

# Laboratorní diagnostika neuroborreliózy

Hana Bílková Fránková  
CKL ZÚ Ostrava

Oddělení parazitologie a lékařské zoologie

15.6., 2011

[www.zu.cz](http://www.zu.cz)



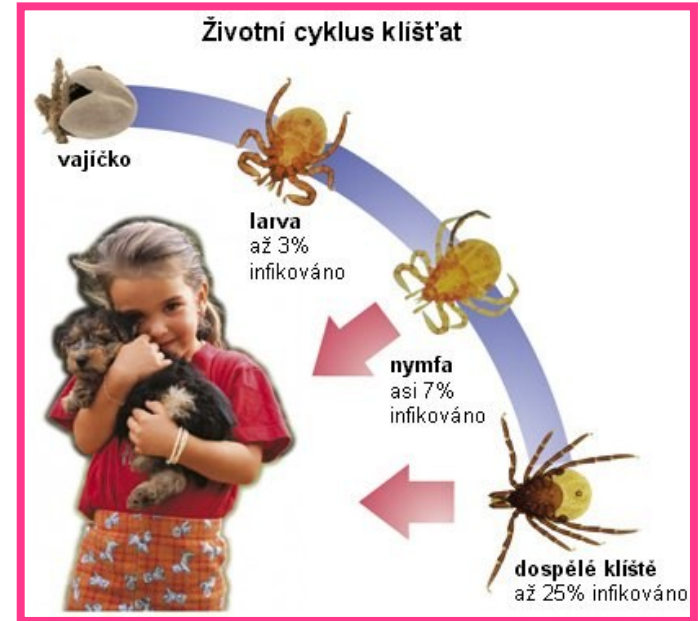
- ⊙ I. Krátce *Ixodes ricinus*
- ⊙ II. Diagnostika boreliózy
- ⊙ III. Diagnostická mozaika u neuroboreliózy
- ⊙ IV. Shrnutí výsledků z roku 2010
- ⊙ V. Novinky z laboratoří

# I. krátce... *Ixodes ricinus*... = nejmenší krevsající predátor

- Klíště preferuje vlhké teplé biotopy, nejhojnější je zhruba do 700-800 m n.m
- Nyní se však vyskytují běžně i výše, nejvyšší výskyt byl v ČR zjištěn ve výšce 1460 m v Jeseníkách. Klíšťata dnes žijí na rozlehlejších územích než dříve.
- Dospělci mají dvojrcholový výskyt, s kulminací na jaře (květnu) a na podzim (září)
- Český hydrometeorologický ústav připravuje v letní sezóně předpověď, která je k dispozici [www.chmi.cz](http://www.chmi.cz).



- Klíšata se vyskytují ve 4 vývojových stádiích:
- **vajíčko, šestinohá larva, osminohá nymfa a imago.**
- Doba celého vývoje kolísá mezi 1–6 lety, každé přeměně předchází sání. Jednotlivá stadia sají jen jednou, ale různě dlouhou dobu . Larvy sají 2-3 dny, nymfa saje 5-6 dnů, dospělá samice 10-12 dnů.
- Z vajíčka se vylíhne larva, která je velmi drobná - může uniknout pozornosti člověka! Měří přibližně 0,8 mm a má tři páry nohou. Když se nasaje, odpadne a prochází metamorfózou; dojde k přeměně všech larválních orgánů na orgány vyššího vývojového stupně - nymfa.
- Nymfa má již čtyři páry nohou, velikost asi 1,2 - 1,5 mm, ale nemá pohlavní otvor. Nymfa se už většinou přisává na poněkud větší zvířata. V přírodě jsou to třeba králíci, zajíci, ježci, ale samozřejmě to mohou být i psi, kočky, lišky a nebo zase ptáci. Nasátá nymfa odpadne a někde v skrytu, v povrchových vrstvách půdy, v hrabance či opadance, prochází metamorfózou v dospělý stupeň – imago.



- ⊙ Složitý (3 různí hostitelé) a dlouhý trojhostitelský vývojový cyklus klíštěte = obrovský význam **epidemiologický**.
- ⊙ Člověk může být nakažen klíštětem, které získalo nákazu od zvířecího hostitele, se kterým se člověk neseťká.
- ⊙ Dlouhý vývojový cyklus klíštěte = klíště se tak stává rezervoárem nález v přírodě.



- Zdroj: [www.profimedia.cz](http://www.profimedia.cz), [www.macrophotography.cz](http://www.macrophotography.cz)
- Krev sají pouze samice, samci se živí rostlinnou mizou
- Páření probíhá na hostiteli i mimo něj a plně nasátá oplodněná samice pak klade až 5000 vajíček
- Samice má na zádech tmavý hřbetní štítek, dosahuje max. do poloviny hřbetu samice. Zbytek těla je cihlově až rumělkově červenavý. U menších samců kryje tentýž štítek jejich hřbetní část celou. Rumělkově červená část těla samice je pod mikroskopem velmi jemně zřasená. Když samice začne sát krev, řasy se roztahují a ona tak může mnohonásobně zvětšit své tělo a přijmout velké množství krve.



- Sací ústrojí klíštěte je tvořeno tzv. chobotkem = hypostomem = dlátovitý útvar s dozadu obrácenými zuby.
- Po straně hypostomu jsou uloženy pedipalpy a chelicery. Jakmile se klíště rozhodne, že je na správném místě, pedipalpy roztáhne a vysune chelicery. Ty mají na svém konci silné zubce, které klíště zasekne do pokožky a začne chelicery zatahovat zpět do svého těla. Tím vyvine značnou sílu a vtlačí do vzniklé ranky hypostom.
- V první fázi sání je tedy klíště v ráně drženo právě jen těmi nazad obrácenými zubci. Jakmile však začne vylučovat sliny, dostane se s nimi do ranky i zvláštní látka, která vytvoří kolem chobotku pevnou cementovou vrstvu, kterým je klíště v ráně upevněno.

- ⊙ Při sání vylučuje klíště farmakologicky aktivní sliny.
- ⊙ **Protisrážlivé látky** - kdyby se totiž zasažené kapiláry uzavřely, klíště by se nejen nenasálo, ale mohlo by to pro něj být přímo fatální.
- ⊙ **Protizánětlivé látky** - nevzniká tak svědění - člověk necítí sající klíště.
- ⊙ **Látky potlačující imunitní odpověď** hostitele.
  - ⊙ Produkce protilátek během sání by totiž ovlivnila jak sající samici, tak i tvorbu vajíček a tím životaschopnost další generace. Zároveň tím klíště připravuje podmínky, umožňující patogenům aby se v hostiteli zdárně uchytili.
  - ⊙ Saje-li na člověku jen jedno klíště nebo více. Když bude sát více klíšťat a pouze 1 z nich bude infikované, tak i ta ostatní klíšťata svými slinami usnadní infekci cestu do hostitele.





- Typickým stanovištěm pro klíšata je listnatý nebo smíšený les (i městský park).
- Jsou slepá, ale citlivě reagují na vydechovaný CO<sub>2</sub>. Na konci terminálního článku 1. páru nohou má klíšě prohlubeň s chemo a mechanoreceptory = Hallerův orgán.
- Na svého hostitele čekají na vegetaci blízko nad zemí v typickém postoji (drží se třemi zadními páry nohou a první přední pár roztáhne a natáčí je do různých směrů). Toho je využíváno při sběru klíšat - vlajkování.
- Přezimují v kterémkoliv stadiu vývoje, v hladovém i nasátém stavu. Probouzejí se už při teplotách nad 5°C (...nálezy v zimním období na lesní zvěři, lze se nakazit při práci v seníku, krmelci, doma na půdě atd.). Jejich plná aktivita naplno propuká 1–2 týdny po posledním sněhu, nejčastěji je to v březnu, první larvy se objeví během dubna a května

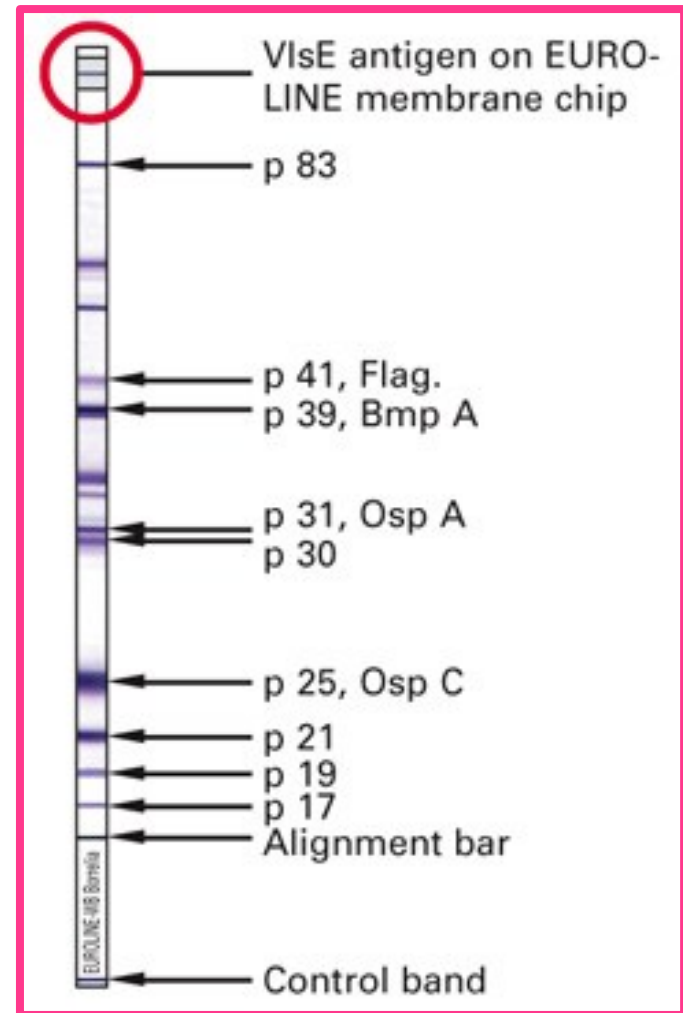
- ⊙ Lymeská borrelióza je v našich podmínkách nejčastější infekcí přenášenou krevsajícími členovci.
- ⊙ *Borrelia burgdorferi s. lato* = mikroaerofilní, gramnegativní spirocheta (0,2 až 0,5 x 3 až 20 μm) s pravidelnými závity a bičíky, kterých je 7 až 11. Bičíky vystupují na obou koncích buňky z bazálních disků.
- ⊙ *Borrelia burgdorferi sensu lato*: *B. b. sensu stricto*, *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. valaisiana*, *B. lusitaniae*, *B. bissetii*...
- ⊙ Borélie jsou vybaveny řadou antigenů, mezi nejvýznamější patří antigeny OspA, OspB, OspC, bičíkový p41
- ⊙ (7 subtypů OspA, 22 OspC, genodruhy mají vztah k patogenitě borélií a hostitelským zvířecím rezervoárům)
- ⊙ Buněčná stěna borélií se sestává z tří vrstev - vnitřní peptidoglykanové, střední lipopolysacharidové a vnější lipoproteinové. Velká flexibilita membrán buněčné stěny umožňuje tvorbu cyst a vylučování membránových vezikulů, které obsahují plazmidovou výbavu.
- ⊙ Způsob organizace genetického materiálu je mezi bakteriemi unikátní, chromozom a některé plazmidy mají lineární charakter.

- ◉ Brzy po průniku do organismu pronikají borrelié do buněk IS – polymorfonukleární leukocyty, monocyty, NK a T buňky. Možný je i průnik hematoencefalickou bariérou (nervové buňky a glie), zde jsou borrelié do značné míry chráněny před vlivem IS.
- ◉ Značné množství produkovaných lipoproteinů borélií, které jsou silnými induktory prozánětlivých cytokinů a chemokinů) je zodpovědné za hostitelskou imunitní odpověď.
- ◉ V literatuře jsou nově citovány povrchové proteiny s afinitou k hostitelskému komplementárnímu kontrolnímu proteinu A (CRASP), které by mohly být důležitou součástí mechanismu perzistence borélií.
- ◉ Přecitlivělost na perzistující antigen může mít za následek vznik systémové zánětlivé odpovědi.
- ◉ Významnou roli zde pravděpodobně hrají cytokiny (IL - 1, IL - 6, IL - 10, IL - 11, IL - 12, IL - 17) a tumor necrosis  $\alpha$ .
- ◉ I po správně zvolené terapii je možná reaktivace a reinfekce.

## II. Diagnostika borreliózy

- ◎ 1. průkaz protilátek v séru
- ◎ Průkaz IgG a IgM Ab, EIA, f. TEST LINE
- ◎ Celobuněčný Ag *B.afzelii* KC90 (OspA, OspC, p41, p100)
- ◎ Průkaz přítomnost Ab proti jednotlivým separovaným Ag, Western Blot, f. Euroimmun

- Antigens: SDS extract of a *Borrelia afzelii* strain.
- EUROLINE-WB is a combination of **westernblot** and **line blot techniques**. An SDS extract of a *Borrelia afzelii* strain is electrophoretically separated according to molecular mass and transferred onto a nitrocellulose membrane. A membrane chip coated with **highly purified recombinant VlsE-Antigen** is then added to the westernblot strips.



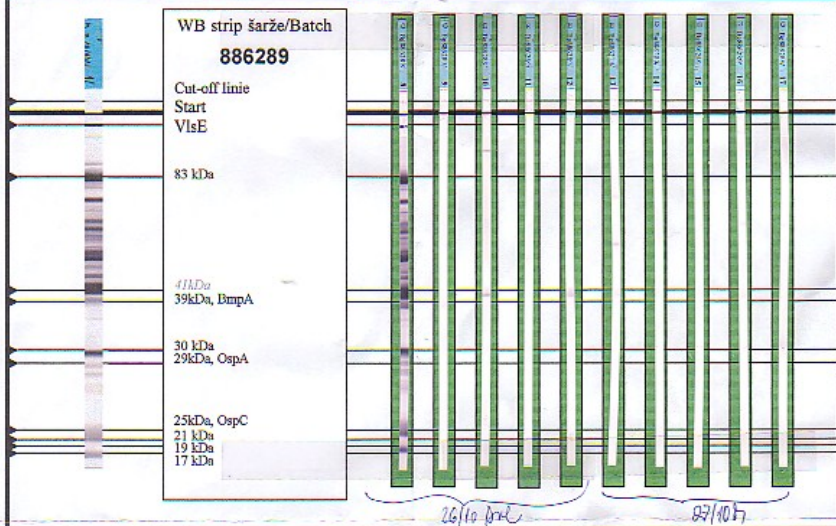
- ◎ 2. průkaz protilátek v likvoru
- ◎ Průkaz IgG a IgM Ab, **EIA**, f. TEST LINE, celobuněčný Ag *B. garinii* s vysokým obsahem p83, p39, OspA, OspC, p41, p18, p14
- ◎ Průkaz přítomnost Ab proti jednotlivým separovaným Ag, **Western Blot**, f. TEST LINE, specifický Ag *B.garinii* (p83, p 39, p30, OspA, OspC, p21, p19, p 17 a rekombinantní Ag VlsE)
- ◎ *Pozn. VlsE Ag je vnější protein B.b., který hraje klíčovou roli ve strategii přežití bakterie. Po jejím průniku do hostitelského organismu stále mění na vnějšku exprimovaný VlsE ve snaze uniknout takto rozpoznání a následné eliminaci imunitním systémem. Tento Ag je exprimován pouze in vivo, v kultivacích ne.*

**PROTOKOL S VYOBRAZENÍM VALIDAČNÍHO STRIPU**  
**PROTOCOL WITH VALIDATION STRIP**

# BLOT *Borrelia garinii* IgG

Šarže soupravy / Batch of Kit 819329P exp. 2011-02

PBL PK NK 5748 409 410 411 412 413 414 415



Použité komponenty Components	Šarže - Batch	Strip č./ No Vzorek/Sample	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
WB stripy WB Strips	886289 2/11	Linie / Bands (kDa)										
Univerzální roztok Universal Solution	440309 6/11	ViSE										
Pozitivní kontrola Positive Control	111156 2/11	83										
Negativní kontrola Negative Control	664328 2/11	41										
Konjugát IgG/AP Conjugate IgG/AP	045199 3/11	39 (BmpA)										
Substrátový roztok BCIP/NBT Substrate Solution/BCIP/NBT	411309 4/11	30										
		29 (OspA)										
		25 (OspC)										
		21										
		19										
		17										
		Hodnocení Interpretation										

Tabulka hodnocení výsledků testů:

Hodnocení specifických linií		Specifické Ag linie: 83,39,30,OspA,OspC,21,19,17			
		více než 2 výrazné linie	2 výrazné linie	1 výrazná linie nebo 2 slabé	žádná linie nebo 1 slabá
ViSE	výrazné	pozitivní	pozitivní	pozitivní	hraniční
	slabé	pozitivní	pozitivní	hraniční	negativní
	bez linie	pozitivní	hraniční	negativní	negativní

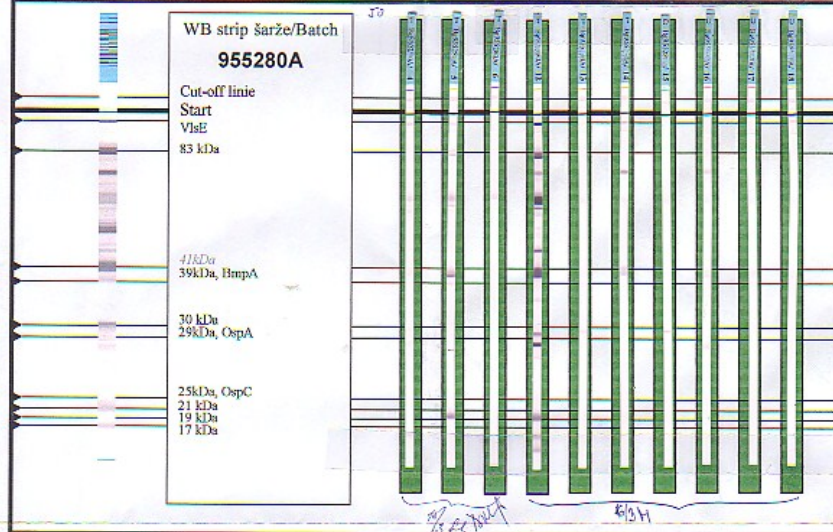
Doba inkubace se substrátovým roztokem: 11  
 Incubation Time (Substrate Solution):  
 Datum provedení: 26.10.2010 14:30:30  
 Date of Performance  
 Test provedl: [signature]  
 Performed by: [signature]

**PROTOKOL S VYOBRAZENÍM VALIDAČNÍHO STRIPU**  
**PROTOCOL WITH VALIDATION STRIP**

# BLOT *Borrelia garinii* IgG

Šarže soupravy / Batch of Kit 703300K exp. 2011-10

282 131 132 133 134 135 136 137 138 139 140



Použité komponenty Components	Šarže - Batch	Strip č./ No Vzorek/Sample	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
WB stripy WB Strips	955280A 2/2012	Linie / Bands (kDa)										
Univerzální roztok Universal Solution	429200 2/2012	ViSE										
Pozitivní kontrola Positive Control	111259 2/2012	83										
Negativní kontrola Negative Control	115259 2/2012	41										
Konjugát IgG/AP Conjugate IgG/AP	111200 2/2012	39 (BmpA)										
Substrátový roztok BCIP/NBT Substrate Solution/BCIP/NBT	200200 2/2012	30										
		29 (OspA)										
		25 (OspC)										
		21										
		19										
		17										
		Hodnocení Interpretation										

Tabulka hodnocení výsledků testů:

Hodnocení specifických linií		Specifické Ag linie: 83,39,30,OspA,OspC,21,19,17			
		více než 2 výrazné linie	2 výrazné linie	1 výrazná linie nebo 2 slabé	žádná linie nebo 1 slabá
ViSE	výrazné	pozitivní	pozitivní	pozitivní	hraniční
	slabé	pozitivní	pozitivní	hraniční	negativní
	bez linie	pozitivní	hraniční	negativní	negativní

Doba inkubace se substrátovým roztokem: 11  
 Incubation Time (Substrate Solution):  
 Datum provedení: 25.10.2010  
 Date of Performance  
 Test provedl: [signature]  
 Performed by: [signature]

# PCR

- PCR je jedna z mála metod přímé diagnostiky lymeské borreliózy
- Možno použít v podstatě jakýkoli materiál ve kterém přítomnost bakterií očekáváme
- Detekujeme klinicky významné patogenní druhy borélií ze sk. *Borrelia burgdorferi s. lato* (*B.b.sensu stricto*, *B.afzelii*, *B.garinii*, *B.valaisiana*, *B.luisitaniae*, *B.andersonii*, *B.bisetii*, *B.japonica*, *B.tanukii*, *B.turdi*, *B.sinica*)
- Metoda je založena na principu amplifikace chromozómního genu kódujícího 16S rDNA metodou RT PCR
- Využívá technologie „hot start“ = minimalizace nespecifických reakcí, maximální senzitivita



# III. NEUROBOROLIÓZA

## ...z Velkého lékařského slovníku

- ◉ ...“ *neuroborrelióza* – neurologická forma Lymeské borreliózy. Může se projevit četnými příznaky a chorobnými stavy, které mnohdy napodobují jiné nervové choroby. Jde např. o bolesti hlavy, únavový syndrom, obrny (zejména hlavových nervů, nejč. lícního), velmi bolestivé záněty míšních kořenů (radikulitidy), záněty mozku či mozkových blan...”
- ◉ ...“*Garinův-Bujadouxův-Bannwarthův syndrom* – zánětem bývají postiženy mozkové pleny, nervové kořeny i nervy (meningomyeloradikuloneuritida). Projevuje se výraznými, často nočními bolestmi, senzitivními i motorickými poruchami nervů (poruchy citlivosti, obrny), meningeálním drážděním...”

<b>Projevy</b>	<b>Časná lokalizovaná infekce</b>	<b>Časná diseminovaná infekce</b>	<b>Pozdní diseminovaná infekce</b>	<b>Chronická infekce (po &gt;1 roce)</b>
<b>Nespecifické</b>	chřipkové příznaky	malátnost, únava	malátnost, únava	únava, neuropsychické příznaky
<b>Kožní</b>	erythema (chronicum) migrans	přídavné léze EM	borreliový lymfocytom	acrodermatitis chronica atrophicans
<b>Neurologické</b>	-	cefalea, meningismus, obrna lícního nervu	akutní serózní meningitida, akutní encefalitida, obrna lícního nervu, Bannwarthův syndrom, periferní neuropatie	chronická (meningo) encefalitida, vaskulitida CNS, periferní neuropatie
<b>Kloubní a svalové</b>	-	artralgie, myalgie	artritida	artritida
<b>Jiné</b>	-	lymfadenopatie, konjunktivitida, hepatopatie	AV blokáda, myo(perikarditida)	-

- U 95% pacientů je udávána časná LNB
- (příznaky trvají méně než 6 měsíců)
- 5% pacientů pozdní LNB (příznaky 6 měsíců – x let)

Časná LNB/postižení PNS	Časná LNB/ postižení CNS
meningoradikulitida	myelitida
parézy hl. nervů	encefalitida
- n.facialis, abducens, oculomotoricus	parkinsonské příznaky
	hemiparézy
Pozdní LNB/ PNS	Pozdní LNB/ CNS
mononeuropatie	cerebeální vaskulitida
radikulopatie	chron. progres. encefalitida
polyneuropatie	encefalomyelitida

# European Union Concerted Action on Lyme Borreliosis

*Evropská skupina pro odhady rizik spojených s LB*

- ⊙ Mezi základní laboratorní metody pro diagnostiku časně i chronické neuroborreliózy patří dle mezinárodního doporučení ([www.eucalb.com](http://www.eucalb.com)) průkaz intratékální syntézy specifických protilátek
- ⊙ *Pozn. Pouhé stanovení koncentrace imunoglobulinů v likvoru je nedostačující, neodlišíme intratékální a krevní původ imunoglobulinů*

# EFNS

## European federation of neurological societies, [www.efns.org](http://www.efns.org)

- ⊙ Doporučení pro diagnostiku LNB
- ⊙ 1. CSF/serum Bb-Ab – **Intrathecal Production** (v časně fázi může být negativní! ; i.t. syntéza protilátek perzistuje i roky po infekci)
- ⊙ 2. signs of CSF inflammation (komplexní likvorologické vyšetření)
- ⊙ 3. Culture and PCR in very early LNB ???
- ⊙ **Kompatibilní klinické příznaky**

## III.1.

# Antibody index

- ⊙ Poměr koncentrace specifických protilátek v likvoru a v séru ve vztahu ke stavu hematolikvorové bariéry a koncentraci celkových imunoglobulinů v likvoru a v séru.

# Podmínky:

- ⊙ Vzorek venózní srážlivé krve a likvoru odebraný **současně**
- ⊙ Stanovení hodnot koncentrace albuminu,
- ⊙ Stanovení celkových imunoglobulinů IgM a IgG v likvoru i séru
- ⊙ *Pozn.:*
- ⊙ *Likvor nesmí být kontaminovaný erytrocyty*
- ⊙ *(>100 ery v 1  $\mu$  l)*
- ⊙ *Zvýšení permeability hematoencefalické a hematolikvorové bariéry při neuroinfekcích avizuje patologické změny v CNS.*
- ⊙ *Změna je dána úsilím organismu poskytnout NS látky s neuroprotektivním účinkem, umožňující efektivní plnohodnotný průběh zánětlivého procesu.*
- ⊙ *Albumin je protein syntetizovaný v játrech, přítomnost v CSF je krevního původu.*

- ◎ Specifické protilátky stanovujeme **imunoenzymaticky**
- ◎ Celkové IgG a IgM protilátky a hladinu albuminu stanovujeme **nefelometricky**
- ◎ Absolutní hodnoty absorbancí sér a likvorů jsou převedeny na tzv. arbitrární jednotky (AU) a poté je vypočtena **hodnota protilátkového indexu dle Reibera**





- ⊙ Z hodnot koncentrací albuminu a celkových Ig v séru a likvoru je vypočítán:
- ⊙  $Q_{\text{Alb}}$
- ⊙ = Albumin v likvoru/ Albumin v séru
- ⊙  $Q_{\text{IgG, IgM}}$
- ⊙ = celk.IgG(M)v likvoru/celk.IgG(M)v séru
- ⊙  $Q_{\text{spec IgG, IgM}} = \text{AU v likvoru} / \text{AU v séru}$
- ⊙ Horní hranici rozsahu  $Q_{\text{Alb}}$  statisticky definuje rovnice pro  $Q_{\text{Lim}}$ :

$$QLim(IgG) = 0,93x\sqrt{QAlb^2 + (6x10^{-6})} - 1,7x10^{-3}$$

Je-li  $Q Lim (IgG) > Q IgG$ , pak  $AI (IgG) = Q Spec.IgG/QIgG$

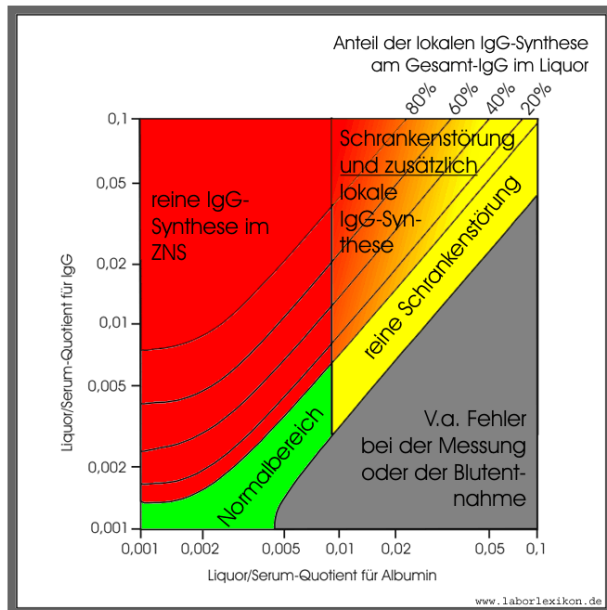
Je-li  $Q Lim (IgG) < Q IgG$ , pak  $AI (IgG) = Q Spec.IgG/Qlim IgG$

$$QLim(IgM) = 0,67x\sqrt{QAlb^2 + (120x10^{-6})} - 7,1x10^{-3}$$

AI »1,5 signalizuje intratékální  
syntézu Ab

⊙ **Hodnota QAlb udává stav:**

- Normální
- Lehká porucha
- Střední porucha
- Těžká porucha hematolikvorové bariéry



Produktion Ig v CNS, intaktní bariéra

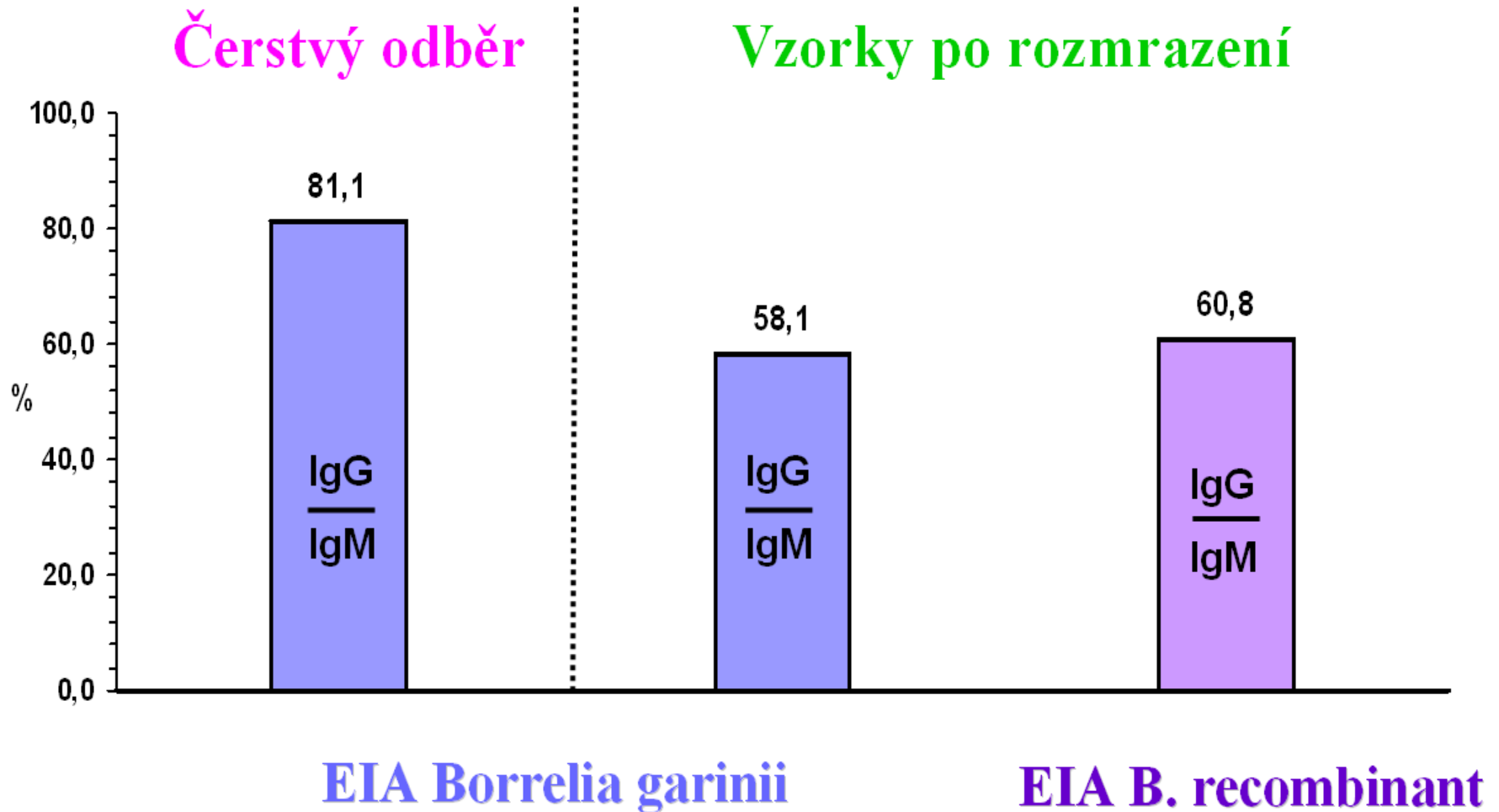
Dysfunkce bariéry, přídavná produkce Ig

Dysf. bariéry /izolovaná/ bez produkce Ig

Intaktní bariéra, normální rozmezí

Chyba v analytickém kroku

# Pozitivita AI v IgG/IgM u vzorků PACIENTŮ s NB před zamrazením a po rozmrazení (n = 74)



## III.2

# ZNÁMKY ZÁNĚTU V LIKVORU

- ⊙ Pleocytóza = zvýšený počet celulárních elementů mozkomíšním moku.

Podle typu buněk se pak p. označuje:

1. granulocytární - při hnisavých bakteriálních infekcích
  2. lymfocytární např. u virových infekcí, ev. v menším množství při RS
  3. monocytární - např. u nádorů, výhřezů ploténky či ischemických změn.
- ⊙ *Pozn. Normální počet buněk (10/3; 15/3 elementů) je u LNB vzácný, ale možný v časně fázi, u imunosuprese*

**Normální nález**  
**< = 10/3 elem.**  
**Lymfocyty/monocyty = 7:3**  
**< = 10% aktivovaných elementů**

	Patologický nález a < = 10/3 elementů	>10/3 elementů
	OLIGOCYTÓZA	PLEOCYTÓZA
LYMFOCYTÁRNÍ	chron. záněty	Serosní neuroinfekce
	RS	chron.neuroinf.
		RS (< 100/3 el)
MONOCYTÁRNÍ	Nezánětlivá onemocnění	Syst.vaskulitidy CNS
	Terminální fáze zánětů	Mozkové ischemie
	Výhřezy disku, tumorózní afekce...	Guillain Barré
		Terminální fáze neuroinf.
GRANULOC. – NEUTR.	Počínající zánět	Bakteriální neuroinf.
GRANULOC. –EOSIN.	Autoimunita Chron. Onem.	Parazitární Mykotická Alergická onem. AO

<b>Likvorové nálezy - meningitidy</b>	<b>Normální likvor</b>	<b>Hnisavé neuroinfekce</b>	<b>Serózní neuroinfekce</b>
<b>Vzhled moku</b>	Čirý, bezbarvý	Zakalený, žlutavý	Čirý či opalescentní
<b>Počet elementů</b>	do 10/3	Stovky–desetitisíce/3	Desítky–stovky/3
<b>Cytologie</b>	65–80% lymfocytů 20–35% monocytů	Neutrofilní segmenty	Lymfocyty (1.–3. den mohou převažovat neutrofilny!)
<b>Celková bílkovina</b>	0,2–0,45 g/l	Výrazně ↑ (>2 g/l) Těžká porucha bariéry	Normální nebo ↑ (<2 g/l)
<b>Glykorrhachie</b>	2,2–4,2 mmol/l	↓↓↓	Normální hodnoty
<b>Laktát</b>	1,2–2,1 mmol/l	↑↑↑ (alespoň 3,5 mmol/l)	Normální nebo hraniční hodnoty
<b>Speciální vyšetření</b>		Mikrobiologické (mikroskop, kultivace)	Virologie, borrelie, mykobakterie, treponemy, leptospiry PCR a EM zejména na HSV a borrelie
<b>Syntéza imunoglobulinů</b>		Není pro nekomplikovanou meningitis typická	

# OLIGOKLONÁLNÍ PÁSY

- ◉ Další citlivou metodou pro průkaz intratékální syntézy protilátek je **stanovení oligoklonálních imunoglobulinů metodou izoelektrické fokusace** s následným barvením, imunofixací nebo imunoblotem.
- ◉ Fyziologicky mají imunoglobuliny v séru i likvoru polyklonální charakter. Do CNS vstupuje pouze omezený počet B lymfocytů, které se po aktivaci antigenem mění v plazmatické buňky produkující protilátky.
- ◉ Intratékálně produkované protilátky se vyznačují omezenou (oligoklonální) heterogenitou, což se při izoelektrické fokusaci projeví jako izolované proužky, které nejsou patrné při analýze séra.
- ◉ *Pozn. Oligoklonální pásy spíše v neutrální až kyselé oblasti se mohou vyskytovat u neuroinfekcí, včetně LNB.*



- ⊙ **1** v séru i moku pouze polyklonální IgG = **normální nález**
- ⊙ **2** oligoklonální proužky jen v likvoru = **lokální syntéza IgG**
- ⊙ **3** oligoklonální proužky v likvoru a další oligoklonální proužky v séru = **lokální syntéza IgG a produkce Ab v organismu** (= chronická infekce CNS, roztr. skleróza)
- ⊙ **4** identické oligoklonální proužky v séru i v moku = dochází k **průniku protilátek z krve do likvoru**
- ⊙ **5** identické monoklonální proužky v séru i v moku v krátkém úseku pH gradientu = **přítomnost monoklonálního paraproteinu v likvoru sérového původu** (myelom)



# Doporučení

1. Neurologické příznaky odpovídající LNB
  2. Pleocytóza v CSF
  3. Intratékální syntéza specifických Ab
- ⊙ Splnění 3 kritérií = LNB
  - ⊙ Splnění 2 kritérií = možná LNB

# IV. VÝSLEDKY 2010

# ŽENY

- 16 vyšetření, 15 pacientek, ø 56let
- Pozitivita AI pouze v IgG: 14x
- Pozitivita AI pouze v IgM: 0x
- Pozitivita AI v IgG i IgM: 1x, dg. Obrna lícního nervu, Q Alb. = 5,12
- Normální bariéra: 4x
- Lehká porucha: 7x
- Střední porucha: 2x

ž, NsP Ha	M54.5, Bolesti zad	1932	1,51	0,523	1,357	0,117	11,99	1,62	0,28
ž, Sosna	G61.8, polyneuropati e	1940	1,903	0,427	1,908	0,146	10,76	2,38	0,62

- Těžká porucha: 2x

ž, Sosna	G62.8, Polyneuropatie	1934	0,333	0,8	1,732	0,242	16,82	18,07	0,59
ž, NsP Ha	A69.2 LB	1949	1,361		2,325		>15	3,37	

# MUŽI

- 15 vyšetření, 14 pacientů, ø 47 let
- Pozitivita AI pouze v IgG: 10x
- Pozitivita AI pouze v IgM: 2x
- Pozitivita AI v IgG i IgM: 3x

- ❑ Normální bariéra: 1x
- ❑ Lehká porucha: 7x
- ❑ Střední porucha: 3x

m, NsP Ha	G51.0, Bellova obrna	2004	1,096	0,899	1,135	1,379	10,73	4,17	11,91
m, NsP Ha	M54.5, Bol. zad, /kr.l./	1984	0,396		0,189		10,48	1,86	
m, Sosna	A69.2 LB	1949	1,973		1,348		10,11	1,51	

- ❑ Těžká porucha: 4x

m, NsP Ha	G98, Poruchy NS, /kr.l./	1974	0,362	0,191	0,634	0,325	>15	0,87	29,3
m, NsP Ha	A69.2 LB	1949	1,552	0,17	2,241	0,721	>15	0,78	7,16
m, KHN	G51.8, Poruchy líc. nervu	1961	0,442	0,697	0,741	0,554	15,54	3,69	2,63
m, FNO	G35, RS	1982	1,027	0,49	2,282	1,063	19,54	3,37	7,79

	dg.	ročník	absorbance sérum		absorbance likvor		Q Alb	AI/G	AI/M	pozn.
			IgG	IgM	IgG	IgM				
ž, KHN	G61.8, polyneuropatie	1988	0,43	0,168	0,443	0,263	4,19	10,71		
ž, NsP Ha	A87.9, virová meningitida	1962								
ž, Sosna	G51.9, obrna lícního nervu	1962	0,638	1,271	0,422	0,223	5,12	4,67	2,25	
ž, NsP Ha	A69.2 LB	1962	2,045		0,971		2,68	5,22		
ž, Sosna	R51, Bolest hlavy	1950	1,209		0,479		6,86	2,51		
ž, NsP Ha	A69.2, LB	1956	1,006	1,902	0,985	0,386	6,83	5,1	1,2	
ž, Sosna	H51.0, Obrna konjug.pohledu	1948	1,155		0,951		9,91	4,23		
ž, NsP Ha	M54.5, Bolesti zad	1932	1,51	0,523	1,357	0,117	11,99	1,62	0,28	
ž, KHN	M54.5, Bolesti zad	1946	1,166		0,85		8,7	2,47		
ž, Sosna	G62.8, Polyneuropatie	1934	0,333	0,8	1,732	0,242	16,82	18,07	0,59	
ž, NsP Ha	A69.2 LB	1949	1,361		2,325		>15	3,37		
ž, Sosna	G61.8, polyneuropatie	1940	1,903	0,427	1,908	0,146	10,76	2,38	0,62	
ž, KHN	R42, Závrať	1940	1,771		0,42		4,82	1,46		
ž, KHN	G98, Poruchy NS	1956	0,629		0,25		6,23	1,74		
ž, NsP Ha	A69.2 LB	1994	1,106		0,396		5,98	1,46		
ž, FNO	G35, RS	1944	0,188		0,14		4,9	4,91		
	dg.	ročník	absorbance sérum		absorbance likvor		Q Alb	AI/G	AI/M	
			IgG	IgM	IgG	IgM				
m, KHN	G62.8, polyneuropatie	1957	0,874		0,501		3,51	6,33		
m, NsP	A69.2 LB	1950	2,019		1,073		7,86	2,18		
m, Sosna		1931	1,167		0,686		9,94	2,51		
m, Sosna	M54.5, Bolesti zad	1954	1,434		0,698		9,82	1,46		
m, FNO	G35, RS	1982	1,027	0,49	2,282	1,063	19,54	3,37	7,79	
m, NsP Ka/Or	A69.2 LB	1935	0,756		0,392		6,01	3,03		
m, Sosna	G61.0, Guillain Barré	1949	2,627		1,443		6,51	3,04		
m, Sosna	A69.2 LB	1949	1,973		1,348		10,11	1,51		
m, Sosna	H81.4, Závrať centr.původu	1983	0,569		0,157		7,42	1,77		
m, NsP Ha	M54.5, Bolesti zad	1984	0,396		0,189		10,48	1,86		krvavý likvor
m, NsP Ka/Or	M54.4., Lumbago s ischiasem	1977	1,489		0,935		7,85	2,29		
m, NsP Ha	G98, Poruchy NS	1974	0,362	0,191	0,634	0,325	>15	0,87	29,3	krvavý likvor
m, NsP Ha	A69.2 LB	1949	1,552	0,17	2,241	0,721	>15	0,78	7,16	
m, KHN	G51.8, Poruchy lícního nervu	1961	0,442	0,697	0,741	0,554	15,54	3,69	2,63	
m, NsP Ha	G51.0, Bellova obrna	2004	1,096	0,899	1,135	1,379	10,73	4,17	11,91	

Liquor			Serum			Abs - liquor		Abs - serum		Arbitr.j.- liquor		Arbitr.j.- serum		QAib	AI-G	AI-M
Albumin	IgG	IgM	Albumin	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	* 10 <sup>-3</sup>		
133	18,2	0,6	51,2	13,3	1,7	<b>0,379</b>	<b>0,133</b>	<b>0,921</b>	<b>0,369</b>	0,2	-0	30,37	6,62	2,60	<b>4,47</b>	-
188	25,4	6,5	47,9	10,6	2,6	<b>0,377</b>	<b>0,855</b>	<b>0,719</b>	<b>0,734</b>	0,2	0,51	21,96	20,1	3,92	<b>3,72</b>	<b>36,13</b>
70,3	12,6	1,4	45,2	13,1	1,6	<b>0,164</b>	<b>0,043</b>	<b>0,964</b>	<b>0,234</b>	0,06	-0,1	32,33	2,22	1,56	<b>2,01</b>	-



# IV. ...KAM DÁLE

# NOVĚ:

- ⊙ **EIA *Borrelia recombinant***
- ⊙ Imunoenzymatická souprava pro stanovení IgG a IgM protilátek proti *Borrelia burgdorferi* v lidském séru, plazmě, synoviální tekutině nebo mozkomíšním moku a k průkazu intratekální syntézy specifických protilátek
- ⊙ IgG: vybrané části specifických antigenů VlsE (variable major protein-like sekvence, expressed), p83, vnitřního flagelinu (p41i), p39, OspC a p17 druhů *Borrelia burgdorferi sensu lato*
- ⊙ IgM: vybrané části spec. Ag OspC (outer surface protein, p25), vnitřního flagelinu p41i a p 39

## ⊙ Souprava III. generace, vysoká citlivost a specifita testu

	Citlivost	Specifita
IgG	98,9%	97,8%
IgM	98,9%	96,7%



### Immunoblot for CSF diagnosis of neuroborreliosis



Anti-Borrelia EUROLINE-RN-AT (IgG)  
(Order No. DN 2131 G)

#### Antigens used

Combination of electrophoretically purified native antigens (p39, p41, p83), native OspC and recombinant VlsE of Borrelia afzelii, B. burgdorferi, B. garinii, recombinant designer antigens (p18, p19, p20, p21, p58) and new lipid antigens.

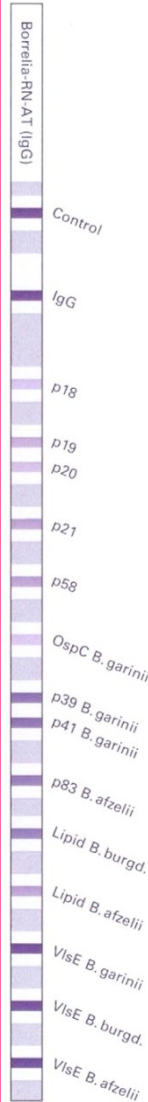
IgG antibody detection in serum or plasma for confirmation of positive or borderline results	IgG antibody detection in CSF/serum pair for diagnosis of specific antibody production in CNS
<b>Sample dilution</b> - Serum or plasma 1:51 with universal buffer	- CSF 1:4 with universal puffer - Serum dilution with universal buffer calculated with $CSO_{total}$ or $CSO_{serum}$
<b>Incubation times</b> 30 min / 30 min / 10 min at room temperature	180 min / 60 min / 20 min at room temperature
<b>Interpretation of results</b> Depending on the number of specific bands (n) in serum or plasma: n = 0: negative n = 1: borderline Exception: positive VlsE B. burgdorferi band: positive n ≥ 2: positive	Depending on the number of specific bands (n) in CSF and serum: $n_{CSF} > n_{Serum}$ : Indication of pathogen-specific antibody production in the CNS $n_{CSF} \leq n_{Serum}$ : Interpretation based on the intensity of bands (i) in CSF and serum possible $i_{CSF} \leq i_{Serum}$ : No indication of pathogen-specific antibody production in the CNS $i_{CSF} > i_{Serum}$ : Indication of pathogen-specific antibody production in the CNS

#### Automation

All EUROIMMUN immunoblots (EUROLINE, EUROLINE-WB, Westernblot) can be processed in a standardised manner using the EUROBlotMaster and scanned by EUROBlotScanner or photographed by EUROBlotCamera. The immunoblots are then evaluated using the EUROLineScan software.

#### Important advantages:

- High specificity (100%) and sensitivity (>97%), determined using clinically precharacterised sera
- Broad range of antigens
- Standardised dilution factor for CSF (1:4) — no complicated calculations required
- Short incubation times (test results after approx. 300min)
- Low sample volumes for CSF (250 µl)
- Automated processing with EUROBlotMaster (standardised incubation for CSF/serum pair)
- Computer-aided evaluation using EUROLineScan (available from EUROIMMUN)



## Kombinace Ag:

- Purifikované nativní Ag p39, p41, p83
- Nativní Ag OspC
- Rekombinantní VlsE *B. afzelii*, *B. burgdorferi*, *B. garinii*
- Rekombinantní p18, p19, p20, p21, p58
- Nové lipidové Ag.

• Vyhodnocení a interpretace:  
• Množství pozitivních reakcí na úrovni specifických antigenů v CSF a v séru:

- $n_{CSF} > n_{Serum}$  = indikace produkce specifických Ab v CSF
- $n_{CSF} < n_{Serum}$  = srovnání intenzity reagujících bandů

