

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta chemická

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Brno, 2016

Bc. Ivana Sližová



# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

SÉROLOGICKÁ DIAGNOSTIKA BORELIÓZ

SEROLOGICAL DIAGNOSIS OF BORRELIOSIS DISEASES

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Ivana Sližová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

RNDr. Ivo Lochman, CSc.

BRNO 2016



Vysoké učení technické v Brně  
**Fakulta chemická**  
Purkyňova 464/118, 61200 Brno

## Zadání diplomové práce

Císlo diplomové práce:	<b>FCH-DIP0981/2015</b>	Akademický rok: <b>2015/2016</b>
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	<b>Bc. Ivana Sližová</b>	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (N2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)	
Vedoucí práce	<b>RNDr. Ivo Lochman, CSc.</b>	
Konzultanti:	prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.	

### Název diplomové práce:

Sérologická diagnostika boreliózy

### Zadání diplomové práce:

Teoretický úvod:

1.  Charakteristika a historie onemocnění
2.  Borelie – mikrobiologická charakteristika
3.  Imunitní systém a patogenese onemocnění
4.  Terapie a prevence onemocnění
5.  Cíl práce

Experimentální část:

Srovnání sérologických metod pro diagnostiku boreliózy a jejich výsledků prováděných v laboratořích Spadia (ELISA, imunobloty)

Diskuze:

Očekávání a možnosti sérologické diagnostiky boreliózy na základě získaných výsledků. Konfrontace s literaturou.

### Termín odevzdání diplomové práce: 6.5.2016

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

-----  
Bc. Ivana Sližová  
Student(ka)

-----  
RNDr. Ivo Lochman, CSc.  
Vedoucí práce

-----  
prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.  
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2016

-----  
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
Děkan fakulty

## Abstrakt

Cílem diplomové práce bylo srovnání výsledků sérologických metod pro diagnostiku boreliózy prováděných rutinně v laboratořích Spadia Lab (ELISA, imunobloty) v kontextu s doporučeními, kdy a jak je indikovat a interpretovat jejich výsledky.

Teoretická část je zaměřena na charakteristiku a historii boreliózy, mikrobiologickou charakteristiku borélií, imunitní systém ve vztahu k patogenezí onemocnění a na terapii a prevenci onemocnění.

Experimentální část se zabývá analýzou výsledků získaných při rutinním vyšetřování protilátek proti boreliím v laboratořích Spadia Lab v období od 1. 1. 2014 do 31. 12. 2015.

Podle doporučení CDC (Centrum pro kontrolu a prevenci chorob) byl u všech vzorků prováděn screening protilátek proti boreliím pomocí ELISA ve třídě IgM a IgG. V roce 2014 byl ELISA screening prováděn pomocí souprav firmy Euroimmun na procesorech vzorků EVOLIS, v roce 2015 byl screening prováděn pomocí souprav firmy DiaSorin na analyzátoru LIAISON.

Pozitivní vzorky byly následně potvrzeny pomocí Westernblotu popř. lineblotu.

ELISA i WesternBlot patří mezi sérologické metody, pomocí nichž se testují protilátky, tj. látky vytvořené imunitním systémem. Imunitní systém hraje klíčovou úlohu v ochraně organismu proti infekci a protilátky jsou jeho významným nástrojem. Sérologické metody, které patří mezi imunoanalytické metody, dnes ještě nelze standardizovat. Diagnózu a opatření vůči infekci také proto nelze dělat jen na základě vyšetření protilátek. Je nutné posuzovat výsledky v kontextu celého klinického obrazu, anamnézy a v případě protilátek se doporučuje opakovat vyšetření s časovým odstupem.

## Abstract

The aim of present master's thesis was to compare the results of serological methods for diagnosing borreliosis that are commonly used in Spadia laboratories (ELISA, immunoblots) in terms of recommendation on how and when to indicate and interpret them.

The theoretical part is focusing on the characteristics and history of borreliosis, microbiological description of *Borrelia*, immune system and pathogenesis of the disease as well as the therapy and prevention.

The experimental part is focusing on the analysis of results obtained from common examinations of antibodies to *Borrelia* made in Spadia Lab laboratories from January 1<sup>st</sup> 2014 to December 31<sup>st</sup> 2015. Screening of antibodies to *Borrelia* made by ELISA in IgM and IgG was done for all samples according to recommendation of CDC. In 2014 the ELISA screening was done using ELISA kits from Euroimmun and Evolis sample processors whereas in 2015

it was done using DiaSorin's CLIA kits on Liaison analyser. Positive results were then confirmed by Westernblot or lineblot alternatively if the physician did not ask otherwise.

It must be remembered that ELISA and Westernblot belong among serological methods that are using antibodies, i.e. substances produced by the immune system. The immune system plays the key role in protecting the body against infection and the antibodies are its important tool. Serological methods belong among immunoassay methods, which is still not standardized. Diagnosis of infections can't be based only on antibody testing. It is necessary to assess the results in the context of the entire clinical picture, history and in the case of antibodies it is recommended retesting with an interval.

## **Klíčová slova**

Lymeská borelióza, *Borrelia burgdorferi sensu lato*, klíště, ELISA, Westernblot.

## **Keywords**

Lyme disease, *Borrelia burgdorferi sensu lato*, tick, ELISA, Westernblot.

SLIŽOVÁ, I. *Sérologická diagnostika borelióz*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2016. 91 s. Vedoucí diplomové práce RNDr. Ivo Lochman, CSc.

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně, a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....  
Podpis studenta

## **Poděkování:**

Těchto pár řádek bych chtěla věnovat všem, kteří mi pomohli a podpořili mě během celého studia i při tvorbě diplomové práce. Především děkuji panu RNDr. Ivo Lochmanovi, CSc. a prof. RNDr. Ivaně Márové, CSc. za ochotnou a vytrvalou pomoc při vedení mé diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat své rodině a příteli za trpělivost během celého studia. A také děkuji za pomoc celému kolektivu laboratoří Spadia lab, a.s.

## OBSAH

1	Teoretická část .....	8
1.1	Charakteristika a historie boreliózy .....	8
1.2	Borelie - mikrobiologická charakteristika .....	10
1.3	Imunitní systém a patogeneze onemocnění .....	13
1.3.1	Průběh onemocnění .....	13
1.3.2	Rozdělení podle místa poškození organismu .....	15
1.4	Terapie a prevence onemocnění .....	17
1.4.1	Prevence.....	17
1.4.2	Správné odstranění klíštěte .....	18
1.4.3	Léčba .....	18
1.4.4	Rezistence k lékům.....	19
1.4.5	Další metody léčby .....	20
1.5	Laboratorní diagnostika .....	21
1.5.1	Nepřímý průkaz infekce .....	24
1.5.2	Přímý průkaz infekce.....	30
1.6	Cíl práce.....	33
2	Experimentální část .....	34
2.1	Stanovení protilátek proti boreliím metodou ELISA na analyzátoru EVOLIS .....	34
2.2	Stanovení protilátek proti boreliím ve třídách IgG, IgM chemiluminiscenční imunoanalýzou na analyzátoru LIAISON® XL.....	34
2.3	Stanovení protilátek proti boreliím ve třídách IgG, IgM metodou westernblot a lineblot .....	34
2.4	Diagnostika Borélií v Laboratořích Spadia Lab., a. s.....	34
2.4.1	Pravidla pro vyhodnocování výsledků: .....	36
2.4.2	Stanovení protilátek proti boreliím metodou ELISA na analyzátoru EVOLIS	36
2.4.3	Stanovení protilátek proti boreliím ve třídách IgG, IgM chemiluminiscenční imunoanalýzou (CLIA) na analyzátoru Liaison .....	36
2.4.4	Stanovení protilátek proti boreliím ve třídách IgM metodou WB.....	36
2.4.5	Stanovení protilátek proti boreliím ve třídách IgG metodou WB .....	37
3	Výsledky .....	39
4	Diskuze .....	46
5	Závěr .....	50
6	Seznam použitých zdrojů.....	51
7	Seznam použitých zkratk a symbolů.....	58
8	Seznam obrázků.....	60
9	Seznam tabulek .....	61
10	Seznam příloh .....	62
11	Přílohy.....	63
11.1	Příloha 1:.....	63
11.2	Příloha 2:.....	69
11.3	Příloha 3.....	79
11.4	Příloha 4.....	87

11.5 Příloha 5:.....	89
11.6 Příloha 6:.....	90
11.7 Příloha 7:.....	91

# 1 TEORETICKÁ ČÁST

## 1.1 Charakteristika a historie boreliózy

Podstata onemocnění byla objasněna v 70. – 80. letech 20. století, ale popisy nemoci odpovídající jejímu klinickému obrazu, jsou mnohem starší. V roce 1909 poprvé popsal Erythema migrans po přisátí klíštěte Arvid Afzelius a za další dva roky byl popsán kožní projev, který se označuje jako boreliový lymfocytom. Když byla borélie objevena, mělo se za to, že existuje pouze jeden její druh. Dnes je již známo několik patogenních druhů borelií, lišících se uvnitř rodu borelií ve své antigenní výbavě. I při kultivaci u nich může docházet ke změnám antigenní skladby [1].

Lymfská borelióza (LB), nazývaná též lymeská borelióza, je infekční onemocnění [2], které patří mezi nejčastější zoonózy a je přenášeno klíšťaty, v Evropě *Ixodes ricinus*, ve východní Asii *Ixodes persulcatus* a v Americe *Ixodes pacificus* a *Ixodes dammini* [3]. K přenosu onemocnění je zapotřebí, aby klíště bylo přisáto minimálně 3 dny. V přenašeči může být až půl milionů infekčních zárodků [4]. Mezi další onemocnění přenášených klíšťaty patří také klíšťová encefalitida (TBE), tularémie, anaplasmóza a rickettsiáza [5].

Vývoj klíštěte obecného se uskutečňuje přes 3 různé hostitele. Nejdříve dospělá samice naklade několik tisíc vajíček na rostliny. Za několik týdnů se z vajíček líhnou šestinohé larvy, které krátce sají na ptácích nebo ještěrkách. Po sání se v detritu půdy svlékají a mění se na osminohé nymfy. Nymfy sají na drobných hlodavcích a poté opět dojde na svlékání. Přeměnou v dospělce klíště dokončuje svůj vývoj. Dospělé samice jako hostitele vyhledávají skot, jeleny, psy a další savce. Samci obvykle krev nesají [6].

Klíšťata mají v trávicím ústrojí postranní laloky, které následně slouží ke skladování nasáté krve. V klíšťatech se borélie usídlují ve střevcích v jejich epiteliálních buňkách prostřednictvím proteinu exprimovaném vně jejich membrán - OspA proteinu. Po sání krve dochází k pomnožení spirochét, k zvýšení teploty, snížení pH, a dopadem toho se snižuje exprese OspA a zvyšuje se koncentrace proteinu OspC. Borélie se oddělí od epitelii střev, pomnoží se ve slinných žlázách a slinami se dostávají do těla hostitele. Následně jsou roznášeny krevním oběhem hostitele do dalších částí těla [7].

Velké riziko přenosu patogenu z klíštěte na člověka hrozí na jaře, kdy aktivní nymfy klíštěte obecného vyhledávají své hostitele, převážně větší obratlovce. Riziko přenosu se snižuje v létě, kdy jsou aktivní spíše larvy vyhledávající jako své hostitele drobné obratlovce. Horké a suché počasí klíšťatům obecně nesvědčí, a tehdy se jejich aktivita, a tudíž i riziko přenosu snižuje. Na podzim je riziko přenosu patogenu opět zvýšené, jelikož kromě nymf jsou více aktivní i dospělci, kteří vyhledávají jako hostitele velké obratlovce. Také infekčnost v populaci klíšťat se zvyšuje.



Obrázek číslo 1: Foto klíštěte *Ixodes ricinus* (Dostupné z [8]).



Obrázek číslo 2: Samice, samec a nymfa *Ixodes ricinus*, dostupný z [9]).

Byla také prokázána přítomnost spirochét v komárech a jiných druzích hematofágního hmyzu [10]. Mezi další možnosti přenosu patří přenos krevní transfúzí. Borélie mohou proniknout i placentární bariérou, ale takový přenos je velmi ojedinělý [11].

Odhaduje se, že se touto chorobou nakazí až 85500 lidí ročně. Nejvíce případů (65500) je zaznamenáno v Evropě [2]. Podle nejnovější informace by měla být LB uznávána za epidemii, která je alespoň 6x častější než HIV/AIDS [12].

Borelióza, pokud přejde do chronicity, se vyznačuje různými klinickými projevy, nejvíce postihuje nervovou soustavu a srdce [1].

Původcem lymfské boreliózy jsou gramnegativní, mikroaerofilní spirochety označované společně jako *Borrelia burgdorferi sensu lato*, které jsou na základě řady studií taxonomicky rozděleny do několika druhů, z nichž patogeneticky nejvýznamnější pro člověka jsou tři druhy: *Borrelia garinii*, *Borrelia afzelii* a *Borrelia burgdorferi sensu stricto*. Tyto zmíněné druhy mohou být často provázeny typickými klinickými příznaky. U *Borrelia burgdorferi sensu stricto* jsou to kožní projevy, polyartritidy i srdeční poruchy, *Borrelia afzelii* je příčinou acrodermatitis chronica atrophicans a mezi hlavní projevy *Borrelia garinii* patří neuroborelióza. Toto rozdělení je velmi časté, ne však striktní. V současnosti je určeno více než 30 genetických druhů borélií, hlavně na základě molekulárních a biologických metod, ale jak již bylo řečeno, patogeneticky nejvýznamnější pro člověka jsou výše uvedené tři druhy.

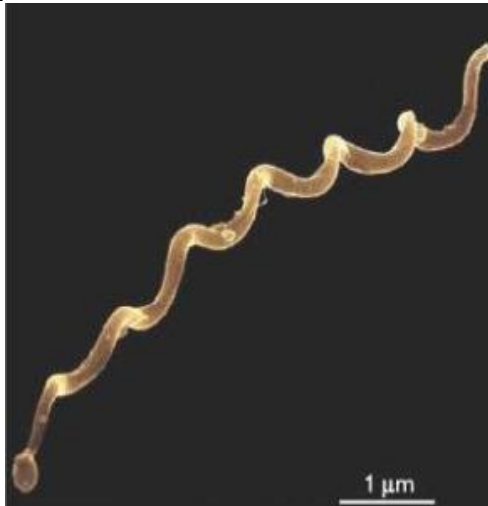
Jelikož neléčená borelióza může způsobovat různé komplikace, je nezbytná její včasná a kvalitní diagnostika, jak laboratorní, tak klinická.

Obtížná diagnostika a nedostatečný léčebný efekt či závažné komplikace a důsledky lymfatické boreliózy učinily z této velice rozšířené nemoci významnou nozologickou jednotku [7].

## 1.2 Borelie - mikrobiologická charakteristika

Borelie se řadí do čeledi Spirochaetaceae, řádu Spirochetales, třídy Spirochaetes a rodu *Borrelia*. [13]. Řád Spirochaetales obsahuje několik rodů, ale pouze čtyři z nich (*Borrelia*, *Treponema*, *Leptospira* a *Brachyspira*) zahrnují druhy patogenní pro člověka [14].

Jako původce LB byl nejprve popsán jediný druh - *Borrelia burgdorferi* [15]. Během dalších let až do současnosti se objevují jako původci onemocnění další druhy a jejich poddruhy, což je příčinou širokého spektra klinických příznaků a částečnou komplikací ve výzkumu očkovací látky [16].



Obrázek číslo 3: *Borrelia burgdorferi*, Dostupné z [17].

Nejznámější a nejvýznamnější druhy v Evropě jsou *Borrelia garinii* a *Borrelia afzelii*, *Borrelia burgdorferi sensu stricto* se vyskytuje převážně na severoamerickém kontinentu.

Další popsané druhy jsou: *B. valaisiana*, *B. bissetti* a *B. japonica*, ale, jak již bylo řečeno, je druhů borelií mnohem více. Všechny druhy borelií se od sebe liší také svým antigenním složením [18].

Jednotlivé druhy mají různý vztah k postižení jednotlivých orgánů. *B. afzelii* postihuje hlavně kůži, *B. burgdorferi sensu stricto* způsobuje poškození kloubů a *B. garinii* CNS [13, 14].

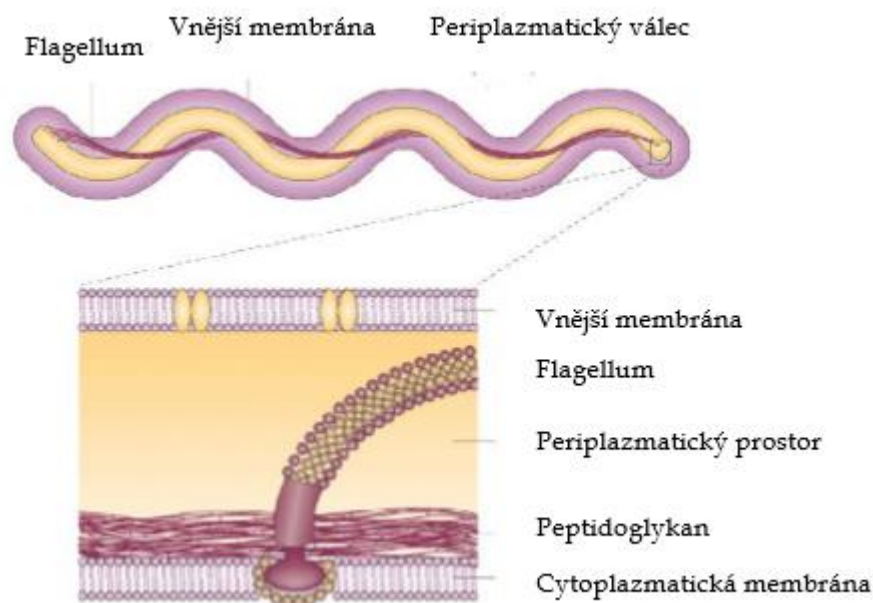
*Borelie* je extracelulární, gramnegativní bakterie, dlouhá 4 až 30  $\mu\text{m}$  a široká 0,2  $\mu\text{m}$ . Na obou koncích má bičíky. Do kmene spirochaetes mimo borelií patří i rod *Treponema*, do něhož patří i původce syfilidy [10]. *Borrelia burgdorferi sensu lato* je rozmanitá skupina

bakterií, která je rozšířená celosvětově. Již jsme uvedli, že dnes je popsáno téměř 30 druhů borelií [20].

Spirálovitý tvar umožňuje boreliím šroubovitý pohyb, pomocí něhož dokáže velmi dobře překonávat různé bariéry. Tuto schopnost bakterie využívají k pohybu ve vysoce viskózním prostředí, jako je například mezibuněčná hmota. Je schopná vstupovat do buněk jako jsou fibroblasty, dendritické buňky nebo mikrořagy a v těchto buňkách umí nadále přeřivat [21]. Ideální teplota pro růst borelií je 30 – 34 °C a její generační doba je 12 hodin [10]. Zvláštností u borelií je jejich genom, představený lineárním chromosomem. Na rozdíl od borelií mají ostatní bakterie genom kruhový [22]. Díky tomu, že boreliím chybí enzymy potřebné pro tvorbu aminokyselin, mastných kyselin a nukleotidů, nejsou schopné samostatného řití, a pro přeřivání proto potřebují nutně svého hostitele [21].

Protoplazmatický cylindrický komplex borelií je obklopan vnější buněčnou membránou. Ta se skládá z peptidoglykanu, cytoplazmy a vnitřní membrány. *B. burgdorferi* je morfologický nepravidelně stočená spirochéta o řířce 0,2 – 0,3  $\mu\text{m}$  a délce 10 – 40  $\mu\text{m}$ . Objevuje se v několika formách in vitro např. zkroucená, nestejnospměrně stočená nebo propletená jedna přes druhou, většinou bývá nalezena v agregované formě [23]. Charakteristickou vlastností borelií je přítomnost bičíků. Periplazmatické bičíky jsou podobné stavbou ostatním bakteriálním bičíkům, ale nenachází se na povrchu buňky, nýbrž v periplazmatickém prostoru mezi protoplazmatickým válcem a vnější buněčnou membránou. Tyto bičíky jsou vloženy na terminálním konci protoplazmatického válce [24]. Na každém konci bakterie jich je 7 – 14. Výjimkou je *B. sinica* s 2 - 4 bičíky, což může být důvod její nepohyblivosti. Bičík se skládá ze dvou proteinů většího FlaB (41 kDa) a menšího FlaA (38 kDa). Cílená inaktivace FlaB indukuje ztrátu pohyblivosti a tyčinkovité formy u těchto mutantů. Bičíky formují tvar borelií a jsou stočené kolem protoplazmatického válce. Na rozdíl od jiných bakterií nemá buněčná stěna hlavní roli v určování tvaru buňky. Složení buněčného povrchu je až na některé rozdíly podobné gram-negativním bakteriím. Je to hojnost lipoproteinů ve vnější buněčné membráně a absence lipopolysacharidu. Jako hlavní lipidové složky membrán byly identifikovány dva fosfolipidy (phosphatidylglycerol a fosfatidylcholin) a dva atypické glykolipidy [25]. Mezi další nepostrádatelnou buněčnou složku borelií patří vnější povrchové proteiny (Osp – outer-surface proteins), což jsou lipoproteiny OspA, OspB, OspC, OspD, OspE a OspF [26]. Změna v syntéze Osp je primární strategie, již se borelie přizpůsobují různým hostitelským prostředím a vyhýbají se hostitelskému imunitnímu systému. Studiemi je prokázáno, že *B. burgdorferi* selektivně exprimuje specifické Osp v konkrétních orgánech a v různých fázích jejího životního cyklu. Expese OspB a OspA se spustí ihned, když spirochety vstoupí do přenašeče a přebývají v něm. Během přenosu z přenašeče do hostitele se zvyšuje expese proteinů, jako jsou DbpA, BBK32, OspC, a snižuje se expese OspB a OspA [27]. OspC je faktorem virulence potřebným pro počáteční

fázi infekce u savců. K indukci exprese OspC dochází u spirochét ještě v přenašeči, ale při kolonizaci klíštěte nebo při migraci do jeho slinných žláz nehraje OspC žádnou roli. Jak již bylo řečeno, spirochéty rodu *Borrelia* jsou jedinečné mezi bakteriemi v tom, že mají genom rozprostřen do lineárního chromozómu o délce 911 kb s průměrným obsahem G+C 28,6 % a celkem 21 plazmidů (9 kruhových o velikosti 9 – 32 kb a 12 lineárních o velikosti 5 - 56 kb). Chromozóm nese 853 předpokládaných otevřených čtecích rámců. Z nich biologická role byla stanovena u 59% a nové geny představují 28%. Chromozomální geny kódují proteiny nezbytné pro replikaci, transkripci, translaci, energetický metabolismus, reparaci DNA, homologní rekombinaci, reakci na tepelný šok a chemotaktické faktory kódující geny [15,16]. Asi 8% genomu borelií je věnováno produkci lipoproteinů vystavených na vnějším povrchu. Plazmidy kódují 535 genů a 90% z nich nemá žádnou podobnost s geny mimo rod *Borrelia*, což naznačuje jejich specializovanou funkci, týkající se přizpůsobení spirochét různým hostitelům [28].



Obrázek číslo 4: Morfologie struktury *Borrelia burgdorferi*. Dostupné z [8].

Na povrchu spirochéty je S-vrstva bez charakteristické struktury. Tato struktura přilehá na vnější membránu, která je tvořena třemi vrstvami. Membránu obklopuje periplazmatický prostor, a v něm se nachází protoplazmatický válec a 7–9 zatažitelných bičíků, které umožní borelii pohyb. Procházejí pod vnější buněčnou stěnou a jsou upevněny do bazálních disků. Intaktní spirochéta má málo práceschopných, volných bičíků vně buňky. Působením TRIS puftru, respektive při změně pH, zvýšené koncentraci lysozymu, ale také komplementu, se množství volných bičíků zvyšuje. Bičíky začnou tvořit shluky po určité době v nepříznivém

prostředí, až jsou odvrženy včetně antigenních epitopů na svém povrchu. Borelie vytváří antigenní mimikry. Jedná se o schopnost unikat působení imunitnímu systému. Podobné faktory jako je tělesná teplota hostitele rovněž ovlivňují antigenní epitopy exprimované na povrchu bakterie. Pružnost membrán umožňuje boreliím nejen aktivní pohyb, ale také tvorbu cyst a vylučování membránových „pupenů“ a vezikulů, které bakterie tvoří ze stejných složek jako buněčnou stěnu a kterými jsou vybaveny plazmidy. Dále jsou významné pro virulenci borelií již zmíněné vnější povrchové proteiny buněčné stěny (Osp), které umožňují bakteriím atakovat bičíkovými proteiny savčí buňky a které zprostředkovávají šíření borelii v hostitelském organismu. Plazmidy nesoucí geny hlavních Osp proteinů pomáhají spirochetě přežít a adaptovat se ve značně odlišných podmínkách, tj. teplokrevném savčím těle a v klíštěti při teplotě zevního prostředí. Podobně jako i jiné patogenní bakterie disponují borelie širokým repertoárem adaptivních molekulárních odpovědí na signály zevního prostředí pomáhajícím jí přežít v různých podmínkách a úspěšně atakovat hostitele. Můžeme například pozorovat odlišnou syntézu membránových proteinů během pobytu v savci a v klíštěti. Důležitou biologickou vlastností *Borrelia burgdorferi* a jedním z hlavních důvodů jejich problematické klinické i laboratorní diagnostiky je tvorba cystických forem. Různé atypické formy se vyskytují u četných bakteriálních druhů (L-formy) a vznikají kompletním nebo částečným odstraněním či narušením buněčné stěny nebo inhibicí syntézy jejich proteinů. *Borrelia burgdorferi* není schopna syntetizovat mastné kyseliny de novo, proto je nucena je využívat z krevního séra hostitele, které je jejich významným zdrojem. V bezsérovém mediu se in vitro bakteriální buňky do 48 hodin z 90 % transformují do podoby nepohyblivých cystických forem [7].

### **1.3 Imunitní systém a patogeneze onemocnění**

#### **1.3.1 Průběh onemocnění**

Lymfská borelióza (LB) má pestrý klinický obraz. Existují naprosto jasné klinické formy, u kterých nepochybuje, že se jedná o toto onemocnění. Ale je popsána celá řada případů s velmi variabilními symptomy a LB se proto velmi obtížně prokazuje.

Podle stadia se onemocnění dělí do 3 stádií:

- časné nákazy
- rozšířené nákazy
- chronické infekce [30].

#### **První fáze nemoci:**

První zaznamenaný symptom se vyskytuje u 40 – 60% pacientů a skládá se z kruhové skvrny Erythema migrans (EM), která se může objevit na všech částech těla, ale nejčastěji se

vyvíjí v místě přichycení klíštěte. Běžně začíná jako červená papula nebo makula a zvětšuje se během několika následujících dnů až týdnů. EM je obvykle ovál měřící v průměru více než 5 centimetrů [31,32]. Skvrna se objevuje velmi krátce po infikování [15]. Může zmizet i bez přeléčení, občas však přetrvává měsíce a často se rozšiřuje od místa přisátí do okolí ranky [3].

V tomto stádiu nemoci se objevují příznaky podobné chřipce, jako horečka, bolest hlavy, svalů, postižení jedinci mohou však být i asymptomatictí [23]. Mezi méně časté kožní projevy patří boreliový lymfocytom, který se však vyskytuje až ve druhém stádiu nemoci u dospělých v oblasti nosu, paží, prsní bradavky a u dětí na ušním lalůčku [33]. Chronická atrofická akrodermatitida (ACA) spontánně nezmizí, na rozdíl od EM a lymfocytomu. Je kožním projevem až ve třetím stádiu onemocnění a nejčastěji se vyskytuje na okrajových částech těla [34].



Obrázek číslo 5: *Erythema migrans*, dostupné z [35].

#### **Druhá fáze:**

Nastává za několik dní až týdnů (často 2 – 12 týdnů po primární infekci) [36]. Borelie začínají diseminovat do různých tkání, ve kterých způsobují poškození tkáně a zánětlivé reakce. Obvykle dochází k postižení srdce, kůže a centrálního a periferního nervového systému [15]. Objevují se různé projevy druhého stádia LB:

- bolesti v krku a další
- neproduktivní kašel
- lymeská karditida
- boreliový lymfocytom
- kloubní a svalová postižení (myalgie, artralgie)
- časná neuroborelióza (Bannwarthův syndrom)



Obrázek číslo 6: Boreliovský lymfocyt, dostupný z [37].

#### **Třetí fáze:**

Poslední stádium začíná 6 týdnů až 2 roky po nákaze. Nejčastější projevy jsou:

- Artritida a další manifestace LB
- Chronická neuroborelióza
- Acrodermatitis chronica atrophicans (ACA)

### **1.3.2 Rozdělení podle místa poškození organismu**

#### **Kardiální projevy:**

Jedná se především o perikarditidu, dilatační kardiomyopatie, dochází k poruchám srdečního rytmu či myokarditidě [38]. Poškození srdce vede nejčastěji k atrioventrikulární blokádě stupně I-III [39]. Poškození srdce, se můžou projevat dušností, palpitací či bolestí na hrudníku. Vyskytují se ale velmi sporadicky [32].

#### **Kožní projevy:**

Kožní projevy se vyskytují ve všech třech stádiích LB [11]. Mezi kožní projevy patří především erythema migrans (EM), která se objevuje po 3 – 30 dnech od nákazy [38]. Dalšími projevy jsou sekundární léze EM, ACA (Chronická atrofická akrodermatitida), což je kožní onemocnění charakterizované výraznou atrofií ztenčením kůže nebo boreliovský lymfocytom, který bez nasazení léčby může trvat i více než rok [11].

### Neurologické projevy:

Při neurologických projevech může docházet k poškození mozkového parenchymu, pleny a periferních nervů [38]. Mohou vzniknout periferní léze obličejového nervu, meningitidy, meningomyeloradikuloneuritida, encefalitida, radikuloneuritidy, radikulopatie, pseudotumor cerebri a paraparéza. Dalšími průvodními jevy mohou být: psychická vyšinutí, poruchy paměti, koncentrace, a mnoho dalších neurologických projevů [19]. K nesnesitelným neurogenním bolestem, které jsou způsobené zánětem plen a míšních kořenů, dochází u vzniku meningomyeloradikuloneuritidy (Garinův-Bujadouxův-Bannwarthův syndrom).

### Revmatologické projevy

Poškození v oblasti pohybového aparátu neboli Lymeská artritida může vzniknout v časném i pozdní fázi infekce [11]. U časného stádia je to nejčastěji bolest struktur pohybového aparátu (artralgie), a bolest svalů (myalgie) [38]. Artralgie mohou být provázeny malou výkonností, horečkou, slabostí a únavou. V pozdějších stádiích se objevuje zánět kloubů (artritida), záněty šlach (tendovaginitidy a tendinitidy), záněty kloubních pouzder (kapsulitidy), či záněty šlach do kosti (entezitidy) a úponů vazů [11].

### Postižení oka

Nejčastěji se vyskytuje v akutní fázi onemocnění. Dochází k poškození očního nervu, dále mohou vznikat orbitální myozitidy, konjunktivitidy, retinální vaskulitidy nebo dochází ke papilitidě, keratitidě, uveitidě, chorioiditidě a episkleritidě [32].

### Ostatní projevy LB

Další možné projevy jsou proteinurie, splenomegalie, hematurie i suchý kašel [11]. Mohou být prokázány zvýšené aktivity transferáz a také může docházet k různým formám plicního poškození či poškození ledvin [32].

### Imunitní odpověď

Pro rozvoj a přenos onemocnění je důležitá nejen antigenní výbava mikroorganismů, ale i buněčná a protilátková odpověď imunitního systému konkrétního hostitele na antigenní podněty invadujícího mikroorganismu. *Borélie* aktivují jak specifickou tak nespecifickou, humorální i buněčnou imunitu. Pro aktivaci imunitního systému jsou klíčové flagelliny, lipoproteiny i povrchové antigeny borelií [11]. *Borélie* se začnou množit ihned poté, co se dostanou do těla hostitele. Můžou být transportovány do mízních uzlin nebo může vzniknout erytém na kůži. Spirální tvar jim umožňuje velmi rychlý pohyb i ve viskózním prostředí mezibuněčné hmoty (>2 mm/min), což 500-krát rychleji, než rychlost, kterou jsou schopny vyvinout neutrofilů [21]. Buněčná imunita je realizována především prostřednictvím

makrofágů a lymfocytů jak CD4 tak CD8 pozitivních. Při aktivaci celého imunitního systému dojde i k aktivaci B lymfocytů, z nichž se diferencují plasmatické buňky produkující protilátky, a to nejen proti antigenům borelií, ale i proti antigenům vlastních poškozených nebo se rozpadajících buněk hostitele (autoprotilátky), kde jako cíle jsou jak jaderné antigeny (ANA), tak antigeny cytoplasmy nebo buněčných stěn jako fosfolipidy (kardiolipin). Tvořeny jsou řásto také kryoglobuliny. Imunitní odpověď vyvolávají především povrchové proteiny borelií a ty slouží také jako induktory tvorby chemokinů a prozánětlivých cytokinů jako je TNF $\alpha$  a některé interleukiny (IL) [32]. Celkově lze říci, že funkce imunitního systému je pro zvládnutí nejen akutní boreliové infekce, ale především její chronické formy klíčová.

Tvorba specifických protilátek (imunoglobulinů) ve třídě IgM začíná obvykle po 2 až 4 týdnech po infikování. K vrcholu jejich tvorby a koncentrace v séru dochází po 3 až 8 týdnech, poté jejich koncentrace klesá.

Tvorba specifických imunoglobulinů IgG začíná po 6 až 8 týdnech po infikování a v těle hostitele mohou být prokazatelné měsíce až roky [18].

## **1.4 Terapie a prevence onemocnění**

### **1.4.1 Prevence**

U LB je jako u spousty infekčních onemocnění snahou ochránit osoby před jejich vznikem specifickou prevencí, vakcinací.

V USA byla v roce 1998 vyvinuta vakcína, která byla založená na imunizaci rekombinantním povrchovým proteinem A (OspA), protože exprese OspA u *Borrelia burgdorferi* je zvýšena v trávicím traktu klíštěte a snížena při přenosu bakterie na hostitele. Neutralizující anti-OspA protilátky hostitele by měly zneškodnit *Borrelia burgdorferi* uvnitř klíštěte na začátku sání na hostiteli ještě před jejich přenosem na hostitele. Rekombinantní Osp A vakcína Lymerix<sup>®</sup> byla však v roce 2002 stažena z trhu. Výrobce vakcíny GlaxoSmithKline zdůvodnil stažení vakcíny z důvodu údajně slabé poptávky po ní. Zjistilo se, že boreliový Osp A antigen vykazuje částečnou homologii s povrchovým receptorem leukocytů LFA-1 $\alpha$  a může způsobit autoimunitní reakci projevující se jako Lymeská artritida [40].

Další kandidát pro vývoj vakcíny nové generace je povrchový membránový protein C (Osp C), který je důležitým virulentním faktorem [41]. Přímé funkční testy pro OspC dosud ještě nebyly předloženy [42]. Exprese OspC se indukuje v počátečních fázích sání [43]. Jakmile dojde k přenosu borelií do těla hostitele, dojde během několika dní k potlačení jeho produkce [44]. Tento lipoprotein je zapotřebí ke vzniku infekce v těle savce, který byl infikován boreliemi. Pro borelie je zřejmě OspC důležitý při adaptaci na prostředí v těle hostitele [45].

Jako další opatření jak zabránit infikování boreliemi je zabránit klíšťatům, aby se přisávaly na kůži hostitele. Lze využít repelenty obsahující látku DEET (repelenty obvykle obsahují 10 až 30% této látky) [46]. Repelenty se natírají přímo na tělo [3]. Ideální je spojit repelent s použitím pesticidu permethrinu, jež se nanáší přímo na oblečení. Musíme si ale dávat pozor, protože permethrin se nesmí nanášet na kůži [46]. Permethrin se smí využívat jen do koncentrace 0,5 %. Deltamethrin spolu s Permethrinem patří mezi insekticidy, které lze použít k ochraně před obtížným hmyzem. Chemická látka DEET (N,N-dietyl-meta-toluamid) je kapalina bez zápachu. Podobnou účinnost má i Icaridin, který nerozpouští umělou hmotu a nepoškozuje oděvy [47].

Důležité preventivní opatření je také to, že po příchodu domů z prostředí, kde by mohl být jedinec ohrožen klíšťaty, si velmi důkladně prohlédneme své tělo a případně přisátá klíšťata co nejdříve odstraníme [46].

#### **1.4.2 Správné odstranění klíštěte**

Pokud již došlo k přisátí klíštěte, je potřeba ho odstranit co nejdříve [3]. K odstranění je vhodné použít ochranné rukavice, protože borelie se do těla mohou dostat i přes drobné oděrky [19]. Jako první se musí místo s přisátým klíštětem zakápnout desinfekčním roztokem (Betadin, Jodisol, Septonex) [11]. Následně se pinzetou, uchopí klíště co nejbližší k pokožce a pomalým tahem se vytáhne. Ihned po vytáhnutí klíštěte je dobré ho odstranit bezpečným způsobem (spálení, spláchnutí) [46]. Nesmíte opomenout postižené místo potřít desinfekčním roztokem. Několik týdnů se pak má místo pozorovat, zdali nedojde k jeho zarudnutí [48].

#### **Důležitá pravidla po přisátí klíštěte:**

- klíště se nesmí rozmačkat
- co nejdříve odstranit klíště [3].

#### **1.4.3 Léčba**

Léčba boreliózy je dnes založena především na podávání antibiotik (ATB) a závisí na stádiu onemocnění. V počáteční fázi stačí perorální léčba antibiotiky, kdy je úspěšnější opakovaná léčba před léčbou trvající delší dobu. Každé tři měsíce po dokončení léčby se doporučuje kontrolovat průběh nemoci podle klinických kritérií i sérologicky. V případě LB může docházet k recidivám i po více než 2 letech [3].

Studie prokázaly, že k léčbě LB jsou vhodná antibiotika, zejména peniciliny (amoxicillin, penicilin G), tetracykliny (doxycyklin), makrolidy (erytromycin, azitromycin, klaritromycin a roxitromycin) a cefalosporiny 2. a 3. generace (cefuroxim, ceftriaxon, cefotaxim, ceftazidim) [36].

Volba a způsob podávání vhodného ATB současně zohledňují stadium LB, orgánové postižení a klinický stav pacienta. Právě délka terapie zajistí uspokojivé zasažení a eradikaci borélií, proto je potřeba nejméně 14 dní léčby ATB.

#### **1.4.3.1 Terapie v časné lokalizované fázi onemocnění**

Použití antibiotik je v této fázi minimálně 2 – 3 týdny. Jako velmi účinný se prokázal v časné fázi doxycyklin. Udává se podání dávky 2x100 mg po 12 hodinách [50]. Doxycyklin způsobuje fotosenzitivitu, dráždí žaludeční sliznici, ale má kvalitní průnik do tkání [48]. Proto, pokud pacient užívá doxycyklin, měl by se vyhnout slunci nebo jinému UV záření [47]. Důležité je, že se prokázala účinnost jednorázového podání 200 mg doxycyklinu do tří dnů po přisátém klíštěti [21]. Jako další ATB léčba se může podávat amoxicilin v dávce 3x1000 mg, který se podává hlavně u lidí, kteří mají alergii na tetracykliny či těhotným, kojícím ženám a u dětí do 8 let věku. Těmto skupinám jsou tetracykliny kontraindikované [48].

#### **1.4.3.2 Terapie v diseminované fázi onemocnění**

Léčba ATB v této fázi onemocnění trvá okolo 3. týdnů. Do této skupiny patří ATB, která zabraňují rozvoji neuroboreliózy, lymeské karditidy či kloubního poškození. Jedná se hlavně o ceftriaxon (1x2000 mg denně), cefotaxim (3x2000 mg denně) nebo penicilin G (4x5 mil.j.) podávané obvykle intravenózně 21 dní [49]. Tato terapie je, ale vyžadována pouze u závažných postižení. Jinak se využívá podání doxycyklinu, amoxicilinu nebo azitromycinu [48].

#### **1.4.3.3 Terapie v pozdní perzistentní fázi onemocnění**

Léčebná terapie pozdního stádia LB se opírá o stejná ATB, avšak odlišuje se zpravidla prodloužením délky parentálního podávání až na 28 dní, často v kombinaci s užíváním imunosupresivních či protizánětlivých léčiv [48].

Důvodem mohl být špatný výběr léku, útlum rozvoje klinických příznaků po krátkodobém podání ATB či terapie po chybně stanovené diagnóze [32]. Využívá se zde, hlavně cefalosporinů třetí generace a penicilinu G [47].

### **1.4.4 Rezistence k lékům**

*Borrelia burgdorferi* tvoří betalaktamázy a cefalosporinázy, které u některých druhů mohou vést k rezistenci k cefalosporinům a penicilinům. Jedná se zřejmě o pomalu fungující enzymový systém, který může být překonán vyššími dávkami nebo udržením stabilních krevních úrovní po delší dobu - obzvláště při spojitých infuzích (cefotaxim) nebo přípravcích s dlouhodobým uvolňováním (benzathine penicilin). Přesto bylo pozorováno selhání léčby penicilinem a cefalosporiny, ale dobré reakce na sulbactam/ampicillin, imipenem

a vankomycin, které pracují jiným způsobem blokování tvorby buněčné stěny, než peniciliny a cefalosporiny.

## **1.4.5 Další metody léčby**

### **1.4.5.1 Pulsní léčba**

Pulzní dávkování znamená užívání periodicky, např. každých 48 hodin, na rozdíl od konvenčního dávkování několikrát denně. Tento způsob má několik výhod:

Dávky jsou zdvojnásobeny (např.: cefotaxim, 12 g denně), což zvětšuje účinnost

- toxičtější léky mohou být používány se zvýšenou bezpečností (např. vancomycin)
- může být účinný, když denní režimy selhaly.
- příjemnější životní styl pro pacienta.
- je často méně nákladný než denní režimy [65].

Pokud jsou ATB užívána tímto způsobem, jejich imunosupresivní efekt je minimalizován, ale jejich schopnost oslabit bakteriální ribozomy je nezměněná. Pacienti postupně zvyšují dávky pulzně užívaných antibiotik tak, že druhy bakterií, které jsou citlivé na různé hladiny koncentrací, budou zacíleny. Přerušované dávky antibiotik zřejmě narušují přirozený stav homeostázy imunitního systému a vyprovokují silnější imunitní odezvu [70].

Tento druh léčby by měl pokračovat minimálně 10 týdnů, a často musí pokračovat více než 20 týdnů. Účinnost tohoto režimu je založená na skutečnosti, že trvá 48 až 72 hodin spojitě baktericidní antibiotické úrovně, aby byly spirochéty zabity, přitom trvá nejméně 4-5 dnů mezi pulsy, než se zbylé zacystované spirochety začnou znovu množit. Jako u každého režimu léčby lymské nemoci je i zde třeba přizpůsobit individuálně každému pacientovi léky, specifické dávkování a zhodnocení podle nejlepšího mínění klinického lékaře [65].

### **1.4.5.2 Kombinovaná léčba**

Léčba chronické lymské nemoci obvykle vyžaduje kombinaci antibiotik. Jsou zde 4 důvody:

#### **1. Dvojí umístění infekce**

*Borrelia burgdorferi* může být nalezena jak v tělních tekutinách, tak hluboko ve tkáních. Každé jednotlivé antibiotikum nebude účinné v obou místech. Logická kombinace použití síly je např. azithromycin a penicilin.

#### **2. Intracelulární úkryt infekce**

Borrelia burgdorferi může proniknout a zůstat životaschopná uvnitř hostitelských buněk a vyhnout se tak účinkům extracelulárních léků. Typické kombinace zahrnují extracelulární antibiotikum plus intracelulárně působící lék, jako je derivát erythromycinu nebo metronidazol.

### 3. L-forma (spheroplast)

Borrelia burgdorferi může existovat ve dvou až třech různých morfologických formách: spirocheta, spheroplast (L-forma) a cystické formě. L-formy a cystické formy nemají buněčné stěny, a tak je neovlivní betalaktamová antibiotika. Zdá se, že L-forma je citlivá na tetracykliny a pokročilé deriváty erythromycinu.

Borrelia burgdorferi může přecházet mezi těmito třemi formami během trvání nákazy, proto je nutné cyklovat různými třídami antibiotik nebo předepsat kombinace nepodobných léčiv.

### 4. Cystická forma

Pokud se Borrelia burgdorferi nachází v nepřítelském prostředí, jako je kultivační médium postrádající některé živiny, míšni tekutina nebo sérum s přidanými antibiotiky, může se změnit z formy spirály do cystické formy. Tato cysta může zůstat spící (dormantní), ale když je umístěna do prostředí více příznivému jejímu růstu, opět se může vrátit do spirochetální formy. Antibiotika obvykle užitá na boreliózu nezabíjí spící formu Borrelia burgdorferi. Nicméně máme laboratorní důkazy, že metronidazol a tinidazol ji mohou narušit. Proto může chronicky nakažený pacient, který má odolnou nemoc, potřebovat přidat metronidazol nebo tinidazol k režimu léčby [65]. Jako nadějná pro terapii pesistujících forem borelií se jeví použití pulsní terapie vhodnými ATB v kombinaci s preparáty zabraňujícími replikaci DNA jako je mitomycin C používanými především v protinádorové léčbě [66].

### **Dárcovství krve**

Lidé po prodělané LB mohou krev darovat nejdříve po 2 letech. Podmínkou je, že hladiny borelia-specifických imunoglobulinů třídy IgM musí být negativní. Vždy je však vhodná konzultace s odborným infektionistou [32].

## **1.5 Laboratorní diagnostika**

Diagnostika boreliózy je založena nejen na výsledcích laboratorních testů, ale především na rozlišení charakteristických klinických příznaků a znalosti anamnézy (pohyb v terénu, klišťe). Laboratorní diagnostika borelií využívá pestrou paletu metod přímého i nepřímého průkazu. Mezi rutinně využívané laboratorní testy patří testy k průkazu protilátek

především z krevního séra, ale také z likvoru a synoviální tekutiny – patří imunoenzymatické metody (EIA), nejčastěji ve formě ELISA nebo různých modifikací imunoblotu a metody nepřímé imunofluorescence (IIFA). Mezinárodní standardy doporučují pro screening soupravy se senzitivitou vyšší než 95%, což splňují většinou ELISA. Ty však mívají díky vysoké senzitivitě nižší specifčnost, a proto je doporučována v případě jejich positivity konfirmace průkazu protilátek další metodou, nejlépe imunoblotem, pomocí kterého lze rozpoznat pozitivitu proti několika boreliovým nebo s boreliemi asociovaným antigenům. Toto doporučení je jinými autory považováno za poněkud nedostatečné, neboť nepočítá s tím, že antigenní výbava diagnostických souprav od různých výrobců se může a také v praxi liší, a v takovém případě je vhodnější pro konfirmaci používat také soupravy různých výrobců. Především v Evropě je použití jediného antigenu a od jednoho druhu borelií nebo úzkého spektra antigenů v testu velmi problematické, protože hlavní původci boreliózy jsou minimálně tři. Doporučováno je také vycházet při výrobě diagnostických souprav z endemických druhů borelií v dané oblasti.

Pro diagnózu infekčních onemocnění je tzv. zlatým standardem izolace původce v čisté kultuře. Kultivace borelií vyžaduje ovšem náročné, vysoce obohacené půdy, které jsou saturovány králičím nebo koňským sérem prostých protilátek omezujících růst borelií. Kultivace je rovněž časově velmi náročná, neboť generační čas borelií může představovat i desítky hodin a také zachytnost z biologického materiálu (likvor, krevní plazma, biotické kožní vzorky atd.) je proměnlivá a nedosahuje v nejlepších případech ani 50 %.

V průběhu času byly pro diagnostiku borelií zkoušeny různé metody, např. elektronová mikroskopie, histologické barvení, bakteriologické barvení, imunohistochemický průkaz apod. Ovšem pro pozitivní průkaz je vždy nutná přítomnost dostatečného počtu bakterií ve vzorku. Jako výhodné se ukazují molekulární biologické metody, především polymerázová řetězová reakce (PCR). Tyto metody dokážou prokazovat i mrtvé nebo nekultivovatelné formy borelií. PCR byla poprvé použita k detekci cílového chromozomového genu *Borrelia burgdorferi* asociovaného s proteinem p66 (porin vnější membrány borelií Osm66) v roce 1989. Zvláště u latentních forem boreliózy však je problém získat materiál, kde by byla dostatečná akumulace borelií. V posledním období je nabízena pro diagnostiku boreliových infekcí také imunospotovací metoda Limespot [64,69]. Tato metoda pracuje s izolovanými lymfocyty, které jsou stimulovány směsí boreliových antigenů a peptidů. Takto stimulované lymfocyty produkují interferon gamma ( $IFN\gamma$ ), který je zachytáván a vyvazován v jamkách mikrotitrační destičky, v nichž probíhá kultivace a po průkazu analogickém blotovacím technikám vytváří skvrnky (spoty). Počet těchto skvrnek v reakčním poli ukazuje na intenzitu lymfocytární odpovědi na testované antigeny. Je si zapotřebí uvědomit, že LimeSpot a sérologické metody mají každý jinou výpovědní hodnotu. Zatímco LymeSpot ukazuje na připravenost imunitního systému odpovídat na boreliovou

infekci v oblasti buněčné imunity, sérologické metody vypovídají o aktuálním stavu odpovědi na probíhající nebo proběhlou infekci v oblasti humorální imunity.

Laboratorní diagnostika lymeské nemoci tak není jednoduchá a je vhodné vždy kombinovat různé diagnostické metody (např. přímý průkaz agens, respektive jeho DNA, s některou ze sérologických, popř. i buněčných metod). Naprosto nutná je úzká spolupráce různých typů laboratoří navzájem a s klinickými pracovišti, což umožní lépe diagnostikovat i tak komplikované onemocnění, jakým lymeská borelióza nepochybně je [7].

Stanovení specifických protilátek proti boreliím ve třídách IgG a IgM je nejdostupnější možností nepřímého průkazu infekce. Existuje řada úskalí v interpretaci sérologických nálezů (nedostatečná protilátková odpověď u některých pacientů, pomalý nástup tvorby protilátek v raném stádiu onemocnění, a především časté zkřížené reakce (autoimunity, CMV, lues, EBV) a s tím související přítomnost falešně pozitivních nálezů.

Jak již bylo řečeno, protilátky třídy IgM jsou detekovatelné 3 – 4 týdny po přisátí klíštěte. Za 1 – 3 měsíce jsou odbourány, mohou však přetrvávat i několik měsíců. V případě hraničního nálezu je vhodný další odběr za 3 – 6 týdnů. U pozitivního nálezu se doporučuje odběr za 2 – 3 měsíce od zahájení terapie. Protilátky třídy IgG se objevují 4 – 8 týdnů po infekci, jsou někdy poměrně brzy odbourány (za 1 rok), ale mohou přetrvávat i mnoho let, zvláště u latentních fiorem boreliózy. U borelií nemají IgG protilátky protektivní charakter.

K detekci protilátek proti *Borrelia burgdorferi* přicházejí v úvahu různé techniky: ELISA, nepřímá imunofluorescence, pasivní hemaglutinace a immunoblot. Mnozí používají k předběžnému zhodnocení vzorku séra ELISA test paralelně s nepřímou imunofluorescencí.

Podle nařízení platných v USA a v Německu musí sérologická diagnóza dodržovat princip procedury o dvou krocích: ELISA nebo nepřímá imunofluorescence jako první krok, je-li vzorek reaktivní, následuje imunoblot, zatím nejčastěji ve formě westerblotu. U čerstvých infekcí se doporučuje provést paralelně ELISA/IIFT a westernblot, protože některé slabší reakce dokáže westernblot detekovat dříve než screeningové testy. VlsE jako nejspecifičtější a nejcitlivější antigen k detekci IgG protilátek a Osp C k detekci IgM protilátek by měly být vždy v testu zahrnuty. Dodatečným stanovením protilátek proti VlsE lze zvýšit úspěšnost detekce o 20% ve srovnání s westernbloty používajícímu jako antigeny jen celobuněčné extrakty borelií a o 30% ve srovnání s westernbloty pouze s jinými rekombinantními antigeny. Ze všech testovaných rekombinantních antigenů má nejvyšší citlivost při detekci boreliové infekce. Specifičnost VlsE pro diagnostiku borelióz je dána tím, že je produkován jen spirálovitými, aktivními formami borelií [67,68].

## 1.5.1 Nepřímý průkaz infekce

### 1.5.1.1 *Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)*

ELISA patří do skupiny imunoanalytických metod, tj. metod založených na interakci antigenů a protilátek. Tyto metody dnes je ještě nelze standardizovat [71], jak bylo poprvé konstatováno pro stanovování alergen-specifických IgE [63,71]. Jedná se o metody enzymové imunoanalýzy, které využívají ve fázi detekce enzymovou reakci. Enzym navázaný na detekční protilátku (konjugát) štěpí přidaný substrát v určitém kroku reakce za vzniku barevného produktu, který se měří spektrofotometricky [25], (obr. 9).

Komponenty reakce a základní složky metody ELISA pro průkaz antigen-specifických protilátek jsou antigen, protilátka, konjugát a substrát.

#### **Antigeny**

Antigeny jsou substance, které mohou být tělu vlastní (autoantigeny) nebo, jako v infekční sérologii, nejsou tělu vlastní (exoantigeny). Mezi zdroje exoantigenů patří i mikroorganismy a jejich produkty. Imunitní systém je rozpoznává a reaguje na ně. Antigeny, které jsou schopny vyvolat imunitní odpověď včetně tvorby specifických protilátek, se nazývají imunogeny. Jako alergeny se označují exoantigeny, které u vnímavého jedince vyvolávají alergickou imunitní reakci. Nejvýznamnějšími antigeny jsou proteiny a různé komplexní polysacharidy, ale také lipidy resp. lipoproteiny. Oblast antigenu, která je rozeznávaná a proti které se tvoří protilátky, se nazývá epitop. Komplexy antigenů s protilátkami, na které se vyvazují také složky komplementového systému, se nazývají imunokomplexy.

#### **Protilátky (Imunoglobuliny)**

Jsou to vysoce polymorfní glykoproteiny produkované B-lymfocyty, respektive jejich aktivovanými formami, plazmatickými buňkami. Protilátky se skládají ze dvou těžkých (H) řetězců, které jsou kovalentně spojeny disulfidickými můstky mezi cysteinovými zbytky molekul řetězců a ke každému těžkému řetězci je disulfidickým můstkem připojen jeden lehký (L) řetězec. Každý řetězec se skládá ze 4 (5) domén, které jsou tvořeny sekvencemi 110-120 aminokyselin. Tyto domény vypadají jako soudky tvořené smyčkami polypeptidového řetězce a celá struktura je to stabilizovaná cysteinovým můstkem. Kratší úseky polypeptidového řetězce spojují jednotlivé soudky. Lehké řetězce obsahují 2 domény. N-části těžkého i lehkého řetězce jsou variabilní a liší se individuálně mezi molekulami produkovanými různými klony B-lymfocytů. Ostatní domény jsou konstantní. Variabilní domény H a L-řetězců vytvářejí společně vazebné místo pro antigen. Co se týče typů řetězců, existuje několik typů lehkých a těžkých řetězců. U člověka známe dva typy lehkých řetězců, které se značí  $\kappa$  a  $\lambda$ . Liší se primární strukturou konstantních domén a jsou kódovány odlišnými



polysacharidové ve třídě IgG2. Protilátky IgG se také dobře váží na protein A produkovaný stafylokoky, a proto se také tento protein využívá k purifikaci IgG, např. ze séra [50].

**IgA** je tvořen především na sliznicích intraepiteliálními lymfocyty. Slizniční IgA je dimer dvou molekul IgA spojených J-komponentou, která činí tento dimer stabilnějším vůči degradaci enzymatickými systémy. Poněvadž na sliznicích probíhá primární protilátková odpověď především ve třídě IgA, je také, podobně jako IgM, i IgA odpověď málo specifická. Vzhledem k způsobu infekce boreliemi, která neprobíhá přes sliznice, není stanovování IgA protilátek v sérologické diagnostice borelií přínosné a není také využíváno.

**IgE** protilátky jsou tvořeny ve zvýšené koncentraci především u atopiků a při parazitárních infekcích. Využívají se především v diagnostice alergií. Schopnost produkovat IgE protilátky předchází v ontogenezi schopnost produkovat IgM protilátky, proto se využívají také v diagnostice intrauterinních infekcí, např. toxoplasmózy.

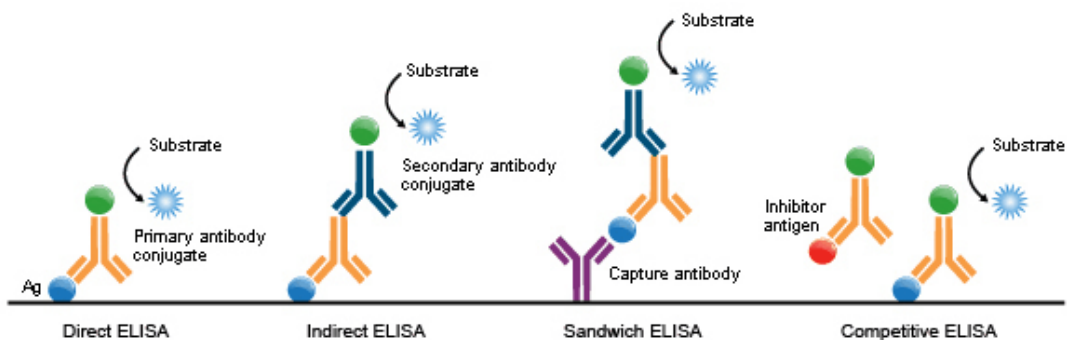
**IgD** tvoří cca 1% proteinů plasmatické membrány zralých B-lymfocytů a je většinou exprimován na zralých B-lymfocytech s IgM. V malém množství je secernován také do séra. Jeho funkční i diagnostický význam je dosud nejasný.

### **Konjugáty a substráty**

V ELISA používané k detekci a stanovení protilátek v infekční sérologii lidí představují konjugáty enzymem značené zvířecí protilátky proti jednotlivým třídám lidských imunoglobulinů. Nejčastěji využívanými zdroji protilátek v infekční sérologii bývají ovce, kozy, králíci, prasata a myši, s enzymů jsou to pak křenová peroxidáza (HRP), alkalická fosfatáza (AP) a  $\beta$ -galaktozidáza. Jako substráty jsou pro barevné reakce nejčastěji používány ABTS (2,2'-Azinobis[3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid]), OPD (o-phenylenediamine dihydrochloride), DAB ((3,3'-DiAminoBenzimidine) a TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) pro HRP, pNPP (*p*-Nitrophenyl Phosphate) pro AP a ONPG (ortho-Nitrophenyl- $\beta$ -galactoside) pro  $\beta$ -galaktozidázu. Jako fluorescenční substrát pro HRP bývá používán ADHP (10-Acetyl-3,7-Dihydroxyphenoxazine), Resazurin (známý také jako Am.plex red) aj., pro AP pak MUP (4-Methylumbelliferyl Phosphate) nebo FDP (Fluorescein DiPhosphate). Jako luminiscenční substrát pro HRP bývá využíván luminol. Nabídka substrátů pro ELISA je poměrně široká.

#### **1.5.1.2 ELISA pro stanovení protilátek v infekční sérologii**

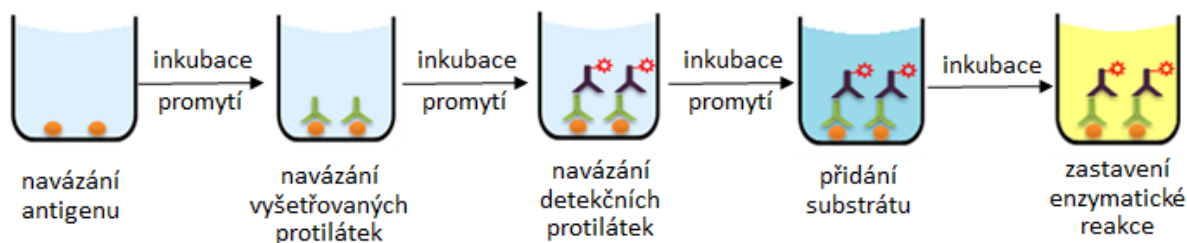
Uspořádání ELISA pro průkaz antigenů a protilátek v infekční sérologii může mít několik modifikací. Pro průkaz protilátek je nejčastěji využívána nepřímá ELISA. Je-li analyzovaná třída protilátek v analyzovaném materiálu, např. séru, obecně přítomna v mnohem menší koncentraci, než jiné třídy protilátek, v nichž rovněž probíhá protilátková odpověď na dané infekční agens, pak se většinou používá tzv. „capture- sendvičová“ varianta. Tato varianta se používá často při detekci a stanovování IgM protilátek.



Obrázek číslo 8: Schéma ELISA. Převzato z [51].

### 1.5.1.3 Nepřímá ELISA

Vzorek, který testujeme na přítomnost anti-boreliových protilátek, je přidán k antigenům vázaným na příslušném sorbenu (jamkách mikrotitrační destičky, květce, zkumavce, kuličkách apod.) a jsou-li protilátky (Ab) přítomny, specificky se na ně váží. Po inkubaci jsou promýváním nnavázané protilátky odstraněny. Navázané protilátky z vyšetřovaného vzorku jsou pak detekovány enzymaticky značenými sekundárními protilátkami a po odmytí nnavázaných sekundárních protilátek jsou pak navázané sekundární protilátky detekovány reakcí na nich navázaného enzymu s příslušným substrátem. Po zastavení enzymatické reakce je provedeno její změření a vyhodnocení pomocí příslušné techniky. Obecné schéma této metody je znázorněno na obrázku 9. Výhodou této nepřímé metody detekce protilátek je, že není nutno vzorek před analýzu nijak upravovat. Stupeň čistoty použitého antigenu v této metodě je závislý na požadavku na specifičnost sledovaných protilátek. Jako u většiny imunotestů je však vhodnější pracovat s purifikovanými nebo alespoň částečně purifikovanými antigeny. Podmínkou spolehlivosti je, že sekundární Ab neváže imobilizovaný Ag ani nepřilne na stěny mikrotitrační destičky.



Obrázek číslo 9 : Schéma nepřímé ELISA: Nejprve dochází v první jamce k navázání antigenu na pevnou fázi (provedeno většinou výrobcem diagnostických souprav). V následném kroku se specifická protilátka, je-li přítomna v analyzovaném vzorku, váže na antigen. Poté se ke směsi přidá sekundární protilátka značená enzymem. Ta v reakci s přidáním substrátem vyvolává vznik tmavě modrého produktu (při použití TMB), který je okyselením změněn na žlutý produkt. Mezi každým krokem je jamka intenzivně promyta.

ELISA testy jsou základní vyšetřovací metodou k průkazu protilátek IgG a IgM u boreliózy. Dle stanovení pravidel doporučených Centrem pro kontrolu a prevenci nemocí (CDC), byl zaveden dvoufázový sérologický protokol, který zahrnuje vysoce senzitivní ELISA testy následované metodou westernblot s vysokou specifíčností pro potvrzení nálezů u vzorků s pozitivními a hraničními koncentracemi protilátek IgG a IgM [52].

Pro průkaz a stanovení protilátek proti boreliím je dnes již na trhu k dispozici řada komerčních souprav ELISA (firmy Test-Line, DadeBehring, Euroimmun, Abbot, VirImmuno a další) [53]. Využívá se na průkaz borelia specifických protilátek třídy IgM, IgG [32]. Jako cílové antigeny soupravy využívají jak různě upravené lyzáty borelií, tak borelia-specifické antigeny, jako jsou OspA 31-32,5 kDa, OspB 34 kDa, OspC 22, 23 a 25 kDa, p39, proteiny o m.h. 41 kDa, 66 kDa, proteiny periplasmatického prostoru (MEP) 83-93 kDa a k několika dalším [48].

#### **1.5.1.4 Imunoblot (westernblot)**

K detekci specifických proteinů a charakterizaci protilátkové odpovědi proti řadě antigenů mikrobiálního původu se využívají široce imunoblotovací metody. Klasické westernblotové metody (WB) používají jako antigenní substrát elektroforeticky rozdělené antigenní extrakty nablívané na vhodné membrány. Stále častěji jsou ale využívány blotovací metody, které používají jednotlivé purifikované nebo rekombinantní antigeny nanášené na sorbent ve formě čárek (line-blot) nebo teček (dot-blot). Tyto metody mají oproti WB výhodu v tom, že je odfiltrována řada nespecifických antigenů, které pak působí komplikace při vyhodnocování WB technik.

Oproti metodě ELISA jsou imunoblotovací metody časově náročnější a dražší, ale z hlediska diagnostiky infekce poskytují výrazně specifičtější výsledky. Poněvadž jsou jimi v jednom vzorku a na jedné ploše detekovány nebo stanovovány protilátky proti několika antigenům, řadí se tyto metody mezi tzv. multiplexové metody, které jsou, srovnáme-li cenu detekce nebo stanovení protilátkové specifity proti jednotlivým antigenům s jednoanalytovými ELISA, naopak levnější a méně pracné než ELISA a spotřebují také méně analyzovaného vzorku. Jejich provedení je podobné jako u ELISA, liší se jen substráty, které kromě toho, že po enzymatické reakci změní barvu, se stávají nerozpustnými a zůstávají v příslušných pozicích blotovací membrány.

Jak již bylo řečeno, WB metoda je kombinací immunoanalytického průkazu specifické protilátky proti jednotlivým antigenům, a elektroforézy, díky níž jsou antigeny rozděleny podle své molekulové hmotnosti a přeneseny na vhodnou matici.

Antigenní preparát se nejdříve zahřívá s dodecylsulfátem sodným (SDS), který rozštěpí komplexní proteiny na jednotlivé frakce. Následně se pomocí elektroforézy v polyakrylamidovém gelu tyto frakce rozdělí podle svých molekulových hmotností a v gelu

tak vzniknou neviditelné pruhy polypeptidů. Tento proces bývá označován jako SDS-PAGE. V další fázi jsou frakce elektroforeticky přeneseny na vhodnou membránu, kterou je nejčastěji nitrocelulóza. Membrána je nastříhána na úzké pásy a nachystána k vlastní reakci. Ta spočívá v inkubaci jednotlivých proužků s naředěným sérem pacienta. Pokud obsahuje sérum hledané protilátky, během inkubace se naváží na specifickou antigenní frakci, opět zde dochází k vytvoření imunokomplexu, který je nutno vizualizovat. V dalších krocích jsou tedy zbytky nenavázaných protilátek odstraněny promytím a do reakce přichází anti-lidský imunoglobulin značený enzymem, který se během další inkubace váže na imunokomplex a po promytí a přidání substrátu dojde v místě vazby protilátky s antigenem k vytvoření barevného proužku. Hodnocení výsledků probíhá buď pomocí softwaru, nebo vizuálním vyhodnocením specifických linií [54].

Imunoblotovací metody se v diagnostice boreliózy využívají hlavně k potvrzení přítomnosti protilátek IgG a IgM u vzorků pozitivních v ELISA testech. Jsou schopny vyloučit řadu falešně pozitivních výsledků způsobených zkříženou reaktivitou, neboť ELISA testy, které se používají jako screeningové a mají vysokou senzitivitu, nevykazují takovou specifitu a protilátky mohou reagovat i s antigeny jiných mikroorganismů. Protilátky třídy IgM proti některým boreliovým antigenům, zejména OspC, které se objevují v časných fázích infekce, mají obecně nižší specifitu než IgG protilátky objevující se v pozdějších fázích infekce.

Za pozitivní IgM WB je obvykle brána reaktivita s nejméně dvěma z následujících antigenů - 21-25 kD (OspC), 39 kD (spec. periplazmatický antigen), 41 kD (flagelin). Za nejdůležitější IgG reaktivitu je brán antigen VlsE a dále je pozitivní IgG WB reaktivita s nejméně pěti z následujících antigenů - 17 kD, 18 kD (OspF), 21-24 kD (OspC), 28 kD, 31 kD (OspA), 35 kD (OspB), 39 kD (spec. periplazmatický antigen), 41 kD (flagelin) a 93 kD [55].

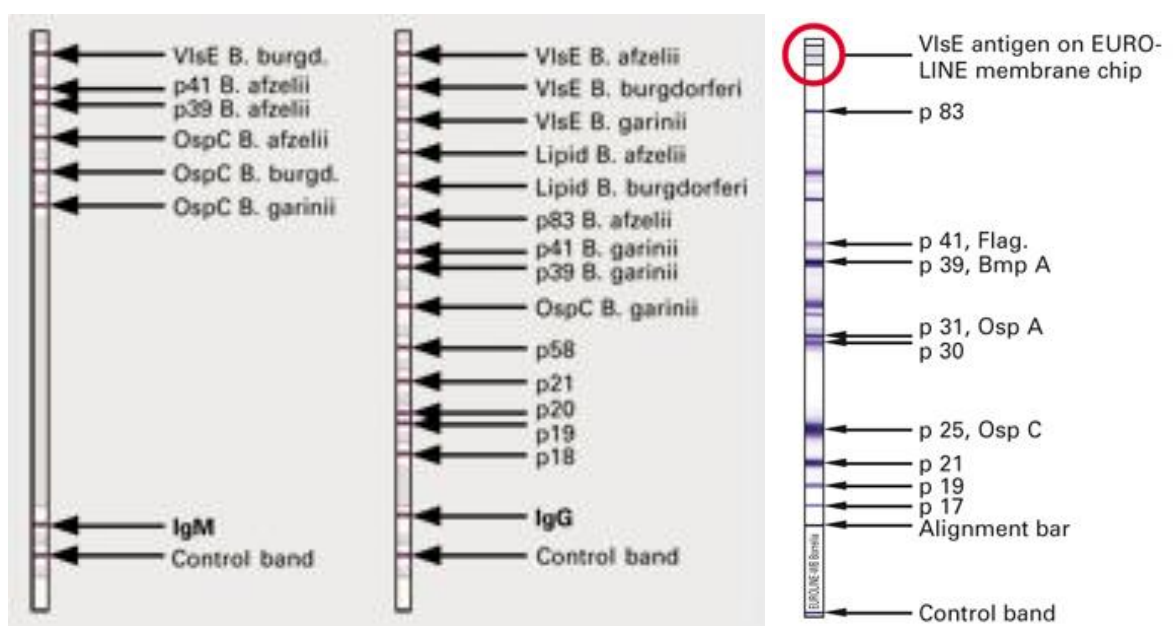
Imunoblotová technika umožňuje mimo jiné stanovit u komplexnějších agens bakteriálního typu i reaktivitu s konkrétními genospecies nebo odlišit reaktivity namířené proti skupinovým antigenům společným jak pro patogenní, tak i pro nepatogenní bakterie. Jde např. o některé stresové proteiny odpovědné za zkřížené reakce [57]. Imunoblotovou techniku lze použít i ke stanovení autoprotiátek, např. protilátek proti extrahovaným nukleárním antigenům (ENA) [56].

Imunoblotové techniky jsou tedy snadno proveditelné, velmi citlivé a specifické se schopností detekovat protilátkovou odpověď i proti rozdílným peptidům ve složitých antigenních směsích [57]. Další výhodou spočívá v možnosti stanovení několika různých protilátek v jednom vzorku najednou. Citlivost těchto testů je dnes vysoká a umožňuje stanovit i množství 1-5 ng látky ve vzorku. Podle použitých antigenů lze zvýšit i specifitu testů [56]. Imunoblotové techniky existují v mnoha variantách a jsou standardně používány v diagnostické i experimentální praxi [58].

### Imunoblot s rekombinantními antigeny

Imunoblot soupravy s rekombinantními antigeny pro diagnostiku Lymeské boreliózy používají široké spektrum antigenů, charakteristických pro borelie. U *Borrelia burgdorferi* sensu lato jsou to konkrétně antigeny typické pro druhy *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii* a *Borrelia burgdorferi sensu stricto*. Rekombinantní antigeny jsou uměle připravované in vitro na základě znalosti aminokyselinové sekvence. Výhody této metody jsou v jednoduché interpretaci, reprodukovatelnosti výsledků a vysoké účinnosti [59].

Imunoblotové systémy s výlučně rekombinantními antigeny jsou snáze vyhodnotitelné a vedly tak na některých laboratořích k opuštění westernblotů využívajících celkové antigeny. Avšak westernbloty s pouze rekombinantními antigeny vykazují někdy až o 23 % nižší citlivost, zvláště u čerstvých infekcí. Nejsou proto pro spolehlivou diagnostiku boreliózy některými autory doporučeny. Jednotlivé rekombinantní antigeny však mohou doplňovat westernblot s celkovými antigeny [60].



Obrázek číslo 10: IgM a IgG imunoblot s rekombinantními antigeny a westernblot doplněný o rekombinantní VlsE pro diagnostiku borelióz. Převzato z katalogu firmy Euroimmun.

### 1.5.2 Přímý průkaz infekce

Mezi tyto metody patří kultivace, elektronová mikroskopie, hybridizace, přímá imunofluorescence (DFA) a průkaz boreliové DNA pomocí PCR [38].

## Kultivace

Kultivace borelií je velmi náročná. Musí se použít vysoce obohacená půda s přidávkou zvířecích sér. Dnes jsou již komerčně dostupné různé druhy půd jako BSK-H, BSK II, Sigma [32]. Pro izolaci v pozdní fázi infekce se využívají půdy (EMEM, MPM), které slouží k záchytu cyst či granul borelií, které se vyskytují v krvi nebo mozkomíšním moku [48]. Dalším materiálem, ze kterého můžeme borelie kultivovat, jsou vzorky z biopsie kožních lézí, krve, synoviální tekutiny, mozkomíšního moku, ale i ze srdeční tkáně anebo duhovky [61]. Odběr biologického materiálu i jeho zpracování, musí být za velmi přísných podmínek [48]. Materiál inkubujeme minimálně 72 hodin, při 30-34°C při mikroaerofilních podmínkách. Nárůst bakterií na půdě je prokazován mikroskopicky, PCR nebo sérologicky.

Ke kultivaci přistupujeme také tehdy, ověřujeme-li již onemocnění diagnostikované nepřímými metodami [61].

Jelikož má kultivace velmi malou senzitivitu, dlouhou dobu stanovení (až 6 týdnů) je tato metoda dnes prakticky využívána jen na výzkumné účely [19].

## Imunofluorescence a elektronová mikroskopie

Ani tyto dvě metody nejsou dnes širěji v diagnostice boreliózy širěji využívány.

U mikroskopie lze vidět tvar spirochét – velikost, počet bičíků, povrchovou membránu, ale můžeme zpozorovat i cystické formy [32]. Klasická mikroskopie pro histologický průkaz je využívána výjimečně. U vzorků se využívá barvení Giemsou, toluidinovou modří nebo se používá stříbření s 1% dusičnanem sodným [48]. K barvení a následné mikroskopii se využívá roztěrů či tkáňových řezů [55].

Metoda přímé fluorescence (DFA) se vzhledem k malé citlivosti v diagnostice LB prakticky nepoužívá [62].

## Hybridizace, PCR

Hybridizace je založena na klonované DNA. Klonovaná DNA je značená radiaktivním izotopem a váže se na známý pro borelie specifický úsek DNA [32]. Často ale dochází k nejasné reakci nehledě na poměrně malém množství boreliové DNA přítomné v nativním vzorku. Proto se využívá před vlastním průkazem specifických úseků DNA namnožení detekovaných úseků boreliové DNA v analyzovaných vzorcích metodou PCR (polymerázová řetězová reakce) [3].

Metoda PCR vznikla v Cetus Corporation v Emeryville v Kalifornii. Metoda spočívá v namnožení genetického materiálu vybraného úseku DNA pomocí polymerázy, o třech teplotních fázích [56].

Polymerázová řetězová reakce je dnes velmi vyžadovaná metoda k rychlému průkazu a stanovení infekčních agens včetně průkazu boreliové DNA [32]. Tato technika má několik nevýhod a to, že je většinou velmi obtížné získat materiál, v němž se nachází alespoň nějaké

borelie, že v preanalytické fázi může dojít lehce ke kontaminaci vzorků a že vyšetření má i dnes poměrně vysokou cenu. Pozitivní na této metodě je její rychlost [61]. Velmi vhodný je odběr a vyšetření ze synoviální tekutiny a kožních lézí, kde citlivost testu dosahuje až 90% [7]. PCR lze využít i na vyšetření z plodové vody [32], z mozkomíšního moku i z krve, ale záchytnost metody u posledních dvou materiálů nízká [61].

Pomocí PCR lze dnes nejen příslušné skvence DNA charakteristické pro dané organismy detekovat, ale i pohodlně stanovovat jejich množství. Metoda, která to dovoluje a nejčastěji se používá, je PCR v reálném čase (RT PCR). Jedním z přístrojů, na němž se může tato metoda realizovat je LightCycler vyráběný firmou Roche. Umožňuje realizovat vyšetření ve velmi krátkém čase cca 30-40 minut, výhodou je i vysoká senzitivita, možnost opakovaných reakcí v jedné kapiláře, vícebarevná optická detekce a další. Samozřejmě, že se musí dát pozor, aby vzorek byl velmi čistý, a musí ho být dostatečné množství, aby z něj byla reálná možnost izolovat alespoň nějaké kopie nukleových kyselin organismu, jež chceme detekovat a stanovovat jeho množství. Na množství vzorku tak závisí také senzitivita metody [11].

## **1.6 Cíl práce**

Cílem mé diplomové práce bylo srovnání výsledků sérologických metod pro diagnostiku borelióz prováděných rutinně v laboratořích Spadia (ELISA, imunobloty) v kontextu s doporučeními, kdy a jak je indikovat a interpretovat jejich výsledky.

## 2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Podrobné postupy metod použitých pro získání analyzovaných dat v této práci (standardní operační postupy – SOP) jsou uvedeny v následujících přílohách:

### 2.1 Stanovení protilátek proti boreliím metodou ELISA na analyzátoru EVOLIS

Viz. Příloha 1

### 2.2 Stanovení protilátek proti boreliím ve třídách IgG, IgM chemiluminiscenční imunoanalýzou na analyzátoru LIAISON® XL

Viz. Příloha 2

### 2.3 Stanovení protilátek proti boreliím ve třídách IgG, IgM metodou westernblot a lineblot

Viz. Příloha 3

### 2.4 Diagnostika Borélií v Laboratořích Spadia Lab., a. s.

V této diplomové práci je provedena analýza výsledků získaných při rutinním vyšetřování protilátek proti boreliím v laboratořích Spadia Lab v období od 1. 1. 2014 do 31. 12. 2015. Podle doporučení CDC (Doporučení Centra pro monitorování chorob) byl u všech vzorků prováděn screening protilátek proti boreliím pomocí ELISA ve třídě IgM a IgG a pozitivní vzorky následně potvrzeny pomocí WB popř. lineblotu, pokud si to indikující lékař nepřál jinak.

V roce 2014 byl ELISA screening prováděn pomocí souprav firmy Euroimmun, která používala jako cílový antigen pro detekci a stanovení IgG protilátek směs celých antigenových extraktů *B.burgdorferi sensu stricto*, *B.afzelii* a *B.garinii* a rekombinantní VlsE *B.burgdorferi*. Pro detekci a stanovení IgM protilátek byla jako cílový antigen použita rovněž směs celých antigenových extraktů *B.burgdorferi sensu stricto*, *B.afzelii* a *B.garinii*, ale bez rekombinantního VlsE *B.burgdorferi*. K provedení testu byl používán procesor vzorků Evolis. Jednalo se o klasickou ELISA na mikrotitračních destičkách (SOP Stanovení protilátek proti boreliím metodou ELISA na analyzátoru EVOLIS, viz příloha 1).

Od 1. 12. 2015 pak byl screening prováděn pomocí souprav firmy DiaSorin na analyzátoru Liaison (metoda CLIA, SOP Stanovení protilátek proti boreliím ve třídách

IgG, IgM chemiluminiscenční imunoanalýzou, příloha 2), kde jako cílové antigeny pro stanovení protilátek ve třídě IgM byly použity OspC (Outer surface protein C) a pro stanovení protilátek ve třídě IgG VlsE (Variable protein-like sequence, Expressed). Výsledky vyšetření ve třídě IgM jsou hodnoceny v indexech pozitivity (IP), kde vzorky s výsledky  $IP < 0,9$  jsou považovány za negativní a vzorky s výsledky s  $IP > 1,1$  za pozitivní. Hodnoty  $IP 0,9 - 1,1$  jsou hodnoceny jako hraniční. Výsledky vyšetření protilátek ve třídě IgG jsou udávány v AU/mL a jako negativní jsou hodnoceny vzorky s hodnotami  $< 10$  AU/mL, jako hraniční s hodnotami  $10 - 15$  AU/mL a jako pozitivní s hodnotami  $> 15$  AU/mL.

Pro potvrzení a typizaci sérologické odpovědi jsou v laboratořích Spadia v současné době používány jak WB obohacené o rekombinantní VlsE, tak IB s rekombinantními antigeny firmy Euroimmun. WB souprav firmy Euroimmun obsahuje jako cílovou antigenní strukturu pro stanovení IgG protilátek lyzát *B.afzelii* doplněný o VlsE z *B.burgdorferii*, pro stanovení IgM protilátek bez VlsE z *B.burgdorferii*. IB obsahují pro vyšetření IgG protilátek vysoce purifikované rekombinantní VlsE antigeny jak z *Borrelia afzelii* (Ba), tak z *Borrelia burgdorferii* (Bb) a *Borrelia garinii* (Bg), lipidy extrahované z Ba a Bb, proti nimž se vyskytují často protilátky v pozdních fázích infekce, vysoce purifikované rekombinantní antigeny bičičků p41 a p39 (flageliny), vysoce specifický dimer OspC (p25) získaný z různých boreliových kmenů a vysoce purifikované rekombinantní borelia-specifické antigeny z Bb p58, p21, p20, p19 a p18 (obr. 10). Jasná pozitivita vůči kterémukoliv z VlsE antigenů potvrzuje boreliovou infekci. V časných fázích infekce však může být anti-VlsE odpověď slabá nebo může dokonce chybět. Pak pomáhají v interpretaci nálezy pozitivit proti ostatním aplikovaným antigenům. IB pro diagnostiku IgM protilátek (časná fáze infekce) obsahují OspC Ba, OspC Bb, OspC Bg, p39 Ba, p41 Ba a VlsE Bb. Pozitivita proti kterémukoliv OspC antigenu potvrzuje časnou fázi boreliové infekce. Poněvadž však, i když velmi zřídka, tato anti-OspC reaktivita může v časných fázích boreliové infekce chybět nebo být nezřetelná, pomáhají v interpretaci nalezené výsledky pozitivit proti dalším použitým antigenům.

Stripy WB i IB jsou po ukončení reakce se substrátem a promytí skenovány a vyhodnocovány automaticky pomocí software dodávaným k soupravám. Po přechodu na screening pomocí ze souprav firmy Euroimmun na soupravy firmy DiaSorin při neshodě výsledků ELISA screeningu a konfirmace WB jsou použity také pro třídu IgG line-blotové soupravy firmy Euroimmun, které používají jako cílové antigeny pro stanovení protilátek definované rekombinantní antigeny (Standardní operační postup - Stanovení protilátek proti boreliím ve třídách IgG, IgM metodou WesternBlot, viz příloha 3).

#### 2.4.1 Pravidla pro vyhodnocování výsledků:

#### 2.4.2 Stanovení protilátek proti boreliím metodou ELISA na analyzátoru EVOLIS

Interpretace anti-borelia IgM a IgG:

IP < 0,8 negativní                      IP 0,8-1,1 hraniční                      IP > 1,1 pozitivní

#### 2.4.3 Stanovení protilátek proti boreliím ve třídách IgG, IgM chemiluminiscenční imunoanalýzou (CLIA) na analyzátoru Liaison

Interpretace anti-borelia IgM:

IP < 0,9 negativní                      IP 0,9-1,1 hraniční                      IP > 1,1 pozitivní

Interpretace anti-borelia IgG:

< 10 AU/mL negativní                      10 – 15 AU/mL hraniční                      > 15 AU/mL pozitivní

#### 2.4.4 Stanovení protilátek proti boreliím ve třídách IgM metodou WB

Rychlé vyhodnocení: antigenní pásek OspC pozitivní → IgM protilátky pozitivní

Jestliže anti-OspC neposkytuje jasný výsledek, provede se podrobnější vyhodnocení na základě positivity dalších pásků podle tabulky 1.

Tabulka 1: Hodnocení IgM positivity WB a imunoblotu na základě positivity celého souboru použitých antigenů.

anti-OspC pásek	spec. Ag pásky celého extraktu: p83, p39, p31, p30, p21, p19, p17	
	1 pásek pozitivní	žádný pásek pozitivní
pozitivní	pozitivní	pozitivní
slabý	pozitivní	hraniční
negativní	pozitivní	negativní

IgM protilátky proti specifickým boreliovým antigenům jiným než OspC nepotvrzují definitivně čerstvou boreliovou infekci. Při serologickém sledování boreliové infekce poskytuje stanovení protilátek ve třídě IgM často nejasné výsledky. IgM protilátky mohou být nalezeny roky po infekci nebo antibiotické léčbě. Proto zjištění IgM protilátek nemusí nezbytně indikovat čerstvou infekci. Negativní IgM protilátky nevylučují čerstvou infekci. Při reinfekci se vytvářejí jen protilátky IgG a nikoliv IgM. V pozdějším stádiu boreliózy pozitivní výsledek IgM neposkytuje doplňkovou informaci vzhledem k perzistenci protilátek. Výskyt takových falešně pozitivních IgM protilátek však zůstava nejasný. Jsou pozorovány např. u mononukleózy, herpetické infekce a různých autoimunitních infekcí.

Charakteristiku antigenů v blotech přináší tabulka 2.

*Tabulka 2: Charakteristika antigenů na testovacích stripech (IgM).*

Pásek	Antigen	Specifičnost
83 kDa	Membránový-vesikální protein, p 83	Rozklad produktu p 100, vysoká specifičnost
75 kDa	Protein teplotního šoku, p 75	Nespecifický
62 kDa	Protein teplotního šoku, p 62	Nespecifický
60 kDa	Protein teplotního šoku, p 60	Nespecifický
50 kDa	p 50	Nespecifický
43 kDa	p 43	Nespecifický
41 kDa	Flagellin, p 41	Rodově specifický, zkřížená reaktivita s jinými spirochaetaceae a bičíkatými bakteriemi.
39 kDa	Bmp A, p 41	Vysoká specifičnost
35 kDa	p 35	Nejasná specifičnost
31 kDa	Osp A, p 31	Vnější povrchový protein A, vysoká specifičnost
30 kDa	p 30	Specifický
28 kDa	p 28	Nespecifický
25 kDa	Osp C, p 25	Vnější povrchový protein C, vysoká specifičnost
21 kDa	p 21	Specifický
19 kDa	p 19	Specifický
17 kDa	p 17	Specifický
16 kDa	p 16	Nejasná specifičnost

#### 2.4.5 Stanovení protilátek proti boreliím ve třídách IgG metodou WB

Ryhlé vyhodnocení: Antigenový pásek VlsE pozitivní → IgG protilátky pozitivní.

IgG protilátky proti VlsE mohou být negativní v časně fázi boreliové infekce a občas i pozdější fázi. Proto je vhodné hodnocení v případě ELISA pozitivních a anti-VlsE negativních výsledků ve WB provést podrobnější hodnocení podle tabulky 3. Charakteristiku jednotlivých antigenů ve WB přináší tab. 4.

Tabulka 3: Srovnávací vyhodnocení IgG protilátek.

anti-VlsE pásek	spec. Ag pásy celého extraktu: p83, p39, p31, OspC (p25), p30, p21, p19, p17		
	≥2 pásy pozitivní	1 pásek pozitivní	žádný pásek pozitivní
pozitivní	pozitivní	pozitivní	pozitivní
slabý	pozitivní	pozitivní	negativní
negativní	pozitivní	negativní	negativní

Tabulka 4: Specifičnost antigenů na testovacích stripech pro IgG WB [52].

Pásek	Antigen	Specifičnost
VlsE	Sekvence podobná sekvenci hlavního variabilního proteinu, exprimovaná	Specifický
83 kDa	Membránový-vesikulární protein, p 83	Degeadační produkt p 100, specifický
41 kDa	Flagellin, p 41	Rodově specifický, křížová reaktivita s dalšími spirochétami a bakteriemi mající bičík
39 kDa	BmpA, p39	Specifický
31 kDa	OspA, p 31	Protein vnějšího povrchu A, specifický
30 kDa	p 30	Specifický
25 kDa	OspC, p 25	Protein vnějšího povrchu C, specifický, znak čerstvé infekce
21 kDa	p 21	Specifický
19 kDa	p 19	Specifický
17 kDa	p 17	Specifický

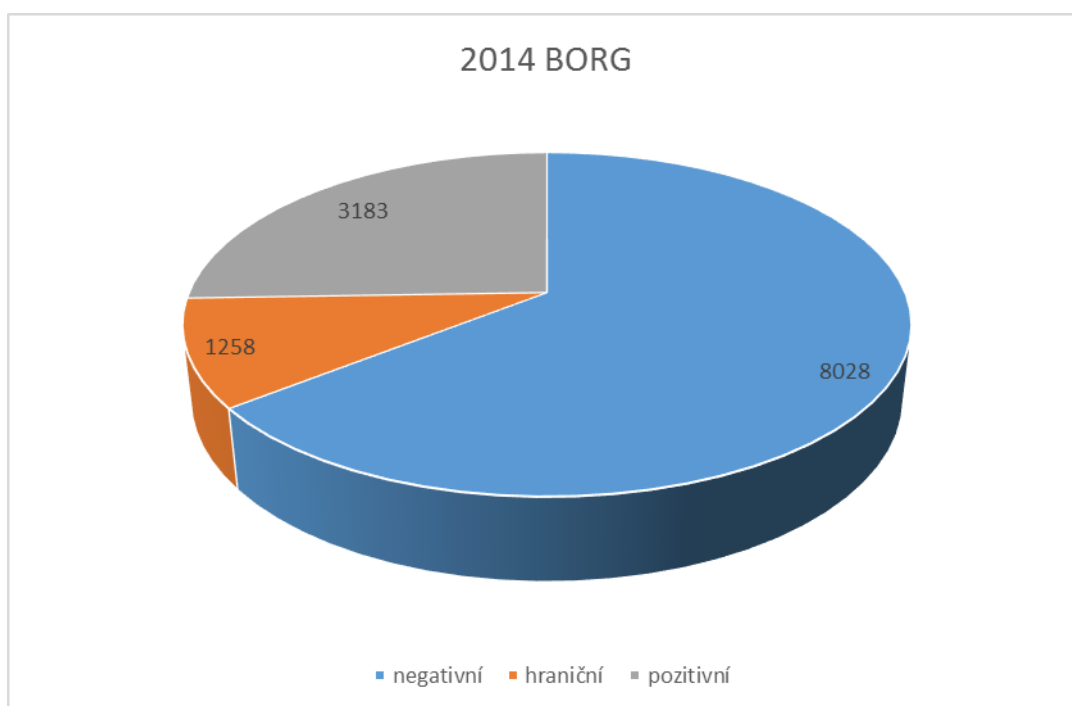
Statistické a grafické vyhodnocení výsledků bylo prováděno pomocí nástrojů tabulkového procesoru Excel.

### 3 VÝSLEDKY

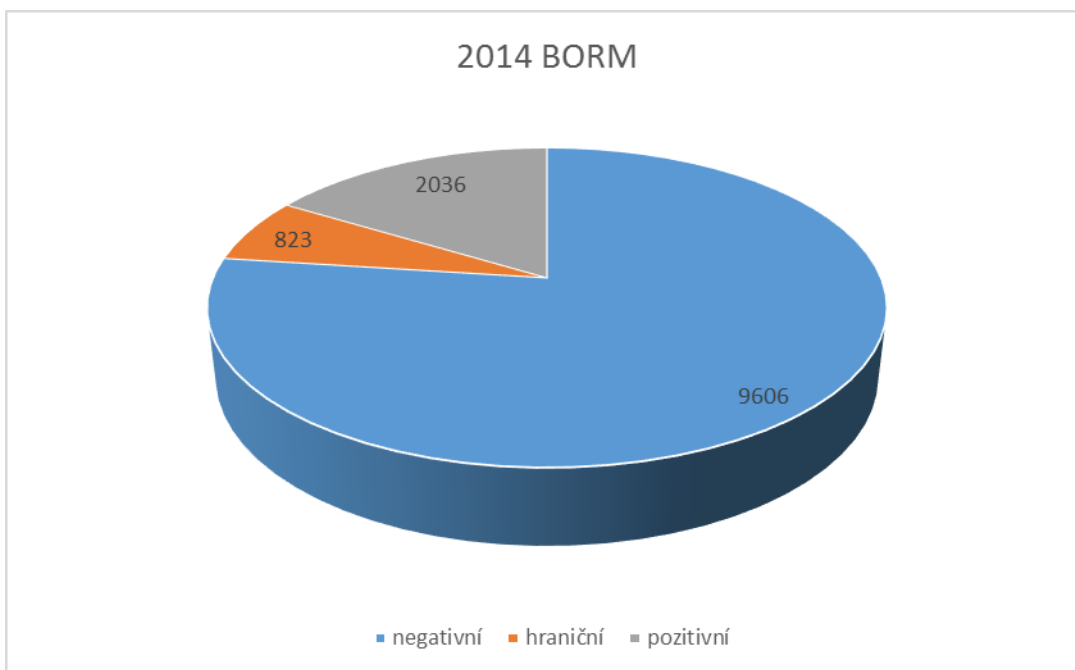
Přehled vzorků a výsledků jejich stanovení je uveden v tabulce 5.

*Tabulka 5: Rozdělení pozitivních, hraničních a negativních výsledků měřených metodou ELISA i WB v roce 2014, 2015.*

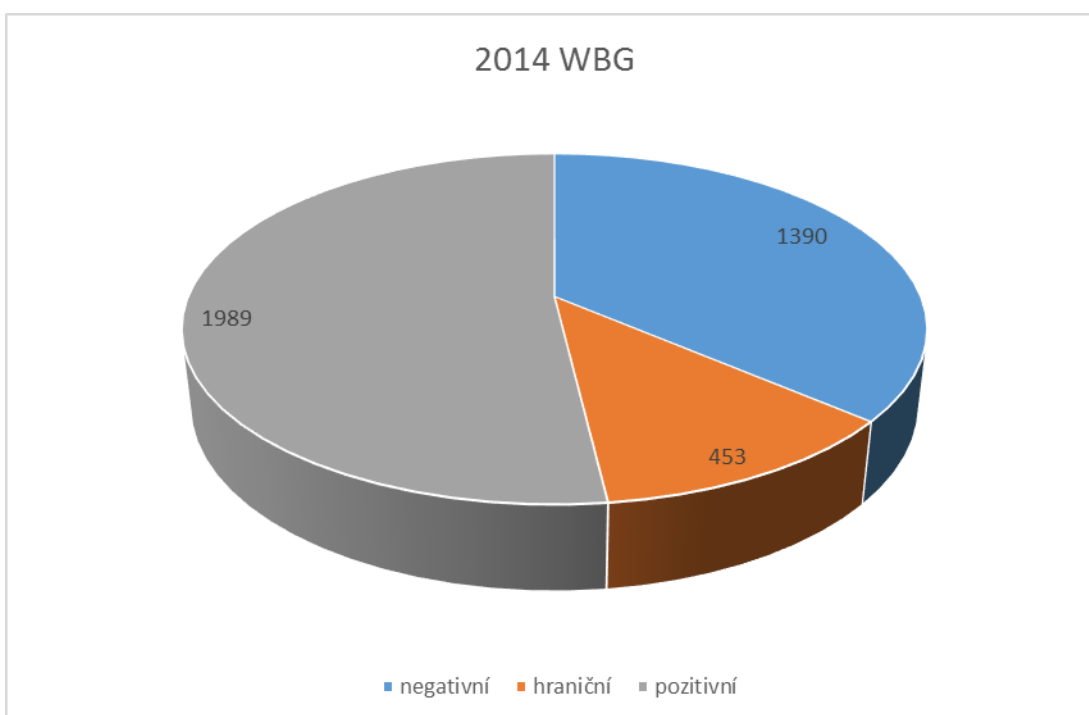
	2014				2015			
	<b>BORG</b>	<b>BORM</b>	<b>WBG</b>	<b>WBM</b>	<b>BORG</b>	<b>BORM</b>	<b>WBG</b>	<b>WBM</b>
<b>počet</b>	12469	12465	3832	3129	12137	12202	1125	937
<b>negativní</b>	8028	9606	1390	1067	11466	10153	191	351
<b>hraniční</b>	1258	823	453	975	214	578	1	291
<b>pozitivní</b>	3183	2036	1989	1087	457	1471	933	295
<b>% negat</b>	64,4	77,1	36,3	34,1	94,5	83,2	17,0	37,5
<b>% hranič</b>	10,1	6,6	11,8	31,2	1,8	4,7	0,1	31,1
<b>% pozit</b>	25,5	16,3	51,9	34,7	3,8	12,1	82,9	31,5



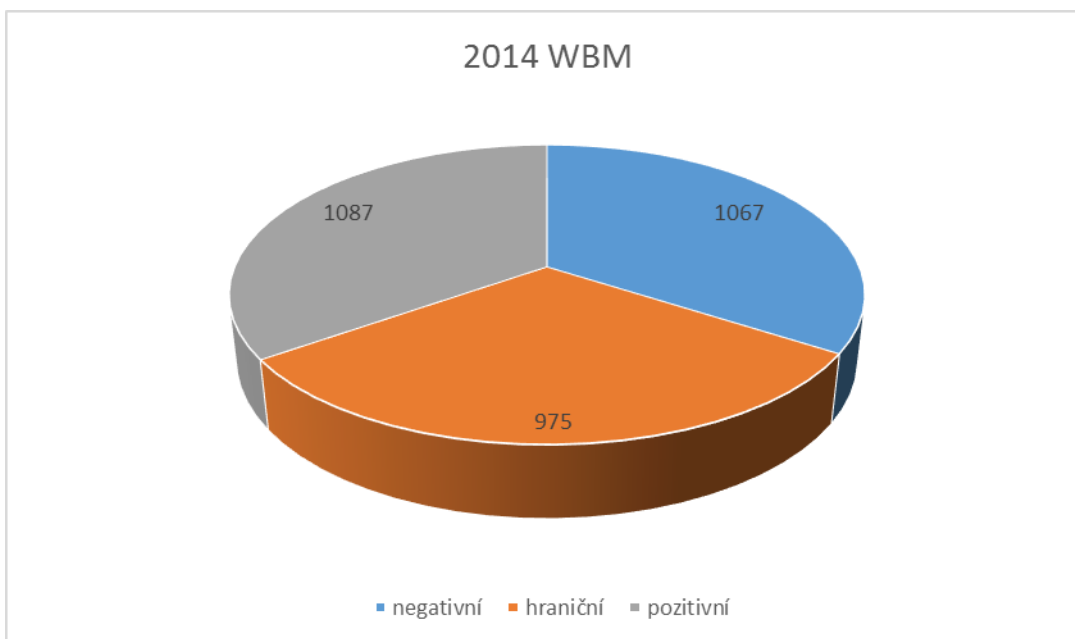
*Obrázek 11: Rozdělení negativních, hraničních a pozitivních výsledků ve třídě IgG měřené metodou ELISA v roce 2014.*



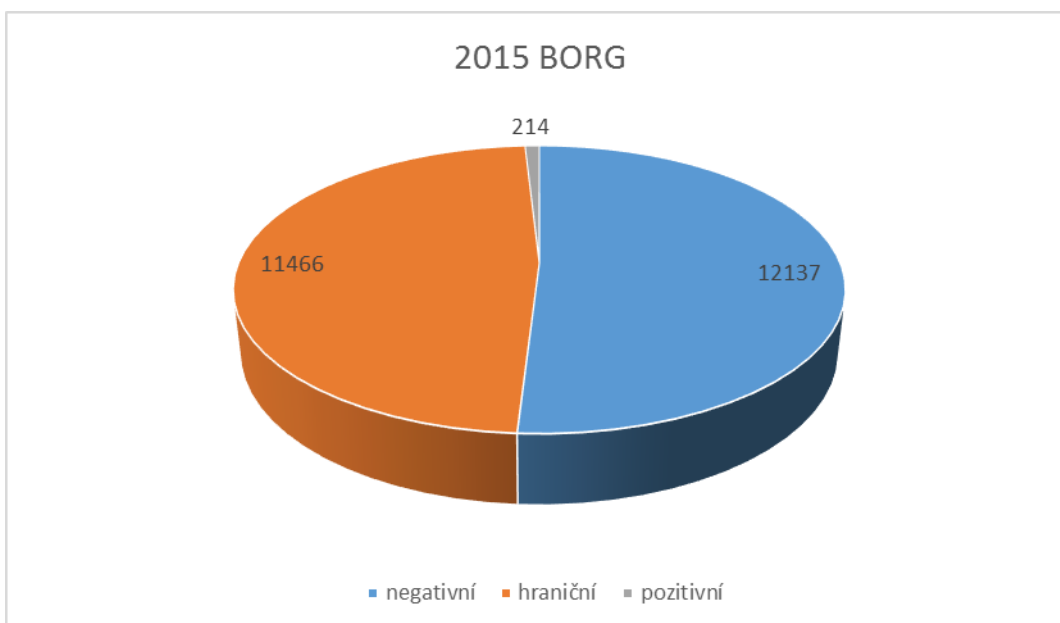
*Obrázek 12: Rozdělení negativních, hraničních a pozitivních výsledků ve třídě IgM měřené metodou ELISA v roce 2014.*



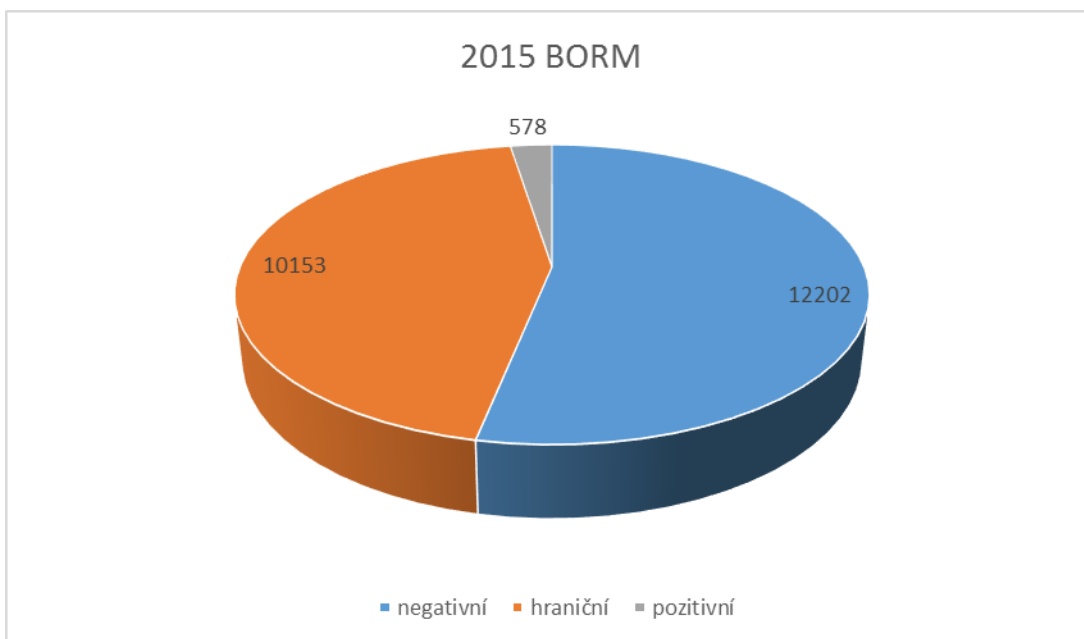
*Obrázek 13: Rozdělení negativních, hraničních a pozitivních výsledků ve třídě IgG měřené metodou westernblot v roce 2014.*



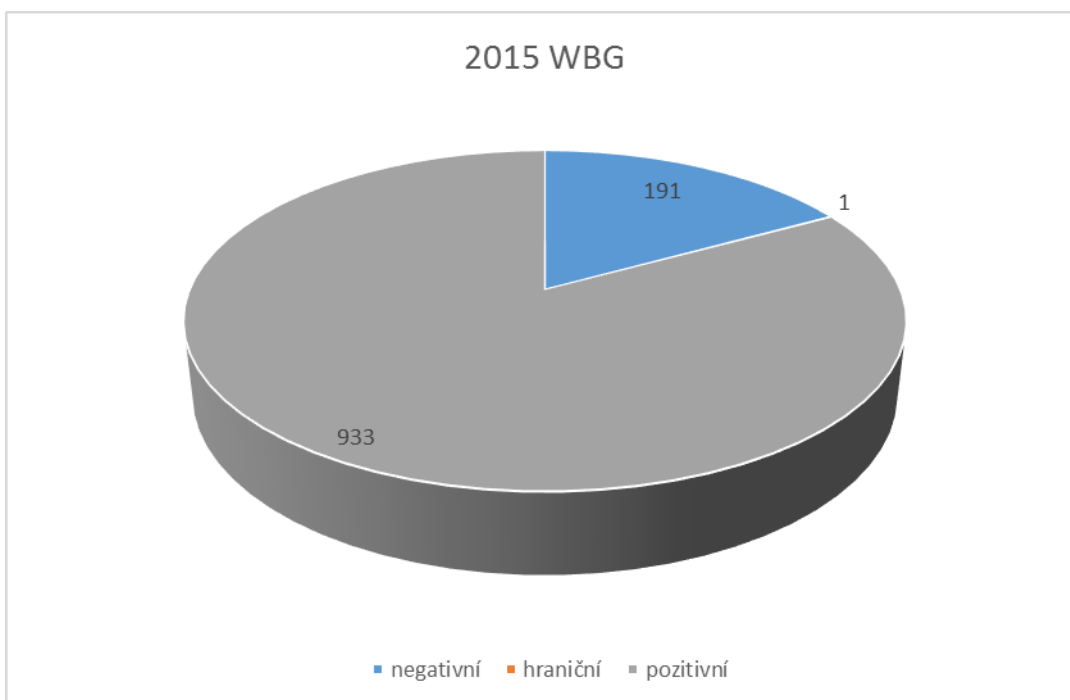
Obrázek 14: Rozdělení negativních, hraničních a pozitivních výsledků ve třídě IgM měřené metodou westernblot v roce 2014.



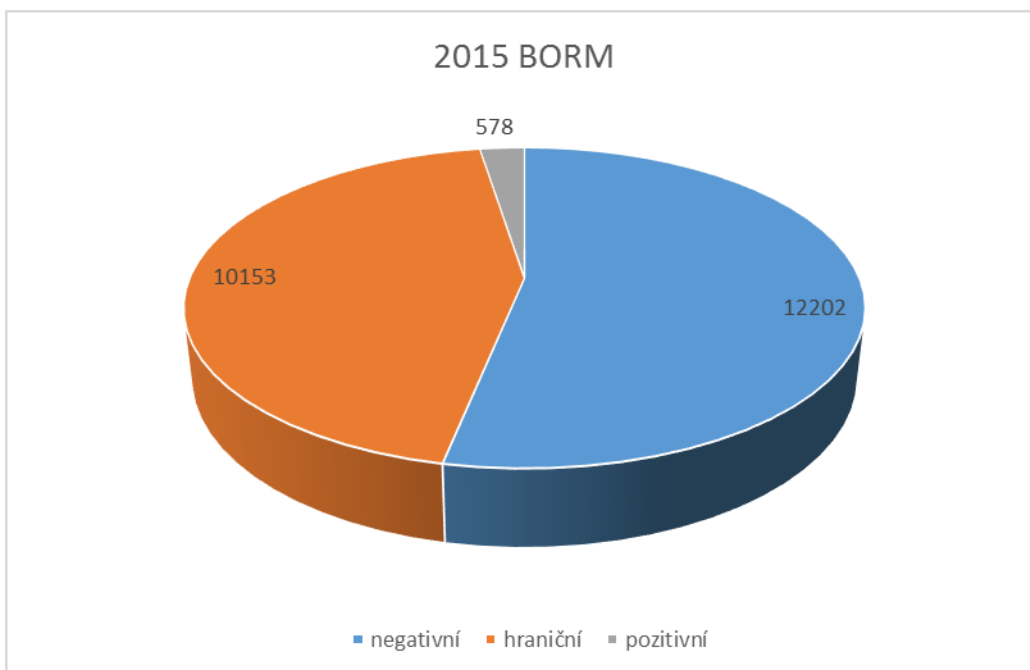
Obrázek 15: Rozdělení negativních, hraničních a pozitivních výsledků ve třídě IgG měřené metodou ELISA v roce 2015.



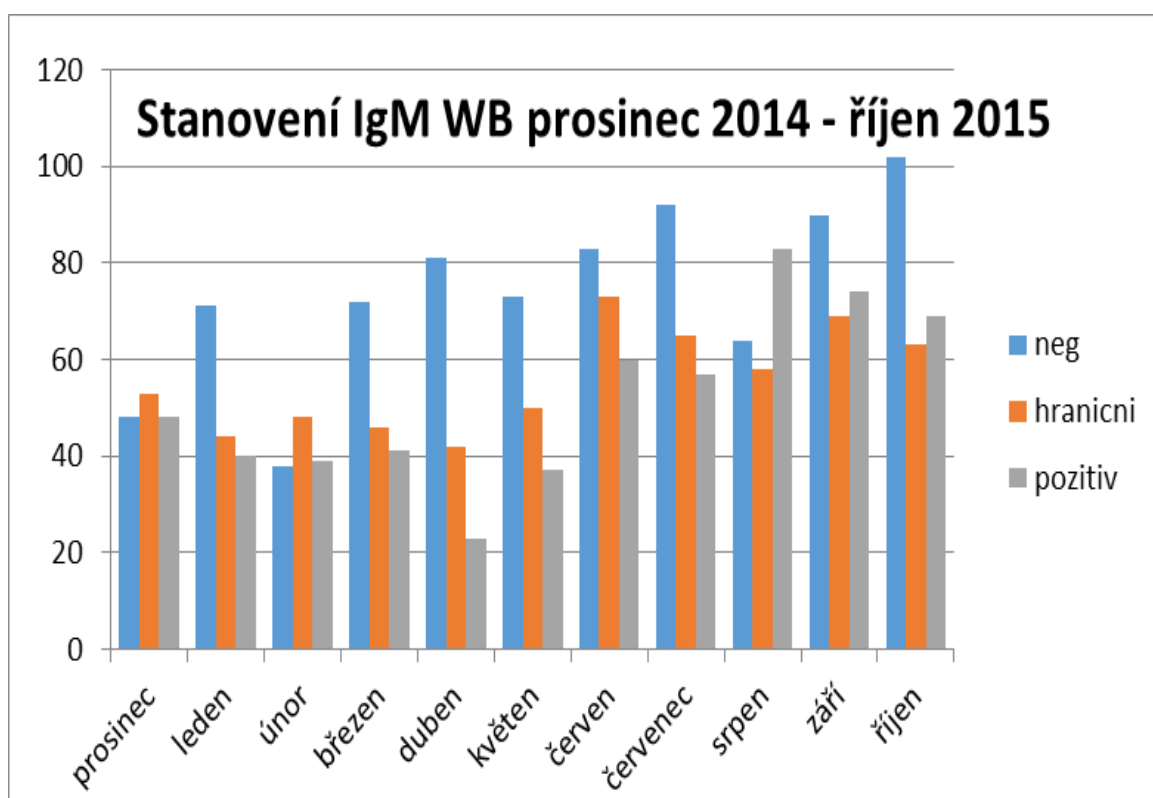
Obrázek 16: Rozdělení negativních, hraničních a pozitivních výsledků ve třídě IgM měřené metodou ELISA v roce 2015.



Obrázek 17: Rozdělení negativních, hraničních a pozitivních výsledků ve třídě IgG měřené metodou westernblot v roce 2015.



Obrázek číslo 18: Rozdělení negativních, hraničních a pozitivních výsledků ve třídě IgM měřené metodou westernblot v roce 2015.



Obrázek číslo 19: Stanovení IgM protilátek metodou WB za časové období prosinec 2014 – říjen 2015.

Z obr. 19 je zřejmé, že i v zimních měsících mohou být nalézány pozitivní výsledky anti-IgM protilátek, jelikož jsou borelie schopné přecházet do aktivních forem z dormantních (klidových, „spících“) forem, které často unikají imunologickému dozoru a bývají rezistentní na antibiotickou terapii. V takovýchto formách jsou borelie schopny přežívat i několik měsíců, než se „probudí“ do aktivní spirochetové formy.

Cílem práce bylo také ověřit, zda blotovací metody pomohou odstranit řadu pozitivních výsledků nalezených ve screeningových ELISA metodách. Výsledky na souboru našich dat jsou uvedeny v následujících tabulkách č. 6 - 9. Z hodnocení byly vyloučeny hraniční hodnoty, které jsou podbarveny žlutě. Z celkového počtu 3445 vyšetření protilátek ve třídě IgG v r. 2014 se neshodovalo 22% výsledků, kde 467 výsledků pozitivních v ELISA nebylo potvrzeno WB, zatímco jen jeden ELISA negativní výsledek byl hodnocen ve WB jako pozitivní. Z celkového počtu 2722 vyšetření protilátek ve třídě IgM v r. 2014 se neshodovalo 31% výsledků, kdy 406 v ELISA pozitivních vzorků nebylo potvrzeno pomocí WB. V r. 2015 se ve třídě IgG neshodovalo a WB nebyla potvrzena pozitivita ELISA u 64% výsledků. Ve třídě IgM nebyla potvrzena ELISA pozitivita u 40% výsledků (188 vzorků), ale 10 vzorků v IgM ELISA negativních bylo nalezeno pomocí WB jako pozitivní (10%).

n = 3445, shoda 78% vyloučeno 1273 (37%)		IgG ELISA		
		negativní	hraniční	pozitivní
IgG WB	negativní	4	679	467
	hraniční	0	195	215
	pozitivní	1	184	1700

Tabulka 6: Srovnání stanovení IgG protilátek proti boreliím pomocí ELISA a WB za rok 2014.

n = 2722, shoda 69% vyloučeno 1400 (51%)		IgM ELISA		
		negativní	hraniční	pozitivní
IgM WB	negativní	7	378	406
	hraniční	1	294	618
	pozitivní	0	109	909

Tabulka 7: Srovnání stanovení IgM protilátek proti boreliím pomocí ELISA a WB za rok 2014.

n = 1125, shoda 36% vyloučeno 82 (7%)		IgG ELISA		
		negativní	hraniční	pozitivní
IgG WB	negativní	190	1	665
	hraniční	1	0	80
	pozitivní	0	0	188

Tabulka 8: Srovnání stanovení IgG protilátek proti boreliím pomocí ELISA a WB za rok 2015.

n = 936, shoda 57% vyloučeno 468 (50%)		IgM ELISA		
		negativní	hraniční	pozitivní
IgM WB	negativní	47	116	188
	hraniční	17	77	197
	pozitivní	14	61	220

Tabulka 9: Srovnání stanovení IgM protilátek proti boreliím pomocí ELISA a WB za rok 2015.

Zajímalo nás také, jak často se u pacientů, kteří přicházejí na vyšetření protilátek proti boreliím nacházejí shodné výsledky (pozitivní/negativní) ve třídě IgM i IgG. Výsledky screeningových ELISA za rok 2014 jsou uvedeny v tab. 10 a za rok 2015 v tab. 11.

n = 12364, shoda 80% vyloučeno 1970 (16%)		IgG ELISA		
		negativní	hraniční	pozitivní
IgM ELISA	negativní	6669	947	1926
	hraniční	437	89	287
	pozitivní	876	210	923

Tabulka 10: Srovnání stanovení IgG a IgM protilátek proti boreliím pomocí ELISA za rok 2014.

n = 12137, shoda = 86% vyloučeno 776 (16%)		IgG ELISA		
		negativní	hraniční	pozitivní
IgM ELISA	negativní	9639	144	327
	hraniční	525	12	37
	pozitivní	1302	58	93

Tabulka 11: Srovnání stanovení IgG a IgM protilátek proti boreliím pomocí ELISA za rok 2015.

## 4 DISKUZE

První část své diplomové práce jsem věnovala teoretickým poznatkům, týkajících se charakteristiky a historie boreliózy, mikrobiologické charakteristice borelií, imunitnímu systému ve vztahu k patogenezi onemocnění, terapií a prevenci onemocnění a postavení sérologických vyšetření v diagnostice onemocnění.

Lymeská borelióza je infekční systémové onemocnění vyvolané bakteriemi *Borrelia burgdorferi sensu lato*, které mají unikátními vlastnosti uniknout imunitní ochraně organismu. Borelie přenáší především klíšťata. Přenos je možný i krev sajícím hmyzem, ale ten nebyl zatím v širší míře potvrzen. Každý jedinec na tuto infekci reaguje individuálně.

U někoho se infikování boreliemi klinicky vůbec neprojeví a skončí spontánním uzdravením, jiný může mít až chronické potíže. Klinické projevy závisí na stádiu onemocnění. Při imunitním systémem nezvládnuté infekci může být často postižen kožní systém, pohybový aparát či nervový systém.

Prevence se dnes zaměřuje především na ochranu před přisátím klíštěte. Na výzkumu vakcíny proti boreliím se stále pracuje.

V druhé, praktické části bakalářské práce jsem prováděla analýzu výsledků získaných při rutinním vyšetřování protilátek proti boreliím v laboratořích Spadia Lab v období od 1. 1. 2014 do 31. 12. 2015.

Strategie vyšetřování protilátek proti boreliím vychází z doporučení CDC (<http://www.cdc.gov/lyme/diagnostesting/labtest/twostep/index.html>) i české skupiny pro boreliózu (<http://www.borelioza.cz/cs/diagnostika/>), kdy screening se provádí pomocí sensitivní ELISA a konfirmace pozitivních vzorků pomocí WB nebo IB, v němž jsou aplikovány rekombinantní nebo vysoce purifikované antigeny. Proto v našich datech je jen minimum ELISA negativních vzorků, které byly současně vyšetřeny i WB nebo IB.

V roce 2014 byl ELISA screening prováděn pomocí souprav firmy Euroimmun, která používala jako cílové antigeny pro detekci a stanovení IgG protilátek směs celých antigenových extraktů *B.burgdorferi sensu stricto*, *B.afzelii* a *B.garinii* obohacenou o rekombinantní VlsE *B.burgdorferi*. Pro detekci a stanovení IgM protilátek byla jako cílový antigen použita rovněž směs celých antigenových extraktů *B.burgdorferi sensu stricto*, *B.afzelii* a *B.garinii*, ale bez rekombinantního VlsE *B.burgdorferi*. K provedení testu byl používán procesor vzorků Evolis. Jednalo se o klasickou ELISA na mikrotitračních destičkách.

Konfirmace pomocí WB byly prováděny soupravami firmy Euroimmun, kde jako antigení cílová struktura pro stanovení IgG protilátek byl použit lyzát *B.afzelii* doplněný o VlsE z *B.burgdorferii*, pro stanovení IgM protilátek bez VlsE z *B.burgdorferii*.

V roce 2014 bylo celkově vyšetřeno ve třídě IgG metodou ELISA 12469 pacientů, z nichž bylo 64,4% negativních; 10,1% hraničních a 25,5% pozitivních (tab. 5). Výsledky v ELISA byly potvrzeny u 3445 vzorků, z nichž u 1273 výsledků nemohl být učiněn jasný závěr, neboť byly v šedé zóně (hraniční), tzn., že u pacientů s těmito vzorky (37%) by mělo být provedeno opakované vyšetření s novým vzorkem. U 467 pacientů s pozitivním ELISA výsledkem nebyla pozitivita WB potvrzena (tab. 6).

Ve třídě IgM bylo vyšetřeno metodou ELISA 12465 pacientů, z nichž bylo 77,1% negativních; 6,6% hraničních a 16,3% pozitivních (tab. 5). Konfirmace nebo současné vyšetření ELISA i WB bylo provedeno u 2722 vzorků, z nichž u 51% musely být výsledky hodnoceny jako hraniční a doporučeno opakované vyšetření a z pozitivních ELISA vzorků nebylo WB potvrzeno 406 (tab. 7).

Od 1. 12. 2015 pak byl screening prováděn pomocí souprav firmy DiaSorin na analyzátoru Liaison, kde jako cílové antigeny pro stanovení protilátek ve třídě IgM byly použity purifikované nebo rekombinantní OspC (Outer surface protein C) antigeny a pro stanovení protilátek ve třídě IgG purifikované nebo rekombinantní VlsE (Variable protein-like sequence, Expressed).

Konfirmace pomocí WB byly prováděny stejně jako v r. 2014 soupravami firmy Euroimmun, kde jako antigenní cílová struktura pro stanovení IgG protilátek byl použit lyzát *B.afzelii* doplněný o VlsE z *B.burgdorferii*, pro stanovení IgM protilátek bez VlsE z *B.burgdorferii*.

Po přechodu na screening pomocí souprav firmy DiaSorin při neshodě výsledků ELISA screeningu a konfirmace WB byla pro třídu IgG provedena ještě druhá konfirmace za použití imunoblotových souprav firmy Euroimmun, které používají jako cílové antigeny pro stanovení protilátek definované rekombinantní antigeny.

V roce 2015 bylo celkově vyšetřeno ve třídě IgG metodou ELISA 12137 pacientů, z nichž bylo 94,5% negativních, 1,8% hraničních a 3,8% pozitivních (tab. 5). Následnou konfirmací pozitivních a hraničních výsledků metodou WB, pokud tento standardní postup klient akceptoval, bylo z celkového počtu 933 ELISA pozitivních výsledků WB vyloučeno 71,3% a zpochybněno (hraniční hodnoty WB) 8,6% vzorků (tab. 8), tj. výrazně více než v r. 2014.

Ve třídě IgM bylo v r. 2015 vyšetřeno metodou ELISA 12202 pacientů, z nichž bylo 83,2% negativních; 4,7% hraničních a 12,1% pozitivních (tab. 5). Následnou konfirmací pozitivních a hraničních výsledků metodou WB, pokud byla provedena, bylo z celkového počtu 605 ELISA pozitivních výsledků vyloučeno 31,5% a zpochybněno 32,6% vzorků (tab. 9). Vyloučených výsledků bylo o cca 10% více než v r. 2014, zpochybněných je zhruba stejně.



poškozuje buňky této tkáně. Mikrobiální antigeny reagují také často zkříženě s některými antigeny hostitele. Tím mohou u geneticky predisponovaných jedinců vyvolávat onemocnění, která řadíme mezi onemocnění autoimunitní. U nezvládnuté primární infekce boreliemi to bývá po přechodu do infekce trvalé postižení nervového systému (periferní obrna lícního nervu, meningoencefalitida, polyradikulopatie), kloubů (lymská artritida), opakované postižení kůže (sekundární erythema migrans, boreliový lymfocytom, acrodermatitis chronica atroficans), vzácněji pak lymská karditida nebo postižení očí.

Dostanou-li se borelie do prostředí, které není pro jejich život optimální, přecházejí do dormantních (klidových, persistujících, „spících“) forem, které často unikají imunologickému dozoru a bývají rezistentní na antibiotickou terapii. V takovýchto formách jsou borelie schopny přežít i několik měsíců, než se „probudí“ do aktivní spirochetové formy. Co se týče antibiotické terapie, ukazuje se, že jako efektivní se z výše uvedených důvodů jeví pulzní antibioterapie vhodnými antibiotiky při akutních potížích (viz str. 20-23). Ta pomůže imunitnímu systému, aby se na danou situaci adaptoval a byl schopen se v dalším období s případnou persistující boreliovou infekcí vyrovnávat sám. Jako perspektivní se ukazuje u persistujících boreliových infekcí pulzní léčba širokospektrými ATB v kombinaci s preparáty zabaňujícími replikaci DNA, jako je mytomycin C [51, 73].

Jak již bylo řečeno, laboratorní diagnostika Lymské boreliózy je v současnosti prováděna nejčastěji sérologickými testy, tj. testy založenými na detekci a stanovování protilátek proti boreliím ve vyšetřovaných vzorcích sér, nejčastěji různými variantami ELISA a imunoblotovacích metod. V oblasti nepřímého průkazu kontaktu vyšetřovaného jedince s boreliemi se stává v posledních letech populární také imunospotovací metoda (LimeSpot). Každá skupina těchto metod má svá specifika, na které je při jejich volbě a interpretaci výsledků nutno brát zřetel.

Metody přímého průkazu borelií v materiálech odebraných od vyšetřovaných osob, ať se již jedná o kultivaci, PCR nebo DFA jsou z různých důvodů (náročnost odběru materiálu k vyšetření, pracnost, cena, konečná efektivita vyšetření aj.) využívány v praxi jen minimálně.

## 5 ZÁVĚR

Naše studie potvrdila, že pro výsledky screenigového vyšetření borelióz pomocí různých variant ELISA dodávaných různými výrobci je velmi důležité složení antigenního substrátu, který je pro analýzu použit. Následná imunoblotová konfirmace pozitivních ELISA výsledků pomůže eliminovat významné procento tzv. „falešně pozitivních“ nálezů.

Při interpretaci výsledků je třeba brát v potaz někdy pomalou tvorbu protilátek v časném stadiu onemocnění, možnost ovlivnění tvorby protilátek předchozí aplikací antibiotik a netypickou dynamiku protilátkové odpovědi. Přetrvávání protilátek po terapii nemusí znamenat selhání léčby akutního onemocnění. Existuje možnost zkřížených reakcí s antigeny jiným patogenů způsobujících např. virová onemocnění jako EBV, CMV i s některými autoantigeny. Pro vyslovení závěrů ze sérologické diagnostiky je důležitý přesmyk protilátek z IgM na IgG. Pouhá přítomnost IgM protilátek za stálé absence IgG protilátek neznamena pozitivní nález. V žádném případě však nelze dělat diagnózu a opatření jen na základě vyšetření protilátek. Výsledky sérologických vyšetření je nutné posuzovat v kontextu celého klinického obrazu [64].

## 6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

1. Goddard, J., *Infectious diseases and arthropods*. Totowa, New Jersey: Humana Press, 2000. ISBN 0-89603-825-4.
2. Hubálek, Z., *Epidemiology of Lyme borreliosis*. *Curr Probl Dermatol*. 2009; 37: 31-50.
3. Kimmig, P., Braun, R., Hassler, D.: *Klíšťata: Nepatrné kousnutí s neblahými následky*. Praha: Pragma, 2003. ISBN 80-7205-881-9.
4. Anděra, M., *Fauna*. 1. vyd. Praha: Libri, 2003. Encyklopedie naší přírody. ISBN 80-7277-162-0.
5. Buchancová, J., et al. *Lymeská borelióza z pohľadu pracovného lekárstva – porovnávajúca štúdia*. *Pracovní lékařství* 2009; č. 2: 46-55.
6. Proal, A., How to correctly target L-form bacteria. *Bacteriality — Understanding Chronic Disease* [online]. 2007 [cit. 2016-03-06]. Dostupné z: <http://bacteriality.com>.
7. Čermáková, Z. *Lymeská borelióza – onemocnění pro multidisciplinární diagnostiku*. *Klinická biochemie a metabolismus* [online]. 1997; 5(1): 1-3 [cit. 2016-01-10]. Dostupné z: <http://www.cskb.cz/res/file/KBM-pdf/2009/1-09/abstrakta/KBM09-1-editorial.pdf>.
8. Foto klíštěte *Ixodes ricinus*. [online] 2016 [cit. 2016-03-01]. Dostupné z [http://www.eurospiders.com/tick\\_ixodes\\_ricinus\\_1292.jpg](http://www.eurospiders.com/tick_ixodes_ricinus_1292.jpg).
9. Samice, samec a nymfa *Ixodes ricinus*. [online] 2016 [cit. 2016-03-01]. Dostupné z [http://tickborne.prf.jcu.cz/Tickborne\\_CZ/Klistata/Entries/2010/8/31\\_Klistata.html](http://tickborne.prf.jcu.cz/Tickborne_CZ/Klistata/Entries/2010/8/31_Klistata.html).
10. Bednář, M., Fraňková, V., Schindler, J., Souček, A., Vávra, J.: *Lékařská mikrobiologie*. Marvil, Praha, 1999, ss.192 – 3.
11. Bartůněk, P., et al. *Lymeská borelióza. 3. doplněné a přepracované vydání*. Praha: Grada Publishing, 2006. ISBN 80-247-1543-0.

12. Gern L., *Life cycle of Borrelia burgdorferi sensu lato and transmission to humans*. *Curr Probl Dermatol* 2009; 37: 18-30.
13. Bolehovská, R.; Plíšek, S.; Plíšková, L.; Čermáková, Z.; Palička, V.: *Lyme borreliosis*. *Klin Biochem Metab* 2009; 17(38): 24–8.
14. Fensfeld, O.: *Borreliae, human relapsing fever and parasite-vector-host relationships*. *Bacteriol. Rev.* 1965; 29(1): 46-74.
15. Bartoš V., Šafářčík K., Karlíková M., Topolčan O., Kučera R., Windrichová J., *Principy imunoanalytických metod*. Plzeň 2013.
16. Roháčová, H. *Lymeská borelióza v ordinaci PL z pohledu infektologa*. *Practicus*. 2004; č.6: 182-4.
17. *Borrelia burgdorferi*. [online] 2016 [cit. 2016-03-01]. Dostupné z <https://lymelightfight.wordpress.com/tag/miss-diagnosis/>.
18. Pícha, D. *Lymeská borelióza*. *Postgraduální medicína*. 2009; č.8. 827-32.
19. Gurčík, L. *Súčasný trendy v diagnostice a liečbe neuroboreliózy*. *Neurol. Prax.* 2009; č.3: 170-6.
20. Grubhoffer, L., Golovchenko, M., Vancová, M., Zacharová-Slavíčková, K., Rudenko, N., Oliver, J.: *Lyme borreliosis: insights into tick- / host-borrelia relations*. *Folia parasitol. Praha*. 2005; 52(4): 279 – 94.
21. Křupka, M., et al. *Lymeská borelióza – biologie, patogeneze, diagnostika a léčba*. *Dermatologie pro praxi*. 2008; č.5: 236-9.
22. Madigan, M., Martinko, J., Stahl, D., Clark, D.: *Brock Biology of Microorganisms*, 13<sup>th</sup> edition, Benjamin Cummings, San Francisco. 2012.
23. Agüero-Rosenfeld ME, Wang G, Schwartz I, Wormser GP: *Diagnosis of Lyme borreliosis*. *Clin Microbiol Rev* 2005; 18: 484-509.
24. Barbour AG, Hayes SF: *Biology of Borrelia species*. *Microbiol Rev* 1986; 50: 381-400.

25. Krupka M, Raska M, Belakova J, Horynova M, Novotny R, Weigl E: *Biological aspects of lyme disease spirochetes: unique bacteria of the Borrelia burgdorferi species group*. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub 2007; 151(2): 175-86.
26. Lam TT, Nguyen TPKN, Montgomery RR, Kantor FS, Fikrig E, Flavell RA: *Outer surface proteins E and F of Borrelia burgdorferi, the agent of Lyme disease*. Infect Immun 1992; 62: 1992: 290-298.
27. Neelakanta G, Li X, Pal U, Liu X, Beck DS, DePonte K, Fish D, Kantor FS, Fikrig E: *Outer surface protein B is critical for Borrelia burgdorferi adherence and survival within Ixodes ticks*. PLoS Pathog 2007; 3(3): e33.
28. de Silva AM, Tyson KR, Pal U: *Molecular characterization of the tick-Borrelia interface*. Front Biosci 2009; 14: 3051-63.
29. Morfologie struktury Borrelia burgdorferi. [online] 2016 [cit. 2016-03-01]. Dostupné z <https://quizlet.com/21521974/spirochetes-flash-cards/>.
30. Dlouhý P, Honegr K, Krbková L, et al. Lymeská borrelióza doporučený postup v diagnostice, léčbě a prevenci. *Klinická mikrobiologie a infekční lékařství*. 2011; 17(4): 144–9.
31. Nau R, Christen HJ, Eiffert H.: *Lyme disease - current state of knowledge*. Dtsch Arztebl Int. 2009; 106: 72-82.
32. Binder, S. C., Telschow. A., Meyer-Hermann. M., *Population Dynamics of Borrelia burgdorferi in Lyme Disease*. Frontiers in Microbiology. 2012; 3: 104. Published online 2012 Mar 22. doi: 10.3389/fmicb.2012.00104. PMID: PMC3309995.
33. Stanek, G., V. Fingerle, K.-P. Hunfeld. Lyme borreliosis: Clinical case definitions for diagnosis and management in Europe. *Clinical Microbiology and Infection*. 2011, 17(1), 69-79.
34. Bartůňková, J., a PAULÍK. M., *Vyšetřovací metody v imunologii*. 2., přeprac. a dopl. vyd. Praha: Grada, 2011. ISBN 978-80-247-3533-7.
35. Erythema migrans. [online] 2016 [cit. 2016-03-01]. Dostupné z [http://medicine.academic.ru/2845/Erythema\\_chronicum\\_migrans](http://medicine.academic.ru/2845/Erythema_chronicum_migrans).

36. Dlouhý, P., *Lymeská borelióza v praxi*. 1. vyd. Praha: Psychiatrické centrum, 1996. ISBN 80-85121-40-9.
37. Boreliový lymfocyt. [online] 2016 [cit. 2016-03-01]. Dostupné z <http://www.remedia.cz/Okruhy-temat/Mikrobiologie-a-infekcni-choroby/Lymska-borelioza-onemocneni-jiz-bez-otazek/8-1c-bS.magarticle.aspx>.
38. Thon, V., et al. *Základy vyšetření v klinické imunologii*. Brno: MU, 2009. ISBN 978-80-210-4227-8.
39. Hejnar, P. *Specifika nepřímé diagnostiky toxoplazmózy a lymeské boreliózy u dětí*. *Pediatric pro praxi*. 2001; č. 2: 112-5.
40. Votava, M., *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun, 2003. ISBN 80-902896-6-5.
41. Schwan T.G., Piesman J., Temporal changes in outer surface proteins A and C of the Lyme disease-associated spirochete, *Borrelia burgdorferi*, during the chain of infection in ticks and mice. *Journal of Clinical Microbiology*. 2000; 38(1): 382 – 8.
42. Tilly K., Krum J.G., Bestor., Mollie M.W., Grimm D., Bueschel D., Byram R., Dorward D., VanRaden J.M., Stewart P., Rosa P. *Borrelia burgdorferi* OspC protein required exclusively in a crucial early stage of mammalian infection. *Infection and Immunity* 2006; 74(6): 3554–64. DOI: 10.1128/IAI.01950-05.
43. Montgomery R. R., Malawista S. E., Feen K. J. M., Bockenstedt L. K., Direct demonstration of antigenic substitution of *Borrelia burgdorferi* ex vivo: exploration of the paradox of the early immune response to outer surface proteins A and C in Lyme disease. *The Journal of Experimental Medicine*. 1996; 183(1): 261 – 9.
44. Gordon, Debra L. *Život bez nemoci: zaručené způsoby, jak se vyhnout více než 90 nemocem, od těch nejběžnějších po ty závažné*. Vyd. 1. Praha: Reader's Digest Výběr, 2011. ISBN 978-80-7406-136-3.
45. Gross, D. M. Identification of LFA-1 as a Candidate Autoantigen in Treatment-Resistant Lyme Arthritis. *Science* xxxx; 281(5377), 703-6. DOI: 10.1126/science.281.5377.703.

46. Holečková, D., et al. *Laboratorní diagnostika novějších neuroinfekcí*. *Posgraduální medicína* 2006; č. 3: 319-322.
47. Litzman, J., *Základy vyšetření v klinické imunologii*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2007. ISBN 978-80-210-4227-8.
48. Earnhart C.G., DeLacy V.L.R., Marconi R.T. Disulfide-Mediated Oligomer Formation in *Borrelia burgdorferi* Outer Surface Protein C, a Critical Virulence Factor and Potential Lyme Disease Vaccine Candidate. *Clinical and Vaccine Immunology*, 2011; 18(6): 6901-6.
49. Pícha, D. Infekce přenášené klíšťaty. *Postgraduální medicína* 2006; č. 3: 310- 4.
50. Tomás, L., Huttová, J., Mistrk I., Kogan, G., Effect of *carboxymethyl chitin glucan* on the activity of some hydrolic enzymes in maize plants. *Chem. Pap.* 2004; 56: 326-9.
51. Struktura molekul imunoglobulinů. [online] 2016 [cit. 2016-03-01]. Dostupné z <http://www.ebioscience.com/knowledge-center/antigen/immunoglobulin/structure.htm>.
52. Hulínská, D., Laboratorní diagnostika. In Bartůněk, P. *Lymeská borelióza*. Praha: Grada, 2006. ss. 50-59.
53. Dušek, P., Diagnostika lymeské boreliózy. *Kruh* [online], 1-4 [cit. 2016-03-01]. Dostupné z: [http://pavel.duskovi.info/skola/medicina/Diagnostika\\_lymeske\\_boreliozy.pdf](http://pavel.duskovi.info/skola/medicina/Diagnostika_lymeske_boreliozy.pdf).
54. Bartůněk, P., *Lymeská borelióza*. 4., přeprac. a dopl. vyd. Praha: Grada, 2013. ISBN 978-80-247-4355-4.
55. Čechová, L., *Ochrana před klíšťaty a obtížným hmyzem*. *Praktické lékařství* 2009; č. 4: 184-8.
56. Beneš, J., *Infekční lékařství*. 1. vyd. Praha: Galén, c2009. ISBN 978-80-7262-644-1.
57. Toman, M. *Veterinární imunologie*. 2., dopl. a aktualiz. vyd. Praha: Grada, 2009. ISBN 978-80-247-2464-5.

58. National Center for Biotechnology Information. *Taxonomie Borrelia burgdorferi sensu lato*. [online]. 2016 [cit. 2016-03-06]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Tree&id=64895&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock> .
59. EUROIMMUN - systémy pro diagnózu borreliózy Westernblotem. [online] 2016 [cit. 2016-03-01]. Dostupné z [http://www.dynex.cz/files/download/EUROLINE-WB\\_VIsE.cz\\_OBR1432.pdf](http://www.dynex.cz/files/download/EUROLINE-WB_VIsE.cz_OBR1432.pdf).
60. Mattson P.E.J. et al.: Analytical Performance Characteristics and Clinical Utility of Immunological Assays for Human Immunoglobulin E (IgE) *Antibodies and Defined Allergen Specificities*; Approved Guideline-Second Edition, **I/LA20-A2 CLSI document, 2009. 156.**
61. Earnhart C.G., Buckles E.L., Dumler J.S., Marconi R.T., *Demonstration of OspC Type Diversity in Invasive Human Lyme Disease Isolates and Identification of Previously Uncharacterized Epitopes That Define the Specificity of the OspC Murine Antibody Response*. Infection and Immunity. 2005; 73(12), 2005. 7869-77.
62. Roháčová, H., *Lymeská borelióza: průvodce ošetřujícího lékaře*. Praha: Maxdorf, c2005. Farmakoterapie pro praxi. ISBN 80-7345-071-2.
63. Cox L., Williams B., Sicherek S., Oppenheimer J., Sher L., Hamilton R., Golden D.: Pearls and pitfalls of allergy diagnostic testing: report from the American College of Allergy, Asthma and Immunology/American Academy of Allergy, Asthma and Immunology Specific IgE Test Task Force. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*. 2008; 101(6): 580-92.
64. Štruncová V. et al.: **Možnosti využití skórovacího systému v diagnostice lymeské boreliózy**. *Prakt. Lék.* 1999; 79(12): 686-90.
65. Příbalový leták Soupravy Anti-Borrelia EUROLINE-WB ( IgG ) + Anti-Borrelia EUROLINE-RN-AT (IgG), Anti-Borrelia afzelii-WESTERNBLOT (IgM) + Anti- Borrelia EUROLIEN-RN-AT (IgM ).

66. Jin C., Roen D.R., Lehmann P.V., Kellermann G.H.: [An Enhanced ELISPOT Assay for Sensitive Detection of Antigen-Specific T Cell Responses to \*Borrelia burgdorferi\*](#). *Cells*. 2013; 2(3): 607-20.
67. Lyme disease in Canada: Q & A for paediatricians. *Paediatr child health* 2009; 14(2): 103-8.
68. Bgerno J.J. Jr. Diagnostic Hints and Treatment Guidelines for Lyme and Other Tick Borne Illnesses; *Diagnostic Hints and Treatment Guidelines for Lyme and Other Tick Borne Illnesses*. 2008; 16: 17-31.
69. Stricker R.B. Johnson L. *Lyme Disease*: Call for a “Manhattan Project” to Combat the Epidemic. *PLoS Pathog*. 2014; 10(1): 1-3.
70. Veitch, N.C., Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry*. 2004; 65: 249-59.
71. Lochman I.: Indikace a interpretace laboratorních metod v infekční sérologii. Abstrakt přednášky. *Klinická imunológia a alergológia*, 2015; 25(3): 30. ISSN 1335-0013.

## 7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

Ab	protilátka
ACA	Chronická atrofická akrodermatitida
Ag	antigen
ANA	antinukleární protilátky
ATB	antibiotika
B.	Borrelia
Ba	Borrelia afzelii
Bb	Borrelia burgdorferi
BBK32	fibronectin-binding protein of Borrelia burgdorferi
Bg	Borrelia garinii
CDC	Centrum pro kontrolu a prevenci nemocí
CLIA	nepřímá chemiluminiscenční imunoanalýza
CMV	Cytomegalovirus
CNS	Centrální nervová soustava
DbpA	Decorin-binding protein A
DEET	(N,N-dietyl-meta-toluamid)
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
EBV	Epstein-Barrové virus
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EHK	Externí hodnocení kvality
EIA	Enzymoimunoanalýza
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
EM	Erythema migrans
EMEM	Eagle's minimal essential medium
HAV	Virus hepatitidy A
hCMV	Human cytomegalovirus
HIV/AIDS	Human Immunodeficiency Virus, Acquired Immune Deficiency Syndrome
HSV	Herpes simplex virus
IgA, IgM, IgG	imunoglobulin
kb	kilobáze
kDa	kilodalton
LB	Lymeská borelióza
LFA-1 $\alpha$	Lymphocyte function-associated antigen 1
OspA, OspB, OspC, OspD, OspE a OspF	Outer Surface Protein
PCR	Polymerase Chain Reaction (polymerázová řetězová reakce)

RF	revmatoidní faktor
RLU	relativní světelná jednotka
SDS	dodecylsulfát sodný
TAT	Turn around time (čas od přijetí vzorku po vytištění výsledku)
TBE	Tick-borne Encephalitis (klíš'ová encefalitida)
TNF	tumor necrosis factor $\alpha$
TRIS	pufr tris(hydroxymethyl)aminomethan pufr
VlsE	Variable protein-like sequence
VZV	Varicella zoster virus
WB	Westernblot

## 8 SEZNAM OBRÁZKŮ

- Obrázek 1: Foto klíštěte *Ixodes ricinus*.
- Obrázek 2: Samice, samec a nymfa *Ixodes ricinus*.
- Obrázek 3: *Borrelia burgdorferi*.
- Obrázek 4: Morfologie struktury *Borrelia burgdorferi*.
- Obrázek 5: *Erythema migrans*.
- Obrázek 6: Boreliový lymfocyt.
- Obrázek 7: Struktura molekul imunoglobulinů.
- Obrázek 8: Schéma ELISA.
- Obrázek 9 : Schéma nepřímé ELISA.
- Obrázek 10: IgM a IgG imunoblot s rekombinantními antigeny a westernblot doplněný o rekombinantní VlsE.
- Obrázek 11: Rozdělení negativních, hraničních a pozitivních výsledků ve třídě IgG měřené metodou ELISA v roce 2014.
- Obrázek 12: Rozdělení negativních, hraničních a pozitivních výsledků ve třídě IgM měřené metodou ELISA v roce 2014.
- Obrázek 13: Rozdělení negativních, hraničních a pozitivních výsledků ve třídě IgG měřené metodou westernblot v roce 2014.
- Obrázek 14: Rozdělení negativních, hraničních a pozitivních výsledků ve třídě IgM měřené metodou westernblot v roce 2014.
- Obrázek 15: Rozdělení negativních, hraničních a pozitivních výsledků ve třídě IgG měřené metodou ELISA v roce 2015.
- Obrázek 16: Rozdělení negativních, hraničních a pozitivních výsledků ve třídě IgM měřené metodou ELISA v roce 2015.
- Obrázek 17: Rozdělení negativních, hraničních a pozitivních výsledků ve třídě IgG měřené metodou westernblot v roce 2015.
- Obrázek 18: Rozdělení negativních, hraničních a pozitivních výsledků ve třídě IgM měřené metodou westernblot v roce 2015.
- Obrázek 19: Stanovení IgM protilátek metodou WB za časové období prosinec 2014 – říjen 2015.
- Obrázek 20: Diagnostická kritéria Lameské boreliózy.

## 9 SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Hodnocení IgM pozitivity WB a imunoblotu.

Tabulka 2: Charakteristika antigenů na testovacích stripech (IgM).

Tabulka 3: Srovnávací vyhodnocení IgG protilátek.

Tabulka 4: Specifičnost antigenů na testovacích stripech pro IgG WB.

Tabulka 5: Rozdělení pozitivních, hraničních a negativních výsledků měřených metodou ELISA i WB v roce 2014, 2015.

Tabulka 6: Srovnání stanovení IgG protilátek pomocí ELISA a WB za rok 2014.

Tabulka 7: Srovnání stanovení IgM protilátek pomocí ELISA a WB za rok 2014.

Tabulka 8: Srovnání stanovení IgG protilátek pomocí ELISA a WB za rok 2015.

Tabulka 9: Srovnání stanovení IgM protilátek pomocí ELISA a WB za rok 2015.

Tabulka 10: Srovnání stanovení IgG a IgM protilátek pomocí ELISA za rok 2014.

Tabulka 11: Srovnání stanovení IgG a IgM protilátek pomocí ELISA za rok 2015.

## **10 SEZNAM PŘÍLOH**

Příloha 1: Stanovení protilátek proti boreliím metodou ELISA na analyzátoru EVOLIS.

Příloha 2: Standardní operační postup - Stanovení protilátek proti boreliím ve třídách IgG, IgM chemiluminiscenční imunoanalýzou.

Příloha 3: Standardní operační postup - Stanovení protilátek proti boreliím ve třídách IgG, IgM metodou WesternBlot.

Příloha 4: Zkrácený postup ke stanovení protilátek proti boreliím ve třídě IgG a IgM metodou WesternBlot.

Příloha 5: Vyhodnocení výsledků Borelia WB IgG, IgM z EUROLineScan.

Příloha 6: Vyhodnocení pozitivních a negativních antigenů pomocí programu EUROLineScan.

Příloha 7: Vyhodnocení negativních antigenů pomocí programu EUROLineScan.

## 11 PŘÍLOHY

### 11.1 Příloha 1:

Typ dokumentu:	Interní	Platnost od:	1.3.2014
----------------	---------	--------------	----------

## STANDARDNÍ OPERAČNÍ POSTUP

### Stanovení protilátek proti boreliím metodou ELISA na analyzátoru EVOLIS

	Jméno:	Funkce:	Podpis:	Datum:
Vypracoval:	Mgr.M.Jindřichová	OP		1.3.2014
Schválil:	RNDr.I.Lochman,C Sc.	VLKIS		1.3.2014

## STANOVENÍ PROTILÁTEK PROTI BORRELIÍM

### **Účel vyšetření**

*Borrelia burgdorferi sensu lato* je mikroaerofilní pohyblivá G- spirochéta. Je původcem lymeské boreliózy. *Borrelia burgdorferi sensu lato* se na podkladě vlastností genetických, fenotypových a imunologických dělí na 4 genospecies -*B. burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii*, *B. afzelii* a *B. japonica*. *B. burgdorferi sensu stricto* se vyskytuje na celém světě, ale jako jediná v severní Americe; *B. garinii* a *B. afzelii* v Evropě, *B. japonica* v Japonsku. V České republice jsou původcem boreliózy zejména druhy *B. garinii* a *B. afzelii*, *B. burgdorferi sensu stricto* jen zřídka. Přenáší se klíšťaty druhu *Ixodes ricinus*.

Stanovení specifických protilátek proti boreliím ve třídách IgM a IgG je zatím nejlepší možností průkazu infekce. Existuje řada úskalí v interpretaci sérologických nálezů (pomalý nástup tvorby protilátek v raném stádiu onemocnění, nedostatečná protilátková odpověď u některých pacientů, poměrně časté zkřížené reakce (lues, EBV, CMV, autoimunity) a s tím související přítomnost falešně pozitivních nálezů.

Protilátky třídy IgM jsou detekovatelné 3 – 4 týdny po přisátí klíštěte. Za 1 – 3 měsíce jsou odbourány, mohou však přetrvávat i několik měsíců. V případě hraničního nálezu je vhodný další odběr za 3 – 6 týdnů. U pozitivního nálezu se doporučuje odběr za 2 – 3 měsíce od zahájení terapie. Protilátky třídy IgG se objevují 4 – 8 týdnů po infekci, jsou někdy poměrně brzy odbourány (za 1 rok), ale mohou přetrvávat i mnoho let. U borelií nemají IgG protilátky protektivní charakter.

### **Princip postupu vyšetření**

Základem ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) metody je komplex specifické protilátky s molekulou enzymu (peroxidasa), která štěpí molekulu substrátu za vzniku barevných produktů měřených fotometricky. Prakticky princip je takový, že na polystyrénovou mikrotitrační destičku o 96 jamkách je na stěny jamek navázán antigen. Do jamky se přidá naředěný vzorek, v případě přítomnosti protilátek dojde k jejich navázání na antigen. K detekci navázaných protilátek se použijí zvířecí protilátky proti lidským imunoglobulinům, které jsou značené enzymem peroxidasou, a reakce se vizualizuje přidáním substrátu, který je enzymem rozštěpen za vzniku barevných produktů. Barevné produkty enzymatické reakce jsou měřeny spektrofotometricky v podobě absorbance.

### **Specifikace funkce**

Příbalový leták, CD01/LKIS/č.5, CE5/LKIS (EHK/MPZ)

### **System primárního vzorku**

Odběr

- vyšetření se provádí ze séra popř. plazmy, krev je odebírána do zkumavek s protisrážlivými činidly (popřípadě EDTA, heparin nebo citrát).
- vzorky krve jsou centrifugovány po dobu 10 min. při 1500 g; případné sraženiny ve vzorku jsou před testováním odstraněny; kontaminovaná, hyperlipemická nebo silně hemolytická séra popř. plazma nejsou vyšetřována.

### Uchování

- vzorky jsou uchovávány při teplotě +2°C – 8°C max. po dobu 7 dní, poté jsou uchovávány 1 měsíc při teplotě -20°C - po tuto dobu je možné si zažádat o další či doplňující vyšetření.
  
- vzorky se nesmí opakovaně rozmrazovat.

### **Manipulace s materiálem**

po fyzickém přezkoumání vzorku (žádanky, odběrové zkumavky) označí pracovník centrálního příjmu žádanku číslem a připojí svoji parafu viz. BS3 Směrnice pro příjem primárních vzorků

po označení se požadavky na vyšetření ze žádanky zadají do laboratorního informačního systému INFOLAB, zadanému vzorku je přiřazeno číslo ze žádanky a tiskárnou čárových kódů jsou vytisknuty nezaměnitelné čárové kódy podle požadavku na vyšetření a nalepí se na odběrovou zkumavku pacienta

zkumavky, mikrozkušavky Eppendorf pro imunologická vyšetření se označí čárovým kódem nebo etiketou (jméno, příjmení, rodné číslo, číslo ze žádanky, požadované vyšetření). Pracovník laboratoře LKIS odpipetuje do těchto zkumavek sérum nebo plazmu z originální odběrové zkumavky s odpovídajícím číslem čárového kódu (pozn. zkumavky se séry jsou v laboratoři centrálního příjmu uchovávány v ledniče po dobu 3 dnů), kde je podle požadovaných vyšetření umístí do příslušných označených stojánek popř. plastových krabiček v ledniče

zkumavky a mikrozkušavky Eppendorf se sérem nebo plazmou jsou likvidovány podle příslušných předpisů viz. Provozní řád SPADIA LAB, a.s.

### **Přístroje a pomůcky**

- Automatické pipety
- Evolis – BioRad
- Vortex V1

## Činidla a reagensie

### Chemikálie a reagensie

- Soupravy Anti-Borrelia ELISA (IgM), Anti-Borrelia plus VlsE ELISA
- (IgG) - EUROIMMUN
- Destilovaná voda

### Spotřební materiál

- Zkumavky plastové
- Latexové rukavice
- Kontejnery na infekční odpad – malé
- Kontejnery na infekční odpad – velké (koš)
- Stojánky
- Kádinky
- Špičky

### Postupy kalibrace

Neprovádí se.

### Pracovní postup

Test je proveden na přístrojích EVOLIS 1, 2, 3 (viz. Manuál č. 6,7) Přístroj provádí metodu dle následujícího postupu:

1. Před použitím vytemperujeme všechny vzorky a reagensie na laboratorní teplotu.
2. Naředíme vzorky v poměru 1:101.
3. Do stripů pipetujeme 100 µl kalibrátoru (2), PK, NK, naředěné vzorky.
4. Inkubace cca 30 min. při laboratorní teplotě.
5. 3x promyjeme v připraveném promývacím.
6. Napipetujeme 100µl konjugátu do všech jamek.
7. Inkubace cca 30 min. při laboratorní teplotě.
8. 3x promyjeme v připraveném promývacím.
9. Napipetujeme 100µl substrátu do všech jamek.
10. Inkubujeme cca 15 min. při laboratorní teplotě, **ve tmě!**
11. Napipetujeme do všech jamek 100µl Stop reagentu.
12. Destičku odečteme fotometricky při 450/630 nm proti vzduchu do 30 min. od zastavení reakce.

Pozn.

- dle příbalového letáku lze provést test dvěma způsoby. Laboratoř LKIS využívá

možnosti stanovení na Index pozitivity (IP). Pipetuje se CAL(2), NK, PK.

### **Postupy řízení kvality**

Součástí každého stanovení je pozitivní a negativní kontrola.

Externí kontrola kvality se zajišťuje účastí v EHK (SEKK).

### **Interference a zkřížené reakce**

Nebyla prokázána signifikantní nespecifická zkřížená reaktivita.

### **Výpočet a vyjádření výsledků**

Výpočet výsledku provede automaticky software přístroje EVOLIS dle schématu:

Výpočet indexu:

**IP = extinkce vzorku / extinkce Cut-off**

### **Hodnocení :**

IP < 0,8 negativní

IP 0,8-1,1 hraniční

IP > 1,1 pozitivní

Výsledek vyšetření je zapsán do pracovního protokolu (nebo jsou přiloženy tištěné výsledky z analyzátoru), který je tištěn z počítačového programu Infolab a který obsahuje: název vyšetření, identifikační kód vzorku (laboratorní číslo a jméno pacienta), datum analýzy, parafu pracovníka, který vyšetření provedl, parafu pracovníka, který vyšetření hodnotil a dále číslo šarže a expiraci použité diagnostické soupravy. Výsledky vyšetření jsou přeneseny z přístroje EVOLIS přímo do laboratorního informačního systému Infolab nebo jsou z protokolu přepsány pracovníkem LKIS do počítačového programu Infolab a zakládány do laboratorního deníku CD01/LKIS/č.5.

### **Biologické referenční rozmezí**

Negativní.

### **Varovné/kritické hodnoty**

Nejsou.

### **Laboratorní protokol a interpretace výsledků**

Výsledky jsou uvolňovány kvalifikovanými pracovníky viz. BS4 Směrnice pro vydávání výsledků.

### **Preventivní bezpečnostní opatření**

Nutno dodržovat bezpečnostní předpisy pro práci s infekčním materiálem uvedené viz. BR1 Provozním řádu.

### **Potenciální zdroje odchylek**

Odběrová fáze, pipetování.

### **Literatura**

Příbalový leták

### **Související dokumentace a přílohy**

BR1 Provozní řád

BS3 Směrnice pro příjem primárních vzorků

BS4 Směrnice pro vydávání výsledků

CE5/LKIS

BS11 Směrnice vnitřní kontroly kvality

Manuál č. 6 – Uživatelský manuál EVOLIS

Manuál č. 7 – Krátký uživatelský manuál EVOLIS

Manuál č. 15 – Vortex V-1

CD01/LKIS/č.5

Příloha č.1 Zkrácený postup: Stanovení protilátek IgG, IgM proti boreliím metodou ELISA

Příloha č.2 Příbalové letáky souprav Anti-Borrelia ELISA (IgM), Anti-Borrelia plus VlsE ELISA (IgG) – EUROIMMUN

Příloha č.3 Listy kvality přiložené ke každé nové šarži soupravy

Příloha č.4 Verifikační protokoly anti-borelia IgG, IgM.

## 11.2 Příloha 2:

Typ dokumentu:	Interní	Platnost od:	2.3.2015
----------------	---------	--------------	----------

# STANDARDNÍ OPERAČNÍ POSTUP

## Stanovení protilátek proti boreliím ve třídách IgG, IgM chemiluminiscenční imunoanalýzou

	Jméno:	Funkce:	Podpis:	Datum:
Vypracoval:	Mgr.M.Jindřichová	OP		2.3.2015
Schválil:	RNDr.I.Lochman,C Sc.	VLKIS		2.3.2015

## STANOVENÍ PROTILÁTEK PROTI BORRELIÍM

### **Účel vyšetření**

*Borrelia burgdorferi sensu lato* je mikroaerofilní pohyblivá G- spirochéta. Je původcem lymeské boreliózy. *Borrelia burgdorferi sensu lato* se na podkladě vlastností genetických, fenotypových a imunologických dělí na 4 genospecies -*B. burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii*, *B. afzelii* a *B. japonica*. *B. burgdorferi sensu stricto* se vyskytuje na celém světě, ale jako jediná v severní Americe; *B. garinii* a *B. afzelii* v Evropě, *B. japonica* v Japonsku. V České republice jsou původcem boreliózy zejména druhy *B. garinii* a *B. afzelii*, *B. burgdorferi sensu stricto* jen zřídka. Přenáší se klíšťaty druhu *Ixodes ricinus*.

Stanovení specifických protilátek proti boreliím ve třídách IgM a IgG je zatím nejlepší možností průkazu infekce. Existuje řada úskalí v interpretaci sérologických nálezů (pomalý nástup tvorby protilátek v raném stádiu onemocnění, nedostatečná protilátková odpověď u některých pacientů, poměrně časté zkřížené reakce (lues, EBV, CMV, autoimunity) a s tím související přítomnost falešně pozitivních nálezů.

Protilátky třídy IgM jsou detekovatelné 3 – 4 týdny po přisátí klíštěte. Za 1 – 3 měsíce jsou odbourány, mohou však přetrvávat i několik měsíců. V případě hraničního nálezu je vhodný další odběr za 3 – 6 týdnů. U pozitivního nálezu se doporučuje odběr za 2 – 3 měsíce od zahájení terapie. Protilátky třídy IgG se objevují 4 – 8 týdnů po infekci, jsou někdy poměrně brzy odbourány (za 1 rok), ale mohou přetrvávat i mnoho let. U borelií nemají IgG protilátky protektivní charakter.

### **Princip postupu vyšetření**

Kvantitativní stanovení specifických protilátek IgG a IgM proti *Borrelia burgdorferi* je založeno na nepřímé chemiluminiscenční imunoanalýze (CLIA). Magnetické částice (pevná fáze) jsou potaženy rekombinantními antigeny specifickými pro *Borrelia burgdorferi* a myší monoklonální protilátky jsou značeny derivátem isoluminolu (konjugát isoluminol-protilátka). Během první inkubace se protilátky proti *Borrelia burgdorferi* přítomné v kalibrátorech, vzorcích nebo kontrolách navážou na pevnou fázi. Během druhé inkubace reaguje konjugát s IgG proti *Borrelia burgdorferi* již navázanými na pevnou fázi. Po každé inkubaci se promytím odstraní nenavázaný materiál. V další fázi jsou přidány startovací reagentie a dochází k indukci prudké chemiluminiscenční reakce. Fotonásobič měří světelný signál odpovídající množství konjugátu isoluminol protilátka. Udává se v relativních světelných jednotkách (RLU) a koresponduje s koncentrací IgG a IgM protilátek proti *Borrelia burgdorferi* v kalibrátorech, vzorcích či kontrolách.

### **Místo provádění postupu**

- Diagnostická laboratoř, pracoviště č. 1: Laboratoř klinické biochemie, Dr. Martínka  
1491/7, Ostrava 700 30

### **Specifikace funkce**

BF 107.01 - Verifikační protokol – anti-Borelia IgG, IgM

### **Použitá terminologie a zkratky**

EHK – externí hodnocení kvality

SEKK – systém externí kontroly kvality

LIS – laboratorní informační systém

LKB – laboratoř klinické biochemie

LKIS – laboratoř klinické imunologie a sérologie

VKK – vnitřní kontrola kvality

### **Fáze před vyšetřením (příprava pacienta)**

Pro obvyklé vyšetřování je vhodný odběr ráno, nalačno. Speciální příprava pacienta před odběrem žilní krve není nutná.

### **Systém primárního vzorku**

Vyšetření se provádí ze séra popř. plazmy, krev je odebírána do zkumavek s protisrážlivými činidly (popřípadě EDTA, heparin nebo citrát). Pokud se test provede do sedmi dnů od odběru vzorků, vzorky se uchovávají v lednici při teplotě 2-8°C; jinak se uchovávají zmražené při –20°C a níže. Po rozmrazení se musí vzorky před testováním dobře promíchat. Minimální požadovaný objem vzorku je 170 µl (20 µl vzorek + 150 µl mrtvý objem).

### **Manipulace s materiálem**

Vzorky krve je třeba doručit do laboratoře tak, aby mohly být zpracovány co nejdříve po odběru. Vzorky pro potřebu laboratorního vyšetřování jsou přijímány pracovníky na příjmu biologického materiálu, kteří byli náležitě poučeni o podmínkách příjmu, evidence v LIS, označení odběrových zkumavek, přípravy a skladování vzorků biologického materiálu před laboratorním vyšetřením. Podmínky příjmu a skladování vzorků definovány viz. *BS3 Směrnice pro příjem primárních vzorků*.

### **Přístroje a pomůcky**

- Centrifuga Eppendorf

- Automatická pipeta jednokanálová 100 – 1000 µl
- Dělená pipeta 5 ml
- Dělená pipeta 2 ml
- Dělená pipeta 10 ml
- Analyzátor LIAISON® XL
- Latexové bezprašné rukavice
- Kontejnery na infekční odpad
- LIAISON® XL Cuvettes
- LIAISON® XL Disposable Tips
- LIAISON® XL Starter Kit
- LIAISON® Wash/System Liquid
- LIAISON® XL Waste Bags
- LIAISON® XL Cleaning Tool

## Činidla a reagensie

### Chemikálie a reagensie

- Kontroly LIAISON® Borrelia IgG (negativní a pozitivní) ([REF] 310881).  
Kontroly LIAISON® Borrelia IgG Liquor (negativní a pozitivní) ([REF] 310882).
- Kalibrátor 1 (3,8 mL) [CAL|1] Lidské sérum/plazma s nízkými hladinami protilátek třídy IgG proti Borrelia burgdorferi, hovězí sérový albumin, fosfátový pufr, 0,2% ProClin® 300, neutrální žluté barvivo. Koncentrace kalibrátorů (AU/mL) je vztažena na preparáty protilátek užívané v laboratoři.
- Kalibrátor 2 (3,8 mL) [CAL|2] Lidské sérum/plazma s vysokými hladinami protilátek třídy IgG proti Borrelia burgdorferi, hovězí sérový albumin, fosfátový pufr, 0,2% ProClin® 300, neutrální modré barvivo. Koncentrace kalibrátorů (AU/mL) je vztažena na preparáty protilátek užívané v laboratoři
- Roztok k ředění vzorků (28 mL) [DIL|SPE] Hovězí sérový albumin, fosfátový pufr, 0,2% ProClin® 300, neutrální žluté barvivo.
- Konjugát (23 mL) [CONJ] Myší monoklonální protilátky proti lidskému IgG konjugované s derivátem isoluminolu, hovězí sérový albumin, PBS pufr, 0,2% ProClin® 300, ochranné látky
- Magnetické částice ( 2,3 ml) SORB- Magnetické částice (2,3 mL) [SORB] Magnetické částice potažené rekombinantním antigenem Borrelia burgdorferi VlsE (získaný z E. coli), hovězí sérový albumin, PBS pufr, < 0,1% azidu sodného

## **Spotřební materiál**

- Zkumavky plastové
- Latexové rukavice
- Kontejnery na infekční odpad – malé
- Kontejnery na infekční odpad – velké (koš)
- Stojánky
- Kádinky
- Špičky

## **Postupy kalibrace**

Test kalibrátorů specifických pro stanovení umožňuje upravit přiřazenou vzorovou křivku pomocí detekovaných hodnot relativních světelných jednotek (RLU). Každý roztok kalibrátoru umožňuje provedení osmi kalibrací. Trojnásobná kalibrace je nutná, když dojde k alespoň jedné z následujících situací:

- Začne se používat nová šarže startéru.
- Poslední kalibrace byla provedena před více než jedním týdnem.
- Pokaždé, když je použita nová šarže integrálu.
- Po údržbě analyzátoru.
- Kontrolní hodnoty přesahují požadovaná rozpětí.

LIAISON® XL Analyzer: Hodnoty kalibrátoru jsou uvedeny na radiofrekvenčním identifikačním transpondéru (Radio Frequency IDentification transponder, štítek RFID).

## **Pracovní postup**

### **Příprava reagensů**

#### **Resuspendace magnetických částic**

Před vložením integrálu do zařízení je nutné magnetické částice zcela resuspendovat. Aby mohlo dojít ke kompletní resuspendaci, postupujte podle kroků uvedených níže:

- Před odstraněním krytu z lahvičky otáčejte malým kolečkem v části s magnetickými částicemi tak dlouho, až se suspenze zbarví dohněda.
- Resuspendaci magnetických částic můžete napomoci jemným a opatrným obracením lahvičky ze strany na stranu (zabraňte vzniku pěny).
- Zrakem zkontrolujte dno lahvičky s magnetickými částicemi a ujistěte se, že došlo k resuspendaci všech usazených magnetických částic.
- Opatrně otřete povrch všech stěn a odstraňte reziduální tekutinu.
- Opakujte dle potřeby tak dlouho, až zcela dojde k resuspendaci magnetických částic.

## **Zpěnění reagensí**

Pro optimální funkčnost integrálu nesmí dojít ke zpěnění reagensí. Aby k tomu nedošlo, dodržujte níže uvedená doporučení:

- Před použitím zrakem zkontrolujte reagensie a zvláště kalibrátory (pozice dvě a tři po lahvičce s magnetickými částicemi), zda neobsahují pěnu.
- Jestliže se po resuspendaci magnetických částic objeví pěna, vložte integrál do zařízení a nechte pěnu zmizet.
- Jakmile se pěna ztratí a integrál je v přístroji a míchá se, je integrál připraven k použití.

## **Vložení integrálu na místo určené pro reagensie**

Analyzátor LIAISON® XL má vestavěné magnetické zařízení, které napomáhá disperzi mikročástic před tím, než se reagenční integrál dostane na místo v analyzátoru určené pro reagensie. Podrobnosti jsou uvedeny v příručce k analyzátoru.

- Vložte reagenční integrál na určené místo.
- Ponechejte reagenční integrál v magnetickém zařízení po dobu alespoň 30s (až několik minut). Podle potřeby opakujte.
- Vložte reagenční integrál do analyzátoru na místo určené pro reagensie tak, aby byl štítek obrácen na levou stranu.
- Před použitím ponechejte reagensie v klidu po dobu 15 min. Analyzátor automaticky rozmíchá a zcela resuspenduje magnetické částice.
- Dle návodu k obsluze analyzátoru rozmístěte vyšetřované vzorky a zahajte analýzu.

## **Uchovávání a stabilita reagenčního integrálu**

Dle návodu se musí reagenční integrál skladovat ve vertikální poloze. Usnadní to resuspendaci magnetických částic. Reagensie reagenčního integrálu si uchovávají stabilitu až do uplynutí expirační doby, jsou-li skladovány neotevřené, ve svislé poloze a při teplotě 2-8°C. Nezmrazujte. Reagenční integrál by neměl být užíván po uplynutí expirační doby uvedené na soupravě a na štítku reagenčního integrálu. Po otevření je reagenční integrál stabilní osm týdnů a pokud není v přístroji, měl by být uchováván při teplotě 2-8°C.

## **Příprava kontrol**

Lahvičky s kontrolami vložte do analyzátoru LIAISON® do stojánek typu C. Každý roztok s kontrolou umožňuje provedení alespoň 20 testů. Minimální požadovaný objem je 420 µl (20 µl kontroly + 400 µl mrtvý objem). V okamžiku použití ekvilibrujte kontroly na teplotu laboratoře (20-25°C) ještě před otevřením lahviček a v přístroji je uchovávejte pouze po dobu nutnou pro kontrolu kvality. Po použití uzavřete lahvičky a skladujte je při teplotě 2-8°C ve

vertikální poloze. Při manipulaci dodržujte příslušná opatření, abyste zamezili bakteriální kontaminaci kontrol. Po dodání se musí kontroly skladovat při 2-8°C ve vertikální poloze, aby se zamezilo přilnutí roztoku k víčku lahvičky. Nezmrazujte. Pokud jsou kontroly skladovány v uzavřeném obalu a ve vertikální poloze, jsou při teplotě 2-8°C stabilní až do data expirace. Po otevření jsou kontroly stabilní po dobu osmi týdnů při správném skladování při teplotě 2-8°C mezi dvěma následujícími použitími. Kontroly by neměly být používány po uplynutí lhůty expirace vyznačené na štítcích lahviček.

Při testování se musí přesně dodržovat pokyny v manuálu k analyzátoru LIAISON® XL. Všechny parametry testu jsou určeny dle informací zakódovaných ve vysokofrekvenčním identifikačním transpondéru (Radio Frequency IDentification transponder, štítek RFID). Je-li štítek RFID nečitelný, nelze integrál použít a je nutné ho zlikvidovat. Podrobnosti jsou uvedeny v příručce k analyzátoru.

Postup práce s analyzátozem:

1. Dávkování kalibrátorů, kontrol nebo vzorků do reakčního modulu.
2. Dávkování potažených magnetických částic.
3. Dávkování roztoku k ředění vzorků.
4. Inkubace.
5. Promývání promývacím/systémovým roztokem.
6. Dávkování konjugátu do reakčního modulu.
7. Inkubace.
8. Promývání promývacím/systémovým roztokem.
9. Přidání startéru a měření vyzářeného světla.

Provedení údržby čisticím nástrojem LIAISON® XL Cleaning Tool (podrobné údaje viz. návod k použití čisticího nástroje LIAISON® XL Cleaning Tool).

### **Postupy řízení kvality**

Kontrola kvality je stanovována denně, vždy na počátku dne, na dvou kontrolních hladinách, při výměně reagensů, po kalibraci metody a servisním zásahu.

Deklarované hodnoty jsou vyznačeny v příbalovém letáku a automaticky převedeny do analyzátoru.

Externí kontrola kvality se zajišťuje účastí v EHK (SZU Praha).

### **Interference a zkřížené reakce**

Kontrolované studie potenciálně interferujících látek a faktorů ukázaly, že výsledky testu nejsou ovlivněny antikoagulancii (citrát sodný, EDTA, heparin), hemolýzou (až do 1000

mg/dl hemoglobinu), lipémií (až do 3000 mg/dl triglyceridů), bilirubinémií (až do 20 mg/dl bilirubinu) a cykly zmražení-rozmražení.

Výsledky testu neovlivňují potenciálně zkříženě reagující protilátky. Mezi prověřované protilátky byly zařazeny:

- protilátky proti různým infekčním agens (hCMV, HSV, HHV 6, VZV, parvovirus B19, HAV, Toxoplasma gondii, Mycoplasma pneumoniae)
- anti-nukleární (ANA) protilátky a revmatoidní faktor (anti-Fc imunoglobulin).

Studie na zkříženou reaktivitu testu LIAISON® EBV IgM byla vytvořena pro vyhodnocení potenciální interference protilátek s jinými patogeny (hCMV, parvovirus B19, Toxoplasma gondii, virus zarděnek, HBV, HAV, HSV, Treponema pallidum, VZV, spalničkový virus, virus příušnic, Borrelia burgdorferi, chřipkové viry) a i jiných onemocnění, jejichž původ může být v atypické aktivitě imunitního systému (antinukleární autoprotilátky, revmatoidní faktor). Vzorky pro tyto studie byly předem vyhodnoceny jiným komerčně dostupným testem IgM proti EBV. Jestliže byly vzorky negativní na protilátky IgM proti EBV, pak byly tyto vzorky použity pro studii potenciální zkřížené reaktivity. Přítomnost potenciálních zkříženě reagujících látek ve vzorcích byla detekována pomocí CE označených testů.

### **Výpočet a vyjádření výsledků**

#### **Borrelia IgG**

Analyzátor automaticky vypočítá koncentraci IgG protilátek proti Borrelia burgdorferi ve formě arbitrárních jednotek (AU/mL) a vyhodnotí výsledky. Podrobnosti jsou uvedeny v příručce k analyzátoru. V analyzátoch LIAISON® a LIAISON® XL mohou kalibrátory a kontroly vykazat různé výsledky relativních světelných jednotek (RLU) nebo koncentrace, ale výsledky vyšetření vzorků pacientů jsou ekvivalentní.

Rozsah testu. 5-240 AU/mL protilátek třídy IgG proti Borrelia burgdorferi. Vzorky s hladinou protilátek vyšší než rozsah testu mohou být předředěny diluční funkcí přístroje a znovu testovány (doporučený diluční faktor je 1:10). Výsledky jsou automaticky vynásobeny dilučním faktorem, čímž jsou získány skutečné hladiny protilátek. Zásoba roztoku k ředění vzorků v reagenčním integrálu vystačí pro 10 předředění.

#### **Borrelia IgM**

Analyzátor automaticky vypočítá koncentrace IgM protilátek proti Borrelia burgdorferi jako indexy a výsledky vyhodnocuje. Podrobnosti jsou uvedeny v příručce k analyzátoru. V analyzátoch LIAISON® a LIAISON® XL mohou kalibrátory a kontroly vykazat různé výsledky relativních světelných jednotek (RLU) nebo koncentrace, ale výsledky vyšetření vzorků pacientů jsou ekvivalentní.

Rozsah testu. 0,1 až 6 hodnoty indexu protilátek třídy IgM proti Borrelia burgdorferi.

## **Biologické referenční hodnoce:**

Výsledek vyšetření je přenesen do systému OPENLIMS.

### **Interpretace Borrelia IgM:**

Vzorky s hodnotou indexu IgM protilátek proti *Borrelia burgdorferi* nižší než 0,9 by měly být hodnoceny jako negativní.

Vzorky s hodnotou indexu IgM protilátek proti *Borrelia burgdorferi* v rozmezí 0,9 až 1,1 se považují za nejasné.

Vzorky s hodnotou indexu IgM protilátek proti *Borrelia burgdorferi* rovnou nebo vyšší než 1,1 by měly být hodnoceny jako pozitivní.

### **Interpratace Borrelia IgG:**

Vzorky s koncentrací IgG protilátek proti *Borrelia burgdorferi* nižší než 10 AU/mL by měly být hodnoceny jako negativní.

Vzorky s koncentrací IgG protilátek proti *Borrelia burgdorferi* v rozmezí 10 až 15 AU/mL se považují za nejasné.

Vzorky s koncentrací IgG protilátek proti *Borrelia burgdorferi* rovnou nebo vyšší než 15 AU/mL by měly být hodnoceny jako pozitivní

## **Varovné/kritické hodnoty**

Nejsou.

## **Laboratorní protokol a interpretace výsledků**

Konzultační činnost laboratoře je prováděna denně telefonicky laboranty a vysokoškolskými pracovníky, kteří jsou kompetentní poskytnout informace. Způsobilí VŠ pracovníci, tam kde to uznají za vhodné, poskytují informace k výsledkům také formou komentářů, které jsou součástí výsledkové zprávy. Turn around time (TAT, čas od přijetí vzorku po vytištění výsledku) je uveden v laboratorní příručce. Výsledky jsou uvolňovány kvalifikovanými pracovníky viz. BS4 Směrnice pro vydávání výsledků.

## **Preventivní bezpečnostní opatření**

Činidla soupravy nejsou klasifikována jako nebezpečná. Je nutné dodržovat obecné zásady bezpečnosti práce podle ČSN 01 8003, ale i zásady práce s biologickým materiálem, který může být zdrojem přenosu některých infekcí. Zejména je třeba zachovávat pravidla osobní hygieny, používat osobní ochranné pracovní prostředky (oděv, obuv apod.), při práci nejíst, nepít a nekouřit. Po práci a před jídlem omýt pokožku především rukou teplou vodou

a mýdlem a ošetřit vhodným reparačním krémem.

### **První pomoc**

Při náhodném požití se vypláchnou ústa a vypije se asi 1/2 litru vody, při vniknutí do oka provést rychlý a důkladný výplach proudem čisté vody. Při potřísnění omýt pokožku teplou vodou a mýdlem. Ve všech vážných případech poškození zdraví vyhledat lékařskou pomoc.

### **Likvidace odpadů**

Na všechny zpracované vzorky je nutné pohlížet jako na potenciálně infekční a spolu s případnými zbytky činidel je likvidovat podle vlastních interních předpisů jako nebezpečný odpad viz. *BR1 Provozní řád*. Papírové a ostatní obaly se likvidují podle druhu materiálu jako tříděný odpad (papír, sklo, plasty).

### **Potenciální zdroje odchylek**

Bakteriální kontaminace nebo tepelná inaktivace mohou ovlivnit výsledky testu. Integrál se nesmí vyměňovat mezi jednotlivými typy analyzátorů (LIAISON® a LIAISON® XL). Jakmile je integrál jednou vložen do určitého typu analyzátoru, musí se v daném analyzátoru používat tak dlouho, až bude zcela vypotřebovaný.

### **Literatura**

Příbalový leták.

### **Související dokumentace a přílohy**

BR1 Provozní řád

BS3 Směrnice pro příjem primárních vzorků

BS4 Směrnice pro vydávání výsledků

CE5/LKIS

BS11 Směrnice vnitřní kontroly kvality

Příloha č.1 Verifikační protokoly anti-borelia IgG, IgM

Příloha č.2 Příbalové letáky

### 11.3 Příloha 3

Typ dokumentu:	Interní	Platnost od:	2.3.2015
----------------	---------	--------------	----------

## STANDARDNÍ OPERAČNÍ POSTUP

### **Stanovení protilátek proti boreliím ve třídách IgG, IgM metodou WesternBlot**

	Jméno:	Funkce:	Podpis:	Datum:
Vypracova l:	Mgr.M.Jindřichová	OP		2.3.2015
Schválil:	RNDr.I.Lochman,CSc.	VLKIS		2.3.2015

## Účel vyšetření

*Borrelia burgdorferi sensu lato* je mikroaerofilní pohyblivá G- spirochéta. Je původcem lymeské boreliózy. *Borrelia burgdorferi sensu lato* se na podkladě vlastností genetických, fenotypových a imunologických dělí na 4 genospecies -*B. burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii*, *B. afzelii* a *B. japonica*. *B. burgdorferi sensu stricto* se vyskytuje na celém světě, ale jako jediná v severní Americe; *B. garinii* a *B. afzelii* v Evropě, *B. japonica* v Japonsku. V České republice jsou původcem boreliózy zejména druhy *B. garinii* a *B. afzelii*, *B. burgdorferi sensu stricto* jen zřídka. Přenáší se klíšťaty druhu *Ixodes ricinus*.

Stanovení specifických protilátek proti boreliím ve třídách IgM a IgG je zatím nejlepší možností průkazu infekce. Existuje řada úskalí v interpretaci sérologických nálezů (pomalý nástup tvorby protilátek v raném stádiu onemocnění, nedostatečná protilátková odpověď u některých pacientů, poměrně časté zkřížené reakce (lues, EBV, CMV, autoimunity) a s tím související přítomnost falešně pozitivních nálezů.

Protilátky třídy IgM jsou detekovatelné 3 – 4 týdny po přisátí klíštěte. Za 1 – 3 měsíce jsou odbourány, mohou však přetrvávat i několik měsíců. V případě hraničního nálezu je vhodný další odběr za 3 – 6 týdnů. U pozitivního nálezu se doporučuje odběr za 2 – 3 měsíce od zahájení terapie. Protilátky třídy IgG se objevují 4 – 8 týdnů po infekci, jsou někdy poměrně brzy odbourány (za 1 rok), ale mohou přetrvávat i mnoho let. U borelií nemají IgG protilátky protektivní charakter.

K detekci protilátek proti *Borrelia burgdorferi* přicházejí v úvahu různé techniky: ELISA, imunofluorescence, pasivní hemaglutinace a immunoblot. Mnozí používají ELISA test paralelně s nepřímou imunofluorescencí k předběžnému zhodnocení vzorku séra.

Podle nařízení platných v USA a Německu musí serologická diagnóza dodržovat princip procedury o dvou krocích: ELISA nebo nepřímá imunofluorescence jako první krok, je-li reaktivní následuje Westernblot. U čerstvých infekcí se doporučuje provést paralelně ELISA/IIFT a Westernblot, protože některé slabší reakce dokáže Westernblot detekovat dříve než screeningové testy. VlsE jako nejcitlivější antigen k detekci IgG protilátek a Osp C k detekci IgM protilátek by měly být v testu zahrnuty. Dodatečným stanovením protilátek proti VlsE lze zvýšit úspěšnost detekce o 20% ve srovnání s celo-extraktovými Westernbloty a o 30% ve srovnání s Westernbloty s rekombinantním antigenem. Ze všech testovaných rekombinantních antigenů má nejvyšší citlivost při detekci boreliové infekce.

## Princip postupu vyšetření

IgG: EUROLINE-WB test umožňuje kvalitativní in-vitro stanovení lidských protilátek proti boreliovým antigenům v seru a plazmě. Test obsahuje stripu s elektroforeticky

rozdělenými extrakty antigenů z *Borrelia afzelii*. Každý strip obsahuje membránu s rekombinantním antigenem VlsE (Variable major protein-like sequence, expressed). Stripy blotu jsou blokovány a v prvním reakčním kroku se inkubují s naředěnými patientskými vzorky. V případě pozitivních vzorků se specifické protilátky třídy IgG (také IgA a IgM) naváží na antigeny. K detekci navázaných protilátek slouží druhá inkubace pomocí enzymově značeného anti-lidského IgG (enzymový konjugát), při které dochází k barevné reakci.

IgM: Testovací souprava WESTERNBLOT nabízí kvalitativní in-vitro zkoušku na lidské protilátky třídy IgM proti *Borrelia afzelii* v séru nebo plazmě. Testovací souprava obsahuje testovací stripy s elektroforeticky separovanými antigenovými extrakty *Borrelia afzelii*. V prvním reakčním kroku dochází k blokování blotovacích stripů a inkubaci s naředěnými patientskými vzorky. Jsou-li vzorky pozitivní, naváží se na antigeny specifické protilátky třídy IgM (a IgA, IgG). Vázané protilátky se poté detekují při druhé inkubaci, která probíhá za použití enzymově značeného anti-lidského IgM (enzymový konjugát), který spustí barevnou reakci.

#### **Místo provádění postupu**

- Diagnostická laboratoř, pracoviště č. 1: Laboratoř klinické imunologie a sérologie, Dr. Martínka 1491/7, Ostrava 700 30

–

#### **Specifikace funkce**

Verifikace metody Imunoblot spočívá v pravidelném zařazování pozitivního kontrolního vzorku (firemní pozitivní kontrola) a zároveň je součástí každého blotu kontrolní proužek.

#### **Použitá terminologie a zkratky**

EHK – externí hodnocení kvality

SEKK – systém externí kontroly kvality

LKIS – laboratoř klinické imunologie a sérologie

LIS – laboratorní informační systém

VKK – vnitřní kontrola kvality

#### **Fáze před vyšetřením (příprava pacienta)**

Pro obvyklé vyšetřování je vhodný odběr ráno, nalačno. Speciální příprava pacienta před odběrem žilní krve není nutná.

#### **System primárního vzorku**

##### Odběr

- vyšetření se provádí ze séra popř. plazmy, krev je odebírána do zkumavek s protisrážlivými činidly (popřípadě EDTA, heparin nebo citrát).

- vzorky krve jsou centrifugovány po dobu 10 min. při 4000ot/s.; případné sraženiny ve vzorku jsou před testováním odstraněny; kontaminovaná, hyperlipemická nebo silně hemolytická séra popř. plazma nejsou vyšetřována.

#### Uchování

- vzorky jsou uchovávány při teplotě +2°C – 8°C max. po dobu 7 dní, poté jsou uchovávány 1 měsíc při teplotě -20°C - po tuto dobu je možné si zažádat o další či doplňující vyšetření.
- vzorky se nesmí opakovaně rozmrazovat.

#### **Manipulace s materiálem**

Vzorky krve je třeba doručit do laboratoře tak, aby mohly být zpracovány co nejdříve po odběru. Vzorky pro potřebu laboratorního vyšetřování jsou přijímány pracovníky na příjmu biologického materiálu, kteří byli náležitě poučeni o podmínkách příjmu, evidence v LIS, označení odběrových zkumavek, přípravy a skladování vzorků biologického materiálu před laboratorním vyšetřením. Podmínky příjmu a skladování vzorků definovány viz. *BS3 Směrnice pro příjem primárních vzorků.*

#### **Přístroje a pomůcky**

- Automatické pipety
- Vortex V1
- Biosan Mini Rocker MR 1 – Dynex
- Dynablot, Dynablot Automatic

#### **Činidla a reagensie**

##### **Chemikálie a reagensie**

Soupravy Anti-Borrelia EUROLINE-WB ( IgG) + Anti-Borrelia EUROLINE-RN-AT (IgG), Anti-Borrelia afzelii-WESTERNBLOT (IgM) + Anti- Borrelia EUROLIEN-RN-AT (IgM)

- Destilovaná voda

##### **Spotřební materiál**

- Zkumavky plastové
- Mikrozukavky
- Latexové rukavice
- Kontejnery na infekční odpad – malé
- Kontejnery na infekční odpad – velké (koš)

- Stojánky
- Kádinky
- Špičky

### **Postupy kalibrace**

Kalibrace se neprovádí

### **Pracovní postup**

Analýza je provedena na přístrojích Dynablot, popř. Dynablot Automatic. Protokol je označen datem analýzy a zkratkou vyšetření „Borelia WB“. Vyhodnocení je prováděno automaticky v SW EUROLiScan.

### **Postupy řízení kvality**

Součástí každého WB-linedot je kontrolní pozitivní band. Pravidelně je zařazována firemní pozitivní kontrola.

Externí kontrola kvality se zajišťuje účastí v EHK (SZÚ).

### **Interference a zkřížené reakce**

Kvalita použitých antigenů (celý antigen, SDS extrakt v kombinaci s rekombinantním VlsE) garantuje vysokou specifitu Westernblotu. Stanovení zkřížených reakcí není u EUROLiNE Westernblotu nezbytné, protože u tohoto testu je možná diferenciacce mezi specifickými a nespecifickými/zkříženě reagujícími antigeny.

### **Výpočet a vyjádření výsledků**

Vyhodnocení se provádí v SW EUROLiScan, hodnocení provádí odborný pracovník.

V případě pozitivní reakce (přítomnost autoprotilátek ve vyšetřovaném séru) se na místě naneseného antigenu objeví barevný proužek (band). Správné provedení inkubace je potvrzeno přítomností barevného kontrolního proužku („function control“).

Hodnocení SW:	0	negativní
	(+)	hraniční
	+	slabě pozitivní
	++	pozitivní
	+++	silně pozitivní

Z přístroje je vytištěn protokol s jednotlivými stripy, který je přiložen k P/p protokolu

tištěném z počítačového programu OpenLims. P/p protokol obsahuje: název vyšetření, identifikační kód vzorku (laboratorní číslo a jméno pacienta), datum analýzy, parafu pracovníka, který vyšetření provedl, parafu pracovníka, který vyšetření hodnotil a dále číslo šarže a expiraci použité diagnostické soupravy. Výsledky vyšetření jsou zapsány do počítačového programu OpenLims.

### **Biologické referenční rozmezí**

Negativní.

### **Varovné/kritické hodnoty**

Nejsou.

### **Laboratorní protokol a interpretace výsledků**

Konzultační činnost laboratoře je prováděna denně telefonicky laboranty a vysokoškolskými pracovníky, kteří jsou kompetentní poskytnout informace. Způsobilí VŠ pracovníci, tam kde to uznají za vhodné, poskytují informace k výsledkům také formou komentářů, které jsou součástí výsledkové zprávy. Turn around time (TAT, čas od přijetí vzorku po vytištění výsledku) je uveden v laboratorní příručce. Výsledky jsou uvolňovány kvalifikovanými pracovníky viz. BS4 Směrnice pro vydávání výsledků.

IgM protilátky proti specifickým boreliovým antigenům jiným než OspC nepotvrzují definitivně čerstvou boreliovou infekci.

Při serologickém sledování boreliové infekce poskytuje stanovení protilátek ve třídě IgM často nejasné výsledky. IgM protilátky mohou být nalezeny roky po infekci nebo antibiotické léčbě. Proto zjištění IgM protilátek nemusí nezbytně indikovat čerstvou infekci. Negativní IgM protilátky nevylučují čerstvou infekci. Při druhé infekci se vytvářejí jen protilátky IgG a nikoli IgM.

V pozdějším stádiu boreliózy pozitivní výsledek IgM neposkytuje doplňkovou informaci vzhledem k perzistenci protilátek, jak bylo zmíněno výše. Výskyt takových falešně pozitivních IgM protilátek však zůstává nejasný. Jsou pozorovány, např. u inf.mononukleózy, herpetické infekce a různých autoimunních onemocnění.

Pro diagnózu čerstvé boreliové infekce by měl být pozitivní IgM výsledek potvrzen pozitivním IgG výsledkem opakovaným odběrem za 3–6 týdnů později.

### **Preventivní bezpečnostní opatření**

Činidla soupravy nejsou klasifikována jako nebezpečná. Je nutné dodržovat obecné zásady bezpečnosti práce podle ČSN 01 8003, ale i zásady práce s biologickým materiálem, který může být zdrojem přenosu některých infekcí. Zejména je třeba zachovávat pravidla osobní hygieny, používat osobní ochranné pracovní prostředky (oděv, obuv apod.), při práci nejíst,

nepít a nekouřit. Po práci a před jídlem omýt pokožku především rukou teplou vodou a mýdlem a ošetřit vhodným reparačním krémem.

### **První pomoc**

Při náhodném požití se vypláchnou ústa a vypije se asi 1/2 litru vody, při vniknutí do oka provést rychlý a důkladný výplach proudem čisté vody. Při potřísnění omýt pokožku teplou vodou a mýdlem. Ve všech vážných případech poškození zdraví vyhledat lékařskou pomoc.

### **Likvidace odpadů**

Na všechny zpracované vzorky je nutné pohlížet jako na potencionálně infekční a spolu s případnými zbytky činidel je likvidovat podle vlastních interních předpisů jako nebezpečný odpad viz. *BR1 Provozní řád*. Papírové a ostatní obaly se likvidují podle druhu materiálu jako tříděný odpad (papír, sklo, plasty).

### **Možné zdroje variability**

Odběrová fáze, pipetování, automatické zpracování blotů

### **Literatura**

- Encyklopedie laboratorní medicíny pro klinickou praxi.
- Kolektiv autorů. Preanalytická fáze.
- Příbalový leták Soupravy Anti-Borrelia EUROLINE-WB ( IgG) + Anti-Borrelia EUROLINE-RN-AT (IgG), Anti-Borrelia afzelii-WESTERNBLOT (IgM) + Anti-Borrelia EUROLIEN-RN-AT (IgM)
- Votava, J. Lékařská mikrobiologie

### **Související dokumentace a přílohy**

BR1 Provozní řád

BS3 Směrnice pro příjem primárních vzorků

BS4 Směrnice pro vydávání výsledků

CE5/LKIS

BS11 Směrnice vnitřní kontroly kvality

Manuál č.9 – Příručka pro obsluhu a údržbu Dynablot

Manuál č. 10 – Servisní příručka pro Dynablot

Manuál č. 16- Manuál Dynablot |Automatic

Příloha č.1 Zkrácený postup Stanovení protilátek pro boreliíím metodou Westernblot

Příloha č.2 Příbalový leták Soupravy Anti-Borrelia EUROLINE-WB ( IgG) + Anti-Borrelia EUROLINE-RN-AT (IgG), Anti-Borrelia afzelii-WESTERNBLOT (IgM) + Anti- Borrelia EUROLIEN-RN-AT (IgM )

Příloha č.3 Šablony pro odečítání (CD01/LKIS/č. 7)

Příloha č.4 Listy kvality přiložené ke každé nové šarži soupravy Anti-Borrelia EUROLINE-RN-AT (IgG) + Anti- Borrelia EUROLIEN-RN-AT (IgM) - (CD01/LKIS/č.7)

Příloha č. 5 Srovnání stanovení protilátek proti boreliím pomocí WB na přístrojích Dynablot

a Dynablot Automatic (Dynex) pomocí souprav Firmy Euroimmun Borelia WB

Příloha č. 6 Srovnání stanovení protilátek proti boreliím pomocí WB na přístrojích Dynablot

Automatic (inv.č.05-PT-015) a Dynablot Automatic (inv.č.05-PT-040)

## 11.4 Příloha 4

### **Zkrácený postup ke stanovení protilátek proti boreliím ve třídě IgG a IgM metodou WesternBlot**

**Souprava:** Euroline Soupravy Anti-Borrelia EUROLINE-WB ( IgG) + Anti-Borrelia EUROLINE-RN-AT (IgG), Anti-Borrelia afzelii-WESTERNBLOT (IgM) + Anti- Borrelia EUROLIEN-RN-AT (IgM)

**Číslo metody v LIS: 1049, 1050**

#### **Uložení setu, vzorků:**

**souprava** – uchováváme na suchém místě v chladničce při teplotě 2-8°C, po otevření souprava vydrží 2 měsíce při teplotě 2-8°C.

**vzorky** – sérum, plasma (EDTA, heparin, citrát) při teplotě 2-8°C do 7 dní, pokud déle vzorky zmrazíme na -20°C.

#### **Příprava reagensů, firemních kontrol a vzorků :**

- **vzorky a firemní pozitivní kontrolu** ředíme **1 : 51** tj. 30µl séra + 1,5 ml nař. universal buffer.
- **Universal buffer**- ředíme 10x (1 strip:.1,5ml universal buffer + 13,5ml destilované vody). Tímto roztokem ředíme i vzorky, ředíme tak asi na 100ml.
- **konjugát** - ředíme 10x (1 strip: 150 µl konjugátu + 1,35 ml naředěného univerzálního pufu).
- **substrát** je připraven k použití

**Externí kontroly kvality:** pravidelná účast EHK Praha.

#### **Pracovní postup :**

Před použitím necháme vytemperovat reagensie na laboratorní teplotu. Vyšetření probíhá na blotovacím automatu Dynablot (program č.1):

Při otevření nové soupravy umístíme do série interní kontrolu.

1. Testovací proužek vložíme do kanálku. Je přidáno 1,5 ml např. univerzálního pufu.
2. Inkubace 15 min.

3. Odsátí.
4. Aplikace 1,5 ml naředěného séra (popř. firemní kontrolu), (můžeme provést i tak, že do kanálku dáme 1,5 ml naředěným Universal buffer a pak 30 $\mu$ l séra).
5. Inkubace 30 min.
6. Odsátí.
7. Promytí 3x 5 min. naředěným univerzálním roztokem ( 1,5 ml univerz. pufru , 5 min třepání, odsátí )
8. Aplikace 1,5 ml naředěného konjugátu,(lze provést i tak, že do kanálku dáme 1,35 ml sample buffer a 150 $\mu$ l konjugátu).
9. Inkubace 30 min.
10. Odsátí.
11. Promytí 3x 5 min. promývacím pufrům jako v bodě č.7.
12. Aplikace 1,5 ml substrátu.
13. Inkubace 10 min (chránit před světlem).
14. Odsátí.
15. Promytí 3x 1 min. destilovanou vodou.
16. Bloty nalepíme na předtištěnou zelenou podložku a předložíme k vyhodnocení odbornému pracovníkovi.

Nalepené bloty vyhodnocuje vysokoškolsky vzdělaný odborný pracovník pomocí scanneru a programu SW EUROLinScan (hodnocení 0 negativní ,(+) hraniční, + slabě pozitivní, ++ pozitivní,+++ silně pozitivní).Tento program vyhodnotí každého pacienta zvlášť. Odborný pracovník zkontroluje každého pacienta s přiloženou šablonou (dle dané šarže), zda scanner vyhodnotil správně.

V případě, že je vše v pořádku, pracovník vytiskne souhrnný výpis všech výsledků blotů , který obsahuje číslo pacienta, příslušnou sérii šablony a den odečítání. Takto vytisknutý výsledek je poté přiložen k laboratornímu protokolu. Laboratorní protokol je označen jménem pracovníka zodpovědného za zpracování, jménem odečítajícího pracovníka, šarží a expirací soupravy.

Výsledek je vydáván tištěnou nebo elektronickou formou z LIS se jménem pracovníka zodpovědného za kontrolu všech výsledků oddělení imunologie a alergologie příslušného dne.

**Validita reakce:** zbarvení kontrolního bandu na proužku.

# 11.5 Příloha 5.:

## EUROLineScan - vyhodnocení

Protokol: 181215 Bor WB IgG,M  
 Operátor: DB Automatic

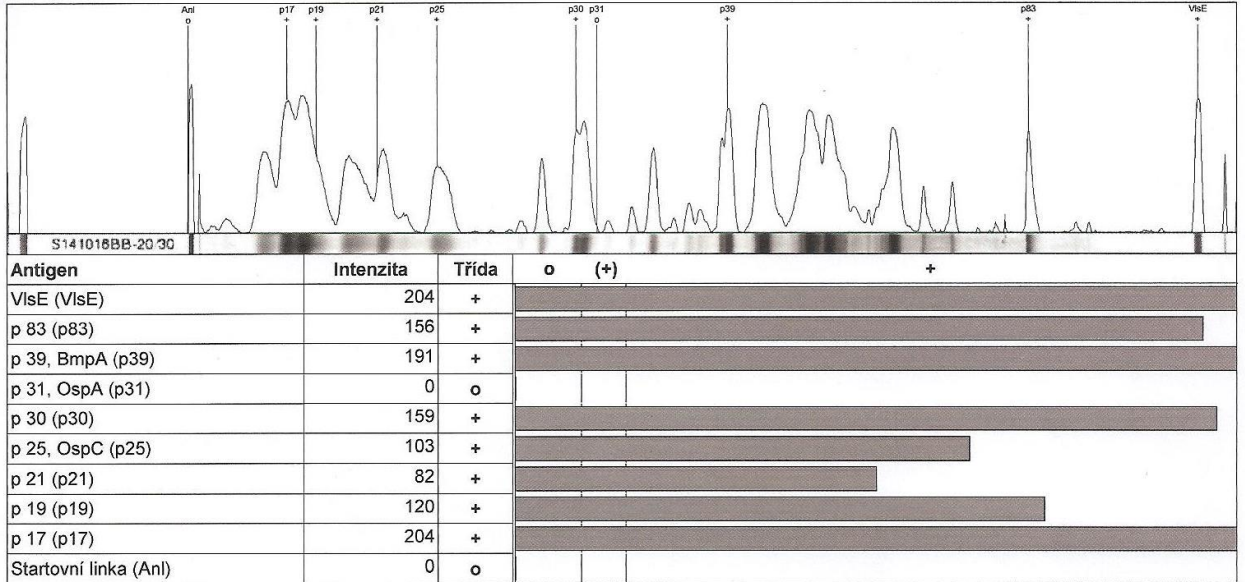
Datum: 18. 12. 2015  
 Tisk: 18. 12. 2015

Č	Pacient ID Test	EUROLINE / Allergy / EUROASSAY										Westernblot																								
		Zkratka										Výsledky					Zkratka																			
		Intenzita										Výsledek					Intenzita																			
		Char															Char																			
1	1512170039S Borrelia IgG	Anl p17 p19 p21 p25 p3p31 p39 p83 VisE																																		
		S141016BB-2024																																		
		negativní	Anl	p17	p19	p21	p25	p30	p31	p39	p83	VisE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0													
2	1512170040S Borrelia IgG	Anl p17 p19 p21 p25 p3p31 p39 p83 VisE																																		
		S141016BB-2025																																		
		pozitivní	Anl	p17	p19	p21	p25	p30	p31	p39	p83	VisE	0	0	0	0	86	12	0	0	0	0	22													
3	1512170197S Borrelia IgG	Anl p17 p19 p21 p25 p3p31 p39 p83 VisE																																		
		S141016BB-2026																																		
		pozitivní	Anl	p17	p19	p21	p25	p30	p31	p39	p83	VisE	0	56	0	10	27	0	0	0	0	0	115													
4	1512170201S Borrelia IgG	Anl p17 p19 p21 p25 p3p31 p39 p83 VisE																																		
		S141016BB-2027																																		
		negativní	Anl	p17	p19	p21	p25	p30	p31	p39	p83	VisE	0	0	0	0	0	6	4	6	0	0	8													
5	1512170246S Borrelia IgG	Anl p17 p19 p21 p25 p3p31 p39 p83 VisE																																		
		S141016BB-2028																																		
		pozitivní	Anl	p17	p19	p21	p25	p30	p31	p39	p83	VisE	0	0	0	0	7	0	0	13	0	0	157													
6	1512170363S Borrelia IgG	Anl p17 p19 p21 p25 p3p31 p39 p83 VisE																																		
		S141016BB-2029																																		
		pozitivní	Anl	p17	p19	p21	p25	p30	p31	p39	p83	VisE	0	56	0	0	116	52	0	8	0	0	42													
7	1512170480S Borrelia IgG	Anl p17 p19 p21 p25 p3p31 p39 p83 VisE																																		
		S141016BB-2030																																		
		pozitivní	Anl	p17	p19	p21	p25	p30	p31	p39	p83	VisE	0	204	120	82	103	159	0	191	156	0	204													
8	1512170635S Borrelia IgG	Anl p17 p19 p21 p25 p3p31 p39 p83 VisE																																		
		S141016BB-2031																																		
		pozitivní	Anl	p17	p19	p21	p25	p30	p31	p39	p83	VisE	0	13	0	0	24	18	48	5	12	0	145													
9	1512160142S BorrEL_IgM	Et Ko IgM IgG OspC Bg OspC Bb OspC Ba p39 p41 VisE-Bb																																		
		Bor-M/ 113-65																																		
		pozitivní	Et	Ko	IgM	IgG	OspC Bg	OspC Bb	OspC Ba	p39	p41	VisE-Bb	-1	113	78	-1	91	73	82	8	62	2	2													
10	1512170039S B. afzelii IgM	Pos p16 p17 p19 p21 p25 p28 p30 p31 p35 p39 p41 p43 p50 p60 p62 p75 p83																																		
		S140522BA-32/88																																		
		negativní	Pos	p16	p17	p19	p21	p25	p28	p30	p31	p35	p39	p41	p43	p50	p60	p62	p75	p83	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	1512170040S B. afzelii IgM	Pos p16 p17 p19 p21 p25 p28 p30 p31 p35 p39 p41 p43 p50 p60 p62 p75 p83																																		
		S140522BA-32/89																																		
		pozitivní	Pos	p16	p17	p19	p21	p25	p28	p30	p31	p35	p39	p41	p43	p50	p60	p62	p75	p83	0	0	0	0	0	32	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	1512170242S B. afzelii IgM	Pos p16 p17 p19 p21 p25 p28 p30 p31 p35 p39 p41 p43 p50 p60 p62 p75 p83																																		
		S140522BA-32/70																																		
		negativní	Pos	p16	p17	p19	p21	p25	p28	p30	p31	p35	p39	p41	p43	p50	p60	p62	p75	p83	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	1512170363S B. afzelii IgM	Pos p16 p17 p19 p21 p25 p28 p30 p31 p35 p39 p41 p43 p50 p60 p62 p75 p83																																		
		S140522BA-32/71																																		
		pozitivní	Pos	p16	p17	p19	p21	p25	p28	p30	p31	p35	p39	p41	p43	p50	p60	p62	p75	p83	0	0	0	0	0	55	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

## 11.6 Příloha 6.:

Pacient ID: 1512170480S  
 Vytvořit: 18. 12. 2015  
 Výsledky z: 18. 12. 2015

Test: Borrelia EUROLINE-WB IgG  
 jamka: 7



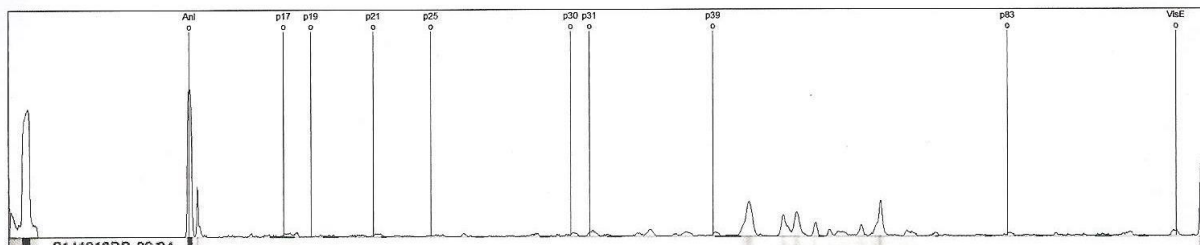
Test	Výsledek
Borrelia EUROLINE-WB IgG	pozitivní

Podpis: \_\_\_\_\_

## 11.7 Příloha 7:

Pacient ID: 1512170039S  
 Vytvořit: 18. 12. 2015  
 Výsledky z: 18. 12. 2015

Test: Borrelia EUROLINE-WB IgG  
 jamka: 1



Antigen	Intenzita	Třída	o	(+)	+
VlsE (VlsE)	0	o			
p 83 (p83)	0	o			
p 39, BmpA (p39)	0	o			
p 31, OspA (p31)	0	o			
p 30 (p30)	0	o			
p 25, OspC (p25)	0	o			
p 21 (p21)	0	o			
p 19 (p19)	0	o			
p 17 (p17)	0	o			
Startovní linka (AnI)	0	o			

Test	Výsledek
Borrelia EUROLINE-WB IgG	negativní

Podpis: \_\_\_\_\_