



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Sciences

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

Laboratorní diagnostika Lymeské borreliózy

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program: LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA

Autor: Simona Dostálová, DiS.

Vedoucí práce: RNDr. Jana Kotalíková

České Budějovice 2024

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem “*Laboratorní diagnostika Lymeské borreliózy*“ jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby bakalářské práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé bakalářské práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 29.04.2024

.....

podpis

Poděkování

Touto cestou bych ráda poděkovala vedoucí mé bakalářské práce RNDr. Janě Kotalíkové za přínosné a cenné připomínky a rady v průběhu jejího vzniku. Velké poděkování patří i mým kolegyním v laboratoři DIA-GON MP, s.r.o. v Chebu za trpělivost a ochotný přístup. Děkuji svým blízkým, kteří mi byli po celou dobu velkou oporou.

Laboratorní diagnostika *Lymeské borreliózy*

Abstrakt

Lymeská borrelióza je nejčastějším infekčním onemocněním, které je přenášeno klíštětem infikováním bakterií *Borrelia burgdorferi* (*antropozoonoza*). Diagnostika tohoto onemocnění je založena na detekci specifických *imunoglobulinů* třídy IgG a třídy IgM pomocí specifických laboratorních testů.

Tato bakalářská práce se zaměřuje na zhodnocení klinického stavu pacientů ošetřujícím lékařem (viz. kazuistiky) v souladu s výsledky laboratorních testů. Správné stanovení diagnózy je založeno na klinických příznacích, anamnéze a laboratorních nálezech u každého pacienta, což slouží k adekvátní antibiotické léčbě.

Kromě toho je v této práci provedeno porovnání dvou metod používaných k detekci protilátek proti *Borrelii burgdorferi* metodu chemiluminiscenční imunoanalýzy (CLIA) a konfirmační metodu Western blotting používaných v Klinické laboratoři DIA-GON MP, s.r.o. v Chebu. Metoda CLIA poskytuje rychlý a citlivý screening pro IgG a IgM protilátky, zatímco Western blotting slouží jako konfirmační test s vyšší specificitou. Vyhodnocení výsledků a jejich interpretace jsou založeny na průkazu specifických protilátek proti *Borrelii* pomocí metody Western blotting.

Poslední část bakalářské práce je rešerší článku z Českého hydrometeorologického ústavu, který spolupracuje se Státním zdravotním ústavem za podpory Ministerstva zdravotnictví České republiky. Pojednává o aktivitě klíšťat, která souvisí s jejich sezónním výskytem. Na základě tohoto článku vypracovávám zhodnocení sezónního výskytu *Lymeské borreliózy* v letech 2015 - 2017 s ohledem na průměrné teploty v daném období.

Klíčová slova

Lymeská borelióza, Borrelie burgdorferi, erythema migrans, acrodermatitis chronica atrophicans (ACA), borrelióvým lymfocytom, Ixodes ricinus, Borrelia burgdorferi sensu lato, CLIA, Western blotting

Laboratory diagnostics of Lyme disease

Abstract

Lyme borreliosis is the most common infectious disease that is transmitted by ticks infected with *Borrelia burgdorferi* bacteria (anthropozoonosis). The diagnosis of this disease is based on the detection of specific IgG and IgM class immunoglobulins by specific laboratory tests.

This bachelor thesis focuses on the evaluation of the clinical condition of patients by the attending physician (see case reports) in accordance with the results of laboratory tests. The correct diagnosis is based on the clinical symptoms, anamnesis and laboratory findings of each patient, which is used to guide adequate antibiotic treatment.

In this work a comparison of two methods used for detection of antibodies against *Borrelia burgdorferi*, the chemiluminescence immunoassay (CLIA) method and the confirmatory Western blotting method used in the Clinical Laboratory of DIA-GON MP, s.r.o. in Cheb, is performed. The CLIA method provides rapid and sensitive screening for IgG and IgM antibodies, while Western blotting serves as a confirmatory test with higher specificity. The evaluation of the results and their interpretation are based on the detection of specific antibodies against *Borrelia* by Western blotting.

The last part of the bachelor thesis is a search of an article from the Czech Hydrometeorological Institute, which cooperates with the State Institute of Health with the support of the Ministry of Health of the Czech Republic. It discusses tick activity in relation to their seasonal occurrence. On the basis of this article, I make an assessment of the seasonal occurrence of Lyme borreliosis in 2015-2017 with respect to the average temperatures in that period.

Key words

Lyme disease, *Borrelia burgdorferi*, *erythema migrans*, *acrodermatitis chronica atrophicans (ACA)*, *borreliový lymfocytom*, *Ixodes ricinus*, *Borrelia burgdorferi sensu lato*, CLIA, Western blotting

Obsah

1	Lymeská borrelióza	8
1.1	Hledání původce	8
1.2	Etiologie <i>Lymeské borreliózy</i>	9
1.3	Charakteristika <i>Borrelia burgdorferi</i>	10
1.4	Přenos	10
1.5	Patogeneze.....	11
1.5.1	Imunitní odpověď.....	11
1.5.2	Klinické projevy borreliózy	12
1.5.3	Borreliové onemocnění z pohledu různých medicínských oborů	14
1.6	Dispenzarizace, hlášení	14
2	Praktická část.....	15
2.1	Použité metody	15
2.1.1	Stanovení protilátek <i>Borrelia</i> IgG, IgM metodou CLIA na analyzátoru LIAISON XL17	
2.1.1.1	Princip postupu	17
2.1.1.2	Provedení	17
2.1.1.3	Diagnostická souprava pro stanovení protilátek LIAISON <i>Borrelia</i> IgM II	19
2.1.1.4	Diagnostická souprava pro stanovení protilátek LIAISON <i>Borrelia</i> IgG	19
2.1.1.5	Kontrola a kalibrace	20
2.1.1.6	Vyhodnocení a interpretace výsledků stanovení protilátek <i>Borrelia</i> IgM, IgG metodou CLIA na analyzátoru LIAISON XL pro vzorky séra/plazmy.....	21
2.1.2	Stanovení protilátek metodou Western blotting.....	22
2.1.2.1	Princip postupu	22
2.1.2.2	Příprava diagnostických reagensů a roztoků pro stanovení specifických protilátek proti <i>Borrelia</i> IgM, IgG	23
2.1.2.3	Provedení analýzy – inkubační protokol	24
2.1.2.4	Vyhodnocení a interpretace výsledků získaných metodou ANTI- <i>Borrelia</i> EUROLINE-RN-AT IgM pro vzorky séra/plazmy	27
2.1.2.5	Vyhodnocení a interpretace výsledků získaných metodou ANTI- <i>Borrelia</i> EUROLINE-RN-AT IgG pro vzorky séra/plazmy	29
2.2	Interpretace sérologických testů	30
3	Výsledky	31
3.1	Kazuistika.....	31
3.1.1	Pacient č.1	31
3.1.2	Pacient č.2	34

3.1.3	Pacient č.3	36
3.2	Srovnání laboratorního stanovení CLIA a Western blotting	39
3.3	Zhodnocení sezónního průběhu infekce <i>Lymeské borreliózy</i> v letech 2015 až 2017 .	43
4	Diskuze.....	49
5	Závěr	51
6	Zdroje:	52
7	Seznam obrázků.....	56
8	Seznam grafů	57
9	Seznam tabulek.....	58
10	Seznam zkratk.....	60

1 Lymeská borrelióza

Lymeská borrelióza je multisystémové onemocnění nejčastěji přenášené v ČR klíšťaty. S infikovanými původci se můžeme setkat po celém území ČR. Toto infekční onemocnění způsobuje specifický komplex druhů bakterií nazývaných souhrnně *Borrelia burgdorferi sensu lato*. V přírodě jsou rezervoárem těchto bakterií drobní hlodavci, ptáci a větší lesní zvěř, v domácnostech pak to jsou nejčastěji psi a kočky (Bhate et al., 2011).

1.1 Hledání původce

Před objevem *Borrelia burgdorferi* byly popisovány samostatné klinické jednotky (diagnózy) jako například: *erythema migrans*, *borreliový lymfocytom*, *acrodermatitis chronica atrophicans* atd.. Bylo také známo, že tyto příznaky jsou léčitelné antibiotiky. První poznatky o *Lymeské borrelióze* byly z roku 1883 v Breslau, jejichž autorem je německý dermatolog Alfred Buchwald, který popisoval kožní změny a označil je jako *acrodermatitis chronica atrophicans* (ACA), která odpovídá třetímu stádiu onemocnění (Bartůněk, 2013).

K průlomovému obratu došlo v roce 1975 a to díky, tak trochu tvrdohlavým rodičům dětí z městečka Old Lyme. Tyto děti byly v letních měsících opakovaně postihovány neobvyklým epidemickým zánětem kloubů, provázenými kožními příznaky (kruhové skvrny se světlým středem) (Bojar, 1996). Zároveň lékařům podílejícím se na šetření toho onemocnění neuniklo, že v oblasti, kde se děti vyskytovali, byl rozšířen výskyt klíšťat *Ixodes dammini* (Bartůněk, 2013). Na základě prací klinika a dermatologa Allena Steera a probíhajícím studiím, došlo k objevu nové klinické jednotky, která byla zařazena jako *lymeská artritida* (Bojar, 1996).

V roce 1982 Willy Burgdorfer (americký bakteriolog) objevil v krevních vzorcích od Allena Steera původce této nemoci, a tato spirochéta byla zařazena mezi borrelie. Stejně spirochéty také našel ve střevech klíšťat rodu *Ixodes dammini*. V roce 1987 lékaři Burdorfer, Barbour a Benach popsali etiologické agens vyvolávající *Lymeskou borreliózu* a pojmenovali ji *Borrelia burgdorferi* (Bartůněk, 2013). Původní předpoklad byl, že *Lymeská borrelióza* je způsobena jedním druhem bakterie.

Postupem času bylo zjištěno, že borelióza se vyskytuje na celé severní polokouli a přenašečem jsou klíšťata. Dále se zjistilo, že jiné druhy borrelií se vyskytují v severní Americe (*Borrelia burgdorferi sensu lato*), které způsobují obvykle postižení kloubů.

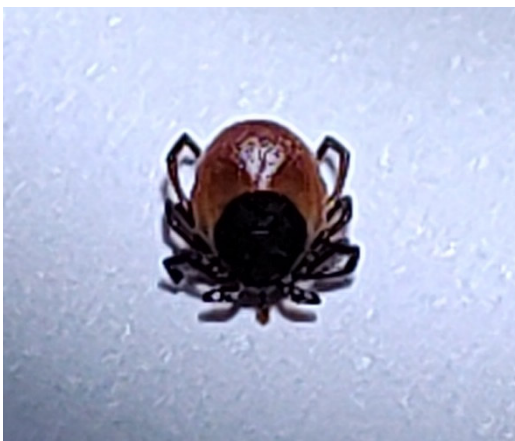
V Evropě se vyskytuje *Borrelia afzelii*, která nejčastěji způsobuje kožní defekty (*erythema migrans*). *Borrelia garinii*, druhý nejčastější druh v Evropě (i v ČR), postihuje nervový systém (Bellova obrna – postižení lícního nervu, případně *neuroborrelióza* – postižení CNS). V současné době je popsáno 10 druhů patogenních borelií, které se od sebe liší svou antigenní výbavou (*Borrelia spielmanii*, *Borrelia bavariensis*, *Borrelia lusitaniae*, *Borrelia valaisiana*, *Borrelia mayounii*) (Halperin et al., 2018).

1.2 Etiologie Lymeské borreliózy

Lymeská borrelióza je onemocnění vyvolané jedním či více patogenními bakteriemi komplexu *Borrelia burgdorferi sensu lato* ze skupiny *spirochet*, které se přenášejí na člověka (hostitele) po přisátí infikovaným vektorem (nejčastěji klíštětem rodu *Ixodes ricinus* – obrázek 1) u nás v Evropě (Prokeš, 2015). Jedná se o jednu z nejčastějších antropozoonóz.

Podle studie provedené státním veterinárním ústavem Protean s.r.o. v letech 2006-2023, kdy bylo vyšetřeno více než 18000 klíšťat odebraných z kůže lidí na území celé České republiky, se prokázalo, že v Karlovarském kraji je nejvyšší výskyt klíšťat pozitivních na borrelii (Burýšková, 2024).

Tato data nelze srovnávat s daty hlášených onemocnění, kde hraje velkou roli také počet lidí pohybujících se v daných lokalitách. Nemoc přenáší všechna vývojová stádia klíštěte (larvy, nymfy i dospělé samice) (Burýšková, 2024).



Obrázek 1: *Ixodes ricinus* (klíště obecné) (Zdroj: Fotografie pořízena autorkou práce).

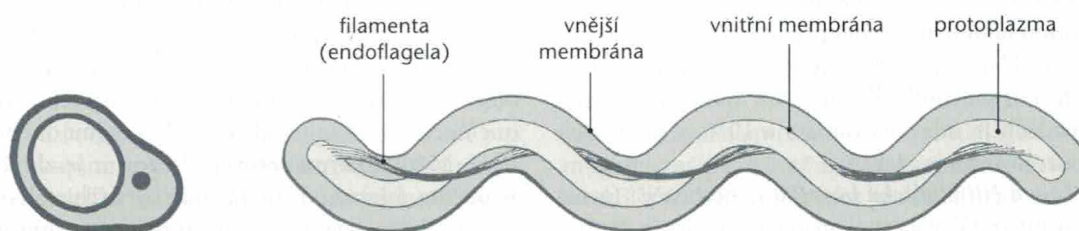
1.3 Charakteristika *Borrelia burgdorferi*

Řád: *Spirochetales*

Čeleď: *Spirochaetaceae*

Rod: *Borrelia burgdorferi sensu lato*

Borrelie jsou mikroaerofilní, gramnegativní bakterie s charakteristickým protáhlým spirálovitým tvarem (obrázek 2). Tento tvar umožňuje šroubovitý pohyb, který je vhodný pro proniknutí v nejčastějším místě výskytu, jako je vysoce viskózní prostředí mezibuněčné hmoty. Umožňuje jim překonat jak epiteliální, tak hematoencefalickou bariéru. Další vlastností borrelie je schopnost vstupovat do buněk a v nich déle přežívat. Mezi tyto buňky patří například *fibroblasty*, *dendritické buňky* a *makrofágy*. U déle trvající infekce (pozdější stádia) byly pozorovány i změny v tvaru (kulovité formy) a změny antigenních struktur. Výsledkem je horší dostupnost pro imunitní systém. (Křupka et al., 2009).



Obrázek 2: Příčný a podélný řez tělem borrelie (Zdroj: Beneš et al., 2009).

1.4 Přenos

Rezervoárem borrelií v přírodě jsou zvířata (lesní vysoká zvěř, drobní hlodavci, ptáci) a domácí zvířata (pes, kočka). Vektor, klíště (*Ixodes ricinus*) po přisátí na člověka (hostitele) přenáší zvířecí krev, která může obsahovat borrelie. Vhodným biotopem pro klíšťe jsou vlhké lesy a louky s vyšší trávou. Vlivem klimatických změn a oteplováním dochází k tomu, že se klíšťata mohou vyskytovat i ve výškách až okolo 1200 m.n.m s optimální teplotou 17-20 °C a vlhkostí 80%. Aktivitu klíšťat můžeme pozorovat již při teplotách 5 – 8 °C. Vznik infekce závisí na délce sání a rozvoj infekce je ovlivněn imunitním systémem hostitele (člověka) (SZÚ, 2024).

Borrelie během svého vývojového cyklu mají řadu vlastností, které jim umožňují vyhnout se obranným mechanismům imunitního systému hostitele (Snigh, 2004 B).

Borrelie je primárně extracelulární patogen, který má v pozdějších fázích schopnost vstupovat do *fibroblastů*, endoteliálních buněk, buněk *synovie* a *neuroglií* (Beneš et al., 2009). K nejdůležitějším vlastnostem patří schopnost přesunu regulace exprese povrchových proteinů - *outer surface protein* (Osp). Na počátku svého vývojového cyklu musí být schopny osídlit trávicí trakt klíštěte, kde se na povrchu borrelií exprimují hlavně proteiny OspA a OspB, jejichž funkcí je adheze borrelií na střevní epitel nenasátého klíštěte. Během sání dochází v důsledku příjmu krve z hostitele ke změnám prostředí v trávicím traktu klíštěte, které vede ke snížení exprese těchto proteinů a zvyšuje se exprese OspC, což umožňuje borreliím migraci skrze slinné žlázy klíštěte dostat se do krevního oběhu hostitele. Funkcí OspC je také schopnost vázat imunoregulační protein Salp15, který je obsažen ve slinách klíštěte, a tak napomáhá borreliím překonat imunitní reakci v iniciační fázi infekce hostitele, neboli v časném diseminovaném stádiu. Během přechodu do této fáze choroby dochází k poklesu exprese OspC a na povrchu borrelií se objevuje protein VlsE, který se vyznačuje vysokou antigenní variabilitou (Önder et al., 2012). Exprese proteinu VlsE a dalších povrchových antigenů borrelie aktivně omezuje působení rozvíjející se specifické imunitní odpovědi hostitele (Křupka et al., 2008). V těle hostitele borrelie dále exprimují molekuly vážící H-faktor, který je zapojený do regulace aktivace komplementu, a to napomáhá uniknout mechanismům nespecifické imunity a umožňuje přechod do chronické (pozdní) fáze infekce (Kraiczy et al., 2006).

1.5 Patogeneze

Patogeneze borrelióvé infekce je ovlivněna vlastnostmi a invazivní strategií původce a dále kvalitou imunitní odpovědi hostitele (Horká et al., 2009). V ranních stádiích je do značné míry spojena s přítomností životaschopných bakterií v místě zánětu, zatímco v pozdějších stádiích přispívají autoimunitní procesy. Inkubační doba je 5 - 14 dnů. Dlouhodobé vystavení imunitního systému hostitele borrelióvé infekci může vyvolat chronické autoimunitní onemocnění (Singh et al., 2004 A).

1.5.1 Imunitní odpověď

Klíště již v průběhu sání vylučuje proteiny, které mají imunosupresivní vliv (Singh et al., 2004 A). Vývoj infekčního onemocnění způsobeného borrelií probíhá z pohledu hostitelského organismu ve třech fázích: časně lokalizované stádium, časně diseminované stádium a pozdní (chronické) diseminované stádium. Po vstupu

do organismu se borrelie množí nejprve lokálně v místě přisátí klíštěte, což je označováno jako časné lokalizované stádium. Pokud nedojde k eliminaci bakterií imunitním systémem, nebo antibiotickou léčbou, poměrně rychle dochází k diseminaci krevní a lymfatickou cestou a nemoc přechází do časného diseminovaného stádia (Křupka et al., 2008). Při mechanismu časné lokalizované a časné diseminované formy vychází z kontaktu s makrofágy v místě zánětu (Singh et al., 2004 B). V pozdní fázi infekce se na orgánovém poškození pravděpodobně podílejí autoimunitní mechanismy, u refrakterní pozdní *lymeské artritidy* hraje roli i genetická predispozice pacientů (Křupka et al., 2008).

Imunitní systém hostitelského organismu dovede rozpoznat borrelie díky jejich povrchovým proteinům, což vede k interakci a aktivaci komplementového systému, makrofágů a dendritických buněk. Po této aktivaci dochází k prudké produkci prozánětlivých cytokinů TNF α , IL-1, IL-6, IL-8. V následném průběhu infekce dochází k specifické imunitní odpovědi s tvorbou protilátek (Rupprecht, 2008).

1.5.2 Klinické projevy borreliózy

Neléčené onemocnění borreliózy může mít až tři stádia. Vývoj infekce (1. až 3. stádia) závisí na kondici imunitního systému, případně včasném záchytu a zahájení léčby antibiotiky. Klinické projevy onemocnění boreliózou kolísá od bezpříznakových nákaz až po velmi závažná onemocnění a jsou vyvolané přímým působením borrelií na tkáň (Beneš et al., 2009). *Lymeskou borreliózou* lze onemocnět i opakovaně během života, což je způsobeno antigenní variabilitou borrelií a pacient může být ohrožen i chronickou infekcí, pokud nebyl dostatečně a včas léčen (Roháčová, 2005).

První stádium – akutní (časná) lokalizovaná infekce se projevuje nejčastěji kožním defektem (*erythema migrans*) (Prokeš, 2015 B). *Erythema migrans* (obrázek 3) se objevuje v místě kousnutí klíštětem a začíná jako červená *makula* zvětšující se až do velikosti několika desítek centimetrů, ale při velikosti alespoň 5 cm se považuje jako diagnosticky významná. *Erythema migrans* je přímým výsledkem uvolněných protizánětlivých markerů, dávky inokula a patogenity kmene. Z důvodu dostatečně silně vyvolané imunitní odpovědi se nedoporučuje serologické vyšetření na protilátky proti *Borrelia burgdorferi* ihned po odstranění přisátého klíštěte, nebo brzy po zjištění *erythema migrans*. Výsledky jsou často negativní a mají omezenou klinickou použitelnost (Theel et al., 2016). V případě správně zahájené antibiotické léčby dochází k úplnému

vyhojení infekce. První stádium trvá po dobu dvou až tří měsíců. Obvyklá léčba je u dospělých tetracyklíny po dobu 2-3 týdny. Klinické projevy u dětí se léčí *amynopenicilíny* (penicilín) popřípadě *makrolidy* po dobu obvykle 2 týdnů.



Obrázek 3: *Erythema migrans* (Zdroj: Fotografie pořízena autorkou práce).

Druhé stádium – časná diseminovaná infekce, kdy se při absenci léčby může infekce *borrelie* dostávat do krevního, nebo lymfatického systému, pomocí kterého se šíří do některého orgánu jako je například nervový systém, klouby, srdce, více ložisek na kůži – mnohočetná *erytemata*, *borreliový lymfom* apod.) (Beneš et al., 2009). Může trvat týdny až měsíce. Léčba je obdobná jako u prvního stádia. Může trvat 2 až 4 týdny (Theel et al., 2016).



Obrázek 4: *Borreliový lymfocytom na tváři.* (Zdroj: *By Spectrum11 - Own work, CC0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=12870456>*)

Třetí stadium – pozdní diseminovaná infekce. Může trvat i roky. Léčba se odvíjí od klinické formy. *Neuroborrelióza* se léčí *intravenózním* podáním *ceftriaxonu* po dobu 2 - 3 týdnů. Kloubní postižení, které může být chronické se doporučuje léčit ATB maximálně třikrát. Důvodem je, že příznaky spojené s autoimunitou nejsou ovlivnitelné antibiotickou léčbou (Smíšková et al., 2017).

1.5.3 *Borreliové onemocnění z pohledu různých lékařských oborů*

Borrelie jako multisystémové onemocnění je diagnostikována a léčena různými lékařskými obory.

Dermatolog: pacient obvykle přichází s kožní formou EM (akutní stádium *Lymeské borreliózy*), které je většinou léčeno antibiotiky tetracyklinové řady (2-3 týdny) – dospělá populace. Při svědomitém využívání antibiotika, dochází k úpravě klinického stavu a vyléčení infekce. Nevýhoda může být špatná snášenlivost a bakteriostatický účinek tetracyklinů, které jsou kontraindikovány u dětí do 12 let. Nejčastější původce je *Borrelia afzelii*.

Pediatr se setkává jak s EM a např. též s *borreliovým lymfocytomem* (raná diseminovaná fáze) nebo i s nervovým postižením (Bellova obrna). Dětská populace je léčena *penicilinovými, aminopenicilinovými* ATB, někdy *makrolidy*. Výhodou *penicilinů, aminopenicilinů* je baktericidní účinek a obvykle dobrá snášenlivost. Délka léčby se odvíjí od kliniky (2-3 týdny).

Praktičtí lékaři léčí dospělé pacienty a škála příznaků může být široká. Léčba se odvíjí od klinických příznaků, délky trvání příznaků a stádia choroby.

Infekcionista, neurologové, kardiologové obvykle léčí pozdnější a komplikovanější formy borreliózy. Léčba se opět odvíjí od stádia choroby a délky trvání příznaků. *Neuroborrelióza* vyžaduje nasazení *intravenózní* aplikace baktericidních antibiotik (*ceftriaxon, peniciliny* ad.) Nejčastěji způsobené *Borelie garinii*. Kardiologie řeší postižení srdečního svalu (velmi vzácná komplikace borreliózy cca 0.4 %).

Revmatologové řeší kloubní postižení *Borrelie burgdorferi*. Jedná se obvykle o II. až III. stádium nemoci, které může být doprovázeno autoimunitou.

1.6 *Dispenzarizace, hlášení*

Lymeská borelióza podléhá povinnému hlášení. V ČR je povinnost hlásit všechny formy onemocnění. Po prodělané léčbě a klinicky bezpříznakové pacienty není nutné sledovat a serologicky vyšetřovat. Je doporučeno u diseminované formy obvykle pacienty sledovat po dobu 12-24 měsíců s ohledem na klinické projevy. Pokles protilátek svědčí o správné léčbě a pokles aktivní infekce. Naopak náhlý vzestup protilátek často svědčí o novém onemocnění (Krbková et al. 2018).

2 Praktická část

V praktické části zpracovávám data pořízená při bakalářské praxi v laboratoři DIA-GON s.r.o. v Chebu na oddělení Klinické biochemie a imunologie. Po dobu mé praxe jsem veškerá laboratorní stanovení dělala pod odborným dohledem. Veškerá data pro vyhodnocení mé praktické části byla stažena z LIS laboratoře DIA-GON MP, s.r.o. se souhlasem vedení.

Cíle praktické části jsou rozdělené do tří oddílů kdy první část je zaměřena na popis diagnostických metod používaných v laboratoři Klinické biochemie a imunologie DIA - GON MP, s.r.o. v Chebu, které jsem používala k vyšetření hladiny specifických protilátek *Lymeské borreliózy* ve třídě IgM a IgG metodou CLIA na analyzátoru LIAISON XL a následné confirmaci protilátek proti specifickým antigenům pomocí imunoblotu metodou Western blotting na analyzátoru DYNABLOT od firmy DYNEX. Pokusit se vysvětlit důvod confirmace Western blotting a zjistit sběrem dat o vyšetření metodou CLIA a Western blotting. Zda-li metoda CLIA vyšetřila pozitivitu rozdílně oproti metodě Western blotting a co může být případnou příčinou rozdílného vyšetření (analytické specifika testu).

Druhá část popisuje důležitost zhodnocení klinického stavu pacientů v souladu s výsledky laboratorních testů. Na základě zhodnocení klinického obrazu 3 pacientů a sledování vývoje jejich specifických protilátek ve třídě IgM a IgG, bych se chtěla pokusit poukázat na to, že takto komplexní zhodnocení pacienta jsou klíčová pro určení správné diagnózy a umožňuje lékařům poskytnout pacientům optimální péči a léčbu.

Třetí část zahrnuje vyhodnocení počtu laboratorních testů na *Lymeskou borreliózu* v letech 2015-2017 s ohledem na průměrné teploty v daném období podložené rešerší článku z Českého hydrometeorologického ústavu, který spolupracuje se Státním zdravotním ústavem za podpory Ministerstva zdravotnictví České republiky o aktivitě klíšťat.

2.1 Použité metody

K diagnostice se používají metody přímé a nepřímé. **Přímá metoda** diagnostiky *Lymeské borreliózy* je založena na průkazu borrelii, anebo jejich komponent, a to metodami mikroskopickými, histologickými, kultivačními anebo PCR (Smíšková at al., 2017). Tyto metody jsou obvykle vysoce specifické, ale v běžné rutinní klinické praxi

se nevyužívají. Důvodem je obtížná standardizovanost, dlouhá doba vyšetření a vysoká cena (Votava et al., 2003).

Kultivační metody pro *Borrelie* se provádí z klinických vzorků (stěr z kůže, synoviální tekutina a mozkomíšni mok apod.) a jsou jedinou metodou prokazující živé *Borrelie* v organismu. Kultivace je obtížná, protože vyžaduje speciální složení kultivační půdy a je zdlouhavá (Wright et al., 2012).

Mikroskopické a histologické metody jsou využívány často pro výzkumné účely a ve vysoce specializovaných laboratořích (referenční laboratoře). Elektrooptický průkaz se provádí k zhodnocení morfologie *Borrelia burgdorferii* (rozměry, počet bičků) a imunocyto-chemickou reakcí antigenu s monoklonální protilátkou. Imunosorpční elektronová mikroskopie je založena na reakci antigenu se specifickou protilátkou na pevném sorbentu a následné konjugaci absorbovaného antigenu s monoklonální protilátkou označenou zlatem (Wright et al., 2012). U **nepřímé metody** diagnostiky borreliové infekce se využívá průkazu specifických protilátek, nebo testy buněčné imunity případně mediátorů imunitní reakce (Krbkova et al., 2018)

Serologická diagnostika *Lymeské borreliózy*, která je předmětem této práce se provádí ve dvou stupních. Prvním krokem je průkaz specifických protilátek, většinou enzymatickou immunoanalýzou (ELISA), kde dochází k určení positivity či negativity ve třídách časných IgM a pozdních IgG (Bartůňková, et al. 2011). Výskyt specifických protilátek u jednotlivých forem *Lymeské borreliózy* kolísá (Wilske, 2003). Druhým krokem při pozitivním či hraničním výsledku se provádí confirmace metodou Western blotting ve třídách IgM a IgG (Theel et al., 2016). Podle doporučení Společnosti infekčního lékařství České lékařské společnosti J. E. Purkyně je pozitivní test, který je takto confirmován považován za pozitivní (Krbkova et al., 2018). Serologicky stanovená pozitivita specifických protilátek podporuje diagnózu, ale není rozhodující pro její stanovení, vždy je důležité brát ji v kontextu s klinickým obrazem pacienta (Dlouhý et al., 2011).

K laboratorní diagnostice *Lymeské borreliózy* jsem použila metodu CLIA na analyzátoru LIAISON XL (obrázek 4, 5 A, B, 6 A, B) pro stanovení protilátek *Borrelia* IgG, IgM a jako confirmační metodu Western blotting (Anti-*Borrelia* EUROLINE-RN-AT IgM, IgG) na automatizovaném analyzátoru Dynablot (obrázek 11).

2.1.1 Stanovení protilátek *Borrelia* IgG, IgM metodou CLIA na analyzátoru LIAISON XL

2.1.1.1 Princip postupu

Test pro analyzátor LIAISON XL od firmy DiaSorin (obrázek 4) využívá metodu chemiluminiscenční imunoanalýzy (CLIA, ChemiLumminiscence ImmunoAssay) pro kvalitativní stanovení specifických protilátek třídy IgG a IgM proti *Borrelia burgdorferi sensu lato* ve vzorcích lidského séra nebo plazmy.

2.1.1.2 Provedení

Zkumavky se vzorkem označené čárovým kódem se vloží do přístroje (obrázek 4). Tím dojde k načtení čárového kódu, na jejímž základě analyzátor vyhodnotí metodu stanovení. Po odsouhlasení metody automatická jehla nadávkuje vzorek do kyvety, ke kterému přidá potažené magnetické částice záchyťovými molekulami a roztok pro ředění vzorků. Nadchází první inkubace, při které dojde k navázání přítomné protilátky na potažené magnetické částice záchyťovými molekulami. Následuje promytí, při kterém dojde k odstranění nenavázaného materiálu. Do reakční kyvety se vzorkem se přidá konjugát. Konjugát obsahuje myší monoklonální protilátky, které jsou značené derivátem isoluminolu. Během druhé inkubace dochází k reakci konjugátu s protilátkami navázanými na magnetické částice. Inkubace je ukončena promytím a odstraněním nenavázaného materiálu. V konečné fázi jsou přidány startovací reagentie a dochází k prudké chemiluminiscenční reakci. V měřicí komoře fotonásobič měří světelný signál odpovídající množství konjugátu s navázanou protilátkou v relativních světelných jednotkách (RLU, relative light unit). Naměřená hodnota koresponduje s koncentrací prokazovaných protilátek (DiaSorin S.p.A, návody diagnostických setů LIAISON® *Borrelia* IgG, IgM 2023).



Obrázek 5: Analyzátor LIAISON XL (Zdroj: Fotografie je pořízena autorkou práce na KL DIA-GON MP, s.r.o. Cheb).



A



B

Obrázek 6: Analyzátor LIAISON XL – A) Prostor pro nádobu na pevný odpad, zásobní lahve s destilovanou vodou a promývacím roztokem, B) Prostor pro nádobu na tekutý odpad (Zdroj: Fotografie je pořízena autorkou práce na KL DIA-GON, s.r.o. Cheb).



A



B

Obrázek 7: Analyzátor LIAISON XL – A) Chlazený prostor pro reagenční integrály, B) prostor pro vzorky (Zdroj: Fotografie je pořízena autorkou práce na KL DIA-GON, s.r.o. Cheb).

2.1.1.3 Diagnostická souprava pro stanovení protilátek LIAISON Borrelia IgM II (obrázek 7)

Testovací integrál pro LIAISON Borrelia IgM II je založen na chemiluminiscenční imunoanalýze pro stanovení specifických protilátek třídy IgM proti *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Testovací souprava obsahuje magnetické částice potažené rekombinantním antigenem OspC (*Borrelia arzelii* kmen pKo) a pro zvýšení přesnosti diagnostiky se využívá specifické rekombinantní antigeny VlsE (*Borrelia garinii* kmen pBi a *Borrelia sensu strictu* kmen B31) získané z *E.coli*. Pro stanovení protilátek se užívá lidské sérum, nebo plazma (DiaSorin S.p.A, návody diagnostických setů LIAISON® Borrelia IgG, IgM 2023).



Obrázek 8: Reagenční integrál pro stanovení protilátek třídy IgM (Zdroj: Fotografie je pořizena autorkou práce na KL DIA-GON, s.r.o. Cheb).

2.1.1.4 Diagnostická souprava pro stanovení protilátek LIAISON Borrelia IgG (obrázek 8)

Test LIAISON Borrelia IgG je založen na chemiluminiscenční imunoanalýze pro stanovení specifických protilátek třídy IgG proti *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Testovací souprava obsahuje magnetické částice potažené rekombinantním antigenem VlsE (*Borrelia garinii* kmen pBi) získaným z *E.coli*. VlsE je povrchový proteinový antigen, který v laboratorní diagnostice vypovídá o časně i pozdní IgG imunitní odpovědi proti *Lymeské borrelióze* a má vysokou citlivost a specifitu (DiaSorin S.p.A, návody diagnostických setů LIAISON® Borrelia IgG, IgM 2023).



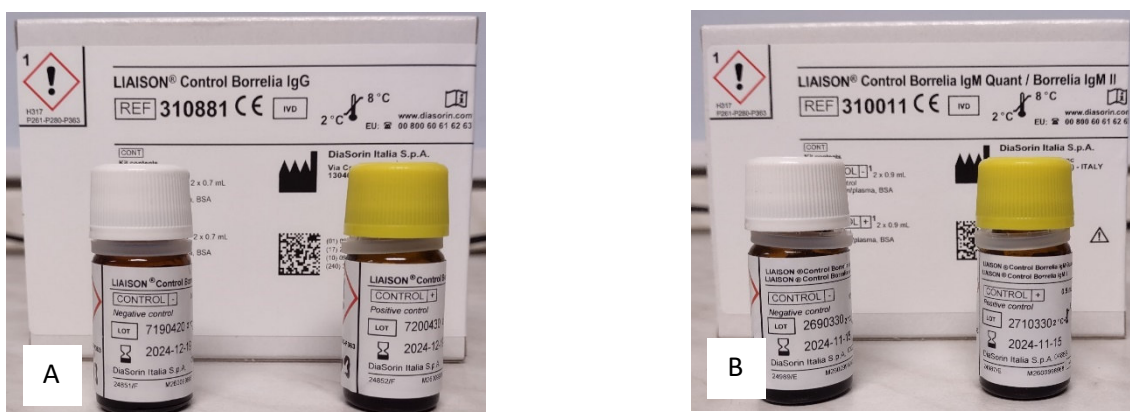
Obrázek 9: Reagenční integrál pro stanovení protilátek třídy IgM (Zdroj: Fotografie je pořizena autorkou práce na KL DIA-GON, s.r.o. Cheb).

2.1.1.5 Kontrola a kalibrace

Pro testy LIAISON Borrelia IgM, IgG je doporučeno výrobcem provedení kalibrace a to za následujících situací:

- Je použita nová šarže soupravy.
- Poslední kalibrace byla provedená před více než jedním týdnem.
- Kontrolní hodnoty leží mimo očekávané rozmezí.

Po výměně soupravy a následné kalibraci a při ranním startu před spuštěním analýzy patientských vzorků je nutné provést vždy kontrolu pomocí kontrol (obrázek 9 A,B) LIAISON Control Borrelia IgM, IgG liquor (REF: 310012, DiaSorin S.p.A., Itálie) (DiaSorin S.p.A, návody diagnostických setů LIAISON® Borrelia IgG, IgM 2023).



Obrázek 10: Kontrolní lahvičky LIAISON Control Borrelia A) IgM, B) IgG liquor (REF: 310012, DiaSorin S.p.A., Itálie) (Zdroj: Fotografie je pořizena autorkou práce na KL DIA- GON, s.r.o. Cheb).

2.1.1.6 Vyhodnocení a interpretace výsledků stanovení protilátek *Borrelia* IgM, IgG metodou CLIA na analyzátoru LIAISON XL pro vzorky séra/plazmy

Negativní výsledek vyšetření IgM/IgG protilátek proti *Borrelia burgdorferi* znamená, že pacient nebyl infikován, anebo též se může jednat o velmi časná stádium akutní infekce, kdy nebyly vytvořeny detekovatelné hladiny protilátek (DiaSorin S.p.A, návody diagnostických setů diagnostickým soupravám LIAISON® *Borrelia* IgG, IgM 2023).

Doporučení laboratoře zní: při klinických příznacích a pozitivní anamnéze, která svědčí pro časná stádium borreliové infekce není nutné čekat na výsledky odběru, který má význam vyšetřit v odstupe 4 týdnů a nasadit ATB léčbu ihned. Kontrolní odběr je vhodný za 4 týdny po ukončení léčby (DiaSorin S.p.A, návody diagnostických setů LIAISON® *Borrelia* IgG, IgM 2023).

Pozitivní výsledek vyšetření IgM/IgG protilátek proti *Borrelia burgdorferi* znamená akutní infekci při detekci protilátek třídy IgM. Při detekci protilátek třídy IgG se jedná o stav po prodělané infekci, nebo již delší dobu probíhající stádium infekce. Vždy musí klinik hodnotit nález v kontextu s klinickými příznaky a anamnézou (délkou trvání příznaků, klíště v anamnéze, ATB léčba). Serologie je doplňující metodou pro potvrzení diagnózy. Velkým pokrokem by objev VlsE a jeho C6 peptidu jako markerů protilátkové odpovědi u *Lymeské borreliózy*. Diagnostika tohoto antigenu funguje spíše v pozdější fázi infekce a má nízkou citlivost během časná infekce. Proto se v současné době doporučuje při výskytu typického klinického příznaku (*erythema migrans*) ATB léčbu zahájit okamžitě bez potvrzující serologické diagnostiky. Vzestup nebo pokles hladiny specifických protilátek má výpovědní hodnotu, která svědčí pro probíhající infekci, případně ustupující infekci po úspěšné ATB léčbě. U složitějších případů je vhodné vyloučit jiná infekční agens. Optimální je osobní kontakt klinika a laboratorního pracovníka (Marques,2015).

Koncentrace protilátek je vypočtená analyzátořem pro třídu IgG a je uvedena v arbitrálních jednotkách (AU/ml), pro třídu IgM je jednotkou index pozitivity (DiaSorin S.p.A, návody diagnostických setů LIAISON® *Borrelia* IgG, IgM 2023).

Tabulka 1: Interpretace výsledků pro třídu IgM, IgG.

Interpretace	Protilátky v třídě IgM IP-index pozitivity	Protilátky v třídě IgG (AU/ml)
Negativní výsledek	0,9 a nižší	10 a nižší
Hraniční výsledek	0,9 - 1,1	10 - 15
Pozitivní výsledek	1,1 a vyšší	15 a vyšší
Rozsah měření	0,0 - 6	5 - 240

Zdroj.: DiaSorin S.p.A, návody diagnostických setů LIAISON® Borrelia IgG, IgM 2023.

Na základě tabulky 1 jsou ustanovena doporučení výrobcem ohledně vyhodnocení a interpretaci výsledků laboratoří. Při hraničních výsledcích, to znamená v hodnotách mezi 0,9-1,1 se považují za nejasné. Takovéto vzorky se musí znovu vyšetřit. Při druhém vyšetření, pokud vyjde výsledek negativní je hodnocen jako negativní, při pozitivitě jako pozitivní. Pokud ale výsledek opakovaně vyjde hraniční, měl by se zohlednit lékařem klinický stav pacienta a případně hledat jiné příčiny dané infekce (DiaSorin S.p.A, návody diagnostických setů LIAISON® Borrelia IgG, IgM 2023).

2.1.2 Stanovení protilátek metodou Western blotting

Pomocí Western blotting, neboli imunoblotu můžeme rozlišit protilátky proti jednotlivým specifickým antigenům. Tato metoda se využívá zejména ke confirmaci výsledků získaných pomocí CLIA nebo jiných screeningových testů. V naší laboratoři je úzus: Western blotting vyšetřit (potvrdit) všechny pozitivní nálezy CLIA metody, případně pokud klinik vysloví požadavek na kompletní vyšetření L. borreliozy (Anti-Borrelia Euroline-RN-AT, protilátky proti Borrelia (IgM, IgG), návody diagnostických setů k analyzátoru DYNA-BLOT, 2023).

2.1.2.1 Princip postupu

Komerční testovací soupravy EUROLINE (obrázek 10 A, B) pro použití testu Anti-Borrelia EUROLINE-RN-AT umožňuje kvalitativní in vitro zkoušku na lidské protilátky třídy IgM, IgG proti antigenům Borrelie v séru nebo plazmě. Souprava obsahuje testovací stripy, které jsou potaženy purifikovanými antigeny. V prvním kroku reakce jsou jednotlivé imunoblotové stripy inkubovány s naředěnými vzorky pacientů, při které dochází k vazbě specifických protilátek přítomných ve vyšetřovacím vzorku na příslušné antigenní linie na stripu. Při pozitivní reakci specifické IgM, IgG protilátky se naváží na odpovídající antigeny.

K následné detekci navázaných specifických protilátek slouží po promytí, inkubace s enzymově značenými ant-lidskými IgM, IgG konjugátem. Vizualizace je provedena inkubací se substrátovým roztokem, který katalyzuje barevnou reakci. Vyhodnocení je pomocí počítačového softwaru po vysušení jednotlivých imunoblotových stripů (Anti-Borrelia Euroline-RN-AT, protilátky proti Borrelia (IgM, IgG), návody diagnostických setů k analyzátoru DYNA-BLOT, 2023).

2.1.2.2 Příprava diagnostických reagensů a roztoků pro stanovení specifických protilátek proti Borrelia IgM, IgG

Všechny reagensie se musí nechat 30 minut před použitím vytemperovat na pokojovou teplotu (+18°C až +25°C).

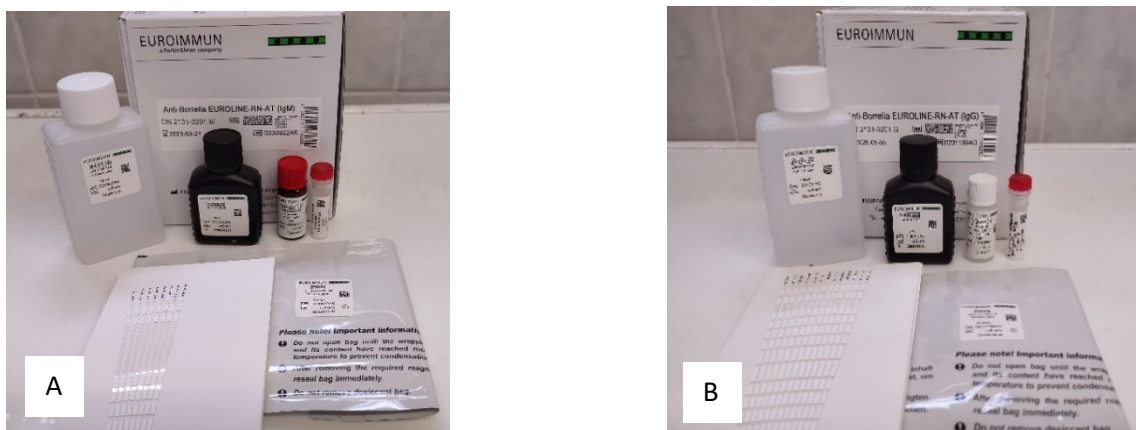
Komerční soupravy Anti-Borrelia EUROLINE-RN-AT obsahují:

- **Testovací stripy potažené antigeny.** Pro testování protilátek ve **třídě IgM** jsou to antigeny: nativní OspC Bg, nativní OspC Bb, nativní OspC Ba, p39, p41 a VlsE Bb. Pro testování protilátek ve **třídě IgG** jsou to antigeny: p18, p19, p20, p21, p58, OspC (p25), p39, p83, p41, LBb, LBa, VlsE Bg, VlsE Bb a VlsE Ba.
 - o Jsou ihned připraveny k použití.
- **Pozitivní kontrola** – lidská protilátka IgM, IgG, která je 50x koncentrovaná
 - o Kontrolní sérum slouží pro pozitivní kontrolu. Pro přípravu je potřeba požadované množství kontrolního séra odebrat čistou pipetou a naředit 1:51 univerzálním pufrům. Takto připravené kontrolní sérum je stabilní jeden den.
- **Enzymový konjugát** – 10 x koncentrované anti-lidské IgM, IgG značené alkalickou fosfatázou
 - o Pro přípravu enzymového konjugátu odebereme požadované množství čistou pipetou a naředíme 1:10 připraveným univerzálním pufrům. Naředěný enzymový konjugát lze použít pouze v den ředění.
- **Univerzální pufr** - 10x koncentrovaný
 - o Před přípravou univerzálního pufru se musí obsah řádně promíchat. Po promíchání se odebere potřebné množství čistou pipetou a naředí se v poměru 1:10 deionizovanou vodou. Takto naředěný univerzální pufr lze použít pouze v den ředění.

- **Substrátový roztok (NBT/BCIP)**

- Je ihned připraven k použití. Důležité je udržovat substrátový roztok v tmavé nádobě, protože jeho komponenty jsou citlivé na světlo.

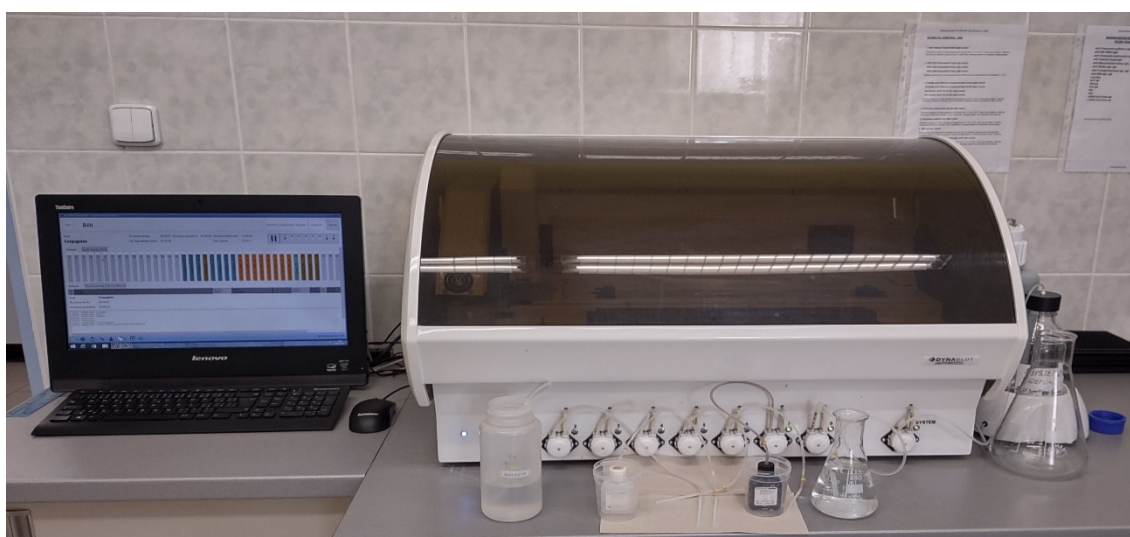
(Anti-Borrelia Euroline-RN-AT, protilátky proti Borrelia (IgM, IgG), návody diagnostických setů k analyzátoru DYNA-BLOT, 2023).



Obrázek 11: A) Komerční testovací souprava Anti-Borrelia EUROLINE-RN-AT pro stanovení protilátek proti Borrelia IgM. B) Komerční testovací souprava Anti-Borrelia EUROLINE-RN-AT pro stanovení protilátek proti Borrelia IgG (Zdroj: Fotografie je pořizena autorkou práce na KL DIA-GON s.r.o. Cheb).

2.1.2.3 Provedení analýzy – inkubační protokol

Analýza probíhá pomocí automatického analyzátoru DYNA-BLOT automatic (obrázek 11).



Obrázek 12: Automatický analyzátor DYNA-BLOT automatic (Zdroj: Fotografie je pořizena autorkou práce na KL DIA-GON, s.r.o. Cheb).

Blokování:

Z komerčně dodaného balení se vyjme potřebné množství testovacích stripů, které se umístí do prázdných kanálků vaničky (obrázek 12 A, B). Každý jednotlivý testovací strip obsahuje v horní části číslo, které musí být dobře viditelné. Do každého jednotlivého inkubačního kanálku vaničky se napipetuje 1,5 ml naředěného univerzálního roztoku a za stálého kývání při pokojové teplotě se inkubuje 15 minut.



Obrázek 13: Automatický analyzátor DYNA-BLOT automatik – A) inkubační vanička se stripy. B Stojan s patientskými vzorky sér (Zdroj: Fotografie je pořízena autorkou práce na KL DIA-GON, s.r.o. Cheb).

První inkubace vzorku:

Po 15minutové inkubaci se odsaje z kanálků vaničky veškerá kapalina. Před naředěním vzorku a 30minutovou inkubací se do každého kanálku vaničky napipetuje 1,5 ml naředěného univerzálního roztoku a k němu se přidá 30 μ l patientského vzorku. Inkubace probíhá za stálého kývání při pokojové teplotě.

Promývání:

Po 30minutové inkubaci se veškerá kapalina z kanálků vaničky odsaje a každý kanálek se promývá celkem 3krát po 5minutách. To se provádí 1,5 ml univerzálního pufru za stálého třepání.

Druhá inkubace vzorku:

Po promytí se do každého kanálku vaničky přidá 1,5 ml naředěného enzymového konjugátu a při pokojové teplotě se inkubuje po dobu 30 minut za stálého kývání.

Promývání:

Po 30minutové inkubaci se veškerá kapalina z kanálků vaničky odsaje a každý kanálek se promývá celkem 3krát po 5 minutách. To se provádí 1,5 ml univerzálního pufru za stálého kývání.

Třetí inkubace vzorku:

Po promytí se odsaje veškerá kapalina z kanálků vaničky a přidá se 1,5 ml substrátového roztoku a inkubuje se 10 minut při pokojové teplotě za stálého kývání.

Zastavovací reakce:

Odsaje se veškerá kapalina z každého kanálku vaničky a promýváme každý kanálek vaničky celkem 3krát po 1 minutě deionizovanou vodou.

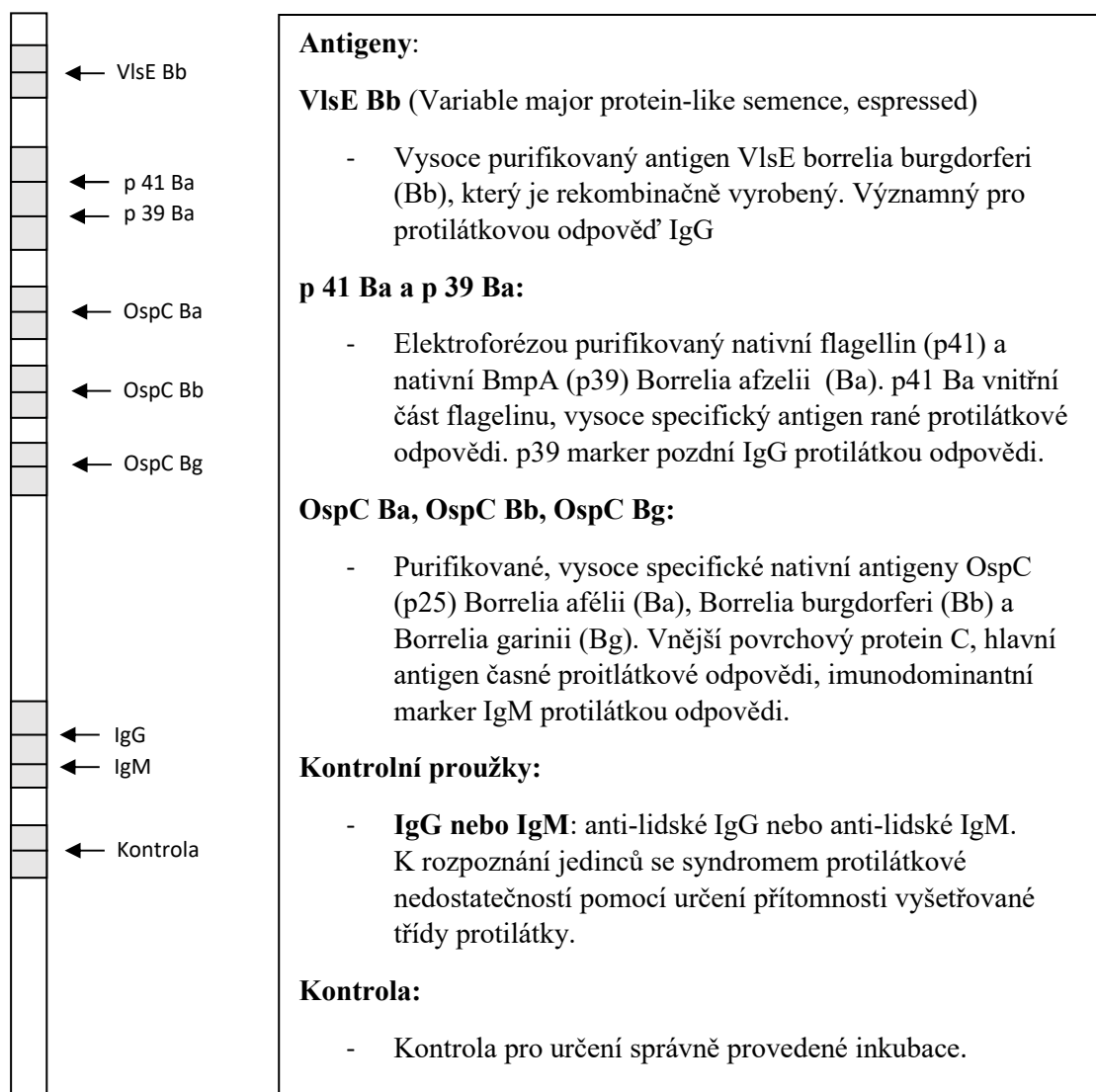
(Anti-Borrelia Euroline-RN-AT, protilátky proti Borrelia (IgM, IgG), návody diagnostických setů k analyzátoru DYNA-BLOT, 2023).

Vyhodnocení:

Na závěr se jednotlivé testovací stripy vysuší a vyhodnotí se pomocí počítačového softwaru EUROLIne Scan (digitální).

Pro správné provedení testu na protilátky třídy IgG proti antigenům Borrélie je potvrzeno intenzivním zbarvením kontrolního proužku a pozitivní reakci IgG proužku. Pro stanovení provedení testu na protilátky třídy IgM proti antigenům Borrélie je potvrzeno intenzivním zbarvením kontrolního proužku a pozitivní reakci IgM proužku. Jestliže jeden z těchto proužků vykazuje špatnou nebo žádnou barevnou reakci, výsledky na základě tohoto nemohou být použity a test se musí zopakovat (Anti-Borrelia Euroline-RN-AT, protilátky proti Borrelia (IgM, IgG), návody diagnostických setů k analyzátoru DYNA-BLOT, 2023).

2.1.2.4 Vyhodnocení a interpretace výsledků získaných metodou ANTI-Borrelia EUROLINE-RN-AT IgM pro vzorky séra/plazmy (obrázek 13)



Obrázek 14: Umístění a popis antigenů na imunoblotovacím stripu pro testování protilátek IgM (Zdroj: Anti-Borrelia Euroline-RN-AT, protilátky proti Borrelia (IgM, IgG), návody diagnostických setů k analyzátoru DYNA-BLOT, 2023).

Při pozitivitě purifikovaných antigenů OspC *Borrelia afzelii*, *Borrelia burgdorferi* a *Borrelia garinii* mají nejvyšší citlivost a specifickou pro stanovení protilátek třídy IgM a to v časných stádiích Borreliových infekcí.

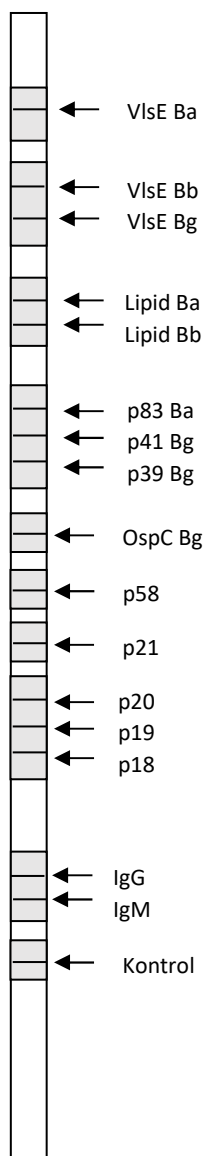
V ojedinělých případech může dojít k tomu, že v časných stádiích borrelióvé infekce mohou protilátky ve třídě IgM s OspC být negativní nebo slabě pozitivní. V tomto případě se vyhodnocení provede pomocí následujícího schématu (tabulka 2):

Tabulka 2: Schéma pro referenční vyhodnocení protilátek IgM metodou Western blot

Výsledek protilátek		Specifické antigenové pásy: p39, VlsE Bb	
		1 proužek pozitivní	Žádný proužek
OspC Ba	Antigenový proužek pozitivní	pozitivní	pozitivní
OspC Bb	OspC Ba nebo OspC Bg	pozitivní	hraniční
OspC Bg	Slabě pozitivní		
	Antigenový proužek negativní	pozitivní	negativní

Zdroj: Anti-Borrelia Euroline-RN-AT, protilátky proti Borrelia (IgM, IgG), návody diagnostických setů k analyzátoru DYNA-BLOT, 2023.

2.1.2.5 Vyhodnocení a interpretace výsledků získaných metodou ANTI-Borrelia EUROLINE-RN-AT IgG pro vzorky séra/plazmy



Antigeny:

VlsE Ba, VlsE Bb a VlsE Bg (Variable major protein-like semence, expressed)

- Vysoce purifikované rekombinantní antigeny VlsE z *Borrelia afélii* (Ba), *Borrelia burgdorferi* (Bb) a *Borrelia garini* (Bg).

Lipid Ba a Lipid Bd:

- Membránové frakce byly extrahovány lipidy *Borrelia afélii* (Ba) a *Borrelia burgdorferi* (Bb). Protilátky proti lipidům borélie se často vyskytují v pozdní fázi infekce.

p83:

- Purifikovaný rekombinantní protein p83 z Borrelie. Protilátky proti p83 se často objevují v pozdní fázi infekce.

p 41 Ba a p 39 Ba:

- Purifikovaný rekombinantní flagelín (p41) a BmpA (p39) z borélie

OspC Bg:

- Vysoce specifický rekombinantní OspC získaný (p25) z různých boréliových kmenů

p58, p21, p20, p19, p18

- Rekombinantní vysoce specifické antigeny z *Borrelia burgdorferi* purifikované afinitní chromatografií.

Kontrolní proužky:

- **IgG nebo IgM:** anti-lidské IgG nebo anti-lidské IgM. K rozpoznání jedinců se syndromem protilátkové nedostatečnosti pomocí určení přítomnosti vyšetřované třídy protilátky

Kontrola:

- Kontrola pro určení správně provedené inkubace.

Obrázek 15: Umístění a popis antigenů na imunoblotovacím stripu pro testování protilátek IgG (Zdroj: *Anti-Borrelia Euroline-RN-AT*, protilátky proti *Borrelia* (IgM, IgG), návody diagnostických setů k analyzátoru *DYNA-BLOT*, 2023).

2.2 Interpretace sérologických testů

Z doporučení Společnosti infekčního lékařství České lékařské společnosti J.E. Purkyně vyplývá, že interpretaci výsledků lze činit za určitých skutečností. Pokud stanovení protilátek, které bylo správně metodicky provedeno je průkazem probíhající nebo proběhlé infekce. Zároveň slouží také jako potvrzení či vyvrácení kontaktu s původcem *Lymeské borreliózy*. Hladina protilátek ve třídě IgM je odpověď přechodná a u některých případů může chybět úplně. Pozitivní diagnózu s pozitivními protilátkami ve třídě IgM lze jako pozitivní diagnózu onemocnění zvažovat pouze v kontextu s pozitivní klinickou anamnézou pacienta, a to i v případě pozitivních protilátek ve třídě IgG (Krbková et al., 2018).

V současné době je doporučení provést serologické potvrzení *Lymeské borreliózy* při výskytu typického *erythema migrans*. V tomto případě se serologická diagnostika provádí až po proběhlé ATB léčbě, která slouží pro zhodnocení vývoje léčby klinikem. V případě, že *erythema migrans* v časném stádiu onemocnění není klinicky typická je důležitá serologická diagnostika LB (Desseau et al., 2018).

Hladina protilátek ve třídě IgM obvykle mizí rychle s odeznívajícími klinickými příznaky, IgG může přetrvávat většinou po dobu až jednoho roku a u artritid může až několik let.

3 Výsledky

3.1 Kazuistika

3.1.1 Pacient č.1

Muž ve věku 69 let se dostavil 3.11.2017 na interní ambulanci do nemocnice v Chebu s klinickým obrazem *Erythema migrans*. Lékařem byl nasazen *Doxycyklin* na 21 dnů a doporučena kontrola stavu po 5 dnech léčby. Kontrola proběhla 8.11.2017 na ambulanci imunologie a alergologie v Chebu. Zároveň byl doporučen odběr na vyšetření *Lymeské borreliózy*, který byl proveden 9.11.2017 (tabulka 3).

Tabulka 3: Vyhodnocení vyšetření pacienta č.1 ze dne 9.11.2017.

Datum	Stanovení CLIA				Stanovení Western blotting	
	Borrelia IgM		Borrelia IgG		IgM	IgG
	Hodnota (IP)	Výsledek	Hodnota (IU/ml)	Výsledek	Výsledek	Výsledek
9.11.2017	>6,00	pozitivní	101,50	pozitivní	pozitivní	pozitivní

Zdroj: LIS Klinické laboratoři DIA-GON MP, s.r.o. v Chebu.

Hodnocení laboratoře: Serologický nálezem (tabulka 3) byla prokázána vysoká hladina specifických borreliových protilátek ve třídě IgM, IgG, což svědčí pro akutní borreliovou infekci. Hodnocení tohoto výsledku je nutno hodnotit v kontextu s klinickými příznaky a anamnézou pacienta.

Dne 29.11.2017 se pacient dostavil na kontrolu na ambulanci imunologie a alergologie po dobrání *Doxycyklinu*. Došlo k ústupu *erythema migrans*, pacient se cítil dobře. Klinický stav pacienta byl v normě. Kontrolní odběr nabrán 27.2.2018 (tabulka 4).

Tabulka 4: Vyhodnocení vyšetření pacienta č.1 ze dne 27.2.2018.

Datum	Stanovení CLIA				Stanovení Western blotting	
	Borrelia IgM		Borrelia IgG		IgM	IgG
	Hodnota (IP)	Výsledek	Hodnota (IU/ml)	Výsledek	Výsledek	Výsledek
27.2.2018	3,20	pozitivní	61,60	pozitivní	pozitivní	pozitivní

Zdroj: LIS Klinické laboratoři DIA-GON MP, s.r.o. v Chebu.

Hodnocení laboratoře: Došlo k výraznému poklesu hladiny borreliových protilátek. Nález svědčí pro úspěšnost léčby, nutno vždy hodnotit v kontextu s vývojem klinických příznaků po léčbě.

Po skoro roce se dne 5.3.2019 pacient dostavil do ambulance a stěžoval si na bolest kolene. Byla stanovena diagnóza artróza kolene a pacient obdržel doporučení na vyšetření *Lymeské borreliózy* (tabulka 5).

Tabulka 5: Vyhodnocení vyšetření pacienta č.1 ze dne 5.3.2019.

Datum	Stanovení CLIA				Stanovení Western blotting	
	Borrelia IgM		Borrelia IgG		IgM	IgG
	Hodnota (IP)	Výsledek	Hodnota (IU/ml)	Výsledek	Výsledek	Výsledek
5.3.2019	1,27	pozitivní	16,93	negativní	pozitivní	pozitivní

Zdroj: LIS Klinické laboratoři DIA-GON MP, s.r.o. v Chebu.

Hodnocení laboratoře: Hladina specifických borreliových protilátek ve třídě IgM, IgG nadále klesá v porovnání s předchozím vyšetřením (tabulka 4,5). Klinik v kontextu s vývojem klinických příznaků, vyhodnocuje nález jako artróza a nenasazuje ATB léčbu.

Skoro po třech letech, dne 4.1.2023 pacient navštívil ambulanci imunologie a alergologie s *erythema migrans* na levé končetině. Pacient si stěžuje na bolest. Bylo doporučeno vyšetření na *Lymeskou borreliózou* (tabulka 6). Na základě laboratorního vyšetření a klinických příznaků byla diagnostikována nová akutní *Lymeská borelióza*. Pacientovi byl nasazen *Cefuroxin* (2x500mg/den) po dobu 21 dnů.

Tabulka 6: Vyhodnocení vyšetření pacienta č. 1 ze dne 4.1.2023.

Datum	Stanovení CLIA				Stanovení Western blotting	
	Borrelia IgM		Borrelia IgG		IgM	IgG
	Hodnota (IP)	Výsledek	Hodnota (IU/ml)	Výsledek	Výsledek	Výsledek
4.1.2023	2,13	pozitivní	>240,00	pozitivní	pozitivní	pozitivní

Zdroj: LIS Klinické laboratoři DIA-GON MP, s.r.o. v Chebu.

Hodnocení laboratoře: Výrazný nárůst hladiny specifických borreliových protilátek třídy IgM a především IgG (tabulka 6). Serologický nálezn svědčí pro borreliovou infekci. Doporučeno hodnotit v kontextu s klinickými příznaky a anamnézou.

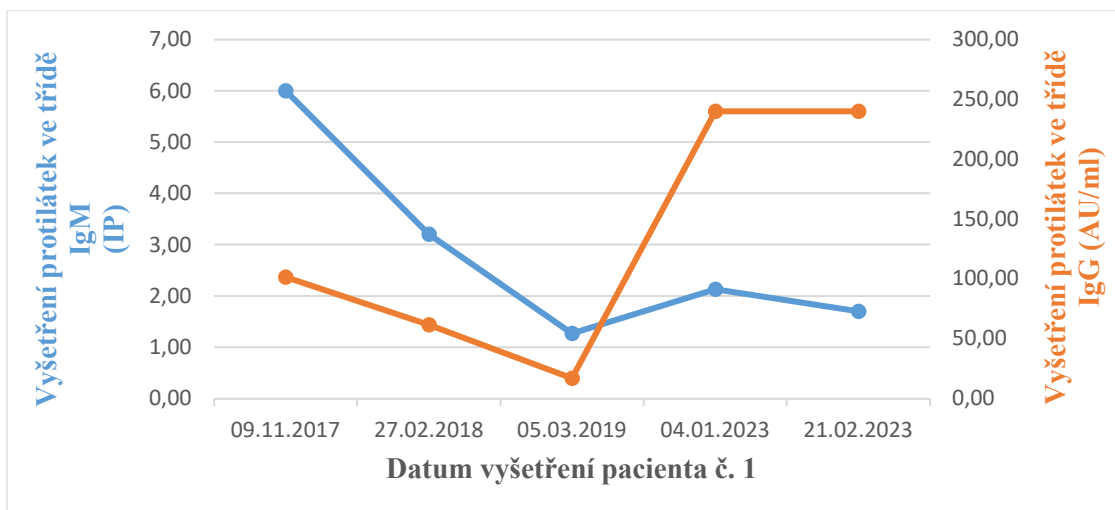
Dne 21.2.2023 kontrola po léčbě *Cefuroximem* a laboratorní stanovením protilátek, kdy hladina IgM protilátek klesá a zároveň přetrvává vysoká hladina IgG protilátek. Po antibiotické léčbě se klinický stav upravil.

Tabulka 7: Vyhodnocení vyšetření pacienta č.1 ze dne 21.2.2023.

Datum	Stanovení CLIA				Stanovení Western blotting	
	Borrelia IgM		Borrelia IgG		IgM	IgG
	Hodnota (IP)	Výsledek	Hodnota (IU/ml)	Výsledek	Výsledek	Výsledek
21.2.2023	1,70	pozitivní	>240,00	pozitivní	pozitivní	pozitivní

Zdroj: LIS Klinické laboratoři DIA-GON MP, s.r.o. v Chebu.

Hodnocení laboratoře: U pacienta přetrvávají borreliové protilátky třídy IgM i IgG. Laboratorní vyšetření bylo v krátkém časovém odstupu. Doporučeno hodnotit nález v kontextu s klinickými příznaky po léčbě.



Graf 1: Přehled vývoje protilátek ve třídě IgM a IgG u pacienta č. 1 (zdroj: LIS Klinické laboratoři DIA-GON MP, s.r.o. v Chebu).

Závěrečné hodnocení: Na základě klinických příznaků a laboratorního stanovení hladiny protilátek (graf 1) u pacienta č.1 proběhly dvě epizody borreliové infekce.

3.1.2 Pacient č.2

Dne 27.9.2022 přichází do ordinace praktického lékaře 29letá pacientka s kožním nálezem v podkolení jamce lividního zbarvení, velikosti dlaně. Pacientka uvádí odstranění klíštěte z postižené oblasti před 2 týdny. Dále si stěžuje na bolest hlavy a bolest v tříslu, kde nebylo zjištěno zvětšení uzlin ani jiná patologie. Lékař stanovil diagnózu A692 (Lymeská nemoc), doporučil kontrolní odběr (tabulka 8) a nasadil *Doxyhexal* 200 mg/den (2 balení).

Tabulka 8: Vyhodnocení vyšetření pacienta č. 2 ze dne 11.10. 2022.

Datum	Stanovení CLIA				Stanovení Western blotting	
	Borrelia IgM		Borrelia IgG		IgM	IgG
	Hodnota (IP)	Výsledek	Hodnota (IU/ml)	Výsledek	Výsledek	Výsledek
11.10.2022	>6,0	pozitivní	18,65	hraniční	pozitivní	pozitivní

Zdroj: LIS Klinické laboratoři DIA-GON MP, s.r.o. v Chebu.

Hodnocení laboratoře: Serologický nález svědčí pro akutní borreliovou infekci – protilátky ve třídě IgM jsou pozitivní (tabulka 8). Serologický nález se musí

hodnotit v kontextu s klinickou anamnézou. Doporučení kontrolní odběr po léčbě za 4 týdny.

Po dobrání *Doxyhexal* 200mg/den proběhla 14.10.2022 kontrolní návštěva pacientky u lékaře. Pacientka si stěžuje na bolest hlavy, která neustupuje a přidává se i únava. Lékařem byla naordinována léčba *Klacid* 500mg/po 12 hodinách a byl doporučen kontrolní odběr (tabulka 9).

Tabulka 9: Vyhodnocení vyšetření pacienta č. 2 ze dne 11.11.2022.

Datum	Stanovení CLIA				Stanovení Western blotting	
	Borrelia IgM		Borrelia IgG		IgM	IgG
	Hodnota (IP)	Výsledek	Hodnota (IU/ml)	Výsledek	Výsledek	Výsledek
11.11.2022	2,05	pozitivní	8,99	negativní	pozitivní	negativní

Zdroj: LIS Klinické laboratoři DIA-GON MP, s.r.o. v Chebu.

Hodnocení laboratoře: U pacientky dochází k poklesu hladiny protilátek (zřejmě po včasné nasazené léčbě). Serologický nálezn je důležité hodnotit v kontextu s vývojem klinických příznaků po léčbě.

Při kontrolní návštěvě u lékaře dne 21.10.23 bylo předepsáno druhé balení *Klacidu* 500mg/ po12 hodinách a doporučen kontrolní odběr.

Tabulka 10: Vyhodnocení vyšetření pacienta č. 2 ze 21.2.2023.

Datum	Stanovení CLIA				Stanovení Western blotting	
	Borrelia IgM		Borrelia IgG		IgM	IgG
	Hodnota (IP)	Výsledek	Hodnota (IU/ml)	Výsledek	Výsledek	Výsledek
21.02.2023	1,24	hraniční	< 5,00	negativní	pozitivní	negativní

Zdroj: LIS Klinické laboratoři DIA-GON MP, s.r.o. v Chebu.

Hodnocení laboratoře: došlo k výraznému poklesu hladiny specifických protilátek. Přetrvávají protilátky třídy IgM a třídy IgG pokles do negativity. Serologický nálezn

je nutno hodnotit v kontextu s vývojem klinických příznaků po léčbě. Lékař hodnotí klinický stav: jako dobrý, pacientka nemá potíže.

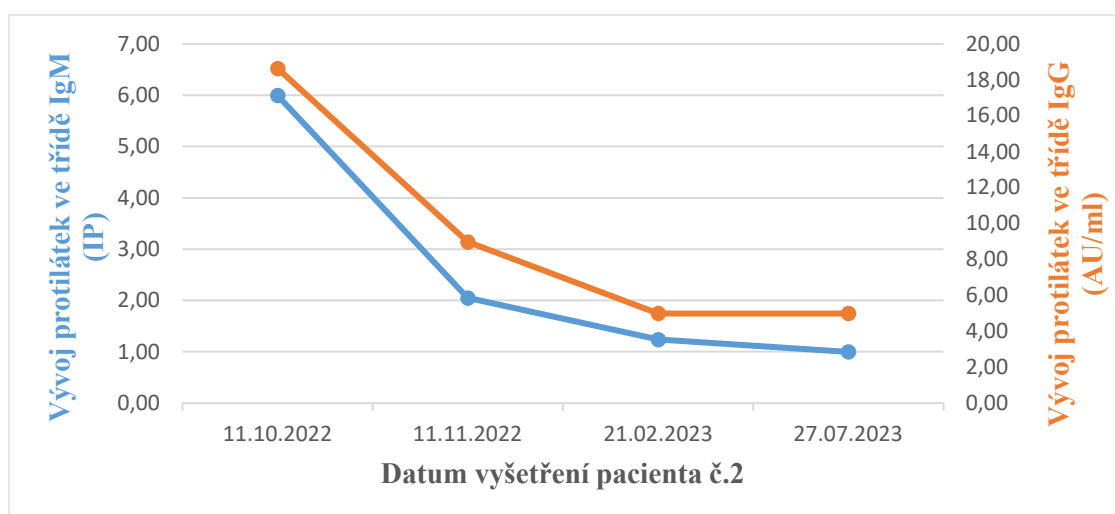
Dne 27.07.2023 byl proveden ošetřujícím lékařem kontrolní odběr krve pro potvrzení správnosti léčby.

Tabulka 11: Vyhodnocení vyšetření pacienta č. 2 ze dne 27.07.2023.

Datum	Stanovení CLIA				Stanovení Western blotting	
	Borrelia IgM		Borrelia IgG		IgM	IgG
	Hodnota (IP)	Výsledek	Hodnota (IU/ml)	Výsledek	Výsledek	Výsledek
27.07.2023	1,00	negativní	< 5,00	negativní	pozitivní	

Zdroj: LIS Klinické laboratoři DIA-GON MP, s.r.o. v Chebu.

Hodnocení laboratoře: ve Western blotting přetrvávají protilátky ve třídě IgM, hodnotit v kontextu s vývojem klinických příznaků pacienta po léčbě.



Graf 2: Přehled vývoje protilátek ve třídě IgM a IgG u pacienta č. 2 (zdroj: LIS Klinické laboratoři DIA-GON MP, s.r.o. v Chebu).

Závěrečné zhodnocení: U pacientky č. 2 po antibiotické léčbě došlo k vymizení klinických příznaků i poklesu hladiny protilátek. Lékař hodnotí stav jako normalizovaný.

3.1.3 Pacient č.3

Pacient muž věk 77 let v dobré fyzické kondici, sportovního založení (lyžař), přichází na kožní ambulanci v Chebu 22.10.2021 s erytémem *migrans* velikosti 6 cm. Lékařka

nasadila *Deoxymykoin* – 3 balení. Na kontrolu pozván 9.11.21 *erythem migrans* vymizel, pacient je bez potíží.

Tabulka 12: Vyhodnocení vyšetření pacienta č.3 ze dne 9.11.2021.

Datum	Stanovení CLIA				Stanovení Western blotting	
	Borrelia IgM		Borrelia IgG		IgM	IgG
	Hodnota (IP)	Výsledek	Hodnota (IU/ml)	Výsledek	Výsledek	Výsledek
9.11.2021	< 0,10	negativní	59,04	pozitivní		

Zdroj: LIS Klinické laboratoři DIA-GON MP, s.r.o. v Chebu.

Hodnocení laboratoře: serologický nález (tabulka 12) prokazuje účinnost léčby. Přetrvávají anamnestické protilátky IgG. *Erythem migrans* vymizel.

Po skoro roce a třech měsících, dne 26.1.2023 proběhla návštěva pacienta č.3 u praktického lékaře. Pacient č.3 přichází s rozsáhlým *erythem migrans* na stehně. Serologický nález potvrzuje akutní borreliovou infekci. Lékařka nasadila *Doxybene* a doporučila kontrolu 1.3.2023 a odběr krve (tabulka 13).

Tabulka 13: Vyhodnocení vyšetření pacienta č. 3 ze dne 1.3.2023.

Datum	Stanovení CLIA				Stanovení Western blotting	
	Borrelia IgM		Borrelia IgG		IgM	IgG
	Hodnota (IP)	Výsledek	Hodnota (IU/ml)	Výsledek	Výsledek	Výsledek
1.3.2023	> 6,00	pozitivní	159,50	pozitivní	pozitivní	pozitivní

Zdroj: LIS Klinické laboratoři DIA-GON MP, s.r.o. v Chebu.

U pacienta vymizel *erythem migrans* do 5 dnů, stěžuje si však na špatnou snášenlivost antibiotika a zvracení.

Hodnocení laboratoře: U pacienta přetrvávají specifické borreliové protilátky třídy IgG i IgM. Pacient měl pozitivní specifické protilátky v roce 2021. Serologický nález svědčí

pro novou borreliovou infekci. Doporučuje se hodnotit serologický nález v kontextu s klinickými příznaky po antibiotické léčbě.

Kontrolní návštěva proběhla 3.5.2023 kdy byl proveden i kontrolní odběr krve (tabulka 14). U pacienta došlo k poklesu hladiny specifických borreliových protilátek ve tř. IgM a zvyšuje se hladina IgG protilátek. 10.5.23 nasazen *Flukloxacin* 1 balení (úzkospektré antistafylokokové ATB). Kontrola naplánována na 28.6.23 s doporučením na kontrolní odběr krve.

Tabulka 14: Vyhodnocení vyšetření pacienta č. 3 ze dne 1.3.2023.

Datum	Stanovení CLIA				Stanovení Western blotting	
	Borrelia IgM		Borrelia IgG		IgM	IgG
	Hodnota (IP)	Výsledek	Hodnota (IU/ml)	Výsledek	Výsledek	Výsledek
3.5.2023	2,18	pozitivní	179,10	pozitivní	pozitivní	pozitivní

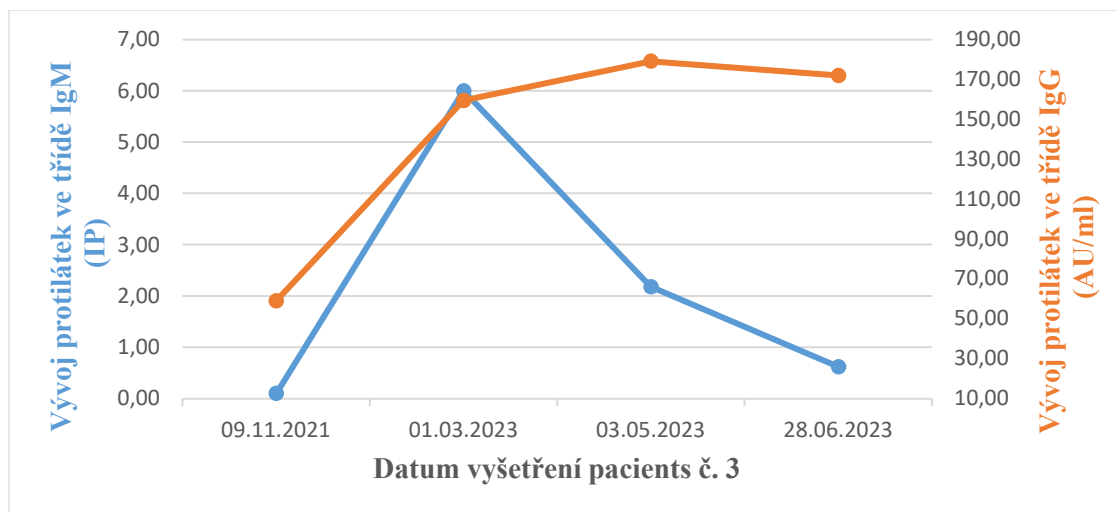
Zdroj: LIS Klinické laboratoři DIA-GON MP, s.r.o. v Chebu.

Při kontrolní návštěvě u lékařky dne 28.6.23 podle laboratorního vyšetření (tabulka 15) přetrvávají protilátky třídy IgM ve Western blotting a stále vysoká hladina ve třídě IgG. Klinické příznaky *Lymeské borreliózy* vymizely. Pacient při obou atakách negoval klíště. V současné době řeší jiné vážné onemocnění.

Tabulka 15: Vyhodnocení vyšetření pacienta č.3 ze dne 28.6.2023.

Datum	Stanovení CLIA				Stanovení Western blotting	
	Borrelia IgM		Borrelia IgG		IgM	IgG
	Hodnota (IP)	Výsledek	Hodnota (IU/ml)	Výsledek	Výsledek	Výsledek
28.06.2023	0,62	negativní	171.90	pozitivní	pozitivní	pozitivní

Zdroj: LIS Klinické laboratoři DIA-GON MP, s.r.o. v Chebu.



Graf 3: Přehled vývoje protilátek ve třídě IgM a IgG u pacienta č.3 (zdroj: LIS Klinické laboratoři DIA-GON MP, s.r.o. v Chebu).

Závěrečné hodnocení: U pacienta č. 3 průběh protilátek ukazuje návrat borrelióvé infekce, který může být způsoben novým kmenem, nebo nedostatečnou léčbou došlo k reaktivaci borreliózy.

3.2 Srovnání laboratorního stanovení CLIA a Western blotting

Laboratorní diagnostika *Lymeské borreliózy* v laboratoři DIA GON MP, s.r.o. je prováděna v souladu s doporučením Společnosti infekčního lékařství České lékařské společnosti J.R. Purkyně“, které bylo publikováno v roce 2018 (Krbková et al., 2018).

Stanovení začíná vždy serologickým vyšetřením protilátek proti *Borrelia burgdorferi sensu lato*. Tato druhová skupina bakterií zahrnuje kmeny s nejčastějším výskytem v Evropě. Patří sem *Borrelia garinii*, která často bývá spojována s neurologickými poruchami, *Borrelia afzelii* projevující se nejčastěji kožním postižením a méně často se vyskytující *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, která postihuje převážně klouby. Vyšetření se provádí v obou třídách IgM i IgG (Krbková et al., 2018).

V případě positivity v jednotlivých třídách je provedena konfirmace metodou Western blotting. Metodou Western blotting jsou detekovány specifické protilátky proti konkrétním antigenům. V případě negativity při serologickém vyšetření v jednotlivých třídách je nutné dodat doporučení ošetřujícímu lékaři, aby hodnotil výsledek v kontextu s vývojem klinických příznaků pacienta (Krbková et al., 2018).

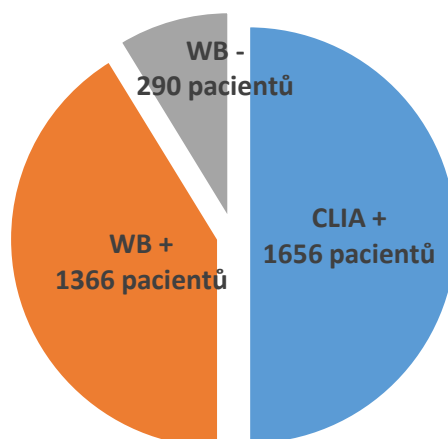
Z imunologického hlediska se časné IgM protilátky tvoří zhruba 3-6 týdnů po nákaze, poté hladina v krvi většinou klesá. Často dochází k manifestní infekci, kde jsou přítomny IgG protilátky. V kontextu s vývojem klinických příznaků pacienta při léčbě je důležité zhodnotit i přetrvávají projevy infekce a v takovém případě je doporučeno serologii opakovat za 3 - 4 týdny (Krbková et al., 2018).

V této praktické části mé práce jsem chtěla zhodnotit případ pozitivních výsledků serologického vyšetření metodou CLIA, které nejsou potvrzeny testem Western blotting v letech 2018-2022 (tabulka 16,17). Sběrem dat z laboratoře DIA-GON MP, s.r.o., jsem chtěla poukázat, že tato možnost výsledku vyšetření je možná a zhodnotit proč může nastat tato situace pozitivního výsledku serologii metodou CLIA, která není potvrzena Western blottingem (graf 4, 5).

Tabulka 16: Přehled vyšetření třídy IgM metodou CLIA a konfirmace metodou Western blotting v letech 2018-2022.

Vyšetření protilátek Borrelia ve třídě IgM			
Rok	Metoda CLIA (počet pozitivních)	Metoda Western blotting (počet pozitivních)	Metoda Western blotting (počet negativních)
2018	322	262	60
2019	380	315	65
2020	414	341	73
2021	269	226	43
2022	271	222	49
Celkové množství pacientů v letech 2018-2022	1656	1366	290

Zdroj: LIS Klinické laboratoři DIA-GON MP, s.r.o.

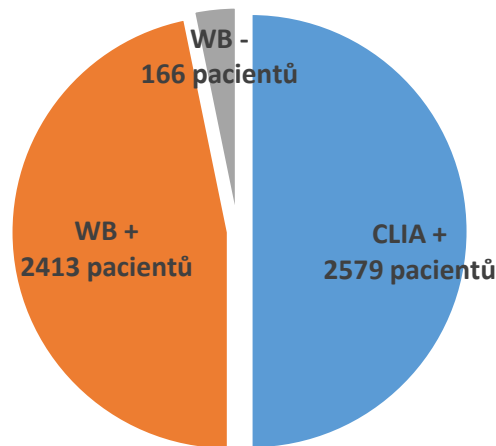


Graf 4: Celkový přehled pozitivních vyšetření protilátek *Borrelia IgM* metodou CLIA na analyzátoru LIAISON XL a confirmace u těchto vyšetření metodou Western blotting v letech 2018-2022 (LIS Klinické laboratoři DIA-GON MP, s.r.o. v Chebu).

Tabulka 17: Přehled vyšetření třídy IgG metodou CLIA a confirmace metodou Western blotting v letech 2018-2022.

Vyšetření protilátek <i>Borelia</i> ve třídě IgG			
Rok	Metoda CLIA (počet pozitivních)	Metoda Western blotting (počet pozitivních)	Metoda Western blotting (počet negativních)
2018	486	457	29
2019	570	533	37
2020	587	541	46
2021	494	461	33
2022	442	421	21
Celkové množství pacientů v letech 2018-2022	2579	2413	166

Zdroj: LIS Klinické laboratoři DIA-GON MP, s.r.o v Chebu.



Graf 5: Celkový přehled pozitivních vyšetření protilátek *Borrelia* IgM metodou CLIA na analyzátoru LIAISON XL a confirmace u těchto vyšetření metodou Western blotting v letech 2018-2022 (LIS Klinické laboratoři DIA-GON MP, s.r.o. v Chebu).

Vyhodnocení dat pořízené během mé bakalářské praxe v klinické laboratoři DIA-GON MP, s.r.o. v Chebu z LIS vyplývá, že z celkového vyšetření protilátek ve třídě IgM metodou CLIA je v letech 2018-2022 pozitivních pacientů 1656 (tabulka 16, graf 4). Při confirmaci metodou Western blotting byla z tohoto počtu 1366 potvrzena pozitivita a u 290 pacientů byl výsledek negativní (tabulka 16). U vyšetření protilátek IgG metodou CLIA je v letech 2018-2022 pozitivních pacientů 2579 a z toho byla potvrzena pozitivita metodou Western blotting u 2413 pacientů a u 166 pacientů byl výsledek negativní (tabulka 17, graf 5). Z toho vyplývá, že metoda CLIA v 17,5% případů pozitivních ve třídě IgM a z 6,43% ve třídě IgG, vyšetřila pozitivitu rozdílně oproti metodě Western blotting.

Podle doporučení výrobce pro metodu stanovení protilátek *Borrelia* IgM, IgG metodou CLIA na analyzátoru LIAISON XL pro vzorky séra/plazmy jsou stanovena analytická specifika testu. Analytická specifika testu můžeme definovat jako schopnost testu přesně detekovat specifický analyt za přítomnosti potenciálně interferujících látek ve vyšetřovaném vzorku (např. hemolýza) nebo zkříženě reagující protilátky. (Příbalové letáky od výrobce DiaSorin Italia S.p.A., LIAISON *Borrelia* IgG, IgM, 2023).

Při pozitivním serologickém výsledku *Lymeské borreliózy*, které není potvrzeno testem Western blotting, je doporučeno považovat tento výsledek za pravděpodobně negativní v důsledku falešné positivity CLIA. Jednou z možností je zkřížená reaktivita

a to v důsledku výskytu protilátek proti různým infekčním agens jako je například EBV, CMV, *Mycoplasma pneumoniae*, *Treponema pallidum*, *Toxoplasma gondii* a další, nebo při výskytu *antinukleárních* (ANA) protilátek, revmatoidního faktoru, a nebo u polyvaletních alergiků, které jsou zdrojem zkříženě reagujících antigenních epitopů. Existují také Borrelie (*Borrelia recurrentis*), které se vyskytují v dutině ústní, ale nezpůsobují multiorgánové postižení jako je Lymeská nemoc, ale rekurentní horečky (Bartůněk, 2013).

3.3 Zhodnocení sezónního průběhu infekce Lymeské borreliózy v letech 2015 až 2017

Pro zhodnocení sezónního výskytu infekce *Lymeské borreliózy* jsem použila data z let 2015 až 2017 poskytnuté během mé bakalářské praxe v laboratoři DIA-GON MP, s.r.o. v Chebu na oddělení Klinické biochemii a imunologii.

Tabulka 18: Přehled porovnání vyšetření *Lymeské borreliózy* ve třídě IgM s průměrnou teplotou v roce 2015.

Vyšetření <i>Lymeské borreliózy</i> ve třídě IgM v roce 2015						
měsíc	Počet vyšetření po měsících			průměrná teplota (°C)	Čtvrtletní zhodnocení	
	negativní	pozitivní	celkem		Celkem vyšetření	průměrná teplota (°C)
leden	72	14	86	0,1	277	0,5
únor	79	15	94	-1,6		
březen	82	15	97	3,1		
duben	74	15	89	6,4	346	10,7
květen	99	17	116	11,2		
červen	118	23	141	14,4		
červenec	128	23	151	18,3	497	16,2
srpen	140	30	170	19,5		
září	149	27	176	10,9		
říjen	136	21	157	6,5	398	5,2
listopad	103	21	124	5,2		
prosinec	99	18	117	3,8		

Zdroj: LIS Klinické laboratoři DIA-GON MP, s.r.o v Chebu.

Tabulka 19: Přehled porovnání vyšetření *Lymeské borreliózy* ve třídě IgM s průměrnou teplotou v roce 2016.

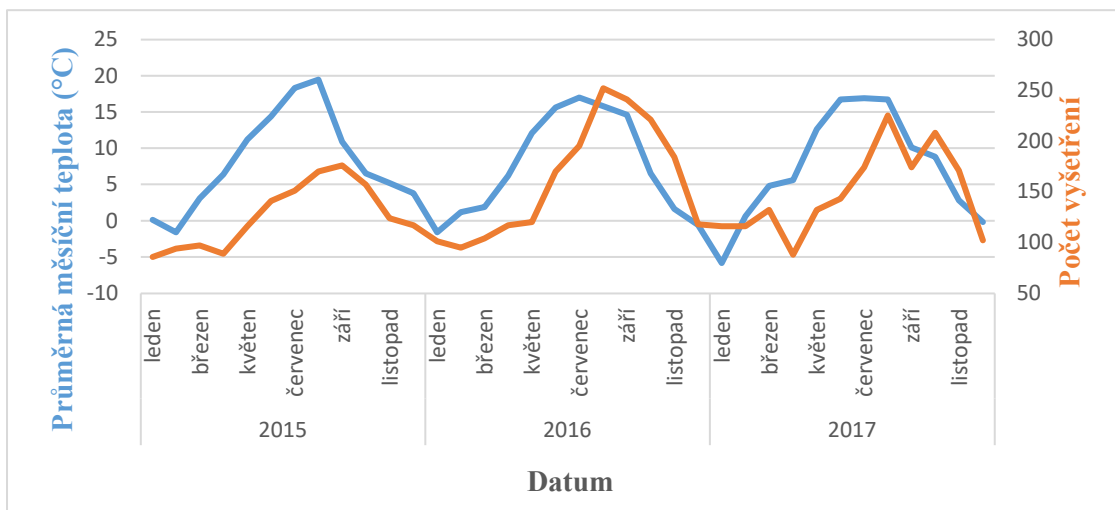
Vyšetření <i>Lymeské boreliózy</i> ve třídě IgM v roce 2016						
Měsíc	Počet vyšetření po měsících			Průměrná teplota (°C)	Čtvrtletní zhodnocení	
	Negativní	Pozitivní	Celkem		Celkem vyšetření	Průměrná teplota (°C)
leden	91	10	101	-1,6	300	0,5
únor	78	17	95	1,2		
březen	85	19	104	1,9		
duben	103	14	117	6,2	407	11,3
květen	103	17	120	12,1		
červen	148	22	170	15,6		
červenec	161	34	195	17	688	15,8
srpen	200	52	252	15,8		
září	193	48	241	14,6		
říjen	175	46	221	6,5	523	2,5
listopad	146	38	184	1,6		
prosinec	96	22	118	-0,6		

Zdroj: LIS Klinické laboratoři DIA-GON MP, s.r.o v Chebu.

Tabulka 20: Přehled porovnání vyšetření *Lymeské borreliózy* ve třídě IgM s průměrnou teplotou v roce 2017.

Vyšetření <i>Lymeské boreliózy</i> ve třídě IgM v roce 2017						
Měsíc	Počet vyšetření po měsících			Průměrná teplota (°C)	Čtvrtletní zhodnocení	
	Negativní	Pozitivní	Celkem		Celkem vyšetření	Průměrná teplota (°C)
leden	96	20	116	-5,8	364	-0,1
únor	92	24	116	0,6		
březen	112	20	132	4,8		
duben	81	7	88	5,6	363	11,6
květen	119	13	132	12,6		
červen	122	21	143	16,7		
červenec	147	27	174	16,9	573	14,6
srpen	193	32	225	16,7		
září	147	27	174	10,1		
říjen	180	28	208	8,8	481	3,8
listopad	145	26	171	2,8		
prosinec	83	19	102	-0,2		

Zdroj: LIS Klinické laboratoři DIA-GON MP, s.r.o v Chebu.



Graf 6: Přehled počtu laboratorních vyšetření Lymeské borreliózy ve třídě IgM s ohledem na průměrné teploty v roce 2015-2017 (zdroj: LIS Klinické laboratoři DIA-GON MP, s.r.o v Chebu).

Tabulka 21: Přehled porovnání vyšetření Lymeské borreliózy ve třídě IgG s průměrnou teplotou v roce 2015.

Vyšetření Lymeské borreliózy ve třídě IgG v roce 2015						
Měsíc	Počet vyšetření po měsících			Průměrná teplota (°C)	Čtvrtletní zhodnocení	
	Negativní	Pozitivní	Celkem		Celkem vyšetření	Průměrná teplota (°C)
leden	64	23	87	-5,8	278	-0,1
únor	73	21	94	0,6		
březen	81	16	97	4,8		
duběn	70	20	90	5,6	346	11,6
květen	95	21	116	12,6		
červen	116	24	140	16,7		
červenec	120	31	151	16,9	493	14,6
srpen	116	50	166	16,7		
září	134	42	176	10,1		
říjen	134	38	172	8,8	413	3,8
listopad	94	30	124	2,8		
prosinec	96	21	117	-0,2		

Zdroj: LIS Klinické laboratoři DIA-GON MP, s.r.o v Chebu.

Tabulka 22: Přehled porovnání vyšetření *Lymeské borreliózy* ve třídě IgG s průměrnou teplotou v roce 2016.

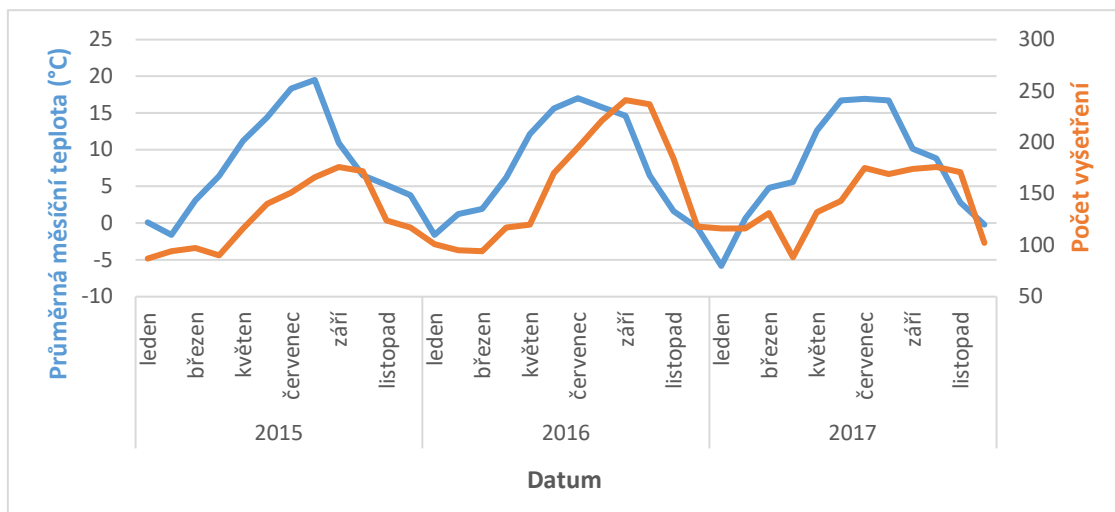
Vyšetření <i>Lymeské borreliózy</i> ve třídě IgG v roce 2016						
Měsíc	Počet vyšetření po měsících			Průměrná teplota (°C)	Čtvrtletní zhodnocení	
	Negativní	Pozitivní	Celkem		Celkem vyšetření	Průměrná teplota (°C)
leden	75	26	101	-5,8	290	-0,1
únor	78	17	95	0,6		
březen	79	15	94	4,8		
duben	96	21	117	5,6	407	11,6
květen	94	26	120	12,6		
červen	131	39	170	16,7		
červenec	141	54	195	16,9	657	14,6
srpen	131	90	221	16,7		
září	164	77	241	10,1		
říjen	164	73	237	8,8	539	3,8
listopad	133	51	184	2,8		
prosinec	93	25	118	-0,2		

Zdroj: LIS Klinické laboratoři DIA-GON MP, s.r.o v Chebu.

Tabulka 23: Přehled porovnání vyšetření *Lymeské borreliózy* ve třídě IgG s průměrnou teplotou v roce 2017.

Vyšetření <i>Lymeské borreliózy</i> ve třídě IgG v roce 2017						
Měsíc	Počet vyšetření po měsících			Průměrná teplota (°C)	Čtvrtletní zhodnocení	
	Negativní	Pozitivní	Celkem		Celkem vyšetření	Průměrná teplota (°C)
leden	94	22	116	-5,8	363	-0,1
únor	89	27	116	0,6		
březen	99	32	131	4,8		
duben	63	25	88	5,6	363	11,6
květen	103	29	132	12,6		
červen	112	31	143	16,7		
červenec	131	44	175	16,9	518	14,6
srpen	112	57	169	16,7		
září	127	47	174	10,1		
říjen	127	49	176	8,8	449	3,8
listopad	126	45	171	2,8		
prosinec	62	40	102	-0,2		

Zdroj: LIS Klinické laboratoři DIA-GON MP, s.r.o v Chebu.



Graf 7: Přehled počtu laboratorních vyšetření *Lymeské borreliózy* ve třídě IgG s ohledem na průměrné teploty v roce 2015-2017 (zdroj: LIS Klinické laboratoři DIA-GON MP, s.r.o v Chebu).

V následujících grafech (graf č.6,7) a tabulkách (tabulka č.18,19,20,21,22,23) je zhodnocení vyšetření pacientů na *Lymeskou borreliózou* v průběhu let 2015-2017 s ohledem na průměrné teploty v těchto letech. Z těchto výsledků je možné usoudit, že onemocnění *Lymeské borreliózy* má sezónní charakter. Zvýšení či snížení teploty v daném období má vliv na aktivitu klíšťat. S rostoucí aktivitou klíšťat roste i potenciální přenos infekčního onemocnění přenášeného těmito parazity. Jednotlivé klimatické změny (výkyvy teplot, krátké a mírné zimy, změny ve srážkových úhrnech, sezónnost počasí aj.) komplexně ovlivňují nejen aktivitu klíšťat, ale i jejich hostitele (primárních přenašečů patogenů).

Z detailnějšího pohledu a sumarizace výsledků za čtvrtletí (tabulka 24) vyplývá, že v letech 2015 – 2017 nejvyšší počet vyšetření byl proveden ve 3. čtvrtletí (červen- září) s počtem pro třídu IgM 1758 vzorků a pro třídu IgG 1668 vzorků při průměrné teplotě 15,5 °C. Druhým nejvyšším počtem vyšetření bylo ve 4. čtvrtletí (říjen-prosinec) s počtem vyšetření pro třídu IgM 1402 vyšetření a pro třídu IgG 1401 vyšetření při průměrné teplotě 3,8 °C. Oproti tomu nejnižší počet vyšetření byl proveden v 1. čtvrtletí (leden - březen) s počtem pro třídu IgM 941 vyšetření a pro třídu IgG 931 vyšetření při průměrné teplotě 0,3 °C. Toto šetření potvrzuje stanovisko Českého hydrometeorologického ústavu, který spolupracuje se Státním zdravotním ústavem za podpory Ministerstva zdravotnictví České republiky, že největší výskyt aktivity klíšťat je v období od března do června, s hlavním vrcholem v květnu, druhý vrchol přichází na podzim a trvá do příchodu prvních mrazů (Český hydrometeorologický ústav, 2024).

Výsledky aktivity klíštěte nelze srovnávat s daty pozitivních onemocnění, kde hraje velkou roli také počet lidí pohybujících se v daných lokalitách (turisti), proto moje zhodnocení je na základě celkového počtu ordinovaných vyšetření porovnané s ohledem na průměrné teploty v daném čtvrtletí roku.

Tabulka 24: Čtvrtletní přehled laboratorního vyšetření na *Lymeskou borreliózu* s čtvrtletními průměrnými teplotami v letech 2015 – 2017

Čtvrtletí v kalendářním roce	Vyšetření <i>Lymeské borreliózy</i> ve třídě IgM v letech 2015 - 2017		Vyšetření <i>Lymeské borreliózy</i> ve třídě IgG v letech 2015 - 2017	
	Počet vyšetření (°C)	Průměrné teploty	Počet vyšetření	Průměrné teploty (°C)
1. čtvrtletí (leden- březen)	941	0,3	931	0,3
2. čtvrtletí (duben - červen)	1116	11,2	720,6	11,2
3. čtvrtletí (červenec- září)	1758	15,5	1668	15,5
4. čtvrtletí (říjen - prosinec)	1402	3,8	1401	3,8

Zdroj: LIS Klinické laboratoři DIA-GON MP, s.r.o v Chebu).

4 Diskuze

Lymeská borelióza patří v ČR mezi nejtypičtější *antropozoonozy* s přírodní ohniskovostí, kdy geografické rozšíření se každý rok zvětšuje. Na možnosti nákazy se také projevuje vliv změn klimatu a ohniska nákazy se posouvají i do vyšších nadmořských výšek, kdy výskyt aktivity klíšťat (*vektora*) se nachází i tam, kde se dříve nevyskytoval. *Lymeská borelióza* se tak stala nejčastější infekcí přenášenou klíšťaty v ČR.

Množství laboratorních vyšetření v Klinické laboratoři DIA-GON MP, s.r.o. v Chebu se mění během roku v závislosti na klimatických podmínkách. Podle studie o aktivitě klíšťat vytvořené Českým hydrometeorologickým ústavem, který spolupracuje se Státním zdravotním ústavem za podpory Ministerstva zdravotnictví České republiky sezóna aktivity klíšťat začíná obvykle v březnu až v dubnu a snižuje se s poklesem teplot. Ale i při teplotách přesahujících 5°C je možné se nakazit *Lymeskou boreliózou*. Potvrzuje to sumarizace vyšetření ve 3.čtvrtletí (červenec-září), kdy bylo pro třídu IgM v roce 2015 - 497 vyšetření při průměrné teplotě 16,2°C, v roce 2016 – 688 vyšetření při průměrné teplotě 15,8 °C a v roce 2017- 573 vyšetření při průměrné teplotě 14,6°C. Pro třídu IgG při stejných průměrných teplotách bylo v roce 2015 – 493 vyšetření, v roce 2016 – 657 vyšetření a v roce 2017 – 518 vyšetření. Což potvrzují výsledky i z ostatních čtvrtletí kalendářního roku (tabulka 18,19,20,21,22,23).

Laboratorní diagnostika *Lymeské boreliózy* není jednoduchá. Za zlatý standart se dnes považuje dvoufázové serologické vyšetření specifických protilátek. V první fázi dochází k určení positivity či negativity specifických protilátek třídy IgM a IgG metodou CLIA. Druhou fází při pozitivním či hraničním výsledku CLIA metodou je provedení konfirmace Western blottingem. Pomocí sběru dat z LIS Klinické laboratoře DIA-GON MP, s.r.o v Chebu jsem prokázala, že dochází k vyšetření positivity či hraničnímu výsledku metodou CLIA, která Western blottingem není potvrzena (tabulka 16,17) (graf 4,5). Důvodem můžou být například interferující látky ve vyšetřovaném vzorku (např.: hemolýza) nebo zkříženě reagující protilátky. Proto je vždy důležité hodnotit výsledek serologického vyšetření v kontextu s klinickým stavem pacienta a nastavenou léčbou.

Jedním z cílů této práce je také kompletní zhodnocení pacienta. Na konkrétních kazuistikách pacientů je prakticky poukázáno, že ačkoli klinické projevy se mohou lišit,

objektivní diagnóza *Lymeské borreliózy* vyžaduje přítomnost známek onemocnění podložené laboratorní diagnostikou specifických protilátek.

Znalost klinického obrazu, patologie a imunologie *Lymeské borreliózy* je předpokladem pro vhodné použití laboratorního vyšetření a určení správné diagnostiky. Toto vše vede k poskytnutí adekvátní léčby pacienta. Borreli

Typický mechanismus imunitního úniku borrelie zahrnuje regulaci komplementu, antigenní variace a regulace imunitní reakce pomocí povrchových proteinů. Díky tomu může přežít patogen v hostiteli a vyvolat infekční onemocnění. Infekce *Borrelia burgdorferi* indukuje imunitní odpověď s typickými nálezy, jako jsou kožní léze (*erythema migrans*) až po neurologické příznaky, postižení srdce nebo artritida postihující velké klouby. Proto detekce protilátek proti *Borrelia burgdorferi* je v současné době laboratorní metodou volby v rutinním klinickém prostředí.

Závěrem lze dodat, že laboratorní pracovník nevidí pacienta a je často odkázán na velmi stručné informace: diagnóza uvedená na průvodce. Bohužel se setkáváme i s případy, kdy uvedená diagnóza nemá vztah k požadovanému vyšetření. Považujeme proto za ideální osobní konzultace (telefonický kontakt) s klinikem obzvláště u komplikovanějších pacientů. Věřím, že to je oboustranně obohacující stav. Další doporučení z laboratoře zní: sledovat pacienta opakovaným vyšetřením, především pokud se jedná o komplikovanější stav.

5 Závěr

Lymeská borrelióza je multisystémové infekční onemocnění, v ČR nejčastěji přenášené klíšťaty rodu *Ixodes ricinus*. Toto onemocnění je vyvolané jedním či více patogenními bakteriemi komplexu *Borrelia burgdorferi sensu lato* ze skupiny *spirochet*.

Teoretická část práce je zaměřená na informace o *Lymeské borrelióze*. Jedná se o stručný a komplexní pohled na původce, historii, etiologii, způsob přenosu, patogenezí a klinické příznaky. Také je zde zhodnocen pohled na toto onemocnění z různých medicínských oborů.

V praktické části jsem se věnovala podrobnému popisu laboratorní *diagnostiky Lymeské borreliózy* v Klinické laboratoři DIA-GON MP, s.r.o. v Chebu. Ve své práci uvádím kazuistiku několika pacientů, které ukazují přínos propojení laboratorní práce v kontextu s klinickým posouzením pacienta a nastavením správné antibiotické léčby. Vysvětlují důvody pro dvoufázové testování metodou CLIA a konfirmací Western blotting. Z výsledků, které jsem získala lze vysledovat závislost v počtu prováděných vyšetření s aktivitou klíšťat v jednotlivých ročních obdobích v kalendářním roce.

Na závěr bych chtěla uvést, že *Lymeská borrelióza* je léčitelné onemocnění, přítomnost prokázaných protilátek neznamena vždy nemoc a opakovaná antibiotická léčba nemá smysl. Tyto poznatky jsou důležité jak pro diagnostiku *Lymeské borreliózy*, tak i zároveň pro serologické stanovení specifických protilátek.

6 Zdroje:

1. Bartůněk P., 2013, *Lymeská borelióza*. Praha: Grada, ISBN: 978-80-247-4355-4.
2. Bartůňková et al., 2011, *Vyšetřovací metody v imunologii*. 2 přepracované a doplněné vydání, Praha: Grada, ISBN978-80-247-3533-7.
3. Beneš J. et al., 2009, *Infekční lékařství*. Praha: Galén, 287-292, ISBN: 978-80-7262-644-1.
4. Bojar M., 1996, *Lymeská borelióza*. Praha: Maxdorf 1996, ISBN: 80-85800-35-7.
5. Burýšková, 2024, *Státní veterinární ústav*. [online] zdroj: Kliste.cz, zdroj: <https://www.kliste.cz/cz/vse-o-klistatech/clanek/vyskyt-infikovanych-klistat-v-jednotlivych-letech>
6. Český hydrometeorologický ústav, 2024, *Aktivita klišťat*, [online], 2024, zdroj: <https://info.chmi.cz/bio/mapy.php?type=kliste>
7. Dessea R., Dam A., Fingerle V., et al, 2018, *To test or not to test? Laboratory support for the diagnosis of Lyme borreliosis: a position paper of ESGBOR, the ESCMID study group for Lyme borreliosis*. [online], Clin Microbiol Infect, Feb;24(2):118-124., doi: 10.1016/j.cmi.2017.08.025.
8. Dlouhý P., Honegr. K., Krbková L., Pícha D., Roháčová H., Štruncová V., 2011. *Lymeská borelióza: doporučený postup v diagnostice, léčbě a prevenci*. Klinická mikrobiologie a infekční lékařství. Praha, 17(4), 144-149, ISSN 1211-264 10.
9. Halperin J. et al., 2018, *Lyme Disease*, 2nd Edition: An Evidence-based Approach, Boston, CABI, ISBN 1786392070
10. Horká H. et al., 2009, *Tick saliva affects both proliferation and distribution of Borrelia burgdorferi spirochetes in mouse organs and increases transmission of spirochetes to ticks* [online], Int J Med Microbiol, 299(5):373-80, doi: 10.1016/j.ijmm.2008.10.009.

11. Kraiczy P., Rossmann E., Brade V., Simon M., Skerka Ch., Zipfel P., Wallich R., 2006, *Binding of human complement regulators FHL-1 and factor H to CRASP-1 orthologs of Borrelia burgdorferi*. [online], Nov;118(21-22):669-76., doi: 10.1007/s00508-006-0691-1.
12. Krbková L., Kybcová K., Pícha D., Hana Roháčová, Smíšková D., 2018, *Doporučený postup diagnostiky a léčby Lymeské boreliózy*. [online], Doporučený postup Společnosti infekčního lékařství České lékařské společnosti J. E. Purkyně, zdroj: <https://infektologie.cz/DPLB18.htm>
13. Křupka M., Raška M., Wiegler J., 2008, *Lymeská borelióza – biologie, patogeneze, diagnostika a léčba*. [online], Dermatologie pro praxi, Solen Medical Education, (E-verze 2/5) 236-239, ISSN 1803-5337. zdroj: https://www.dermatologiepropraxi.cz/artkey/der-200805-0007_Lymska_borelioza-biologie_patogeneze_diagnostika_a_lecba.php
14. Marques AR., 2015, *Laboratory diagnosis of Lyme disease: advances and challenges*. [online], Infect Dis Clin North Am, Jun, 29(2):295-307, doi: 10.1016/j.idc.2015.02.005.
15. Önder Ö., Humphrey P., McOmber B., Korobova F., Francella N., Doron C. Greenbaum D., Brisson D., 2012, *OspC Is Potent Plasminogen Receptor on Surface of Borrelia burgdorferi*, [online], May 11; 287(20): 16860–16868, doi: 10.1074/jbc.M111.290775
16. Prokeš Z., 2015. *Lymeská borelióza*. [online], Praktické lékařství, Solen, 11(E-verze 3/15), 15-24, ISSN 1803-5329, zdroj: <https://www.praktickelekarenstvi.cz/pdfs/lek/2015/89/03.pdf>
17. Příbalové letáky k diagnostickým soupravám LIAISON® Borrelia IgM a příručka uživatele pro obsluhu analyzátoru LIAISON XL, 2023 DiaSorin S.p.A., Itálie, CS-200/007-920,11-2022-07.
18. Příbalové letáky k diagnostickým soupravám LIAISON® Borrelia IgG a příručka uživatele pro obsluhu analyzátoru LIAISON XL. DiaSorin S.p.A., 2023, Itálie, CS-200/007-881,11-2022-07.

19. Příbalové letáky k diagnostickým testům Anti-Borrelia Euroline-RN-AT, protilátky proti Borrelia (IgM) a příručka uživatele pro obsluhu analyzátoru DYNA-BLOT analyzátor, 2023, DN_2131_A_CZ_C05.doc
20. Příbalové letáky k diagnostickým testům Anti-Borrelia Euroline-RN-AT, protilátky proti Borrelia (IgM) a příručka uživatele pro obsluhu analyzátoru DYNA-BLOT analyzátor, 2023, DN_2131G_A_CZ_C04.doc
21. Roháčová H., 2013, *Je pozdní forma lymeské neuroborreliózy léčitelná?* [online], *Neurologie pro praxi Solen*, 14(4), 200-202, ISSN 1803-5280, zdroj: <https://www.neurologiepropraxi.cz/pdfs/neu/2013/04/10.pd>
22. Rupprecht T., Koedel U., Fingerle V., Pfister H., 2008, *The pathogenesis of Lyme neuroborreliosis: From infection to inflammation.* [online], *Mol Med* Mar-Apr; 14(3-4): 205–212, doi: 10.2119/2007-00091
23. Singh S., Girschick H., 2004, *Lyme borreliosis: from infection to autoimmunity.* [online], *Clin Microbiol Infect*, 10(7):598-614, doi:10.1111/j.1469-0691.2004.00895.x.
24. Singh S., Girschick H., 2004, *Molecular survival strategies of the Lyme disease spirochete Borrelia burgdorferi.* [online], *Lancet Infect Dis.*, Sep;4(9):575-83. doi: 10.1016/S1473-3099(04)01132-6.
25. Smíšková, D., Pícha D., 2017. *Diagnostika a léčba lymeské borreliózy.* [online]. *Medicína pro praxi, Solen*, 14(2), 77-80. ISSN 1214-8687.
26. SZÚ, 2024, *Lymeská borrelióza*, [online], zdroj: <https://szu.cz/temata-zdravi-a-bezpecnosti/a-z-infekce/l/lymeska-borrelioza/>
27. Votava M. et al, 2003, *Lékařská mikrobiologie II. Přehled vyšetřovacích metod v lékařské mikrobiologii.* Brno: Masarykova univerzita, ISBN 80-210-2272-8
28. Theel E. S., 2016, *The past, present and (possible) future of serologic testing for Lyme disease.* [online], *J Clin Microbiol*, 54(5):1191-6, doi:10.1128/JCM.03394-15

29. Wilske B., 2003. *Diagnosis of Lyme borreliosis in Europe*. [online], Vector Borne Zoonotic Dis, 3(4):215-227, doi: 10.1089/153036603322662200
30. Wright F., et al, komentář Bartůněk P., 2012, *Diagnostika a léčba lymeské borreliózy*. [online], Medicína po promoci, MEDICAL TRIBUNE, 4/2012, zdroj: <https://www.tribune.cz/archiv/diagnostika-a-lecba-lymeske-borreliozy/>

7 Seznam obrázků

Obrázek 1: <i>Ixodes ricinus</i> (klíště obecné)	9
Obrázek 2: Příčný a podélný řez tělem borrelie	10
Obrázek 3: <i>Erythema migrans</i>	13
Obrázek 4: Borreliový <i>lymfocytom</i> na tváři	13
Obrázek 5: Analyzátor LIAISON XL	18
Obrázek 6: Analyzátor LIAISON XL – A) Prostor pro nádobu na pevný odpad, zásobní lahve s destilovanou vodou a promývacím roztokem, B) Prostor pro nádobu na tekutý odpad.....	18
Obrázek 7: Analyzátor LIAISON XL – A) Chlazený prostor pro reagenční integrály, B) prostor pro vzorky	18
Obrázek 8: Reagenční integrál pro stanovení protilátek třídy IgM.....	19
Obrázek 9: Reagenční integrál pro stanovení protilátek třídy IgM	20
Obrázek 10: Kontrolní lahvičky LIAISON Control Borrelia A) IgM, B) IgG liquor (REF: 310012, DiaSorin S.p.A., Itálie).....	20
Obrázek 11: A) Komerční testovací souprava Anti-Borrelia EUROLINE-RN-AT pro stanovení protilátek proti Borrelia IgM. B) Komerční testovací souprava Anti-Borrelia EUROLINE-RN-AT pro stanovení protilátek proti Borrelia IgG	24
Obrázek 12: Automatický analyzátor DYNA-BLOT automatic.....	24
Obrázek 13: Automatický analyzátor DYNA-BLOT automatik – A) inkubační vanička se stripy. B) Stojan s patientskými vzorky sér	25
Obrázek 14: Umístění a popis antigenů na imunoblotovacím stripu pro testování protilátek IgM	27
Obrázek 15: Umístění a popis antigenů na imunoblotovacím stripu pro testování protilátek IgG.....	29

8 Seznam grafů

Graf 1: Přehled vývoje protilátek ve třídě IgM a IgG u pacienta č. 1	34
Graf 2: Přehled vývoje protilátek ve třídě IgM a IgG u pacienta č. 2	36
Graf 3: Přehled vývoje protilátek ve třídě IgM a IgG u pacienta č.3	39
Graf 4: Celkový přehled pozitivních vyšetření protilátek <i>Borrlia</i> IgM metodou CLIA na analyzátoru LIAISON XL a konfirmace u těchto vyšetření metodou Western blotting v letech 2018-2022	41
Graf 5: Celkový přehled pozitivních vyšetření protilátek <i>Borrlia</i> IgM metodou CLIA na analyzátoru LIAISON XL a konfirmace u těchto vyšetření metodou Western blotting v letech 2018-2022	42
Graf 6: Přehled počtu laboratorních vyšetření <i>Lymeské borreliózy</i> ve třídě IgM s ohledem na průměrné teploty v roce 2015-2017	45
Graf 7: Přehled počtu laboratorních vyšetření <i>Lymeské borreliózy</i> ve třídě IgG s ohledem na průměrné teploty v roce 2015-2017	47

9 Seznam tabulek

Tabulka 1: Interpretace výsledků pro třídu IgM, IgG.	22
Tabulka 2: Schéma pro referenční vyhodnocení protilátek IgM metodou Western blot	28
Tabulka 3: Vyhodnocení vyšetření pacienta č.1 ze dne 9.11.2017.	31
Tabulka 4: Vyhodnocení vyšetření pacienta č.1 ze dne 27.2.2018.	32
Tabulka 5: Vyhodnocení vyšetření pacienta č.1 ze dne 5.3.2019.	32
Tabulka 6: Vyhodnocení vyšetření pacienta č. 1 ze dne 4.1.2023.	33
Tabulka 7: Vyhodnocení vyšetření pacienta č.1 ze dne 21.2.2023.	33
Tabulka 8: Vyhodnocení vyšetření pacienta č. 2 ze dne 11.10. 2022.	34
Tabulka 9: Vyhodnocení vyšetření pacienta č. 2 ze dne 11.11.2022.	35
Tabulka 10: Vyhodnocení vyšetření pacienta č. 2 ze 21.2.2023.	35
Tabulka 11: Vyhodnocení vyšetření pacienta č. 2 ze dne 27.07.2023.	36
Tabulka 12: Vyhodnocení vyšetření pacienta č.3 ze dne 9.11.2021.	37
Tabulka 13: Vyhodnocení vyšetření pacienta č. 3 ze dne 1.3.2023.	37
Tabulka 14: Vyhodnocení vyšetření pacienta č. 3 ze dne 1.3.2023.	38
Tabulka 15: Vyhodnocení vyšetření pacienta č.3 ze dne 28.6.2023.	38
Tabulka 16: Přehled vyšetření třídy IgM metodou CLIA a konfirmace metodou Western blotting v letech 2018-2022.	40
Tabulka 17: Přehled vyšetření třídy IgG metodou CLIA a konfirmace metodou Western blotting v letech 2018-2022.	41
Tabulka 18: Přehled porovnání vyšetření <i>Lymeské borreliózy</i> ve třídě IgM s průměrnou teplotou v roce 2015.	43
Tabulka 19: Přehled porovnání vyšetření <i>Lymeské borreliózy</i> ve třídě IgM s průměrnou teplotou v roce 2016.	44
Tabulka 20: Přehled porovnání vyšetření <i>Lymeské borreliózy</i> ve třídě IgM s průměrnou teplotou v roce 2017.	44
Tabulka 21: Přehled porovnání vyšetření <i>Lymeské borreliózy</i> ve třídě IgG s průměrnou teplotou v roce 2015.	45
Tabulka 22: Přehled porovnání vyšetření <i>Lymeské borreliózy</i> ve třídě IgG s průměrnou teplotou v roce 2016.	46
Tabulka 23: Přehled porovnání vyšetření <i>Lymeské borreliózy</i> ve třídě IgG s průměrnou teplotou v roce 2017.	46

Tabulka 24: Čtvrtletní přehled laboratorního vyšetření na <i>Lymeskou borreliózu</i> s čtvrtletními průměrnými teplotami v letech 2015 – 2017	48
---	----

10 Seznam zkratek

ACA	<i>acrodermatitis chronica atrophicans</i>
ATB	antibiotika
ANA	antinukleární protilátka
CLIA	chemiluminiscenční imunoanalýza
CNS	centrální nervový systém
CMV	Cytomegalovirus
ČR	Česká republika
EBV	virus Epstein-Barr
ELISA	enzymatická imunoanalýza
EM	<i>erythem migrans</i>
E.coli	<i>Escherichia coli</i>
Ig	imunoglobulin
IL	interleukin
LB	<i>Lymeská borrelióza</i>
LIS	laboratorní informační systém
PCR	polymerázová řetězová reakce
TNF	<i>tumor necrosis faktor</i>
SZÚ	Státní zdravotní ústav