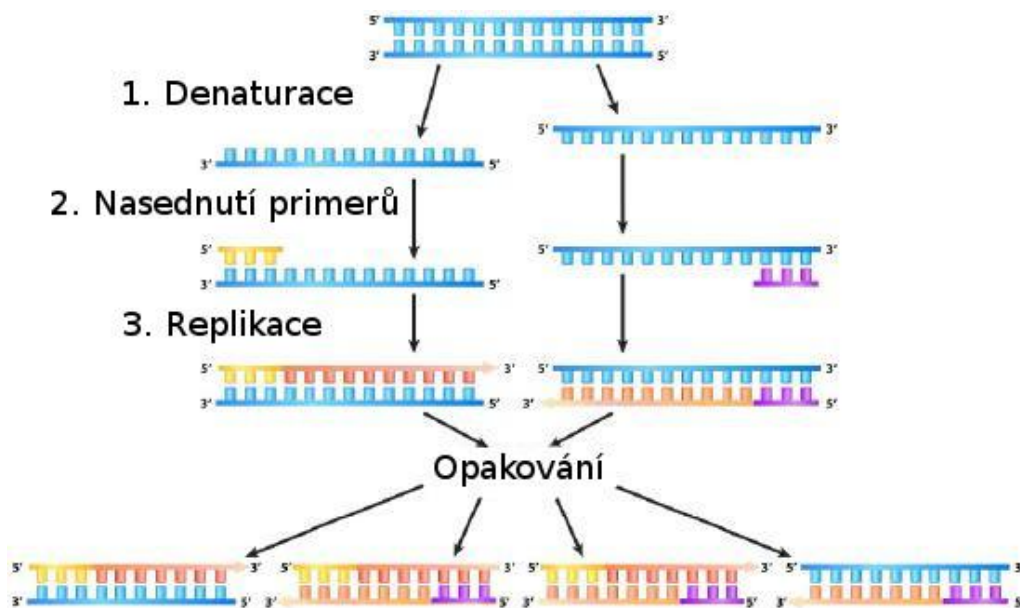
K průkazu pohyblivých borelií v klišťeti se využívá světelná mikroskopie v zástínu. Pokud chceme provést mikroskopické vyšetření krve, doporučují pánové Larsson a Bergstrom dvoufázovou centrifugaci – 5 minut při 500 g, plazmu přenést do nové zkumavky a poté centrifugovat 10 minut při 5000 g. Pro fluorescenční mikroskopii se využívá sediment, který se nanese na podložní sklo a obarví se fluorescenčně značenými protilátkami či akridinovou oranží. [1,17] Z takto připraveného sedimentu se může provést i kultivace či PCR reakce. [1]

Bioptické vzorky se zalívají do parafinu či pryskyřice a histologické řezy se barví Giemsou, toluidinovou modří či dusičnanem stříbrným po natrávení amylázou. Takto připravené vzorky se mikroskopují pomocí světelného mikroskopu. [1,17]

Pomocí elektronového mikroskopu je možné pozorovat velikost borelií, množství bičíků, případně cystické formy. Je možné využít i imunosorbentní elektronové mikroskopie, která je založena na reakci antigenu se specifickou protilátkou, která je vázána na mikroskopické síťce. [3] Následuje konjugace antigenu s monoklonální protilátkou značenou například koloidním zlatem. Takto může být prokázána infekce u séronegativních pacientů. [1]

5.6.1.3 Polymerázová řetězová reakce, PCR

Pro přímý průkaz borelií je metoda PCR v současnosti využívána nejvíce. [18] Reakce probíhá v termocykleru, ve kterém dochází během cyklu ke změnám teploty. Během několika desítek cyklů dojde ke zmnožení cílové sekvence DNA. Jeden cyklus se skládá z denaturace řetězce, vazby uměle připravených nukleotidů (primerů) na známé okrajové sekvence a syntézy nového komplementárního vlákna z přítomných volných nukleotidů pomocí DNA polymerázy. [3]

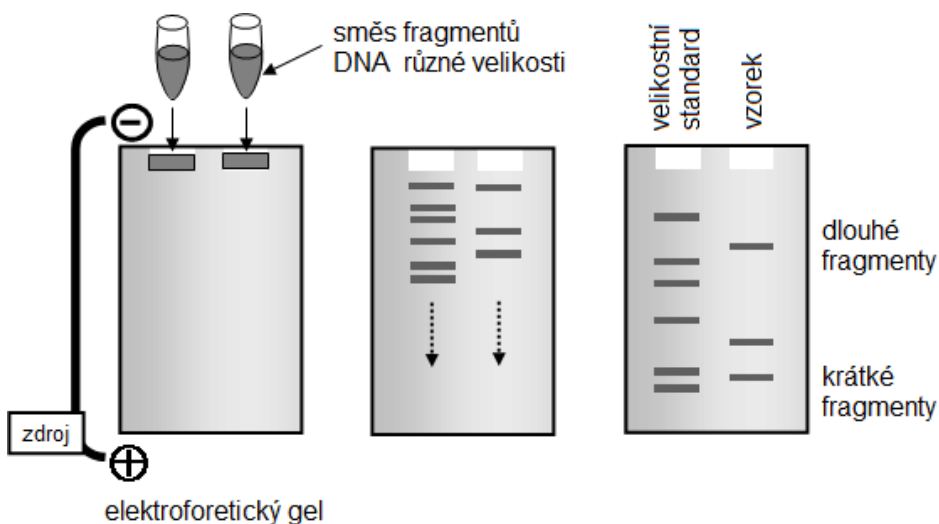


Obrázek 7: Průběh PCR

Převzato a upraveno z:

[https://bio.libretexts.org/TextMaps/Biochemistry/Book%3A_Biochemistry_Free_For_All_\(Aher%2C_Rajaopal%2C_and_Tan\)/8%3A_Basic_Techniques/8.07%3A_Polymerase_chain_reaction_\(PCR\)](https://bio.libretexts.org/TextMaps/Biochemistry/Book%3A_Biochemistry_Free_For_All_(Aher%2C_Rajaopal%2C_and_Tan)/8%3A_Basic_Techniques/8.07%3A_Polymerase_chain_reaction_(PCR))

Kvalitativně lze vzniklé řetězce prokázat gelovou elektroforézou, hybridizací či sekvenací. [1] Dnes se spíše využívá PCR v reálném čase (real time PCR), která umožňuje kvantitativní analýzu. [3]



Obrázek 8: Vyhodnocení PCR pomocí gelové elektroforézy

Převzato z: https://cit.vfu.cz/opvk2011/?title=popis_metod_gelova_elektroforeza&lang=cz

Výhodou PCR je její rychlost. Nevýhodami jsou náchylnost ke kontaminacím, náročnost na transport a uchování vzorků [17], nestandardnost z hlediska různorodosti primerů a relativně vysoká cena. [3]

Důležitý pro analýzu borelií metodou PCR je výběr vzorku, který záleží na klinických projevech onemocnění a stádiu nemoci. Při EM a ACA se může provést biopsie kůže, při podezření na LNB je vhodné odebrat mozkomíšni mok a při lymské artritidě zaslat vzorek synoviální tekutiny. Neméně důležité je i množství vzorku – doporučuje se 2 – 3 mm³ velký bioptický vzorek a minimálně 1 ml mozkomíšního moku či synoviální tekutiny. [8]

Co se týče transportu a uchování materiálu, doporučuje se vzorek zaslat do laboratoře co nejrychleji, nejlépe do 2 hodin při teplotě 4 – 8°C. Největší záchyt borelií metodou PCR je ze vzorků čerstvých, případně rychle zmrazených. [8]

Z mnoha studií vyplývá, že citlivost molekulárně diagnostických metod pro lymskou boreliózu koreluje s detekčními limity pro kultivaci. [8] PCR je výhodné využít pro průkaz množících se borelií v kultivačních médiích. [17]

Citlivost PCR u biopsií z EM se pohybuje kolem 68 % [8], ale pro praxi je nevýznamná, protože EM je jasným projevem lymské boreliózy. [17] U vzorků biopsie z ACA je PCR pozitivní na borelie průměrně v 75 % případů. [8] Přínosné se zdá být vyšetření synoviální tekutiny při podezření na lymskou artritidu [17], u které se citlivost pohybuje okolo 77,5%. Pro vzorky mozkomíšního moku je citlivost nižší – ze studií vyplývá kolem 22,5%. Nejnižší záchyt je ve vzorcích krve (asi 18 %) vzhledem k nízkému množství a krátké době výskytu borelií v tomto materiálu. [8,17]

Jako cílové sekvence pro molekulární diagnostiku lymské boreliózy se dají použít chromozomální geny – rRNA geny (16S, 23S, spacer 5S rRNA-23S rRNA), flagelin (*fla*), *recA*, *p66*, případně plazmidové geny – *OspA*, *OspB*, *OspC*. [8,17]

Citlivost PCR reakce je závislá na množství a čistotě DNA, charakteru primerů, délce stanovovaného úseku a optimalizaci podmínek. Vzhledem k různorodosti primerů, postupech v jednotlivých laboratořích, rozdílné citlivosti amplifikace z chromozomální a plazmidové DNA nebyla metoda zatím standardizována. [1]

5.6.2 Metody nepřímé

5.6.2.1 Nepřímá imunofluorescence

Metoda nepřímé imunofluorescence (IFA, indirect immunofluorescence assay) se pro stanovení protilátek proti boreliím využívala jako první. [3] Na sklíčko potažené bakterií *Borelia burgdorferi* s.l., která slouží jako antigen, se nanese naředěný vzorek séra a pokud se ve vzorku nacházejí příslušné protilátky, dojde k jejich navázání. V dalším kroku se na sklíčko nanese konjugát obsahující protilátky proti lidským protilátkám značené fluorescenčním barvivem. Hodnocení se provádí na fluorescenčním mikroskopu. [10]

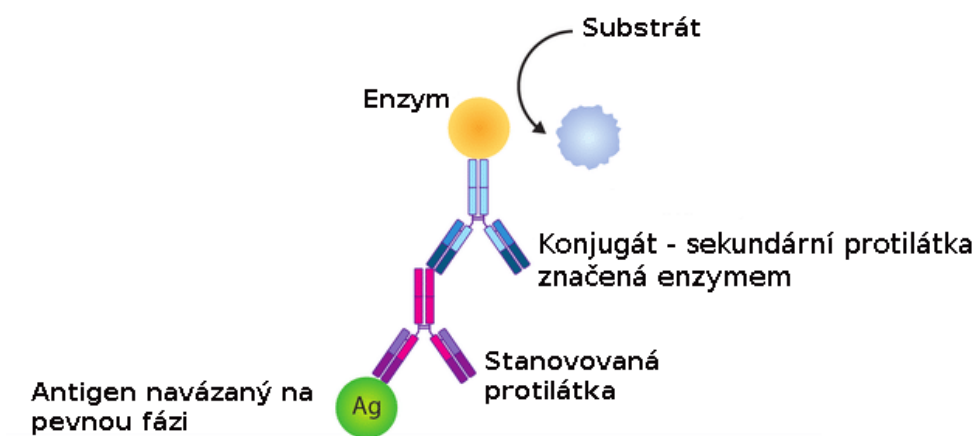
V současnosti se imunofluorescence moc nepoužívá, jelikož je poměrně pracná, nedá se automatizovat, nehodí se pro zpracování většího množství vzorků a pro její hodnocení je třeba zkušený personál. [10,19]

5.6.2.2 Enzymová imunoanalýza

Enzymová imunoanalýza (EIA, enzyme immunoassay) je založena na reakci, ve které je jedna ze složek označena enzymem, který v dalším kroku rozloží substrát za vzniku barevného produktu. [19]

5.6.2.2.1 Enzymově značený imunotest s využitím pevné fáze

ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay, Enzymově značený imunotest s využitím pevné fáze) je typ enzymové imunoanalýzy, kdy je jedna ze složek (v případě stanovení protilátek se jedná o antigen) vázána na pevnou fázi (např. povrch jamek mikrotitrační destičky). [19] Princip ELISA je naznačen na obrázku 9.



Obrázek 9: Princip testu ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)

Převzato a upraveno z: https://www.researchgate.net/figure/ELISA-assays-Direct-ELISA-mostly-used-for-antigen-detection-Indirect-ELISA-mainly-used_fig3_320265684

ELISA se pro stanovení protilátek proti boreliím využívá nejvíce. Vyšetření je možné provést z krve, mozkomíšního moku či synoviální tekutiny a většinou se vyšetřují protilátky typu IgM a IgG. [3]

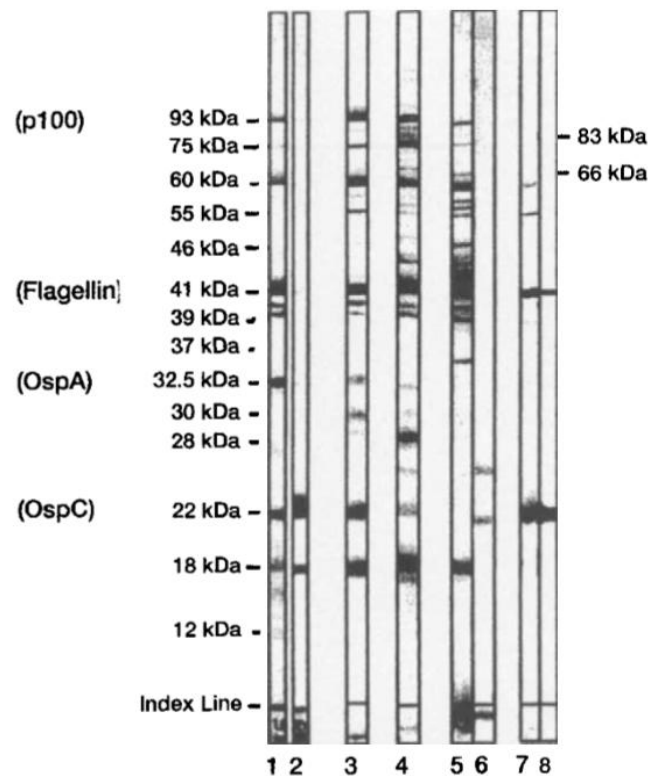
Problémem u laboratorní diagnostiky lymfské boreliózy je, že existuje více druhů a i heterogenních sérotypů *Borelia burgdorferi* s.l. Mnoho studií se proto zabývá tím, které antigeny jsou pro ELISA testy nejvhodnější. Cílem je zachytit co nejvíce pozitivních vzorků a vyvarovat se zkřížených reakcí, které vedou k falešně pozitivním výsledkům. V testech se využívají různé typy antigenů. Některé jsou vhodnější pro diagnostiku časných fází, jiné pro pozdější fázi onemocnění. Různé typy antigenů vykazují různou specifitu.

Většina diagnostických souprav první generace využívajících směsné celobuněčné antigeny reaguje i proti antigenu bíčků o molekulové hmotnosti 41 kDa a antigenům teplotního šoku. To může vést ke zkřížené reaktivitě s bakterií *Treponema pallidum*, jinými spirochétami či některými viry (např. s virem Epstein-Barrové). U druhé generace testů využívajících purifikované antigeny je specifita lepší. [1,20]

Nyní jsou k dispozici testy třetí generace využívající synteticky připravené rekombinantní antigeny. Mezi ně patří například rekombinantní vnitřní fragmenty flagelinu p41-G, dále protein flagelární pochvy FlaA, BBK32, P39, P35, vnější povrchové proteiny OspA, OspB, OspC, OspE, OspF, VlsE či DbpA. Všeobecně platí, že diagnostické soupravy využívající OspC, jsou citlivější při časném stádiu LB. Stejně tak testy využívající rekombinantní VlsE mají citlivost srovnatelnou s OspC při časně infekci, ale mají vyšší citlivost u pacientů s LNB či pozdní fází LB. Testy obsahující rekombinantní DbpA zachytí většinou IgG protilátky a mají vyšší citlivost u pacientů s LNB či pozdní LB. Rekombinantní BBK32 vykazuje vysokou citlivost v jakémkoli stádiu infekce, ale váže především IgG. [10,20]

5.6.2.3 Western blot

Pomocí Western blotu (WB) neboli imunoblotu můžeme rozlišit protilátky proti jednotlivým antigenům. Tato metoda se využívá zejména ke confirmaci výsledků získaných pomocí ELISA nebo jiných screeningových testů. [18]



Vysvětlivky: 1 – pozitivní kontrola IgG, 2 – pozitivní kontrola IgM, 3 – pacient s artritidou IgG, 4 - pacient s ACA IgG, 5 – pacient s LNB IgG, 6 – pacient s LNB IgM, 7 – pacient s EM IgG, 8 – pacient s EM IgM. Linie s proteiny o molekulové hmotnosti 93; 83; 75; 66; 60; 55; 46; 41; 39; 37; 32,5; 30; 28; 22 a 18 kDa jsou detekovány u pozitivní kontroly IgG. Linie s proteiny o molekulové hmotnosti 93; 60; 41; 37; 32,5 a 22-23 kDa jsou detekovány u pozitivní kontroly IgM.

Obrázek 10: Typický imunoblotový profil pro pozitivní kontrolu a séra pacientů se specifickými příznaky lymské boreliózy.

Převzato z: [21]

Stripy pro WB se připravují tak, že se antigenní preparát zahřívá s detergentem (např. dodecylsulfátem sodným), který rozštěpí mikrobiální protein na jednotlivé polypeptidy. Poté se tyto polypeptidy pomocí elektroforézy na polyakrylamidovém gelu rozdělí dle molekulové hmotnosti na jednotlivé frakce. Z gelu se elektroforeticky přenesou polypeptidové pruhy na nitrocelulózovou membránu, která se nastříhá na jednotlivé stripy. [19]

Reakce se vzorkem probíhá ve vaničce. Pokud se ve vzorku nachází stanovené protilátky, navážou se na příslušné antigeny. Po promytí se aplikuje protilátka proti lidské protilátce značená enzymem, který rozštěpí substrát za vzniku barevného proužku. [19]

Díky WB je možné určit, které antigeny vyvolávají v různých stádiích lymfatické boreliózy tvorbu protilátek. V počáteční fázi jsou protilátky třídy IgM směřovány proti OspC a bičkovým antigenům. Vzhledem k různým druhům borelií a jejich heterogenitě je výsledek WB silně ovlivněn výběrem antigenů. Rozdílné výsledky mohou být způsobeny i přípravou antigenů. [10]

Klasický WB používá jako zdroj antigenu bílkoviny získané lýzou celých buněk pomocí ultrazvuku. Použití celobuněčných antigenů má několik nevýhod. Jednak existují značné rozdíly v expresi antigenů mezi jednotlivými druhy borelií. Dále jsou méně specifické a může docházet ke zkříženým reakcím. Problémem může být například i to, že imunodominantní antigen VlsE je tvořen buňkami *in vivo*, ale intenzita exprese u kultivovaných borelií je nízká. Imunobloty využívající rekombinantní antigeny jsou specifičtější a využívají se dnes častěji. Je možné připravit směsi rekombinantních antigenů různých druhů borelií. [8,17]

5.6.3 Laboratorní diagnostika neuroboreliózy

Diagnostika LNB je podle současných evropských směrnic založena na klinických projevech a analýze mozkomíšního moku. Rychlá a spolehlivá diagnostika LNB je pro pacienta zásadní, protože pozdější nasazení antibiotické léčby je spojeno s pomalejším zotavením a příznaky mohou přetrvávat delší dobu. [20]

Mozkomíšní mok se získává lumbální punkcí z páteřního kanálu mezi 4. a 5. bederním obratlem či mezi 5. bederním a 1. křížovým obratlem. Pacient při odběru leží na boku s pokrčenýma nohama nebo sedí v předklonu. Speciální injekční jehla se zavede do páteřního kanálu a mozkomíšní mok se nechá odkapávat do sterilní zkumavky (viz obrázek 11). Po odběru by měl pacient zůstat v klidu ležet.



Obrázek 11: Lumbální punkce

Převzato z:

[https://www.wikiskripta.eu/w/Lumb%C3%A1ln%C3%AD_punkce#/media/File:Wikipedian_getting_a_lumbar_puncture_\(2006\).jpg](https://www.wikiskripta.eu/w/Lumb%C3%A1ln%C3%AD_punkce#/media/File:Wikipedian_getting_a_lumbar_puncture_(2006).jpg)

Při podezření na LNB zahrnuje analýza mozkomíšního moku cytologické a biochemické vyšetření, ale především stanovení protilátek třídy IgM a IgG proti boreliím a výpočet jejich intratekální syntézy. [3]

Při LNB je možné v mozkomíšním moku prokázat pleocytózu (zvýšený počet celulárních elementů) monocytární či lymfocytární a zvýšenou bílkovinu, což lze většinou prokázat Pandeho testem. Dále lze v mozkomíšním moku prokázat intratekálně produkované specifické protilátky proti boreliím či borelie přímo pomocí kultivace nebo PCR. [1,3]

Problémem může být diagnostika velmi časného stádia, kdy ještě nejsou detekovatelné protilátky. Navíc specifické protilátky proti boreliím mohou přetrvávat dlouho dobu po léčbě, což komplikuje odlišení akutní reinfekce od stavu po prodělané infekci. [4,5] Je proto snaha najít další markery založené na imunitní odpovědi organismu, které by pomohly diagnostikovat akutní LNB.

Pokud se borelie dostanou do centrálního nervového systému, jsou rozpoznávány monocyty, makrofágy, dendritickými buňkami, pericyty či astrocyty. Ty začnou produkovat řadu cytokinů a chemokinů, které přitahují další buňky imunitního systému. V mozkomíšním moku pacientů s LNB je možné stanovit vysokou koncentraci IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, IL-18, IFN- γ , TNF α a chemokinů CXCL8, CXCL10, CXCL12 a CXCL13. [4,22]

Cerar a kol. testovali řadu cytokinů a chemokinů (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, CXCL13, INF γ , a TNF α) v mozkomíšním moku a séru u pacientů rozdělených do pěti skupin (s prokázanou LNB, s podezřením na LNB, s klíšťovou encefalitou, jinými neurologickými nemocemi a kontrolní skupinou u séra byli dárči krve). Bylo zjištěno, že se koncentrace některých markerů v séru a mozkomíšním moku liší mezi jednotlivými skupinami, ale rozdílnost je nízká. Pouze CXCL13 se významně liší mezi pacienty s prokázanou LNB a pacienty s podezřením na LNB (bez pleocytózy). Bylo prokázáno, že koncentrace CXCL13 v krevním séru není vhodný diagnostický marker pro LNB. Studie však naznačuje, že koncentrace CXCL13 v mozkomíšním moku nemusí mít až tak velký význam pro potvrzení diagnózy LNB. [4]

Z většiny studií však vyplývá, že chemokin CXCL13 je vhodný marker pro diagnostiku LNB, jak je uvedeno níže.

Moniuszko a kol. se zaměřili na stanovení koncentrace chemokinů (CXCL8, CXCL10, CXCL11, CXCL12 a CXCL13) v mozkomíšním moku a séru u pacientů s LNB před léčbou a po léčbě antibiotiky. Kontrolní skupinu pro sérum tvořili zdraví dárči krve a kontrolní skupinu pro mozkomíšní mok tvořili pacienti s předpokládanou meningitidou/encefalitidou. Bylo zjištěno, že se tyto chemokiny při LNB účastní zánětlivého procesu a že se jejich role liší v mozkomíšním moku a v séru. Lze je využít k monitorování léčby. Jako dobrý marker pro diagnostiku LNB se zdá být CXCL13. [22]

Pietikainen a kol. studovali koncentraci 49 různých cytokinů ve vzorcích mozkomíšního moku od pacientů s LNB, klíšťovou encefalitou, roztroušenou sklerózou a kontrolní skupiny, u které byly specifické protilátky proti boreliím negativní. Studie byla zaměřena i na koncentraci cytokinů v mozkomíšním moku po antibiotické léčbě LNB. Bylo stanoveno 9 cytokinů, které se u uvedených skupin lišily nejvíce, ale pouze IL-10 a CXCL13 byly nejvyšší u pacientů s LNB. Většina ostatních z 9 cytokinů byla nejvyšší u pacientů s klíšťovou encefalitou. Ze studie vyplynulo, že chemokin CXCL13 patří mezi nejlepší markery pro diagnostiku LNB. Pro hodnocení léčby se nejvíce osvědčily CXCL13 a IL-1ra, což je antagonist IL-1, který se váže na receptor pro IL-1. [5]

5.6.3.1 Chemokin CXCL13

Chemokin CXCL13 je produkován stromálními buňkami sekundárních lymfatických orgánů a slouží jako chemoatraktant pro B lymfocyty. Výsledkem působení CXCL13 v mozkomíšním moku je velké množství B lymfocytů a plazmatických buněk. [6,7]

V poslední době se provádí měření koncentrace chemokinů CXCL13 ve vzorcích mozkomíšního moku u pacientů s podezřením na LNB. Koncentrace CXCL13 u pacientů s LNB jsou ve srovnání s pacienty trpícími jinými neurologickými poruchami značně zvýšené. [5] Některé studie říkají, že se zvýšené koncentrace CXCL13 v mozkomíšním moku mohou objevit o několik dní dříve, než specifické protilátky proti boreliím. [4]

Ukazuje se, že se jedná i o dobrý marker, který koreluje s odpovědí organismu na antibiotickou léčbu. Jeho koncentrace se po léčbě rychle snižuje. [8]

Koncentrace CXCL13 mohou být zvýšené i u jiných onemocnění centrálního nervového systému, jako je neurosyfilis, tuberkulózní meningitida, encefalopatie způsobená virem lidské imunodeficiency, jiné virové onemocnění, roztroušená skleróza či lymfom centrálního nervového systému. [8,15]

5.6.3.2 Výpočet intratekální syntézy protilátek

Jelikož průkaz samotných protilátek v mozkomíšním moku nevyovídá zcela o zánětu centrálního nervového systému, provádí se výpočet intratekální syntézy protilátek. Protilátky mohou při poruše hematolikorové bariéry do mozkomíšního moku přestoupit ze séra nebo jsou tvořeny intratekálně. Pomocí výpočtu intratekální syntézy protilátek lze určit původ protilátek. [23]

Pro stanovení je třeba vyšetřit protilátky a albumin v mozkomíšním moku i séru. Albumin se tvoří v játrech, ale intratekálně produkován není. Při poškození hematolikorové bariéry se může albumin dostávat do mozkomíšního moku a to snadněji než protilátky. Míru permeability hematolikorové bariéry určuje albuminový kvocient (Q_{Alb}), který je závislý na věku. [23]

Rovnice 1: Albuminový kvocient se vypočítá ze vztahu:

$$Q_{Alb} = \frac{Alb_{CSF}}{Alb_{s\acute{e}rum}}$$

Q_{Alb} – albuminový kvocient

Alb_{CSF} – koncentrace albuminu v mozkomíšním moku

$Alb_{s\acute{e}rum}$ – koncentrace albuminu v séru

Pokud srovnáme kvocient albuminu a kvocient imunoglobulinů, lze z Reiberova diagramu zjistit původ protilátek.

Rovnice 2: Výpočet kvocientu imunoglobulinů

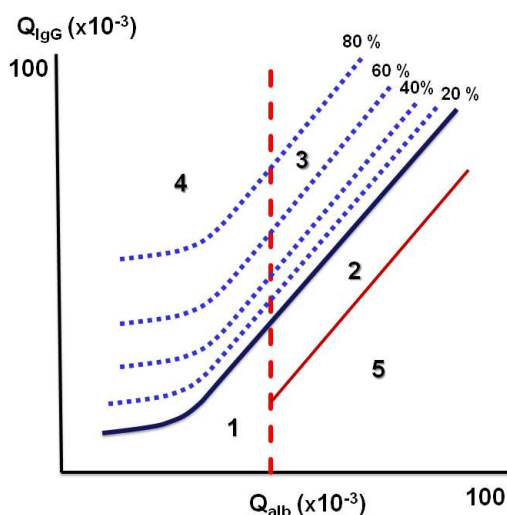
$$Q_{Ig} = \frac{Ig_{CSF}}{Ig_{s\acute{e}rum}}$$

Q_{Ig} – kvocient imunoglobulinů

Ig_{CSF} – koncentrace imunoglobulinů v mozkomíšním moku

$Ig_{s\acute{e}rum}$ – koncentrace imunoglobulinů v séru

Reiberův diagram slouží k hodnocení původu protilátek. Srovnává se kvocient imunoglobulinů s kvocientem albuminu. Hodnoty vypočtených kvocientů jsou zaneseny do Reiberova diagramu. Ten je rozdělen do pěti oblastí. Do oblasti 1 spadají hodnoty s normálním nálezem. Do oblasti 2 spadají pacienti bez intratekální syntézy s izolovanou poruchou hematolikorové bariéry. Porucha hematolikorové bariéry současně s intratekální syntézou spadá do oblasti 3. Do oblasti 4 spadají pacienti bez porušené hematolikorové bariéry s intratekální syntézou protilátek, což ukazuje na zánět centrálního nervového systému. 5. oblast je oblast analytických chyb. Pokud se hodnoty nachází nad plnou modrou křivkou, dochází k intratekální syntéze protilátek a rozsah je vyjádřen v procentech. Červená přerušovaná čára odděluje neporušenou hematolikorovou bariéru (vlevo) od porušené hematolikorové bariéry (vpravo) – viz. obrázek 13. [23,24]



Popis obrázku: **Oblast 1** - hodnoty s normálním nálezem; **oblast 2** - pacienti bez intratekální syntézy s izolovanou poruchou hematolikorové bariéry; **oblast 3** - porucha hematolikorové bariéry současně s intratekální syntézou; **oblast 4** - bez porušené hematolikorové bariéry s intratekální syntézou protilátek; **oblast 5** - oblast analytických chyb. Hodnoty nad plnou modrou křivkou - intratekální syntéza protilátek (rozsah vyjádřen v %). Červená přerušovaná čára odděluje neporušenou hematolikorovou bariéru (vlevo) od porušené hematolikorové bariéry (vpravo).

Obrázek 12: Reiberův diagram

Převzato z: [24]

6. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

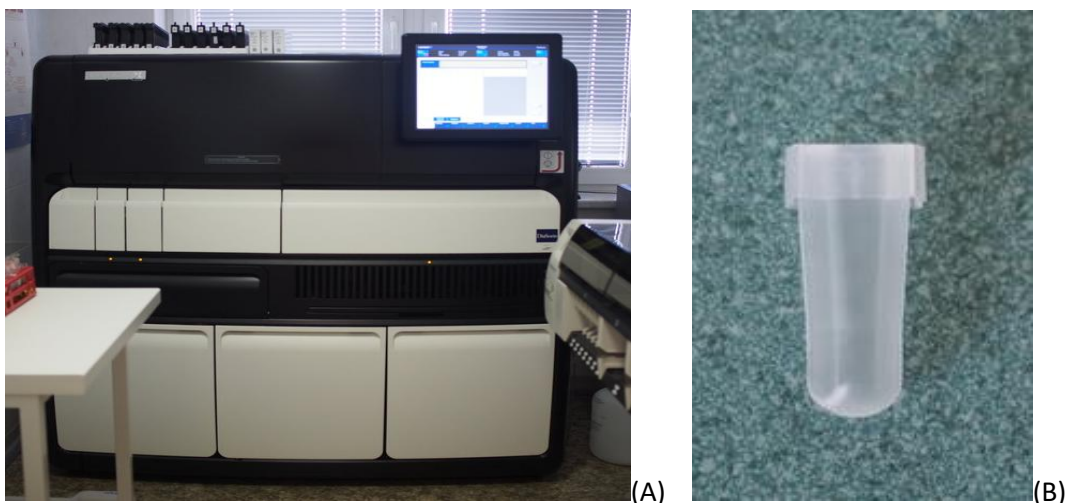
Součástí experimentální části bylo stanovení koncentrace chemokinu CXCL13 ve vzorcích mozkomíšního moku vyšetřených na Oddělení Lékařské mikrobiologie v Krajské nemocnici T. Bati a.s. ve Zlíně (OLM KNTB a.s. Zlín). Vzorky mozkomíšních moků byly dále podrobeny analýze specifických protilátek proti boreliím dvěma metodami. Screeningové vyšetření protilátek proti boreliím třídy IgM a IgG bylo provedeno metodou chemiluminiscenční imunoanalýzy na analyzátoru LIAISON XL s následnou konfirmací metodou WB. U některých vzorků mozkomíšního moku byla provedena i detekce boreliové DNA metodou PCR. Cílem bylo porovnat výsledky těchto vyšetření a zhodnotit jejich význam při diagnostice LNB.

6.1 Použité metody

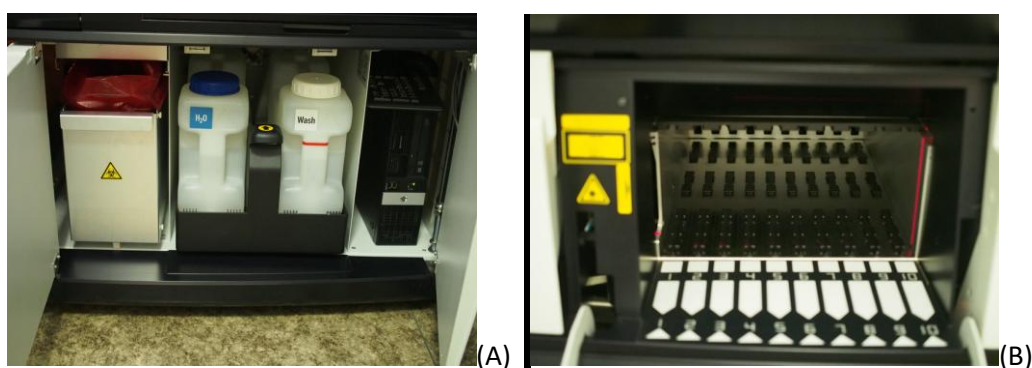
6.1.1 Stanovení protilátek metodou CLIA na analyzátoru LIAISON XL

6.1.1.1 Princip

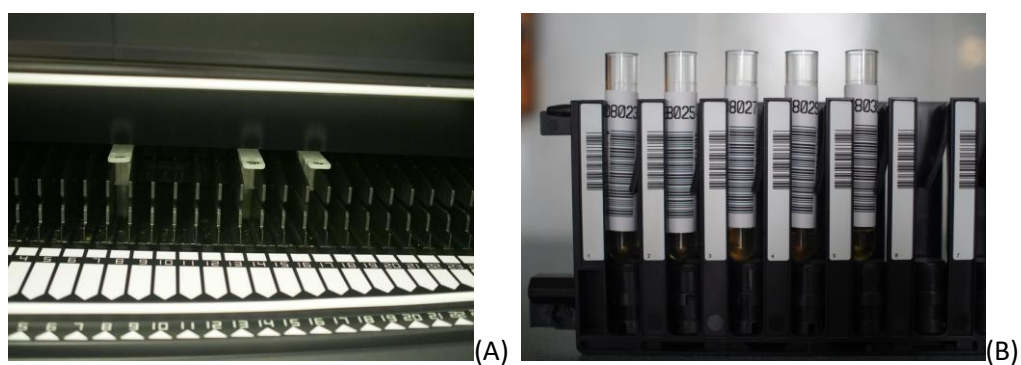
Analyzátor LIAISON XL (DiaSorin S.p.A., Itálie) - viz. Obrázky 13, 14, 15 je založen na principu chemiluminiscenční imunoanalýzy (CLIA, ChemiLumminiscence ImmunoAssay), při níž je excitace fotonů vyvolána chemickou reakcí. Zkumavka se vzorkem označená čárovým kódem (viz Obrázek 15B) se vloží do přístroje. Automatická jehla nadávkuje vzorek do kyvety (viz Obrázek 13B), přidá k němu magnetické částice potažené záchytovými molekulami a roztok k ředění vzorků. Následuje první inkubace, při které se navážou přítomné protilátky na magnetické částice. Nenavázaný materiál se odstraní promytím. Do reakční nádoby se přidá konjugát obsahující myší monoklonální protilátky značené derivátem isoluminolu. Při druhé inkubaci reaguje konjugát s protilátkami již navázanými na magnetické částice. Nenavázaný materiál se opět odstraní promýváním. V závěru dojde po přidání startérů k prudké chemiluminiscenční reakci. V měřicí komoře se měří fotonásobičem světelný signál v relativních světelných jednotkách (RLU, relative light unit), jehož velikost je přímo úměrná množství prokazovaných protilátek. [25]



Obrázek 13: A - Analyzátor LIAISON XL, B – reakční nádobka
Fotografie pořízeny autorkou práce na OLM KNTB a.s. Zlín



Obrázek 14: A – prostor pro zásobníky s destilovanou vodou, promývacím roztokem a nádobou na pevný odpad; B – prostor pro vzorky
Fotografie pořízeny autorkou práce na OLM KNTB a.s. Zlín



Obrázek 15: A – chlazený prostor pro reagenční integrály, B - stojánek se vzorky
Fotografie pořízeny autorkou práce na OLM KNTB a.s. Zlín

Aby byla zajištěna kompenzace mezi různými analyzátoři, okolními podmínkami a dávkami reagensie, je nutné provádět kalibraci. Redukce dat se provádí pomocí hlavní křivky uložené v analyzátoru po přečtení čárového kódu na štítku reagenčního integrálu s 2-bodovou rekalibrací. Měřicí signály kalibrátorů umožní posunout všechny body hlavní křivky na pracovní

křivku, odpovídající skutečným hodnotám při měření. Po každé kalibraci je nutné provést kontrolu. [25]

6.1.1.2 Použité soupravy

Námi použité testy jsou principiálně založeny na CLIA a slouží pro kvantitativní stanovení specifických protilátek třídy IgM či IgG proti *Borrelia burgdorferi* sensu lato ve vzorcích lidského séra, plazmy nebo mozkomíšního moku.

LIAISON® Borrelia IgM Quant (REF: 310020, DiaSorin S.p.A., Itálie)

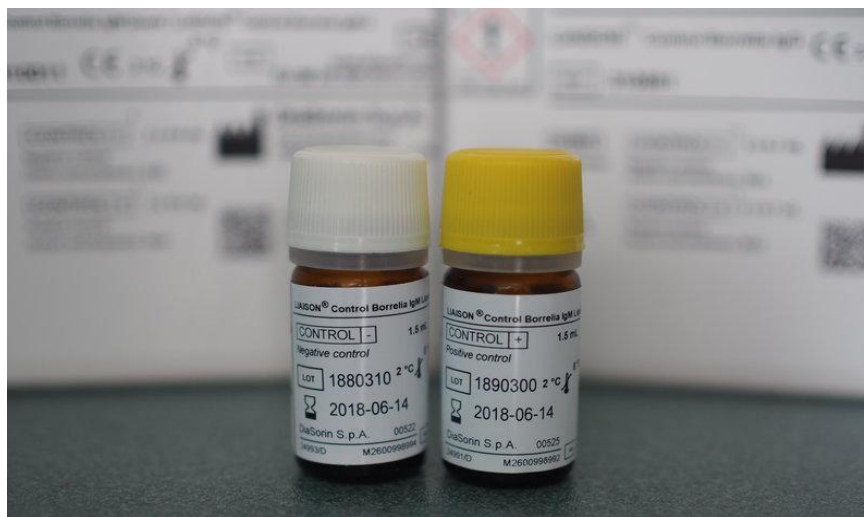
Reagenční integrál obsahuje [25]:

- 1) Magnetické částice potažené rekombinantními antigeny OspC a VlsE *Borrelia burgdorferi*.
- 2) Kalibrátor 1 a kalibrátor 2 obsahující lidské sérum/plazmu s nízkými resp. vysokými hladinami protilátek třídy IgM.
- 3) Roztok k ředění vzorků.
- 4) Konjugát obsahující myší monoklonální protilátky proti lidskému IgM konjugované s derivátem isoluminolu.



Obrázek 16: Reagenční integrál pro stanovení protilátek třídy IgM
Fotografie pořízena autorkou práce na OLM KNTB a.s. Zlín

Pokud se pomocí soupravy LIAISON® Borrelia IgM Quant vyšetřují mozkomíšní moky, je nutné po každé kalibraci provést kontrolu pomocí kontrol LIAISON® Control Borrelia IgM Liquor (REF: 310012, DiaSorin S.p.A., Itálie).



Obrázek 17: Lahvičky s kontrolami (DiaSorin S.p.A., Itálie)
Fotografie pořízena autorkou práce na OLM KNTB a.s. Zlín

LIAISON® Borrelia IgG (REF: 310880, DiaSorin S.p.A., Itálie)

Reagenční integrál obsahuje [25]:

- 1) Magnetické částice potažené rekombinantním antigenem VlsE *Borrelia burgdorferi*.
- 2) Kalibrátor 1 a kalibrátor 2 obsahující lidské sérum/plazmu s nízkými resp. vysokými hladinami protilátek třídy IgG.
- 3) Roztok k ředění vzorků.
- 4) Konjugát obsahující myší monoklonální protilátky proti lidskému IgG konjugované s derivátem isoluminolu.



Obrázek 18: Reagenční integrál pro stanovení protilátek třídy IgG
Fotografie pořízena autorkou práce na OLM KNTB a.s. Zlín

Pokud se pomocí soupravy LIAISON® Borrelia IgG (310880) vyšetřují mozkomíšni moky, je nutné po každé kalibraci provést kontrolu pomocí kontrol LIAISON® Borrelia IgG Liquor Controls (REF: 310882, DiaSorin S.p.A., Itálie).

6.1.1.3 Interpretace výsledků ve vzorcích mozkomíšního moku

Koncentrace protilátek vypočtená analyzátozem je uvedena v arbitrálních jednotkách (AU/ml).

Tabulka 1: Interpretace výsledků z analyzátoru LIAISON XL pro protilátky proti *Borrelia burgdorferi sensu lato* [25]

Interpretace	Protilátky IgM	Protilátky IgG
negativní	méně než 2,5 AU/ml	méně než 4,5 AU/ml
hraniční	2,5 – 3,5 AU/ml	4,5 – 5,5 AU/ml
pozitivní	více než 3,5 AU/ml	více než 5,5 AU/ml
Rozsah měření	0 – 190 AU/ml	0,2 – 240 AU/ml

6.1.2 Stanovení protilátek metodou Western blot

6.1.2.1 Princip

Rekombinantní antigeny jednotlivých *Borrelia species* a *Anaplasma phagocytophila* jsou naneseny na nitrocelulózu membránu upevněnou na plastové podložce. Následně je membrána nařezána na stripy. V testu jsou jednotlivé stripy inkubovány s vyšetřovaným vzorkem, přičemž dochází k vazbě specifických protilátek přítomných ve vzorku na příslušné antigenní linie na stripu. Po promytí jsou stripy dále inkubovány s konjugátem. Vizualizace je provedena inkubací se substrátovým roztokem. Po vybarvení jsou jednotlivé stripy vysušeny a vyhodnoceny pomocí počítačového softwaru. [26]

6.1.2.2 Použité diagnostické soupravy

Blot-line Borrelia/HGA IgM (REF: BML020, Testline Clinical Diagnostics s.r.o., Česká republika)

Blot-line Borrelia/HGA IgG (REF: BGL020, Testline Clinical Diagnostics s.r.o., Česká republika)

Soupravy obsahují [26]:

- 1) Stripy – testovací proužky s nanesenými rekombinantními antigeny.
- 2) Univerzální roztok – pufr pro ředění vzorků a promývání stripů.
- 3) Konjugát – roztok obsahující zvířecí imunoglobulin značený alkalickou fosfatázou.
- 4) Substrát – pufr s BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl Phosphate) a NBT (Nitroblue Tetrazolium) - BCIP se hydrolyzuje alkalickou fosfatázou za vzniku modrého meziproduktu, který dále oxiduje NBT za vzniku dimeru, který má intenzivní fialovou barvu.
- 5) Protokol s vyobrazením vzorového stripu.

Tabulka 2: Stripy v Blot-line *Borrelia*/HGA IgM obsahují tyto specifické antigeny – převzato a upraveno z [26]

Antigen	Popis/poznámky
VlsE Bg	Variable major protein-like sequence, expressed; exprimovaná sekvenec podobná sekvenci variabilního proteinu – významný pro protilátkovou odpověď IgG; druhově specifický antigen
p83 Ba	hlavní extracelulární protein (degradační produkt proteinu p100)
p41 Ba	vnitřní část flagelinu – vysoce specifický marker pro časnou protilátkovou odpověď
p39 Ba	syn. BmpA (basic membrane protein A, glykosaminopeptidový receptor) – znak pro pozdní imunitní odpověď IgG
OspC Ba OspC Bg OspC Bs	Outer surface protein C, vnější povrchový protein C – hlavní imunogen v časně protilátkové odpovědi IgM; druhově specifický antigen
p44	hlavní marker v protilátkové odpovědi u infekčního onemocnění, lidská granulocytární anaplazmóza, vyvolané bakterií <i>Anaplasma phagocytophila</i>

Vysvětlivky: Ba – *Borrelia afzelii*, Bg – *Borrelia garinii*, Bs – *Borrelia burgdorferi* sensu stricto

Tabulka 3: Stripy v Blot-line *Borrelia*/HGA IgG obsahují tyto specifické antigeny – převzato a upraveno z [26]

Antigen	Popis/poznámky
VlsE Ba VlsE Bg VlsE Bs	Variable major protein-like sequence, expressed; exprimovaná sekvenec podobná sekvenci variabilního proteinu – významný pro protilátkovou odpověď IgG; druhově specifický antigen
p83 Ba	hlavní extracelulární protein (degradační produkt proteinu p100)
p58 Bg	syn. OppA 2 (oligopeptide ABC transporter, periplasmic oligopeptide-binding protein), oligopeptidová permeáza 2), membránový transportér, považován za marker diseminovaného stádia lymfské boreliózy
p41 Ba	vnitřní část flagelinu – vysoce specifický marker pro časnou protilátkovou odpověď
p39 Ba	syn. BmpA (basic membrane protein A, glykosaminopeptidový receptor) – znak pro pozdní imunitní odpověď IgG
OspB Bs	Outer surface protein C, vnější povrchový protein B
OspA Ba OspA Bg OspA Bs	Outer surface protein A, vnější povrchový protein A – ve třídě IgG vysoce specifický znak pro infekci boreliemi
OspC Bg	Outer surface protein C, vnější povrchový protein C – hlavní imunogen v časně protilátkové odpovědi; imunodominantní znak odpovědi IgM
p17 Bg	syn. DbpA (Decorin-binding protein A, decorin vázající protein A) – vnější povrchový protein
NapA Bs	Neutrophil activating protein A, neutrofilní aktivační protein A – silný imunogen, jeden z významných faktorů v patogenezi lymfské artritidy
p44	hlavní marker v protilátkové odpovědi u infekčního onemocnění, lidská granulocytární anaplazmóza, vyvolané bakterií <i>Anaplasma phagocytophila</i>
TpN17	imunodominantní membránový protein <i>Treponema pallidum</i> , vysoce specifický antigen pro diagnostiku syfilis

Vysvětlivky: Ba – *Borrelia afzelii*, Bg – *Borrelia garinii*, Bs – *Borrelia burgdorferi* sensu stricto

V použitých diagnostických soupravách se nachází i hlavní marker protilátkové odpovědi lidské granulocytární anaplazmózy (HGA, Human granulocytic anaplasmosis). HGA je onemocnění vyvolané bakterií *Anaplasma phagocytophila*. Přenašečem tohoto infekčního onemocnění je klíště, stejně jako je tomu u boreliózy. Po přisátí klíštěte se bakterie šíří hematogenní a lymfatickou cestou, napadají bílé krvinky a snižují jejich obrannou funkci. Onemocnění může probíhat od asymptomatických forem po závažné formy s komplikacemi respiračními, gastrointestinálními, renálními, neurologickými. [26]

V diagnostické soupravě Blot-line Borrelia/HGA se nachází i vysoce specifický membránový protein TpN17 bakterie *Treponema pallidum*, který slouží k vyloučení zkřížené reaktivity se spirochétou způsobující syfilis. [26]

6.1.2.3 Vzorky a jejich příprava

Soupravy jsou určeny pro vyšetření protilátek ve vzorcích lidského séra, citrátové plazmy, mozkomíšního moku či synoviální tekutiny. Vzorky se ředí univerzálním roztokem podle typu materiálu. Vzorky mozkomíšního moku se ředí v poměru 1:2, což se provede tak, že se smíchá 750 µl mozkomíšního moku a 750 µl univerzálního roztoku. [26]

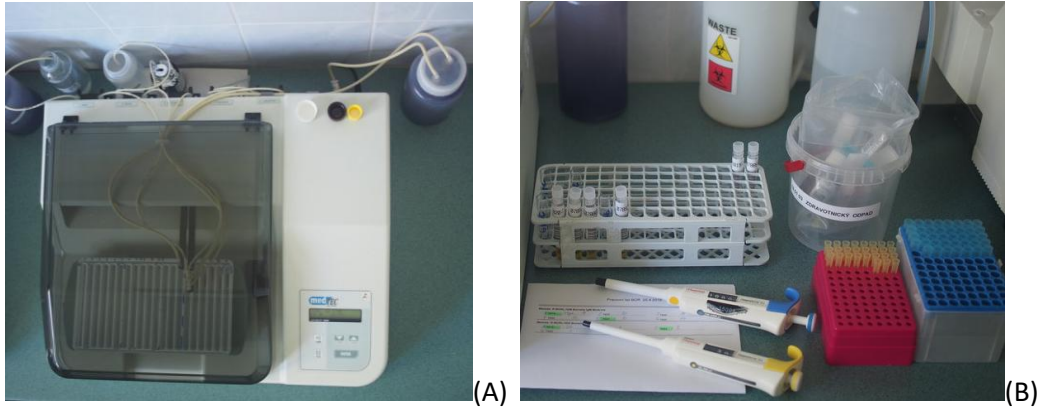
6.1.2.4 Pracovní postup

- 1) Všechny reagentie se vytemperují na laboratorní teplotu (viz Obrázek 19).



Obrázek 19: Soupravy BLOT-LINE Borrelia/HGA IgM a IgG – potřebné reagentie (univerzální roztok, konjugáty, substrát, stripy s rekombinantními antigeny, protokol)
Fotografie pořízena autorkou práce na OLM KNTB a.s. Zlín

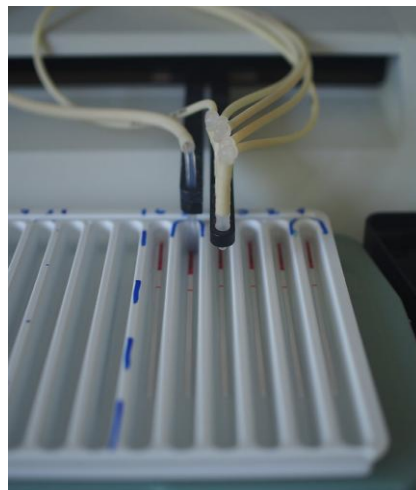
- 2) Připraví se vzorky, které mají být vyšetřeny. Zprovozní se automat AUTOBLOT 3000 (MedTec, USA), který slouží k dávkování a odsávání jednotlivých roztoků a k třepání (viz Obrázek 20).



Obrázek 20: A - AUTOBLOT 3000 – vzadu peristaltická čerpadla pro dávkování reagensí, kývavý pohyb vaničky zajišťuje dokonalé smáčení stripů; B – připravené vzorky, pipety, pipetovací špičky

Fotografie pořízeny autorkou práce na OLM KNTB a.s. Zlín

- 3) Do vaničky se nadávkuje 2,5 ml univerzálního roztoku, pomocí pinzety se k němu přidá strip a nechá se 10 minut smáčet.
- 4) Univerzální roztok se odsaje a nadávkuje se 1500 μ l vzorku mozkomíšního moku naředěného 1:2 (750 μ l mozkomíšního moku a 750 μ l univerzálního roztoku) a inkubuje se na třepačce při laboratorní teplotě 30 minut.
- 5) Následuje promytí univerzálním roztokem 3 krát 1,5 ml 5 minut (viz Obrázek 21).



Obrázek 21: Promývání - odsátí a dávkování univerzálního roztoku
Fotografie pořízena autorkou práce na OLM KNTB a.s. Zlín

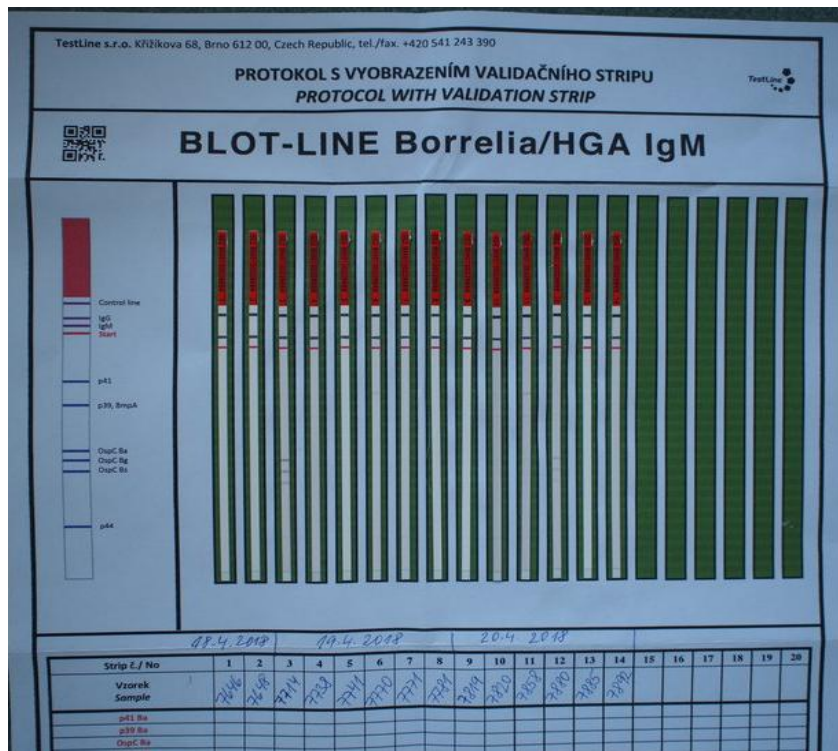
- 6) Poté se dávkuje 1,5 ml konjugátu a inkubuje se 30 minut.
- 7) Následuje opět promytí univerzálním roztokem 3 krát 1,5 ml 5 minut.

- 8) V dalším kroku se ke stripu přidá 1,5 ml substrátu a inkubuje se 15 minut.
- 9) Reakce se ukončí promytím 2 krát 2 ml destilované vody.



Obrázek 22: Stripy ve vaničce po provedení testu
Fotografie pořízena autorkou práce na OLM KNTB a.s. Zlín

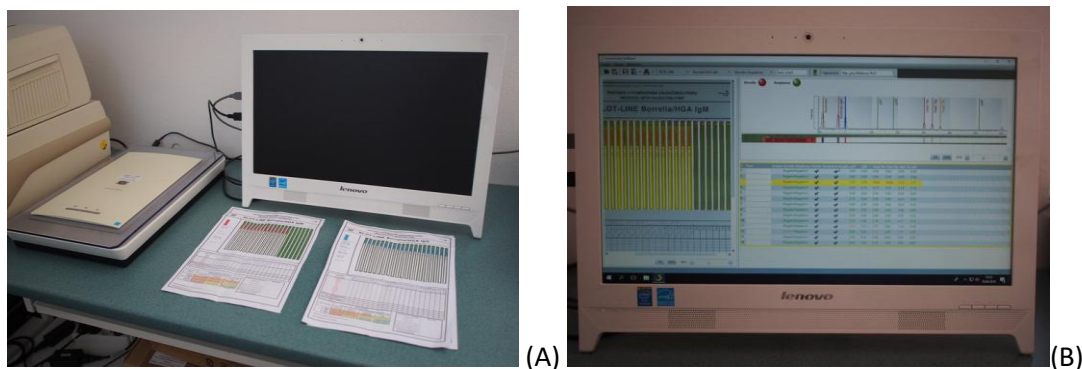
- 10) Stripy se vysuší, nalepí na přiložený protokol (viz Obrázek 23) a provede se vyhodnocení pomocí počítačového programu Immunoblot Software verze 1.6.3 (Testline Clinical Diagnostics s.r.o., Česká republika). [26]



Obrázek 23: Stripy pro vyšetření protilátek třídy IgM nalepené na vyhodnocovacím protokolu
Fotografie pořízena autorkou práce na OLM KNTB a.s. Zlín

6.1.2.5 Vyhodnocení

Na zpracovaném stripu je patrná řada příčných proužků, které odpovídají pozitivní reakci protilátek s jednotlivými specifickými antigeny. Vyhodnocovací protokol se stripu se naskenuje a vyhodnocení se provádí pomocí programu Immunoblot Software, verze 1.6.3 (Testline Clinical Diagnostics s.r.o., Česká republika) - viz Obrázek 24. [26]



Obrázek 24: A – počítač, skener a protokoly před vyhodnocením, B – Immunoblot Software pro vyhodnocení

Fotografie pořízeny autorkou práce na OLM KNTB a.s. Zlín

Test je validní, pokud se na stripu nachází kontrolní linie a linie kontroly konjugátu příslušné třídy.

Celkové hodnocení testů se provádí podle tabulek 4 a 5 kombinací specifických antigenů. U hraničních výsledků je doporučeno test opakovat s odstupem 2 – 6 týdnů. [26]

Tabulka 4: Celkové vyhodnocení testu BLOT-LINE *Borrelia*/HGA IgM – převzato z [26]

Antigeny	VlsE, p83, p41, p39		
Alespoň 1 linie OspC	2 pozitivní linie	1 pozitivní nebo 2 hraniční linie	bez linie nebo 1 hraniční linie
pozitivní linie	pozitivní	pozitivní	pozitivní
hraniční linie	pozitivní	pozitivní	hraniční
bez linie	pozitivní	hraniční	negativní

Vysvětlivky: Osp C - Outer surface protein C, vnější povrchový protein C; VlsE - Variable major protein-like sequence, expressed, exprimovaná sekvence podobná sekvenci variabilního proteinu; p83 – protein p83; p41 – protein p41; p39 – protein p39.

Tabulka 5: Celkové vyhodnocení testu BLOT-LINE *Borrelia*/HGA IgG – převzato z [26]

Antigeny	p83, p58, p41, p39, OspB, OspA, OspC, p17, NapA			
Alespoň 1 linie VlsE	více než 2 pozitivní linie	2 pozitivní linie	1 pozitivní nebo 2 hraniční linie	bez linie nebo 1 hraniční linie
pozitivní linie	pozitivní	pozitivní	pozitivní	hraniční
hraniční linie	pozitivní	pozitivní	hraniční	negativní
bez linie	pozitivní	hraniční	negativní	negativní

Vysvětlivky: VlsE - Variable major protein-like sequence expressed, exprimovaná sekvence podobná sekvenci variabilního proteinu; p83 – protein p83; p58 – protein p58; p41 – protein p41; p39 – protein p39; Osp (A, B, C) - Outer surface protein (A, B, C), vnější povrchový protein (A, B, C); p17 - protein p17; NapA - Neutrophil activating protein A, neutrofilní aktivační protein A.

6.1.3 Vyšetření CXCL13 metodou ELISA

6.1.3.1 Princip

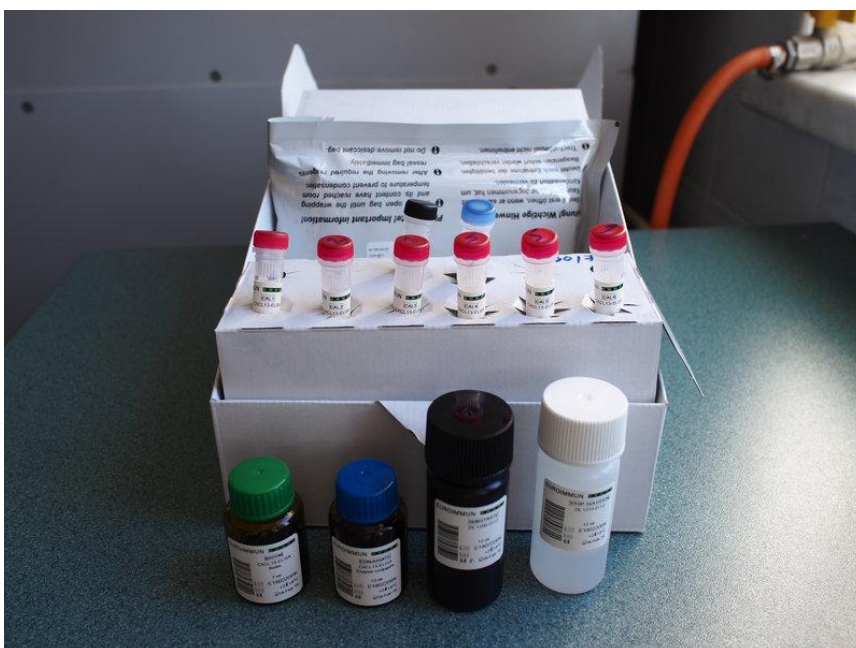
Jamky mikrotitrační destičky jsou potaženy monoklonálními protilátkami proti CXCL13. V prvním kroku analýzy se nadávají kalibrátory, kontroly či vzorky mozkomíšního moku a přidá se biotin navázaný na anti-CXCL13. Během inkubace se vytvoří komplex CXCL13 – anti-CXCL13-biotin, který se naváže na dno jamky mikrotitrační destičky. V dalším kroku se na vytvořený komplex váže streptavidin značený peroxidázou. Peroxidáza štěpí substrát za vzniku barevného produktu, jehož intenzita odpovídá koncentraci CXCL13 ve vzorku. [27]

6.1.3.2 Použitá diagnostická souprava

Stanovení koncentrace CXCL13 bylo provedeno pomocí diagnostické soupravy CXCL13-ELISA (EQ 6811-9601-L, Euroimmun, Německo) - viz Obrázek 25.

Souprava obsahuje:

- 1) Mikrotitrační destičku s jamkami potaženými protilátkou proti CXCL13.
- 2) 6 kalibrátorů a 2 kontroly s definovanou koncentrací CXCL13.
- 3) Biotinem značená protilátka proti CXCL13.
- 4) Enzymový konjugát – streptavidin značený peroxidázou.
- 5) Chromogenní substrát – obsahuje TMB (tetramethylbenzidin) a H_2O_2 .
- 6) Zastavovací roztok – obsahuje kyselinu sírovou.
- 7) Promývací roztok.



Obrázek 25: Obsah soupravy pro stanovení CXCL13 metodou ELISA
Fotografie pořízena autorkou práce na OLM KNTB a.s. Zlín

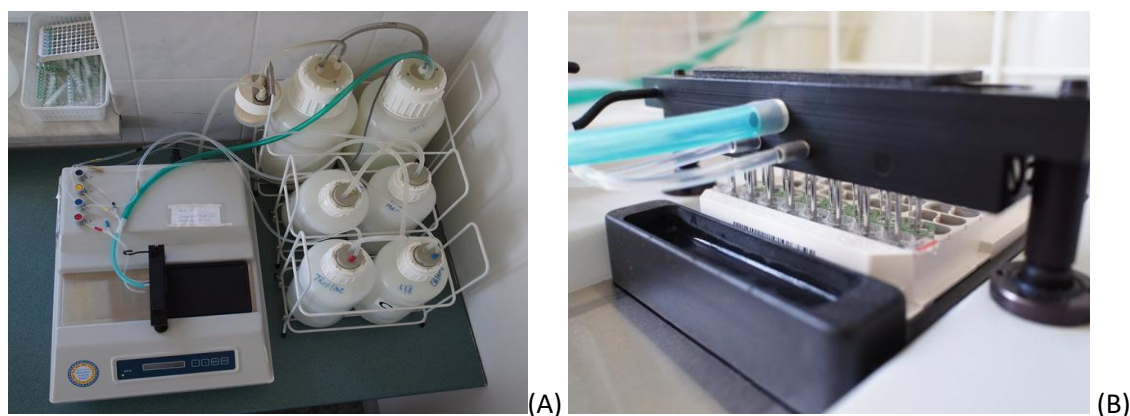
6.1.3.3 Pracovní postup

- 1) Do jamky mikrotitrační destičky se napipetuje 50 μ l kalibrátoru, kontroly nebo vzorku mozkomíšního moku a přidá se 50 μ l biotinu. Inkubuje se 180 minut na třepačce (viz Obrázek 26), při teplotě 18 – 25 °C při 400 otáčkách za minutu.



Obrázek 26: A – třepačka BIOSAN Ltd., Lotyšsko, B - mikrotitrační destička na třepačce
Fotografie pořízeny autorkou práce na OLM KNTB a.s. Zlín

- 2) Následuje promytí 3 krát 300 μ l naředěným promývacím roztokem (viz Obrázek 27). Nadávkuje se 100 μ l enzymového konjugátu a inkubuje se 30 minut na třepačce při teplotě 18 – 25 °C při 400 otáčkách za minutu.



Obrázek 27: A - Promývací linka, Dynatech, USA, B – detail promývacího kroku
Fotografie pořízeny autorkou práce na OLM KNTB a.s. Zlín

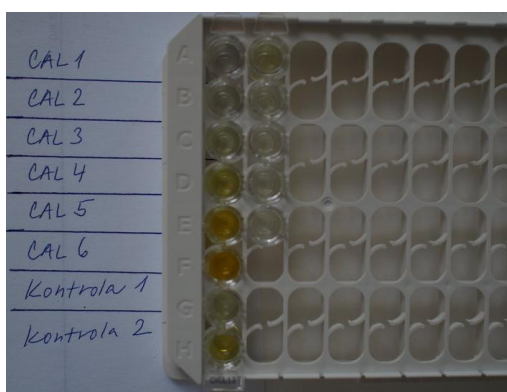
- 3) Dalším krokem je opět promytí 3 krát 300 μ l naředěným promývacím roztokem a pipetování 100 μ l chromogenního substrátu. Inkubace 15 minut při teplotě 18 – 25 °C ve tmě (viz Obrázek 28).



Popis obrázku: v 1. sloupci mikrotitrační destičky je sada kalibrátorů (A-F) o zvyšující se koncentrací CXCL13 a kontroly (G-H); ve 2. sloupci se nachází 5 vzorků (A-E), v jamkách (F-G) jsou jen prázdné jamky pro doplnění sloupce pro promývání. Intenzita modrého zbarvení se zvyšuje se zvyšující se koncentrací CXCL13.

*Obrázek 28: Mikrotitrační destička se substrátem – barví se modře
Fotografie pořízena autorkou práce na OLM KNTB a.s. Zlín*

- 4) Poté se přidá do každé jamky 100 μ l zastavovacího roztoku, modré zbarvení se změní na žluté (viz Obrázek 29A) a měří se absorbance při vlnové délce 450 nm a referenční vlnové délce 620 – 650 nm (viz Obrázek 29B). [27]



(A)



(B)

Popis obrázku A: v 1. sloupci mikrotitrační destičky je sada kalibrátorů (A-F) o zvyšující se koncentrací CXCL13 a kontroly o dané koncentraci (G-H); v 2. sloupci se nachází 5 vzorků (A-E). Intenzita žlutého zbarvení se zvyšuje se zvyšující se koncentrací CXCL13.

*Obrázek 29: A – mikrotitrační destička po přidání zastavovacího roztoku, B – Spektrofotometr MRX II (Dyner Technologies, USA) s příslušenstvím
Fotografie pořízeny autorkou práce na OLM KNTB a.s. Zlín*

6.1.3.4 Vyhodnocení

Vyhodnocení se provádí pomocí počítačového programu Relevation verze 4.25 (Dynatech Laboratories, USA). Křivka pro stanovení CXCL13 ve vzorcích mozkomíšního moku se získá vynesáním hodnot absorbance naměřených pro 6 kalibrátorů proti koncentraci CXCL13 v pg.ml^{-1} .

Test pro CXCL13 je validní, jestliže je koncentrace kontrol v rozmezí stanoveném pro příslušnou šarži testu.

Z křivky se získají koncentrace CXCL13 ve vzorcích mozkomíšního moku v pg.ml^{-1} . Leží-li absorbance vzorku nad hodnotou kalibrátoru 6, je třeba vzorek ředit 1:10 v kalibrátoru 1, poté je nutné výsledek vynásobit 10x. [27]

6.1.3.5 Interpretace výsledků

Tabulka 6: Interpretace výsledků CXCL13 – převzato z [27]

Hodnoty	Koncentrace CXCL13 [pg.ml^{-1}]	Interpretace
standardní	< 20	vyloučení neuroboreliózy
hraniční	20 - 30	
zvýšené	30 - 100	
výrazně zvýšené	> 100	podezření na akutní neuroboreliózu, pokud jsou přítomny odpovídající symptomy

Nejnovější literatura uvádí, že výsledky > 250 pg.ml^{-1} jsou považovány za známku akutní neuroboreliózy (Euroimmun, 2018). [27]

6.1.4 Stanovení boreliové DNA pomocí PCR

6.1.4.1 Izolace DNA

6.1.4.1.1 Princip

Pomocí izolační soupravy lze izolovat DNA tak, že se nejdříve provede lyze vzorku v roztoku s vysokým obsahem chaotropních iontů za přítomnosti proteinázy K. Poté se k lyzátu přidá etanol, čímž se dosáhne ideálních podmínek pro navázání DNA na silikagelovou membránu kolonky. Pomocí několika promývacích kroků se odstraní nežádoucí látky. Čistá DNA se eluuje z kolonky pomocí mírně alkalického elučního pufru. [28]

6.1.4.1.2 Použitá diagnostická souprava

Pro izolaci boreliové DNA byla použita izolační souprava GeneProof PatogenFree DNA Isolation Kit (GeneProof a.s., Česká republika) – viz Obrázek 30.

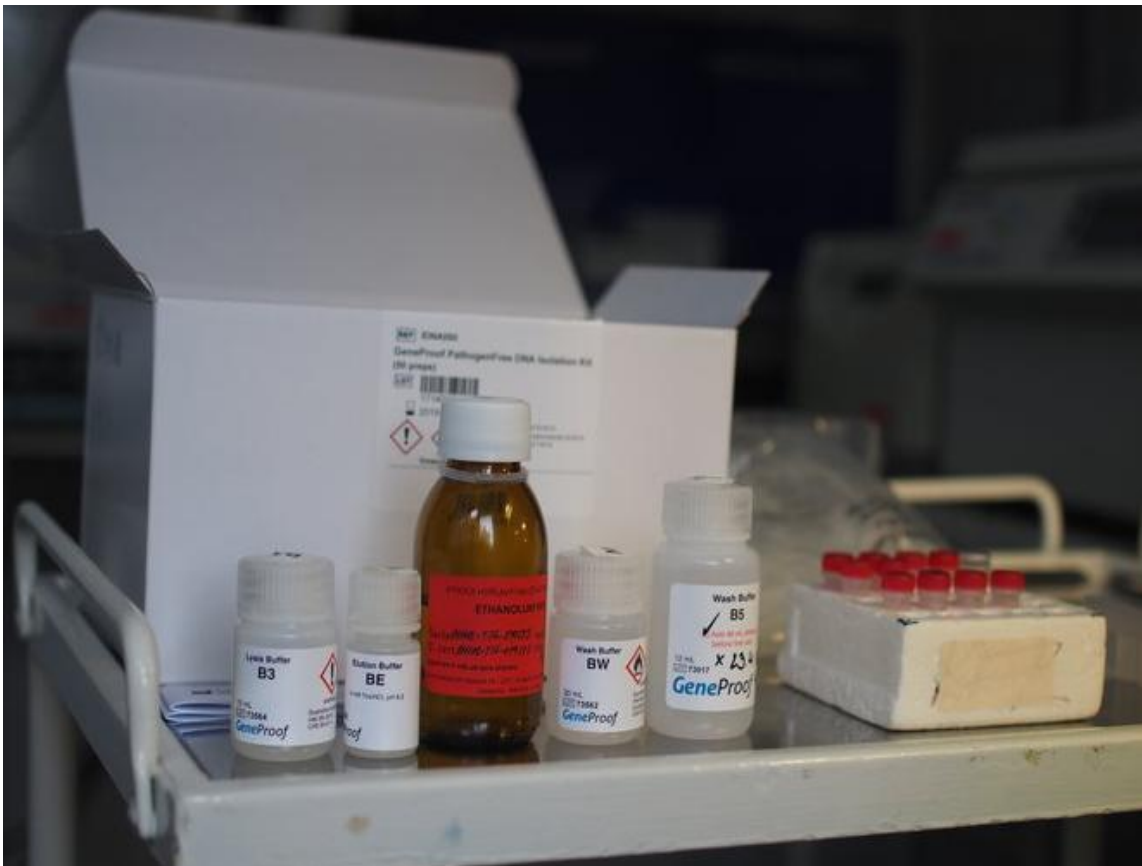
Souprava obsahuje:

- 1) Lyzační pufr B3.
- 2) Proteinázu K.
- 3) Promývací pufr B5.

- 4) Promývací pufr BW.
- 5) Eluční pufr BE.
- 6) DNA kolonky.
- 7) 2 ml centrifugační zkumavky.

Dále je potřeba:

- 1) 96% etanol.
- 2) Interní standard.



*Obrázek 30: Potřebné reagentie pro izolaci DNA
Fotografie pořízena autorkou práce na OLM KNTB a.s. Zlín*

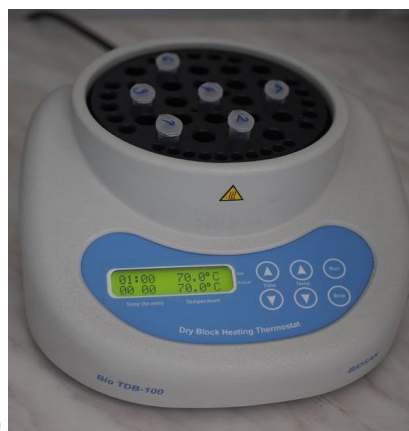
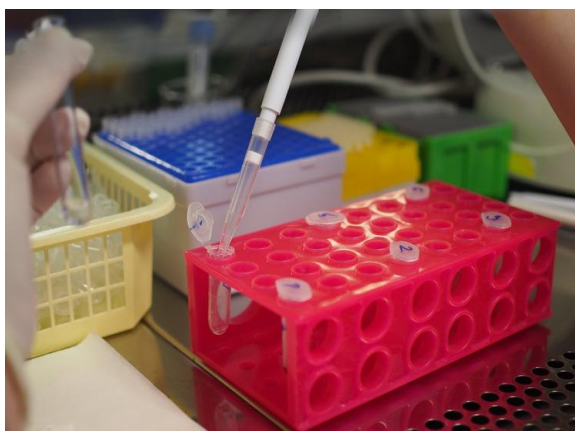
6.1.4.1.3 Pracovní postup pro izolaci DNA z mozkomíšního moku

Aby se předešlo kontaminaci vzorku, provádí se izolace DNA v laminárním boxu (Labox spol. s.r.o., Česká republika) - viz Obrázek 31. Laminární box slouží rovněž k ochraně laborantky.



Obrázek 31: Laminární box pro izolaci DNA
Fotografie pořízena autorkou práce na OLM KNTB a.s. Zlín

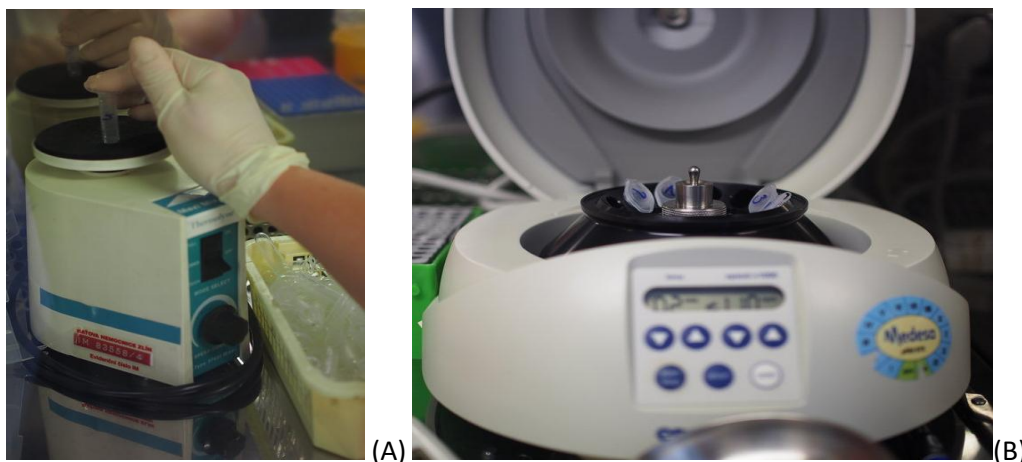
- 1) Do zkumavky se napipetuje 25 μ l proteinázy K, 5 μ l interního standardu, 200 μ l vzorku mozkomíšního moku (viz Obrázek 32A) a 200 μ l lyzačního pufru B3. Obsah se vortexuje 10 – 20 s a zkumavka se inkubuje při 70°C 30 minut (viz Obrázek 32B). Dojde k lyze vzorku.



Obrázek 32: A – pipetování vzorku pomocí špičky s filtrem, B – Termostat (BIOSAN Ltd., Lotyšsko)

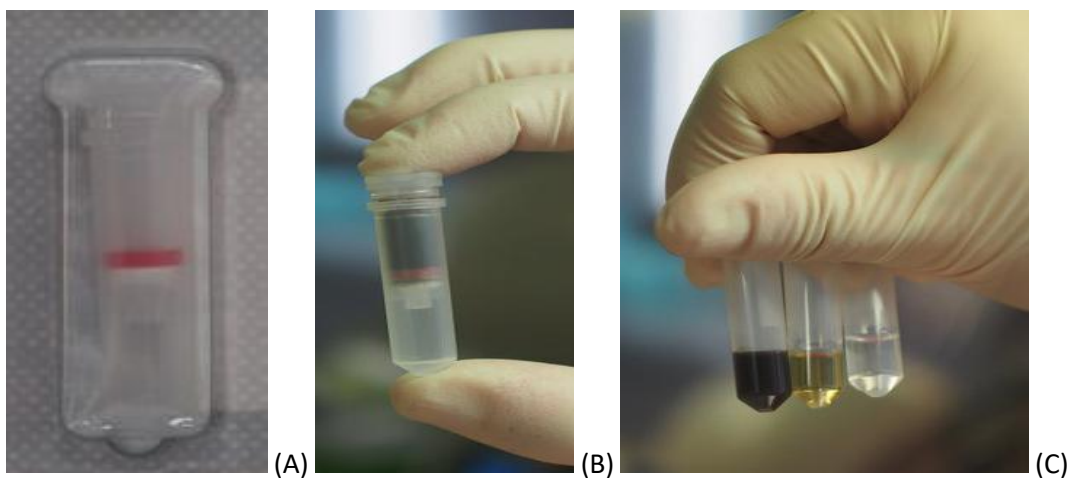
Fotografie pořízeny autorkou práce na OLM KNTB a.s. Zlín

- 2) Dalším krokem je úprava podmínek pro navázání DNA na membránu. Přidá se 210 μ l 96% etanolu, obsah se promíchá na vortexu (viz Obrázek 33A) a krátce se centrifuguje (viz Obrázek 33B).



Obrázek 33: A – vortex (BIOSAN Ltd., Lotyšsko), B – centrifuga Minispin (Eppendorf, Německo)
Fotografie pořízeny autorkou práce na OLM KNTB a.s. Zlín

- 3) Navázání DNA na kolonku se provede tak, že se lyzát napipetuje na kolonku a centrifuguje se při 11000 x g 1 minutu. Zkumavka s filtrátem se vyhodí (viz Obrázek 34).



Obrázek 34: A – zabalená čistá kolonka, B – vzorek krve v kolonce vložené do zkumavky před centrifugací, C – zkumavky s filtrátem po centrifugaci – zleva vzorek krve, punktátu, mozkomíšního moku

Fotografie pořízeny autorkou práce na OLM KNTB a.s. Zlín

- 4) Kolonka se umístí do nové zkumavky, přidá se 500 μ l promývacího pufru BW a centrifuguje se při 11 000 x g 1 minutu. Zkumavka s filtrátem se vyhodí.
- 5) Kolonka se umístí do nové zkumavky, přidá se 600 μ l promývacího pufru B5 a centrifuguje se při 11 000 x g 1 minutu. Zkumavka s filtrátem se vyhodí.
- 6) Kolonka se umístí do nové zkumavky a centrifuguje se při 11 000 x g 1 minutu. Dojde k vysušení membrány v kolonce, odstraní se zbytkový etanol. Zkumavka se vyhodí.

- 7) Kolonka se umístí do nové zkumavky a přidá se 50 μ l elučního pufru BE předeřhřátého na 70°C. Následuje inkubace 1 minutu při pokojové teplotě a centrifuguje se při 11 000 x g 1 minutu. Kolonka se vyhodí a ve zkumavce se získá 50 μ l izolátu DNA.
- 8) Takto připravený izolát DNA (viz Obrázek 35) se použije pro PCR reakci nebo se uchová v mrazničce. [28]



Obrázek 35: Dole – zkumavka s izolátem, nahoře kolonka na vyhození
Fotografie pořízena autorkou práce na OLM KNTB a.s. Zlín

6.1.4.2 Stanovení DNA borelií pomocí polymerázové řetězové reakce v reálném čase

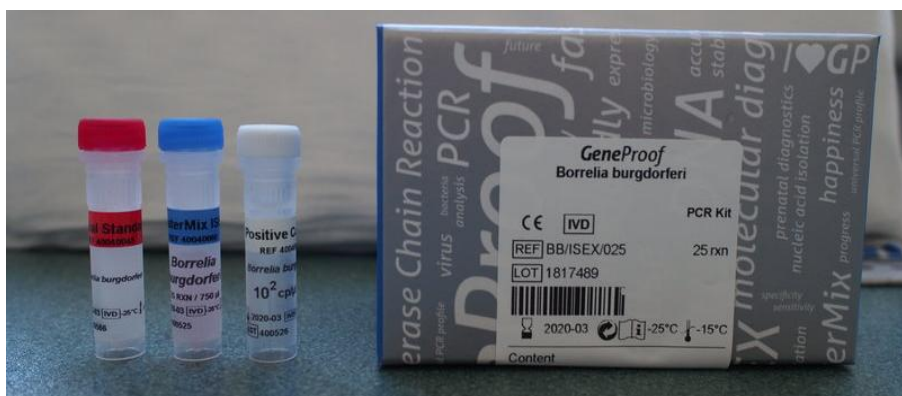
6.1.4.2.1 Princip

Detekce borelií ze skupiny *Borrelia burgdorferi* sensu lato metodou PCR v reálném čase je založena na principu amplifikace sekvence genu kódujícího 16S rRNA a měření nárůstu fluorescence fluoroforu FAM (5(6)-carboxyfluorescein). [28]

6.1.4.2.2 Použitá souprava

Souprava Geneproof *Borrelia burgdorferi* PCR kit verze ISEX (GeneProof a.s., Česká republika) obsahuje (viz Obrázek 36) [28]:

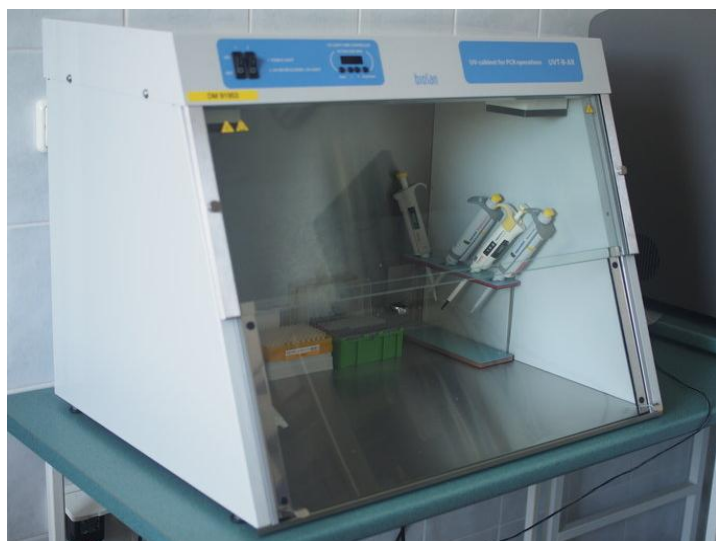
- 1) MasterMix *Borrelia burgdorferi* - obsahuje všechny potřebné komponenty pro PCR amplifikaci, navíc uracil-DNA glykosylázu (UDG), která eliminuje kontaminaci PCR amplifikačními produkty.
- 2) Pozitivní kontrolu *Borrelia burgdorferi*.
- 3) Interní standard *Borrelia burgdorferi* – slouží pro kontrolu inhibice PCR reakce a kontrolu kvality izolace DNA. Pozitivní amplifikace interního standardu je detekovaná ve fluorescenčním kanálu pro fluorofor HEX (6-carboxy-2,4,4,5,7,7 - hexachlorofluorescein succinimidyl ester).



Obrázek 36: Souprava pro PCR reakci Geneproof Borrelia burgdorferi
 Fotografie pořízena autorkou práce na OLM KNTB a.s. Zlín

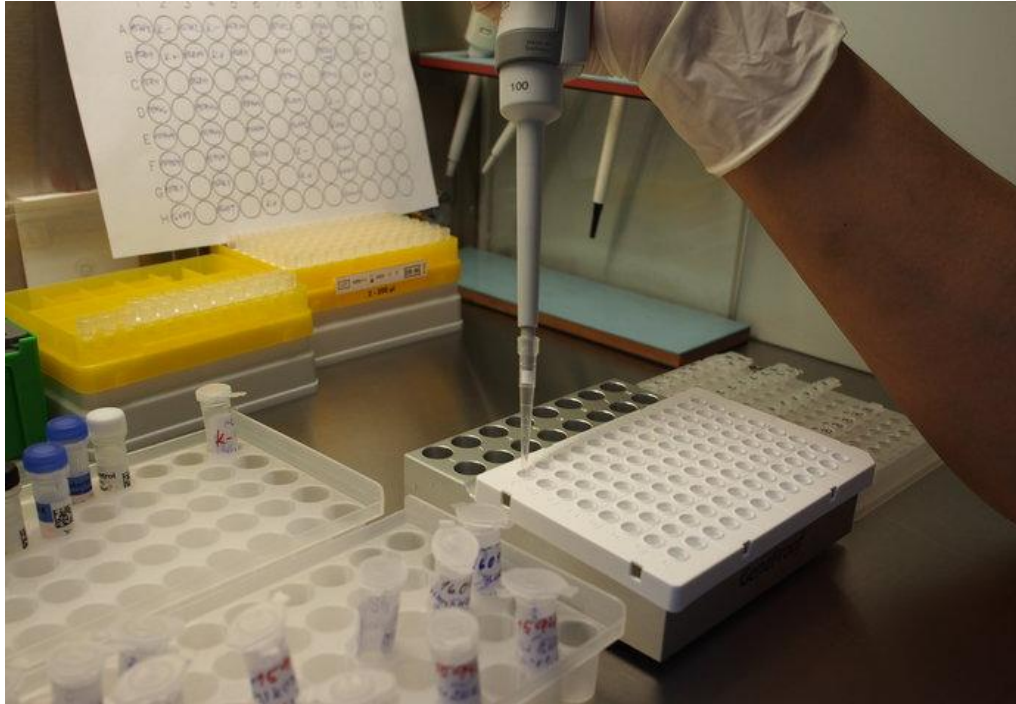
6.1.4.2.3 Příprava polymerázové řetězové reakce [28]

Aby se předešlo kontaminaci, provádí se příprava v jiném boxu než izolace DNA (viz Obrázek 37).



Obrázek 37: Box s UV zářičem (BIOSAN Ltd., Lotyšsko)
 Fotografie pořízena autorkou práce na OLM KNTB a.s. Zlín

- 1) MasterMix se vytemperuje na laboratorní teplotu. Do papírové šablony 96-ti jamkové destičky se zapíše pozice vzorků a kontrol.
- 2) Do jamky destičky pro PCR se napipetuje 30 μ l MasterMixu a přidá se 10 μ l izolátu DNA vzorku. Výsledný objem reakční směsi je 40 μ l (viz Obrázek 38).



*Obrázek 38: Pipetování MasterMixu do destičky pro PCR reakci
Fotografie pořízena autorkou práce na OLM KNTB a.s. Zlín*

- 3) Do další jamky destičky se napipetuje 30 μ l MasterMixu a 10 μ l pozitivní kontroly.
- 4) Do další jamky se napipetuje 10 μ l negativní kontroly (negativní izolát z předešlé analýzy, příp. destilovaná voda upravena izolačním postupem).
- 5) Destička se přelepí krycí folií, folie se přitlačí plastovou stěrkou a destička se centrifuguje při 1500 otáčkách 2 minuty na centrifuze 5430 (Eppendorf, Německo).
- 6) Destička se vloží se do termocykleru LightCycler®480II (Roche Diagnostics Ltd., Švýcarsko), ve kterém probíhá vlastní PCR reakce (viz Obrázek 39).



*Obrázek 39: Termocykler LightCycler®480II s příslušenstvím
Fotografie pořízena autorkou práce na OLM KNTB a.s. Zlín*

7) Spustí se Amplifikační program:

- UDG dekontaminace při 37°C 2 minuty
- počáteční denaturace při 95°C 10 minut
- denaturace při 95°C 5 sekund
- annealing při 60°C 40 sekund – čtení fluorescenčního signálu
- replikace při 72°C 20 sekund
- počet cyklů 45

6.1.4.2.4 Vyhodnocení PCR

Vyhodnocení provádí zaškolený VŠ pracovník. Přítomnost borelií ve vzorku je indikována nárůstem fluorescence FAM fluoroforu. K primárnímu vzorku je přidáván interní standard (IS) kontrolující možnou inhibici PCR reakce i kvalitu izolace DNA (verze ISEX). Pozitivní amplifikace IS je detekována ve fluorescenčním kanálu pro HEX fluorofor.

Interpretace výsledků

Pozitivní – v případě positivity (pozitivní signál = amplifikační růstová křivka) ve FAM fluoroforu a positivity IS (pozitivní signál = amplifikační růstová křivka) v HEX fluoroforu. U vysoce pozitivního vzorku nemusí být pozitivita IS.

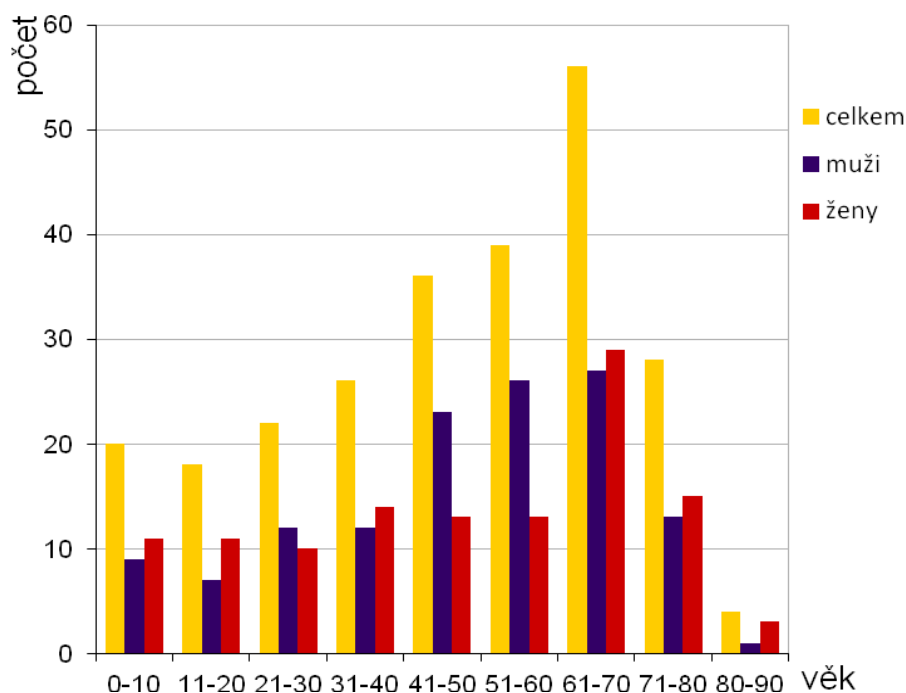
Negativní – v případě negativity (žádná amplifikační křivka) ve FAM fluoroforu a pozitivita IS v HEX fluoroforu.

Nevalidní (inhibice reakce) – v případě negativity (žádná amplifikační křivka) ve FAM fluoroforu a negativní IS v HEX fluoroforu (vyšetření je nutno opakovat). [28]

6.2 Soubor pacientů

Od března 2015, kdy bylo stanovení koncentrace CXCL13 na OLM KNTB a.s. Zlín zavedeno, do července 2018 bylo vyšetřeno 249 vzorků mozkomíšního moku. Věk pacientů se pohyboval od 4 do 88 let. Skupina zahrnuje 130 mužů a 119 žen.

Graf 1: Soubor pacientů – rozložení dle věku a pohlaví



Všechny tyto vzorky mozkomíšních moků byly podrobeny stanovení koncentrace chemokinu CXCL13, dále stanovení specifických protilátek třídy IgM a IgG pomocí screeningového vyšetření metodou chemiluminiscenční imunoanalýzy na analyzátoru LIAISON XL a následnou konfirmací metodou WB. U 35 vzorků mozkomíšního moku byla provedena i detekce boreliové DNA metodou PCR.

Nejdříve byly vzorky hodnoceny jako celek. Poté byly vybrány 2 skupiny, které byly zhodnoceny podrobněji. První skupinu tvoří posledních 50 vzorků vyšetřených v období červen – červenec 2018 a druhou skupinu tvoří děti do 12 let, kterých bylo 27.

U těchto dvou skupin byly dohledány výsledky stanovení koncentrace albuminu a celkových protilátek třídy IgM a IgG ve vzorcích mozkomíšního moku a séra, které byly vyšetřeny na Oddělení klinické biochemie a farmakologie (OKBF) KNTB a.s. Zlín. Dále byly dohledány výsledky vyšetření specifických protilátek třídy IgM a IgG proti boreliím ve vzorcích séra. Ze všech těchto hodnot mohl být vypočten protilátkový index (AI, antibody index) pomocí programu Berechnungsprogramm (DiaSorin, Německo). Za pozitivní hodnotu AI je považována hodnota $> 1,5$. Byly vyhledány i výsledky cytologie mozkomíšního moku, která byla provedena na OKBF KNTB a.s. Zlín. Dále byla dohledána propouštěcí zpráva, ze které byly čerpány informace o stanovené diagnóze.

7. VÝSLEDKY

7.1 Výsledky všech 249 vzorků

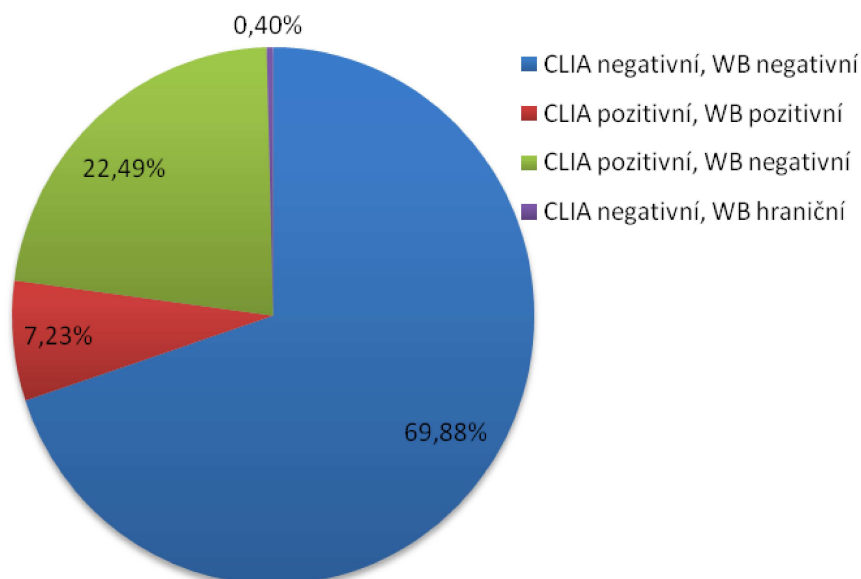
Výsledky vyšetření mozkomíšního moku všech 249 pacientů jsou uvedeny v Příloze 1. V příloze 1 je možné nalézt číslo vzorku, rok a měsíc vyšetření, věk a pohlaví pacienta, koncentraci CXCL13 v pg.ml^{-1} , koncentraci specifických protilátek třídy IgM a IgG proti boreliím naměřenou na analyzátoru LIAISON XL pomocí metody CLIA v AU.ml^{-1} , výsledky vyšetření specifických protilátek třídy IgM a IgG proti boreliím stanovených metodou WB. U některých vzorků je také uveden výsledek stanovení boreliové DNA metodou PCR (35 vzorků), ostatní nálezy, příznaky a diagnostický závěr.

Pomocí programu Microsoft Excel byly výsledky srovnány a výsledky jsou uvedeny v příloze 2. Bylo zjištěno, že 107 vzorků bylo zcela negativních, tj. žádné specifické protilátky proti boreliím a hodnoty koncentrace CXCL13 se pohybovaly pod 20 pg.ml^{-1} . Tyto vzorky by se daly počítat, jako kontrolní skupina. 17 vzorků mělo negativní protilátky, ale koncentraci CXCL13 větší než 20 pg.ml^{-1} a z nich pouze jeden (vzorek 88) měl koncentraci CXCL13 větší než 250 pg.ml^{-1} .

Z 249 pacientů bylo stanoveno minimálně 40 případů LNB. Celkově mělo koncentraci CXCL13 větší než 250 pg.ml^{-1} 42 vzorků, z toho 38 připadalo na pacienty s LNB. Čtyři zbylé případy měly TBC basilární meningitidu, aseptickou meningitidu, herpetickou encefalitidu a jeden zemřel.

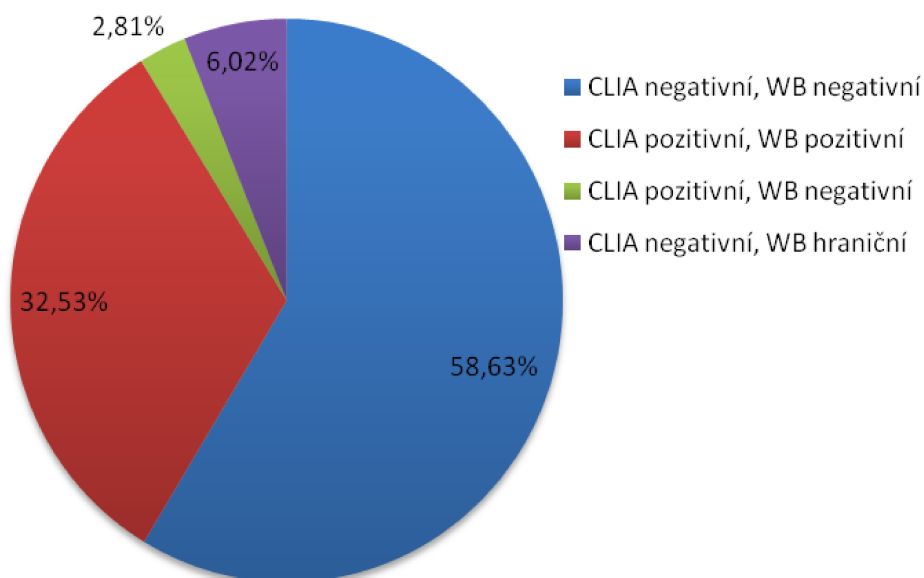
Srovnání výsledků stanovení specifických protilátek metodou CLIA a WB ukazuje graf 2 a 3. Shoda u protilátek třídy IgM byla v 77,1 %, ale 22,49% bylo pozitivních metodou CLIA, ale nepotvrzeno WB. Pouze u jednoho vzorku (0,40 %) byly protilátky třídy IgM negativní metodou CLIA a hraniční metodou WB.

Graf 2: Srovnání výsledků vyšetření protilátek třídy IgM metodou CLIA a WB



U protilátek třídy IgG byla shoda u 91,2 % vzorků, jak je patrné z grafu 3. 6,02 % vzorků bylo negativních metodou CLIA a hraniční metodou WB. Pouze 3 vzorky (2,81 %) byly pozitivní metodou CLIA, ale nepotvrzeny WB.

Graf 3: Srovnání výsledků vyšetření protilátek třídy IgG metodou CLIA a WB



Z tabulky 7 je zjevné, že koncentrace chemokinu CXCL13 při jiné infekci než LNB nepřekročila hodnotu 250 pg.ml^{-1} , která je několika studiemi doporučována jako hranice pro diagnostiku akutní LNB.

Tabulka 7: Přehled ostatních nálezů vzhledem ke koncentraci CXCL13

	Protilátky proti klíčové encefalitidě				Ostatní nálezy		
	IgM+ IgG+	IgM- IgG+	IgM+ IgG-	IgM- IgG H	VZV PCR+	HSV1 PCR+	Anaplasma IgM- IgG+
CXCL13 [pg/ml]	8,919	4,7	31,37	4,099	29,554	229,3	10,262
	12,618	6,725			45,381	6,868	6,725
	19,59	7,466			232,205		
	33,461	8,341					
	49,694	9,61					
	59,16	9,67					
	112,85	11,44					
	113,986	23,9					
	123,936	76,625					
	128,75						
	158,39						
průměr	74,67	17,61	31,37	4,10	102,38	118,08	8,49

Vysvětlivky: + - pozitivní, - - negativní, H – hraniční, PCR – polymerázová řetězová reakce, HSV – herpes simplex virus, VZV – varicella zoster virus, Anaplasma – *Anaplasma phagocytophilum*

7.2 Výsledky vzorků vyšetřených v období červen – červenec 2018

Výsledky posledních 50ti vzorků, které byly vyšetřeny v období červen – července roku 2018 lze nalézt v příloze 3. V této skupině bylo zachyceno 8 případů LNB. Všechny jsou charakterizované lymfocytární pleocytózou, pozitivním protilátkovým indexem (AI) ve třídě IgM i IgG a koncentrací CXCL13 vyšší než 250 pg.ml⁻¹. V tabulce 8 je vidět přehled nejčastějších příznaků a nálezů. Pozitivní AI pro protilátky třídy IgG se nacházelo kromě 8 pacientů s LNB u 6 pacientů. Dva trpěli polyneuropatií dolních končetin, dva měli uvedenu dříve proběhlou lymfskou boreliózu, jeden pacient měl pozitivní protilátky třídy IgM proti klíšťové encefalitidě a jeden trpěl akutní meningoencefalitidou nejasné etiologie. Koncentrace CXCL13 u těchto šesti pacientů byla menší než 20 pg.ml⁻¹, což by mělo vyloučit akutní neuroboreliózu.

Tabulka 8: Výsledky a nálezy u 50 pacientů za období červen-červenec 2018

	vyšetřeno celkem	pacienti s LNB
počet pacientů	50	8
PPLN	6	3 (1)
bolest hlavy	8	3
lymfocytární pleocytóza	18	8
pozitivní AI pro IgM	8	8
pozitivní AI pro IgG	14	8
CXCL13 > 250 pg/ml	8	8
CXCL13 100 - 250 pg/ml	3	0
CXCL13 30 - 100 pg/ml	6	0
CXCL13 20-30 pg/ml	1	0
CXCL13 < 20 pg/ml	32	0
PCR - pozitivní	1	1
PCR - negativní	7	2
CLIA IgM+ / H	12	8
CLIA IgM-	38	0
CLIA IgG+ / H	15	8
CLIA IgG-	35	0
WB IgM+ / H	3	3
WB IgM-	47	5
WB IgG+ / H	17	8
WB IgG-	33	0

Vysvětlivky: LNB – lymfská neuroborelióza, PPLN – periferní paréza lícního nervu, AI – antibody index, PCR – polymerázová řetězová reakce pro stanovení DNA borelií, CLIA – chemiluminiscenční imunoanalýza, WB – Western blot, + - pozitivní, - - negativní, H - hraniční

V souboru 50 pacientů byly zachyceny 2 případy klíšťové encefalitidy, u 1 vzorku byl zachycen metodou PCR Varicella zoster virus (VZV) a u 1 vzorku Herpes simplex virus 1 (HSV 1). U těchto 4 vzorků byly koncentrace CXCL13 zvýšeny, ale nepřesahovaly hodnotu 250 pg.ml⁻¹.

Jak je patrné z tabulky 9, 7 pacientů ze souboru 50 pacientů mělo negativní specifické protilátky proti boreliím, ale hodnota CXCL13 se pohybovala mezi 20 a 250 pg.ml⁻¹. Mezi tyto vzorky spadají kromě výše zmíněných (HSV 1, VZV, klíšťová encefalitida), pacienti s roztroušenou sklerózou, paraparézou po bodnutí včely, meningoencefalitidou a jedna pacientka v počáteční fázi neuroboreliózy – viz kazuistika 1.

Tabulka 9: Přehled výsledků pro soubor 50 pacientů za období červen-červenec 2018

CXCL13 [pg/ml]		< 20	20 – 30	30 – 100	100 – 250	> 250	celkem
CLIA	WB						
IgM- IgG-	IgM- IgG-	24	1	4	2		31
IgM+ IgG+	IgM- IgG+	1			1	5	7
IgM+ IgG+	IgM+ IgG+					3	3
IgM- IgG-	IgM- IgG H	2					2
IgM- IgG+	IgM- IgG H	3					3
IgM- IgG+	IgM- IgG+	2					2
IgM + IgG-	IgM- IgG-			2			2
počet případů – celkem		32	1	6	3	8	50

Vysvětlivky: + - pozitivní, - - negativní, **H** – hraniční, **CLIA** – chemiluminiscenční analýza, **WB** – Western blot

Dva pacienti měli v mozkomíšním moku pozitivní protilátky třídy IgM i IgG metodou CLIA, ale potvrzeny WB byly jen protilátky třídy IgG. Tito pacienti nespádali mezi pacienty s LNB, jeden trpěl polyneuropatií (CXCL13 < 20 pg.ml⁻¹ a negativní AI) a jeden měl podezření na onkologické onemocnění mozku (CXCL13 220,5 pg.ml⁻¹ a negativní AI).

Dva pacienti měli v mozkomíšním moku pouze pozitivní protilátky třídy IgM metodou CLIA, ale nepotvrzené WB. Mezi nimi se nacházel pacient s klíšťovou encefalitidou a pacient s lymfocytární meningitidou (oba měli AI pro IgM negativní).

Kazuistika 1 (vzorek 207 a 212)

31.5. 2018

64-letá žena přichází s bolestmi v levém uchu, poklesem levého ústního koutku, nedovírá levé oko a opakovaně zvracela. Před třemi dny byla očkovaná proti klíšťové encefalitidě. Před 4 týdny měla klíště bez větší lokální reakce. Byla provedena lumbální punkce. Biochemicky byl mozkomíšní mok v pořádku, cytologicky mírná lymfocytární pleocytóza. Specifické protilátky proti boreliím v séru i mozkomíšním moku negativní. Jen zvýšená hodnota CXCL13 (vzorek 207 = 49,055 pg.ml⁻¹).

6.6. 2018

Propuštěna domů – naordinováno analgetikum, oční mast, oční kapky a rehabilitace.
Diagnostický závěr – Idiopatická periferní paréza lícního nervu vlevo.

13.6. 2018

Pacientka přichází pro obrnu lícního nervu i na pravé straně. Opět proveden odběr mozkomíšního moku. Při biochemickém vyšetření zvýšeny imunoglobuliny, albumin, laktát. Cytologicky byla stanovena lymfocytární pleocytóza. V séru hraniční specifické protilátky třídy IgM a IgG proti boreliím, protilátky IgM WB pozitivní. V mozkomíšním moku protilátky metodou CLIA pozitivní, ale WB zachytil pouze hraniční IgG. Vysoká koncentrace CXCL13 (vzorek 212 = 833,69 pg.ml⁻¹).

Diagnostický závěr: LNB projevující se bilaterální periferní parézou lícního nervu.

Z této kazuistiky je vidět, že u pacientky nebyla na začátku onemocnění LNB stanovena správná diagnóza, protože laboratorní výsledky ještě nezachytily probíhající infekci. Koncentrace chemokinu CXCL13 byla zvýšena, ale nepřekračovala ani hodnotu 100 pg.ml⁻¹. Protilátky ještě detekovatelné nebyly.

7.3 Výsledky skupiny dětí do 12 let

Výsledky dětí do 12 let jsou uvedeny v příloze 4. Z 27 dětí mělo diagnózu LNB 20. Všechny měly zvýšenou koncentraci CXCL13 nad hodnotu 355 pg.ml⁻¹ a většina z nich měla v mozkomíšním moku stanovenou lymfocytární pleocytózu. Nejčastějším projevem byla periferní paréza lícního nervu, která se nacházela u 15 dětí s LNB. Druhým nejčastějším projevem byla u dětí bolest hlavy. Z těchto 20 dětí mělo 19 dětí v mozkomíšním moku pozitivní protilátky třídy IgM metodou CLIA, ale potvrzeno WB byly jen 4 vzorky. 18 dětí mělo v mozkomíšním moku pozitivní protilátky třídy IgG metodou CLIA, potvrzeno WB bylo 16 vzorků. U 11 vzorků byl vypočten protilátkový index (AI), který byl u všech těchto vzorků pozitivní v obou třídách protilátek. U ostatních pozitivních vzorků nemohl být AI vypočten, protože nebyla naměřena všechna potřebná data. Jeden vzorek měl pouze vysokou koncentraci CXCL13 a LNB byla potvrzena pozitivní boreliovou DNA metodou PCR – viz. kazuistika 2. Další vzorek měl pouze vysokou koncentraci CXCL13 a pozitivní specifické protilátky třídy IgM proti boreliím metodou CLIA, ale nepotvrzenou WB – viz kazuistika 3. Přehled výsledků je uveden v tabulce 10.

Tabulka 10: Přehled výsledků u skupiny – děti do 12 let

	stanoveno celkem	pacienti s LNB
počet pacientů	27	20
PPLN	19	15
bolest hlavy	4	4
lymfocytární pleocytóza	16	14
pozitivní AI	11	11
CXCL13 > 250 pg/ml	20	20
CXCL13 < 20 pg/ml	7	7
PCR – pozitivní	4	4
PCR – negativní	17	11
CLIA IgM+	20	19
CLIA IgM-	7	1
CLIA IgG+	18	18
CLIA IgG-	9	0
WB IgM+ / H	4	4
WB IgM-	23	16
WB IgG+ / H	16	16
WB IgG-	11	4

Vysvětlivky: LNB – lymfská neuroborelióza, PPLN – periferní paréza lícního nervu, AI – antibody index, PCR – polymerázová řetězová reakce pro stanovení DNA borelií, CLIA – chemiluminiscenční imunoanalýza, WB – Western blot, + - pozitivní, - - negativní, H – hraniční

Kazuistika 2 (vzorek 88)

9-ti letý chlapec byl přijat pro periferní parézu lícního nervu vlevo. Byla provedena lumbální punkce. Cytologicky stanovena lymfocytární pleocytóza. Specifické protilátky třídy IgM i IgG v séru i mozkomíšním moku negativní. Zato byla zvýšena koncentrace chemokinu CXCL13 ($593,6 \text{ pg.ml}^{-1}$) a LNB byla potvrzena metodou PCR, pomocí které byla detekována boreliová DNA.

Tato kazuistika ukazuje záchyt velmi časného stádia LNB v období, kdy ještě nebyly vytvořeny protilátky. Koncentrace chemokinu CXCL13 diagnózu LNB podporuje.

Kazuistika 3 (vzorek 68)

12-ti letý chlapec byl přijat pro opakované zvracení a bolesti hlavy. Po přijetí se velmi rychle rozvíjí výrazný meningismus. Dle počítačové tomografie je centrální nervový systém bez patologie. Byla provedena lumbální punkce. Mozkomíšní mok byl lehce zkalený, cytologicky a biochemicky odpovídá spíše bakteriálnímu zánětu. Po podání antibiotik se chlapec zlepšuje. Kultivace mozkomíšního moku i hemokultur byla negativní. Byly zjištěny pouze pozitivní specifické protilátky třídy IgM proti boreliím v mozkomíšním moku metodou CLIA, které se WB nepotvrdily. Protilátkový index (AI) nemohl být vypočten, protože nebyly změřeny všechny parametry k tomu potřebné. Koncentrace CXCL13 byla $355,53 \text{ pg.ml}^{-1}$, tedy celkem vysoká. Příčina potíží nebyla zcela jasná, ale po konzultaci s neurologem byl závěr boreliová meningoencefalitida.

Tato kazuistika ukazuje, že se zřejmě jednalo o velmi časnou LNB, která ještě nemohla být potvrzena pozitivními protilátkami. Stanovení borelií metodou PCR bylo negativní, což mohlo být způsobeno nízkou citlivostí této metody. Jediný ukazatel směřující k diagnostice LNB byla vysoká koncentrace CXCL13 a příznaky onemocnění, reagující na léčbu antibiotiky.

8. DISKUSE

LNB patří mezi časté systémové manifestace lymfské boreliózy v Evropě. Aby mohla být diagnóza LNB stanovena, musí být splněny 3 podmínky – odpovídající klinické symptomy, pleocytóza v mozkomíšním moku a intratekální produkce protilátek. Jsou-li splněny pouze 2 tyto podmínky, diagnóza LNB je možná. [29] Tyto pravidla jsou dána směrnicemi Evropské federace neurologických společností (EFNC, European federation of neurological societies). [30]

Laboratorní diagnostika LNB není jednoduchá. Za zlatý standard se dnes považuje stanovení intratekální syntézy specifických protilátek. Tato metoda má však svá omezení. Pokud se jedná o velmi časně stádium, nemusí být protilátky ještě vytvořeny. Na druhou stranu mohou protilátky přetrvávat delší dobu. Přímý průkaz borelií má nízkou citlivost. Z 35 vzorků mozkomíšního moku vyšetřených v rámci této práce byla DNA borelií metodou PCR zachycena pouze 4 krát a to u dětí ve věku 4, 5, 6 a 9 let.

Z těchto důvodů se hledá nový laboratorní marker pro diagnostiku lymfské neuroboreliózy. Vhodným diagnostickým markerem se zdá být stanovení koncentrace CXCL13 v mozkomíšním moku, jehož koncentrace bývá při akutní neuroborelióze značně zvýšená. Navíc jeho koncentrace rychle klesá po léčbě. Stanovení koncentrace CXCL13 k monitorování léčby se však v praxi moc nevyužije, protože odběr mozkomíšního moku je prováděn pouze v nutných případech.

Problémem však je, že zatím nebyla definována mezní hodnota koncentrace CXCL13 pro diagnostiku LNB, navrhované mezní hodnoty se pohybují od méně než 100 po více než 1229 pg.ml^{-1} . [6]

Pícha a kol. ve své studii hodnotili klinický význam CXCL13 pro stanovení diagnózy LNB. Zjistili, že koncentrace CXCL13 dobře koreluje s pleocytózou v mozkomíšním moku. Dále zjistili, že ze 110 pacientů s prokázanou LNB měli koncentraci CXCL13 pod 29 pg.ml^{-1} pouze 2 pacienti a 3 pacienti s LNB měli koncentraci CXCL13 menší než 130 pg.ml^{-1} . Z toho vyplývá, že význam stanovení koncentrace CXCL13 v mozkomíšním moku pro diagnostiku LNB význam má. [6] Největší diagnostický význam stanovení koncentrace CXCL13 by byl u pacientů, kterým byla v mozkomíšním moku stanovena pleocytóza, ale AI byl negativní. Pokud by byla koncentrace CXCL13 vysoká, podporovalo by to diagnózu LNB. Nebo u pacientů bez pleocytózy s pozitivním AI. U těchto pacientů byla koncentrace CXCL13 většinou nízká, což by podporovalo stádium odeznívající LNB. Většina těchto pacientů už měla příznaky delší dobu. [7]

Henningsson a kol. porovnávali dva diagnostické testy pro stanovení koncentrace CXCL13 - Quantikine ELISA (R & D Systems, USA) a testu na bázi kuliček recomBead CXCL13 (Mikrogen Diagnostik, Německo). Zjistili, že mezní hodnota koncentrace CXCL13 je závislá na použitém testu. Výrobce recomBead CXCL13 doporučuje jako hraniční hodnoty 190 – 300 pg.ml^{-1} a hodnoty nad 300 pg.ml^{-1} jsou interpretovány jako silně podporující diagnózu LNB. Tyto hodnoty jsou potvrzeny studií od Henningsson a kol. Henningsson a kol. se také domnívají, že klasifikace pacientů dle současných evropských směrnic má trhliny. Tyto směrnice řadí do jedné skupiny (možná LNB) pacienty s pleocytózou, charakteristickými příznaky, ale bez AI a pacienty s AI, ale bez pleocytózy. Henningsson a kol. doporučují rozdělit tuto skupinu na dvě

skupiny. Skupina 1 - pacienti s AI, ale bez pleocytózy, které považují za LNB proběhlou dříve. Koncentrace CXCL13 v této skupině byla nízká. Skupinu 2 by tvořili pacienti s pleocytózou, charakteristickými příznaky, ale bez AI. V této skupině byla diagnóza akutní LNB podpořena vyšší koncentrací CXCL13 u 50% vzorků (zejména u dětí). Henningsson a kol. tedy považují stanovení koncentrace CXCL13 v mozkomíšním moku za užitečný diagnostický nástroj. [31]

Cílem studie autorů Remy a kol. bylo zhodnotit diagnostický význam CXCL13 u dětí (0 – 18 let) při podezření na LNB a stanovit mezní koncentraci CXCL13 pro odlišení LNB od ostatních infekcí. Pro stanovení koncentrace CXCL13 použili diagnostickou soupravu od stejného výrobce jako je používána na OLM KNTB a.s. Zlín, tedy CXCL13 ELISA (Euroimmun, Německo). Je to první schválená souprava pro rutinní využití. Remy a kol. nachází ve stanovení koncentrace CXCL13 několik přínosů. Zvýšené hodnoty koncentrace CXCL13 podporují diagnózu LNB v případech, kdy ještě není možné stanovit AI vzhledem k negativitě protilátek. To může urychlit diagnostiku o několik týdnů. Další výhodou je, že stačí menší množství mozkomíšního moku, což se uplatní zvláště u malých dětí, u kterých bývá odběr většího množství mozkomíšního moku problémem. Do reakce se dává 50 μ l mozkomíšního moku. Malé množství vzorku navíc je potřeba u případů, kdy je koncentrace CXCL13 vyšší než koncentrace CXCL13 kalibrátoru o nejvyšší koncentraci a musí se provést nové testování ředěného vzorku. Naproti tomu například pro vyšetření protilátek třídy IgM a IgG v mozkomíšním moku metodou WB pomocí souprav firmy Testline je potřeba 1500 μ l mozkomíšního moku. Za výhodné považují Remy a kol. i relativní rychlost vyšetření – trvá asi 4 hodiny. V KNTB a.s. Zlín může trvat vyšetření všech parametrů nutných pro výpočet intratekální syntézy i týden, proto může stanovení koncentrace CXCL13 diagnostiku urychlit o několik dní. Výsledky studie Remy a kol. korelují s předchozími studiemi zahrnující dospělé pacienty. Remy a kol. doporučují používání stanovení koncentrace CXCL13 u dětí při podezření na LNB. [30]

Skogman a kol. porovnávali 3 testy pro laboratorní diagnostiku LNB (CXCL13, AI a index celkových IgM) u dětí. Za velmi důležité pro hodnocení diagnostického přínosu různých testů považují výběr dobře definovaných pacientů. V této studii se o to snažili. Skupina s možnou LNB zahrnovala pacienty s krátkou dobou neurologických příznaků, u kterých nebyla prokázána jiná bakteriální či virová infekce. V mozkomíšním moku těchto pacientů byla stanovena pleocytóza a tito pacienti dobře reagovali na antibiotickou léčbu. Výsledky této studie ukazují, že stanovení koncentrace CXCL13 v mozkomíšním moku i stanovení indexu celkových IgM podávají užitečné informace. Za zajímavé považují několik pacientů s krátkou dobou příznaků, bez pleocytózy a protilátek, ale zvýšeným CXCL13. Tito pacienti by mohli mít velmi časnou LNB a mohli být špatně zařazeni mezi pacienty bez LNB. [32]

Jelikož v rámci této bakalářské práce nebyl proveden výběr dobře definovaných pacientů, je hodnocení výsledků komplikované.

Za poměrně dobře definovanou skupinu by mohla být považována skupina dětí do 12 let, jelikož děti většinou netrpí jinými chorobami, které by mohly výsledky vyšetření ovlivnit. Z 27 dětí do 12 let mělo diagnózu LNB 20. Všechny měly koncentraci CXCL13 vyšší než 355 $\text{pg}\cdot\text{ml}^{-1}$, většina z nich měla v mozkomíšním moku stanovenou lymfocytární pleocytózu, nejčastějším projevem byla periferní paréza lícního nervu. Diagnostický přínos stanovení koncentrace

CXCL13 je určitě u 2 vzorků, u kterých nebyly stanoveny protilátky a koncentrace CXCL13 diagnózu LNB podpořila.

Přínos vyšetření koncentrace chemokinu CXCL13 v KNTB a.s. je, že může být diagnóza LNB podpořena dříve, než se vyšetří všechny parametry potřebné pro stanovení AI, pomocí kterého se odliší intratekální syntéza protilátek od protilátek pocházejících ze séra při porušené hematolikorové bariéře.

Z 249 vzorků bylo diagnostikováno minimálně 40 případů LNB a z nich 38 mělo koncentraci CXCL13 339 pg.ml⁻¹ a vyšší. Dva pacienti diagnostikovaní jako LNB měli koncentraci CXCL13 menší než 20 pg.ml⁻¹. Tito pacienti by mohli spadat do skupiny, kdy už infekce odeznívá. Nebo jelikož nebyl stanoven AI a dle biochemického výsledku se jednalo o čisté narušení hematolikorové bariéry bez lokální syntézy IgG, mohlo jít o protilátky ze séra.

Vzhledem k tomu, že koncentrace CXCL13 u většiny pacientů s LNB (38/40) vyšetřených v rámci této bakalářské práce překračovala hodnotu 339 pg.ml⁻¹, přikláněla bych se k již navrhované mezní hodnotě 250 pg.ml⁻¹. Tato hodnota byla u pacientů bez stanovené LNB překročena pouze 4 krát, ale u všech 4 pacientů (vzorky 16, 26, 57 a 88) byly zachyceny nějaké specifické protilátky proti boreliím v mozkomíšním moku, což by diagnózu LNB zcela nevylučovalo.

9. ZÁVĚR

V bakalářské práci je charakterizován původce lymské boreliózy bakterie *Borrelia burgdorferi* sensu latu. Dále je popsán jeho vztah k hostiteli a projevy lymské boreliózy. Je popsán i hlavní přenašeč lymské boreliózy, kterým je klíště rodu *Ixodes*.

Laboratorní diagnostika původce lymské boreliózy není jednoduchá vzhledem k antigenní heterogenitě komplexu *Borrelia burgdorferi* sensu latu. Metody je možné rozdělit na přímé, mezi které patří kultivace, mikroskopie a dnes nejvíce využívaná polymerázová řetězová reakce, a metody nepřímé zahrnující nepřímou imunofluorescenci, enzymovou imunoanalýzu a Western blot. Jelikož je citlivost přímých metod pro průkaz borelií nízká, využívají se dnes hlavně metody nepřímé založené na reakci antigenu a protilátky. Je navrženo dvoustupňové schéma stanovení protilátek. Jako screeningové vyšetření je nejvíce využívána metoda ELISA a ta je následně potvrzována specifitější metodou Western blot.

Pokud borelie napadnou nervový systém, hovoří se o LNB. Diagnóza LNB je podle směrnic Evropské federace neurologických společností založena na charakteristických neurologických projevech, pleocytóze v mozkomíšním moku a pozitivní intratekální syntéze protilátek. Ne vždy jsou splněny všechny tři podmínky. Problémem mohou být pacienti s charakteristickými příznaky, pleocytózou, ale bez pozitivní intratekální syntézy protilátek. Může se jednat o pacienty s LNB ve velmi časně fázi, kdy ještě nejsou vytvořeny protilátky. Na druhou stranu existují pacienti většinou s déle trvajícími příznaky, pozitivní intratekální syntézou protilátek, ale bez pleocytózy. Tito pacienti mohou být ve fázi odeznívající infekce. Oba tyto případy jsou zahrnuty mezi pacienty s možnou LNB.

Novým laboratorním markerem, který by mohl přispět k diagnostice LNB je stanovení koncentrace CXCL13 v mozkomíšním moku. Koncentrace CXCL13 bývá v mozkomíšním moku při akutní LNB značně zvýšená. Stanovení koncentrace CXCL13 by mohlo zejména přispět u případů možná LNB. U pacientů s charakteristickými příznaky, pleocytózou, ale bez pozitivní intratekální syntézy protilátek (mezi ně spadají zejména děti), vysoká koncentrace CXCL13 podporuje diagnózu LNB. U pacientů s charakteristickými příznaky, pozitivní intratekální syntézou protilátek, ale bez pleocytózy, by mohlo stanovení koncentrace CXCL13 přispět k odlišení pacientů v akutní fázi LNB od pacientů v odeznívající fázi.

Na Oddělení lékařské mikrobiologie v Krajské nemocnici T. Bati a.s. ve Zlíně se vyšetření CXCL13 začalo provádět v březnu roku 2015. Do konce července 2018 bylo vyšetřeno 249 vzorků mozkomíšního moku. U většiny případů LNB (38/40), přesahovala koncentrace CXCL13 hodnotu 339 pg.ml^{-1} . U dvou dětí byla stanovením koncentrace CXCL13 (hodnota vysoká) diagnóza LNB podpořena, jelikož tyto děti neměly ještě vytvořeny protilátky.

Výhoda zařazení vyšetření koncentrace CXCL13 v mozkomíšním moku v KNTB a.s. Zlín spočívá zejména v tom, že je hodnota většinou získána dříve, než se vyšetří všechny parametry potřebné pro výpočet intratekální syntézy protilátek, což může diagnostiku urychlit o několik dní. Navíc může stanovení koncentrace CXCL13 přispět k diagnostice LNB u případů, kdy ještě nejsou vytvořeny protilátky. To se stává zejména u dětí. Výhodou je potřeba malého množství vzorku mozkomíšního moku.

10. POUŽITÉ ZKRATKY

ACA	akrodermatitis chronica atrophicans	chronická atrofická dermatitida
AI	antibody index	protilátkový index
B3	lysis buffer	lyzační pufr
B5	wash buffer 5	promývací pufr 5
Ba	<i>Borrelia afzelii</i>	
BBK32	fibronectin binding protein	fibronektin vázající protein
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl Phosphate	
BE	elution buffer	eluční pufr
Bg	<i>Borrelia garinii</i>	
BKS	Barbour-Stoener-Kelly medium	Barbour-Stoener-Kellyho médium
BSK H	Barbour-Stoener-Kelly medium H	modifikované Barbour-Stoener-Kellyho médium
BSK II	Barbour-Stoener-Kelly medium II	modifikované Barbour-Stoener-Kellyho médium
BW	wash buffer	promývací pufr BW
CLIA	Chemiluminescence immunoassay	chemiluminiscenční imunoanalýza
CMRL	Connaught Medical Research Laboratories	
cp	circular plasmid	kruhový plazmid
CXCL	CXC chemokine ligand	
DbpA	Decorin-binding protein A	dekorin vázající protein A
DbpB	Decorin-binding protein B	dekorin vázající protein B
DNA	deoxyribonucleic acid	deoxyribonukleová kyselina
EIA	Enzyme immunoassay	enzymová imunoanalýza
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	enzymově značený imunotest s využitím pevné fáze
EM	erythema migrans	migrující erytém
Erp	OspEF related proteins	proteiny blízké s OspEF
HSV	Herpes simplex virus	
FAM	5(6)-carboxyfluorescein	
fla	flagellin gene	gen pro flagelin
FlaA	Flagellar filament outer layer protein FlaA	protein flagelární pochvy
HEX	6-carboxy-2,4,4,5,7,7 - hexachlorofluorescein succinimidyl ester	
HGA	Human granulocytic anaplasmosis	lidská granulocytární anaplazmóza
IFA	indirect immunofluorescence assay	nepřímá imunofluorescence
IgG	Immunoglobulin G	imunoglobulin G
IgM	Immunoglobulin M	imunoglobulin M
IL	Interleukin	interleukin
INFγ	Interferon gamma	interferon gama
KNTB	Krajská nemocnice Tomáše Bati	
LNB	lyme neuroborreliosis	lymská neuroborelióza
lp	linear plasmid	lineární plazmid
NapA	Neutrophil activating protein A	neutrofilní aktivační protein A
NBT	Nitroblue Tetrazolium	
OKBF	Oddělení klinické biochemie a farmakologie	

OLM	Oddělení lékařské mikrobiologie	
Osp	Outer surface protein	vnější povrchový protein
OspS	Outer surface proteins	vnější povrchové proteiny
P17	syn. DbpA (Decorin-binding protein A)	dekorin vázající protein A
P35	protein 35	protein o molekulové hmotnosti 35 kDa
P39	syn. BmpA (basic membrane protein A)	základní membránový protein A
P41	protein 41	vnitřní část flagelinu
P44	protein 44	
P58	syn. OppA 2 (oligopeptide ABC transporter, periplasmic oligopeptide-binding protein)	oligopeptidová permeáza 2, membránový transportér
P66	protein 66	vnější povrchový protein P66
P83	protein 83	hlavní extracelulární protein
PCR	polymerase chain reaction	polymerázová řetězová reakce
recA	gene <i>recA</i>	gen <i>recA</i>
RLU	relative light unit	relativní světelné jednotky
rRNA	ribosomal ribonukleotid acid	ribozomální ribonukleová kyselina
TMB	tetramethylbenzidin	
TNFα	tumor necrosis factor alpha	tumor nekrotizující faktor alfa
TpN17	<i>Treponema pallidum</i> antigen	membránový protein <i>Treponema pallidum</i>
UDG	Uracil-DNA-glycosylase	uracil-DNA-glykosidáza
USA	United States of America	Spojené státy americké
VlsE	Variable major protein-like sequence, expressed	Variable major protein-like sequence, expressed
VZV	Varicella zoster virus	
WB	Western blot	

11. SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Interpretace výsledků z analyzátoru LIAISON XL pro protilátky proti <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato [25]	36
Tabulka 2: Stripy v Blot-line <i>Borrelia</i> /HGA IgM obsahují tyto specifické antigeny – převzato a upraveno z [26]	37
Tabulka 3: Stripy v Blot-line <i>Borrelia</i> /HGA IgG obsahují tyto specifické antigeny – převzato a upraveno z [26]	37
Tabulka 4: Celkové vyhodnocení testu BLOT-LINE <i>Borrelia</i> /HGA IgM – převzato z [26]	41
Tabulka 5: Celkové vyhodnocení testu BLOT-LINE <i>Borrelia</i> /HGA IgG – převzato z [26]	41
Tabulka 6: Interpretace výsledků CXCL13 – převzato z [27]	45
Tabulka 7: Přehled ostatních nálezů vzhledem ke koncentraci CXCL13	55
Tabulka 8: Výsledky a nálezy u 50 pacientů za období červen-červenec 2018	56
Tabulka 9: Přehled výsledků pro soubor 50 pacientů za období červen-červenec 2018	57
Tabulka 10: Přehled výsledků u skupiny – děti do 12 let	58

12. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato zachycená elektronovým mikroskopem (zvětšeno 15 000x).....	11
Obrázek 2: Vysunuté bičíky pod ztenčenou povrchovou membránou, ze které jsou vylučovány membranózní vezikuly - zachyceno elektronovým mikroskopem (zvětšení 80 000x).....	12
Obrázek 3: <i>Ixodes ricinus</i> – vlevo nahoře - dospělá samice, vpravo nahoře – nymfa, vlevo dole – dospělý samec, vpravo dole – larva	14
Obrázek 4: <i>Erythema migrans</i>	15
Obrázek 5: Boreliový lymfocytom.....	16
Obrázek 6: <i>Acrodermatitis chronica atrophicans</i>	16
Obrázek 7: Průběh PCR	23
Obrázek 8: Vyhodnocení PCR pomocí gelové elektroforézy.....	23
Obrázek 9: Princip testu ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay).....	25
Obrázek 10: Typický imunoblotový profil pro pozitivní kontrolu a séra pacientů se specifickými příznaky lymeské boreliózy	26
Obrázek 11: Lumbální punkce.....	28
Obrázek 12: Reiberův diagram.....	31
Obrázek 13: A - Analyzátor LIAISON XL, B – reakční nádobka	33
Obrázek 14: A – prostor pro zásobníky s destilovanou vodou, promývacím roztokem a nádobou na pevný odpad; B – prostor pro vzorky	33
Obrázek 15: A – chlazený prostor pro reagenční integrály, B - stojánek se vzorky	33
Obrázek 16: Reagenční integrál pro stanovení protilátek třídy IgM.....	34
Obrázek 17: Lahvičky s kontrolami (DiaSorin S.p.A., Itálie)	35
Obrázek 18: Reagenční integrál pro stanovení protilátek třídy IgG.....	35
Obrázek 19: Soupravy BLOT-LINE <i>Borrelia</i> /HGA IgM a IgG – potřebné reagensie (univerzální roztok, konjugáty, substrát, stripy s rekombinantními antigeny, protokol)	38
Obrázek 20: A - AUTOBLOT 3000 – vzadu peristaltická čerpadla pro dávkování reagensí, kývavý pohyb vaničky zajišťuje dokonalé smáčení stripů; B – připravené vzorky, pipety, pipetovací špičky.....	39
Obrázek 21: Promývání - odsátí a dávkování univerzálního roztoku.....	39

Obrázek 22: Stripy ve vaničce po provedení testu.....	40
Obrázek 23: Stripy pro vyšetření protilátek třídy IgM nalepené na vyhodnocovacím protokolu	40
Obrázek 24: A – počítač, skener a protokoly před vyhodnocením, B – Immunoblot Software pro vyhodnocení.....	41
Obrázek 25: Obsah soupravy pro stanovení CXCL13 metodou ELISA.....	42
Obrázek 26: A – třepačka BIOSAN Ltd., Lotyšsko, B - mikrotitrační destička na třepačce.....	43
Obrázek 27: A - Promývací linka, Dynatech, USA, B – detail promývacího kroku.....	43
Obrázek 28: Mikrotitrační destička se substrátem – barví se modře	44
Obrázek 29: A – mikrotitrační destička po přidání zastavovacího roztoku, B – Spektrofotometr MRX II (Dy nex Technologies, USA) s příslušenstvím	44
Obrázek 30: Potřebné reagentie pro izolaci DNA.....	46
Obrázek 31: Laminární box pro izolaci DNA.....	47
Obrázek 32: A – pipetování vzorku pomocí špičky s filtrem, B – Termostat (BIOSAN Ltd., Lotyšsko)	47
Obrázek 33: A – vortex (BIOSAN Ltd., Lotyšsko), B – centrifuga Minispin (Eppendorf, Německo)	48
Obrázek 34: A – zabalená čistá kolonka, B – vzorek krve v kolonce vložené do zkumavky před centrifugací, C – zkumavky s filtrátem po centrifugaci – zleva vzorek krve, punktátu, mozkomíšního moku	48
Obrázek 35: Dole – zkumavka s izolátem, nahoře kolonka na vyhození	49
Obrázek 36: Souprava pro PCR reakci Geneproof Borrelia burgdorferi	50
Obrázek 37: Box s UV zářičem (BIOSAN Ltd., Lotyšsko).....	50
Obrázek 38: Pipetování MasterMixu do destičky pro PCR reakci.....	51
Obrázek 39: Termocykler LightCykler®480II s příslušenstvím	51

13. SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Soubor pacientů – rozložení dle věku a pohlaví.....	53
Graf 2: Srovnání výsledků vyšetření protilátek třídy IgM metodou CLIA a WB	54
Graf 3: Srovnání výsledků vyšetření protilátek třídy IgG metodou CLIA a WB	55

14. SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1:	Naměřená a vyhledaná data všech 249 vzorků
Příloha 2:	Přehled výsledků všech 249 pacientů – uvedeny počty vzorků pro jednotlivé kategorie
Příloha 3:	Naměřená a vyhledaná data skupiny 50 pacientů za období červen – červenec 2018 (posledních 50 vzorků)
Příloha 4:	Přehled vyšetření v souboru – děti do 12 let

15. POUŽITÁ LITERATURA

- [1] Bartůněk P. a kol. *Lymeská borelióza 4., přepracované a doplněné vydání*. Praha: Grada, 2013. 157 s. ISBN 978-80-247-4355-4.
- [2] Buhner S.H. *Borelióza: Přírodní prevence a bylinná léčba lymeské boreliózy a jejích koinfekcí*. 1. vydání, Praha: Triton, 2014. 76 s. ISBN 978-80-7387-780-4.
- [3] Roháčová H. *Lymeská borelióza*. 1. vydání. Praha: Maxford, 2005. 76 s. ISBN 80-7345-071-2.
- [4] Cerar T., Ogrinc K., Lotrič-Furlan S., Kobal J., Levičnik-Stežinar S., Strle F., Ružič-Sabljić E. *Diagnostic Value of Cytokines and Chemokines in Lyme Neuroborreliosis*. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2013, 20(10): 1578-1584.
- [5] Pietikäinen A., Maksimow M., Kauko T., Hurme S., Salmi M., Hytönen J. *Cerebrospinal fluid cytokines in Lyme neuroborreliosis*. *Jurnal of Neuroinflammation*. 2016, 13(1):273.
- [6] Pícha D., Moravcová L., Smíšková D. *Prospective study on the chemokine CXCL13 in neuroborreliosis and other aseptic neuroinfections*. *Journal of the Neurological Sciences*. 2016, 368:214-220.
- [7] Pícha D., Moravcová L., Smíšková D. *Diagnostický význam chemokinu CXCL13 a protilátek proti C6 peptidu u pacientů s neuroborreliózou*. *Epidemiologie, mikrobiologie, imunologie*. 2017, 66(2): 80-85.
- [8] Lohr B., Fingerle V., Norris D. E., Hunfeld K. P. *Laboratory diagnosis of Lyme borreliosis: Current state of the art and future perspectives*. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*. 2018, 55(4): 219-245.
- [9] Havrdová E. a kol. *Neuroimunologie*. 1.vydání. Praha: Maxdorf, 2001. 451 s. (309 - 317 s.) ISBN 80-85912-24-4.
- [10] Agüero-Rosenfeld M.E., Wang G., Schwartz I., Wormser G.P. *Diagnosis of lyme borreliosis*. *Clinical Microbiology Reviews*. 2005, 18(3): 484-509.
- [11] Křupka M. , Raška M., Weigl E. *Lymeská borelióza – biologie, patogeneze, diagnostika a léčba*. *Dermatologie pro praxi*. 2008, 2(5-6): 236-239.
- [12] Dlouhý P., Honegr K., Krbková L., Pícha D., Roháčová H. *Lymeská borelióza: Doporučený postup v diagnostice, léčbě a prevenci*. [Online] Publikováno květen 2011. [Citace: 7. 11 2017.] Dostupné z: <http://infekce.cz/DoporLB11.htm>.
- [13] Kennedy M. R., Lenhart T. R., Ankins D. R. *The Role of Borrelia burgdorferi Outer Surface Proteins*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 2012, 66(1): 1-19.
- [14] Comstedt P., Hanner M., Schüler W., Meinke A., Lundberg U. *Design and development of a novel vaccine for protection against Lyme borreliosis*. *PLOS ONE*. 2014, 9(11): 1-12.

- [15] Marques A. R. *Lyme Neuroborreliosis*. Continuum (Minneapolis, Minn). 2015, 21(6): 1721-1744.
- [16] Marques A. R. *Laboratory diagnosis of Lyme disease: advances and challenges*. Infectious Disease Clinics of North America. 2015, 29(2):295–307.
- [17] Dušek P. *Diagnostika lymeské boreliózy*. [Online] Publikováno leden 2011. [Citace: 3. 7 2018.] Dostupné z: http://pavel.duskovi.info/skola/medicina/Diagnostika_lymeske_boreliozy.pdf.
- [18] Gurčík L. *Súčasný trendy v diagnostice a léčbě neuroboreliózy*. Neurologie pro praxi. 2009, 10(3):184-190.
- [19] Votava M. a kol. *Lékařská mikrobiologie II. Přehled vyšetřovacích metod v lékařské mikrobiologii*. Brno: Masarykova univerzita, 2003. 309 s. ISBN 80-210-2272-8.
- [20] Henningsson A. J., Christiansson M., Tjernberg I., Löfgren S., Matussek A. *Laboratory diagnosis of Lyme neuroborreliosis: a comparison of three CSF anti-Borrelia antibody assays*. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases. 2014, 33: 797-803.
- [21] Ryffel K., Oliver P., Luc B., Dayer E. *Interpretation of immunoblots for Lyme borreliosis using a semiquantitative approach*. Clinical Microbiology and Infection. 1998, 4(4): 205-212.
- [22] Moniuszko A., Czupryna P., Pancewicz S., Rutkowski K., Zajkowska O., Swierzbńska R., Grygorczuk S., Kondrusik M., Owłasiuk P., Zajkowska J. *Evaluation of CXCL8, CXCL10, CXCL11, CXCL12 and CXCL13 in serum and cerebrospinal fluid of patients with neuroborreliosis*. Immunology Letters. 2014, 157(1-2):45-50.
- [23] Sobek O., Adam P., Kelbich P., Koudelková M., Doležil D., Kasík J., Hajduková L., Krušina M., Hybeřlová M. *Vyšetření likvoru – současné možnosti*. Neurologie pro praxi. 2009, 10(5): 280-284.
- [24] Anonymous. *Reiberův diagram*. WikiSripta. [Online] 07. 02 2015. [Citace: 14. 08 2018.] https://www.wikiskripta.eu/w/Reiber%C5%AFv_diagram.
- [25] Příbalové letáky k diagnostickým soupravám LIAISON® Borrelia IgM Quant, LIAISON® Borrelia IgG a příručka uživatele pro obsluhu analyzátoru LIAISON XL. DiaSorin S.p.A., Itálie.
- [26] Příbalové letáky k diagnostickým soupravám Blot-line Borrelia/HGA IgM, Blot-line Borrelia/HGA IgG. Testline Clinical Diagnostics s.r.o., Česká republika. 2018.
- [27] Příbalový leták k diagnostické soupravě CXCL13 ELISA. EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika, Německo. 2018, verze: 11/6/2018.
- [28] Příbalové letáky GeneProof PathogenFree DNA Isolation Kit a Borrelia burgdorferi PCR Kit. GeneProof a.s., Česká republika. 2017.

- [29] Wutte N., Archelos J., Crowe B.A., Zenz W., Daghofer E., Fazekas F., Aberer E. *Laboratory diagnosis of Lyme neuroborreliosis is influenced by the test used: Comparison of two ELISAs, immunoblot and CXCL13 testing.* Journal of the Neurological Sciences. 2014, 347: 96-103.
- [30] Remy M. M., Schöbi N., Kottanattu L., Pfister S., Duppenhaler A., Suter-Riniker F. *Cerebrospinal fluid CXCL13 as a diagnostic marker of neuroborreliosis in children: a retrospective case-control study.* Journal of Neuroinflammation. 2017, 14:173.
- [31] Henningsson A. J., Gyllemark P., Lager M., Skogman B.H., Tjernberg I. *Evaluation of two assay for CXCL13 analysis in cerebrospinal fluid for laboratory diagnosis of Lyme neuroborreliosis.* Acta pathologica, microbiologica et immunologica scandinavica. 2016, 7: 985-990.
- [32] Skogman B.H., Lager M., Henningsson A.J., Tjernberg I. *The recomBead Borrelia antibody index, CXCL13 and total IgM index for laboratory diagnosis of Lyme neuroborreliosis in children.* European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases. 2017, 36(11): 2221-2229.

Příloha 1: Naměřená a vyhledaná data všech 249 vzorků

vzorek	rok	měsíc	věk	pohlaví	CXCL13 pg/ml	CLIA - LIAISON				WB		PCR	Ostatní nálezy	Příznaky	Závěr
						IgM (2,5-3,5)		IgG (4,5-5,5)		IgM	IgG				
						AU/ml		AU/ml							
1	2015	3	67	m	12,86	0,00	N	1,40	N	N	H				
2	2015	4	40	ž	13,4	0,00	N	3,70	N	N	H				
3	2015	4	54	ž	56,3	0,00	N	< 0,2	N	N	N			retrobulbární neuritida	
4	2015	4	42	ž	16,9	0,00	N	< 0,2	N						
5	2015	5	28	m	5,372	0,00	N	< 0,2	N	N	N				
6	2015	6	41	m	6,938	0,58	N	5,10	H	N	H				
7	2015	6	22	ž	4,351	0,00	N	< 0,2	N	N	N				
8	2015	6	8	m	494,145	9,50	P	48,40	P	N	H	N		PPLN	LNB
9	2015	6	26	m	19,59	3,80	P	17,40	P	N	P		KENC M+G+	bolest hlavy	KME
10	2015	6	61	m	15,19	0,00	N	3,80	N	N	H				
11	2015	6	31	ž	9,67	8,50	P	< 0,2	N	N			KENC M-G+		
12	2015	7	38	m	37,57	0,15	N	9,50	P	N	H			bolest hlavy, viróza	NI vyloučena
13	2015	7	64	m	158,39	20,80	P	1,40	N	N	H		KENC M+G+		KME
14	2015	7	87	ž	7689,1	24,70	P	> 240	P	P	P			PPLN	LNB
15	2015	8	31	m	31,37	5,00	P	< 0,2	N	N	N		KENC M+G-		KME
16	2015	8	53	m	1440,06	18,00	P	18,90	P	H	N			TBC basilární meningitida	
17	2015	8	68	ž	26,95	0,00	N	< 0,2	N	N	N			infekce HCD	
18	2015	8	76	m	24,4	0,00	N	34,10	P	N	P				
19	2015	8	16	ž	36,301	0,00	N	< 0,2	N	N	N	N		PPLN	jiné poruchy LN
20	2015	8	11	m	9447,56	63,10	P	> 240	P	N	P		KENC M-G+	PPLN	LNB

Vysvětlivky: N – negativní, H – hraniční, P – pozitivní, CLIA – chemiluminiscenční imunoanalýza, WB – Western blot, PCR – polymerázová řetězová reakce, KENC – klíšťová encefalitida, HSV – herpes simplex virus, VZV – varicella zoster virus, KME – klíšťová meningoencefalitida, Anaplas – *Anaplasma phagocytophilum*, LNB – neuroborelióza, PPLN – periferní paréza lícního nervu, HCD – horní cesty dýchací, ME – meningoencefalitida, NI – neuroinfekce, TBC – tuberkulóza, DK – dolní končetina, BS -Bannwarthův syndrom, B-G – Guillainův-Barrého syndrom, RS – roztroušená skleróza, LB – Lymfská borelióza, AI – antibody index, M – IgM, G - IgG

Příloha 1: Naměřená a vyhledaná data všech 249 vzorků

vzorek	rok	měsíc	věk	pohlaví	CXCL13 pg/ml	CLIA - LIAISON				WB		PCR	Ostatní nálezy	Příznaky	Závěr
						IgM (2,5-3,5)		IgG (4,5-5,5)		IgM	IgG				
						AU/ml		AU/ml							
21	2015	8	53	m	205,152	0,23	N	0,29	N	N	N			myelitida s paraparézou DK	
22	2015	8	55	m	64,83	3,74	P	42,74	P	N	P			poruchy řeči, slabost, pokles koutku	herp.encefal.
23	2015	8	19	ž	28,98	4,21	P	< 0,2	N	N	N			meningitidis při bakt. Infekci	
24	2015	9	63	ž	181,6	144,90	P	235,80	P	P				herpetická encefalitida	
25	2015	9	10	m	1335,36	47,95	P	> 240	P	H	H	N	AI M+ G+	PPLN	LNB
26	2015	9	63	ž	372,17	104,00	P	> 240	P	P	P	N		herpetická encefalitida	
27	2015	9	51	m	11,44	0,18	N	35,36	P	N	H				
28	2015	9	64	m	16,317	9,18	P	56,71	P	N	P			polyradikulitida	LNB
29	2015	9	57	m	15,562	0,00	N	2,67	N	N	H				
30	2015	10	25	m	34,41	4,32	P	1,11	N	N	N			aseptická meningitida při LB	
31	2015	10	47	ž	1156,77	84,44	P	> 240	P	N	P			bolesti páteře, zhoršená jemná motor.	LNB + RS
32	2015	10	20	ž	79,5	0,00	N	3,45	N	N	H			porucha vidění	RS
33	2015	10	73	ž	19,7	5,72	P	0,34	N	N	N				
34	2015	10	49	m	over	72,15	P	> 240	P	P	P			PPLN	LNB
35	2015	11	11	ž	over	> 190	P	200,50	P	H	P			PPLN	LNB
36	2015	11	9	ž	13369,7	59,42	P	90,84	P	N	H			meningeální syndrom	LNB
37	2015	12	63	m	18,775	3,81	P	0,43	N	N	N				
38	2015	12	56	m	6,62	0,00	N	76,68	P	N	P				
39	2016	1	54	m	14,229	3,82	P	64,38	P	N	P			PPLN, únava	LNB
40	2016	1	45	m	39,063	0,56	N	< 0,2	N	H	N			endokarditida + ME	

Vysvětlivky: N – negativní, H – hraniční, P – pozitivní, CLIA – chemiluminiscenční imunoanalýza, WB – Western blot, PCR – polymerázová řetězová reakce, KENC – klíšťová encefalitida, HSV – herpes simplex virus, VZV – varicella zoster virus, KME – klíšťová meningoencefalitida, Anaplas – *Anaplasma phagocytophilum*, LNB – neuroborelióza, PPLN – periferní paréza lícního nervu, HCD – horní cesty dýchací, ME – meningoencefalitida, NI – neuroinfekce, TBC – tuberkulóza, DK – dolní končetina, BS -Bannwarthův syndrom, B-G – Guillainův-Barrého syndrom, RS – roztroušená skleróza, LB – Lymská borelióza, AI – antibody index, M – IgM, G – IgG

Příloha 1: Naměřená a vyhledaná data všech 249 vzorků

vzorek	rok	měsíc	věk	pohlaví	CXCL13 pg/ml	CLIA - LIAISON				WB		PCR	Ostatní nálezy	Příznaky	Závěr
						IgM (2,5-3,5)		IgG (4,5-5,5)		IgM	IgG				
						AU/ml		AU/ml							
41	2016	1	16	m	71,503	0,00	N	< 0,2	N	N	N	N		zvracení, asept. ME	
42	2016	2	52	m	32,239	0,26	N	35,65	P	N	H			kořenový syndrom-hernie disku	
43	2016	3	54	m	11	11,09	P	0,97	N	N	N				
44	2016	4	83	ž	9,61	4,11	P	< 0,2	N	N	N		KENC M-G+		
45	2016	4	58	ž	59,16	3,54	P	48,12	P	N	P		KENC M+G+		KME
46	2016	5	59	m	29,554	0,68	N	11,54	P	N	H		VZV +	pravostraná paréza, ME	
47	2016	5	44	m	123,936	16,29	P	< 0,2	N	N	N		KENC M+G+		KME
48	2016	5	7	ž	491,108	38,92	P	35,23	P	N	H	N		PPLN	LNB
49	2016	5	53	ž	21,997	1,57	N	19,37	P	N	N			cervikobrachiální syndrom	NB vyloučena
50	2016	5	5	m	844,994	10,16	P	5,81	P	N	N			bolest hlavy	LNB
51	2016	6	64	m	76,625	3,74	P	38,94	P	N	P		KENC M-G+	bolest hlavy, febrilie	G-B syndrom
52	2016	6	75	m	5167,36	86,21	P	> 240	P	N	P			bolest páteře, paraparéza DK	LNB
53	2016	6	5	ž	551,28	162,90	P	46,71	P	P	H	N		PPLN	LNB
54	2016	6	64	m	339,575	27,46	P	107,00	P	N	P		KENC M+G+	G-B syndrom	LNB
55	2016	7	73	m	7141,38	> 190	P	167,80	P	P	P			PPLN	LNB
56	2016	7	7	ž	1224,693	18,32	P	> 240	P	N	P	N		PPLN	LNB
57	2016	7	80	ž	7705,16	36,19	P	> 240	P	N	H				?
58	2016	7	64	m	240,65	7,02	P	15,38	P	N	H			Staphylococcus epidermidis v likvoru	
59	2016	8	6	ž	459,324	56,03	P	48,09	P	N	H	P		PPLN	LNB
60	2016	8	46	m	34585	16,95	P	> 240	P	H	P		Anapla M+ G-	PPLN	LNB

Vysvětlivky: N – negativní, H – hraniční, P – pozitivní, **CLIA** – chemiluminiscenční imunoanalýza, **WB** – Western blot, **PCR** – polymerázová řetězová reakce, **KENC** – klíšťová encefalitida, **HSV** – herpes simplex virus, **VZV** – varicella zoster virus, **KME** – klíšťová meningoencefalitida, Anaplas – *Anaplasma phagocytophilum*, **LNB** – neuroborelióza, **PPLN** – periferní paréza lícního nervu, **HCD** – horní cesty dýchací, **ME** – meningoencefalitida, **NI** – neuroinfekce, **TBC** – tuberkulóza, **DK** – dolní končetina, **BS** -Bannwarthův syndrom, **B-G** – Guillainův-Barrého syndrom, **RS** – roztroušená skleróza, **LB** – Lymská borelióza, **AI** – antibody index, **M** – IgM, **G** – IgG

Příloha 1: Naměřená a vyhledaná data všech 249 vzorků

vzorek	rok	měsíc	věk	pohlaví	CXCL13 pg/ml	CLIA - LIAISON				WB		PCR	Ostatní nálezy	Příznaky	Závěr
						IgM (2,5-3,5)		IgG (4,5-5,5)		IgM	IgG				
						AU/ml		AU/ml							
61	2016	8	11	m	16,156	0,00	N	< 0,2	N	N	N	N			
62	2016	8	4	ž	775,82	25,30	P	48,98	P	N	H	P		bolest hlavy, schvácen.	LNB
63	2016	8	54	m	378,89	4,62	P	> 240	P	N	P			bolest hrudníku, klíště	LNB
64	2016	8	60	m	8,919	0,60	N	5,17	H	N	P		KENC M+ G+		KME
65	2016	8	84	m	232,205	0,00	N	10,43	P	N	H		VZV +	PPLN	
66	2016	9	61	m	113,986	0,66	N	17,02	P	N	H		KENC M+ G+		KME
67	2016	9	16	ž	9,647	0,00	N	< 0,2	N	N	N	N			
68	2016	9	12	m	355,53	4,38	P	0,29	N	N	N	N		zvracení, bolest hlavy	LNB
69	2016	9	64	m	9,69	76,64	P	> 240	P	N	P	N		neuroinfekce	
70	2016	9	21	ž	38,57	31,87	P	< 0,2	N	N	N		Anapla Mh G-	bolest hlavy	LNB nelze vyloučit
71	2016	9	39	m	6,72	0,00	N	3,75	N	N	H				
72	2016	9	33	m	5,29	5,29	N	0,65	N	N	N				
73	2016	9	42	m	8,15	0,00	N	< 0,2	N	N	N				
74	2016	9	72	ž	12,36	0,00	N	< 0,2	N	N	N				
75	2016	9	65	ž	8,79	0,00	N	< 0,2	N	N	N				
76	2016	10	65	m	10,795	0,00	N	49,86	P	N	P				
77	2016	10	72	m	10,518	0,29	N	43,82	P	N	P				
78	2016	10	46	m	9,546	0,00	N	< 0,2	N	N	N				
79	2016	10	37	ž	7,713	0,00	N	< 0,2	N	N	N				
80	2016	10	6	ž	6775,8	62,04	P	> 240	P	N	P			PPLN, klíště	LNB

Vysvětlivky: N – negativní, H – hraniční, P – pozitivní, CLIA – chemiluminiscenční imunoanalýza, WB – Western blot, PCR – polymerázová řetězová reakce, KENC – klíšťová encefalitida, HSV – herpes simplex virus, VZV – varicella zoster virus, KME – klíšťová meningoencefalitida, Anaplas – *Anaplasma phagocytophilum*, LNB – neuroborelióza, PPLN – periferní paréza lícního nervu, HCD – horní cesty dýchací, ME – meningoencefalitida, NI – neuroinfekce, TBC – tuberkulóza, DK – dolní končetina, BS -Bannwarthův syndrom, B-G – Guillainův-Barrého syndrom, RS – roztroušená skleróza, LB – Lymeská borelióza, AI – antibody index, M – IgM, G – IgG

Příloha 1: Naměřená a vyhledaná data všech 249 vzorků

vzorek	rok	měsíc	věk	pohlaví	CXCL13 pg/ml	CLIA - LIAISON				WB		PCR	Ostatní nálezy	Příznaky	Závěr
						IgM (2,5-3,5)		IgG (4,5-5,5)		IgM	IgG				
						AU/ml		AU/ml							
81	2016	10	59	m	9,272	0,00	N	5,58	P	N	H				
82	2016	11	6	ž	12199	38,79	P	46,39	P	N	H	N		PPLN	LNB
83	2016	11	70	ž	7,511	0,00	N	0,88	N	N	N				
84	2016	11	77	m	5,607	0,00	N	14,96	P	N	H				
85	2016	11	66	m	8,583	0,77	N	15,89	P	N	H				
86	2016	11	26	m	30,574	1,00	N	188,20	P	N	H			aseptická ME	
87	2016	11	42	m	8,036	0,00	N	< 0,2	N	N	N				
88	2016	12	9	m	593,6	1,50	N	1,04	N	N	N	P		PPLN	LNB
89	2016	12	43	ž	10,9	0,00	N	< 0,2	N	N	N				
90	2016	12	38	ž	9,995	6,19	P	< 0,2	N	N	N				
91	2016	12	67	m	9,347	0,46	N	1,49	N	N	H				
92	2016	12	4	m	10,268	4,09	N	< 0,2	N	N	N	N			
93	2017	1	46	m	11,44	0,00	N	< 0,2	N	N	N		KENC M-G+		
94	2017	1	32	ž	10,262	0,00	N	< 0,2	N	N	N				
95	2017	1	50	m	8,595	0,00	N	< 0,2	N	N	N				
96	2017	1	72	ž	12,4	1,49	N	> 240	P	N	P				
97	2017	2	16	m	21,8	103,40	P	< 0,2	N	N	N	N		G-B syndrom, parestezie DK	
98	2017	2	71	ž	508,538	7,44	P	1,72	N	N	H			zmatenost, aseptická ME	
99	2017	2	27	m	10,495	0,00	N	< 0,2	N	N	N				
100	2017	2	40	m	13,207	0,00	N	< 0,2	N	N	N				

Vysvětlivky: N – negativní, H – hraniční, P – pozitivní, CLIA – chemiluminiscenční imunoanalýza, WB – Western blot, PCR – polymerázová řetězová reakce, KENC – klíšťová encefalitida, HSV – herpes simplex virus, VZV – varicella zoster virus, KME – klíšťová meningoencefalitida, Anaplas – *Anaplasma phagocytophilum*, LNB – neuroborelióza, PPLN – periferní paréza lícního nervu, HCD – horní cesty dýchací, ME – meningoencefalitida, NI – neuroinfekce, TBC – tuberkulóza, DK – dolní končetina, BS -Bannwarthův syndrom, B-G – Guillainův-Barrého syndrom, RS – roztroušená skleróza, LB – Lymfská borelióza, AI – antibody index, M – IgM, G – IgG

Příloha 1: Naměřená a vyhledaná data všech 249 vzorků

vzorek	rok	měsíc	věk	pohlaví	CXCL13 pg/ml	CLIA - LIAISON				WB		PCR	Ostatní nálezy	Příznaky	Závěr
						IgM (2,5-3,5)		IgG (4,5-5,5)		IgM	IgG				
						AU/ml		AU/ml							
101	2017	2	20	ž	9,92	0,00	N	< 0,2	N	N	N				
102	2017	2	54	ž	13,233	0,00	N	< 0,2	N	N	N				
103	2017	3	19	m	7,926	0,00	N	< 0,2	N	N	N				
104	2017	3	43	m	12,919	0,00	N	< 0,2	N	N	N				
105	2017	3	35	ž	5,352	0,00	N	< 0,2	N	N	N				
106	2017	3	25	ž	7,186	0,00	N	< 0,2	N	N	N				
107	2017	3	32	m	6,139	0,00	N	< 0,2	N	N	N				
108	2017	3	25	ž	5,34	0,00	N	< 0,2	N	N	N				
109	2017	3	22	m	5,25	0,00	N	< 0,2	N	N	N				
110	2017	3	54	m	6,558	0,00	N	< 0,2	N	N	N				
111	2017	3	62	ž	8,042	0,00	N	< 0,2	N	N	N				
112	2017	3	65	ž	235,637	0,00	N	< 0,2	N	N	N			hemipareza LHK	tumor mozku
113	2017	3	42	ž	5,991	12,43	P	< 0,2	N	H	N			Bezvědomí, křeče končetin	epilepsie
114	2017	4	23	ž	5,948	0,00	N	< 0,2	N	N	N				
115	2017	4	36	ž	4,145	0,00	N	< 0,2	N	N	N				
116	2017	4	75	ž	4,021	0,00	N	3,55	N	N	N				
117	2017	4	39	ž	5,379	0,00	N	0,23	N	N	N				
118	2017	4	67	ž	6,909	0,64	N	< 0,2	N	N	N				
119	2017	4	51	m	5,068	3,76	P	8,42	P	N	N			epileptický paroxysmus	
120	2017	4	71	ž	6,868	3,34	H	0,43	N	H	N		HSV1 +		

Vysvětlivky: N – negativní, H – hraniční, P – pozitivní, CLIA – chemiluminiscenční imunoanalýza, WB – Western blot, PCR – polymerázová řetězová reakce, KENC – klíšťová encefalitida, HSV – herpes simplex virus, VZV – varicella zoster virus, KME – klíšťová meningoencefalitida, Anaplas – *Anaplasma phagocytophilum*, LNB – neuroborelióza, PPLN – periferní paréza lícního nervu, HCD – horní cesty dýchací, ME – meningoencefalitida, NI – neuroinfekce, TBC – tuberkulóza, DK – dolní končetina, BS -Bannwarthův syndrom, B-G – Guillainův-Barrého syndrom, RS – roztroušená skleróza, LB – Lymfská borelióza, AI – antibody index, M – IgM, G – IgG

Příloha 1: Naměřená a vyhledaná data všech 249 vzorků

vzorek	rok	měsíc	věk	pohlaví	CXCL13 pg/ml	CLIA - LIAISON				WB		PCR	Ostatní nálezy	Příznaky	Závěr
						IgM (2,5-3,5)		IgG (4,5-5,5)		IgM	IgG				
						AU/ml		AU/ml							
121	2017	4	36	m	6,274	0,46	N	< 0,2	N	N	N				
122	2017	4	61	m	5,41	1,19	N	< 0,2	N	N	N				
123	2017	4	74	m	6,839	0,00	N	91,44	P	N	P				
124	2017	4	42	ž	5,665	0,00	N	< 0,2	N	N	N				
125	2017	5	62	ž	5,246	0,00	N	< 0,2	N	N	N				
126	2017	5	43	ž	4,99	0,00	N	< 0,2	N	N	N				
127	2017	5	65	ž	4,099	0,00	N	< 0,2	N	N	N		KENC M- GH		
128	2017	5	60	ž	4,312	0,00	N	< 0,2	N	N	N				
129	2017	5	41	m	6,557	0,29	N	2,39	N	N	H				
130	2017	5	37	ž	> 10000	>190	P	155,3	P	P	P		Anapla M+ G+	bilaterální paréza	LNB
131	2017	5	60	m	11,081	0,35	N	23,07	P	N	P				
132	2017	6	60	m	5,766	0,11	N	14,9	P	N	P				
133	2017	6	7	m	> 10000	19,67	P	56,21	P	N	P	N		PPLN, bolest hlavy	LNB
134	2017	6	65	ž	9,747	0,00	N	< 0,2	N	N	N				
135	2017	6	73	ž	9,06	0,00	N	6,14	P	N	P				
136	2017	6	44	ž	9,38	0,00	N	< 0,2	N	N	N				
137	2017	8	51	ž	9,241	0,00	N	< 0,2	N	N	N				
138	2017	8	66	m	9673,41	159,90	P	> 240	P	H	P			bolest páteře, PPLN, BS	LNB
139	2017	8	59	ž	33,461	3,15	H	< 0,2	N	N	N		KENC M+ G+		KME
140	2017	8	70	m	11,924	0,50	N	21,61	P	N	P				

Vysvětlivky: N – negativní, H – hraniční, P – pozitivní, CLIA – chemiluminiscenční imunoanalýza, WB – Western blot, PCR – polymerázová řetězová reakce, KENC – klíšťová encefalitida, HSV – herpes simplex virus, VZV – varicella zoster virus, KME – klíšťová meningoencefalitida, Anaplas – *Anaplasma phagocytophilum*, LNB – neuroborelióza, PPLN – periferní paréza lícního nervu, HCD – horní cesty dýchací, ME – meningoencefalitida, NI – neuroinfekce, TBC – tuberkulóza, DK – dolní končetina, BS -Bannwarthův syndrom, B-G – Guillainův-Barrého syndrom, RS – roztroušená skleróza, LB – Lymfská borelióza, AI – antibody index, M – IgM, G – IgG

Příloha 1: Naměřená a vyhledaná data všech 249 vzorků

vzorek	rok	měsíc	věk	pohlaví	CXCL13 pg/ml	CLIA - LIAISON				WB		PCR	Ostatní nálezy	Příznaky	Závěr
						IgM (2,5-3,5)		IgG (4,5-5,5)		IgM	IgG				
						AU/ml		AU/ml							
141	2017	8	22	ž	8,75	0,00	N	< 0,2	N	N	N				
142	2017	8	61	ž	7,384	0,00	N	< 0,2	N	N	N				
143	2017	8	64	ž	9172,93	26,75	P	134,2	P	N	P			bolest břcha, beder	LNB
144	2017	8	64	m	62,87	1,90	N	12,52	P	N	P			encefalitida	
145	2017	8	11	m	7,466	0,00	N	< 0,2	N	N	N	N	KENC M- G+		
146	2017	8	55	ž	6,789	0,00	N	< 0,2	N	N	N				
147	2017	10	12	ž	15,194	0,14	N	0,57	N	N	N	N			
148	2017	10	5	ž	1236,1	5,22	P	17,58	P	N	N	N		PPLN, meningitida	LNB
149	2017	11	46	m	9,19	0,23	N	7,88	P	N	H				
150	2017	11	48	ž	10,45	0,00	N	7,68	P	N	P	N			
151	2017	11	62	ž	11,253	0,00	N	< 0,2	N	N	N				
152	2017	11	45	m	12,618	0,00	N	< 0,2	N	N	N		KENC M+ G+		KME
153	2017	11	39	ž	18,03	0,44	N	< 0,2	N	N	N				
154	2017	11	56	m	18,717	0,00	N	< 0,2	N	N	N				
155	2017	11	45	m	128,75	0,00	N	< 0,2	N	N	N		KENC M+ G+		KME
156	2017	11	80	ž	10266,22	3,66	P	177,1	P	N	P			paréza n. femoralis	LNB
157	2017	11	38	m	8,32	0,00	N	< 0,2	N	N	N				
158	2017	11	60	ž	9,96	0,00	N	< 0,2	N	N	N				
159	2017	11	47	ž	11,38	0,00	N	< 0,2	N	N	N				
160	2017	11	64	m	11,55	0,00	N	< 0,2	N	N	N				

Vysvětlivky: N – negativní, H – hraniční, P – pozitivní, CLIA – chemiluminiscenční imunoanalýza, WB – Western blot, PCR – polymerázová řetězová reakce, KENC – klíšťová encefalitida, HSV – herpes simplex virus, VZV – varicella zoster virus, KME – klíšťová meningoencefalitida, Anaplas – *Anaplasma phagocytophilum*, LNB – neuroborelióza, PPLN – periferní paréza lícního nervu, HCD – horní cesty dýchací, ME – meningoencefalitida, NI – neuroinfekce, TBC – tuberkulóza, DK – dolní končetina, BS -Bannwarthův syndrom, B-G – Guillainův-Barrého syndrom, RS – roztroušená skleróza, LB – Lymská borelióza, AI – antibody index, M – IgM, G - IgG

Příloha 1: Naměřená a vyhledaná data všech 249 vzorků

vzorek	rok	měsíc	věk	pohlaví	CXCL13 pg/ml	CLIA - LIAISON				WB		PCR	Ostatní nálezy	Příznaky	Závěr
						IgM (2,5-3,5)		IgG (4,5-5,5)		IgM	IgG				
						AU/ml		AU/ml							
161	2017	11	51	ž	22,85	0,00	N	< 0,2	N	N	N			polyneuropatie DK	
162	2017	11	73	m	22,402	0,00	N	7,5	P	N	P			polyneuropatie horních končetin, etiologie nejasná	
163	2017	11	69	ž	24,218	0,11	N	< 0,2	N	N	N			paraparéza DK – demyelin. onemocnění	
164	2017	11	55	m	17,995	0,00	N	< 0,2	N	N	N				
165	2017	12	61	m	20,6	2,08	N	5,77	P	N	N			polyradikulitida, polyneuropatický syndr.	
166	2017	12	53	m	14,911	0,00	N	99,16	P	N	H				
167	2017	12	76	m	14,94	0,00	N	8,35	P	N	H				
168	2017	12	61	m	10,262	0,33	N	4,73	H	N	N		Anapla M- G+		
169	2017	12	52	ž	8,715	0,00	N	< 0,2	N	N	N				
170	2017	12	52	ž	>1000	>190	P	105,6	P	P	H			ME	LNB
171	2017	12	69	ž	6,343	0,00	N	< 0,2	N	N	N				
172	2017	12	11	ž	11,165	0,00	N	< 0,2	N	N	N				
173	2018	1	71	m	2,67	0,00	N	< 0,2	N	N	N				
174	2018	1	61	ž	3,69	0,00	N	< 0,2	N	N	N				
175	2018	1	23	m	3,81	0,00	N	< 0,2	N	N	N				
176	2018	1	35	m	4,75	0,00	N	< 0,2	N	N	N				
177	2018	2	88	ž	12,71	25,65	P	110,7	P	N	N				
178	2018	2	70	ž	6,979	0,00	N	< 0,2	N	N	N				
179	2018	2	52	m	8,168	0,00	N	0,46	N	N	N				
180	2018	2	65	ž	5,187	0,10	N	< 0,2	N	N	N				

Vysvětlivky: **N** – negativní, **H** – hraniční, **P** – pozitivní, **CLIA** – chemiluminiscenční imunoanalýza, **WB** – Western blot, **PCR** – polymerázová řetězová reakce, **KENC** – klíšťová encefalitida, **HSV** – herpes simplex virus, **VZV** – varicella zoster virus, **KME** – klíšťová meningoencefalitida, Anaplas – *Anaplasma phagocytophilum*, **LNB** – neuroborelióza, **PPLN** – periferní paréza lícního nervu, **HCD** – horní cesty dýchací, **ME** – meningoencefalitida, **NI** – neuroinfekce, **TBC** – tuberkulóza, **DK** – dolní končetina, **BS** -Bannwarthův syndrom, **B-G** – Guillainův-Barrého syndrom, **RS** – roztroušená skleróza, **LB** – Lymská borelióza, **AI** – antibody index, **M** – IgM, **G** – IgG

Příloha1: Naměřená a vyhledaná data všech 249 vzorků

vzorek	rok	měsíc	věk	pohlaví	CXCL13 pg/ml	CLIA - LIAISON				WB		PCR	Ostatní nálezy	Příznaky	Závěr
						IgM (2,5-3,5)		IgG (4,5-5,5)		IgM	IgG				
						AU/ml		AU/ml							
181	2018	2	35	ž	6,743	0,00	N	0,29	N	N	N				
182	2018	3	43	m	7,839	0,00	N	< 0,2	N	N	N				
183	2018	3	67	ž	6,725	0,07	N	1,36	N	N	N		Anapla M- G+		
184	2018	3	59	m	19,011	0,63	N	0,95	N	N	N				
185	2018	3	8	ž	11,446	5,51	P	< 0,2	N	N	N	N			
186	2018	4	48	ž	6,69	0,00	N	< 0,2	N	N	N				
187	2018	4	41	ž	5,247	0,00	N	< 0,2	N	N	N				
188	2018	5	14	ž	9,446	0,00	N	< 0,2	N	N	N	N			
189	2018	5	54	m	6,6	0,00	N	< 0,2	N	N	N				
190	2018	5	58	ž	6,827	0,00	N	2,37	N	N	H				
191	2018	5	73	m	6,995	0,00	N	2,39	N	N	H				
192	2018	5	14	ž	9,651	0,00	N	< 0,2	N	N	N	N			
193	2018	5	46	m	15,22	0,00	N	< 0,2	N	N	N				
194	2018	5	63	m	11,93	0,70	N	60,23	P	N	P				
195	2018	5	66	ž	11,669	0,19	N	< 0,2	N	N	N				
196	2018	5	70	ž	46,464	0,00	N	< 0,2	N	N	N			pseudochabá paraparéza - podklad ische.	
197	2018	5	61	ž	15,81	0,00	N	< 0,2	N	N	N				
198	2018	5	41	m	9,351	0,00	N	19,35	P	N	H				
199	2018	5	38	ž	11,331	0,00	N	< 0,2	N	N	N	N			
200	2018	6	29	m	12,784	2,36	N	18,44	N	N	H			akutní ME nejasné etiologie	

Vysvětlivky: N – negativní, H – hraniční, P – pozitivní, CLIA – chemiluminiscenční imunoanalýza, WB – Western blot, PCR – polymerázová řetězová reakce, KENC – klíšťová encefalitida, HSV – herpes simplex virus, VZV – varicella zoster virus, KME – klíšťová meningoencefalitida, Anaplas – *Anaplasma phagocytophilum*, LNB – neuroborelióza, PPLN – periferní paréza lícního nervu, HCD – horní cesty dýchací, ME – meningoencefalitida, NI – neuroinfekce, TBC – tuberkulóza, DK – dolní končetina, BS -Bannwarthův syndrom, B-G – Guillainův-Barrého syndrom, RS – roztroušená skleróza, LB – Lymfská borelióza, AI – antibody index, M – IgM, G – IgG

Příloha 1: Naměřená a vyhledaná data všech 249 vzorků

vzorek	rok	měsíc	věk	pohlaví	CXCL13 pg/ml	CLIA - LIAISON				WB		PCR	Ostatní nálezy	Příznaky	Závěr
						IgM (2,5-3,5)		IgG (4,5-5,5)		IgM	IgG				
						AU/ml		AU/ml							
201	2018	6	31	ž	4,44	0,00	N	< 0,2	N	N	N			chron.parestezie, slabost končetin	
202	2018	6	61	m	5,359	0,00	N	2,07	N	N	N			bolest hlavy, polyatralgie, febrilie, LB v sér.	
203	2018	6	41	m	6,713	0,00	N	< 0,2	N	N	N			bolest hlavy nejasné etiologie	
204	2018	6	76	ž	6,469	0,00	N	< 0,2	N	N	N			psychosyndrom	
205	2018	6	73	m	6,457	0,36	N	4,19	N	N	H			porucha pameti – Alzheimer	
206	2018	6	78	ž	7,822	0,00	N	< 0,2	N	N	N			demyelinizační onemocnění	
207	2018	6	65	ž	49,055	0,00	N	< 0,2	N	N	N			PPLN	počátek LNB
208	2018	6	66	m	11,18	0,00	N	10,62	P	N	H			záškuby tváře, dříve LB	LNB vyloučena
209	2018	6	58	m	11,04	0,13	N	< 0,2	N	N	N			mononeuropatie n. femoralis	
210	2018	6	75	ž	14,04	0,00	N	< 0,2	N	N	N			PPLN	
211	2018	6	68	ž	12,2	1,78	N	0,69	N	N	N			LB bez NI	
212	2018	6	65	ž	833,69	4,54	P	21,12	P	N	H		KENC M- G+	PPLN oboustranná	LNB
213	2018	6	35	m	6,908	0,00	N	< 0,2	N	N	N			bolest hlavy, asept. meningitida	
214	2018	6	67	ž	8,341	2,26	N	64,38	P	N	H		KENC M- G+	serózní meningitida, KENC M+ v séru	
215	2018	6	29	ž	41,15	11,53	P	0,07	N	N	N			lymfocytární meningitida	
216	2018	6	42	ž	66	0,00	N	< 0,2	N	N	N			demyelinizační onemocnění typu RS	
217	2018	6	49	m	49,694	9,75	P	< 0,2	N	N	N	N	KENC M+ G+	aseptická ME	KME
218	2018	6	23	ž	14,539	0,00	N	< 0,2	N	N	N			parainfekční meningismus	
219	2018	6	48	m	11,675	0,09	N	< 0,2	N	N	N			somatizační porucha	
220	2018	6	67	m	0,202	0,06	N	< 0,2	N	N	N			epileptické Jacksonské paroxymy	

Vysvětlivky: N – negativní, H – hraniční, P – pozitivní, CLIA – chemiluminiscenční imunoanalýza, WB – Western blot, PCR – polymerázová řetězová reakce, KENC – klíšťová encefalitida, HSV – herpes simplex virus, VZV – varicella zoster virus, KME – klíšťová meningoencefalitida, Anaplas – *Anaplasma phagocytophilum*, LNB – neuroborelióza, PPLN – periferní paréza lícního nervu, HCD – horní cesty dýchací, ME – meningoencefalitida, NI – neuroinfekce, TBC – tuberkulóza, DK – dolní končetina, BS -Bannwarthův syndrom, B-G – Guillainův-Barrého syndrom, RS – roztroušená skleróza, LB – Lymská borelióza, AI – antibody index, M – IgM, G – IgG

Příloha 1: Naměřená a vyhledaná data všech 249 vzorků

vzorek	rok	měsíc	věk	pohlaví	CXCL13 pg/ml	CLIA - LIAISON				WB		PCR	Ostatní nálezy	Příznaky	Závěr
						IgM (2,5-3,5)		IgG (4,5-5,5)		IgM	IgG				
						AU/ml		AU/ml							
221	2018	6	5	ž	790,71	62,08	P	90,93	P	N	H	P	AI M+ G+	PPLN	LNB
222	2018	6	29	m	0,365	0,00	N	< 0,2	N	N	N			hemikranie po viróze	
223	2018	7	37	m	229,3	3,13	H	< 0,2	N	N	N		HSV1 +	herpetická encefalitida	
224	2018	7	61	ž	7,84	0,00	N	< 0,2	N	N	N	N		Staphylococcus aureus v krvi	
225	2018	7	71	m	7,32	0,00	N	< 0,2	N	N	N			polyneuropatie DK	
226	2018	7	5	m	958,9	11,66	P	34,86	P	N	P	N		PPLN	LNB
227	2018	7	59	m	6,38	4,97	P	26,55	P	N	P			polyneuropatie DK	
228	2018	7	71	ž	974,38	13,36	P	137,3	P	N	P			bolest hlavy, zad, pokles koutku	LNB
229	2018	7	22	m	6,72	0,00	N	< 0,2	N	N	N			demyelinizační onemocnění	
230	2018	7	4	m	880,45	100,20	P	136,3	P	H	H	N	AI M+ G+	bolest hlavy	LNB
231	2018	7	33	m	38,6	0,53	N	< 0,2	N	N	N	N		únava, myalgie, nekompletní PPLN, ME	
232	2018	7	79	ž	5,65	0,00	N	5,52	P	N	P			PPLN, LB a HSV ve stádiu hojení	
233	2018	7	47	ž	3,7	0,00	N	0,93	N	N	H			demyelinizační onemocnění	
234	2018	7	78	ž	7,1	0,00	N	< 0,2	N	N	N			demence	
235	2018	7	67	ž	4,7	0,00	N	< 0,2	N	N	N		KENC M-G+	degenerativní změny páteře	
236	2018	7	64	m	200,5	2,90	H	28,42	P	N	P			chabá paraparéza DK	nádor?
237	2018	7	8	m	6,8	0,00	N	< 0,2	N	N	N	N		horečka, světloplachost, meningitis	
238	2018	7	40	ž	4,697	0,00	N	< 0,2	N	N	N			ophtalmická migréna	
239	2018	7	42	m	825,48	8,19	P	27,58	P	N	H		AI M+ G+	únava, bolest hlavy, ME	LNB
240	2018	7	23	ž	5,032	0,33	N	< 0,2	N	N	N			komorová tachykardie, LB	

Vysvětlivky: N – negativní, H – hraniční, P – pozitivní, **CLIA** – chemiluminiscenční imunoanalýza, **WB** – Western blot, **PCR** – polymerázová řetězová reakce, **KENC** – klíšťová encefalitida, **HSV** – herpes simplex virus, **VZV** – varicella zoster virus, **KME** – klíšťová meningoencefalitida, **Anaplas** – *Anaplasma phagocytophilum*, **LNB** – neuroborelióza, **PPLN** – periferní paréza lícního nervu, **HCD** – horní cesty dýchací, **ME** – meningoencefalitida, **NI** – neuroinfekce, **TBC** – tuberkulóza, **DK** – dolní končetina, **BS** -Bannwarthův syndrom, **B-G** – Guillainův-Barrého syndrom, **RS** – roztroušená skleróza, **LB** – Lymská borelióza, **AI** – antibody index, **M** – IgM, **G** – IgG

Příloha 1: Naměřená a vyhledaná data všech 249 vzorků

vzorek	rok	měsíc	věk	pohlaví	CXCL13 pg/ml	CLIA - LIAISON				WB		PCR	Ostatní nálezy	Příznaky	Závěr
						IgM (2,5-3,5)		IgG (4,5-5,5)		IgM	IgG				
						AU/ml		AU/ml							
241	2018	7	26	ž	6,052	0,70	N	< 0,2	N	N	N			demyelinizační onemocnění typu RS	
242	2018	7	61	m	9,075	0,24	N	< 0,2	N	N	N			závrativé stavy	
243	2018	7	27	m	45,381	1,37	N	0,52	N	N	N		VZV +	meningitida	
244	2018	7	58	m	6,066	0,00	N	4,74	H	N	H		AI G+	polyneuropatie DK	
245	2018	7	29	m	13,1	0,00	N	< 0,2	N	N	N			bolest hlavy	
246	2018	7	16	ž	23,9	0,00	N	< 0,2	N	N	N	N	KENC M-G+	paraparéza po bodnutí včely	
247	2018	7	78	m	418,05	77,02	P	> 240	P	P	P		AI M+ G+	dysestezie DK, bolest zad	LNB
248	2018	7	47	m	112,85	1,32	N	< 0,2	N	N	N		KENC M+G+	bolest hlavy, únava, spavost	KME
249	2018	7	70	m	>500	92,3	P	169,4	P	P	P		AI M+ G+	bolesti DK, slabost, únava	LNB

Vysvětlivky: **N** – negativní, **H** – hraniční, **P** – pozitivní, **CLIA** – chemiluminiscenční imunoanalýza, **WB** – Western blot, **PCR** – polymerázová řetězová reakce, **KENC** – klíšťová encefalitida, **HSV** – herpes simplex virus, **VZV** – varicella zoster virus, **KME** – klíšťová meningoencefalitida, **Anaplas** – *Anaplasma phagocytophilum*, **LNB** – neuroborelióza, **PPLN** – periferní paréza lícního nervu, **HCD** – horní cesty dýchací, **ME** – meningoencefalitida, **NI** – neuroinfekce, **TBC** – tuberkulóza, **DK** – dolní končetina, **BS** -Bannwarthův syndrom, **B-G** – Guillainův-Barrého syndrom, **RS** – roztroušená skleróza, **LB** – Lymská borelióza, **AI** – antibody index, **M** – IgM, **G** - IgG

Vysvětlivky barev v příloze 1, 3 a 4:

Koncentrace CXCL13		
standardní	< 20	vyloučení neuroboreliózy
hraniční	20 - 30	
zvýšené	30 - 100	
výrazně zvýšené	100 - 250	podezření na akutní neuroboreliózu
vysoké	> 250	akutní neuroborelióza je pravděpodobná

CLIA + WB
N = negativní
H = hraniční
P = pozitivní

Příloha 2: Přehled výsledků všech 249 pacientů – uvedeny počty vzorků pro jednotlivé kategorie

věk	CXCL13 [pg/ml]	CLIA	M-G-	M+G+	M+G+	M+G-	M-G+	M-G-	M+G+	M+G-	ostatní	celkem
		WB	M-G-	M+G+	M-G+	M-G-	M-G+	M-GH	M-G-	M+G-		
0 až 10	< 20		2			1						
	20 - 30											
	30 - 100											
	100 - 250											
	> 250		1	2	12				2			
11 až 20	< 20		9									
	20 - 30		1			2						
	30 - 100		2					1				
	100 - 250											
	> 250			1	1	1						
21 až 30	< 20		15		1			1				
	20 - 30											
	30 - 100		1			3	1					
	100 - 250											
	> 250											
31 až 40	< 20		17			2		2				
	20 - 30											
	30 - 100		1			1	1					
	100 - 250					1						
	> 250			1								
41 až 50	< 20		19				4	2		1		
	20 - 30											
	30 - 100		1			1					1	
	100 - 250		2			1						
	> 250			2	2							
51 až 60	< 20		13		2	1	8	2	1			
	20 - 30		1				1				1	
	30 - 100		1		2	1	1					
	100 - 250		1									
	> 250			1	1						1	
61 až 70	< 20		24		2	1	6	3			1	
	20 - 30		2								1	
	30 - 100		2		1		1					
	100 - 250		1	1	2		1				1	
	> 250			3	3							
71 až 80	< 20		8			1	7	2		1		
	20 - 30						2					
	30 - 100											
	100 - 250											
	> 250			2	4						1	
80 až 90	< 20					1				1		
	20 - 30											
	30 - 100											
	100 - 250						1					
	> 250			1								
celkem	< 20		107		5	7	25	12	1	3	1	161
	20 - 30		4			2	3				2	11
	30 - 100		8		3	6	4	1			1	23
	100 - 250		4	1	2	2	2				1	12
	> 250		1	13	23	1			2		2	42
celkem			124	14	33	18	34	13	3	3	7	249

Vysvětlivky: CLIA – chemiluminiscenční imunoanalýza, WB – Western blot M- – negativní protilátky třídy IgM, G- – negativní protilátky třídy IgG, M+ – pozitivní protilátky třídy IgM, G+ – pozitivní protilátky třídy IgG, GH – hraniční protilátky třídy IgG

Příloha 3: Naměřená a vyhledaná data skupiny 50 pacientů za období červen – červenec 2018 (posledních 50 vzorků)

vzorek	protilátky								AI IgG	AI IgM	CXCL13 [pg/ml]	PCR	cytologie	Příznaky	Závěr
	sérum				mozkomíšni mok										
	CLIA IgG [AU/ml] (10-15)	WB IgG	CLIA IgM [AU/ml] (18-22)	WB IgM	CLIA IgG [AU/ml] (4,5-5,5)	WB IgG	CLIA IgM [AU/ml] (2,5-3,5)	WB IgM							
200	236,20		18,32	P	18,44	H	2,36	N	3,75		12,784		smíšená pleocytóza	akutní ME nejasné etiologie	
201	5,00		10,30		< 0,2	N	0,00	N			4,44		bez patologie	chron.parestezie, slabost končetin	
202	108,00		25,41	P	2,07	N	0,00	N			5,359		bez patologie	bolest hlavy, polyatralgie, febrilie, LB v séru	
203	5,00		3,05		< 0,2	N	0,00	N			6,713		bez patologie	bolest hlavy nejasné etiologie	
204	5,00		7,40		< 0,2	N	0,00	N			6,469		bez výrazné patologie	psychosyndrom	
205	34,13		2,00		4,19	H	0,36	N	1,26		6,457		mírná lymfo. pleocytóza	porucha paměti – Alzheimer	
206	5,00		8,61		< 0,2	N	0,00	N			7,822		bez patologie	demyelinizační onemocnění	
207	9,71		8,38		< 0,2	N	0,00	N			49,055		mírná lymfo. pleocytóza	PPLN	počátek LNB
208	107,70		4,28		10,62	H	0,00	N	8,07		11,18		bez patologie	záškuby tváře, dříve LB	LNB vyloučena
209	5,00		4,67		< 0,2	N	0,13	N			11,04		bez patologie	mononeuropatie n. femoralis	
210	5,00		5,67		< 0,2	N	0,00	N			14,04		lymfocytární pleocytóza	PPLN	
211	18,25		108,50	P	0,69	N	1,78	N			12,2		lymfocytární pleocytóza	LB bez NI	
212	13,17		18,24	P	21,12	H	4,54	N	40,98	2,51	833,69		lymfocytární pleocytóza	PPLN oboustranná	LNB
213	5,00		12,10		< 0,2	N	0,00	N			6,908		lymfocytární pleocytóza	bolest hlavy, asept. meningitida	
214	24,49		7,49		64,38	H	2,26	N	94,03		8,341		mírná pleo. s převah. seg.	serózní meningitida, KENC M+ v séru	
215	22,41		2,97		0,07	N	11,53	N		0,01	41,15		lymfocytární pleocytóza	lymfocytární meningitida	
216	5,00		6,79		< 0,2	N	0,00	N			66		mírná lymfo. pleocytóza	demyelinizační onemocnění typu RS	
217	5,00		7,47		< 0,2	N	9,75	N		0,00	49,694	N	lymfocytární pleocytóza	aseptická ME	KME

Vysvětlivky: N – negativní, H – hraniční, P – pozitivní, CLIA – chemiluminiscenční imunoanalýza, WB – Western blot, PCR – polymerázová řetězová reakce, KENC – klíšťová encefalitida, HSV – herpes simplex virus, VZV – varicella zoster virus, KME – klíšťová meningoencefalitida, Anaplas – *Anaplasma phagocytophilum*, LNB – neuroborelióza, PPLN – periferní paréza lícního nervu, HCD – horní cesty dýchací, ME – meningoencefalitida, NI – neuroinfekce, TBC – tuberkulóza, DK – dolní končetina, BS -Bannwarthův syndrom, B-G – Guillainův-Barrého syndrom, RS – roztroušená skleróza, LB – Lymská borelióza, AI – antibody index (pozitivní > 1,5)

Příloha 3: Naměřená a vyhledaná data skupiny 50 pacientů za období červen – červenec 2018 (posledních 50 vzorků)

vzorek	protilátky								AI IgG	AI IgM	CXCL13 [pg/ml]	PCR	cytologie	Příznaky	Závěr
	sérum				mozkomíšni mok										
	CLIA IgG [AU/ml] (10-15)	WB IgG	CLIA IgM [AU/ml] (18-22)	WB IgM	CLIA IgG [AU/ml] (4,5-5,5)	WB IgG	CLIA IgM [AU/ml] (2,5-3,5)	WB IgM							
218	32,91		3,86		< 0,2	N	0,00	N			14,539		bez patologie	parainfekční meningismus	
219	9,29		58,74	P	< 0,2	N	0,09	N			11,675		bez buněk	somatizační porucha	
220	16,51		16,25		< 0,2	N	0,06	N			0,202		bez patologie	epileptické Jacksonské paroxymy	
221	147,10	H	29,90	N	90,93	H	62,08	N	13,87	19,7	790,71	P	lymfocytární pleocytóza	PPLN	LNB
222	5,48		18,68	P	< 0,2	N	0,00	N			0,365		bez patologie	hemikranie po viróze	
223	5,00		14,01		< 0,2	N	3,13	N			229,3		lymfocytární pleocytóza	herpetická encefalitida	HSV 1
224	5,00		3,61		< 0,2	N	0,00	N			7,84	N	bez patologie	Staphylococcus aureus v krvi	
225	5,00		2,00		< 0,2	N	0,00	N			7,32		bez patologie	polyneuropatie DK	
226	178,90	P	33,69	H	34,86	P	11,66	N	3,87	3,06	958,9	N	lymfocytární pleocytóza	PPLN	LNB
227	240,00		66,72	H	26,55	P	4,97	N	2,03	1,2	6,38		bez výrazné patologie	polyneuropatie DK	
228	143,70		28,55	P	137,3	P	13,36	N	8,84	1,88	974,38		lymfocytární pleocytóza	bolest hlavy, zad, pokles koutku	LNB
229	5,00		11,45		< 0,2	N	0,00	N			6,72		bez jednoznačné patologie	demyelinizační onemocnění	
230	202,70		50,45	H	136,3	H	100,20	H	8,18	11,67	880,45	N	lymfocytární pleocytóza	bolest hlavy	LNB
231	5,00		7,93		< 0,2	N	0,53	N			38,6	N	lymfocytární pleocytóza	únava, myalgie, nekompletní PPLN	ME
232	197,50		43,13	P	5,52	P	0,00	N	1,66		5,65		bez patologie	PPLN, LB a HSV ve stádiu hojení	
233	70,00		8,90		0,93	H	0,00	N			3,7		bez patologie	demyelinizační onemocnění	
234	5,00		2,23		< 0,2	N	0,00	N			7,1		monocytární pleocytóza	demence	
235	5,00		2,00		< 0,2	N	0,00	N			4,7		bez patologie	degenerativní změny páteře	

Vysvětlivky: N – negativní, H – hraniční, P – pozitivní, CLIA – chemiluminiscenční imunoanalýza, WB – Western blot, PCR – polymerázová řetězová reakce, KENC – klíšťová encefalitida, HSV – herpes simplex virus, VZV – varicella zoster virus, KME – klíšťová meningoencefalitida, Anaplas – *Anaplasma phagocytophilum*, LNB – neuroborelióza, PPLN – periferní paréza lícního nervu, HCD – horní cesty dýchací, ME – meningoencefalitida, NI – neuroinfekce, TBC – tuberkulóza, DK – dolní končetina, BS -Bannwarthův syndrom, B-G – Guillainův-Barrého syndrom, RS – roztroušená skleróza, LB – Lymská borelióza, AI – antibody index (pozitivní > 1,5)

Příloha 3: Naměřená a vyhledaná data skupiny 50 pacientů za období červen – červenec 2018 (posledních 50 vzorků)

vzorek	protilátky								AI IgG	AI IgM	CXCL13 [pg/ml]	PCR	cytologie	Příznaky	Závěr
	sérum				mozkomíšni mok										
	CLIA IgG [AU/ml] (10-15)	WB IgG	CLIA IgM [AU/ml] (18-22)	WB IgM	CLIA IgG [AU/ml] (4,5-5,5)	WB IgG	CLIA IgM [AU/ml] (2,5-3,5)	WB IgM							
236	136,00		5,22		28,42	P	2,90	N	1,07	0,84	200,5		lymfocytární pleocytóza	chabá paraparéza DK	nádor?
237	5,00		5,68		< 0,2	N	0,00	N			6,8	N	bez patologie	horečka, světloplachost, meningitis	
238	5,00		31,67	N	< 0,2	N	0,00	N			4,697		bez patologie	ophtalmická migréna	
239	117,40		17,74	P	27,58	H	8,19	N	4,5	2,82	825,48		lymfocytární pleocytóza	únava, bolest hlavy, ME	LNB
240	5,00		37,96	H	< 0,2	N	0,33	N			5,032		bez patologie	komorová tachykardie, LB	
241	5,00		18,95	N	< 0,2	N	0,70	N			6,052		bez patologie	demyelinizační onemocnění typu RS	
242	5,00		23,57	P	< 0,2	N	0,24	N			9,075		bez patologie	závrativé stavy	
243	23,64		14,01		0,52	N	1,37	N			45,381		lymfocytární pleocytóza	meningitida	VZV
244	61,47		5,81		4,74	H	0,00	N	2,7		6,066		bez patologie	polyneuropatie DK	
245	5,00		16,96		< 0,2	N	0,00	N			13,1		bez patologie	bolest hlavy	
246	5,00		2,55		< 0,2	N	0,00	N			23,9	N	bez patologie	paraparéza po bodnutí včely	
247	240,00		152,50	P	> 240	P	77,02	P	10,94	25,46	418,05		lymfocytární pleocytóza	dysestezie(poruchy čítí) DK, bolest zad	LNB
248	5,00		3,51		< 0,2	N	1,32	N			112,85		lymfocytární pleocytóza	bolest hlavy, únava, spavost	KME
249	240,00		190,00	P	169,4	P	92,3	P	9,45	2,71	>500		lymfocytární pleocytóza	bolesti DK, slabost, únava	LNB

Vysvětlivky: N – negativní, H – hraniční, P – pozitivní, CLIA – chemiluminiscenční imunoanalýza, WB – Western blot, PCR – polymerázová řetězová reakce, KENC – klíšťová encefalitida, HSV – herpes simplex virus, VZV – varicella zoster virus, KME – klíšťová meningoencefalitida, Anaplas – *Anaplasma phagocytophilum*, LNB – neuroborelióza, PPLN – periferní paréza lícního nervu, HCD – horní cesty dýchací, ME – meningoencefalitida, NI – neuroinfekce, TBC – tuberkulóza, DK – dolní končetina, BS -Bannwarthův syndrom, B-G – Guillainův-Barrého syndrom, RS – roztroušená skleróza, LB – Lymská borelióza, AI – antibody index (pozitivní > 1,5)

Příloha 4: Přehled vyšetření v souboru – děti do 12 let

vzorek	věk	pohlaví	mozkomíšni mok						sérum				AI IgM	AI IgG	Cytologie	Příznaky	Závěr
			CXCL13 pg/ml	protilátky				PCR	protilátky								
				CLIA IgM [AU/ml] (2,5-3,5)	WB IgM	CLIA IgG [AU/ml] (4,5-5,5)	WB IgG		CLIA IgM [AU/ml] (18-22)	WB IgM	CLIA IgG [AU/ml] (10-15)	WB IgG					
62	4	ž	775,82	25,30	N	48,98	H	P	9,73		13,78		18,84	102,68	LP	bolest hlavy, schvácenost	LNB
92	4	m	10,268	4,09	N	< 0,2	N	N	2,30		< 5,00					křeče, autista	epilepsie
230	4	m	880,45	100,20	H	136,3	H	N	50,45	H	202,70	H	11,67	8,18	LP	bolest hlavy	LNB
50	5	m	844,994	10,16	N	5,81	N		4,57		6,41		26,50	25,00		bolest hlavy	LNB
53	5	ž	551,28	162,90	P	46,71	H	N	48,45	N	43,94		73,31	44,55	LP	PPLN	LNB
148	5	ž	1236,1	5,22	N	17,58	N	N	6,56		24,46		9,43	19,48	LP	PPLN, meningitida	LNB
221	5	ž	790,71	62,08	N	90,93	H	P	29,90	N	147,16	H	19,70	13,87	LP	PPLN	LNB
226	5	m	958,9	11,66	N	34,86	P	N	33,69	H	198,90	P	3,06	3,87	LP	PPLN	LNB
59	6	ž	459,324	56,03	N	48,09	H	P	6,88	N	16,00	N			LP	PPLN	LNB
80	6	ž	6775,8	62,04	N	> 240	P		21,49	P	67,24				LP	PPLN, klíště	LNB
82	6	ž	12199	38,79	N	46,39	H	N	34,12	N	52,63				LP	PPLN	LNB
48	7	ž	491,108	38,92	N	35,23	H	N	127,30	P	114,20				LP	PPLN	LNB
56	7	ž	1224,693	18,32	N	> 240	P	N	20,07	N	> 240	P			LP	PPLN	LNB
133	7	m	> 10000	19,67	N	56,21	P	N	8,82	N	130,60	P	15,55	5,93	LP	PPLN, bolest hlavy	LNB

Vysvětlivky: **N** – negativní, **H** – hraniční, **P** – pozitivní, **CLIA** – chemiluminiscenční imunoanalýza, **WB** – Western blot, **PCR** – polymerázová řetězová reakce, **AI** – antibody index (pozitivní > 1,5), **LP** – lymfocytární pleocytóza, **MP** – monocytární pleocytóza, **GP** - granolocytní pleocytóza, **LO** – lymfocytární oligocytóza, **bez** – bez patologie, **PPLN** – periferní paréza lícniho nervu, **LNB** – neuroborelióza, **BO** – Bellova obrna, **EBV** – virus Epstein-Baarové, **červené políčko** – pozitivní výsledek, **šedé políčko** – hraniční výsledek

Příloha 4: Přehled vyšetření v souboru – děti do 12 let

vzorek	věk	pohlaví	mozkomíšni mok						sérum				AI IgM	AI IgG	Cytologie	Příznaky	Závěr
			CXCL13 pg/ml	protilátky				PCR	protilátky								
				CLIA IgM [AU/ml] (2,5-3,5)	WB IgM	CLIA IgG [AU/ml] (4,5-5,5)	WB IgG		CLIA IgM [AU/ml] (18-22)	WB IgM	CLIA IgG [AU/ml] (10-15)	WB IgG					
8	8	m	494,145	9,50	N	48,40	H	N	20,60	P	55,10			nelze hod.	PPLN	LNB	
185	8	ž	11,446	5,51	N	< 0,2	N	N	26,89	N	< 5,00			bez	PPLN - Bellova obrna	BO	
237	8	m	6,8	0,00	N	< 0,2	N	N	5,68		< 5,00			bez	horečka, světloplachost	meningitis	
36	9	ž	13369,7	59,42	N	90,84	H		35,97	P	126,20		7,37	8,61	meningeální syndrom	LNB	
88	9	m	593,6	1,50	N	1,04	N	P	3,87		< 5,00			LP	PPLN	LNB	
25	10	m	1335,36	47,95	H	> 240	H	N	14,88	H	50,87	H	33,07	96,25	LP	PPLN	LNB
20	11	m	9447,56	63,10	N	> 240	P		38,90	P	213,20			LP	PPLN	LNB	
35	11	ž	over	> 190	H	200,50	P		43,54	P	> 240		18,98	8,19	LP	PPLN	LNB
61	11	m	16,156	0,00	N	< 0,2	N	N	2,24		< 5,00			bez	PPLN z prochládnutí		
145	11	m	7,466	0,00	N	< 0,2	N	N	14,06		7,80			bez	mononeuropatie s EBV		
172	11	ž	11,165	0,00	N	< 0,2	N		5,82		< 5,00			hran. MP	PPLN z prochládnutí		
68	12	m	355,53	4,38	N	0,29	N	N	12,59		6,20			GP	zvracení, bolest hlavy	LNB	
147	12	ž	15,194	0,14	N	0,57	N	N	19,64	N	6,52			LO	PPLN - Bellova obrna	BO	

Vysvětlivky: N – negativní, H – hraniční, P – pozitivní, CLIA – chemiluminiscenční imunoanalýza, WB – Western blot, PCR – polymerázová řetězová reakce, AI – antibody index (pozitivní > 1,5), LP – lymfocytární pleocytóza, MP – monocytární pleocytóza, GP - granulocytární pleocytóza, LO – lymfocytární oligocytóza, bez – bez patologie, PPLN – periferní paréza lícního nervu, LNB – neuroborelióza, BO – Bellova obrna, EBV – virus Epstein-Baarové, červené políčko – pozitivní výsledek, šedé políčko – hraniční výsledek