

UNIVERZITA PARDUBICE  
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

DIPLOMOVÁ PRÁCA

2019

Martina Scherková

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Lymfická neuroborelióza v likvorologickej praxi

Martina Scherková

Diplomová práca

2019

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Martina Scherková**  
Osobní číslo: **C17452**  
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Bioanalytik**  
Název tématu: **Lymfská neuroborelióza v likvorologické praxi**  
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

### Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

#### Teoretická část:

- 1) Preštudujte současnou literaturu a zpracujte rešerš na tému Lymfské neuroboreliózy s důrazem na původcu ochorenia, definíciu neuroboreliózy, patogenézu a patofyziológiu. Ďalej opíšte klinické aspekty ochorenia spolu so štádiami. Pri vyhľadávaní literárnych údajov využite všetky dostupné databázy (NCBI, PubMed, Scopus).
- 2) Opíšte klinickú diagnostiku neuroboreliózy.
- 3) Preštudujte literaturu a zpracujte rešerš o problematike v súčasnosti používaných metódach laboratórnej diagnostiky neuroboreliózy so zameraním na metódy využívané v likvorologickej praxi. Pri vyhľadávaní literárnych údajov využite všetky dostupné databázy (NCBI, PubMed, Scopus).

#### Experimentálna časť:

- 1) Prakticky zrealizujte súbor vyšetrení z likvoru a séra na diagnostiku neuroboreliózy.
- 2) Sledujte a štatisticky vyhodnoťte laboratórne parametre vo vzťahu ku klinickému priebehu (porovnajete laboratórne zachytenú fázu ochorenia so symptómami, v akých hladinách sa pohybuje marker CXCL13 k protilátkovej odpovedi a splnenie podmienok pre diagnostikovanie ochorenia)

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**  
Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**  
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**  
Seznam odborné literatury:

Vedoucí diplomové práce: **prof. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.**  
Katedra biologických a biochemických věd  
Konzultant diplomové práce: **PaedDr. RNDr. Jana Špajdelová, Ph.D.**  
Ostatní konzultanti: **MUDr. Ondřej Sobek, CSc.**

Datum zadání diplomové práce: **21. prosince 2018**  
Termín odevzdání diplomové práce: **10. května 2019**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.  
děkan

L.S.



prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2019

## **Prehlasujem:**

Túto prácu som vypracovala samostatne. Všetky literárne pramene a informácie, ktoré som v práci využila sú uvedené v zozname použitej literatúry.

Bola som oboznámená s tým, že sa na moju prácu vzťahujú práva a povinnosti vyplývajúce zo zákona č. 121/2000 Sb., o práve autorskom, o právach súvisiacich s právom autorským a o zmene niektorých zákonov (autorský zákon), v znení neskorších predpisov, hlavne zo skutočnosti, že Univerzita Pardubice má právo na uzatvorenie licenčnej zmluvy o použití tejto práce ako školského diela podľa § 60 ods. 1 autorského zákona, a s tým, že pokiaľ dôjde k použitiu tejto práce mnou alebo bude poskytnutá licencia na použitie inému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávnená odo mňa požadovať primeraný príspevok na úhradu nákladov, ktoré na vytvorenie diela vynaložila, a to podľa okolností až do ich skutočnej výšky.

Beriem na vedomie, že v súlade s § 47b č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o zmene a doplnení ďalších zákonov (zákon o vysokých školách), v znení neskorších predpisov, a smernici Univerzity Pardubice č. 9/2012 Pravidla pre zverejňovanie záverečných prác a ich základnú jednotnú formálnu úpravu, v znení neskorších dodatkov, bude práca zverejnená v univerzitnej knižnici a prostredníctvom Digitálnej knižnice Univerzity Pardubice.

Súhlasím s prezenčným sprístupnením svojej práce v Univerzitnej knižnici.

V Pardubiciach dňa 7. 5. 2019

.....

Martina Scherková

## **Pod'akovanie**

Touto cestou by som sa chcela pod'akovať mojej vedúcej práce PaedDr. RNDr. Jane Špajdelovej, PhD., tiež vedúcej práce za školu, pani prof. RNDr. Zuzane Bílkovej, PhD., za ich vedenie, pomoc a ochotný prístup, ktoré mi poskytli v čase vypracovávania práce. Obrovská vďaka patrí aj pánovi prim. MUDr. Ondřejovi Sobkovi, CSc. a celému tímu laboratória Topelex, s. r. o. za možnosť vykonávať u nich experimentálnu časť práce, za rady, konzultácie a ochotu pri vykonávaní výskumu a zbieraní údajov pre potreby práci. Za odborné konzultácie a ochotný prístup by som tiež chcela pod'akovať personálu na Klinike infekčných nemocí Fakultnej nemocnice Hradec Králové, menovite predovšetkým pánu prednostovi doc. MUDr. Stanislavovi Plíškovi, PhD. a MUDr. Jurajovi Szányimu. Za podporu a trpezlivosť ďakujem aj mojej rodine.

## **ANOTÁCIA**

Práca sa zaoberá problematikou Lymskej neuroboreliózy a jej diagnostiky v likvorologickej praxi. Stručne prezentuje pôvodcu, ochorenie, liečbu a metódy laboratórnej diagnostiky využívané v likvorológii. Experimentálna časť obsahuje špeciálne vyšetrovacie analýzy pre zistenie intratekálnej syntézy a koncentrácie chemokínu CXCL13 a spracovanie výsledkov vo vzťahu k faktom z literatúry a ich interpretáciu pre uzatvorenie diagnostiky.

## **KLÚČOVÉ SLOVÁ**

Lymská neuroborelióza, chemokín CXCL13, protilátky, likvor, sérum, *Borrelia burgdorferi*

## **TITLE**

Lyme neuroborreliosis in liquorological practice

## **ANNOTATION**

The thesis deals with problematics of Lyme neuroborreliosis and its diagnosis in liquorological practise. It shortly presentes originator of the disease, disease itself, treatment and the method of laboratory diagnosis used in liquorology. The experimental part of the thesis includes special investigative analyzes for finding an intrathecal synthesis and a concentration of chemokine CXCL13 and also a processing of the results in relation to the facts from literature and their interpretation for concluding the diagnosis.

## **KEYWORDS**

Lyme neuroborreliosis, chemokine CXCL13, antibodies, cerebrospinal fluid, serum, *Borrelia burgdorferi*

# OBSAH

ÚVOD.....	15
1 TEORETICKÁ ČASŤ.....	16
1.1 Stručná charakteristika rodu <i>Borrelia burgdorferi</i> a jej antigénnej štruktúry.....	16
1.1.1 Patomechanizmy <i>Borrelia burgdorferi</i> .....	20
1.2 Lumbálna punkcia .....	20
1.3 Neuroborelióza .....	22
1.3.1 Patogenéza a patofyziológia.....	22
1.3.2 Klinické prejavy .....	24
1.3.3 Štádia ochorenia .....	26
1.3.3.1 Včasné lokalizované štádium .....	26
1.3.3.2 Včasné diseminované štádium .....	26
1.3.3.3 Neskoré diseminované štádium.....	27
1.3.4 Terapia .....	27
1.4 Klinická a laboratórna diagnostika .....	28
1.4.1 Anamnéza.....	28
1.4.2 Klinické vyšetrenie .....	29
1.4.3 Laboratórna diagnostika.....	31
1.4.3.1 Vyšetrovaný materiál.....	32
1.4.3.2 Analýza likvoru .....	34
1.4.3.3 Cytológia likvoru.....	35
1.4.3.4 Imunoglobulíny a vyšetrenie stavu permeability hematolikvorovej bariéry .....	36
1.4.3.4.1 Dôkaz intratekálnej syntézy špecifických protilátok .....	36
1.4.3.4.2 Izoelektrická fokusácia.....	38
1.4.3.4.3 Permeabilita hematolikvorovej bariéry .....	40
1.4.3.5 Zápalové markery .....	41
1.4.3.5.1 CXCL13 .....	41
1.4.3.6 Stanovenie špecifických protilátok proti <i>Borrelia burgdorferi sensu lato</i> .....	42
1.4.3.6.1 Dvojkroková analýza.....	42
1.4.3.6.1.1 ELISA .....	43
1.4.3.6.1.2 Western blot .....	44
1.4.3.7 Priamy dôkaz boréliovej DNA .....	46
CIELE PRÁCE .....	48
2 Experimentálna časť.....	49



2.1	Charakteristika súboru a metodika práce .....	49
2.2	Kvantitatívne stanovenie imunoglobulínov v sére a likvore pomocou imunonefelometrie .....	49
2.3	Stanovenie hladiny albumínu v sére a likvore pomocou imunonefelometrie .....	49
2.4	Izoelektrická fokusácia na zistenie prítomnosti intratekálnej oligoklonálnej syntézy 50	
2.5	Dôkaz špecifických boréliových protilátok v sére a v likvore metódou ELISA .....	51
2.6	Konfirmačný test Western blot pre kvalitatívne stanovenie ľudských protilátok proti boréliovým antigénom v sére a likvore.....	52
2.7	Detekcia chemokínov CXCL13 metódou ELISA.....	54
3	Výsledky .....	55
3.1.1	Posúdenie fázy infekcie klinickou symptomatológiou a laboratórnymi parametrami.....	55
3.1.2	Porovnanie hladín CXCL13 a protilátkovej odpovede.....	57
3.1.1	Analýza kritérií potrebných pre uzatvorenie Lymfatickej neuroboréliózy .....	61
	DISKUSIA .....	67
	ZÁVER .....	72
	ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY .....	73

## ZOZNAM ILUSTRÁCIÍ

<b>Obrázok 1:</b> Morfológia a štruktúra bunky <i>Borrelia burgdorferi</i> .....	17
<b>Obrázok 2:</b> Štruktúra povrchového VIsE antigénu .....	19
<b>Obrázok 3:</b> Sagitálna časť bedrových stavcov ilustrujúca smer ihly pri lumbálnej punkcii ..	21
<b>Obrázok 4:</b> Schéma cirkulácie likvoru (prevzaté z Ambler, 2006). .....	33
<b>Obrázok 5:</b> Lymfocytárna celulizácia v základnom farbení .....	36
<b>Obrázok 6:</b> Stanovenie intratekálnej syntézy protilátok .....	37
<b>Obrázok 7:</b> Delenie látok na základe izoelektrických bodov v gradiente pH .....	39
<b>Obrázok 8:</b> Typy rozdelenia látok v likvore a sére .....	40
<b>Obrázok 9:</b> Schéma dvojstupňového testovania .....	43
<b>Obrázok 10:</b> Stripy využívajúce sa na stanovenie prítomnosti protilátok proti jednotlivým separovaným antigénom metódou Western blot .....	45
<b>Graf 1:</b> Percentuálne zastúpenie výskytu zvýšených hladín špecifických antiboréliových protilátok v likvore pre zachytenie fázy ochorenia. ....	55
<b>Graf 2:</b> Percentuálne zastúpenie výskytu zvýšených hladín špecifických anti- <i>Borrelia burgdorferi</i> protilátok v sére pre zachytenie fázy infekcie .....	56
<b>Graf 3:</b> Porovnanie nameraných hladín CXCL13 s koncentraciami špecifických protilátok triedy IgG a IgM v likvore.....	59
<b>Graf 4:</b> Porovnanie hladín CXCL13 s koncentraciami špecifických protilátok proti <i>Borrelia burgdorferi</i> v sére. ....	60
<b>Graf 5:</b> Percentuálne zastúpenie výskytu intratekálnej oligoklonálnej syntézy typu 3 („more than pattern“) zistenej IEF. ....	63

## **ZOZNAM TABULIEK**

<b>Tabuľka 1:</b> Prehľad nameraných špecifických hodnôt zo séra (S) a likvoru (CSF) chemokínu CXCL13, IgG a IgM a protilátkového indexu (AI) v oboch triedach imunoglobulínov . . . . .	57
<b>Tabuľka 2:</b> Hodnoty potrebné pre výpočet a posúdenie intratekálnej syntézy špecifických protilátok. . . . .	62
<b>Tabuľka 3:</b> Prehľad nameraných hodnôt a confirmácie ELISA metódy Western blotom u likvoru a séra. . . . .	65

## ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

AAN	American Academy of Neurology
AI	protilátkový index (angl. „antibody index“)
Alb	albumín
ATB	antibiotiká
AU	arbitrárne jednotky
BBK32	spirochetálny gén
cca	cirka, približne, asi
CD	transmembránové proteíny (angl. „cluster designation“)
CNS	centrálny nervový systém
CSF	mozgovomiechový mok (angl. „cerebrospinal fluid“)
CXC	podrodina chemokínov
CXCL	ligand pre chemokín CXC
CXCR	chemokínový receptor
EFNS	European Federation of Neurological Societies
ELISA	enzýmová imunoanalýza na imunosorbentoch (angl. „Enzyme-Linked Immunosorbent Assay“)
event.	eventuálne
FLC	voľné ľahké reťazce imunoglobulínov (angl. „Free Light Chains“)
HIV	vírus ľudskej imunodeficiencie (angl. „Human Immunodeficiency Virus“)
HLB	hematolikvorová bariéra
HSP60	heat shock protein 60
i. v.	intravenózne

IDSA	Infectious Diseases Society of America
IEF	izoelektická fokusácia
IgA	imunoglobulín A
IgG	imunoglobulín G
IgM	imunoglobulín M
IL	interleukín
ILADS	International Lyme and Associated Diseases Society
INF	interferón
LNB	Lymeská neuroborelióza
min.	minúta
napr.	napríklad
NK	bunky, prirodzené zabíjače (angl. „natural killer cells“)
NS	nervový systém
Osp	povrchové proteíny (angl. „outer space proteins“)
p. o.	per orálne
PCR	polymerázová reťazová reakcia (angl. „Polymerase Chain Reaction“)
PNS	periférny nervový systém
prim.	primár
príp.	prípadne
Q Alb	albumínový kvocient
resp.	respektíve
S	sérum
t. j.	to jest

Tc	cytotoxický T lymfocyt
Th	pomocné T lymfocyty
TLR	toll-like receptor
TNF	faktor nekrotizující tumory (angl. „tumor necrosis factor“)
tzv.	takzvaný
USA	Spojené štáty americké
v. s.	veľmi pravdepodobne, veri similitur
VlsE	antigén variabilný systém E (angl. „variable major protein E“)
WB	Western blot

## ÚVOD

Lymfská neuroborelióza je neurologický prejav systémovej infekcie spôsobenej spirochétou *Borrelia burgdorferi* (Djukic *et al.* 2012), prenášanou kliešťami *Ixodes ricinus* (Barstad *et al.*, 2018). Zároveň je najčastejším prejavom neskorého diseminovaného štádia Lymfskej boreliózy v Európe (Henningsson *et al.*, 2014). Postihuje centrálny a/alebo periférny nervový systém, od čoho závisí aj manifestácia infekcie, ktorá však závisí okrem iného aj od kmeňov spôsobujúcich ochorenie. V Európe sú dominantnými genotypmi *Borrelia afzelii* a *Borrelia garinii*, zatiaľ čo v USA iba *Borrelia burgdorferi sensu stricto* (Barstad *et al.*, 2018). Infekcia prebieha vo viacerých fázach, avšak najčastejšou je včasná diseminovaná, ktorá sa typicky prejavuje Bannwarthovým syndrómom a mozgovomiechovou meningitídou.

Práca sa venuje Lymfskej neuroborelióze a jej pôvodcovi, a problematike laboratórnej diagnostiky v likvorológii. Pri podozrení na neuroboreliózu je potrebné súčasne vyšetrovať likvor a sérum. Laboratórne metódy rozdeľujeme na priame a nepriame. K priamym vyšetrovacím metódam patrí kultivácia, elektrónová mikroskopia a PCR. Vykazujú však nízku špecificitu a senzitivitu, čo je dôvod, prečo nie sú v praxi príliš využívané. Vhodnejšie, a v praxi využívané sú metódy nepriame. Ide o dvojkrokové testovanie ELISA, Western blot, ďalej detekcia intratekálnej syntézy protilátok, posúdenie stavu hematolikvorovej bariéry a vyšetrenie zápalových ukazovateľov. V práci vybrané laboratórne vyšetrovacie metódy sú využívané v špeciálnej likvorologickej diagnostike a sú zamerané na detekciu markerov potrebných na uzatvorenie diagnózy podľa smerníc EFNS. Z laboratórnych parametrov sem patrí intratekálna syntéza špecifických protilátok a pleocytóza v likvore.

Experimentálna časť obsahuje metódy nepriamej laboratórnej diagnostiky na detekciu imunitnej odpovede hostiteľa voči pôvodcovi ochorenia. Taktiež sa venuje detekcii prítomnosti špecifického markera floridity zápalu neuroboreliózy, chemokínu CXCL13. Výsledky sú interpretované vo vzťahu ku odporúčaniam EFNS a faktom z odbornej literatúry.

# 1 TEORETICKÁ ČASŤ

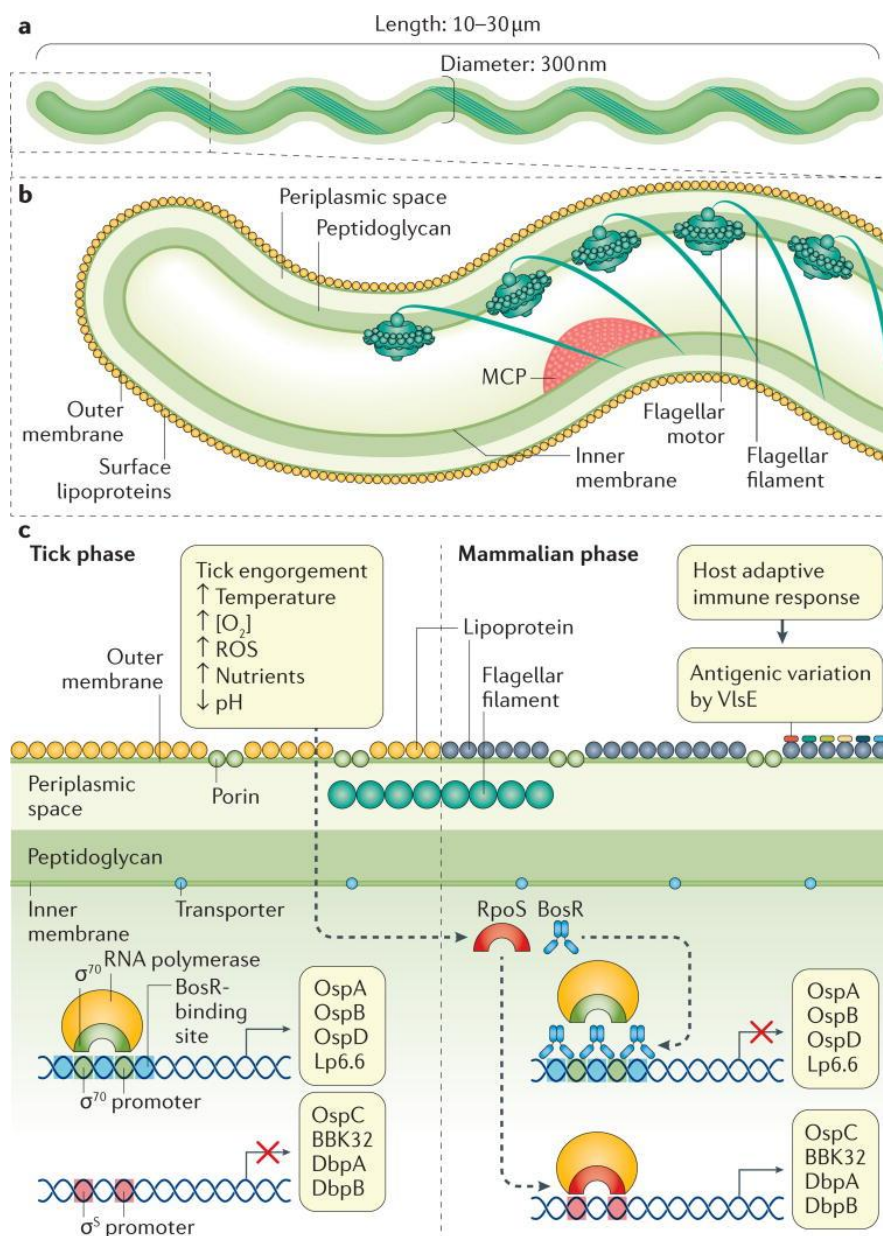
## 1.1 Stručná charakteristika rodu *Borrelia burgdorferi* a jej antigénnej štruktúry

*Borrelia burgdorferi* je gramnegatívna spirochéta patriaca do čeľade *Spirochaetaceae*. Patrí medzi baktérie najčastejšie prenášané kliešťami vo svete (Garg *et al.*, 2018).

Jej chromozóm je lineárny s variabilným počtom kruhových a lineárnych plazmidov (Marques *et al.*, 2005). Chromozóm ostáva v rámci *Borrelia burgdorferi sensu lato* zachovaný, zatiaľ čo genóm vykazuje vysoký stupeň variácie (Aguero-Rosenfeld *et al.*, 2005). Z dostupných informácií vyplýva, že niektoré plazmidy *Borrelia burgdorferi* chýbajú u *Borrelia garinii* či *Borrelia afzelii*, čo môže byť predpokladom ku klinickej variabilite Lymfatickej boreliózy v rôznych geografických oblastiach (Saint Girons *et al.*, 1998).

Rovnako, ako všetky spirochéty, má vnútornú cytoplazmatickú a vonkajšiu membránu s tenkou vrstvou peptidoglykánu (obrázok 1). Typickým znakom sú periplazmatické flagely (Marques *et al.*, 2005), pripojené ku každému pólu bunky a obtáčajúce sa okolo bunky v periplazmatickom priestore medzi peptidoglykánovou vrstvou a vonkajšou membránou (Steere *et al.* 2016). Od gramnegatívnych baktérií sa líši najmä vonkajšou membránou, ktorá neobsahuje lipopolysacharid, ale pozostáva z lipidovej dvojvrstvy zloženej z glykolipidov a lipidov (Stanek *et al.*, 2011). Vonkajšia membrána obsahuje aj povrchové lipoproteíny, ktoré sa môžu meniť v závislosti od prostredia (Steere *et al.* 2016) či od toho v akom životnom cykle sa momentálne baktéria nachádza. Napr. OspC sa exprimuje v skorých fázach infekcie a OspA počas kolonizácie kliešťá.





**Obrázok 1:** Morfológia a štruktúra bunky *Borrelia burgdorferi*. Časť **a** ukazuje na morfológiu baktérie, na modely **b** vidieť bičíky vychádzajúce z periplazmatického priestoru a ukotvené ku každému pólu bunky „bičikovými motormi“ usmiernených vedľa chemotaktických proteínov pripomínajúcich metyl (MCP), v časti **c** vidieť, vonkajšiu membránu, ktorá pozostáva z lipidovej dvojvrstvy prestúpenú lipoproteínmi, ktoré sú exprimované na povrchu aj u kliešťov aj u cicavcov, zablokovaný podnet expície lipoproteínov vo fáze kliešťa, ktorý aktivuje expresiu lipoproteínov u cicavcov prostredníctvom regulačnej siete spolu s regulátorom oxidačného stredu (BosR) a alternatívnym  $\sigma$ -faktorom RpoS RNA polymerázy, a vďaka špecifickej imunite hostiteľa je znižovaný OspC, ale stúpajúci VlsE, podliehajúci antigénnej variácii, exprimovaný na bakteriálnom povrchu (prevzaté z Steere *et al.*, 2016).

*Borrelia burgdorferi* má niekoľko povrchových lipoproteínov, vďaka ktorým sa dokáže pripojiť k rôznym molekulám a tkanivám hostiteľského organizmu a mnohé z nich sú vyjadrené iba v určitých fázach životného cyklu baktérie (Steere *et al.*, 2016). Okrem toho sú nemenej dôležité pre rast, virulenciu a vôbec život mikroba. Väčšina je lokalizovaná na vonkajšej membráne a pravdepodobne zohrávajú úlohu pri transmisii a nie sú ovplyvniteľné

protilátkami ani antibiotikami. Môžu sa viazať na plazminogény, aktivátory plazminogénu a na bunky extracelulárnej matrix a povrchové molekuly (Salo *et al.*, 2011). Tiež v nej bolo identifikovaných niekoľko adhezínov, ktoré sprostredkovávajú adhéziu ku kolagénu, integrínov, dekorínu, fibronektínu, glykozaminoglykánom a laminínu (Hallstrom *et al.*, 2010).

Existuje celkovo 6 typov Osp (outer space protein) antigénov, OspA, OspB, OspC, OspD, OspE a OspF (Votava *et al.*, 2006).

OspA je adhezín, ktorý sa selektívne viaže na bunky črevného epitelu. Je veľmi špecifický, tvorí sa až pri dlhotrvajúcej infekcii (Aguero-Rosenfield *et al.*, 2005). Podľa niekoľkých štúdií sa produkuje a mení v priebehu prenosu (Ohnishi *et al.*, 2002). Sprostredkováva pripojenie borélií k črevu kliešťa počas prvých hodín jeho prisatia k hostiteľovi (Aguero-Rosenfield *et al.*, 2005), a to prostredníctvom interakcie OspA antigénu a receptorom pre OspA, tzv. TROSPA, čo slúži na rozmnoženie spirochét a ich prípravu na rozšírenie do slinných žliaz kliešťa, a teda sa len zriedka dostane do slinných žliaz (Steere *et al.*, 2016). Tiež je známe, že jeho lipidová časť indukuje aktiváciu polyklonálnych B-buniek.

OspB je typický svojím baktericídnym účinkom, čo okrem iného ovplyvňuje konkurencieschopnosť iných baktérií, ktoré sa vyskytujú u hostiteľa.

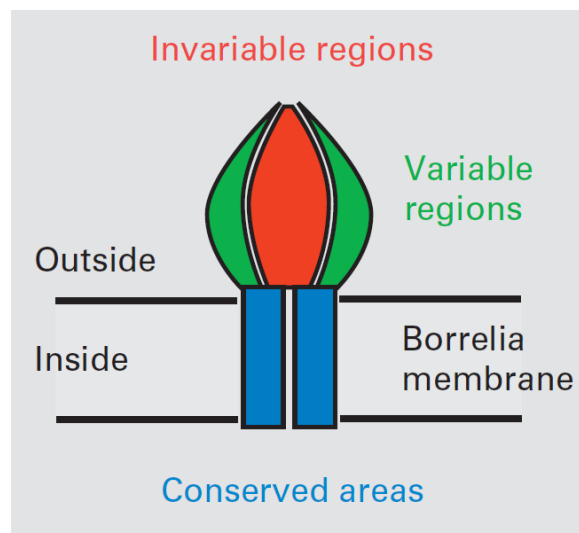
OspC sa môže podieľať pri úniku spirochét z čriev kliešťa do slinných žliaz a spôsobuje infekciu u človeka (Ohnishi *et al.*, 2002). Radíme ho medzi antigény teplotného šoku. Začína sa tvoriť ihneď po vniknutí borélií do organizmu hostiteľa, čím sa chráni pred únikom imunitného systému (Aguero-Rosenfield *et al.*, 2005).. Vrchol syntézy nastáva po približne 48 hodinách od prisatia kliešťa (Ohnishi *et al.*, 2002). Pokiaľ sa začnú tvoriť protilátky proti OpsC antigénu, prevažne typu IgM, ide o ranné štádium infekcie, naopak, pri znížení ich expresie dochádza k perzistencii mikroorganizmu a prechodu na chronický priebeh ochorenia (Meyerhoff *et al.*, 2018).

OspD antigén je lipoproteín a má lytický účinok. Rovnako ako OspA a OspB sa viaže na črevá kliešťa, no na rozdiel od spomínaných nie je pre túto väzbu dôležitý.

OspE spolu s OspF sú antigénmi teplotného šoku zabezpečujúce stresovú odpoveď bunky na rôzne faktory ohrozujúce život.

VlsE je povrchový lipoproteín, ktorý sa objavuje pri prechode do diseminovaného štádia (Aguero-Rosenfield *et al.*, 2005). Podlieha antigénnej obmene (Ohnishi *et al.*, 2002)

a predpokladá sa, že zohráva dôležitú úlohu v imunitnej odpovedi hostiteľa na boréliu (Aguero-Rosenfield *et al.*, 2005). Pravdepodobne to môže byť spôsobené jeho štruktúrou (obrázok 2), konkrétne variabilnými a konštantnými oblasťami. Pričom variabilná časť je neustále menená rekombináciami, vďaka čomu sa imunitný systém stretáva stále s novými epitopmi, konštantnú časť chráni od priameho zásahu imunitného systému hostiteľa variabilná časť, nakoľko ju maskuje (Jacek *et al.*, 2016). Hlavným imunodominantným epitopom je C6 peptid nachádzajúci sa v oblasti IR6 (Marques *et al.*, 2015). Používa v komerčných diagnostických testoch. Predpokladá sa, že práve silná imunogenita IR6 oblasti môže byť súčasťou mechanizmu úniku *Borrelia burgdorferi* pred imunitným systémom hostiteľského organizmu (Jacek *et al.*, 2016). Vyvoláva silnú a rýchlu humorálnu odozvu, ktorú môžeme zistiť v priebehu infekcie (Marques *et al.*, 2015). U pacientov s Lymfskou chorobou sa tvoria špecifické protilátky práve proti tomuto antigénu a to vo všetkých štádiách ochorenia.



**Obrázok 2:** Štruktúra povrchového VlsE antigénu (prevzaté z Euroimmun).

Borélie majú okrem povrchových aj bičíkový antigén – flagelin. Ide o nešpecifický glykoproteín tvorený vonkajším a vnútorným proteínom, FliA a FliB (Štěrba *et al.*, 2008). FliA typ proteínu tvoriaci obal bičíka spúšťa včasnú imunitnú odpoveď s protilátkou tvorbu triedy IgM. Pri tvorbe IgG protilátok proti FliA proteínu, ktoré sú nešpecifické, môže dôjsť ku vzniku autoimunitného ochorenia, nakoľko vedú zapríčiniť skříženú reakciu s ľudským antigénom HSP60, proteínom nervových buniek (Steele *et al.*, 2016). FliB proteín tvorí jadro bičíka. Na základe stavby flagelinu sa stretávame pri diagnostike Lymfskej choroby s problémom, akým je možná falošná pozitivita (Marques *et al.*, 2015). Dôvodom je, že

rodovo špecifická je len vnútorná časť flagelinu, a teda s inými spirochétami či baktériami s bičíkom môže reagovať celý antigén.

### **1.1.1 Patomechanizmy *Borrelia burgdorferi***

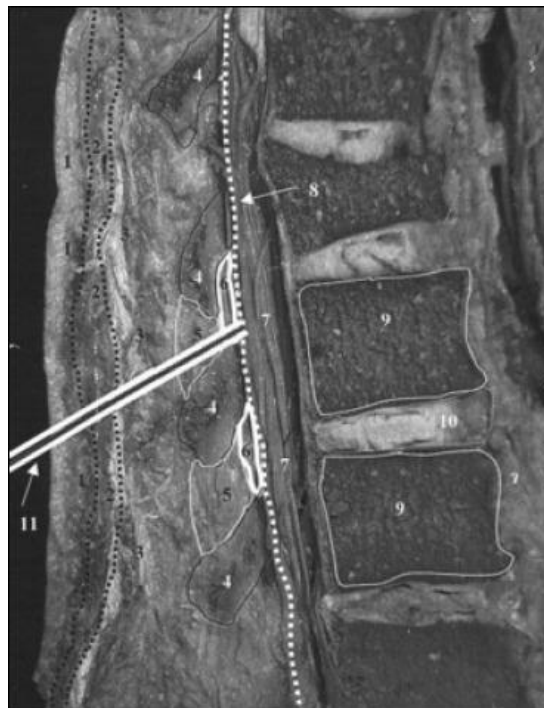
O spirochétach je známe, že sú neurotropné. TLR receptory spolu s CD14 viažu povrchové proteíny spirochét a prostredníctvom TLR signalizácie stimulujú mikroglie s makrofágmi k sekrécii cytokínov a chemokínov a exprimujú rôzne prozápalové molekuly s cieľom odstrániť napádajúce spirochéty a poškodené bunky hostiteľa (Steere *et al.*, 2016). Povrchové lipoproteíny alebo priamo tento kmeň indukujú produkciu C reaktívneho proteínu, TNF a sérového amyloidu A. Zohrávajú významnú úlohu pri systémových a lokálnych zápalových zmenách, charakteristických pre infekcie spôsobené spirochétami. Baktérie tohto kmeňa sú schopné aktivovať ako klasické, tak aj alternatívne dráhy komplementu a využívať širokú škálu stratégií na prežitie v hostiteľských bunkách (Steere *et al.*, 2016). *Borrelia burgdorferi* má päť povrchových proteínov viažucich imunitné regulátory alternatívnej dráhy, ktoré zabraňujú deštrukcii lýzou komplementu (Salo *et al.*, 2011). Indukuje tiež IL-12, čo je cytokín zodpovedný za riadenie bunkovej odpovede voči Th1 podskupine, čím vlastne spomaľuje indukciu tvorby protilátok Th2 bunkami (Pietikäinen *et al.*, 2016). Opísaný spôsob je ich ochrana pred adaptívnym imunitným systémom. Ďalšou výhodou borelií je fakt, že sú intracelulárnym parazitom, čo im rovnako poskytuje istú formu ochrany pred imunitným systémom hostiteľského organizmu. Blokáda kaskády komplementu poskytuje spirochétam istú výhodu a umožňuje im progresívny rast aj v hostiteľovi s imunitou.

## **1.2 Lumbálna punkcia**

Lumbálna punkcia je diagnostická metóda, ktorou sa odoberá likvor. V niektorých prípadoch slúži aj ako liečebná procedúra, kedy sa aplikujú liečivé prípravky (Telano *et. Baker*, 2018). K najčastejším indikáciám patria infekčné alebo zápalové ochorenia nervového systému či už infekčnej alebo autoimunitnej etiológie, ďalej neurodegeneratívne, niektoré cievne a nádorové postihnutia centrálného nervového systému (CNS) (Doherty *et. Forbes*, 2014).

K vyšetreniu sa likvor najčastejšie, podľa všeobecných doporučení, získava v medzistavcových priestoroch L3-L4 alebo L4-L5 pomocou sterilnej spinálnej ihly (obrázok 3) (Wright *et al.*, 2011). U dospelého človeka miecha zväčša nepresahuje úroveň tretieho bedrového stavca, väčšinou končí vo výške dvanásteho hrudného stavca. Pacient je počas

odberu buď v ľahu na boku s maximálnou flexiou chrbtice alebo v sede s flektovanou chrbticou (Telano *et.* Baker, 2018). Miesto vpichu sa vydezinfikuje, event. je možné i miestne znecitlivenie. V súčasnosti sa najčastejšie používajú špeciálne, tzv. atraumatické ihly, ktoré sú v prípade dospelého človeka dlhé asi 9 cm. Pri ich použití sa znižuje možnosť komplikácií, nedochádza k veľkému poraneniu okolitých štruktúr a minimálne je aj spätné presakovanie mozgovomiechového moku po odbere. Ihla pri lumbálnej punkcii preniká postupne týmito štruktúrami: kožou, podkožným tkanivom, *ligamentum supraspinale*, *ligamentum interspinale*, *ligamentum flavum*, epidurálnym priestorom medzi žilnou pletňou, tvrdou mozgovou plenu a arachnoideou (Doherty *et.* Forbes, 2014). Po zavedení ihly do subarachnoidálneho priestoru a vytiahnutí mandrénu z ihly necháme likvor odkvapkávať do 2-3 skúmaviek, pričom sa odoberá čo najmenšie množstvo, optimálne cca 10 ml u dospelého (Doherty *et.* Forbes, 2014). K vyšetreniu sa použije vzorka s najmenšou prímiesou krvi. Po lumbálnej punkcii sa odporúča pokoj na lôžku.



**Obrázok 3:** Sagitálna časť bedrových stavcov ilustrujúca smer ihly pri lumbálnej punkcii (prevzaté z Doherty *et.* Forbes, 2014).

Lumbálnu punkciu indikujeme pri podozrení na ochorenia nervového systému, ako sú Reye syndróm, nádorové ochorenia mozgu a miechy, krvácanie v subarachnoidálnom priestore, demyelinizačné ochorenia, neuroinfekcie, *Guillain-Barré* syndróm, pseudotumor cerebri (idiopatická intracraniálna hypertenzia) či bolesti hlavy (Telano *et.* Baker, 2018).

Kontraindikácie zahŕňajú napríklad lokálnu kožnú infekciu, zvýšený intrakraniálny tlak či poruchy zrážanlivosti krvi (Wright *et al.*, 2018).

### 1.3 Neuroborelióza

Lymfská neuroborelióza je neurologický prejav systémovej infekcie spôsobenej spirochétou *Borrelia burgdorferi* (Djukic *et al.*, 2012), prenášanou kliešťami *Ixodes ricinus* (Huppertz *et al.*, 2012). Zároveň je najčastejším prejavom neskorého diseminovaného štádia Lymfskej boreliózy v Európe (Henningsson *et al.*, 2014). Prejavuje sa postihnutím centrálného a/alebo periférneho systému. Medzi dominantné genotypy spôsobujúce Lymfskú chorobu v Európe patrí *Borrelia garinii* a *Borrelia afzelii* (Wilske *et al.*, 2007), zatiaľ čo v Amerike je jediným patogénom *Borrelia burgdorferi sensu stricto* (Lindland *et al.*, 2018).

O neuroborelióze môžeme hovoriť až v prípade splnení istých kritérií, ktoré udáva EFNS (Mygland *et al.*, 2010). Zahŕňajú intratekálnu syntézu špecifických protilátok, vyjadrenú aj cez protilátkový index a/alebo pozitívnu PCR, pleocytózu v likvore a prítomnosť kompatibilných neurologických symptómov (Henningsson *et al.*, 2014). Ak sú splnené tri kritéria, neuroborelióza je potvrdená, v prípade dvoch ide o pravdepodobnú neuroboreliózu (Lindland *et al.*, 2018). Aj v tomto prípade však existuje výnimka, kedy nemusia byť dané kritéria splnené, a to pri neskorom štádiu – polyneuropatickej forme. Konkrétne sa to týka acrodermatitis chronica atrophicans a neuropatie (Mygland *et al.*, 2010).

Neuroborelióza obvykle nekončí fatálne, pravdepodobne pre nedostatok klasických endotoxínov a preto, že organizmus má dostatok času sa s infekciou vyrovnáť (Rupprecht *et al.*, 2014). Infekcia, bez ohľadu na jej trvanie je teda prakticky vyliečiteľná (Halperin *et al.*, 2016). Avšak, ak sa príznaky neliečia, môže viesť k trvalému poškodeniu nervového tkaniva (Signorino *et al.*, 2014). Zmena kvality života, únava, depresia a kognitívne poruchy nie sú častejšie u pacientov po prekonanej neuroborelióze v porovnaní so zdravými ľuďmi (Dersch *et. Rauer*, 2017).

#### 1.3.1 Patogenéza a patofyziológia

Mechanizmus invázie patogéna do nervového systému zostáva nejasný. Existuje hypotéza, z ktorej vyplýva, že spirochéty migrujú z *erythema migrans* vzniknutého na mieste prisatia kliešťa do nervového systému pozdĺž periférnych nervov (Henningsson *et al.*, 2018). Založená je na výskyte radikulárneho syndrómu s *erythema migrans* na rovnakých končatinách, čo však tiež bolo vyvrátené, a preto je hypotéza o invázii borélií do nervového

systemu neobjasnená. Hypotézu o migrácii z miesta prisatia kliešť'a pozdĺž periférnych nervov do CNS podporuje aj skutočnosť, ktorou je prítomnosť boréliami indukovaného chemokínu CXCL13 vo vysokých koncentráciách v likvore, ale nie v sére u pacientov s Lymfskou neuroboreliózou (LNB) (Steere *et al.*, 2016). Rupprecht s kolektívom vo svojej štúdií popisujú možnú cestu invázie spirochét do CNS hematogénnou disemináciou. Svoje tvrdenie zakladajú na fakte, že krvný obeh je známym spôsobom šírenia mnohých iných baktérií, a preto je pravdepodobné, že *Borrelia burgdorferi* využíva túto cestu tiež (Rupprecht *et al.*, 2014). O rôznych spôsoboch invázie borélií do CNS nasvedčuje aj rôzna klinická symptomatológia, čo súvisí s odlišnými pôvodcami v Európe a v USA. A to najmä, ak si uvedomíme, že najčastejším izolovaným druhom z likvoru u pacientov s Bannwarthovým syndrómom v Európe je *Borrelia garinii*, zatiaľ čo v USA zistený nebol a syndróm sa tam vyskytuje minimálne (Lindland *et al.*, 2018). Naopak, najčastejším prejavom v USA je meningitída vyvolaná *Borrelia burgdorferi sensu stricto* (Lindland *et al.*, 2018). To v istej miere umožňuje polemizovať nad odlišnými mechanizmami invázie borélií do CNS medzi USA a Európou, nakoľko meningopolyradikulitída pri Bannwarthovom syndróme môže byť výsledkom invázie pozdĺž nervov, zatiaľ čo v USA pozorovaná meningitída by mohla byť výsledkom hematogénneho šírenia (Henningsson *et al.*, 2018).

Otázkou však ostáva taktiež mechanizmus prechodu borélií cez hematoliquorovú bariéru (HLB). V literatúre sa uvádzajú dva možné spôsoby, a to penetrácia spirochét medzi endotelové bunky a transcelulárny prechod (Rupprecht *et al.*, 2014).

Čo sa týka skutočného mechanizmu poškodenia nervového systému, existujú len obmedzené údaje patologických procesoch u ľudí (Halperin, 2017). Pozorovania údajov z neurofyziologických nálezov a zobrazovacích techník jediného zmysluplného zvieracieho modelu neuroboreliózy, a to u opice *Makak rhesus*, poukazujú na multifokálny zápalový proces (Lindland *et al.*, 2018). V prípade periférneho nervového systému (PNS) sa jedná o mononeuropatiu multiplex, klinicky sa prejavujúcu ako mononeuropatia, plexopatia, radikulopatia alebo konfluentná mononeuropatia multiplex (Lindland *et al.*, 2018). Prejavy postihnutia PNS môžu byť pozorované aj u pacientov, u ktorých ešte neprebehla sérokonverzia (Remy *et al.*, 2017).

Rovnako ako mechanizmus invázie borélií, nie je objasnená ani imunopatológia neuroboreliózy. Pacientov definuje zvýšený počet leukocytov v cerebrospinálnej tekutine, pričom cca 90% z nich tvoria lymfocyty (Pietikäinen *et al.*, 2016). Tiež sa ukázalo, že

mozgovomiechová tekutina u pacientov s neuroboreliózou obsahuje viac lymfocytov B ako likvor u ľudí, ktorí majú iné ochorenia nervového systému (Pietikäinen *et al.*, 2016). Spôsobené je to pravdepodobne tým, že akonáhle borélie vstúpia do CNS, najskôr sa stretnú s lokálnymi bunkami imunitného systému, ktorými sú makrofágy, monocyty či dendritické bunky (Cerar *et al.*, 2013). Tieto bunky produkujú prozápalové cytokíny, napr. IL-8, IL-6, IL-12, IL-18 či INF, čo je dôvodom, prečo u pacientov s LNB detekujeme v likvore ich zvýšené hladiny (Martinez *et al.*, 2015). Podstatnou sa v tomto zdá najmä produkcia chemokínov na prítiahnutie ostatných buniek imunitného systému (najmä lymfocyty B) do miesta zápalu (Cerar *et al.*, 2013). Nakoľko chemokíny môžeme rozdeliť podľa toho, aký typ buniek priťahujú, a keďže u týchto pacientov prevládajú lymfocyty B, ktoré vykazujú migráciu iba v reakcii na veľmi málo chemokínov (medzi nimi okrem iných aj CXCL13), tak môžu hrať dôležitú úlohu pri zápalovej reakcii v CNS, a tiež v tom, prečo pri neuroborelióze prevláda práve chemokín CXCL13 (Cerar *et al.*, 2013). Polyklonálne B bunky aktivuje lipidová časť OspA antigénu, vďaka čomu môžu diferencovať špecifické protilátky detekované v likvore (CSF), čo nám opäť môže poskytnúť vysvetlenie, prečo sú detekovateľné zvýšené hladiny CXCL13 v likvore skôr ako prítomnosť intratekálnych špecifických protilátok.

Okrem plazmatických buniek a lymfocytov B dochádza aj k akumulácii aktivovaných CD8+ lymfocytov v CNS počas skorého štádia neuroboreliózy.

Doposiaľ však u borélií neboli objavené žiadne enzýmy, faktory virulencie či toxíny (Bartůnek *et al.*, 2013). K faktorom patogenity radíme aktívny pohyb bičíkov a prítomnosť lipopolysacharidového komplexu, ktorý sa podieľa na vzniku teploty a tkanivovom poškodení (Henningsson *et al.*, 2018).

### **1.3.2 Klinické prejavy**

Klinická prezentácia Lymfocytnej neuroboreliózy sa môže značne líšiť, čiastočne kvôli genetickým rozdielom v spirochetálnych kmeňoch (Lindland *et al.*, 2018). Široké spektrum symptómov môže byť tiež podmienené tým, ako sa spirochéty šíria z miesta prisatia kliešťa do nervového systému, kam sa dostanú po prekonaní bariéry mozgovomiechového moku a hematoencefalitickej membrány. *Borrelia burgdorferi* sa organizmom šíri najmä krvnou cestou, zatiaľ čo *Borrelia garinii* i *Borrelia afzelii* migrujú pozdĺž iných štruktúr až priamo do nervových koreňov (Henningsson *et al.*, 2018). Individuálne varianty imunologickej odpovede a možnosť koinfekcie môžu tiež vysvetliť široké spektrum symptómov, s ktorými



sa stretávame (Lindland *et al.*, 2018). Vyskytuje sa však aj atypická klinická manifestácia vrátane gastrointestinálnych prejavov z dôvodu autonómnej dysfunkcie (Hansen *et al.*, 2018).

Symptómy sa od uhryznutia kliešťa objavia v priebehu niekoľkých týždňov, v niektorých prípadoch sa klinicky prejaví až v priebehu niekoľkých rokov (Pietikäinen *et al.*, 2016). Zvyčajne však ide o časové rozpätie 1-12 týždňov, pričom najčastejšie je to do štyroch týždňov od prisatia kliešťa (Mygland *et al.*, 2010). Ochorenie môže manifestovať rôznymi spôsobmi, aj keď samotné klinické symptómy sú tiež predmetom diskusií, nakoľko odborníci z oblasti sa nezhodujú v typických či nešpecifických prejavoch Lymскеj neuroboreliózy (Dersch *et al.*, 2015). Často sa prejavuje meningitídou, radikulitídou, prípadne obrnou líčneho nervu, zriedkavejšie už ako periférne neuropatie, meningoencefalitída či cerebrálna vaskulitída (Lindland *et al.*, 2018). Menej špecifické, ale bežné príznaky sú cefalea, únava, nevoľnosť, strata chuti do jedla alebo nešpecifická bolesť (Henningsson *et al.*, 2018). No najbežnejším prejavom je Bannwarthov syndróm s bolestivou radikulitídou a aseptickou meningitídou (Lindland *et al.*, 2018). Pričom iba 25-50% pacientov s Lymskou neuroboreliózou má v anamnéze *erythema migrans* a iba tretina pohryznutie kliešťom (Rauer *et al.*, 2018). Klinická manifestácia je čiastočne zapríčinená tým, ktoré genospecies spôsobilo infekciu (Marques *et al.*, 2015). Napríklad, výraznejšie príznaky spôsobuje *Borrelia garinii* v porovnaní s *Borrelia afzelii* (Henningsson *et al.*, 2014). Neurologickým prejavom môžu v niektorých prípadoch predchádzať symptómy poukazujúce na postihnutie iného orgánového systému (Hansen *et al.*, 2018).

U detí sa klinická manifestácia výrazne nelíši v porovnaní s dospelými pacientmi (Bartůnek *et al.*, 2013). Najčastejším prejavom je periférna paréza *nervus facialis* a lymfocytárna meningitída (Stanek *et al.*, 2011). Z nešpecifických príznakov sú to často najmä zvýšená teplota, únava či strata chuti do jedla, v niektorých prípadoch dokonca bez špecifických neurologických nálezov (Rauer *et al.*, 2018).

Stretávame sa aj s prípadmi, kedy asi 10 – 50% pacientov trpiacich neuroboreliózou alebo boreliózou všeobecne udáva pretrvávajúce, prípadne nové symptómy (Eikeland *et al.*, 2011). Sú to predovšetkým myalgie, cefalea, atralgie, poruchy pamäte a koncentrácie, a únava (Lindland *et al.*, 2018). V tomto prípade ide o postboreliový syndróm (Chandra *et al.*, 2011).

### 1.3.3 Štádia ochorenia

#### 1.3.3.1 Včasné lokalizované štádium

Vo včasnom lokalizovanom štádiu sa s neurologickými prejavmi nestretávame, typickým prejavom však je *erythema migrans* s chrípkovitými symptómami (Cerar *et al.*, 2013). Približne polovica infikovaných má nešpecifické symptómy ako horúčka, myalgia, lymfadenopatia a bolesť hlavy (Roaldsnes *et al.*, 2017). V prípade, že sa vyskytnú, podobajú sa iným ochoreniam nervového systému, vrátane vírusovej alebo lymfocytárnej mozgovomiechovej meningitídy.

V prvých dňoch infekcie sa môže urobiť biopsia kože, vykazujúca papilárny dermálny edém a infiltrát (Steere *et al.*, 2016). Ten pozostáva prevažne z neutrofilov, lymfocytov T, dendritických buniek, makrofágov a monocytov. Expresia cytokínov je v tomto štádiu prevažne prozápalová a zahŕňa zvýšené hladiny TNF, IL-2, IL-6, a IFN typu 1 (Jones *et al.*, 2008). U pacientov s *erythema migrans* môžeme sledovať zvýšené hladiny aj u chemokínov, napr. CXCL1, CXCL9, CXCL10, CXCL11 či CCL3 a CCL4. Detekované môžu byť aj špecifické protilátky triedy IgM proti OspC proteínu (Mülleger *et al.*, 2007).

#### 1.3.3.2 Včasné diseminované štádium

Najčastejším neurologickým prejavom skorého diseminovaného štádia je Bannwarthov syndróm, bolestivá meningoradikulitída (Mygland *et al.*, 2010). Klinickými znakmi Bannwarthovho syndrómu sú radikulárna bolesť (u 86% pacientov) a paréza (61%) (Mygland *et al.*, 2010), pričom k jej rozvoju dochádza v priebehu asi 1-4 týždňov. Môže ísť o parézy periférne alebo bilaterálne, a v princípe môže byť postihnutý ktorýkoľvek z kraniálnych nervov, aj keď nebol hlásený žiaden prípad postihnutia čuchových nervov (Rauer *et al.*, 2018). Lokalizácia a intenzita bolesti sa môže zmeniť zo dňa na deň a zvyčajne sa objavuje v noci (Mygland *et al.*, 2010). Pre bolesť je typický bodavý, páľčivý a trhavý charakter so zlou reakciou na bežné analgetiká. Avšak najčastejším počiatočným príznakom postihnutia PNS je neurogénna bolesť pozdĺž chrbta vyžarujúca do nôh a chodidiel, sprevádzaná slabosťou, necitlivosťou a mravčením (Ramesh *et al.*, 2015). Časté sú aj motorické deficity a bolesť lokalizovaná na uhryznutej končatine. Bannwarthov syndróm je často sprevádzaný lymfocytárnou meningitídou (Stanek *et al.*, 2011). Bolesť hlavy sa vyskytuje približne u 43% (Mygland *et al.*, 2010), ale výrazná cefalea bez parézy alebo radikulárnej bolesti je u dospelých zriedkavá. Opozícia šíje sa taktiež vyskytuje len zriedka.

V tejto fáze ochorenia je postihnutie CNS zriedkavé, ale pacienti môžu mať encefalitídu či myelitídu. Rovnako sa môžeme stretnúť s príznakmi podobnými Parkinsonovej chorobe, zmätenosťou, hemiparézou alebo cerebelárnou ataxiou (Mygland *et al.*, 2010).

### 1.3.3.3 Neskoré diseminované štádium

Táto fáza ochorenia sa tiež zvykne nazývať ako tzv. chronická neuroborelióza, a teda má chronický priebeh, čo pravdepodobne súvisí s pretrvávajúcim prežívaním baktérií v nervovom tkanive (Mygland *et al.*, 2010). Pacient sa v tomto štádiu ocitne v prípade, ak jeho symptómy pretrvávajú viac než 6 mesiacov (Stanek *et al.*, 2011), pričom je okrem centrálného nervového systému postihnutý aj periférny nervový systém (Mygland *et al.*, 2010). Okrem dlhodobej symptomatológie je prítomná lymfocytárna pleocytóza, typicky s aktivovanými lymfocytmi B a prítomnosťou intratekálnych špecifických IgG protilátok v likvore (Stanek *et al.*, 2011).

V Európe je zatiaľ jediná popísaná manifestácia postihnutia PNS polyneuropatia s acrodermatitis chronica atrophicans – typický dermatologický prejav neskorého štádia boreliovej etiológie (Stanek *et al.*, 2011). Vyskytuje sa prevažne na akrálnych častiach končatín a popisuje sa ich výskyt práve na končatinách, na ktorých pacienti udávali erythema migrans v skorších fázach ochorenia. Acrodermatitis chronica atrophicans je výsledkom infekcie spôsobenej predovšetkým baktériou *Borrelia afzelii*, no nevylučuje sa ani *Borrelia burgdorferi*, príp. *Borrelia garinii* (Rauer *et al.*, 2018). Pri tomto ochorení nemôže byť príčinný vzťah s boreliovou infekciou založený len na detekcii špecifických anti – *Borrelia burgdorferi* protilátok, keďže sa vyskytovať aj u 5-25% zdravých osôb (Mygland *et al.*, 2010).

Postihnutie centrálného nervového systému zahŕňa chronickú progresívnu encefalitídu alebo encefalomyelitídu s tetraspastickým syndrómom, poruchou močenia a spasticko-ataktickou chôdzou a cerebrálnu vaskulitídu (Rauer *et al.*, 2018).

### 1.3.4 Terapia

Lymská borelióza je predovšetkým klinická diagnóza, a v prípade, že pacient nemá žiadne klinické ťažkosti, pozitivita laboratórných parametrov sa nelieči (Gurčík, 2009).

Voľba vhodného antibiotika, spôsob jeho podania či dĺžka trvania liečby stále patria k diskutovaným témam. Smernice AAN, IDSA a EFNS odporúčajú trvanie terapie 14-28 dní, avšak ILADS uvádza potrebu v trvaní až niekoľkých mesiacov (Dersch *et al.*, 2015). Nezhody

sú aj v podávaní opakovanej antibiotickej liečby, pretože odporúčaniami niektorých smerníc ich odporúčajú, zatiaľ čo iné vyvracajú vôbec možnosť pretrvávania infekcie po adekvátnom preliečení, a preto by mala byť voľená už len liečba symptomatická (Cameron *et al.*, 2004). Jednotlivé spoločnosti sa nezhodujú ani v tom či je lepšie podať kombináciu viacerých druhov antibiotík s inými, pomocnými látkami alebo či postačuje len jeden druh ATB (Cameron *et al.*, 2004).

Vhodná antibiotická terapia Lymfatickej choroby závisí od štádia, v ktorom sa pacient nachádza.

Liekom voľby skorej lokalizovanej fáze infekcie je doxycyklín 2x100 mg v trvaní 10-21 dní. Pri kontraindikáciách, intolerancii či alergii volíme cefuroxim 2x500 mg 14-21 dní, event. Amoxicilín 3x500 mg počas 10-21 dní, všetko perorálne (Rauer *et al.*, 2018). Odporúčané dávkovanie pri podávaní amoxicilínu u detí do 8 rokov je 50 mg/kg/deň, možno však podať aj penicilín V 3x100 mg, p. o. 10-21 dní (Rauer *et al.*, 2018). V porovnaní s ostatnými ATB sú makrolidy menej účinné, tiež sa nepodávajú ani betalaktámové antibiotiká a cefalosporíny I. generácie (Gurčík, 2009).

Vo včasnej diseminovanej fáze je odporúčaným liekom ceftriaxon 2 g i. v. podávaný najmenej 28 dní, možnou alternatívou je cefoxatim 3x2 g i. v., rovnako aspoň 14-28 dní. Podľa odporúčaní môžeme zvoliť aj penicilín G i. v. v trvaní 21-30 dní (OU MZ SR, 2010).

Liečba chronickej neuroboreliózy je zhodná so skorým diseminovaným štádiom.

## **1.4 Klinická a laboratórna diagnostika**

### **1.4.1 Anamnéza**

Anamnéza je súhrn informácií o pacientovi podstatných pre vyhodnotenie aktuálneho zdravotného stavu. Anamnéza je viac než polovica diagnózy, preto by lekár mal mať po jej dokončení základnú predstavu o pacientovi a jeho chorobe, ale aj o základnej diferenciálnej diagnóze (Ambler, 2006).

Kontakt s pacientom začíname anamnézou terajších ochorení, ktorú je možné rozdeliť na spontánnu, cieľnú a objektívnu. Pri spontánnej pacient svojimi slovami udáva problémy a ťažkosti. Pri cieľnej anamnéze ide vlastne o vedenie anamnézy spontánnej, teda kladieme konkrétne otázky, upresňujeme pojmy, napr. pri kľúčoch či závratach (Ambler, 2006). Taktiež si

zistíme doterajšie vyšetrenia a liečbu. Objektívna anamnéza pochádza od rodiny, svedkov konkrétnej udalosti. Dôležitá je najmä pri poruchách vedomia, prípadne u zmien osobnosti, ak ju má postihnutý v anamnéze. V tejto časti sa sledujú hlavné ťažkosti, ktorými sú bolesti hlavy, poruchy niektorých zmyslov, poruchy vedomia, porucha citlivosti, poruchy motoriky (napr. slabosť, porucha rovnováhy, tremor), závrate a porucha vyšších kortikálnych funkcií. Všímame si aj mimiku, výraz v tvári, spôsob reči či inotáciu hlasu (Seidl, 2015).

Nasleduje rodinná anamnéza, ktorá vie byť užitočná aj v prípade infekčného ochorenia.

Pri osobnej anamnéze zisťujeme, najmä pri deťoch, od matiek priebeh tehotenstva, pôrodu, závažné choroby a ich priebeh. Dôraz sa kladie predovšetkým na ochorenia, ktoré si vyžiadali hospitalizáciu či sústavnú liečbu, úrazom a operáciám, najmä chrbtice a hlavy. Dôležitá je tiež súčasná prítomnosť iných, hlavne systémových chorôb a užívanie liekov, nakoľko niektoré prejavy môžu byť dôsledkom vedľajších či dokonca toxických prejavov liekov, prípadne môže ísť o abstinenčné príznaky (Seidl, 2015). Nemej podstatné v rámci osobnej anamnézy je aj alergická anamnéza a abúzus návykových látok, teda fajčenie a alkohol. U žien sa spisuje aj gynekologická anamnéza (potraty, pôrody, menštruácia, tehotenstvo, klimaktérium či užívanie kontraceptív) (Ambler, 2006).

Možnú súvislosť s ochorením, či skôr s prejavmi, môže mať aj typ práce pacienta, preto je potrebné spisovať aj pracovnú anamnézu.

Zhodnotenie súčasných sociálnych a rodinných pomerov patrí do sociálnej anamnézy.

#### **1.4.2 Klinické vyšetrenie**

Cieľom klinického vyšetrenia je čo najpresnejšie lokalizovať postihnutie, stanoviť jeho rozsah a prípadne charakter (Ambler, 2006). Ošetrujúci lekár vykonáva objektívne a subjektívne vyšetrenie. Informácie získané objektívnym vyšetrením sú cennejšie.

Pod normou, resp. normálnym, fyziologickým stavom sa rozumie, ak je pacient pri vedomí, spolupracuje, je orientovaný, primeranej výživy a má normálnu farbu kože (Seidl, 2015).

Systematické vyšetrenie zahŕňa vyšetrenie hlavy, vrátane mozgových nervov, krk, horné končatiny, brucho a dolné končatiny, pokračuje sa chrbticou, postojom a chôdzou (Seidl, 2015).

U detí sa najčastejšie môžeme stretnúť s obrnou niektorého z tvárových nervov, bolesťou hlavy a pozitívnym meningeálnym syndrómom (Stanek *et al.*, 2011).

Len malé percento pacientov s neliečenou Lymfskou chorobou má príznaky kraniálnej neuropatie, avšak u väčšieho počtu infikovaných vo včasnom štádiu neuroboreliózy sa vyvíja kraniálna neuritída (Lindland *et al.*, 2018). Najbežnejšia je paréza *nervus VII*, pričom bilatérna obrna je pre túto infekciu charakteristická, čo klinikom umožňuje odlišenie LNB od Bellovej obrny či iných porúch (Meyerhoff *et al.*, 2018). Pri parézach tvárových nervov sa vyskytujú aj iné nálezy súvisiace práve s parézou. Môžu zahŕňať poruchy sluchu a zraku, vertigo a/alebo parestéziu tváre. Medzi iné neurologické symptómy patria radikuloneuropatia a/alebo plexopatia a fokálny príp. difúzny mononeurotis multiplex (Meyerhoff *et al.*, 2018). Už menej častými sú pseudotumor cerebri, myozitída a cerebelitída.

V prípade, že ide o meningitídu, ktorá je relatívne častá, príznaky sa objavia približne v rozmedzí 2-10 týždňov od uhryznutia kliešťom (Meyerhoff *et al.*, 2018). Nemanifestuje však klinicky natoľko výrazne ako bakteriálna meningitída. Najčastejšími symptómami indikujúcimi menigeálne podráždenie sú cefalea, bolesť krku a/alebo jeho stuhnutosť a fotofóbia. (Seidl, 2015) Závažnosť cefaley sa pohybuje od miernej až po ťažkú, ale samostatná perzistentná je pri tejto infekcii zriedkavá, aj keď je potrebné zvážiť aj túto možnosť.

Vo viac než polovici prípadov sa uvádza akútna radikuloneuritída (Lindland *et al.*, 2018). Po 2-4 týždňoch sa pozoruje rýchly nástup motorických deficitov, strata zmyslového vnímania a silná radikulárna bolesť (Meyerhoff *et al.*, 2018). Bežnou prezentáciou je aj multifokálna asymetrická slabosť. Často však ju nie je možné rozoznať od kompresie chrbtice a miechy.

Naopak, chronická radikulitída zvyčajne nebýva spojená so senzorickými či motorickými deficitmi (Meyerhoff *et al.*, 2018).

Intermitentné parestézie udávajú pacienti zväčša pri periférnej neuropatii (Meyerhoff *et al.*, 2018). Najčastejším nálezom pri vyšetrení je zníženie vibračnej citlivosti na distálnych častiach dolných končatín. Bežným zistením sú aj epikritické zmyslové deficity a oproti motorickým nálezom sú výraznejšími tie senzorické (Meyerhoff *et al.*, 2018)..

Intermitentné parestézie distálnych častí končatín hlásia pacienti pri neskorej axonálnej neuropatii mesiace až roky po liečbe ochorenia (Meyerhoff *et al.*, 2018). Je však

potrebné odlíšenie od neuropatie pri skorej Lymsej borelióze aj tým, že symptómy sú menej závažné. Asociovaná neuropatia – acrodermatitis chronica atrophicans sa prejavuje svalovými kŕčmi, neuropatickou bolesťou a parestéziou (Mygland *et al.*, 2010).

Bežným prejavom infekcie spôsobenej *Borrelia garinii* je Bannwarthov syndróm, ktorý manifestuje kraniálnou neuritídou bez cefaley a neuritickou bolesťou (Meyerhoff *et al.*, 2018). Typicky sa vyskytuje aj lymfocytová pleocytóza (Mygland *et al.*, 2010).

Boréliová encefalopatia najčastejšie manifestuje ako mierny stav zmätenosti sprevádzaný poruchami pamäte, spánku, koncentrácie, náladovosťou a taktiež poruchami osobnosti či vyjadrovania, ktoré môžu pretrvávať aj mesiace až roky po eradikácii ochorenia (Eikeland *et al.*, 2011). Bežnými sú aj podráždenosť či depresia (Meyerhoff *et al.*, 2018).

V neskoršom štádiu je možné stretnúť sa aj so neuropsychiatrickými nálezmi zahŕňajúcimi bipolárnu poruchu, depresiu, demenciu, úzkosť a psychózu podobnú schizofrénii (Meyerhoff *et al.*, 2018).

### **1.4.3 Laboratórna diagnostika**

Diagnostika Lymsej neuroboreliózy sa opiera o posúdenie klinickej anamnézy pacienta a klinických neurologických symptómov, ale veľmi dôležitú úlohu zohráva aj laboratórna diagnostika (Cerar *et al.*, 2013). Podľa odporučení EFNS detekujeme intratekálnu syntézu špecifických protilátok alebo priamy dôkaz borélií metódou PCR, alebo kultivačne (Henningsson *et al.*, 2014). Obmedzením však je možná nižšia citlivosť v skorých fázach choroby, čo môže viesť k falošne negatívnym výsledkom (Henningsson *et al.*, 2018). Ďalšou komplikáciou je taktiež fakt, že anti – *Borrelia burgdorferi* protilátky sa môžu u pacientov perzistovať aj niekoľko rokov po eradikácii (Marques *et al.*, 2015). Čo je dôvod, prečo nie je vhodné používať sérologickú diagnostiku na sledovanie úspešnosti antibiotickej liečby. Ku zlatému štandardu diagnostiky Lymsej neuroboreliózy okrem spomínaných dvoch kritérií patrí aj dôkaz zápalových zmien v likvore, typicky pleocytózy (Mygland *et al.*, 2010). V prípade chronickej polyneuropatie však platia iné diagnostické kritéria, a to pozitívita antiboreliových protilátok v sére, periférna polyneuropatia a acrodermatitis chronica atrophicans (Mygland *et al.*, 2010).

V prípade podozrenia na neuroboreliózu súčasne vyšetrujeme likvor a sérum. Metódy, ktoré využívame k dôkazu pôvodcu vo všeobecnosti možno rozdeliť na priame a nepriame (Huppertz *et al.*, 2012).

Pri priamych vyšetrovacích metódach narážame na problém, ktorým je nízky počet borélií vo väčšine klinických vzoriek. Z toho dôvodu nie sú nevyhnutnosťou pre diagnostikovanie ochorenia, ale vedia byť užitočné (Huppertz *et al.*, 2012). K hlavným metódam patrí kultivácia a PCR. V prípade kultivácie nejde o rutinne využívanú diagnostickú metódu, vzhľadom na dlhú inkubáciu, náročnosť borélií na kultivačné média a pomerne nízku citlivosť (Marques *et al.*, 2015).

Nepriame vyšetrovacie metódy sú založené na detekcii protilátkovej odpovede proti boréliám v likvore a v sére. Užitočné sú predovšetkým v prípadoch, kedy klinický obraz ukazuje na neskorú fázu ochorenia, nakoľko v skorých štádiách sa protilátky ešte netvoria alebo ich nie je dostatočné množstvo (Henningsson *et al.*, 2018). Z toho vyplýva, že citlivosť nepriameho testovania sa zvyšuje s dĺžkou trvania infekcie, a teda negatívny výsledok ešte nevyklučuje dané ochorenie (Meyerhoff *et al.*, 2018). K diagnostikovaniu neuroboreliózy sa z týchto metód využíva ELISA a Western blot, príp. izoelektrická fokusácia.

#### **1.4.3.1 Vyšetrovaný materiál**

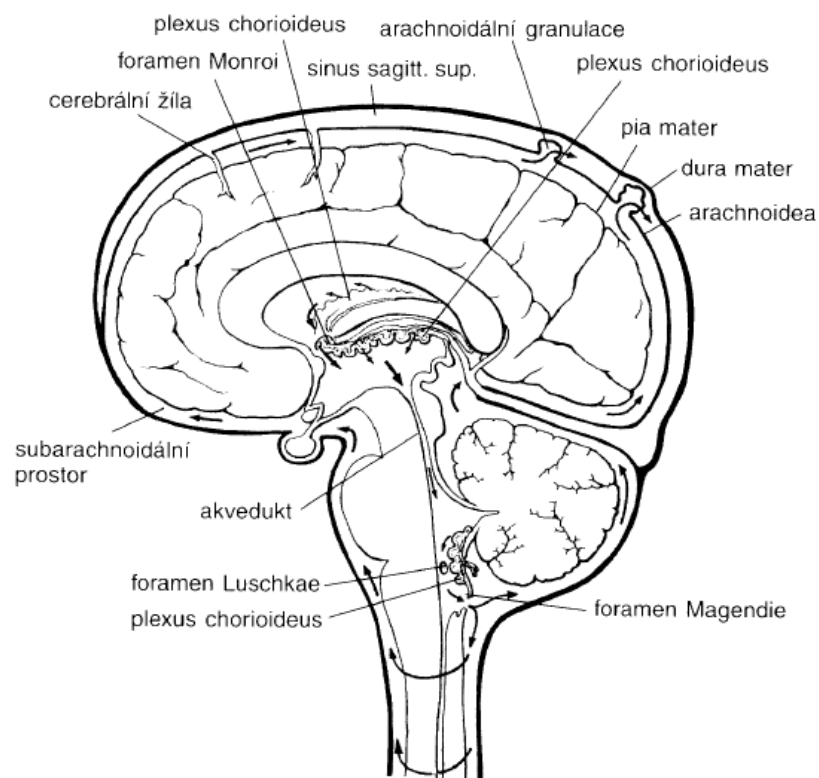
Likvor je číry, plazme podobný a zaraďujeme ho ku transcelulárnym telovým tekutinám. Obklopuje miechový kanál, komorový systém a subarachnoidálny priestor (Adigun a Al-Dhahir 2018). Je neustále uvoľňovaný a reabsorbovaný. Väčšinu likvoru produkujú aktívnou sekréciou *plexus choroideus* (Spector *et al.*, 2015), pričom spolu s mozgovým parenchýmom tvoria väčšinu komorového cerebrospinálneho moku (Sakka *et al.*, 2011). K tvorbe „lumbálneho“ likvoru prispievajú meningy, subarachnoidálne štruktúry a dorzálne korene. Obsahuje látky potrebné na udržiavanie rovnováhy nervového systému, a to napríklad bunky, cukry, vodu a proteíny, no v porovnaní napr. s plazmou ma iné zloženie (Telano *et. Baker*, 2018).

Za fyziologických podmienok je likvor bezfarebný, číry. Jeho objem sa u dospelého človeka odhaduje asi na 150-180 ml, pričom 125 ml sa distribuuje v subarachnoidálnych priestoroch a zvyšok v komorách mozgu (Telano *et. Baker*, 2018). Sekrécia je individuálna, ale spravidla sa pohybuje v rozmedzí 400-600 ml denne (Sakka *et al.*, 2011). V súčasnosti však nie je známe kedy produkcia likvoru začína. Vytvárajúci sa choroidálny plexus môže byť vidieť už okolo 32. dňa vývoja (Huff *et. Varacallo*, 2018). Arachnoidálne klky sa začínajú tvoriť okolo 35. týždňa s pokračujúcim vývojom počas prvých 18 mesiacov života (Huff a Varacallo 2018). Zloženie CSF je prísne regulované, a akékoľvek zmeny môžu byť použité na diagnostické účely (Telano *et. Baker*, 2018). Zložením vlastne zodpovedá ultrafiltrátu plazmy.



Z bunkových elementov obsahuje iba malé množstvo lymfocytov (3-4 v 1  $\mu$ l). V porovnaní so sérom má likvor vyššiu koncentráciu chloridu, sodíka a horčíka, ale nižšiu koncentráciu vápnika a draslíka (Spector *et al.*, 2015). Bielkovín a imunoglobulínov sa tu nachádza len stopové množstvo (Damkier *et al.*, 2010). Taktiež obsahuje aj glukózu a lipidy, ktoré spolu s elektrolytmi a bielkovinami poskytujú nevyhnutnú výživu CNS (Huff *et. Varacallo*, 2018). Napriek zmenám v zložení v porovnaní so sérom a prietoku krvi ostáva zloženie CSF konštantné (Telano *et. Baker*, 2018), čo poskytuje stabilné intraventrikulárne prostredie dôležité pre udržanie normálnej funkcie neurónov (Sakka *et al.*, 2011).

Mozgovomiechový mok cirkuluje cez komory a cistery do subarachnoidálneho priestoru (obrázok 4), odkiaľ je následne najmä drenážnou cestou z arachnoidálnych granulácií absorbovaný do venózných splavov. Do periférneho lymfatického systému sa vstrebáva menšia časť drenáže z perineurálnych priestorov kraniálnych nervov, ktoré zásobujú štruktúry krku a nazálnu sliznicu (Sakka *et al.*, 2011). Za hlavné mechanizmy cirkulácie sa považujú tlakový mechanizmus, teda jednosmerný, predpokladajúci rozdiely hydrostatických gradientov medzi arachnoidálnymi granuláciami a *plexus chorioideus* (Ambler, 2006), kde je vyšší tlak. Druhým mechanizmom je mechanizmus pulzatívny, ktorý spočíva na princípe pulzácie cerebrálnych artérií.



**Obrázok 4:** Schéma cirkulácie likvoru (prevzaté z Ambler, 2006).

Cerebrospinálny mok má mnoho funkcií. Privádza hormóny, neurotransmitery a výživné látky, ďalej tvorí mechanickú ochranu mieche a mozgu (Ambler, 2006). Tiež má homeostatickú funkciu s cieľom zaistiť optimálne podmienky pre bunky CNS (Telano *et. Baker*, 2018) a podobne ako lymfatický systém tvorí drenážny mechanizmus pre odstraňovanie metabolitov a podieľa sa na ochrane CNS pred patogénnymi mikroorganizmami. Ďalej tlmí nárazy a znižuje hmotnosť mozgu z jeho 1,5 kg na 50 gramov (Telano *et. Baker*, 2018), čo zníži silu pôsobiacu na mozgový parenchým a cievy mozgu počas mechanického poškodenia (Sakka *et al.*, 2011). Okrem toho dokáže regulovať intrakraniálny tlak, čo je možné ovládať buď znížením alebo zvýšením jeho produkcie prispôsobenej potrebám CNS v danom čase.

#### **1.4.3.2 Analýza likvoru**

Vyšetrenie likvoru indikujeme k určaniu diagnózy v prípadoch akútneho zápalu nervového systému, teda v diagnostike neuroboreliózy by nemalo chýbať. K akútnym zápalovým ochoreniam nervového systému boréliovej etiológie radíme meningoencefalitídu, meningitídu, encefalomyelitídu, Bannwarthov syndróm, akútnu encefalitídu, cerebrálnu vaskulitídu, akútnu polyneuropatiu, myelitídu a neuritídu hlavových nervov, predovšetkým parézu *nervus facialis*. Indikovať vyšetrenie cerebrospinálnej tekutiny možno aj v prípade podozrenia na zlyhanie antibiotickej liečby, čo slúži ako kontrola stavu pacienta (Djukic *et al.*, 2012).

Lymfská neuroborelióza v Európe je typicky spojená so zvýšeným počtom buniek v CSF (t. j. pleocytózou) (Djukic *et al.*, 2012), pričom ide najmä o lymfocyty a plazmatické bunky (Mygland *et al.*, 2010). Vo včasnom diseminovanom štádiu detekujeme v likvore lymfocytárnu pleocytózu s počtom elementov 10-1000/3 (Djukic *et al.*, 2012). Obvykle nachádzame aj hyperproteínorachiu. V rámci potvrdenia diagnózy neuroboreliózy patrí k nevyhnutnosti prítomnosť intratekálnej syntézy špecifických antiboreliových protilátok tvoriacich sa v CNS a/alebo priamy dôkaz pôvodcu (Pietikäinen *et al.*, 2016). Problémom sú včasné lokalizované a chronické formy ochorenia, nakoľko nie sú bežne dostupné dostatočne citlivé a špecifické diagnostické postupy. Existujú aj pacienti, ktorí majú normálny nález likvoru, jedná sa ale hlavne o ľudí s *acrodermatitis chronica atrophicans* asociovaného s polyneuropatiou (Mygland *et al.*, 2010).

Pleocytózu v likvore nachádzame v takmer každom prípade neuroboreliózy, no existujú aj výnimky, kedy sa pleocytóza nevyskytuje, a to hlavne u pacientov s krátkym

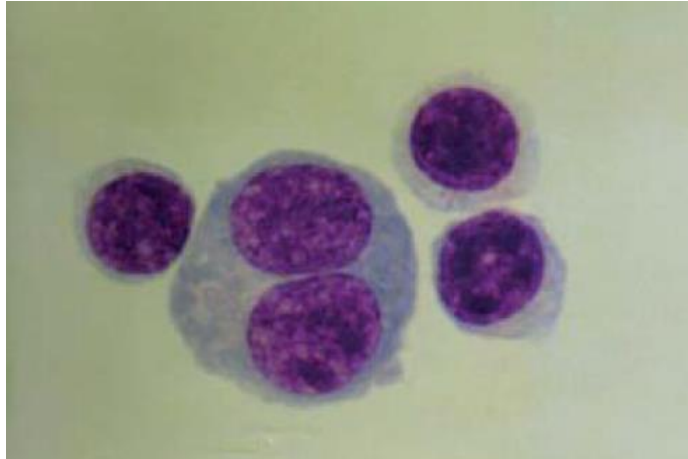
trvaním klinických príznakov, v skorých fázach oborenia či u jedincov so zníženou imunitou. Jedna štúdia dokonca naznačuje fakt, že pleocytóza je menej častá u infekcie vyvolanej spirochétou *Borrelia afzelii* (Cepok *et al.*, 2003). Vo viacerých iných štúdiách sa uvádza, že bunky v likvore sú hlavne CD8+ a CD4+ T-lymfocyty, veľký počet plazmatických buniek a lymfocytov B (CD19, CD20) (Steere *et al.*, 2016). Podiel monocytov je u neuroboreliózy v porovnaní so spomínanými bunkami nízky, naopak, ich zvýšený počet evidujeme u vírusových meningitíd (Meyerhoff *et al.*, 2018). Počet buniek rýchlo klesá po začatí terapie, no v niektorých prípadoch ich mierne zvýšený počet môže pretrvávajúť aj niekoľko týždňov až rokov po jej ukončení.

### 1.4.3.3 Cytológia likvoru

Cytologické vyšetrenie likvoru by malo patriť k bežnej súčasť jeho základného vyšetrenia. Slúži na určenie kvalitatívnej bunkovej skladby likvoru a to mikroskopickým vyšetrením trvalého cytologického preparátu. Preparát farbíme základným farbením *May-Grünwald Giemsa*, ktoré umožňuje dobre identifikovať leukocytárne rady pri zápalových postihnutiach nervového systému (Sobek *et al.*, 2009). Taktiež jeho pomocou vieme určiť aj stupeň aktivácie lymfocytárnej populácie vrátane populácie lymfocytov (Kelbich *et al.*, 2009).

V normálnom cytologickom obraze likvoru možno nájsť lymfocyty a monocyty vo vzájomnom pomere približne 7:3 a s toleranciou do 10% aktivovaných lymfocytov (Kelbich *et al.*, 2009). Za fyziologických podmienok by sa v likvore okrem spomínaných buniek a ojedinelých buniek výstelky likvorových ciest nemali nachádzať. Odchýlky od popísanej normálnej cytologickej skladby CSF potom môžeme považovať za prejav patologických zmien ako v centrálnom, tak periférnom nervovom systéme.

Pri Lymsekej neuroborelióze prevažuje v cytologickom obraze výskyt lymfocytárnych elementov (obrázok 5), nakoľko ide o tzv. seróznú zápalovú odpoveď CNS infekčnej etiológie. Medzi lymfocyty zahrňame funkčne pomerne heterogénnu skupinu elementov. Patria medzi ne cytotoxické Tc lymfocyty CD8+, regulačné Th lymfocyty CD4+, lymfocyty B a NK bunky (Kelbich *et al.*, 2009). Môžeme sa však stretnúť aj s prípadmi, kedy majú pacienti normálny počet buniek v CSF, aj keď je to zriedkavé, ale ide najmä o pacientov imunosuprimovaných, v skorom štádiu či o infekciu spôsobenú *Borrelia afzelii* (Cepok *et al.*, 2003). Svetelnou mikroskopiou však môžeme spoľahlivo diferencovať len vyššie aktivované štádia B buniek, a to plazmocyty a lymfoplazmocyty.



**Obrázok 5:** Lymfocytárna celulizácia v základnom farbení (prevzaté z Sobek *et al.*, 2009).

### **1.4.3.4 Imunoglobulíny a vyšetrenie stavu permeability hematolikvorovej bariéry**

#### **1.4.3.4.1 Dôkaz intratekálnej syntézy špecifických protilátok**

V centrálnom nervovom systéme pochádza intratekálna syntéza imunoglobulínov z perivaskulárnych infiltrátov lymfocytov B. Na rozdiel od séra, kedy dochádza k typickej reakcii, čiže prechodu z tvorby protilátok triedy IgM do IgG v subakútnej alebo chronickej fáze ochorenia (Rauer *et al.*, 2018), v intratekálnej syntéze prítomné nie je. Už na začiatku ochorenia je prítomná tvorba imunoglobulínov IgM, IgG, IgA a zostáva relatívne konštantná. Jej tvorba však nemusí znamenať akútne ochorenia, môže byť prítomná aj už po prekonanej infekcii, pri zápalovom ochorení centrálného nervového systému manifestovaného zvýšeným počtom buniek v CSF či u chronického zápalového autoimunitného procesu v CNS (Henningsson *et al.*, 2018).

Dôkaz intratekálnej syntézy špecifických protilátok, tzn. hladiny špecifických antiboreliových protilátok tvorených v likvore, ktoré dokazujeme buď kvalitatívne alebo kvantitatívne, patrí k zlatému štandardu laboratórnej diagnostiky Lymfkej neuroboreliózy (Henningsson *et al.*, 2014). Hladina týchto imunoglobulínov v mozgovomiechovom moku závisí na permeabilite HLB, intratekálnej produkcii protilátok a hladine protilátok v sére (Meyerhoff *et al.*, 2018). Pre zistenie intratekálnej produkcie anti – *Borrelia burgdorferi* protilátok v CNS využívame súčasnú analýzu likvoru a séra metódou ELISA, pretože pri meraní hodnôt špecifických protilátok len v CSF môže byť zavádzajúce (Marques *et al.*, 2015). Dôvodom je, pri pozitívnom výsledku, ich možný pasívny prenos zo séra pri zvýšenej permeabilite hematolikvorovej bariéry (Djukic *et al.*, 2012).

Výsledkom kvantitatívnej detekcie intratekálnej syntézy je protilátkový index (obrázok 6), čo je vlastne pomer koncentrácie špecifických protilátok v sére a v likvore vo vzťahu ku stavu hematolikorovej bariéry a koncentrácii celkových imunoglobulínov v sére a CSF (Stanek *et al.*, 2011).

Výpočet protilátkového indexu (AI):

$$Antibody\_index = \frac{Q(IgX)_{SPEC}}{Q(IgX)_{TOTAL}}$$

Modifikace dle Reiberova vztahu:

$Q(IgX)_{TOTAL} > Q_{lim(IgX)}$ , dosadíme  $Q_{lim}$

$$Q_{lim(IgG)} = 0,93 * \sqrt{(Q_{alb})^2 + 6 * 10^{-6}} - 1,7 * 10^{-3}$$

$$Q_{lim(IgM)} = 0,67 * \sqrt{(Q_{alb})^2 + 120 * 10^{-6}} - 7,1 * 10^{-3}$$

**Obrázok 6:** Stanovenie intratekálnej syntézy protilátok (prevzaté z Reiber, 1994).

Z toho vyplýva, že potrebujeme stanoviť hodnoty koncentrácií albumínu a celkových imunoglobulínov IgG a IgM v cerebrospinálnom moku a sére (Rauer *et al.*, 2018). Zvýšené koncentrácie protilátok v mozgovomiechovom moku môže byť dôsledkom poruchy hematolikorovej bariéry (HLB) alebo zvýšenej koncentrácie imunoglobulínov v sére (Djukic *et al.*, 2012). Pri poruche HLB je dominantným transportným mechanizmom difúzia proteínov zo séra do CSF, pričom väčšie molekuly (IgM) prestupujú pomalšie ako tie menšie (IgG). Pri zvýšení koncentrácie sérového proteínu sa zvýši aj jeho koncentrácie v likvore, ale gradient vyjadrený pomerom koncentrácie proteínu v CSF a sére ostáva konštantný. Pri zvýšenej permeabilite HLB dochádza k patologickému zvýšeniu koncentrácie proteínu v mozgovomiechovom moku, preto je potrebné stanoviť albumín aj imunoglobulíny v likvore aj v sére. V súčasnej dobe sa odporúča k dôkazu intratekálnej syntézy používať výpočet podľa Reibera (Sobek *et al.*, 2009). Popisuje vzťah, ktorý je hyperbolický, medzi Q albumínu a Q príslušného imunoglobulínu (Kelbich *et al.*, 2009). Pre výpočet tohto vzťahu musíme previesť na tzv. arbitrátne jednotky (AU) absolútne hodnoty absorbancií séra a cerebrospinálnej tekutiny. Až potom môžeme vypočítať hodnotu protilátkového indexu.

Môžeme sa však stretnúť aj s falošne pozitívnou IgM reaktivitou pri meningitíde vyvolanej *Eppstein-Barr* vírusom (Garg *et al.*, 2018). Taktiež môže nastať prípad, kedy protilátkový index vyšiel negatívny, avšak analýza likvoru ukázala zvýšené hodnoty

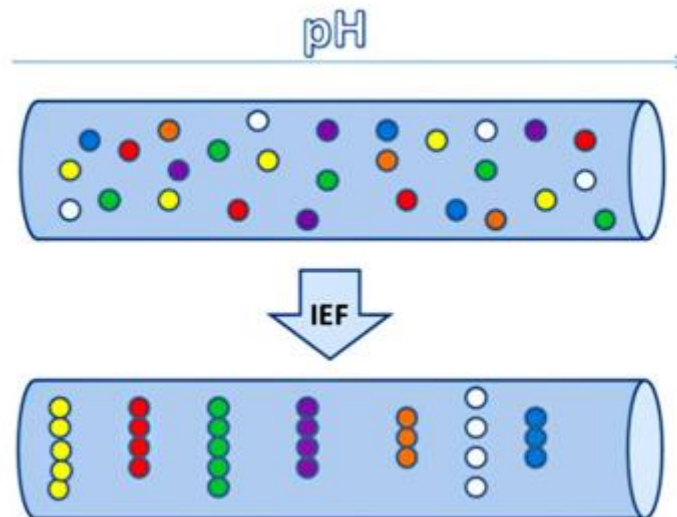
poukazujúce na neuroboreliózu. V takom prípade hovoríme o pravdepodobnej neuroborelióze (Rupprecht *et al.*, 2014).

Existujú však problémy pri interpretácii výsledkov, kvôli nedostatku štúdií a prípadov, ich definícii, a tiež nedostatku výkladu a porovnaní výsledkov medzi laboratóriami (Marques, 2015). Celkovo i tak možno povedať, že citlivosť tvorby intratekálnej protilátky je okolo 50% (Marques, 2015). Vyšetrenie obmedzuje aj nízka citlivosť na začiatku ochorenia, počas prvých šiestich týždňov, preto je potrebné v tomto štádiu výsledky interpretovať len s klinickými príznakmi, anamnézou a zápalovými parametrami likvoru (Barstad *et al.*, 2018). Ale aj napriek tomu vykazuje testovanie intratekálnej syntézy protilátok vyššiu citlivosť než izolácia borélií z cerebrospinálnej tekutiny (Cerar *et al.*, 2013). Špecifickosť testu sa blíži k 100%, avšak pri skutočnosti pretrvávania špecifických protilátok v organizme aj roky po eradikácii je možné, že pozitívny výsledok testu bude poukazovať na predchádzajúcu infekciu. Protilátkový index vykazuje citlivosť 75% a citlivosť 97% pri diagnostike neuroboreliózy (Djukic *et al.*, 2012).

#### **1.4.3.4.2 Izoelektrická fokusácia**

Metóda je považovaná za zlatý štandard k dôkazu intratekálnej oligoklonálnej syntézy a ide o kvalitatívny dôkaz (Adam *et al.*, 2001). Pri izoelektrickej fokusácii sa vždy súčasne analogicky vyšetruje likvor a sérum, ktoré nariedime na koncentráciu odpovedajúcu CSF, pre danú triedu, pričom sa prevádza v jednotlivých triedach imunoglobulínov, teda IgG a IgM a pre ľahké reťazce kappa a lambda (Sobek *et al.*, 2009).

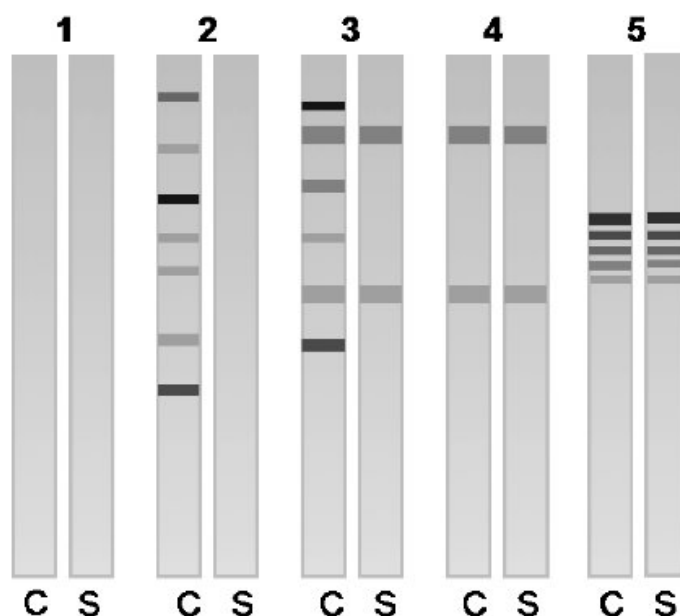
Ide o elektromigračnú metódu, pri ktorej sa látky separujú na základe ich izoloelektrických bodov v prirodzene vytvorenom gradiente pH (obrázok 7). Slúži k deleniu látok amfotérnej povahy, ktoré majú kyslé a bázické skupiny (Smoluch *et al.*, 2016).



**Obrázok 7:** Delenie látok na základe izoelektrických bodov v gradiente pH (prevzaté z Smoluch *et al.*, 2016).

Existuje medzinárodne dohodnutých päť typov rozdelenia cerebrospinálnej tekutiny a séra (obrázok 8), a to (Bonnar, 2016):

1. Normálny stav, žiadne oligoklonálne pásy, tzv. *normal pattern*
2. Oligoklonálne pásy prítomné len v CSF
3. Oligoklonálne pásy prítomné aj v sére, aj likvore, avšak v CSF sú pásy aj navyše, ktoré v sére nie sú, typické pre neuroboreliózu
4. Identické oligoklonálne pásy v likvore a sére
5. Monoklonálne pásy v sére a likvore



**Obrázok 8:** Typy rozdelenia látok v likvore a sére (prevzaté z Bonnan, 2016).

Pre prítomnosť intratekálnej syntézy svedčí prítomnosť dvoch a viac oligoklonálnych pásov v mozgovomiechovom moku, ktoré nemajú analógiu v sére (Bonnan, 2016). S normálnymi výsledkami sa stretávame v prípade *acrodermatitis chronica atrophicans* (Meyerhoff *et al.*, 2018).

Pri IgG ide o jeho kvalitatívne aj kvantitatívne zastúpenia. V likvore však absolútna koncentrácia nemá sama o sebe výpovednú hodnotu, dôležitý je práve dôkaz ich intratekálnej produkcie (Sobek *et al.*, 2009).

Podobná situácia ako pri IgG je pri IgA s rozdielom, pri ktorom je náročne prevediteľná IEF tejto triedy imunoglobulínov. Preto, z technických dôvodov, ostáva buď výpočet podľa Reibera, celková IgA alebo IgA index, odporúča sa však skôr ELISA, prípadne imunonefelometria s latexovými partikulami (Smoluch *et al.*, 2016).

Stanovovanie voľných ľahkých reťazcov lambda a kappa je dôležité v neuroimunologickej diagnostike a odporúča sa pre vyšetrenie pacientov so sklerózou multiplex (Sobek *et al.*, 2009).

#### 1.4.3.4.3 Permeabilita hematolikvorovej bariéry

Hematolikvorová bariéra predstavuje bariérový systém pre likvor a krv. Anatomicky má niekoľko tzv. *gap junctions* a vezikúl slúžiacich ako makrofilter pre proteíny (Johanson *et al.*, 2010). Tvorí ju jemná sieť kapilár v mäkkej blane mozgu a endotel chorioidálnych



plexov. Umožňuje prestup proteínov z plazmy do cerebrospinálnej tekutiny, pričom prestup látok v chorioidálnych plexoch sa uskutočňuje aktívnym a pasívnym transportom. Za predpokladu funkčnosti HLB je hlavným determinujúcim faktorom vplývajúcim na koncentráciu molekúl v likvore je koncentrácia krvi a hydrodynamický priemer. Na poruchu hematolikorovej bariéry nás upozornia zvýšené koncentrácie sérových proteínov v CSF, teda hovoríme o albumíne (Kelbich *et al.*, 2009).

Mieru permeability hematolikorovej membrány obvykle určuje výpočet albumínového kvocientu (Q Alb), pomeru koncentrácií albumínu v CSF/v sére, ktorý je závislý na veku (Sobek *et al.*, 2009). Tá môže byť buď normálna, s ľahkou, strednou alebo ťažkou poruchou. Okrem toho vieme vďaka Q Alb určiť aj lokálnu syntézu ostatných proteínov v CNS (Johanson *et al.*, 2010).

Albumín je najdôležitejším proteínom plazmy a tvorí viac ako polovicu množstva všetkých proteínov (Sakka *et al.*, 2011). Tvorí sa výlučne v pečeni a slúži ako väzobný a transportný proteín mastných kyselín, hormónov, bilirubínu, vápnika, vitamínov, liečiv, hormónov a stopových prvkov (Johanson *et al.*, 2010). Nakoľko sa albumín syntetizuje výlučne v pečeni je pomer albumínu v likvore oproti jeho hodnote v sére validným parametrom pre vyjadrenie poruchy HLB (Mygland *et al.*, 2010).

### **1.4.3.5 Zápalové markery**

#### **1.4.3.5.1 CXCL13**

Chemokíny CXCL13 sú členmi rodiny chemokínov CXC (Borde *et al.*, 2012). Ide o selektívne chemoatraktanty B lymfocytov a pomocných lymfocytov T, ktoré pôsobia cez špecifický receptor CXCR5 (Henningsson *et al.*, 2018). Sú zodpovedné za migráciu B – buniek prostredníctvom mozgových endoteliálnych buniek pri zápalových procesoch v CNS (Kępa *et al.*, 2015). Ich úloha je v prirodzenej imunite, kde tvoria prvú obrannú líniu, neskôr sa uplatňujú v získanej imunite produkciou špecifických protilátok (Kępa *et al.*, 2015). V likvore sú vyjadrené cez dendritové bunky, makrofágy a monocyty.

CXCL13 v likvore sú citlivý a špecifický marker u akútnej neuroboreliózy (Djukic *et al.*, 2012) v prípadoch, kedy je prítomná intratekálna syntéza špecifických anti – *Borrelia burgdorferi* protilátok (Borde *et al.*, 2013). Detekovať ich môžeme dokonca aj v prípade skorej LNB, kedy sa ešte nezačali tvoriť špecifické protilátky (Borde *et al.*, 2012). Tu však nevieme rozlíšiť či ide o pacientov s Lymfskou neuroboreliózou alebo o iný zápalový stav

v CNS. Ich hladina sa u pacientov s LNB zvyšuje, nakoľko zohrávajú svoju úlohu v zápalových procesoch v CNS a samotný pôvodca ochorenia ich sekréciu stimuluje. Okrem ich zvýšených hladín pri neuroborelióze musíme pri ich vyšetovaní myslieť aj na fakt, že zvýšené hladiny môžeme nájsť aj v prípade mozgových lymfómov, neurosyfylysu, kryptokokovej, HIV, tuberkulózne meningitídy (Borde *et al.*, 2012). Z toho vyplýva, že nedokážeme pomocou nich odlišiť Lymfskú chorobu s chýbajúcou intratekálnou syntézou protilátok od iných zápalových stavov nervového systému, aj keď v prípade neuroboreliózy je hladina CXCL13 výrazne vyššia ako u spomínaných ochorení CNS (Pietikäinen *et al.*, 2016). CXCL13 sa však pre bežnú diagnostiku neodporúča kvôli pochybnostiam o špecifickosti (Rupprecht *et al.*, 2014). Rupprecht a kol. v jednej zo svojich štúdií uvádzajú, že môže byť v klinickej praxi užitočným parametrom stanovovaným v CSF na diagnostiku LNB aj u pacientov, u ktorých nie je prítomná pleiocytóza v likvore. Všetky uvedené fakty platia ako u dospelých pacientov, tak aj u detí.

Stanovenie CXCL13 môže byť užitočné u séronegatívnych pacientov v skorých fázach ochorenia, nakoľko ich hladina začína stúpať už na začiatku ochorenia (Henningsson *et al.*, 2014), a pre sledovanie liečby, keďže vplyvom antibiotickej liečby ich hladina prudko klesá (Rupprecht *et al.*, 2014).

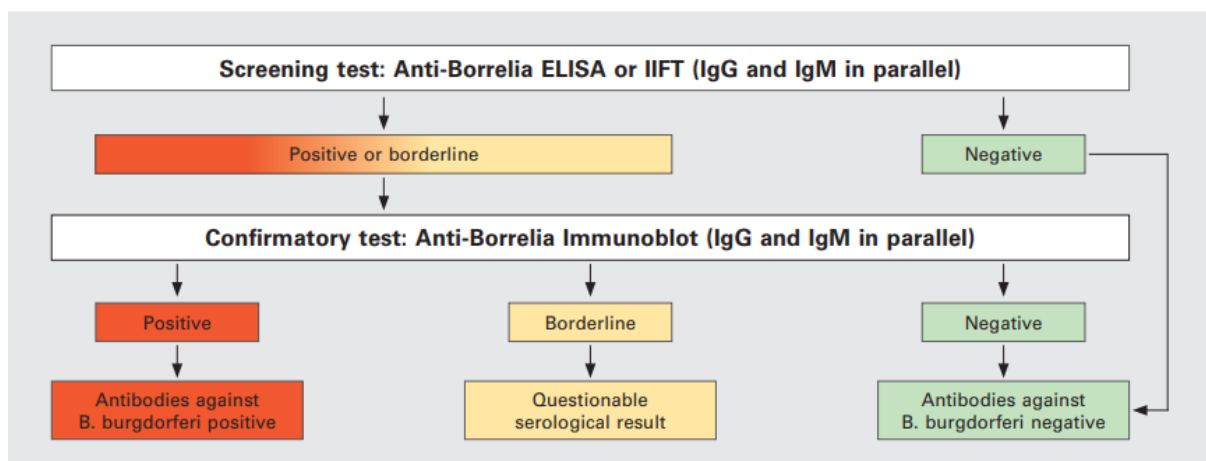
Objavenie CXCL13 ako markera a jeho súvislosti s akútnou neuroboreliózou má obrovský význam pre posun v rámci diagnostiky tejto choroby (Rupprecht *et al.*, 2014). Aj preto CXCL13 zostáva do budúcnosti najlepším markerom pre zisťovanie neuroboreliózy (Pietikäinen *et al.*, 2016). Do smernice EFNS však zatiaľ rutinná analýza CXCL13 pri podozrení na Lymfskú neuroboreliózu nebola zaradená (Mygland *et al.*, 2010).

#### **1.4.3.6 Stanovenie špecifických protilátok proti *Borrelia burgdorferi sensu lato***

##### **1.4.3.6.1 Dvojkroková analýza**

Dvojstupňové testovanie pre určenie diagnózy Lymfskej neuroboreliózy zahŕňa v prvom kroku ELISA metódu (obrázok 9), a následne ako konfirmačný test Western blot (Mygland *et al.*, 2010). Ďalšou špecifikáciou je potreba súčasnej analýzy séra a likvoru. Ide teda o nepriamy dôkaz patogéna v rámci rozšírenej likvorológie.

Western blot pre potvrdenie diagnózy využívame až v prípade pozitívneho alebo hraničného výsledku ELISA testu, ktorý slúži na vylúčenie falošne pozitívnych vzoriek z predošlého testu. hraničného výsledku ELISA testu (Signorino *et al.*, 2014).



**Obrázok 9:** Schéma dvojstupňového testovania (prevzaté z Euroimmun).

Aj pri tomto postupe sa však stretávame s nedostatkami. Prvým z nich je relatívne nízka citlivosť v skorých fázach ochorenia (Lindland *et al.*, 2018), ďalej skutočnosť, že protilátky pretrvávajú aj po adekvátnej liečbe (Mygland *et al.* 2010), nie úplne optimálna špecificita metódy Western blot a variabilita špecificity a citlivosti ako Western blot aj ELISA metódy pri použití cieľových rekombinantných antigénov na detekciu protilátkovej odpovede voči boréliam (Henningsson *et al.*, 2014).

#### 1.4.3.6.1.1 ELISA

ELISA metódu používame na kvantitatívne stanovenie intratekálnej syntézy IgM, IgG a IgA protilátok v sére a v likvore, ktoré detekujeme buď v kombinácií (najčastejšie IgG a IgM) alebo individuálne (Aquero-Rosenfield *et al.*, 2005), čím vlastne dokazujeme selektívnu prítomnosť anti – *Borrelia burgdorferi* protilátky v CNS (Huppertz *et al.*, 2012).

Princípom metódy je reakcia protilátky s príslušnými enzýmom, čiže ide o metódu enzýmovej imunoanalýzy, ktorá patrí medzi imunoanalytické metódy. Detekujeme enzýmovú reakciu, kedy v istom kroku reakcie daný enzým štiepi pridaný substrát za vzniku farebného produktu, ktorý meriame denzitometricky. Nevýhodou však je, že borélia spôsobujúca infekciu môže byť antigénne odlišná. V reakcii využívame celobunkové alebo rekombinantné antigény (Henningsson *et al.*, 2014).

Obmedzením v používaní ELISA metódy v diagnostike je jej nízka špecificita, aj keď citlivosť má vysokú (Mygland *et al.*, 2010). Nízka špecificita je hlavne kvôli výskytu séronegatívnych foriem a skrížene reagujúcich protilátok a vysokej séroprevalencií (Henningsson *et al.*, 2014). S falošne negatívnymi výsledkami sa môžeme stretnúť hlavne počas akútnej fázy choroby (Marques, 2015), keď sa ešte u pacientov nevyvinula dostatočná

protilátková odpoveď na pozitívny výsledok testu, čo môže trvať 6-8 týždňov od uhryznutia kliešťom (Mygland *et al.*, 2010). Naopak, falošnú pozitivitu môžu vyvolať iné ochorenia, ako napr. syfilis, reumatoidná artritída či systémový lupus erythematosus (Hansen *et al.*, 2018), ale aj malé percento zdravého obyvateľstva môže mať falošne pozitívne výsledky. S falošnou pozitivitou sa môžeme stretnúť aj u pacientov po adekvátnom preliečení antibiotikami, pretože IgG aj IgM protilátky môžu pretrvávajúť aj niekoľko rokov po liečbe (Mygland *et al.*, 2010), čo je dôvodom prečo pozitívny nález nemusí znamenať prítomnosť infekcie. Ďalšími negatívami sú nedostatočná štandardizácia, existencia viacerých variácií medzi testami, pokiaľ ide o antigénne zloženie a detekciu špecifických tried imunoglobulínov, hlavne IgM (Aquero-Rosenfield *et al.*, 2005).

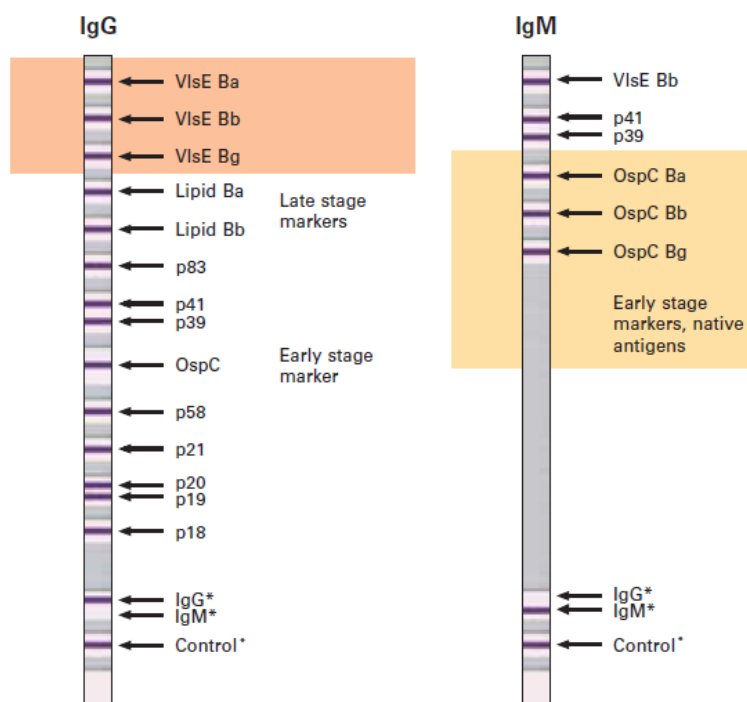
Špecifické IgM protilátky môžeme detekovať v krvi už od tretieho týždňa po expozícii a IgG protilátky od šiesteho (Rauer *et al.*, 2018). Akonáhle detekujeme vysoké koncentrácie špecifických IgG protilátok vieme, že ide o neskorú fázu neuroboreliózy.

#### **1.4.3.6.1.2 Western blot**

Ide o konfirmačný test v prípadoch hraničných či pozitívnych výsledkov vo vzorkách analyzovaných predchádzajúcou, ELISA metódou.

Metódou Western blot dokazujeme prítomnosť protilátok proti jednotlivým separovaným antigénom borélií (obrázok 10), čiže ide o kvalitatívne stanovenie. Taktiež nám umožňuje detekovať rekombinantné antigény VIsE, BBK32, DbpA, čo eliminuje nízku špecificitu ELISA testu (Halpern *et al.*, 2014). Na vyšetrenie antiboréliových protilátok využívame antigénne lyzáty, resp. rekombinantné antigény *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii* a *Borrelia burgdorferi sensu stricto* (Henningsson *et al.*, 2014).

Vyšetrovať by sme mali imunoglobulíny typu IgM a IgG v prípade, ak symptómy pretrvávajú 30 dní alebo menej, ak dlhšie, tak testujeme triedu IgG.



**Obrázok 10:** Stripy využívajúce sa na stanovenie prítomnosti protilátok proti jednotlivým separovaným antigénom metódou Western blot (prevzaté z Euroimmun).

Pri protilátkach triedy IgG proti *Borrelia burgdorferi sensu lato* na rýchle vyhodnotenie využívame vysoko špecifický a senzitivný rekombinantný VIsE antigén (Huppertz *et al.*, 2012), pričom ak máme na blotovacom stripe pozitívitu, považujeme IgG protilátku za pozitívnu. Môže však nastať prípad, kedy je tento typ protilátky negatívny, a to najmä v začiatkovej fáze infekcie. V takom prípade sa k hodnoteniu využívajú aj ostatné špecifické antigény, konkrétne p17, p19, p21, p25 (OspC), p30, p31, p39 a p83 (Signorino *et al.*, 2014). Pozitivita, resp. negativita v jednotlivých antigénnych pásičkách a v ich počte už závisí od výskytu a intenzity pásika v antigéne VIsE. Ak máme pozitívny antigénový pásik pri antigéne VIsE, za pozitívny výsledok prítomnosti protilátok IgG sa považuje pozitivita ako u viac, tak aj u menej ako v dvoch prípadoch ostatných antigénov či dokonca v žiadnom z nich. Ak však VIsE vykazuje len slabú intenzitu, je potreba pozitivity aspoň u jedného z ďalších už opísaných. V prípade negatívneho rekombinantného antigénu je pre pozitívny výsledok žiaduca prítomnosť pásičkov aspoň dvoch ďalších antigénov.

Naopak, protilátky typu IgM sú formované v akútnej fáze infekcie, typicky proti OspC (p25) (Signorino *et al.*, 2014). Na rozdiel od IgG, IgM protilátky proti ostatným špecifickým antigénom nie sú nevyhnutné pre indikáciu začínajúcej infekcie boréliovej etiológie, samozrejme ak je pozitívny OspC (Marques, 2015). Prítomnosť slabého antigénového pásika OspC a jedného z ostatných špecifických stále znamená prítomnosť IgM protilátky proti

*Borrelia burgdorferi sensu lato* (Aguero-Rosenfield *et al.*, 2005). Ak iný antigén prítomný nie je, výsledok už je hraničný. Za pozitívne dokonca považujeme aj situácie pri neprítomnosti p25, ale pozitivitu v inom z antigénov, aj keď nemusí ísť výlučne o Lymeskú boreliózu (Meyerhoff *et al.*, 2018). Jasne pozitívny výsledok testu je prítomnosť pásika v ktoromkoľvek zo špecifických antigénov.

#### **1.4.3.7 Priamy dôkaz boréliovej DNA**

Polymerázová reťazová reakcie je jedna z mála metód priamej diagnostiky Lymskej neuroboreliózy. Prítomnosť patogéna vo vyšetřovanom materiáli sa zisťuje na základe DNA pomocou sekvencie nukleových kyselín, ktoré sú doplnkové k DNA borélií (Meyerhoff *et al.*, 2018). Nevýhodou však je pravdepodobnosť falošne negatívnych výsledkov, kvôli nedostatku spirochét vo vyšetřovaných vzorkách, preto aj negatívny výsledok infekciu nevylučuje (Aguero-Rosenfield *et al.*, 2005).

Princípom reakcie je amplifikácia špecifického úseku DNA pôvodcu. Ide o cyklický proces, pri ktorom sa opakujú tri kroky, a to denaturácia, hybridizácia a polymerizácia. Nakoľko ide o cyklický proces, celá reakcie prebieha v niekoľkých cykloch, zvyčajne ide o približne 30, čoho výsledkom je vznik niekoľkých kópií pôvodnej sekvencie DNA.

Pri podozrení na Lymeskú neuroboreliózu je vhodné odobrať materiál podľa charakteru klinických príznakov, čiže likvor (Mygland *et al.*, 2010). Nakoľko je koncentrácia spirochét vo vzorkách veľmi nízka, pre spoľahlivé výsledky je veľmi dôležitý spôsob odberu, preprava vzorky a izolácia DNA z vyšetřovaného materiálu (Aguero-Rosenfield *et al.*, 2005). Vzorky by sa sme mali spracovať v čo najkratšom čase po odbere, v prípade, že to nie je možné, mali by sa uchovávať v zmrazenom stave.

Výsledky PCR analýzy môžu byť kvantitatívne (kompetitívna PCR, Real-Time PCR) alebo kvalitatívne (Nested PCR, konvenčná PCR) (Aguero-Rosenfield *et al.*, 2005). Na diagnostiku neuroboreliózy obvykle postačuje kvalitatívne PCR, ale komerčne dostupné sú už aj prostriedky na Real – Time PCR.

Citlivosť metódy v mozgovomiechovom moku v ranných fázach infekcie sa pohybuje okolo 10-30%, v krvi je dokonca nižšia (Mygland *et al.*, 2010). Extrémne nízka citlivosť PCR je v neskorých fázach choroby (Mygland *et al.*, 2010). Citlivosť okrem nízkeho obsahu baktérie vo vyšetřovanom materiáli môže znížiť aj degradácia DNA počas transportu, spracovania či skladovania vzorky (Aguero-Rosenfield *et al.*, 2005). Závisieť môže od

klinickej prezentácie, počtu leukocytov v CSF, dĺžky trvania ochorenia a od podávania antibiotík (Aguero-Rosenfield *et al.*, 2005). Aj napriek nízkej citlivosti v likvore môže byť táto metóda užitočná v skorých fázach ochorenia pri pacientoch s negatívnym indexom protilátok, prípadne u pacientov v imunodeficienciami (Mygland *et al.*, 2010), no aj napriek tomu jej pozitívny výsledok je s najväčšou pravdepodobnosťou falošne pozitívny. Na citivosť môže mať tiež vplyv zahájenie antibiotickej liečby (Wilske *et al.*, 2007). PCR reakcia sa práve kvôli spomínanej nízkej citlivosti neodporúča ako diagnostická metóda u pacientov s podozrením na chronickú neuroboreliózu ani na sledovanie úspešnosti liečby (Mygland *et al.*, 2010). Aj napriek nízkej citlivosti v CSF, je tu vysoká špecificita pri pozitívnom výsledku.

## **CIELE PRÁCE**

Hlavným cieľom práce bolo realizovať vybrané laboratórne vyšetrovacie metódy potrebné k uzavretiu diagnostiky Lymfkej neuroboreliózy využívané v likvorológii a vyhodnotiť ich výsledky.

Zoznam cieľov:

1. Prakticky previesť jednotlivé vyšetrovacie metódy
2. Posúdiť fázu ochorenia na základe nameraných hodnôt protilátkovej odpovede s klinickou symptomatológiou u pacient v skupine
3. Porovnať hladiny CXCL13 s protilátkovou odpoveďou
4. Posúdenie podmienok potrebných pre uzatvorenie diagnózy a interpretácia výsledkov



## **2 Experimentálna časť**

### **2.1 Charakteristika súboru a metodika práce**

Súbor tvorilo 40 náhodne vybraných pacientov z územia Českej republiky dispenzarizovaných v infektologickej ambulancii Fakultnej nemocnice Hradec Králové.

Použité údaje sme získali z chorobopisov pacientov a laboratórneho systému laboratórií Topelex, s.r.o., pričom jednotlivé vzorky pacientov boli vyšetované za rutinného chodu klinického laboratória s použitím automatického, prednastaveného vybavenia k potrebným analýzám a komerčne dostupných súprav k jednotlivým vyšetreniam, a teda nie špeciálne pre účely tejto práce.

Údaje o pacientoch sú získané a spracovávané so súhlasom Fakultnej nemocnice Hradec Králové.

### **2.2 Kvantitatívne stanovenie imunoglobulínov v sére a likvore pomocou imunonefelometrie**

#### **Princíp**

V rámci imunochemickej reakcie tvoria proteíny obsiahnuté v biologickom materiály so špecifickými protilátkami imunokomplexy, ktoré rozptýlia lúč svetla prechádzajúci vzorkou. Intenzita rozptýleného svetla je úmerná koncentrácii albumínu vo vyšetrovanej vzorke. Výsledok sa stanoví porovnaním so štandardom o známej koncentrácii.

#### **Postup**

Rovnako ako meranie albumínu bolo všetko plne automatizované. Sérum pre meranie IgG sa riedilo v pomere 1:400, IgA a IgM v pomere 1:20. V prípade potreby bolo možné vzorky pre meranie IgG v sére a likvore riediť manuálne. Výsledky prístroj vyhodnocoval automaticky vo zvolených jednotkách, a to mg/l.

### **2.3 Stanovenie hladiny albumínu v sére a likvore pomocou imunonefelometrie**

#### **Princíp**

V ľudských biologických tekutinách obsiahnuté proteíny vytvárajú so špecifickými protilátkami v rámci imunochemickej reakcie imunokomplexy. Tie rozptyľujú lúč svetla

prechádzajúci vzorkou. Intenzita rozptýleného svetla je úmerná koncentrácií proteínu v meranom materiály. Porovnaním so štandardom so známou koncentráciou sa stanoví výsledok.

### **Postup**

Plne automatizovaný, pričom vzorky séra boli automaticky riedené v pomere 1:400 a následne analyzované. Likvor bol analyzovaný z riedenia 1:5, príp. bol podľa potreby riedený manuálne. Automaticky prístroj tiež počítal koncentrácie albumínu ako v sére, tak v likvore. Antiséra dodávané komerčne boli pripravené k použitiu

## **2.4 Izoelektrická fokusácia na zistenie prítomnosti intratekálnej oligoklonálnej syntézy**

### **Princíp**

Ide o zlatý štandard v dôkaze intratekálnej oligoklonálnej syntézy protilátok, kedy sa analogicky súčasne vyšetruje sérum a likvor.

Pri tejto elektromigračnej metódy sa látky delia na základe ich izoelektrických bodov v gradiente pH.

### **Príprava vzoriek**

Sérum sme najprv nariedili desaťnásobne (90  $\mu$ l fyziologického roztoku + 10  $\mu$ l séra), následne sme ho riedili podľa koncentrácie IgG zodpovedajúcej vzorky likvoru. CSF sme riedili v prípade potreby, t. j. ako hodnoty IgG boli vyššie než 50 mg/l podľa predpísaných vzorcov.

### **Príprava gélu**

Gél vybratý z obalu bez ochranej fólie sme krátko osušili papierom a pripravili si elektródy. Na gél sme umiestnili podľa pokynov masku na nanášanie vzoriek a taktiež osušili filtračným papierom. Na destilovanou vodou navlhčený stolček sme uložili pripravený gél. Vzorky likvoru a séra sme nanášali v objeme 5  $\mu$ l, pri hodnotách IgG v CSF nižších než 20 mg/l sme pridali ešte ďalších 5  $\mu$ l.

## **Fokusácia**

Stolček s gélom a nadávkovanými vzorkami sme umiestnili do deliacej vane, priložili sme elektródy a vaňu zavreli. Doba delenia bola 1 hodinu a 20 minút.

## **Blotting**

Dve membrány sme namočili do destilovanej vody, jednu sme osušili papierovým utierkami. Gél sme preniesli na ďalší filtračný papier. Pomocou valčeku sme postupne pritlačali jednu z membrán, po chvíli sme ju odstránili a rovnakým spôsobom pritlačili membránu druhú. Vytvorené vzduchové bublinky sme vytlačili. Na takto pripravenú membránu sme uložili 4 filtračné papiere dvoch druhov, zaťažili a nechali 30 minút pôsobiť.

## **Ďalší postup**

Po 30 minútach sme odstránili filtračné papiere a gél, pretože sme ďalej pracovali len s membránou. Tú sme vložili do misky a pridali 30 ml roztoku „blocking agent“ pripraveného rozpustením 1 g prášku v 50 ml fyziologického roztoku. Na trepačke-kývačke sme nechali 30 minút premývať a následne opláchli 3-5krát destilovanou vodou. Membránu sme umiestnili do kúpeľa roztoku s protilátkou, teda 2,5 ml „blocking agent“ do 25 ml fyziologického roztoku + 25 µl protilátky. opäť sme nechali 30 minút na kývačke a prepláchli 3-5krát destilovanou vodou. Prípadné zbytky roztoku sme vymývali 5 minút na kývačke fyziologickým roztokom. Opäť sme vypláchli 3-5krát destilovanou vodou. Farbili sme čerstvo pripraveným roztokom: 2,5 ml acetátového pufru + 5 ml chromogénu (fľaška prášku + 50 ml etanolu) + 25 ml destilovanej vody + 25 µl peroxidu. Nechali sme pôsobiť 20 – 25 minút na kývačke a následne vypláchli 3-5krát destilovanou vodou a nechali sušiť v tme do druhého dňa. Odčítavanie prebiehalo ručne pri dobrom svetle.

## **2.5 Dôkaz špecifických boréliových protilátok v sére a v likvore metódou ELISA**

### **Princíp**

Ide o kvantitatívnu in vitro skúšku pre ľudské protilátky proti antigénom borélií v CSF. Stanovenie oproti vyšetreniu v sére sa líši iba potrebou použitia kalibračného séra k diagnostike likvoru. Používame mikrotitračné reakčné jamky potiahnuté antigenmi borélií.

V prvom kroku sa v jamkách súbežne inkubujú nariadené vzorky pacientov a likvor. Ak sú vzorky pozitívne, na antigény sa naviažu špecifické protilátky triedy IgG (tiež IgM a IgA). Naviazané protilátky detekujeme pri druhej inkubácii, pri ktorej používame enzýmovo značené anti-ľudské IgG protilátky (enzýmový konjugát), katalyzujúce farebnú reakciu.

Koncentráciu protilátok proti boréliám v CSF a v sére meriame pomocou kalibračnej krivky stanovenej na základe inkubácie kalibrátorov.

### **Príprava reagensí**

Komerčne dodané súbory boli už pripravené priamo k použitiu.

### **Príprava vzoriek**

Analyzované vzorky sér sa riedili 1:404 vo vzorkovom pufry, vzorky likvoru v pomere 1:2 vo vzorkovom pufry

### **Inkubácia**

V prvom kroku inkubácie sa do mikrotitračných platničiek prenieslo 100 µl CSF kalibrátora, nariadenej vzorky pacienta alebo likvor a inkubovalo sa 60 minút pri izbovej teplote (18-25 °C). Po inkubácii sa automatickým premývaním reakčné jamky trikrát premyli 450 µl nariadeného premývacieho roztoku. Následne sa napipetovalo 100 µl enzýmového konjugátu, teda peroxidázou značených anti-ľudských IgG, do každej jamky a inkubovalo sa opäť 60 minút pri izbovej teplote. Nasledovalo rovnaké premývanie ako po prvom kroku. Ďalej sa inkuboval substrát, napipetovalo sa 100 µl chromogenu/substrátového roztoku do každej jamky. Inkubovalo sa pri izbovej izbovej teplote 15 minút. Reakcia sa zastavila napipetovaním 100 µl zastavovacieho roztoku do každej jamky v rovnakom poradí a rovnakou rýchlosťou ako sa pipetoval chromogen. Následne sa fotometricky zmeralo sfarbenie pri vlnovej dĺžke 450 nm, behom 30 minút od pridania zastavovacieho roztoku, pričom pred meraním sa doštička ľahko pretrepala.

## **2.6 Konfirmačný test Western blot pre kvalitatívne stanovenie ľudských protilátok proti boréliovým antigénom v sére a likvore**

### **Princíp**

Test obsahuje stripy s elektroforeticky separovanými extraktmi antigénov *Borrelia afzelii* a každý strip obsahuje navyše aj rekombinantný antigén VIsE. V prvom reakčnom

kroku sa stripy po blokovaní inkubujú so vzorkami pacientov. V prípade pozitívnych vzoriek sa špecifické protilátky tried IgG, IgM a IgA naviažu na antigény. Naviazané protilátky sa detekujú po druhej inkubácii za použitia enzýmom značenej anti-ľudskej protilátky vyšetrovanej triedy protilátky (enzýmový konjugát) ako katalyzátor farebnej reakcie.

### **Príprava reagensí**

Pred použitím bolo potrebné všetky reagensie vytemperovať na izbovú teplotu. Testovacie stripy boli pripravené k použitiu, mohli sa však použiť až po tom, čo dosiahli izbovú teplotu, aby sa zabránilo kondenzácii. Enzýmový konjugát sa dodával desaťkrát koncentrovanej, preto bolo ho potrebné pred použitím nariediť v pomere 1:10 nariedeným univerzálnym pufrom. Na jeden testovaný prúžok pripadalo 0,15 ml anti-ľudského imunoglobulínového koncentrátu 1,35 nariedeného univerzálného pufru. Rovnako koncentrovanej ako enzýmový konjugát sa dodával aj univerzálny pufor, ktorý sa pred použitím taktiež riedil v pomere 1:10 deionizovanou alebo destilovanou vodou. Na inkubáciu jedného prúžku pripadalo 1,5 ml koncentrovanej pufru a 13,5 ml vody. Substrátový pufor bol pripravený, bez potreby ďalších príprav.

### **Príprava vzoriek**

Vzorky séra sa riedili v pomere 1:51 v nariedenom univerzálnom pufore. Riedenie likvor záviselo od koncentrácie IgG.

### **Inkubácia**

Najprv je potrebné blokovanie, kedy sa naplnil každý kanál inkubačnej dosky, podľa počtu testovaných sérových vzoriek, 1,5 ml pripraveného univerzálného pufru a vložil sa blotovací strip. Následne sa inkubovalo na trepačke 15 minút pri izbovej teplote a odsalo sa všetka tekutina. Kanále so stripmi sa naplnili 1,5 ml nariedených sér a inkubovalo sa pri izbovej teplote 30 minút za stáleho trepania. Po 30 minútach nasledovalo premývanie, kedy sa zo všetkých kanálov odsala tekutina a premývalo sa trikrát po 5 minútach 1,5 ml nariedeného univerzálného pufru za trepania. Druhým krokom bola inkubácia konjugátu, čo zahŕňalo napipetovanie 1,5 ml nariedeného enzýmového konjugátu (alkalickou fosfatázou konjugované anti-ľudské Ig) opäť do každého kanála. Po 30 minútach pri izbovej teplote sa odsala tekutina a premylo sa už opísaným spôsobom. Inkubácia substrátu bola krokom číslo tri, pričom sa pipetovalo po 1,5 ml substrátového roztoku a inkubovalo sa pri izbovej teplote 10 minút za neustáleho trepania. Reakciu sme zastavili odsatím všetkej tekutiny a premytím každého

stripu trikrát po 1 minúte deionizovanou alebo destilovanou vodou. Vyhodnocovalo sa digitálne pomocou skenu v prípade vzoriek séra. Testovacie stripy pre vzorky likvoru sa odčítavali ručne, pričom po skončení analýzy sa prúžky lepili na papier pre lepšie vyhodnocovanie.

## **2.7 Detekcia chemokínov CXCL13 metódou ELISA**

### **Princíp**

Počas prvého kroku sa riedia kalibrátory a vzorky pacientov s biotínom značenými protilátkami anti-CXCL13 a vložia sa do jamiek mikrotitračnej platničky, ktoré sú potiahnuté monoklonálnymi anti-CXCL13 protilátkami, pričom sú CXCL13 viazané v komplexe. Pri druhej inkubácii je komplex označený peroxidázou značený streptavidínom. Pri tretej inkubácii za použitia substrátu tetrametylbentidín (TMB), vyvoláva naviazaná peroxidáza farebnú reakciu. Intenzita sfarbenia je úmerná koncentrácii CXCL13 vo vzorke.

### **Príprava reagensí**

K použitiu boli pripravené potiahnuté jamky spolu s biotínom, enzýmovým konjugátom, roztokom chromogénu/substrátu, zastavovacím roztokom. Pri kalibrátoroch a kontrolách sme museli previesť rekonštitúciu 500  $\mu$ l destilovanej, príp. deionizovanej vody. Premývací pufor bolo potrebné riediť destilovanou vodou (1 diel reagensie, 9 vody).

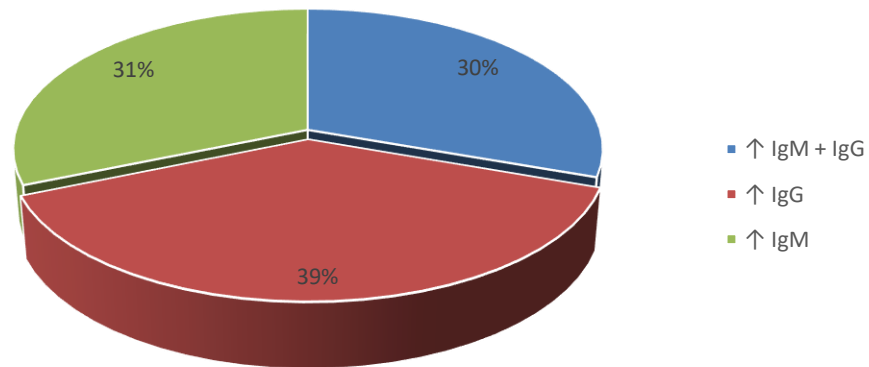
### **Inkubácia**

Prvým krokom bola inkubácia vzorky. Do každej jamky mikrotitračnej platničky sme napipetovali 50  $\mu$ l kalibrátora, kontrol a vzorky pacientov (nezriedené) a 50  $\mu$ l biotínu. Dodanou ochrannou fóliou sme zakryli platničku a inkubovali 180 min. za neustáleho trepania pri izbovej teplote. Nasledovalo automatické premývanie, trikrát 450  $\mu$ l nariedeného premývacieho pufru. Krok dva bola inkubácia s enzýmovým konjugátom, čo obnášalo jeho napipetovanie (100  $\mu$ l, streptavidín-peroxidáza) do každej jamky. Zakryté sme inkubovali 30 minút za rovnakých podmienok uvedených vyššie a premyli sme. Do každej jamky sme následne napipetovali 100  $\mu$ l chromogen/substrátového roztoku a inkubovali sme 15 minút. Reakciu sme zastavili pridaním 100  $\mu$ l zastavovacieho roztoku. Do 30 minút po zastavení reakcie sme previedli fotometrické meranie pri vlnovej dĺžke 450 nm.

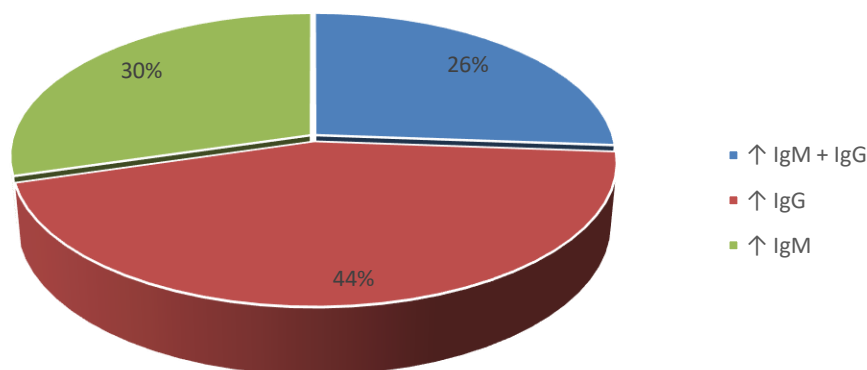
### 3 Výsledky

#### 3.1.1 Posúdenie fázy infekcie klinickou symptomatológiou a laboratórnymi parametrami

Protilátky triedy IgM vieme zachytiť už od tretieho týždňa po uhryznutí kliešťom, IgG od šiesteho. Akonáhle detekujeme vysoké hladiny špecifických IgG protilátok, vieme že ide o neskorú fázu infekcie. V grafoch 1 a 2 uvádzame percentuálne zastúpenie výskytu zvýšených hodnôt jednotlivých tried antiboréliových protilátok, u jednotlivcov v našom výskumnom výbere, na základe ktorých môžeme určiť fázu infekcie.



**Graf 1:** Percentuálne zastúpenie respondentov s výskytom zvýšených hladín špecifických antiboréliových protilátok v likvore pre zachytenie fázy ochorenia.



**Graf 2:** Percentuálne zastúpenie výskytu respondentov zvýšených hladín špecifických anti-*Borrelia burgdorferi* protilátok v sére pre zachytenie fázy infekcie

Percentuálne zastúpenie zvýšených jednotlivých typov protilátok, zvýšené koncentrácie spolu IgM aj IgG, len IgG alebo len IgM) je takmer rovnaké v sére aj v likvore, čo prezentujú priložené grafy. Zvýšená koncentrácia IgM pravdepodobne upozorňuje na včasnú fázu ochorenia, približne do 5. týždňa, vzhľadom k predpokladanej tvorbe humorálnej odpovede. Vyššie hladiny IgM aj IgG protilátok ukazuje na subakútnu fázu infekcie, u IgG ide pravdepodobne už o chronickú formu, teda ochorenie je prítomné už viac než 6 týždňov. Aj napriek prítomnosti humorálnej odpovede organizmu však nie je možné s istotou, len z laboratórnych parametrov, bez vyšetrenia markera akútnej infekcie (CXCL13) zistiť či sa jedná skutočne o akútnu, prebiehajúcu infekcie alebo o anamnesticke protilátky, čomu sa však venujeme v ďalších častiach práce.

K najčastejším klinickým symptómom u nášho súboru pacientov bol Bannwarthov syndróm, polyradikulitída. K ďalším, pomerne častým prejavom patrili bolesti kĺbov, parézy dolných a horných končatín, parézy *nervus facialis*. Menej časté už boli kŕče chodidiel, lýtok, cefalea, bolesti šije, brnenie hornej končatiny, fotofóbia a v jednom prípade dokonca obojstranná paréza brušnej steny a chudnutie. Teplotu negovali všetci pacienti. Všetky symptómy poukazovali na včasné diseminované štádium.



### 3.1.2 Porovnanie hladín CXCL13 a protilátkovej odpovede

Chemokíny CXCL13 sú špecifický a citlivý marker pri akútnej neuroborelióze, keď je prítomná intratekálna syntéza špecifických protilátok proti *Borrelia burgdorferi*, na základe ich koncentrácie vieme určiť či sa jedná o floridnú neuroboreliózu alebo namerané hodnoty antiboreliových protilátok sú len anamnestické.

U vybranej skupiny pacientov s vyšetreným chemokínom CXCL13, celkom 15, sme porovnali hodnoty u tohto markera a súčasným výskytom špecifickým boreliových protilátok vyšetrených ELISA metódou v sére aj v likvore a prítomnosťou intratekálnej syntézy špecifických protilátok proti *Borrelia burgdorferi*, čo prezentujeme v tabuľke 1. Nami namerané hodnoty a výsledky sme porovnávali s tvrdeniami, ktoré sa uvádzajú v iných štúdiách a literatúre.

**Tabuľka 1:** Prehľad nameraných špecifických hodnôt zo séra (S) a likvoru (CSF) chemokínu CXCL13, IgG a IgM a protilátkového indexu (AI) v oboch triedach imunoglobulínov .

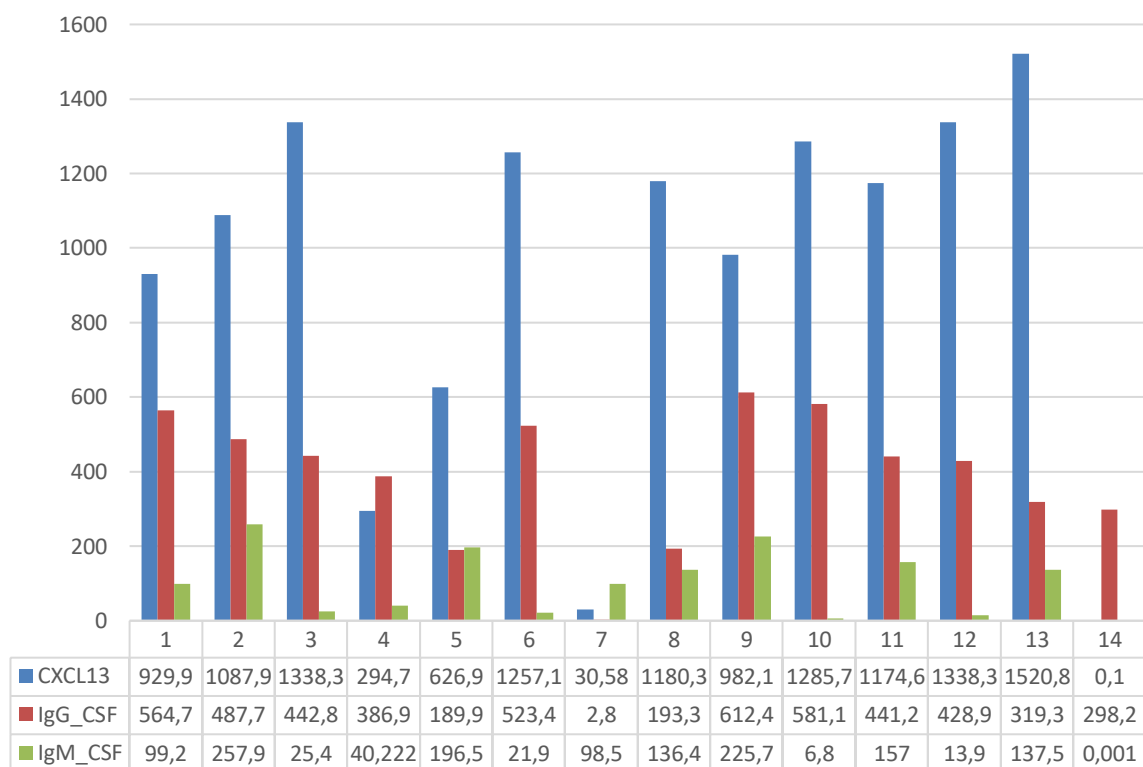
	CXCL13	IgG_CSF	IgM_CSF	IgG_S	IgM_S	AI IgG	AI IgM
1	929,9	564,7	99,2	66,5	7,3	1,89	5,2
2	1087,9	487,7	257,9	152,5	35,2	7,9	38,33
3	1338,3	442,8	25,4	55,2	26,6	3,1	0,84
4	294,7	386,9	40,222	86,6	86,9	5,29	1,19
5	626,9	189,9	196,5	160	158,2	0,74	2,13
6	1257,1	523,4	21,9	75,6	4,6	2,21	3,27
7	30,58	2,8	98,5	2,8	62,9	0	1,8
8	1180,3	193,3	136,4	16	127,2	7,17	1,39
9	982,1	612,4	225,7	64,2	26,4	2,8	3,9
10	1285,7	581,1	6,8	361,9	37,9	1,39	0
11	1174,6	441,2	157	136,5	17,9	4,11	17,24
12	1338,3	428,9	13,9	31,9	1,7	3,7	3,1
13	1520,8	319,3	137,5	187,8	57,3	6,3	26,1
14	0,1	298,2	0,001	377	21,8	1,9	0
15	1302,3	451,9	230,4	76,7	230,9	1,32	0,32

V tabuľke 1 prezentujeme výsledky stanovovania zápalového markera CXCL13 spolu v hodnotení so špecifickou protilátkovou odpoveďou v likvore (CSF) a v sére (S), a vypočítaným protilátkovým indexom (AI). Podľa našich výsledkov sa dá o floridnom zápale hovoriť v prípade výraznej elevácie chemokínu CXCL13, spravidla nad 500 pg/ml, pri nami sledovanej infekcii, aj keď norma je nastavená > 20 pg/ml. Z toho vyplýva, že na základe nameraných hodnôt tohto ukazovateľa sa v. s. o floridnú neuroboreliózu nejedná v troch prípadoch, aj keď sérologické kritéria boli splnené v dvoch prípadoch, a teda môže ísť

pravdepodobne o anamnestické protilátky. Štyri vzorky nespĺnili jednu z podmienok z usmernení EFNS, zvýšenú hodnotu protilátkového indexu, avšak u troch z nich bola signifikantne zvýšená hladina CXCL13, čo by špecifického markera LNB, ktorý diagnózu neuroboreliózy podporuje. Hodnotu protilátkového indexu pravdepodobne ovplyvnila zvýšená permeabilita hematolikorovej membrány. O LNB sa v ostávajúcom jednom prípade (č. 7) v. s. nejedná, nakoľko nie je prítomná ani zvýšená koncentrácia špecifických IgG v CSF a CXCL13 sú zvýšené len mierne. V našom súbore nenastala ani situácia, kedy by sme detekovali zvýšenie CXCL13 bez prítomnosti intratekálnej syntézy špecifických protilátok (AI), a teda nebolo z tohto hľadiska potrebné uvažovať o inej neuroinfekcii, napr. o neurosyfilise, HIV, kryptokokovej či tuberkulózne meningitíde, pri ktorých je taktiež možné detekovať zvýšené hodnoty spomínaného zápalového markera.

Farebne vyznačené bunky tabuľky demonštrujú výsledky analýzy, pričom červená farba znamená zvýšenú koncentráciu, zelené hodnoty sú v norme a žltá predstavuje hraničnú hodnotu.

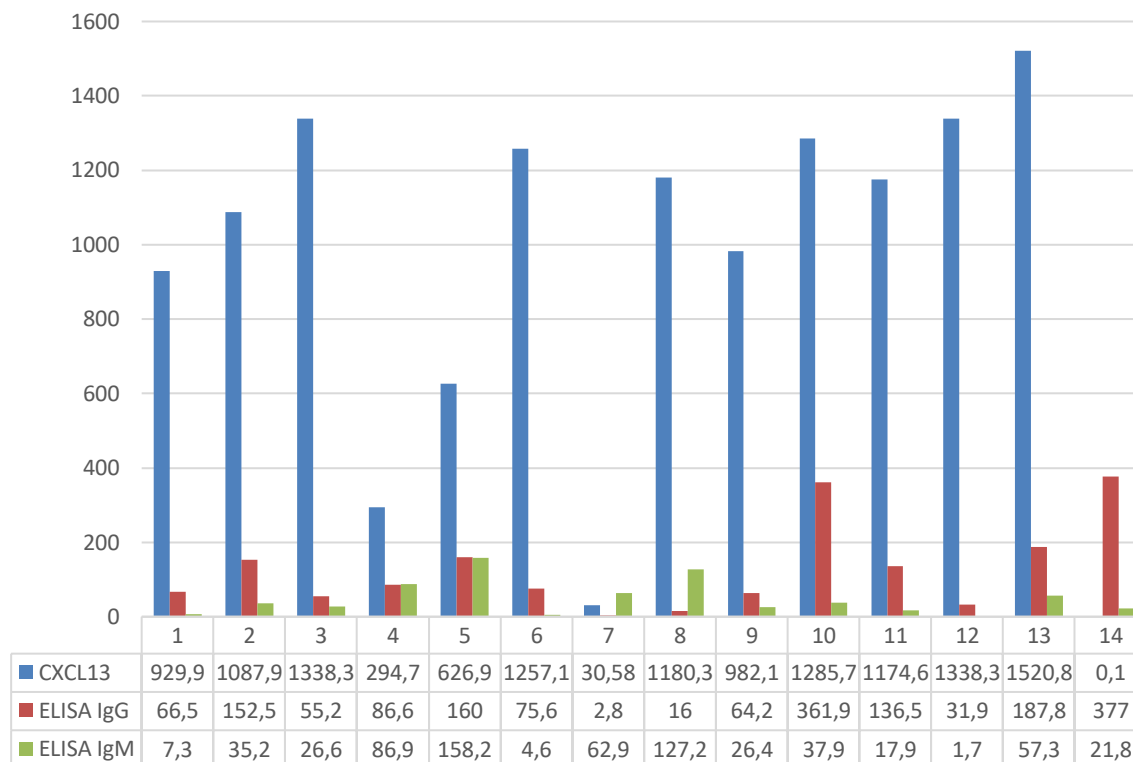
Graf 3 porovnáva hladiny CXCL13 a špecifických boréliových protilátok v triedach IgG a IgM v CSF. Ako sme už spomenuli v teoretickej časti práce, chemokíny CXCL13 tvoria prvú obrannú líniu v prirodzenej imunite a neskôr sa uplatňujú v získanej imunite tvorbou špecifických protilátok. Preto je možné ich detekovať aj pri včasnej neuroborelióze v čase, keď sa ešte nezačala humorálna odpoveď infikovaného organizmu.



**Graf 3:** Porovnanie nameraných hladín CXCL13 s koncentraciami špecifických protilátok triedy IgG a IgM v likvore.

Až na jeden prípad (č. 14), sme u pacientov zistili výraznú zápalovú odpoveď CNS pri infekcii *Borrelia burgdorferi*, čo dokazuje elevácia chemokínu. Vo vybranej skupine vzoriek sa nám nepodarilo potvrdiť či je možné detekovať zvýšené hodnoty CXCL13 ešte predtým, než začne špecifická humorálna odpoveď infikovaného organizmu, pretože sa u nás taký prípad nevyskytol, pričom až na dvoch pacientov sa imunoglobulíny tvorili v oboch vyšetrovaných typoch, IgG a IgM.

V grafe 4 sme porovnali koncentráciu chemokínu CXCL13 s hladinami špecifických antiboréliových protilátok v sére.



**Graf 4:** Porovnanie hladín CXCL13 s koncentraciami špecifických protilátok proti *Borrelia burgdorferi* v sére.

Na základe nameraných hodnôt vidieť, že náš súbor neobsahoval žiadneho séronegatívneho pacienta (norma <16 U/ml) v oboch triedach imunoglobulínov, teda v skorej fáze ochorenia s eleváciou CXCL13. Pri neuroborelióze sa zameriavame na IgG a v tejto triede sme mali jedného negatívneho pacienta a u jedného sme namerali hraničnú koncentráciu. Pacient s negatívnym IgG mal tiež len mierne zvýšené CXCL13, čo poukazuje nato, že o LNB nejde. V triede IgM boli v norme tri vzorky a jedna hraničná, avšak s výraznou eleváciou chemokínu. Iba v jednej zo vzoriek boli CXCL13 v norme, čo upozorňuje na fakt, že sa v. s. o neuroboreliózu nejedná. V sledovanej skupine sa nám, nepodarilo potvrdiť či stanovenie CXCL13 môže byť užitočným markerom pre diagnostikovanie Lymfocytárnej neuroboreliózy u séronegatívnych pacientov v skorej fáze infekcie.

### **3.1.1 Analýza kritérií potrebných pre uzatvorenie Lymfatickej neuroboreliózy**

Vo všetkých našich prípadoch boli u pacientov prítomné klinické symptómy poukazujúce na postihnutie nervového systému, pričom boli vylúčené iné možné príčiny jeho postihnutia. Údaje pre splnenie kritéria sme získali z chorobopisov pacientov.

Vzhľadom k tomu, že naše vzorky pochádzali od pacientov dispenzarizovaných na infekčnej klinike v Hradci Králové, nebolo možné k cytologickému vyšetreniu spracovať vzorky likvoru do dvoch hodín za účelom zistenia prítomnosti pleocytózy a jej charakteru, čiže sme sa touto podmienkou v práci nezaoberali.

Poslednou podmienkou, zlatým štandardom v diagnostike neuroboreliózy je zistenie prítomnosti intratekálnej syntézy špecifických protilátok. Zamerali sme sa na jej splnenie spolu s tzv. sérologickými kritériami a konfirmáciou metódou Western blot. Výsledky analýzy prezentujeme v priloženej tabuľke 2, v ktorej uvádzame namerané koncentrácie špecifických (š) imunoglobulínov IgG a IgM v sére (S) a v likvore (CSF), hodnoty vypočítaného protilátkového indexu (AI) a albumínový kvocient (Q Alb), ktorý môže ovplyvniť protilátkový index.

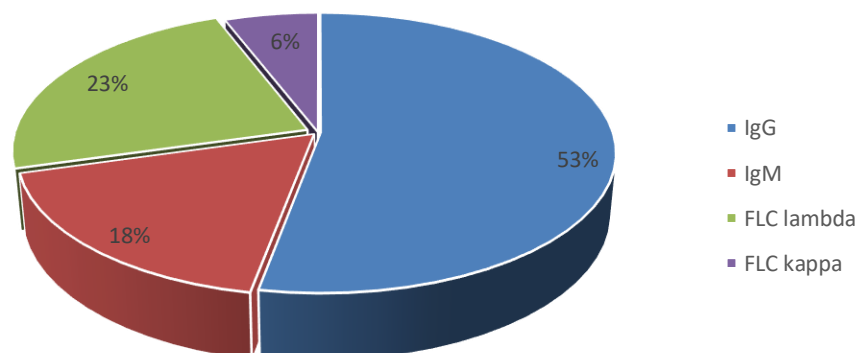
**Tabuľka 2:** Hodnoty potrebné pre výpočet a posúdenie intratekálnej syntézy špecifických protilátok.

	IgG_CSF_š	IgG_S_š	IgM_CSF_š	IgM_S_š	AI IgG	AI IgM	Q Alb
1	179,5	195,6	2,1	12,7	2,02	2,1	5,35E-03
2	68,4	55,4	0,001	1,1	2,01	0	7,23E-03
3	408,6	221,8	207,2	17,1	1,34	20,4	1,03E-02
4	444,5	42,6	155,9	9,7	4,3	10,6	1,90E-02
5	315,5	63	60,7	9,5	4,2	7,9	3,03E-02
6	21,4	8,6	4,4	12,3	2,3	0	1,04E-02
7	567,1	279,8	213,8	64,9	0,41	1,24	2,83E-02
8	350,7	310,3	36,1	11,9	0,17	1,6	3,64E-02
9	564,7	66,5	99,2	7,3	1,9	5,2	2,01E-02
10	384,8	157,8	26,9	10,3	2,4	4,6	2,96E-02
11	487,7	152,5	257,9	35,2	7,85	38,33	1,39E-02
12	386,9	86,6	40,2	86,9	5,3	1,2	7,90E-03
13	163,3	51,5	0,001	1,9	3,7	0	5,90E-03
14	189,9	160	196,5	158,2	0,74	2,13	1,02E-02
15	523,4	75,6	21,9	4,6	2,2	3,3	2,78E-02
16	459,8	63,5	193,7	17,7	2,32	6,1	2,14E-02
17	346,4	33,4	52,7	9,8	1,75	0,86	5,65E-02
18	193,3	16	136,4	127,2	7,2	1,4	1,21E-02
19	564,7	66,5	99,2	7,3	1,89	5,2	1,03E-02
20	487,7	152,5	257,9	35,2	7,9	38,33	1,39E-02
21	442,8	55,2	25,4	26,6	3,1	0,84	1,55E-02
22	386,9	86,6	40,222	86,9	5,29	1,19	7,90E-03
23	189,9	160	196,5	158,2	0,74	2,13	1,02E-02
24	523,4	75,6	21,9	4,6	2,21	3,27	2,78E-02
25	2,8	2,8	98,5	62,9	0	1,8	1,31E-02
26	193,3	16	136,4	127,2	7,17	1,39	1,21E-02
27	612,4	64,2	225,7	26,4	2,8	3,9	2,45E-02
28	581,1	361,9	6,8	37,9	1,39	0	1,03E-02
29	441,2	136,5	157	17,9	4,11	17,24	2,74E-02
30	428,9	31,9	13,9	1,7	3,7	3,1	3,00E-02
31	319,3	187,8	137,5	57,3	6,3	26,1	8,70E-03
32	298,2	377	0,001	21,8	1,9	0	5,30E-03
33	451,9	76,7	230,4	230,9	1,32	0,32	3,16E-02
34	427,4	183,8	0,001	0,1	1,95	0,01	1,03E-02
35	392,9	58,6	275,8	283,9	0,52	0,12	7,13E-02
36	296,8	212,7	228,5	251,9	0,27	0,33	2,93E-02
37	451,2	12,6	303,3	306,3	19,24	1,1	1,37E-02
38	388,1	9,6	217,1	18,4	22,3	9,7	1,62E-02
39	352,8	48,2	206,7	12	7,7	22,2	3,79E-02
40	431	123,8	39,5	98,3	1,8	0,53	1,20E-02
41	531,9	40,1	67,7	17,9	6,8	2,75	1,77E-02
42	413,4	140,6	142,4	245,2	1,9	0,46	1,67E-02
43	493,9	23,2	4,4	1,5	12,13	0	1,57E-02
44	24,4	7,4	0,001	3,8	10,2	0	4,23E-03

V nami zvolenej skupine bol AI IgG zvýšený ( $> 1,5$ ) u 76% (34, z celkových 45). Hodnoty protilátkového indexu nám ovplyvnila aj permeabilita hematollikvorovej membrány. Z desiatich vzoriek, ktoré mali hladinu AI v referenčnom rozmedzí, bolo šesť ovplyvnených, resp. nehodnotiteľných, čoho príčinou bola zvýšená priepustnosť HLB, pričom v jednom šlo o extrémne zvýšenie ( $7,13E-02$ ; norma  $< 7,4E-03$ ). Vykonanými meraniami sme u jedného z pacientov na základe laboratórnych parametrov zistili, že sa v.s. o Lymfskú neuroboreliózu nejedná, aj napriek klinickej manifestácii indikujúcej práve túto infekciu.

Tzv. „sérologické kritéria“, t. j. vysoká hladina antiboréliových IgG spolu s AI sú splnené u všetkých, až na jednu vzorku, kde sa vzhľadom k negatívne nález AI o LNB nejedná. V dvoch situáciách, sme namerali len mierne zvýšenú koncentráciu antiboréliových IgG v likvore spolu s normálnou hladinou špecifických IgG v sére, a preto sa pravdepodobne jedná o anamnestické protilátky a nie o akútnu infekciu aj napriek pozitívite AI.

Priložený graf 5 prezentuje výsledky izoelektrickej fokusácie v našom súbore pacientov, pričom sme sledovali výskyt spomínaného typu 3, teda tzv. „*more than pattern*“, ktorý je typický pre LNB.



**Graf 5:** Percentuálne zastúpenie respondentov s výskytom intratekálnej oligoklonálnej syntézy typu 3 („*more than pattern*“) zistenej IEF.

V diagnostike tejto infekcie nás zaujíma najmä trieda IgG, ktorá sa v našej skupine vyskytla v zastúpení 53%. Typ IgM sme zistili u 18%, zatiaľ čo ľahké reťazce (FLC) lambda 23% a u 6% pacientov bola intratekálna oligoklonálna syntéza prítomná u ľahkých reťazcov

kappa. Na základe výsledkov môžeme povedať, že z dostupných nálezov bola intratekálna oligoklonálna syntéza v. s. borélievej etiológie prítomná u 53% pacientov.

V priloženej tabuľke 3 uvádzame prehľad nameraných výsledkov špecifických imunoglobulínov G a M v sére (IgG\_S\_š, resp. IgM\_S\_š) a v likvore (IgM\_CSF\_š, resp. IgG\_CSF\_š) ELISA metódou, s potvrdenými výsledkami metódou Western blot v každej triede analyzovanej v sére aj v likvore, pričom uvádzame kvalitatívne výsledky pri metóde Western blot (POZIT – pozitívny; NEGAT – negatívny, NEMER. – nameraný).



**Tabuľka 3:** Prehľad nameraných hodnôt a konfirmácie ELISA metódy Western blotom u likvoru a séra.

	<b>IgG CSF š</b>	<b>WB</b>	<b>IgG S š</b>	<b>WB</b>	<b>IgM CSF š</b>	<b>WB</b>	<b>IgM S š</b>	<b>WB</b>
1	179,5	POZIT	195,6	POZIT	2,1	NEMER.	12,7	POZIT
2	68,4	POZIT	55,4	POZIT	0,001	NEMER.	1,1	NEGAT
3	408,6	POZIT	221,8	POZIT	207,2	POZIT	17,1	POZIT
4	444,5	POZIT	42,6	POZIT	155,9	POZIT	9,7	NEMER.
5	315,5	NEMER.	63	POZIT	60,7	POZIT	9,5	POZIT
6	21,4	NEMER.	8,6	NEGAT	4,4	NEMER.	12,3	NEMER.
7	567,1	POZIT	279,8	POZIT	213,8	POZIT	64,9	POZIT
8	350,7	POZIT	310,3	POZIT	36,1	POZIT	11,9	POZIT
9	564,7	NEMER.	66,5	POZIT	99,2	POZIT	7,3	NEGAT
10	384,8	POZIT	157,8	POZIT	26,9	POZIT	10,3	POZIT
11	487,7	POZIT	152,5	POZIT	257,9	POZIT	35,2	POZIT
13	386,9	POZIT	86,6	POZIT	40,2	NEMER.	86,9	POZIT
14	163,3	POZIT	51,5	POZIT	0,001	NEMER.	1,9	NEGAT
15	189,9	POZIT	160	POZIT	196,5	POZIT	158,2	POZIT
16	523,4	NEMER.	75,6	POZIT	21,9	NEGAT	4,6	NEGAT
17	459,8	POZIT	63,5	POZIT	193,7	POZIT	17,7	POZIT
18	346,4	POZIT	33,4	POZIT	52,7	POZIT	9,8	NEGAT
19	193,3	POZIT	16	POZIT	136,4	POZIT	127,2	POZIT
20	564,7	POZIT	66,5	POZIT	99,2	NEMER.	7,3	POZIT
21	487,7	POZIT	152,5	POZIT	257,9	POZIT	35,2	POZIT
22	442,8	NEMER.	55,2	POZIT	25,4	NEMER.	26,6	NEGAT
23	386,9	POZIT	86,6	POZIT	40,222	NEMER.	86,9	POZIT
24	189,9	POZIT	160	POZIT	196,5	POZIT	158,2	POZIT
25	523,4	NEMER.	75,6	POZIT	21,9	NEMER.	4,6	POZIT
26	2,8	NEMER.	2,8	NEGAT	98,5	NEMER.	62,9	POZIT
27	193,3	POZIT	16	POZIT	136,4	POZIT	127,2	POZIT
28	612,4	NEMER.	64,2	POZIT	225,7	NEMER.	26,4	POZIT
29	581,1	POZIT	361,9	POZIT	6,8	NEMER.	37,9	POZIT
30	441,2	NEMER.	136,5	POZIT	157	NEMER.	17,9	POZIT
31	428,9	POZIT	31,9	POZIT	13,9	POZIT	1,7	NEGAT
32	319,3	POZIT	187,8	POZIT	137,5	POZIT	57,3	POZIT
33	298,2	POZIT	377	POZIT	0,001	NEMER.	21,8	POZIT
34	451,9	POZIT	76,7	POZIT	230,4	POZIT	230,9	POZIT
35	427,4	POZIT	183,8	POZIT	0,001	POZIT	0,1	NEGAT
36	392,9	NEMER.	58,6	POZIT	275,8	NEMER.	283,9	POZIT
37	296,8	NEMER.	212,7	POZIT	228,5	NEMER.	251,9	POZIT
38	451,2	NEMER.	12,6	POZIT	303,3	NEMER.	306,3	POZIT
39	388,1	POZIT	9,6	POZIT	217,1	POZIT	18,4	NEGAT
40	352,8	POZIT	48,2	POZIT	206,7	POZIT	12	POZIT
41	431	NEMER.	123,8	POZIT	39,5	NEMER.	98,3	POZIT
42	531,9	POZIT	40,1	POZIT	67,7	POZIT	17,9	POZIT
43	413,4	POZIT	140,6	POZIT	142,4	POZIT	245,2	POZIT
44	493,9	POZIT	23,2	POZIT	4,4	NEMER.	1,5	NEGAT
45	24,4	NEGAT	7,4	POZIT	0,001	NEMER.	3,8	POZIT

Konfirmácia vzoriek likvoru v triede IgG potvrdila výsledok ELISA testu u 31 pacientov, v jednom sa výsledok nepotvrdil, konkrétne pozitívna ELISA a Western blot vyšiel ako negatívny. Nemerali sme pri 14 vzorkách z dôvodu nedostatku materiálu. IgG protilátky v sére sme konfirmovali vo všetkých prípadoch. Trikrát sa nám výsledok nepotvrdil, keď ELISA metódou boli namerané hladiny v referenčnom rozmedzí, pričom WB bol pozitívny.

Protilátky typu IgM v mozgovomiechovom moku sme nekonfirmovali v dvadsiatich vzorkách, z ktorých osem bolo ELISA metódou v referenčných medziach. Rozdielne výsledky sme pri triede IgM v likvore namerali len jedenkrát. V sére sme nekonfirmovali dvakrát, zhodné výsledky sme nepotvrdili v ôsmich vzorkách, z čoho ELISA bola v norme, zatiaľ čo Western blot vyšiel ako pozitívny, opačný prípad nastal v nami sledovanom súbore jedenkrát.

## DISKUSIA

Lymfská neuroborelióza je neurologickým a zároveň najčastejším prejavom neskorého diseminovaného štádia Lymfskej choroby v Európe. Symptomatológia infekcie je rôznorodá, pretože postihuje centrálny a/alebo periférny nervový systém. Klinická prezentácia je závislá aj na genetických rozdieloch v spirochetálnych kmeňov, od spôsobu šírenia spirochét z miesta prisatia kliešť'a do nervového systému. Príznaky sa môžu prejavovať v priebehu niekoľkých rokov od uhryznutia kliešťom, môže však prebiehať aj ako latentná infekcia, ktorá sa klinicky prejaví s odstupom času. Aj napriek pokrokom v medicíne sú príznaky neuroboreliózy diskutovanou témou, nakoľko sa odborníci nezhodujú v typických ani nešpecifických prejavoch. Postihnutie nervového systému sa vyskytuje v dvoch, z troch štádií Lymfskej boreliózy, a to vo včasnom diseminovanom a neskorom diseminovanom štádiu. Najčastejšie sa stretávame práve so včasným diseminovaným štádiom, ktoré sa typicky manifestuje Bannwarthovým syndrómom. Do chronickej diseminovanej fázy sa dostane len veľmi málo pacientov. Stretávame sa aj s postboreliovým syndrómom, pri ktorom pacienti udávajú pretrvávajúce či nové symptómy. Napriek všetkému neuroborelióza obvykle nekončí fatálne a je prakticky vyliečiteľná.

Okrem klinickej manifestácie je diskutovaná aj liečba ochorenia. Nezhody sú pri voľbe vhodného antibiotika, spôsobe podania či dĺžke terapie. Smernica AAN, ILADS, EFNS IDSA udávajú tiež rozporuplné informácie pri liečení doznievajúcich príznakov po adekvátnej liečbe, pretože spochybňujú pretrvávajúce patogéna v organizme po správnej terapii. Spomínané smernice sa nezhodujú tiež v potrebe podávania pomocných látok či v počte typov antibiotík.

Pri diagnostikovaní ochorenia je potrebné myslieť na stanovené podmienky, ktoré sú dané pre diagnostikovanie Lymfskej neuroboreliózy. Ošetrojúci lekár musí posúdiť klinickú anamnézu s príznakmi indikujúcimi postihnutie nervového systému a vylúčiť inú možnú príčinu jeho postihnutia. Z laboratórnych parametrov sú to pleocytóza v likvore a intratekálna syntéza špecifických protilátok a/alebo pozitívna PCR. V prípade podozrenia na neuroboreliózu vyšetríme sérum a likvor a metódy, ktoré využívame na ich analýzu možno rozdeliť na priame a nepriame. Likvor je za normálnych okolností číry a zložením zodpovedá ultrafiltrátu plazmy. Za fyziologických okolností obsahuje len veľmi malé množstvo bunkových elementov a v porovnaní so sérom má vyššiu koncentráciu sodíku, horčíka a chloridov, nižšiu koncentráciu draslíka a vápnika. Obsahuje tiež bielkoviny a imunoglobulíny v stopovom

množstve, okrem toho tiež glukózu a lipidy s elektrolytmi. Vo včasnom diseminovanom štádiu nachádzame typicky lymfocytárnu pleocytózu s počtom buniek 10-1000/3, výnimkami sú veľmi skorá fáza ochorenia či dokonca infekcia spôsobená *Borrelia afzelii*. K priamym patrí kultivácia a PCR, avšak pre pomerne nízku citlivosť nie sú vhodné pre rutinné diagnostiku. Polymerázovou reťazovou reakciou zisťujeme prítomnosť patogéna za základe DNA pomocou sekvencie nukleových kyselín, ktoré sú doplnkové k DNA borélií. Obmedzením však je nízka citlivosť a možnosť falošne negatívnych výsledkov, kvôli nedostatku borélií vo vyšetrovanej vzorke. Pri nepriamych metódach detekujeme protilátkovú odpoveď infikovaného organizmu, a teda ich citlivosť stúpa s dĺžkou trvania infekcie. V likvorológii využívame ELISA metódu, Western blot, prípadne izoelektrickú fokusáciu. ELISA a Western blot sú súčasťou tzv. dvoj krokového testovania. ELISA metódu využívame na kvantitatívne stanovenie IgM, IgG a IgA. Obmedzením je však nízka špecificita, a aj možnosť falošne negatívnych výsledkov v skorých fázach choroby nakoľko sérokonverzia začína okolo 6. týždňa infekcie. Problémom je tiež možné pretrvávanie protilátok aj po preliečení. Western blot slúži ako konfirmačný test v prípade pozitívne, resp. hraničného výsledku z ELISA metódy. V tomto prípade detekujeme prítomnosť protilátok proti jednotlivým separovaným antigénom borélií. Izoelektrická fokusácia je považovaná za zlatý štandard v dôkaze intratekálnej oligoklonálnej syntézy, pričom pre neuroboreliózu je typický tretí typ rozdelenia CSF a séra, tzv. „*more than pattern*“. Výsledkom kvantitatívnej intratekálnej syntézy špecifických antiboréliových protilátok je protilátkový index, pomer koncentrácie špecifických protilátok v sére a v likvore vo vzťahu ku stavu HLB a koncentracii imunoglobulínov v sére a likvore. V súčasnosti sa odporúča používať výpočet podľa Reibera. Mieru permeability hematolikorovej bariéry nám určuje výpočet albumínového kvocientu, teda koncentrácií albumínu v likvore/v sére. Stav HLB nám môže ovplyvniť protilátkový index, s tým, že pokiaľ máme extrémne zvýšenú jej priepustnosť, protilátkový index môže byť vo fyziologickom rozmedzí, v takom prípade je však vzhľadom na stav membrány nehodnotiteľný. Ďalším vyšetrovaným markerom je chemokín CXCL13. Ide o významný ukazovateľ akútnej neuroboreliózy aj v prípade, kedy ešte nie je prítomná intratekálna syntéza špecifických protilátok proti *Borrelia burgdorferi*, pretože ich úloha je v prirodzenej imunite. Užitočné sú aj pri séronegatívnych pacientoch v skorých fázach infekcie.

Prvým cieľom bolo posúdiť fázu ochorenia cez protilátkovú odpoveď a klinické symptómy. Protilátky triedy IgM vieme zachytiť už od tretieho týždňa po uhryznutí kliešťom, IgG od šiesteho. Akonáhle detekujeme vysoké hladiny špecifických IgG protilátok, vieme že

ide o neskorú fázu infekcie. Na základe našich nameraní (graf 1 a 2), kedy ako v sére, tak aj v likvore, sme zistili najčastejšie zvýšenú hladinu IgG (likvor – 39%, sérum 44%), môžeme preto povedať s odvolaním sa na literatúru, že ide už o neskorú formu infekcie, pravdepodobne v trvaní nad šesť týždňov. IgM boli v sére zvýšené v 30% prípadoch, v likvore u 31%. Tu išlo pravdepodobne skorú fázu, do 5. týždňa. V oboch triedach sme detekovali zvýšené koncentrácie v CSF u 30% pacientov, u 26% v sére, čiže išlo pravdepodobne o subakútnu fázu. Na včasné štádium Lymsej choroby upozorňovali aj príznaky zistené v našom súbore. K najčastejším patrila Bannwarthov syndróm. Pomerne často sa vyskytli aj bolesti kĺbov, parézy horných aj dolných končatín, parézy *nervus facialis*. V menšej miere už pacienti udávali kŕče lýtok, chodidiel, bolesti šije, cefaleu, fotofóbiu. Teplota sa nevyskytla. Aj napriek nameraným hodnotám humorálnej odpovede a klinickej symptomatológii sme však nemohli, najmä z laboratórneho hľadiska, určiť či ide o akútnu, prebiehajúcu infekciu, alebo len o anamnestické protilátky s pretrvávajúcimi symptómami. Preto sa ukazuje ako vhodné indikovať vyšetrenie markera floridy zápalu – chemokínu CXCL13.

Druhým cieľom bolo porovnať hladiny CXCL13 s protilátkovou odpoveďou. Najprv sme porovnali namerané hodnoty CXCL13 so súčasným výskytom špecifických antiboréliových protilátok vyšetrených ELISA metódou v sére a cerebrospinálnej tekutine a prítomnosťou intratekálnej syntézy špecifických protilátok (tabuľka 1). V rámci sérologických kritérií musí byť na uzatvorenie diagnostiky Lymsej neuroboreliózy prítomná zvýšená likvorová hladina antiboréliových IgG vrátane vypočítaného AI IgG. Ak však tieto podmienky splnené nie sú, signifikantne vyššie hodnoty CXCL13 môžu diagnostikovaníu infekcie napomôcť. V prípade situácie, kedy nie sú výrazne vysoké hodnoty CXCL13, aj keď sú prítomné špecifické protilátky s AI, pravdepodobne sa o floridnú neuroboreliózu jednať nebude, v takýchto situáciách nie je možné odlišiť akútnu infekciu od prítomnosti anamnestických protilátok. Podľa našich výsledkov v. s. o floridnú neuroboreliózu nešlo v troch prípadoch, aj napriek splneným kritériám. Naopak, pri nesplnení jednej z podmienok, zvýšenému protilátkovému indexu, ale pri elevácii CXCL13 sa aj napriek tomu podporuje diagnóza neuroboreliózy, takže sa ukazuje opodstatnenie jeho detekcie. Nestretli sme sa ani s prípadom, kedy by sme detekovali eleváciu CXCL13 bez prítomnosti intratekálnej syntézy špecifických protilátok, čiže nebolo potrebné vylučovať iný typ neuroinfekcie. Ďalej sme porovnávali hladiny CXCL13 a špecifických boréliových protilátok v triedach IgG a IgM v likvore (graf 3), pretože vyšetované chemokíny sa uplatňujú už v rámci prirodzenej

imunity, a teda je možné ich detekovať ešte pred humorálnou odpoveďou hostiteľského organizmu. V našej skupine sa nám tieto tvrdenia nepodarilo zachytiť, nakoľko sme až na dvoch pacientov, namerali zvýšené koncentrácie v oboch triedach imunoglobulínov. V odbornej literatúre sa tiež uvádza, že stanovenie CXCL13 vie byť užitočné v skorých fázach infekcie u séronegatívnych pacientov, pretože ich hladina stúpa už na začiatku choroby, čo sme sa rozhodli sledovať aj v tejto práci (graf 4), preto sme sa ďalej rozhodli porovnať koncentráciu chemokínu s hladinami špecifických protilátok v sére. Medzi respondentami sa však takýto prípad nevyskytol, takže sme to nepotvrdili. Na základe nami zistených výsledkov s odvolaním sa na v literatúrach uvádzané tvrdenia môžeme povedať, že *Borrelia burgdorferi* stimuluje sekréciu CXCL13 a tým vyvoláva zápalový proces v CNS na základe tvorby špecifických protilátok v likvore a vysokých hladín CXCL13 vo vzorkách. Avšak, aby sme mohli s hlbším významom, relevantnejšie hovoriť o vzťahu, resp. dynamike tvorby chemokínu CXCL13 k imunitnej odpovedi pacienta pri dlhšom časovom vývoji infekcie, bolo by lepšie, efektívnejšie a aj štatisticky významnejšie analyzovať väčšiu skupinu osôb, ale najmä prevádzat' merania opakovane po určitom čase, možno aj pred zahájením liečby, počas terapie a po jej ukončení. Veľkým problémom však je, že by sa zle hľadala skupina ľudí ochotná opakovanie podstúpiť lumbálnu punkciu.

Na základe smerníc, ktoré ustanovujú EFNS, potrebných na uzatvorenie diagnostiky neuroboreliózy sme sa zamerali na ich splnenie, čo bolo našim ďalším cieľom. Patria sem pleocytóza v likvore, klinické symptómy indikujúce postihnutie NS s vylúčením iných príčin a intratekálna syntéza špecifických protilátok. Symptómy posudzovali ošetrojúci lekári vo Fakultnej nemocnici Hradec Králové. Cytologické vyšetrenie za účelom zistenia pleocytózy sme neprevádzali vzhľadom k tomu, že vzorky boli od pacientov z Hradca Králové.. Posudzovali sme prítomnosť intratekálnej syntézy špecifických protilátok (tabuľka 2), taktiež tzv. sérologické kritéria a konfirmáciu Western blot metódou v rámci dvojkrokovej analýzy. Pri hodnotení protilátkového indexu sme u desiatich vzoriek mali síce AI v norme, avšak v šiestich prípadoch ju ovplyvnila zvýšená permeabilita HLB, z čoho vyplýva potreba komplexného posudzovania výsledkov. Zvýšený protilátkový index sme zistili v 76% prípadov. Pri sérologických kritériách, teda vysokej hladiny antiboréliových IgG spolu s AI, sme zistili ich splnenie až na jeden prípad, v dvoch prípadoch boli zvýšené špecifické IgG v likvore, pričom v sére boli koncentrácie antiboréliových IgG v rámci fyziologických hodnôt. V tomto prípade nie je možné rozlíšiť či ide o anamnesticke protilátky alebo prebiehajúcu infekciu, aj napriek pozitívite AI, preto je vhodné indikovať vyšetrenie

chemokínu CXCL13. Ďalšou metódou, ktorou získame kvalitatívny dôkaz intratekálnej oligoklonálnej syntézy je izoelektrická fokusácia. Podľa medzinárodne dohodnutých piatich typov rozdelenia likvoru a séra je pre Lymskú neuroboreliózu typický typ 3. V tomto prípade pre prítomnosť intratekálnej syntézy svedčí prítomnosť > 2 oligoklonálnych pásov v CSF bez analógie v sére. Vyšetrenie intratekálnej oligoklonálnej syntézy izoelektrickou fokusáciou sa odporúča v neuroimunologickej praxi, aby sme indikujúcemu, ošetrojúcemu lekárovi poskytli informáciu o možnom príčine postihnutia nervového systému neinfekčného pôvodu. Pre Lymskú neuroboreliózu nás zaujíma najmä trieda IgG, ktorá sa v našej skupine vyskytla v 53% prípadov (graf 5). Typ IgM sme zistili u 18%, zatiaľ čo ľahké reťazce (FLC) lambda u 23% a pri ľahkých reťazcoch kappa bola intratekálna oligoklonálna syntéza prítomná 6% respondentov. Ďalším špecifikom v laboratórnom testovaní pri podozrení na LNB je dvojkroková analýza, ktorá zahŕňa konfirmáciu Western blot metódou výsledky z ELISA metódy zistené v prvom kroku. Western blot využívame až pri hraničných a pozitívnych výsledkoch, aby sme predišli prípadným falošne pozitívnym výsledkom z ELISA metódy. Pri triede IgG z likvoru sme z nedostatku materiálu nekonfirmovali 14 vzoriek, pričom sa výsledok potvrdil v 31 prípadoch (tabuľka 3). V jednom prípade sme namerali ELISA metódou zvýšenú koncentráciu, zatiaľ čo Western blot ukázal negatívny výsledok. V sére sa nám výsledok nepotvrdil trikrát, kedy výsledky detekované ELISA metódou vyšli v referenčnom rozmedzí a Western blot ako pozitívny. V cerebrospinálnej tekutine pri IgM triede sme nekonformovali 20 vzoriek, u ktorých sme u ôsmich respondentov nezistili prítomnosť IgM ELISA metódou. Rozdielne výsledky sme namerali len raz. V sére sme nekonfirmovali dvakrát, zhoda v metódach sa nepotvrdila v ôsmich prípadoch.

Aj vzhľadom ku kritériám EFNS, kam k potvrdeniu diagnózy je žiaduce posúdenie klinickej symptomatiky, a zložitosti problematiky interpretácie výsledkov je potrebná spolupráca ošetrojúceho lekára a laboratórnych diagnostikov pri vyslovení definitívnej diagnózy. Čo vyplýva aj z toho, že Lymská borelióza je diagnózou klinickou, čo znamená, že pozitivita laboratórnych ukazovateľov sa nelieči, ak je pacient bez klinických symptómov. Naopak v situácii laboratórne nepotvrdeného ochorenia s klinickou manifestáciou indikujúcou Lymskú chorobu sa liečba podáva.

## ZÁVER

Lymská neuroborelióza je infekčná, kliešťami prenášaná choroba, ktorá manifestuje ako postihnutie nervového systému pri Lymskej chorobe.

V práci sme obsiahli stručnú charakteristiku pôvodcu ochorenia, klinickú problematiku infekcie spolu s odporúčanou liečbou. V laboratórnej diagnostike sme sa zamerali na vyšetrovaný materiál a metódy využívané v likvorologickej praxi v rámci diagnostikovania Lymskej neuroboreliózy, predovšetkým podľa odporúčaní EFNS. Opísali sme úskalia a výhody jednotlivých metód, ich špecificitu a senzitivitu. Spomínanými metódami je v rámci priameho dôkazu pôvodcu PCR, z nepriamych metód je to izoelektrická fokusácia, ELISA a konfirmačný test Western blot. Časť práce sme venovali aj cytológii likvoru, nakoľko pleocytóza patrí k jednému z kritérií potrebných pre zistenie diagnózy, posúdeniu stavu hematolikvorovej bariéry a intratekálnej syntéze protilátok.

Z výsledkov experimentálnej časti nám vyplynulo, že na základe detekovanej humorálnej odpovede organizmu a klinickej symptomatológie respondentov zo súboru sa všetci nachádzali v najčastejšie sa vyskytujúcim, včasnom diseminovanom štádiu, pričom najviac zastúpeným klinickým symptómom bol Bannwarthov syndróm. Stanovením chemokínu CXCL13 sme prišli na jeho opodstatnenie pre určovanie floridity zápalu, pretože aj keď existujú kritéria pre uzatvorenie diagnózy, nie je v mnohých prípadoch možné určiť či ide o práve prebiehajúcu infekciu, čo sme prezentovali aj v rámci práce. Na základe jeho výraznej elevácie taktiež možno povedať, že *Borrelia burgdorferi* jeho produkciu stimuluje. Pre hlbší význam stanovovania CXCL13 vo vzťahu k dynamike ochorenia aj popri vývoji humorálnej odpovede a ich prepojenie by sme museli analyzovať pacientov opakovane, čo nebolo predmetom práce. Pri interpretácii výsledkov z vyšetrení na uzatvorenie diagnózy je, ako vyplýva z textu, potrebné komplexné posudzovanie jednotlivých parametrov. Ako sme preukázali, nie vždy splnenie kritérií musí nutne znamenať prebiehajúcu infekcie a je potrebné zohľadňovať aj faktory ovplyvňujúce jednotlivé hodnoty. Konkrétne, čo bol aj náš prípad, môže výrazné porušená hematolikvorová bariéra ovplyvniť podstatný ukazovateľ, ktorým je intratekálna syntéza protilátok.



## ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

1. ADIGUN, O. O., A MOHAMMED A. AL-DHAHIR. 2018. "Anatomy, Head and Neck, Cerebrospinal Fluid". In *StatPearls Publishing*. [online]. 2018. [cit. 2019-02-04]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29083815>.
2. AGUERO-ROSENFELD, M. E., et al. 2005. "Diagnosis of lyme borreliosis." In *Clinical microbiology reviews* [online]. 2005. 18(3): 484–509. [cit. 2016-10-31]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16020686>.
3. BONNAN, M. 2016. "Intrathecal Immunoglobulin Synthesis in MS—A Complete Reappraisal". In *Trending Topics in Multiple Sclerosis*. Dostupné z: <https://doi.org/10.5772/63201>
4. BORDE, J. P. et al. 2012. "CXCL13 may improve diagnosis in early neuroborreliosis with atypical laboratory findings." In *BMC infectious diseases*. [online]. 2012. 12: 344. [cit. 2017-12-14]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23228054>.
5. CEPOK, S. et al. 2003. "The Immune Response at Onset and During Recovery From *Borrelia burgdorferi* Meningoradiculitis". In *Archives of Neurology*. [online]. 2003. 60(6): 849. [cit. 2017-03-13]. Dostupné z: <http://archneur.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/archneur.60.6.849>.
6. CERAR, T. et al. 2013. "Diagnostic value of cytokines and chemokines in lyme neuroborreliosis." In *Clinical and vaccine immunology*. [online]. 2013. CVI 20(10): 1578–84. [cit. 2017-12-14]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23945160>.
7. DERSCH, R., RAUER, S. 2017. "Neuroborreliose – Diagnostik, Therapie und Verlauf". In *Der Nervenarzt*. [online]. 2017. 88(4): 419–31. [cit. 2018-11-07]. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00115-016-0263-1>.
8. DERSCH, R et al. 2015. "Methodological quality of guidelines for management of Lyme neuroborreliosis". In *BMC Neurology*. [online]. 2015. 15(1): 242. [cit. 2017-12-14]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26607686>.
9. DJUKIC, M. et al. 2012. "Cerebrospinal fluid findings in adults with acute Lyme neuroborreliosis". In *Journal of Neurology*. [online]. 2012. 259(4): 630–36. [cit. 2018-11-07]. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00415-011-6221-8>.
10. DOHERTY, C. M, RAEBURN B. F. 2014. "Diagnostic Lumbar Puncture." In *The Ulster medical journal* [online]. 2014. 83(2): 93–102. [cit. 2019-02-07]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25075138>.
11. EIKELAND, R., et al. 2011. "European neuroborreliosis: quality of life 30 months

- after treatment”. In *Acta Neurologica Scandinavica*. [online]. 2011. 124(5): 349–54. [cit. 2018-11-07]. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-0404.2010.01482.x>.
12. GARG, K. et al. 2018. “Evaluating polymicrobial immune responses in patients suffering from tick-borne diseases”. In *Scientific Reports*. [online]. 2018. 8(1): 15932. [cit. 2019-02-11]. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/s41598-018-34393-9>.
  13. HALPERIN, J. J. 2017. “Neuroborreliosis”. In *Journal of Neurology*. [online]. 2017. 264(6): 1292–97. [cit. 2018-11-08]. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00415-016-8346-2>.
  14. HANSEN, B. A., et al. 2018. “Autonomous dysfunction in Lyme neuroborreliosis. A case report”. In *Clinical Case Reports*. [online]. 2018. 6(5): 901. [2018-11-07]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29744083>.
  15. HENNINGSSON, A. J. et al. 2014. “Laboratory diagnosis of Lyme neuroborreliosis: a comparison of three CSF anti-Borrelia antibody assays.” In *European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology*. [online] 2014. 33(5): 797–803. [cit. 2016-10-31]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24263552>.
  16. HENNINGSSON, A. J. et al. 2018. “The chemokine CXCL13 in cerebrospinal fluid in children with Lyme neuroborreliosis.” In *European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology* [online]. 2018. 37(10): 1983–91. [cit. 2018-11-07]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30083887>.
  17. HUFF, T., VARACALLO, M. 2018. "Neuroanatomy, Cerebrospinal Fluid". In *StatPearls*. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29262203>.
  18. JACEK, E. et al. 2016. “Epitope-Specific Evolution of Human B Cell Responses to *Borrelia burgdorferi* VlsE Protein from Early to Late Stages of Lyme Disease.” In *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. [online]. 2016. 196(3): 1036–43. [cit. 2016-10-31]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26718339>.
  19. KEPA, L., et al. 2015. “Chemokine CXCL13 concentration in cerebrospinal fluid in patients with neuroborreliosis--own observations.” In *Przegląd epidemiologiczny*. [online]. 2015. 69(4): 705–10, 851–55. [cit. 2017-03-13]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27139348>.
  20. LINDLAND, E. S. et al. 2018. “Imaging in Lyme neuroborreliosis”. In *Insights into Imaging*. [online]. 2018. 9(5): 833–44. [cit. 2018-11-07]. Dostupné z:

<http://link.springer.com/10.1007/s13244-018-0646-x>.

21. MARQUES, A. R. 2015. "Laboratory diagnosis of Lyme disease: advances and challenges." In *Infectious disease clinics of North America*. [online]. 2015. 29(2): 295–307. [cit. 2017-10-31]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25999225>.
22. MYGLAND, Å. et al. 2010. "EFNS guidelines on the diagnosis and management of European Lyme neuroborreliosis". In *European Journal of Neurology*. [online]. 2010. 17(1): 8-e4. [cit. 2019-02-11]. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1468-1331.2009.02862.x>.
23. PIETIKÄINEN, A. et al. 2016. "Cerebrospinal fluid cytokines in Lyme neuroborreliosis." In *Journal of neuroinflammation*. [online]. 2016. 13(1): 273. [cit. 2017-12-14]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27756335>.
24. RAMESH, G. et al. 2015. "Inflammation in the pathogenesis of lyme neuroborreliosis." In *The American journal of pathology*. [online]. 2015. 185(5): 1344–60. [cit. 2017-12-14]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25892509>.
25. RAUER, S. et al. 2018. "Lyme neuroborreliosis". In *Deutsches Aerzteblatt Online*. [online]. 2018. [cit. 2019-01-17]. Dostupné z: <https://www.aerzteblatt.de/10.3238/arztebl.2018.0751>.
26. ROALDSNES, E., et al. 2017. "Lyme-nevroboreliose ved uspesifikke nevrologiske symptomer". In *Tidsskrift for Den norske legeforening*. [online]. 2017, 137(2): 101–4. [cit. 2018-11-07]. Dostupné z: <https://tidsskriftet.no/2017/01/originalartikkel/lyme-nevroboreliose-ved-uspesifikke-nevrologiske-symptomer>.
27. RUPPRECHT, T. A., et al. 2014. "CXCL13 als Biomarker der akuten Neuroborreliose". In *Der Nervenarzt*. [online]. 2014. 85(4): 459–64. [cit. 2018-12-14]. Dostupná z: <http://link.springer.com/10.1007/s00115-014-4020-z>.
28. SALO, J. et al. 2011. "Decorin binding by DbpA and B of *Borrelia garinii*, *Borrelia afzelii*, and *Borrelia burgdorferi sensu Stricto*." In *The Journal of infectious diseases*. [online]. 2011. 204(1): 65–73. [cit. 2019-01-11]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21628660>.
29. SIGNORINO, G. et al. 2014. "Identification of OppA2 linear epitopes as serodiagnostic markers for Lyme disease." In *Clinical and vaccine immunology*. [online]. 2014. CVI 21(5): 704–11. [cit. 2018-10-31]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24623628>.

30. SMOLUCH, M., et al. 2016. "Online and Offline Sample Fractionation". In *Proteomic Profiling and Analytical Chemistry*. [online]. 2016. 63–99. [cit. 2019-03-01].  
Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444636881000057>.
31. SOBEK, O. et al. 2009. "Vyšetření likvoru – současné možnosti". In *Neurologie pro praxi*. [online]. 2009. 10(5): 280–84. [cit. 2019-02-05]. Dostupné z: [https://www.neurologiepropraxi.cz/artkey/neu-200905-0003\\_Vysetreni\\_likvoru-soucasne\\_moznosti.php](https://www.neurologiepropraxi.cz/artkey/neu-200905-0003_Vysetreni_likvoru-soucasne_moznosti.php).
32. STEERE, A. C. et al. 2016. "Lyme borreliosis." In *Nature reviews. Disease primers 2*. [online]. 2016. 16090. [cit. 2019-01-13.] Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27976670>.
33. TELANO, L. N. et al. 2018. Physiology, Cerebral Spinal Fluid (CSF). In *StatPearls Publishing*. [online]. 2018. [cit. 2019-01-29]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30085549>.
34. DERSCH, R et al. 2015. "Methodological quality of guidelines for management of Lyme neuroborreliosis". In *BMC Neurology*. [online]. 2015. 15(1): 242. [cit. 2017-01-25]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26607686>.
35. ECKMAN, E. A., et al. 2018. "Neuroimmunomodulators in Neuroborreliosis and Lyme Encephalopathy". In *Clinical Infectious Diseases*. [online]. 2018. 67(1): 80–88. [cit. 2018-11-08]. Dostupné z: <https://academic.oup.com/cid/article/67/1/80/4797597>.
36. EUROIMMUN. *Professional serological Borrelia diagnostics using recombinant and native antigens*. [cit. 2019-02-20]. Dostupné z: [www.euroimmun.com](http://www.euroimmun.com).
37. HALPERIN, J. J. 2016. "Nervous system Lyme disease, chronic Lyme disease, and none of the above". In *Acta Neurologica Belgica*. [online]. 2016. 116(1): 1–6. [cit. 2019-03-11]. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s13760-015-0541-x>.
38. HALPERN, M. D., et al. 2014. "Simple objective detection of human lyme disease infection using immuno-PCR and a single recombinant hybrid antigen." *Clinical and vaccine immunology: CVI* [online]. 2014. 21(8): 1094–1105. [cit. 2018-10-31]. Dostupné z:
39. HENNINGSSON, A. J. et al. 2016. "Evaluation of two assays for CXCL13 analysis in cerebrospinal fluid for laboratory diagnosis of Lyme neuroborreliosis". In *APMIS*. [online]. 2016. 124(11): 985–90. [cit. 2018-11-08]. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/apm.12596>.
40. HUPPERTZ, H. I. et al. 2012. "Rational diagnostic strategies for Lyme borreliosis in

- children and adolescents: recommendations by the Committee for Infectious Diseases and Vaccinations of the German Academy for Pediatrics and Adolescent Health.” In *European journal of pediatrics*. [online]. 2012. 171(11): 1619–24. [cit. 2017-12-28]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22782450>.
41. HYTÖNEN, J. et al. 2014. “CXCL13 and neopterin concentrations in cerebrospinal fluid of patients with Lyme neuroborreliosis and other diseases that cause neuroinflammation.” In *Journal of neuroinflammation*. [online]. 2014. 11: 103. [cit. 2017-01-04]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24920219>.
  42. CHANDRA, A. et al. 2011. “Anti-Borrelia burgdorferi antibody profile in post-Lyme disease syndrome.” In *Clinical and vaccine immunology : CVI*. [online]. 2011. 18(5): 767–71. [cit. 2019-01-10]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21411605>.
  43. JOHANSON, C. E., et al. 2010. “The Blood–Cerebrospinal Fluid Barrier: Structure and Functional Significance”.
  44. MARTINEZ, A. N. et al. 2015. “Antagonist of the neurokinin-1 receptor curbs neuroinflammation in ex vivo and in vitro models of Lyme neuroborreliosis.” In *Journal of neuroinflammation*. [online]. 2015. 12: 243. [cit. 2018-12-04]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26714480>.
  45. MIKLOSSY, J. 2012. “Chronic or late lyme neuroborreliosis: analysis of evidence compared to chronic or late neurosyphilis.” In *The open neurology journal* [online]. 2012. 6: 146–57. [cit. 2017-01-04]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23346260>.
  46. OHNISHI, J. et al. 2001. “Antigenic and genetic heterogeneity of Borrelia burgdorferi populations transmitted by ticks”. In *Proceedings of the National Academy of Sciences*. [online]. 2001. 98(2): 670–75. [cit. 2019-01-17]. Dostupné z: <https://www.pnas.org/content/98/2/670>.
  47. REMY, M. M. et al. 2017. “Cerebrospinal fluid CXCL13 as a diagnostic marker of neuroborreliosis in children: a retrospective case-control study.” In *Journal of neuroinflammation*. [online]. 2017. 14(1): 173. [cit. 2018-11-10]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28859668>.
  48. RODRÍGUEZ, I. et al. 2015. “Multiplex PCR for molecular screening of Borrelia burgdorferi sensu lato, Anaplasma spp. and Babesia spp”. In *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*. 22(4): 642–46.
  49. RUPPRECHT, T. A., PFISTER H. W. 2009. “What Are the Indications for Lumbar

- Puncture in Patients with Lyme Disease?” In *Lyme Borreliosis*, Basel: KARGER. [online]. 2009. 200–206. [cit. 2018-11-27]. Dostupné z: <https://www.karger.com/Article/FullText/213078>.
50. SKOGMAN, B. H, et al. 2015. “The NeBoP score - a clinical prediction test for evaluation of children with Lyme Neuroborreliosis in Europe.” In *BMC pediatrics*. [online]. 2015. 15: 214. [cit. 2017-12-29]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26678681>.
51. STANEK, G. et al. 2011. “Lyme borreliosis: Clinical case definitions for diagnosis and management in Europe”. In *Clinical Microbiology and Infection*. [online]. 2011. 17(1): 69–79. [cit. 2019-02-11]. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1198743X14609162>.
52. WILSKE, B. et al. 2007. “Microbiological and serological diagnosis of Lyme borreliosis”. In *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. [online]. 2007. 49(1): 13–21. [cit. 2019-02-15]. Dostupné z: <https://academic.oup.com/femspd/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-695X.2006.00139.x>.
53. WORMSER, G. P. et al. 2013. “Comparative cost-effectiveness of two-tiered testing strategies for serodiagnosis of lyme disease with noncutaneous manifestations.” In *Journal of clinical microbiology*. [online]. 2013. 51(12): 4045–49. [cit. 2017-10-31]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24068010>.
54. AMBLER, Z. 2006. *Základy neurologie*. 6. prepracované a doplnené vyd. Praha: Galén, 2006. 351 s. ISBN 807-262-433-4.
55. BARTŮŇEK, P. et al. 2013. *Lymeská borelióza*. České Budejovice: PROTISK, s.r.o. , 2013. 168 s. ISBN 978-80-247-4355-4.
56. SCHERKOVÁ, Martina. Problematika diagnostiky a terapie neuroborelióz. Trnava, 2017. 71 s. Bakalárska práca. Trnavská univerzita v Trnave, Fakulta zdravotníctva a sociálnej práce. Vedúci práce PaedDr. RNDr. Jana Špajdelová, PhD.
57. Two-step Laboratory Testing Process | Lyme Disease | CDC. (n.d.). Dostupné na internete: <<http://www.cdc.gov/lyme/diagnosistesting/labtest/twostep/index.html>>.
58. Understanding the EIA Test | Lyme Disease | CDC. (n.d.). Dostupné na internete <<http://www.cdc.gov/lyme/diagnosistesting/labtest/twostep/eia/index.html>>.
59. Understanding the Immunoblot Test | Lyme Disease | CDC. (n.d.). Dostupné na internete: <<http://www.cdc.gov/lyme/diagnosistesting/LabTest/TwoStep/WesternBlot/index.htm>>.

60. VOKURKA, M. et al. 2015. *Velký lékařský slovník*. Praha: Maxdorf, 2015. 1119 s. ISBN 978-807-345-456-2.
61. ZIMA, T. 2013. *Laboratorní diagnostika*. 3. vyd. Praha: Galén, 2013. 1146 s. ISBN 978-807-492-062-2.
62. BARSTAD, B. et al. 2018. "Direct Molecular Detection and Genotyping of *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato in Cerebrospinal Fluid of Children with Lyme Neuroborreliosis". In *Journal of Clinical Microbiology*. [online]. 2018. 56(5): e01868-17. [cit. 2019-02-11]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29467195>.
63. GURČÍK, L. 2009. "Súčasné trendy v diagnostike a liečbe neuroboreliozy". In *Neurologia pre prax*. 2009, 10,(3) s. 170-176.
64. KELBICH, P. et al. 2009. "Význam základního vyšetření likvoru pro diagnostiku postižení centrálního nervového systému (1. část)".
65. KELBICH, P. et al. 2009. "Význam základního vyšetření likvoru pro diagnostiku postižení centrálního nervového systému (2. část)".
66. Odborné usmernenie Ministerstva zdravotníctva SR (OUMZ SR) na diagnostiku a liečbu lymfatickej choroby v Slovenskej republike číslo: 06486-XX/2010-OZS ver. 2.008.
67. SPECTOR R. et al. 2015. „A balanced view of the cerebrospinal fluid composition and functions: Focus on adult humans“. In *Exp. Neurol.* [online]. 2015. 273:57-68. [cit. 2019-03-22]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26247808>.
68. DAMKIER H. H. et al., 2010. „Epithelial pathways in choroid plexus electrolyte transport“. In *Physiology (Bethesda)*. [online]. 2010. 25(4):239-49. [cit. 2019-03-13]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20699470>.
- SAKKA L. et al. 2011. „Anatomy and physiology of cerebrospinal fluid“. In *Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis*. [online]. 2011. 128(6):309-16. [cit. 2019-01-19]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1879729611001013?via%3Dihub>.
69. WRIGHT B. L. et al. 2012. „Cerebrospinal fluid and lumbar puncture: a practical review“. In *J. Neurol.* [online]. 2012. 259(8):1530-45. [cit. 2019-01-05]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22278331>.
70. PFISTER H. W. et al. 2006. „Clinical aspects of neuroborreliosis and post-Lyme disease syndrome in adult patients“. In *Int J Med Microbiol.* [online]. 2006. 296(Suppl 40): 11–16. [cit. 2019-01-05]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16524775>.

71. CAMERON D. et al. 2004. „Evidence-based guidelines for the management of Lyme disease“. In *Expert Rev Anticancer Ther.* [online]. 2004. 2:S1–13. [cit. 2019-01-06]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15581390>.
72. HALLSTROM T. et al. 2010. „Complement regulator-acquiring surface protein 1 of *Borrelia burgdorferi* binds to human bone morphogenic protein 2, several extracellular matrix proteins, and plasminogen“. In *J Infect Dis.* 2010.
73. MÜLLEGGER RR. et al. 2007. „Chemokine signatures in the skin disorders of Lyme borreliosis in Europe: predominance of CXCL9 and CXCL10 in erythema migrans and acrodermatitis and CXCL13 in lymphocytoma“. In *Infect. Immun.* [online]. 2007. 75:4621–4628. [cit. 2018-11-22]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1951170/>.
74. JONES K. L. et al. 2008. „Higher mRNA levels of chemokines and cytokines associated with macrophage activation in erythema migrans skin lesions in patients from the United States than in patients from Austria with Lyme borreliosis“. In *Clin. Infect. Dis.* [online]. 2008. 46:85–92. [cit. 2018-09-18]. Dostupné z: <https://academic.oup.com/cid/article/46/1/85/338874>.
75. ADAM P. et al. 2001. „Cerebrospinal Fluid“. In *Advances in Clinical Chemistry.* [online]. 2001. 36: 1–62. [cit. 2019-01-25]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065242301360249>
76. VOTAVA et al., 2006. *Lekářská mikrobiologie speciální*. Liberec: Neptun, 2006. 495 s. ISBN 809-028-966-5.
77. SAINT GIRONS, I. et al. 1998. „Identification of *Borrelia burgdorferi* sensu lato species in Europe“. In *Zentbl. Bakteriol.* [online]. 1998. 287:190-195. [cit. 2019-04-02]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0934884098801205>.
78. ŠTĚRBA J. et al. 2008. „Flagellin and Outer Surface Proteins from *Borrelia burgdorferi* are not Glycosylated“. In *Journal of Bacteriology.* [online]. 2008. 190(7):2619-23. [cit. 2019-01-13]. Dostupné z: <https://jb.asm.org/content/190/7/2619.long>.
79. MEYERHOFF O. J. et al. 2018. „Lyme disease“. In *Medscape.* [online]. 2018. [cit. 2019-01-03]. Dostupné z: <https://emedicine.medscape.com/article/330178-workup>.
80. SEIDL Z. 2015. *Neurologie pro studium i praxi*. Praha: Grada, 2015. 384 s. ISBN 978-802-475-247-1.



81. REIBER H. 1994. „The hyperbolic function: a mathematical solution of the protein flux/CSF flow model for blood-CSF barrier function“. In *J Neurol Sci*, 126, 243-245.
82. SOBEK, O. et al. 2012. „Algoritmus vyšetření likvoru v návaznosti na doporučení Sekce neuroimunologie a likvorologie České neurologické společnosti JEP“. In *Cesk Slov Neurol N*, 75/ 108(2), 159-163.
83. VOKURKA, M. et al. 2015. *Praktický slovník medicíny*. Praha: Maxdorf, 2016. 450 s. ISBN 978-807-345-464-7.