

Dôkaz spirochét *Borrelia burgdorferi* u pacientov s včasnou diseminovanou formou lymeskej boreliózy

K. SCHWARZOVÁ¹, K. HOLEČKOVÁ², Z. KOŠŤANOVÁ³

¹Virologický ústav, Slovenská akadémia vied, Bratislava, ²Slovenská zdravotnícka univerzita, Bratislava

³Regionálny úrad verejného zdravotníctva, Žiar nad Hronom

SOUHRN

Schwarzová K., Holečková K., Košťanová Z.: **Dôkaz spirochét *Borrelia burgdorferi* u pacientov s včasnou diseminovanou formou lymeskej boreliózy**

V krvi a likvore 15 pacientov s klinicky potvrdenou včasnou diseminovanou formou lymeskej boreliózy (LB) sme zisťovali prítomnosť spirochét. In vitro kultivácia vzoriek bola úspešná v 8 vzorkách krvi a v 1 vzorke likvoru. Vzorky boli analyzované aj elektrónovou mikroskopiou, Western blotom a PCR metódou. DNA borélií bola PCR analýzou potvrdená v 9 vzorkách krvi a v 1 vzorke likvoru. S použitím reštrikčnej endonukleázy MseI boli vo vzorkách metódou RFLP dokázané tri druhy spirochét, *Borrelia garinii*, *B. afzelii* a *B. burgdorferi* s.s.

Kľúčové slová: *Borrelia burgdorferi*, priamy dôkaz, PCR, RFLP (Restriction fragment length polymorphism) analýza.

SUMMARY

Schwarzová K., Holečková K., Košťanová Z.: **Evidence of *Borrelia burgdorferi* spirochetes in patients with early disseminated lyme borreliosis**

Fifteen patients with clinically documented early disseminated lyme borreliosis were screened for the presence of spirochetes. In vitro trials of isolation of the pathogen were positive in 8 blood and 1 cerebrospinal fluid (CSF) samples. The positivity was further confirmed by electron microscopy, Western blot analysis and PCR. However, successful DNA extraction after using *Borrelia* specific primers proved the positivity in 9 blood and 1 CSF samples (67%). Restriction fragment length polymorphism (RFLP) method using MseI restriction of PCR products of the amplified *rrf-rrl* region, allowed the identification of three species, namely the *Borrelia garinii*, *B. afzelii* and *B. burgdorferi* s.s.

Keywords: *Borrelia burgdorferi*, direct detection, PCR, RFLP (Restriction fragment length polymorphism) analysis

Klin mikrobiol inf lék 2009;15(2):40–44

Adresa: Katarína Schwarzová, Virologický ústav, Slovenská akadémia vied, Bratislava, Dúbravská cesta 9, 84505 Bratislava. Slovensko, e-mail: virukats@savba.sk

Došlo do redakcie: 31. 12. 2008

Prijato k tisku: 19. 3. 2009

Úvod

V posledných desaťročiach dochádza v dôsledku globálnych zmien (klimatických, hospodárskych i spoločenských) k šíreniu a/ alebo novo sa objavovaniu závažných infekčných ochorení rôznej etiológie. Počet hlásených nálezov zoonotického charakteru narastá aj vďaka pokrokom v diagnostike. Typickým príkladom je práve lymeská borelióza (LB). Nejedná sa o novú epidémiu, ale o rozpoznanie ochorenia. LB patrí v dnešnej dobe medzi najrozšírenejšie infekčné ochorenia v Európe a v USA, primárne prenášané kliešťami. Infekcia sa prejavuje multisystémovým postihnutím organizmu pacienta, s veľkou variabilitou klinických príznakov vzájomne sa prekrývajúcich, preto je právom označovaná za veľkého imitátora viacerých ochorení. Ochorenie vyvoláva spirochéta komplexu *Borrelia burgdorferi* sensu lato, s fenotypovo a genotypovo odlišnými druhmi *Borrelia garinii*, *Borrelia afzelii* a *Borrelia burgdorferi*

sensu stricto (*B. burgdorferi* s.s.). Najnovšie boli z pacientov izolované aj druhy *B. spielmanii*, *B. lusitaniae* a *B. valaisiana* [1,7,10]. Hlavným vektorom týchto spirochét je kliešť rodu *Ixodes*.

Ťažiskom diagnostiky lymeskej boreliózy v praxi sú sérologické metódy na detekciu protilátkovej odpovede. Z databázy informačného systému prenosných ochorení (EPIS) v rokoch 2003–2007 však vyplýva, že z hlásených ochorení na LB pri pozitívnej kliešťovej anamnéze a pri prítomnosti klinických príznakov, bol sérologický výsledok pri diagnostikovanom včasnom lokalizovanom štádiu infekcie v 10 % negatívny. Výsledky sérologického vyšetrenia včasného diseminovaného štádiu infekcie boli negatívne v 13 % a pri neskorom diseminovanom štádiu v 6 %. Tieto údaje poukazujú aj na problém citlivosti sérodiagnostických testov [2]. Cieľom tejto analýzy bolo zistiť prítomnosť borélií alebo ich DNA u 15 pacientov s diseminovanou formou LB.

Materiál a Metódy

Vzorky pacientov

Do štúdie bolo začlenených 15 pacientov s diagnózou včasnej diseminovanej LB v období od roku 2003–2007. Údaje o pacientoch zaznamenávajúce vek, pohlavie, prítomnosť protilátok IgG a IgM tried proti *Borrelia burgdorferi* s. l. (ELISA kit), pohryzenie kliešťom a symptómy ochorenia boli získané v spolupráci s Klinikou infektológie a geografickej medicíny (KIGM) v Bratislave a s lekármi prvého kontaktu v Žiari n/Hronom. Trinásť pacientov malo v ELISA analýze hraničné hodnoty alebo negatívne výsledky.

Špecifickými diagnostickými testami sme analyzovali 15 vzoriek krvi a 4 vzorky likvoru u 15 pacientov s LB. Desiat z nich (67 %) boli deti v priemernom veku 9 rokov (vekové rozpätie 7–15 rokov) a päť pacientov (33 %) bolo dospelých. V tejto skupine boli 3 ženy s priemerom 47 rokov (od 43 do 51 rokov) a dvaja muži (55 a 60 rokov). Päť pacientov trpelo na neuroboreliózu (33 %), osem pacientov (53 %) malo erythema migrans (EM) s následnými neurologickými komplikáciami a dvom pacientom (13 %) bola diagnostikovaná suspektná LB (pri sclerosis multiplex, akútna artritída). Vzorky krvi a likvoru boli pacientom odobraté pred antibiotickou terapiou.

Kultivácia borélií z krvi a likvoru

Vzorky krvi odobraté všetkým 15 pacientom v objeme 5 mL a štyri vzorky likvoru (3 mL) zároveň odobraté pacientom s neuroboreliózou sa 5 min centrifugovali pri 8 000 rpm. Inokulum sa sterilne a v mikroaerofilných podmienkach pri 34 °C podľa odporučení [10] prenieslo do jednej až troch kultivačných nádob s BSK-H médiom (Sigma) a v týždenných intervaloch sa sledoval nárast spirochét. Dobre vyrastené kultúry sa uchovali pri teplote –70 °C pre ďalšie použitie.

Serológia

Vzorky sa testovali komerčným kitom *Borrelia garinii* Western blot IgG a IgM (Anti-*Borrelia garinii*-Western Blot IgM and IgG, Euroimmun, Germany). Interpretácia výsledkov sa stanovila podľa pokynov výrobcu.

Kontrolné kmene baktérií

Kontrolné kmene *B. burgdorferi* s.l. komplexu, MIL (*B. burgdorferi* s.s.), VS461 (*B. afzelii*) a K10 (*B. garinii*) boli poskytnuté prof. Kmetym [4] a dr. D. Postic, Pasteur Institute, Paris, France.

Elektrónová mikroskopia

Izoláty (>100 mikroorg./µmL kult.) boli sledované elekt-

Tabulka 1

Vyšetrenia pacientov s včasným diseminovaným štádiom LB štyrmi diagnostickými metódami.

Č.	Pacient		ELISA		WB		Kultivácia	PCR/RFLP
	Vek	Pohl.	IgM	IgG	IgM	IgG		
1	7	F	–	–	–	hr	–	–
2	8	F	+	+	+	+	+	B.g.
3	8	M	+	+	+	+	+	B.g.
4	9	F	–	–	–	–	+	B.a.
5	9	M	–	–	–	–	–	–
6	10	M	hr	–	–	–	+	B.g.
7	11	F	–	–	–	–	+	B.g.
8	11	M	–	–	–	–	–	–
9	14	F	hr	–	+	+	+	B.g.
10	15	F	–	–	–	–	+	B.g.
11	43	F	hr	–	–	–	–	B.g.
12	47	F	–	–	–	–	–	–
13	51	F	–	–	–	–	+	B.b.s.s
14	55	M	–	–	–	–	+	B.g.
15	60	M	hr	–	–	–	–	–

Legenda:

(+) – anti-*Borrelia* IgM, IgG protilátky prítomné, pozitívne
 (–) – anti-*Borrelia* IgM, IgG protilátky neprítomné, negatívne
 hr – hraničné hodnoty
 F – ženské

M – mužské
 B.a – *Borrelia afzelii*
 B.g – *Borrelia garinii*
 B.b.s.s. – *Borrelia burgdorferi* s.s.

rónovým mikroskopom podľa Hovind-Hougen [3] a podľa popísaného postupu [8].

DNA extrakcia

Z primárnych kultúr spirochét (celkom v objeme 5 ml) bola extrahovaná DNA pomocou QIAamp DNA Blood Mini kitu (Qiagen, Germany) podľa pokynov výrobcu a zamrazená pri -20°C .

PCR a RFLP (Restriction fragment length polymorphism) analýza

Pre analýzu PCR sa použilo 10 μL 2x PCR Master Mix (Fermentas), 10 pmol zo špecifického (1 μL) primeru, 7 μL deionizovanej vody a 1 μL izolovanej DNA. Špecifické pri-

mery pre *Borrelia burgdorferi* s.l. boli syntetizované podľa Kurtenbacha a kol. [5]. Amplifikačné reakcie prebiehali v 35 cykloch (denat. 94°C – 30 s, anneal 55°C – 30 s, ext. 72°C – 1 min). Špecifické PCR produkty sa identifikovali v 2% agaróze, farebnej ethidiom bromide.

PCR produkty sa ďalej štiepili s MseI podľa pokynov daných výrobcom (Fermentas), bandy špecifické pre jednotlivé druhy, *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii* and *B. garinii* sa odčítali na polyakrylamidových géloch (6).

Výsledky

V štúdií bolo vyšetrených 15 klinických vzoriek (tab. 1). Spirochéty sa kultivačne potvrdili v deviatich kultúrach (z 8 kultivovaných vzoriek krvi a jednej vzorky likvoru). Spirochetálne bunky boli v primárnych kulturách zaznamenané po 4 týždňoch inkubácie.

V jednom prípade (pacient č. 4) sa borélie izolovali kultivačne zo vzorky likvoru (izolát *B. afzelii* LQ1). Prítomnosť spirochét (*B. garinii*) sa zistila aj u pacientky, roky trpiacej na sclerosis multiplex (pacient č. 11). Táto pacientka bola pohryzená kliešťom 3 týždne pred analýzou vzorky. Priamy dôkaz DNA borélií v jej krvi pomocou RFLP techniky inicioval zahájenie antibiotickej terapie.

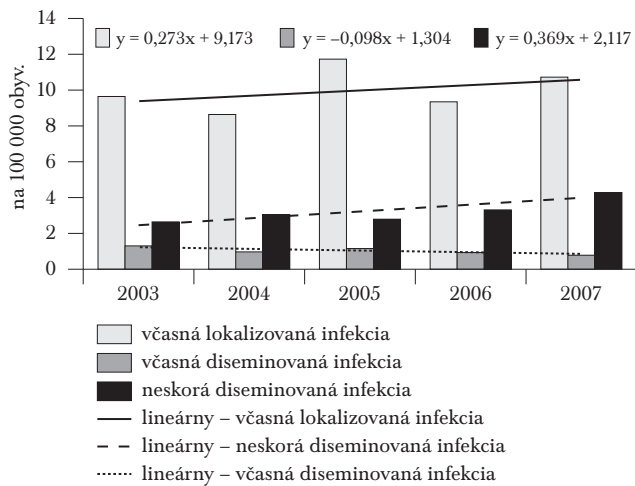
Pomocou PCR analýzy bola prítomnosť DNA borélií potvrdená v 9 vzorkách krvi a v 1 vzorke likvoru. S použitím reštrikčnej endonukleázy MseI metódou RFLP boli spirochéty v 8 prípadoch identifikované ako *Borrelia garinii*, a po jednom izoláte *B. afzelii* a *B. burgdorferi* s.s. (obr. 1). Prítomnosť borélií sa u pacienta č. 11 dokázala iba pomocou PCR analýzy.

Kazuistiky:

1) Osemročnému dievčaťu bolo odporučené vyšetrenie u neurológa pre neprivieranie viečka ľavého oka po 3 týždňoch od poštípania kliešťom. Týždeň pred vyšetrením sa objavili zväčšené krčné lymfatické uzliny. Erythema migrans (EM) nebol zaznamenaný. Neurológom bol stav hodnotený ako periférna lézia ľavého líčneho nervu. Po rehabilitácii a polyvitaminóznej liečbe nedošlo k úprave klinického stavu, preto bolo odporučené neurologické vyšetrenie v Detskej FN. Odporučená bola hospitalizácia na rehabilitačnom oddelení s nálezom paréza n. VII l. sin., lagoftalmus, mierny pokles ústneho kútika, oslabený m. frontalis, m. levator nasi. Na siedmy deň hospitalizácie pri kontrolnom neurologickom vyšetrení bola zaznamenaná úprava periférnej parézy vľavo, no začala sa rozvíjať nekompletná periférna paréza vpravo. Laboratórne hematologické a biochemické vyšetrenia nevykazovali okrem zvýšenej sedimentácie erytrocytov žiadne patologické zmeny. Serologické vyšetrenia na adenovírusy a RS vírusy boli negatívne. Vzhľadom na biparézu n. VII a neuroboreliózu bolo dieťa preložené na Klinikum infektológie a geografickej medicíny v Bratislave (KIGM), kde bola indikovaná lumbálna punkcia (LP). V likvore bola zaznamenaná prítomnosť mononukleárnej pleocytózy, EI 415/3, bielkoviny 750 mg/l a patologicky zvýšený protilátkový index AI = 9,6 potvrdzujúci intratekálnu protilátkovú produkciu. CRP negat. Séroum bolo vyšetrené v dvoch laboratóriách s pozitívnym výsledkom *Borrelia burgdorferi* v triede IgM a IgG. V jednom labo-

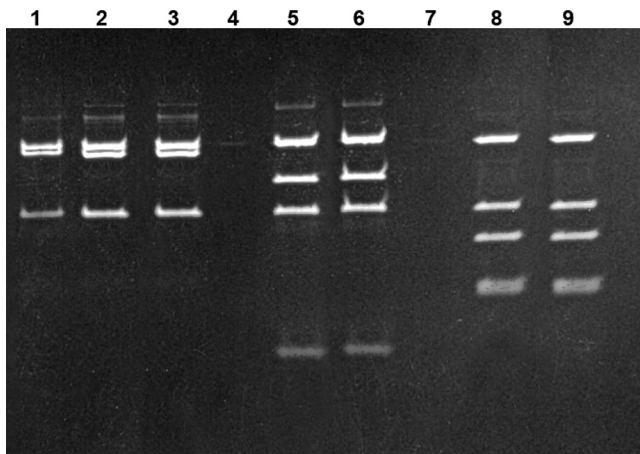
Graf 1

Trend vývoja chorobnosti na klinické štádia LB v SR v r. 2003–2007



Obr. 1

Reprezentatívne RFLP fragmenty *B. burgdorferi* s.l. z patientských izolátov: 1 – K10 (kontrolný kmeň, *B. garinii*), 2 – PK1 (*B. garinii*, patientský izolát), 3 – MJ4 (*B. garinii*, patientský izolát), 5 – VS461 (kontrolný kmeň, *B. afzelii*), 6 – LQ1 (*B. afzelii*, patientský izolát), 8 – MIL (kontrolný kmeň, *B. burgdorferi* s.s.), 9 – izolát PR3 (*B. burgdorferi* s.s., patientský izolát)



ratóriu boli namerané hodnoty IgM pozit a IgG 74 IU/ml. V ďalšom laboratóriu boli hodnoty IgM pozit. 618 abs.j. a IgG pozit 563 abs. j. Likvor IgM negat, a IgG 1 : 310. Kultivačne bola vo vzorke krvi dokázaná prítomnosť *Borrelia garinii*, potvrdená analýzou RFLP. Na základe anamnézy, klinického priebehu a laboratórných výsledkov bol stav hodnotený ako neuroborelióza a dieťaťu bola indikovaná antibiotická liečba i.v. Ceftriaxonom 1 g po dobu 28 dní. Pacientka bola na 29. deň hospitalizácie po úprave klinického stavu, fyzikálneho a likvorologického obrazu prepustená do ambulantnej starostlivosti.

- 2) Desafročnému chlapcovi bol extirpovaný nacicany kliešť na krku. Na štvrtý deň od extirpácie sa objavil erytém s centrálnym výbledom, ktorý spontánne vymizol v priebehu niekoľkých dní. Na 28. deň sa objavili bolesti hlavy, krku, malátnosť. Pediatrom bol ordinovaný myorelaxans. Na 30. deň sa pridružili teploty do 39 st.C, intenzívne bolesti hlavy a opakované zvracanie. Následne bol odporučený na oddelenie KIGM s podozrením na meningitídu. V lumbálnom punktáte bola zaznamenaná prítomnosť mononukleárnej pleocytózy, El 1072/3, Mono 1040/3, poly 32/3, Bielkoviny 368 mg/l, gluk. Kvocient 0,59, spektrofotometria v norme, CRP negat. Likvor a sérum bolo v diagnostickom laboratóriu vyšetrené metódou ELISA. Likvor bol v triedach IgM a IgG negatívny. V sére bola zaznamenaná hraničná hodnota *Borrelia burgdorferi* IgM 0,381 a IgG negat. Z krvi pacienta bola vykultivovaná *B. garinii* potvrdená analýzou RFLP. Na základe anamnézy, prítomného EM a seróznej meningitídy, ako aj výsledkov priamej laboratórnej diagnostiky bol stav hodnotený ako neuroborelióza. Dieťaťu bol indikovaný i.v. Ceftriaxonom 1 g po dobu 28 dní. Dieťa bolo v dobrom stave prepustené do ambulantnej starostlivosti.
- 3) Štrnásťročná dievča bolo na oddelenie KIGM prijaté pre diferenciálnu diagnostiku lymeskej boreliózy. V anamnéze spred dvoch rokov v lete mala prisatého kliešťa, EM nepozorovala. Po troch mesiacoch od infikovania kliešťom sa objavilo pískanie v pravom uchu, ktoré trvalo asi dva týždne, na čo sa objavila asymetria tváre. Pacientka bola hospitalizovaná na infekčnej klinike a prepustená s diagnózou inkompletná periférna lézia n. VII. dx. A areflexia vestibulárneho aparátu I. dx. Dodatočne bolo zrealizované MRI mozgu, ktoré ukázalo demyelinizačné zmeny, pre ktoré bola hospitalizovaná na neurologickom oddelení s potvrdenou diagnózou susp. Sclerosis multiplex. Počas hospitalizácie biochemické a hematologické vyšetrenia boli v medziach normy. Vyšetrenie séra pri prijatí metódou ELISA na *Borrelia burgdorferi* IgM: hraničné hodnoty. a IgG negat. Vyšetrenie likvoru bolo negatívne. Prítomnosť *B. garinii* bola vo vzorke krvi potvrdená špecifickou kultivačnou metódou a následne potvrdená RFLP metódou. V kultúre spirochét bola pomocou elektrónovej mikroskopie zistená prítomnosť cystických útvarov. Pacientke bola indikovaná i.v. terapia Cefalosporinom 3. generácie (Ceftriaxon) po dobu 28 dní a v dobrom stave bola prepustená domov.

Diskusia

U pacientov s včasnou diseminovanou formou lymeskej boreliózy. sa analyzovali vzorky krvi a likvoru. Prítomnosť

troch druhov *Borrelia burgdorferi* s.l. (*B. garinii*, *B. afzelii* a *B. burgdorferi* s.s.) sa pomocou PCR analýzy dokázala v deviatich vzorkách krvi a jednej vzorke likvoru (67 %). Kultivačne sa spirochetálne bunky izolovali v deviatich kultúrach (v 8 vzorkách krvi a jednej vzorke likvoru). Sedem pacientov (47 %) malo v kazuistike uvedené negatívne serologické výsledky v ELISA testoch. V jednej vzorke likvoru sa dokázala prítomnosť *B. afzelii*, (izolát LQ1).

V podmienkach SR je lymeska borelióza na prvom mieste v štatistických údajoch o nákazách prenášaných kliešťami. Z databázy informačného systému prenosných ochorení (2) vyplýva, že v priebehu prvých 10 rokov sledovania bola priemerná chorobnosť LB na Slovensku 8,06/100 000 obyvateľov, zatiaľ čo za posledných 10 rokov sa priemer chorobnosti zvýšil na 12,81/100 000 obyvateľov. Oproti päťročnému priemeru bol zaznamenaný až 20% vzostup ochorení. Z klinických foriem LB prevažuje za desaťročné obdobie v 74 % diagnóza A 69.2 (štádium včasnej lokalizovanej infekcie LB, kožná forma – erythema migrans – EM), diagnózy G63.0 (štádium včasnej diseminovanej infekcie, predovšetkým neurologická forma ochorenia) sa vyskytujú v 6 % a diagnóza M01.2 (neskoré diseminované štádium LB – ACA, kĺbna forma) v 20 %. Pri analýze trendu vývoja chorobnosti u jednotlivých klinických štádií hlásených prípadov ochorení na LB v SR v rokoch 2003–2007 bol zaznamenaný stúpajúci trend u včasného lokalizovaného štádia (priemerná chorobnosť 9,99/100 000 obyv.) a výraznejší stúpajúci trend chorobnosti v neskorom diseminovanom štádiu infekcie (priemerná chorobnosť 3,22/100 000 obyv.) Priemerná chorobnosť na LB vo včasnom diseminovanom štádiu bola 1,01/100 000 obyv.a bol zaznamenaný mierny klesajúci trend chorobnosti počas sledovaného obdobia (graf 1).

Špecifická diagnostika môže pomôcť zdokonaľiť prognózu ochorenia najmä v sporných prípadoch alebo pri negatívnych výsledkoch, dosiahnutých bežne využívanými serologickými vyšetreniami [9]. Získané výsledky sa však musia interpretovať v kontexte s epidemiologickou anamnézou a klinickým nálezom. Priamy dôkaz (in vitro kultivácia, PCR) *Borrelia burgdorferi*, ako aj ďalších patogénov prenosných kliešťami v telových tekutinách pacientov a živočíchov je z hľadiska diagnostiky veľmi dôležitý. Umožňuje potvrdiť infekciu v organizme v prípade, keď imunologické ani ostatné reakcie makroorganizmu tento stav jednoznačne nepotvrdzujú [8]. Taktiež upozorní na prítomnosť iných kliešťami prenosných patogénov v tele pacienta.

Výskum bol finančne podporený grantami VEGA 2/6151/27, VEGA 2/0016/08 a 2007/11-SZU-07 (MZSR).

Literatúra

- Demaerschalc I, Benmessaoud A, De Kesel M, Hoyois B, Lobet Y, Hoet P, Bigaignon G, Bollen A, Godfroid E. Simultaneous presence of different *Borrelia burgdorferi* genospecies in biological fluids of Lyme disease patients. *J Clin Microbiol* 1995;33:602–608.
- EPIS: <http://www.epis.sk>
- Hovind-Hougen K. Ultrastructure of spirochetes isolated from *Ixodes ricinus* and *Ixodes dammini*. *Yale J Biol Med* 1984;57:543–548.
- Kmety E, Řeháček J, Výrosteková V. Investigations of ticks for the presence of *Borrelia* in Czechoslovakia. *Zentralbl. Bakteriol Mikrobiol Hyg.* 1987;263:468–70.
- Kurtenbach K, Peacey M, Rijpkema SG, Hoodless AN, Nuttall PA, Randolph SE.

- Differential transmission of the genospecies of *Borrelia burgdorferi* sensu lato by game birds and small rodents in England. *Appl Environ Microbiol* 1998;64:1169–1174.
6. Postic D, Assous MV, Grimont PD, Baranton G. Diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato evidenced by restriction fragment length polymorphism of *rrf* (5S)-*rrl* (23S) intergenic spacer amplicons. *Internat J Syst Bacteriol* 1994;44:743–753.
 7. Ružić-Sabjić E. Microbiological diagnosis of Lyme borreliosis. *Acta Dermatovenerol* 2001;APA:4:1–7.
 8. Schwarzová K, Čížnár I. Combined infection of *Ixodes ricinus* with three *Borrelia burgdorferi* sensu lato genotypes. *Folia Microbiol* 2004;49:297–300.
 9. Schwarzová K, Holečková K, Dolánová R. Izolácia *Borrelia burgdorferi* sensu lato od pacientov s Lymeskou boreliózou. *Klin mikrobiol inf lék* 2001;7(7–8):203–207
 10. Strle F, Ružić-Sabjić E, Cimperman J, Maraspin V, Lotrič-Furlan S. Isolation of *Borrelia burgdorferi* from normal cerebrospinal fluid in seronegative patients with erythema migrans and peripheral facial palsy. *Ann Rheum Dis* 1993;52:411.