

**I.Neurologická klinika UN a LFUK
pracovisko Staré Mesto, Bratislava
prednosta Prof. MUDr. Peter Turčáni, PhD**

**Genotypizácia *B. burgdorferi* u pacientov s lymskou
boreliózou v korelácii s klinickým obrazom**

Dizertačná práca

Študijný program : externá forma
Študijný odbor : číslo: 7.1.11, názov: neurológia
Školiace pracovisko : I. Neurologická klinika UN a LFUK Bratislava
Školiteľ : Doc. MUDr. Jaroslav Pancák, PhD
Konzultant : Doc. MUDr. Sylvia Bazovská, CSc

BRATISLAVA, 2011

MUDr. Judita Ďurovská

Pod'akovanie

Vyslovujem úprimné pod'akovanie Prof. MUDr. P. Turčanimu, PhD, prednostovi I. Neurologickej kliniky UN a LFUK v Bratislave a Prof.MUDr.P.Traubnerovi, PhD, za možnosť venovať sa tejto problematike.

Zároveň by som chcela pod'akovať Doc. MUDr. S. Bazovskej, CSc, z Ústavu epidemiológie LFUK v Bratislave, za cenné rady pri písaní mojej dizertačnej práce, ako aj svojmu školiteľovi Doc.MUDr. J. Pancákovi, PhD za pripomienky, rady a podporu.

Judita Ďurovská

Abstrakt

Úvod: Lymfická choroba (borelióza) je multisystémové infekčné ochorenie postihujúce najčastejšie kožu, kĺby, srdce a nervový systém. Etiologickým agensom je baktéria - spirochéta *Borrelia burgdorferi* sensu lato (*B. burgdorferi* s.l.), pričom v Európe dominujú druhy *Borrelia afzelii* (*B. afzelii*) vyvolávajúca najmä kožné prejavy a *Borrelia garinii* (*B. garinii*), ktorá sa manifestuje najčastejšie neurologickými prejavmi, menej často *Borrelia burgdorferi* s.s. (*B. burgdorferi* s.s.). Neexistuje však klinický obraz, ktorý by bol pre boreliózu patognomický. Diagnóza sa stanovuje na podklade epidemiologickej anamnézy, klinického obrazu a výsledkov pomocných vyšetrení (Bojar, 1996).

Ciele práce: Vzhľadom na problémy so stanovením diagnózy u týchto pacientov sme sa zamerali na zlepšenie diagnostiky rozšírením laboratórnych vyšetrovacích metód, aj za použitia genetických metód a s overovaním ich významu. Cieľom našej práce bolo zhodnotiť:

- využitie konfirmačného testu-westernblotu a imunologického vyšetrenia pre stanovenie diagnózy ochorenia u pacientov s dlhotrvajúcimi ťažkosťami a s podozrením na lymfickú boreliózu,
- prínos imunomodulačnej liečby a ďalších postupov v terapii diseminovanej formy lymfickej boreliózy,
- využitie PCR diagnostiky u pacientov s podozrením na neuroboreliózu a identifikácia jednotlivých genomospecies *B. burgdorferi* a ich vzťah ku klinickému ochoreniu.

Materiál a metódy: Celkovo sme vyšetřovali 238 pacientov s podozrením na lymfickú boreliózu. Klinická diagnóza bola založená na epidemiologickej anamnéze a klinickej symptomatológii (Blanck a spol., 2007, Stanek a spol., 2011) a pri stanovení konečnej diagnózy sme sa opierali o kritériá EUALB (2011). Pacienti boli rozdelení do 3 skupín:

1. skupinu tvorilo 77 pacientov (M:40 a Ž:37), kde sme overovali prínos konfirmačného testu-westernblotu a imunologického vyšetřenia pre stanovenie diagnózy lymfickej boreliózy.
2. skupinu tvorilo 179 pacientov (M:88 a Ž:91), kde sme overovali možné ďalšie postupy v terapii diseminovanej formy LB, s využitím imunomodulačnej liečby.
3. skupinu tvorilo 82 pacientov (M:39 a Ž:43), kde sme overovali význam PCR diagnostiky a stanovenie genomospecies *Borrelia burgdorferi* s.l. vo vzťahu ku klinickej diagnóze.

Výsledky a závery: Lymfická borelióza prebieha veľa krát nepoznane, subklinicky alebo s miernymi klinickými príznakmi a laboratórna diagnostika naráža na mnohé problémy vzhľadom na jej nedostatočnú špecifickosť a senzitivitu.

1. U pacientov s dlhotrvajúcimi ťažkosťami, kde klinický stav poukazoval na možnosť chronickej formy lymfickej boreliózy, sa u 32 z 77 pacientov pri negatívnych výsledkoch IFT a ELISA na prítomnosť antiboreliových protilátok v sére, zistila prítomnosť špecifických protilátok pri vyšetření westerblotom. To poukazuje na potrebu u takýchto pacientov doplniť vyšetřenie:
 - imunologickými testami, kde sme u všetkých 32 pacientov potvrdili imunodeficienciu a
 - protilátok westerblotom (WB), ktorý je senzitivnejší, a ktorý napriek negatívnym skríningovým testom potvrdil prítomnosť špecifických protilátok.
2. V skupine 179 pacientov s diseminovanou formou lymfickej boreliózy sa pri terapii ukázalo, že je vhodné podávať popri dlhšej antibiotickej terapii s využitím antibiotík, ktoré sú účinné aj na cystické formy borelií, aj imunomodulačnú liečbu, po ktorej sme zaznamenali zlepšenie klinického nálezu.
3. V rámci využitia PCR metód sme u skupiny 82 pacientov s podozrením na neuroboreliózu vyšetřovali likvor, u pacientov s diagnostikovanou neuroboreliózou bol v 17 prípadoch pozitívny. Ale pozitívita sa zistila aj u 4 pacientov s demyelinizačným ochorením (v.s. sclerosis multiplex). Najčastejším pôvodcom neuroboreliózy bola *B. garinii*, potom *B. afzelii* a *B. burgdorferi* s.s., čo podporuje doterajšie údaje o vzťahu *B. garinii* k neurologickým ochoreniam.

Laboratórna diagnostika lymfickej boreliózy naráža stále na množstvo problémov. Zlepšenie laboratórnej diagnostiky, ktorá by umožňovala odlišenie protilátok pretrvávajúcich po prekonanej infekcii od protilátok pri aktívnej infekcii je stále otázkou výskumu. K bližšiemu objasneniu vzťahu *B. burgdorferi* a vzniku invazívnych ochorení by boli potrebné ďalšie detailnejšie štúdie, ktoré by mohli objasniť, ktoré genotypy sa podieľajú na týchto ochoreniach a či práve kombinácia genotypov môže skorej viesť k diseminovanému ochoreniu u ľudí. Je na základnom výskume, aby sa objasnili niektoré vlastnosti *B. burgdorferi* a predovšetkým vzťah jednotlivých genotypov k ochoreniam u ľudí, čo vyžaduje bližšiu spoluprácu medzi pracovníkmi zaoberajúcimi sa enviromentálnou a mikrobiálnou ekológiou a pracovníkmi vo výskume v oblasti humánnej medicíny.

Kľúčové slová: *B. burgdorferi*, genotypizácia, lymfická borelióza, neuroborelióza

Abstract

Introduction: Lyme disease (borreliosis) is a multisystem infectious disease affecting mostly skin, joints, heart and nervous system. Causative agent is a bacterium - spirochete *Borrelia burgdorferi* sensu lato (*B. burgdorferi* s.l.), while Europe is dominated by species *Borrelia afzelii* (*B. afzelii*) which induces mainly skin manifestations and *Borrelia garinii* (*B. garinii*), which is manifested mostly through neurological symptoms and, less often *Borrelia burgdorferi* s.s. (*B. burgdorferi* s.s.). However, there is not a clinical picture that is pathognomic for borreliosis. Diagnosis is determined on the basis of epidemiological history, clinical picture and results of ancillary tests (Bojar, 1996).

Aim of the study: Due to problems with the diagnosis in these patients, we focused on improving diagnosis by enhancing laboratory investigative techniques, and using genetic methods and verification of their importance. The aim of our study was to evaluate:

- Use of confirmatory test-westernblot and immunological tests for diagnosis of disease in patients with long-standing difficulties with suspected Lyme disease,
- Benefits of immunomodulatory therapy and other procedures in the treatment of disseminated forms of Lyme borreliosis,
- the use of PCR diagnosis in patients with suspected neuroborreliosis and identification of genospecies *B. burgdorferi*, and their relationship to clinical disease.

Material and Methods: Overall, we investigated 238 patients with suspected Lyme disease. Clinical diagnosis was based on clinical and epidemiological history of symptomatology (Blanck et al., 2007, Stanek et al., 2011) and when the final diagnosis, we rely on the criteria EUCALB (2011).

Patients were divided into 3 groups:

First group consisted of 77 patients (M: F 40 and: 37), where we verified the benefits of confirmation westernblot test and immunological tests for diagnosis of Lyme disease. Second group consisted of 179 patients (M: F 88 and 91) where we can verified other procedures in the treatment of disseminated forms of LB using immunomodulatory therapy. Third group consisted of 82 patients (M: 39 and Z 43), where we verified the importance of PCR diagnosis and determination of genospecies *Borrelia burgdorferi* s.l. in relation to clinical diagnosis.

Results and conclusions: Lyme disease is being often manifested by unknown, subclinical or mild clinical signs and laboratory diagnosis raises many problems because of its lack of specificity and sensitivity.

1. In patients with long-lasting difficulties, the clinical condition referred to the possibility of chronic forms of Lyme borreliosis, in 32 of the 77 patients with negative results of the IFT and ELISA for the presence of antiborelial antibodies in serum, specific antibodies using westernblot test were detected. This highlights the need for complete evaluation of such patients:
 - by the means of immunological tests, where we in all 32 patients confirmed immunodeficiency and
 - by the means of Westerblot antibodies test (WB), which is more sensitive, and despite negative screening tests it confirmed the presence of specific antibodies.
2. Among 179 patients with disseminated form of Lyme disease, the therapy has shown that it is more appropriate to use in addition to prolonged antibiotic therapy using antibiotics that are effective also on cystic forms of *Borrelia*, to use an immunomodulatory treatment, after which we have seen improvement in clinical findings.
3. When we were using PCR methods and testing CSF in a group of 82 patients with suspected neuroborreliosis it was positive in 17 cases which were diagnosed with neuroborreliosis. But positivity was also found 4 patients with demyelinating disease (multiple sclerosis vs). The most common agent of neuroborreliosis was *B. garinii*, then *B. afzelii* and *B. burgdorferi* s.s., which supports the existing data on *relationship B. garinii* in neurological diseases.

Laboratory diagnosis of Lyme disease still faces many problems. Improved laboratory diagnostics, allowing differentiation of persistent antibodies after infection from prevalent antibodies in active infections is still a question of research. For further clarification of relationship of *B. burgdorferi* and the emergence of invasive diseases should be further studied that could clarify which genotypes are involved in these diseases and whether the combination of genotypes may lead to early disseminated disease in humans. It is on the basic research to clarify some properties of *B. burgdorferi* and in particular the relationship of individual genotypes to diseases in humans, which requires closer cooperation among workers dealing with environmental and microbial ecology and research workers in the field of human medicine.

Keywords: *B. burgdorferi*, genotyping, lyme disease, neuroborreliosis

OBSAH

	str.
Abstrakt.....	3
Abstract.....	4
Zoznam tabuliek	6
Zoznam obrázkov	7
Zoznam použitých skratiek.....	8
1. Úvod	9
2. Pôvodca.....	11
2.1 Základná charakteristika <i>B. burgdorferi</i>	11
2.2. Forma cysty ako mechanizmus prežitia.....	13
3. Prenos.....	18
3.1. Základná charakteristika prenosu a životný cyklus kliešťov	18
3.2. Iné spôsoby prenosu	23
4. Klinická diagnostika	24
4.1. Klinické prejavy	24
4.2. Včasná lokalizovaná lymská borelióza	24
4.3. Včasná diseminovaná lymská borelióza	26
4.4. Neskorá lymská borelióza	26
5. Laboratórna diagnostika	31
5.1. Ne-mikrobiologická diagnostika	31
5.2. Mikrobiologická diagnostika	32
5.2.1. Priamy dôkaz.....	32
5.2.2. Nepriamy dôkaz- serologické testy	34
5.2.3. Senzitivita a špecificita serologických vyšetrení.....	36
6. Doporučené diagnostické postupy	38
7. Patofyziológia	41
8. Terapia Lymskej boreliózy.....	44
8.1. Niektoré doporučované terapeutické postupy pri jednotlivých štádiách LB.....	44
8.2. Prehľad antibiotickej a chemoterapeutickej liečby	46
8.3. Alternatívne spôsoby liečby	48
9. Ciele dizertačnej práce	49
10. Materiál a metódy	50
11. Výsledky.....	53
12. Diskusia	82
13. Závery	86
14. Zoznam použitej literatúry.....	87

Zoznam tabuliek

Tabuľky:

Tab.č.1:	Kliešť ako vektor niektorých chorôb človeka a zvieratstr. 19
Tab.č.2:	Diagnostické postupy..... str. 39
Tab.č.3:	Patients with false negative screening tests for presence of antibodies against antigen <i>B.burgdorferi</i>str. 54
Tab.č.4:	Výsledky vyšetrení pacientov I. skupinystr. 57
Tab.č.5:	Výsledky vyšetrení pacientov II. skupinystr. 58
Tab.č.6:	Výsledky vyšetrení pacientov III. skupinystr. 58
Tab.č.7:	Antibiotiká tetracyklínovej a penicilínovej rady – včasná fázastr. 61
Tab.č.8:	Antibiotiká penicilínovej rady – včasná diseminovaná formastr.62
Tab.č.9:	Makrolidy - včasná diseminovaná formastr. 62
Tab.č.10:	Antiparazitiká - včasná aj chronická diseminovaná formastr.62
Tab.č.11:	Chemoterapeutiká - včasná aj chronická diseminovaná formastr.62
Tab.č.12:	Ansamycínové antibiotiká - včasná aj chronická disem. formastr.62
Tab.č.13:	Aminoglykozidy - včasná aj chronická diseminovaná formastr.62
Tab.č.14:	Hypolipidemiká - chronická diseminovaná formastr.62
Tab.č.15:	Antimykotiká - včasná aj chronická diseminovaná formastr.62
Tab.č.16:	Imunologická liečba - chronická diseminovaná formastr.62
Tab.č.17:	Alternatívne spôsoby liečbystr.62
Tab.č.18:	Výsledkystr.63
Tab.č.19:	Charakteristika diagnostického testustr.67
Tab.č.20:	Vyhodnotenie výsledkov anlyzy kontrolných reakciístr.67
Tab.č.21:	Prevalence of <i>Borrelia burgdorferi</i> s.l. in <i>Ixodes ricinus</i> ticks from two areas in Slovakiastr.78
Tab.č.22:	Distribution of <i>Borrelia burgdorferi</i> s.l. genospecies in <i>Ixodes ricinus</i> ticks from two areas in Slovakia including co-infections, in Bratislava district 17 borrelial infections could not be typed to the species.str.79
Tab.č.23:	Detection of <i>Borrelia burgdorferi</i> s.l. by polymerase chain reaction in CSF in patients with suspected Lyme borreliosis..str.79
Tab.č.24:	Distribution of genospecies <i>Borrelia burgdorferi</i> in CSF in patients with suspected Lyme borreliosisstr.79

Zoznam obrázkov

Obrázky

Obr. č.1: Zhluk borelií	str. 11
Obr. č.2: Cysta <i>T. macrodentium</i> a v nej zbalené spirochéty.....	str. 14
Obr. č.3: Sféroblast.....	str. 15
Obr. č.4: <i>B. burgdorferi</i> - vyvíjajúce sa spirochéty vychádzajúce z cysty	str. 15
Obr.č.5: <i>B. burgdorferi</i> - po inkubácii ceftriaxonom	str. 17
Obr. č.6: <i>Ixodes ricinus</i>	str. 18
Obr. č.7: Životný cyklus <i>Ixodes ricinus</i>	str. 20
Obr. č.8: Vývin nymfy na dospelého jedinca	str. 21
Obr. č.9: Erythema chronicum migrans.....	str. 25
Obr. č.10: Acrodermatitis chronica atrophicans.....	str.28

Zoznam použitých skratiek

ACA	acrodermatitis chronica atrophicans
ATB	antibiotikum
BBK32	spirochetálny gén
CFS	chronic fatigue syndróm
CNS	centrálny nervový systém
CRP	C reaktívny proteín
CRASPs	komplement regulujúci povrchový proteín
CXCL13	chemokin C-X-C s ligandom 13 - gén, ktorý kóduje proteín
DBPA	spirochetálny gén
DNA	deoxyribonucleic acid
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EM	Erythema migrans
EUCALB	European Union Concerted Action on Lyme Borreliosis
HBOT	Hyperbaric Oxygen Treatment
HLA	human leukocyte antigens
IgG	imunoglobulín G
IgM	imunoglobulín M
ICHT	Intracelulárna hypertermická liečba
MBC	minimálna bakteriálna koncentrácia
NIF	nepriama fluorescenčná metóda
OspA,B,C	membránové proteíny
PCR	polymerázovej reťazovej reakcie
RNA	ribonucleic acid
r-RNA	ribosomal ribonucleic acid
SLE	systémový lupus erytematodus
TPIT	<i>Treponema pallidum</i> imun. Test (Nelsonov test)
TTC	Tetracyklín
VDRL	venereal disease research laboratory

1. Úvod

Lymská choroba (borelióza) je multisystémové infekčné ochorenie postihujúce najčastejšie kožu, kĺby, srdce a nervový systém. Etiologickým agensom je baktéria - spirochéta *Borrelia burgdorferi* sensu lato (*B.burgdorferi* s.l.), pričom v Európe dominujú druhy *Borrelia afzelii* (*B.afzelii*) vyvolávajúca najmä kožné prejavy a *Borrelia garinii* (*B.garinii*), ktorá sa manifestuje najčastejšie neurologickými prejavmi, menej často *Borrelia burgdorferi* s.s. (*B. burgdorferi* s.s.). Ale v Európe sa vyskytujú aj ďalšie druhy, ktoré sa spájajú i keď ojedinele s ochoreniami u ľudí, ako *B. spielmanii*, *B. valaisiana* a *B. bissettii* (Stanek a Reiter, 2011). Prenášačom ochorenia je najčastejšie kliešť *Ixodes ricinus*. Ide o pomerne novú nozologickú jednotku. Súvislosť s infekciou a konkrétnym infekčným agens sa stala známou až začiatkom 80-tych rokov (Burgdorfer a spol., 1982).

Prejavom skorej infekcie je erythema migrans - makulopapulózny erytém veľkosti asi 15 cm, ktorý sa objaví za niekoľko dní až týždňov po zaklieštení (Berger, 1989). Neskorším prejavom infekcie sú veľmi často artralgie a myalgie (Ostrov a Athreya, 1991). Komplikáciou môže byť i myokarditída alebo perikarditída. Ochorenie srdca môže byť i prvou klinickou manifestáciou (Kimball a spol., 1989). U neliečených pacientov sa môžu objaviť i prejavy postihnutia nervového systému. Udáva sa, že v Európe sú poškodenia nervového systému relatívne častejšie. U neliečených pacientov sa objavujú v 40-60% (Bojar, 1987, 1996). Izolovaná lézia tvárového nervu sa ako samostatný príznak vyskytuje u 7% pacientov s lymskou chorobou a v endemických oblastiach až u 25% (Halperin a Golightly, 1992). Popísané boli meningoencefalitídy, polyradikuloneuritídy, psychické zmeny v podobe depresí, chronického únavového syndrómu, panické ataky a podobne. Vyskytujú sa i radikulitídy, ktoré môžu imitovať vertebro - diskogénne podmienené radikulopátie (Bojar, 1987, Pachner, 1991). Neexistuje však klinický obraz, ktorý by bol pre boreliózu patognomický. Diagnóza sa stanovuje na podklade epidemiologickej anamnézy, klinického obrazu a výsledkov pomocných vyšetrení (Bojar, 1996).

V klinickej diagnostike sa štandardne vyšetrujú protilátky v sére s antigénom *B. burgdorferi* imunofluorescenčnou metódou (IF) a metódou ELISA. IgM protilátky sú detekovateľné 3 - 6 týždňov po infekcii, IgG protilátky sa tvoria asi po 6 týždňoch, vrcholia po šiestich mesiacoch a pretrvávajú dlhodobo (Bazovská, 2008).

Vzhľadom na možnosť falošne pozitívnych výsledkov sa odporúča, v prípade ich pozitivity, následná konfirmačná metóda westernblot. Využíva sa najmä pri nejasných alebo hranične pozitívnych výsledkoch základných sérologických metód. Umožňuje analýzu reakcie protilátok proti jednotlivým antigénovým proteínom borélií, čo eliminuje prípadné nešpecificky pozitívne reakcie. Vyšetrenie špecifických protilátok metódou westernblot sa vykonáva s antigénnym lyzátom, resp. s antigénmi pripravenými rekombinantnou technikou z *B. afzelii*, *B. garinii* a *B. burgdorferi* sensu stricto (Gurčík, 2009). V diagnostike sporných a nejasných prípadov a prípadného postihnutia ďalších orgánov hrá stále väčšiu rolu priamy dôkaz boréliovej DNA v krvi, v likvore a v ďalších tkanivách metódou polymerázovej reťazovej reakcie (PCR). Na detekciu boréliovej DNA v klinických vzorkách sa používajú rozličné protokoly (Aguero-Rosenfeld, 2005), ale keďže neexistuje jediný diagnostický postup, ktorý by bol „zlatým“ štandardom a tiež je málo porovnávacích štúdií, z ktorých by sme mohli vychádzať, v súčasnosti nie je možné odporučiť špecifický PCR protokol. Diagnostická senzitivita v likvore je u skorej neuroboreliózy v priemere 10-30%. Pri vyšetrení krvi metódou PCR je toto číslo ešte nižšie (Cerar, 2008) a u neskorej neuroboreliózy je senzitivita PCR extrémne nízka.

B. burgdorferi s.s., *B. garinii* a *B. afzeli*, genospecies s potvrdenou patogenitou pre človeka, nemajú jednotnú distribúciu v rámci Európy. Tento fakt by mohol súvisieť s rozdielnosťou klinickej manifestácie boreliózy v jednotlivých krajinách, keďže podľa súčasnej predstavy majú jednotlivé genospecies *B. burgdorferi* vzťah k rôznym prejavom lymskej boreliózy. Preto prebiehajú aj snahy o analýzu genómu *B. burgdorferi* s cieľom odhaliť gény zodpovedné za rozdiely vo virulencii a patogenite borélií.

Zložitá problematika pôvodcov ochorenia, problémy laborat. a klinickej diagnostiky nás viedli k hlbšiemu štúdiu tohto ochorenia.

Vo vlastnej práci sa zaoberám v samostatných kapitolách pôvodcom ochorenia, jeho prenosom, prameňom nákazy, epidemiologickými charakteristikami, klinickými prejavmi, pričom sme sa sústredili hlavne na zlepšenie diagnostiky tohto ochorenia a stanovenie genomospecies ku vzťahu ku klinickému obrazu ochorenia.

2. Pôvodca

2.1 Základná charakteristika *B.burgdorferi*

Spirochéty sú špirálovité baktérie, aktívne pohyblivé. Patria do radu **Spirochetales**, ktorý obsahuje 2 čeľade, z ktorých medicínsky významné sú tri rody ***Borrelia*, *Treponema* a *Leptospira***. Z klinicko-patologického hľadiska borélie možno rozdeliť na pôvodcov lymskej boreliózy (***Borrelia burgdorferi*** sensu lato), vyvolávateľov návratných horúčok (napr. ***Borrelia recurrentis*, *B. hermsii***) a ***Borrelia vincentii***, pôvodca ulcerácií v orofaciálnej oblasti. Pôvodca lymskej boreliózy bol objavený v r. 1982 a v súčasnosti je rozdelený do 18 genomospécies (Stanek a Reiter, 2011). Najvýznamnejšie sú ***Borrelia burgdorferi* s.s., *B. garinii* a *B. afzelii***, patogénne pre človeka, ale ochorenia boli popísané aj v súvislosti s *B. valaisiana*, ktorá bola izolovaná z likvoru pacienta v Grécku (Diza, 2004), *B. lusitaniae* z kožnej lezie u pacienta so suspektnou boreliózou v Portugalsku (Collares-Pereira, 2004) a *B. spielmanii* u pacientov s erythema migrans.

Obr.č.1. Zhluk borélií



Obrázok prevzatý z www.nature.com, nature publishing groupe, 2000

Rozdelenie *Borrelia burgdorferi* sensu lato do určitých genomospécies má aj klinický význam. *Borrelia burgdorferi* sensu stricto sa najčastejšie spája s artritídou, hlavne v Severnej Amerike, kde je to ako jediný známy pôvodca lymskej boreliózy.

Borrelia garinii je asociovaná s neurologickými symptómami a *Borrelia afzelii* s chronickými kožnými afekciami, ako napríklad acrodermatitis chronica atrophicans (ACA). Aj napriek rozdielnym klinickým manifestáciám medzi jednotlivými genomospecies, majú jedno spoločné, spôsobovanie patognomického symptómu erythema migrans (EM).

Ostatné genomospecies boli izolované z kliešťov a rezervoárových zvierat, ako *B. japonica*, *B. tanukii* a *B. turdae*, ktoré sa vyskytujú v Japonsku (Masuzawa, 2004), *B. sinica* v Číne, *B. andersonii* v USA a *B. bissettii* v USA a západnej Európe a pod. Ich identifikácia je založená na genetických metódach. Najčastejšie používanými cieľmi (terčami) pre DNA amplifikáciu, hybridizáciu a reštrikčnú polymorfnú analýzu sú r-RNA gény a medzigenómový medzerník, fla (gén kódujúci flagelin) a OspA (plazmidový gén kódujúci proteín A vonkajšej membrány) gény. Borélie sú gramnegatívne špirálovité baktérie s nepravidelnými závitmi, dobre pozorovateľné mikroskopom v tmavom poli, alebo pri fázovom kontraste. Rotácia a posun týchto baktérií je významným faktorom patogenity.

Stavba borélií zodpovedá stavbe gramnegatívnych baktérií, kde protoplazmatický valec borélií je ohraničený dvomi membránami, cytoplazmatickou membránou s tenkou vrstvou peptidoglykanu a vonkajšou membránou. Medzi vonkajšou membránou a cytoplazmatickou membránou prebiehajú z oboch strán filamentá, ktoré sprostredkujú pohyb borélie. Ide o aerofilné baktérie, ktoré sa rozmnožujú pri teplote 34 - 37 st. C, pre svoj rast potrebujú komplexné médiá. Rozmnožujú sa relatívne pomaly, celúlarne delenie trvá 12-24 hod. (Praec - Mursic a spol ., 1986).

Borélie majú veľmi zložitú antigénnu štruktúru:

- typickým morfológickým znakom *Borrelia burgdorferi* sú flagely - americké kmene majú 7-11, európske 8. Na flagelách je lokalizovaný jeden z najvýznamnejších antigénov - 41 kD, proti ktorému sa tvoria prvé protilátky pri infekcii, je prítomný aj u iných borélií, spirochét, v imunoblote sa vyskytuje ako i41 - vnútorný fragment, je relatívne stabilný a kódovaný na chromozóme
- povrchové proteíny Osp A,B,C,D, E, F,G, sú variabilné, kódované na plazmidoch. Osp A,B operon je lokalizovaný na cirkulárnom plazmide, v blízkosti génov pre guaninový metabolizmus (v čreve kliešťov vysoká koncentrácia guanínu – expresia týchto antigénov). Osp C – k expresii dochádza po prisatí kliešťa na hostiteľa, po poklese expresie OspA, zvýšenie teploty – vedie k

expresii Osp C,E,F, in vitro kultivácia vedie k strate určitých proteínov.

Osp C (21 kD) – má 13 typov 1-4 *B.burg.*, 5-7 *B.afzelii*, 9-13 *B.garinii*, protilátky sú veľmi typovo špecifické

Osp A 31 kD - 6 rozdielnych typov

Osp B 34 kD

- 17 kD vysoko imunodominantný
- 39 kD vysoko špecifický
- 60 kD, (66kD) „ shock" proteíny, krížovo reagujúce - syfilis, reumatické ochorenia

83/100 kD - vysoko špecifické, kódovanie na chromozóme

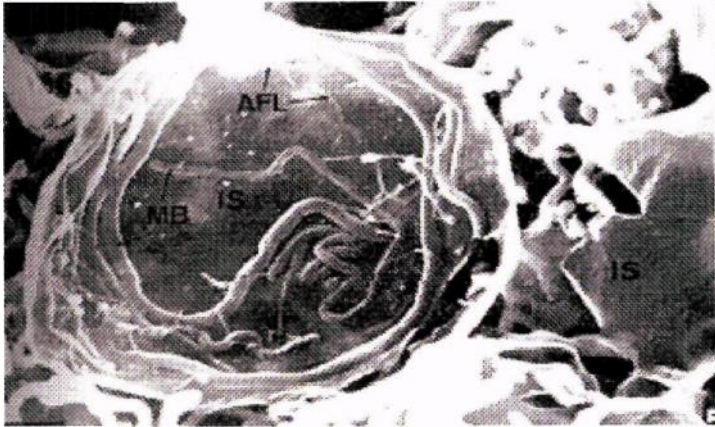
2.2. Forma cysty ako mechanizmus prežitia

V prípade nepriaznivých podmienok borélie sa doslova „zbalí" do kompaktného kľbka, pokryje sa transparentnou mukoidnou kapsulou, ktorá zabraňuje penetrácii protilátok a antibiotík. V tejto forme môže prežiť dlhé časové obdobie bez reakcie od hostiteľa.

Cystické formy spirochét (obr.č. 2) a hostiteľ spolunažívajú viac menej „mierumilovne", ale počas priaznivých podmienok sa cysty môžu pretransformovať naspäť do špirálovej formy, ktorá ničí bunky hostiteľa a vyvoláva imunitnú odpoveď (Ovcinnikov, Delectorsku, 1971).

Predpokladá sa, že tieto cysty slúžia na prežitie borélií. Podobne existencia etiologického agens spôsobujúceho syfilis v nespirochetálnej forme nebola dlho vysvetlená. Stala sa predmetom hypotéz, ktoré vysvetľovali existenciu latentného syfilisu. Preto sa uvažovalo o význame cystických foriem. Analogicky u prvokov slúži cysta na ochranu vnútra alebo obsahu voči nepriaznivým podmienkam, ale niektoré slúžia na zabezpečenie dlhej časovej periódy „oddychu". Neskôr, keď pominú nepriaznivé podmienky, ochranné cysty sa môžu stať rozmnožovacími cystami (Al-Qudah., a spol., 1983).

Obr.č.2. Cysta *T. macrodentium* a v nej zbalené spirochéty.



Umemoto T.; Namikawa I. a spol, 1982.

In "An internal view of the spherical body of *Treponema macrodentium* as revealed by scanning electron microscopy." *Microbiology & Immunology*, 26(3): 195.

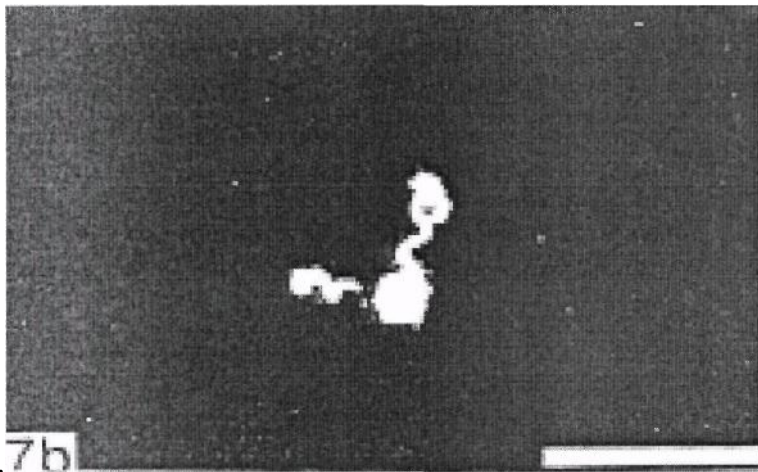
Cystické formy (taktiež nazývané sféroblasty, alebo „hladujúca forma“) a ich schopnosť premeny do normálnej motilnej spirochéty boli dokázané a demonštrované na komplexe *Borrelia burgdorferi* sensu lato (Gruntar a spol., 2001). Motilná *B. garinii* sa môže vyvinúť do cystickej formy nielen in vitro, ale taktiež in vivo po inokulácii myší cystickými formami. Demonštrovaná kapacita cýst rekonvertovať sa do motilných spirochét in vivo a ich prekvapujúca odolnosť voči nepriaznivým enviromentálnym podmienkam sugestívne poukazuje na úlohu cystických foriem u lymfnej choroby. Túto skutočnosť potvrdzuje aj práca kanadských autorov, ktorí zistili cystické formy borélií v astrocytoch mozgu u troch pacientov s potvrdenou diagnózou neuroboreliózy a tieto cysty boli totožné s cystami pozorovanými in vitro (Miklossy a spol., 2008).

Obr. č.3. Sféroblast



Obrázok prevzatý z www.radio.cbc.ca/.../shows/bacteria/willy.html,
Keynote Address - The Complexity of Vector-borne Spirochetes (*Borrelia* spp)

Obr.č. 4. *B. burgdorferi*. Vyrývajúce sa spirochéty vychádzajúce z cysty



Brorson O; Brorson SH. : A Rapid Method for Generating Cystic Forms of *Borrelia burgdorferi*, and Their Reversal to Mobile Spirochetes , *APMIS* , 106 (12) , 1999 , 1131 - 1141.

Pretrvávanie infekcie *Borrelia burgdorferi* u pacientov s aktívnou lymskou boreliózou sa vyskytuje napriek antibiotickej terapii. Atypické formy sa dokázali v

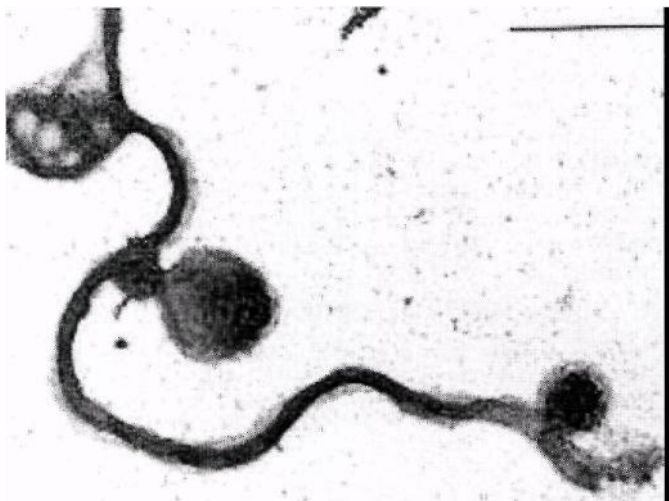
experimentoch in vitro pacientov liečených antibiotikami a u pacientov neliečených s klinickou diagnózou definitívnej a pravdepodobnej lymfatickej boreliózy. Navyše sa pozorovala degenerácia izolátov baktérie *B. burgdorferi* počas vystaveniu vplyvu Penicilínu G in vitro.

Morfologická analýza svetelným a elektrónovým mikroskopom odhalila mnoho rôznych tvarov a variácií. Zo vzoriek pacientov liečených antibiotikami sa vo vysokom percente vyvinuli atypické formy (60-80%). Morfologické variácie v kultúre s Penicilínom G sa vyvinuli postupne a ich množenie sa zväčšovalo s dĺžkou inkubácie. Pleomorfizmus (tvarová pestrosť), prítomnosť predĺžených foriem a sférických štruktúr, neschopnosť buniek sa replikovať, dlhý čas adaptácie v médiu (MKP) a mykoplazme podobným kolóniám po raste v pevnom médiu (agar) nasvedčuje, že *Borrelia burgdorferi* produkuje sféroblast - L-formu. S ohľadom na polyfázický priebeh lymfatickej boreliózy tieto formy bez bunkovej steny môžu byť možným dôvodom, prečo borélia prežije v organizme dlhý časový interval a sú dôvodom, prečo protilátkové titry založené na identifikácii antigénov bunkovej steny miznú a znovu sa objavia po reverzii (Mursic a spol., 1996).

Antibiotická terapia Penicilínom, Doxycyklinom a Ceftriaxonom sa ukázala ako efektívna liečba lymfatickej boreliózy. Avšak u niektorých pacientov sa zistilo, že borélia je schopná prežiť v tkanivách napriek zdanlivo adekvátnej terapii. Pre lepšie pochopenie tohto fenoménu sa pozorovali rôzne typy degenerácie *B. burgdorferi* počas 96 hodín po vystavení účinku antibiotík. Pomocou svetelného a elektrónového mikroskopu bolo možné pozorovať na membránach „nabobtnanie“ a postupné granulárne formácie a cystické štruktúry. Aj napriek ATB koncentráciám pri ktorých 90% organizmov bolo inhibovaných po 72 hodinách. Z toho ale 80% a viac boli motilné formy a tie pretrvávali ako vitálne pri liečbe s Penicilínom a Doxycyklinom, neboli však prítomné pri liečbe Ceftriaxonom.

Pomocou elektrónového mikroskopu sa podarilo odhaliť, že intaktné časti baktérií boli uložené hlavne v cystách, a to aj po 96 hodinách za súčasného vplyvu všetkých troch vyššie uvedených antibiotík. Z výsledkov štúdií iných spirochét môže vyplývať, že práve cystické formy spirochét môžu byť zodpovedné za pretrvávajúce antigénne stimuly vedúce ku chronickej lymfatickej borelióze (Kersten a spol., 1995).

Obr.č.5. *B.burgdorferi*: Po inkubácii Ceftriaxonom



Kersten a spol. , 1995

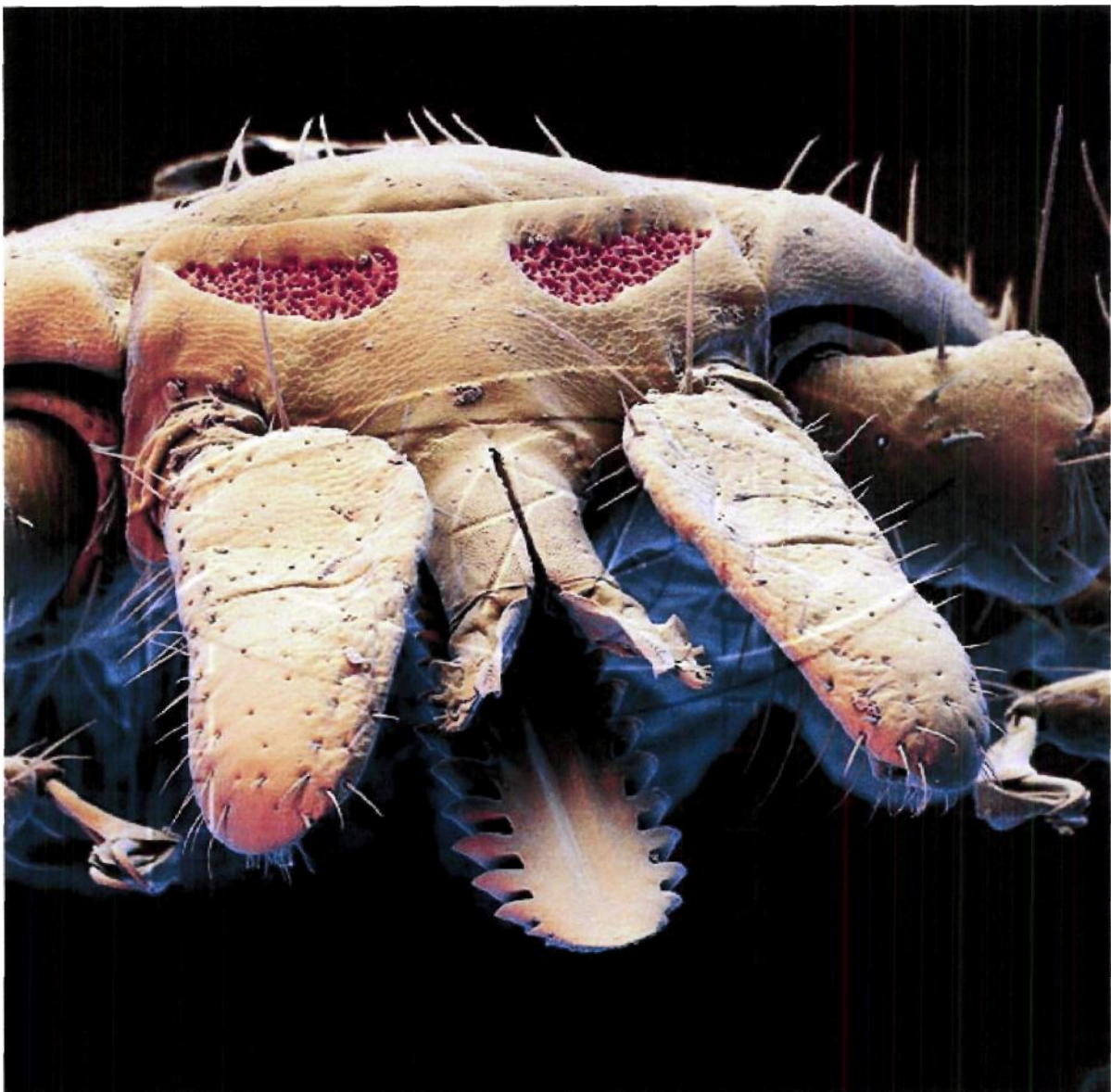
In: Antimicrobial agents and chemotherapy , 39 (5), 1127 -1133

3. Prenos

3.1 Základná charakteristika prenosu a životný cyklus kliešťov

Lymfská borelióza sa prenáša na človeka takmer výlučne cicaním infikovaných kliešťov z rodu *Ixodes*. Patria medzi kliešte s tzv. tvrdým telom, na chrbte majú štít (scutum), ktorý u samčekov pokrýva celý chrbát, samička ho má menší. Najrozšírenejší z tejto skupiny na Slovensku je kliešť obyčajný (*Ixodes ricinus*) (Obr. č. 6), ktorý môže prenášať pôvodcov viacerých nákaz (Tab. 2).

Obr. č.6. *Ixodes ricinus*



Obrázok prevzatý z www.tierarzt-auf-raedem.de, autor Dr. med. vet. Imke Rieksmeier,

V roku 1983 Burgdorfer a spol. identifikovali *Ixodes ricinus* ako prenášača novo opísanej lymskej boreliózy (Burgdorfer a Keirans, 1983). V súčasnosti sa za prenášačov lymskej boreliózy považujú štyri druhy kliešťov: *Ixodes ricinus* rozšírený v Európe a v strednej Ázii, *Ixodes persulcatus* v Ázii a *Ixodes pacificus* a *Ixodes scapularis* (*dammini*) v Severnej Amerike (Schmidt, 1985).

Tab.č.1. Kliešť ako vektor niektorých chorôb človeka a zvierat

Ochorenie	Etiologické agens	Zdroj a možný objekt	Klinické prejavy
Infekčná encefalomyelitída oviec	Virus	ovce, dobytok, kozy, tetrov, ľudia	encefalitída
Kliešťom prenášaná encephalitída	Virus	ľudia	encefalitída
Lymská borelióza	<i>Borrelia burgdorferi</i> (spiroch.bact.)	ľudia, psy, kone	multi-systémové ochorenie
Erlichioza	<i>Anaplasma (Ehrlichia) phagocytophilum</i> (rickettsia)	prežúvavce, psy, kone, ľudia	horúčka, immuno-suppresia
Kliešťová pyacmia	<i>Staphylococcus aureus</i>	jahňatá (teľatá)	kĺbne abscesy (contaminative bacteria)
Hovädzia babezioza	<i>Babesia divergens</i> (protozoa)	dobytok, ľudia	horúčka, anémia,
Myšia babezioza	<i>Babesia microti</i> (protozoa)	hlodavce, ľudia	horúčka, anémia
Rickettsiosis	<i>Rickettsia helvetica</i> (<i>rickettsia bacteria</i>)	hlodavce, ľudia	myocarditída, sarcoidoza

Spracované podľa EUCALB, 2005 (www.eucalb.com)

Miesto vhodné pre výskyt kliešťa musí zabezpečovať minimálne dve základné požiadavky. Je to dostatočná vlhkosť vzduchu, aby si kliešte dokázali udržať bilanciu vody v tele a dostatok zvieracích druhov ako hostiteľov pre tri vývojové štádiá: **larva, nymfa a dospelý jedinec** (Obr. č. 7). Kliešte sú veľmi citlivé na nedostatok vlhkosti počas hľadania hostiteľa, ktoré môže trvať niekoľko týždňov až mesiacov.

Dospelí jedinci sa úspešne živia iba na veľkých zvieratách ako napríklad jeleň, ovca, krava, pes atď. Vývojové štádiá môžu parazitovať skoro na všetkých teplokrvných zvieratách, na malých cicavcoch, ako aj na niektorých plazoch a vtákoch.

To znamená, že kliešte sa nachádzajú vhodné podmienky hlavne v listnatých

lesoch, v ktorých žijú malé aj veľké cicavce, ale môžu sa tiež vyskytovať aj v záhradách obytných domov a parkoch. Životný cyklus *Ixodes ricinus* ako dôležitého prenášača lymskej boreliózy trvá 3 roky.

Každé vývojové štádium (larva, nymfa, dospelý jedinec) trvá približne rok, ale pri zhoršených podmienkach môže tento cyklus trvať dlhšie od 2-6 rokov, pričom k zakliešteniu dochádza 1x pri každom vývojovom štádiu a to po dobu niekoľko dní (Hamilton, 1989).

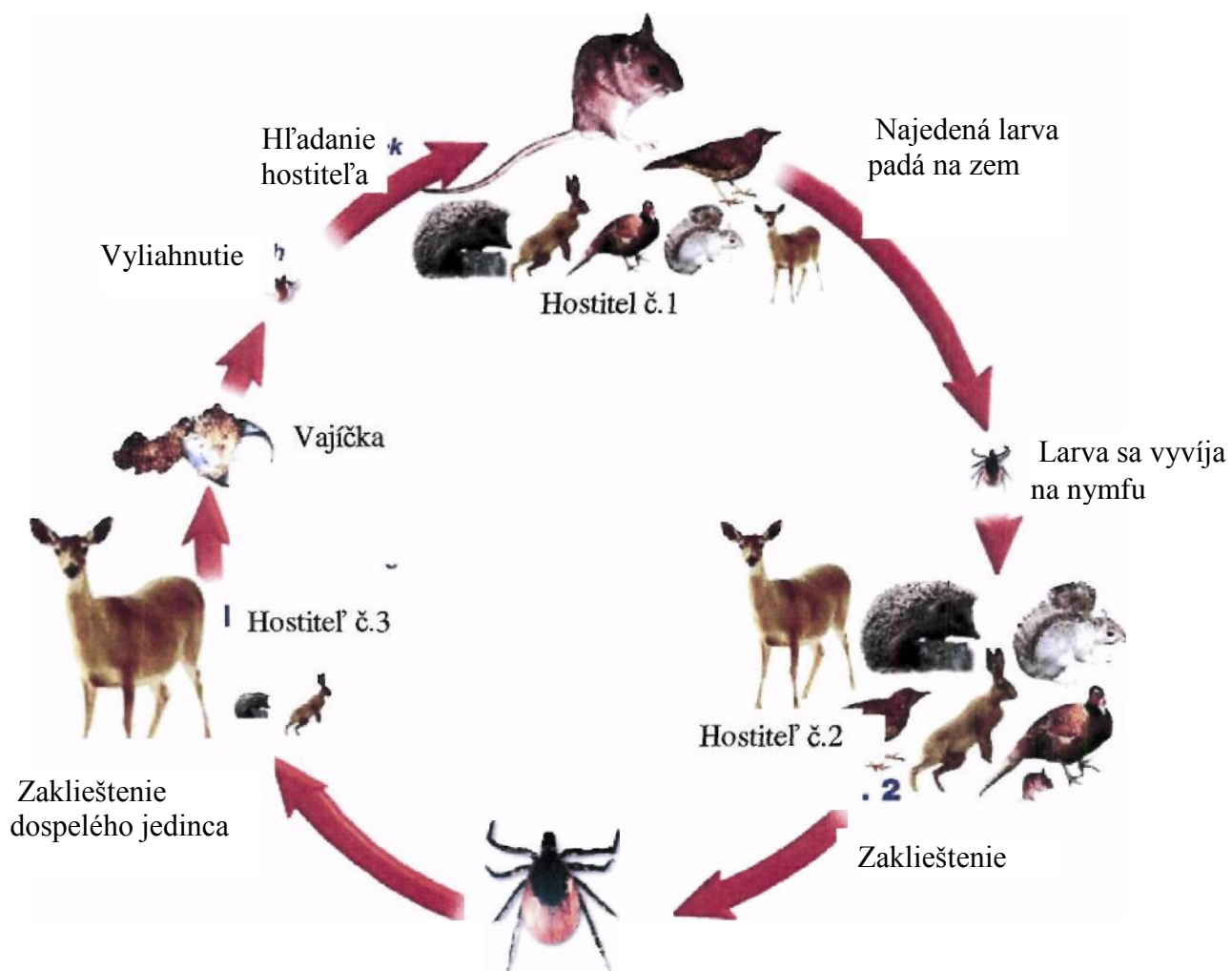
Obr.č.7. Životný cyklus *Ixodes ricinus*



Obrázok prevzatý z www.drp.univ.trieste.it/spirolab/zecche.htm, 2005

Dospelý jedinec sa nasaje krvi na veľkých zvieratách, príležitostne aj na ľuďoch. Trávenie krvi a vývoj do ďalšieho vývojového štádia sa deje počas hlbokého úkrytu vo vegetácii. Samička nakladie vajíčka okolo 2000 kusov. Z nich vzniknú za priaznivých podmienok larvy, ktoré sú ledva viditeľné voľným okom a po pár dňoch sú pripravené na prijímanie potravy. Na ďalší vývin šesťnohých lariev je potrebná krv, ktorú väčšinou získajú parazitovaním na malých hlodavcoch. Počas dvoch, troch dní sa ich hmotnosť zväčší 10-20 násobne. Z lariev sa po niekoľkých mesiacoch vyvinú osemnohé nymfy 1,5-2 milimetrové, ktoré sa väčšinou zakliešia v nasledujúcom roku na dobu 4-5 dní a práve tie môžu napadnúť človeka, ale zväčša sa živia na srstnatých zvieratách (jazvec, zajac, líška, veverica, králik...). Po nasatí krvi sa vyvinú dospelé kliešte. Všetky tri vývojové štádiá môžu parazitovať na ľuďoch, najčastejšie nymfy.

Obr.č. 8. Vývin nymfy na dospelého jedinca



Courtesy of Dr Jeremy Gray and Bernard Kaye

Obrázok prevzatý z www.oeghmp.at, EUCALB, 2011

Vo väčšine geografických lokalít je *Ixodes ricinus* aktívny od marca do októbra v dvoch subpopuláciách, pričom jedna je aktívna na jar a v skorom lete (máj - jún) a druhá menšia v neskorom lete a v jeseni (august - september). Nakoľko nenasatý kliešť môže prežiť niekoľko týždňov v lokalitách s dostatočnou vlhkosťou, prenos choroby môže nastať i počas teplejších mesiacov v roku. Najdôležitejším faktorom stimulujúcim vývoj sa zdá byť dĺžka dňa, avšak teplota prostredia môže mať pozmeňujúci vplyv. Sezónnosť kliešťa determinuje sezónnosť ochorenia na lymskú boreliózu.

Borélie u nenasatých kliešťov sa nachádzajú v tráviacom trakte. Počas zaklieštenia sa presúvajú do slín a z nich sa dostávajú do krvného obehu hostiteľa. Proces migrácie z tráviaceho traktu do slinných žliaz trvá 1-3 dni, čo vysvetľuje fakt, že transmisia na hostiteľa nastáva až po prvých 24 hodinách (Piesman a kol., 1987), avšak u časti populácie kliešťov (hlavne u *Ixodes persulcatus*) boli nájdené borélie v slinných žľazách už aj pred zaklieštením, čo vysvetľuje prípady nakazenia sa kliešťom, ktorý bol odstránený po niekoľkých hodinách. K prenosu môže dôjsť aj nesprávnou manipuláciou pri odstránení kliešťa, kedy dochádza k regurgitácii, resp. k infekcii rany obsahom čreva.

Nakoľko sa kliešte zakliešťa iba raz v každom vývojovom štádiu, infekciu kliešť väčšinou získa v jednom štádiu (napr. štádium larvy). V tomto vývojovom štádiu sa väčšinou nakazí na hostiteľovi, ktorý je rezervoárom infekcie a infekcia sa prenáša na ďalšie vývojové štádiách, tzv. transštádiálny prenos. V prípade *Ixodes ricinus* nymfy sú považované za najinfekčnejšie, nakoľko sú početnejšie ako dospelí jedinci a majú väčšiu tendenciu zaklieštiť človeka. V niektorých lokalitách 80% zaklieštení je spôsobené nymfami. Pravdepodobnosť prehliadnutia nymfy pri zaklieštení je vzhľadom na jej rozmer podstatne väčšia ako pri dospelých jedincov. Percento infikovaných nýmfm môže byť až 50%, ale vo väčšine prípadov sa pohybuje od 10-30%. Larvy sú zriedkavo infikované (pod 5%), z čoho vyplýva, že transovariálny prenos je zriedkavý. Aj napriek tomu larvy môžu mať úlohu pri zachovávaní cirkulácie borélií v prírode infikovaním rezervoárových hostiteľov, ako napr. hlodavce.

3.2 Iné spôsoby prenosu

Úloha bodavého hmyzu v prenose nákazy nie je jasná, predpokladá sa že ide o mechanický prenos infekcie. V roku 1997 Altaie a spol. prezentovali na 10-tej výročnej medzinárodnej vedeckej konferencii o lymfkej chorobe a iných kliešťom prenášaných ochorení transplacentárny prenos *B. burgdorferi* v experimentoch na myšiach.

Kongenitálne infekcie *B. burgdorferi* boli popísané v literatúre u troch novorodencov, ktorých matky mali boreliózu počas prvého trimestra tehotenstva (Schlesinger a spol. 1985). U žien, ktoré počas gravidity prekonali erythema migrans a boli liečené antibiotikami sa poškodenie plodu nepozorovalo (Hercogová a spol. 1993). Epidemiologické štúdie v endemických oblastiach (Gerber a Zalaneraitis, 1994) nepotvrdili transplacentárny prenos infekcie u človeka ani výskyt kongenitálnych poškodení. Doterajšie skúsenosti a údaje z literatúry poukazujú na to, že pri infekcii *B. burgdorferi* u gravidných žien môže dôjsť k transplacentárnemu prenosu a k infekcii fetálneho tkaniva, ale kongenitálne poškodenie plodu nebolo dokázané (Bazovská, 1997). Z praktického hľadiska je u gravidných žien dôležitá včasná a adekvátna terapia ochorenia.

4. Klinická diagnostika

4.1. Klinické prejavy

Diagnóza lymskej boreliózy je primárne založená na epidemiologickej anamnéze a klinickej symptomatológii. Je sťažená heterogenitou klinických prejavov a ich prekrývaním. Typický klinický obraz je len u časti chorých a to najmä pri kožných formách. Preto pri konečnej diagnóze hrá veľmi dôležitú úlohu laboratórna diagnostika.

Infekcia spôsobená *Borrelia burgdorferi* môže byť subklinická, alebo máviacero klinických manifestácií, v závislosti od časovej dĺžky infekcie a **orgánovo/systémového** postihnutia. Ak nedochádza k liečeniu infekcie, u pacientov dochádza k skorým manifestáciám choroby, ale môžu sa aj bez týchto príznakov objaviť s časovým odstupom príznaky poukazujúce na pokročilejšie štádiá. Táto práca nemá ambíciu popísať všetky klinické formy, ktoré sú mimoriadne variabilné, čo vyplýva už z podstaty choroby. Bolo zvykom deliť klinický obraz a klinický priebeh na 3 štádiá. Niektorí však zvyknú deliť manifestácie lymskej boreliózy na 2 štádiá : na tzv. včasné a chronické (neskoré disseminované) štádium. Včasné sa podľa takejto klasifikácie delí na tzv. lokalizované a disseminované včasné štádium (Bartúnek, 1996).

4.2. Včasná lokalizovaná lymská borelióza

- niekoľko dní až mesiac po poštípaní

Erythema migrans (EM)

Erythema migrans sa prejavuje charakteristickým sčervenaním kože a s periférnym šírením sa až do veľkosti 15-75 cm v priemere obyčajne s vyblednutím centrálnej časti a vyvýšeným lemom. Migrujúci okraj je typický a ložisko sa môže rozrásť do veľkých rozmerov, postihujúcich napr. celú gluteálnu oblasť až s postihnutím dolnej končatiny. Typicky sa objaví po 2 až 30 dňoch po zaklieštení a je to priamym dôsledkom invázie spirochét migrujúcich cez kožu. Veľmi skoré začervenanie môže byť spôsobené reakciou na zaklieštenie prípadne spôsobené akútnou bakteriálnou koinfekciou, ako napríklad streptokoková alebo stafylokoková infekcia. V niektorých prípadoch začervenanie nemusí byť výrazné a taktiež nemusí mať vyvýšený lem a dá sa ľahko prehliadnuť, hlavne ak sa jedná o osobu s tmavou pokožkou. Pacient môže mať

pridružené symptómy podobné chrípke (sekrécia z nosa, kašeľ a bolesť v hrdle nepatria do príznakového komplexu) a opuch lymfatických uzlín v blízkosti miesta začervenania. Ak tieto symptómy boli sprevádzané artralgiou, myalgiou, bolesťou hlavy alebo pocitom stuhnutia v krčnej oblasti chrbtice, je možné že došlo k sekundárnemu rozšíreniu infekcie do iných častí tela.

Obr. č. 9. Erythema migrans



Obrázok prevzatý z www.i.onmeda.de, OnVista Média GmbH,2005

Boréliový lymfocytóm

Lymfocytóm pri borelióze je veľmi zriedkavá forma včasnej lokalizovanej lymfocytárnej boreliózy, ktorá sa prejavuje ako nebolestivý modrastočervený uzlík alebo opuch na ušnom lalôčiku (hlavne u detí), na prsnej bradavke alebo na miešku. Pacient si nemusí pamätať zaklieštenie. Mikroskopické vyšetrenie z uvedenej oblasti poukazujú na veľmi hustú lymfocytárnu infiltráciu.

4.3. Včasná diseminovaná lymská borelióza

- niekoľko dní až 10 mesiacov po poštípaní

Spirochéta sa môže rozšíriť pomocou krvného a lymfatického riečišťa do iných tkanív, ako napríklad iné časti kože, nervový systém, muskuloskeletálny systém a srdce. Zasiahnutie hociktorého z týchto systémov môže spôsobiť širokú variáciu klinických prejavov prezentujúcich sa po pár týždňoch až do roka po prvotnej infekcii.

Klinické prejavy tohto štádia môžu zahrňovať:

- viacpočetné erythema migrans (viacnásobné samotné začervenania a bývajú menšej veľkosti),
- radikulopátia (prejavujúce sa skôr mesiace ako týždne po zakliešení),
- rekurentná artritída s edémom,
- karditída s poruchami prevodu (väčšinou pravo a ľavo ramienkové bloky).

Skorá neuroborelióza zahrňuje:

- léziu n. facialis a lézie iných kraniálnych nervov,
- aseptickú (vírusovú) meningitídu,
- polyradikulitídu (prejavujúcu sa skôr mesiace ako týždne po zakliešení),
- ľahkú formu encefalitídy,
- periférnu neuritídu.

Iné zriedkavé manifestácie boli zdokumentované vrátane kardiomyopatie, anteriórnej a posteriórnej uveitídy, panoftalmitídy, hepatitídy, myozitídy a orchitídy.

4.4. Neskorá lymská borelióza

Toto štádium sa manifestuje pri nestostatočnej liečbe **niekoľko mesiacov až rokov po infekcii** a môže atakovať kĺby (lymská artritída), kožu (acrodermitis chronica atrophicans), alebo nervový systém.

Chronická lymská artritída

Jej výskyt je viac frekventovaný v USA ako v Európe. Typicky sa manifestuje ako intermitentná alebo chronická, mono alebo oligoartritída veľkých kĺbov, v

zriedkavých prípadoch s eróziou chrupavky alebo kosti. Niekedy sa to vyvinie u pacientov, ktorí prekonali intermitentné artralgie alebo oligoartritídu v skorších štádiách ochorenia, ktoré prešli do chronicity. Najčastejšie postihnutým kĺbom je koleno. Spôľahlivým dôkazom lymfkej artritídy je kultivácia a DNA detekcia spirochét z kĺbového punktátu.

Avšak malé množstvo spirochét v synoviálnej membráne a náročnosť kultivácie zo synoviálnej tekutiny vedie niekedy k negatívnym výsledkom. U malého percenta pacientov bol zistený zápal šliach v mieste úponu na kosť. Tento prejav môže po niekoľkých rokoch ustúpiť, ale môže zostať reziduálne poškodenie kľbu u ťažkých prípadov. Predpokladá sa, že u niektorých pacientov, hlavne u tých ktorí majú artritídu rezistentnú na liečbu, môže ísť o genetickú predispozíciu na lymfskú artritídu a toto bolo pozorované hlavne u ľudí s HLA-DR2 alebo DR4 fenotypmi, čo poukazuje na imunogenetický faktor v patogenéze ochorenia (Steere a spol., 1979, Pfluger a spol., 1988).

Acrodermatitis chronica atrophicans (ACA)

Ide o postupné trofické zmeny kože spojené s jej zriasaním a s presvitaním žilovej kresby. Najčastejšie sa objavuje u starších ľudí v nižších častiach končatín s modrastým zafarbením kože s postupnou epidermálnou atrofiou, ktorá sa manifestuje leskom a papierovým vzhľadom.

Tento prejav je spôsobený pretrvávajúcou aktívnou infekciou, živé spirochéty boli izolované z biopsie kože pacientov z ACA až 10 rokov po prvotnej infekcii. ACA sa môže tak isto objaviť u mladých ľudí ako nato poukazuje kazuistika 11 ročného pacienta s postihnutím všetkých štyroch končatín (Brzonová a spol., 2002).

Obr. č. 10. Acrodermatitis chron.atrophicans



Obrázok prevzatý z www.mf.uni-lj.si/acta-apa/acta-apa-04/wegger.html,
Weger a Mullegger, 2001

Choroby manifestujúce sa po prekonaní lymskej boreliózy

Lymská encefalopatia je zriedkavá. Nemala by byť diagnostikovaná pri chýbaní laboratórnych dôkazov infekcie *Borrelia burgdorferi*. Môže dôjsť ku strate pamäti, k depresii, senzorickej polyneuropatii a k spastickej paraparéze, pravdepodobne spôsobené priamou infekciou nervového systému.

Niektoré manifestácie lymskej choroby môžu pripomínať „Chronic fatigue syndróm“ (CFS) čiže chronický únavový syndróm . Iné môžu vzbudzovať podozrenie na fibromyalgiu. Niektorí americkí autori používajú aj pojem perzistujúca infekcia čiže **Post-Lyme Disease Syndróm**.

Tieto prejavy môžu byť spustené predchádzajúcou infekciou *B. burgdorferi*, ale v čase ich manifestácie nie sú prítomné príznaky aktívnej infekcie. Vyskytujú sa aj u preliečených pacientov, u ktorých došlo k remisii. Vyskytujú sa tiež psychiatrické ochorenia, ako sú poruchy osobnosti, poruchy pamäti, poruchy koncentrácie, depresie, psychózy, anorexia nervosa a panické ataky.

Symptómy fibromyalgie a chronický únavový syndróm sa v súvislosti s lymskou chorobou môžu prejavovať ako ľahšie formy, okrem toho aj ako chronické manifestácie chrípke podobným syndrómom (Flu-like syndróm) spojené so skorou disemináciou.

Pomerne často sa v praxi neurológa vyskytuje klinický obraz diseminovaného poškodenia CNS, ktoré imponuje ako rozstrúsená skleróza a pritom ide o ochorenie súvisiace s lymfskou boreliózou. Zvykne sa označovať ako SM-like syndróm (Reik, 1985, Reik a spol., 1991, Halperin a spol., 1991). V súvislosti s dôležitosťou správnej diferenciálnej diagnózy je vhodné sa tejto forme venovať o niečo rozsiahlejšie ako predchádzajúcim prejavom. Pri nepresvedčivej anamnéze, chýbajúcich kožných príznakov sa táto diagnóza logicky ponúka. Vzťah k boreliovej infekcii sa nezriedka podarí dokázať až po dlhšom diagnostickom úsilí.

Hlavné klinické príznaky sú slabosť dolných končatín, obvykle pod obrazom spastickej alebo zmiešanej paraparézy, mozočkové a vestibulárne poruchy, resp. kombinácia týchto príznakov. Chorobný proces postihuje centrálnu, ako aj periférnu neuróny a ich axóny. Časté sú zadnopovrazcové príznaky. Okrem toho bývajú vyznačené nešpecifické príznaky, ako závraty, instabilita, únava.

Ide väčšinou o pacientov, u ktorých sa s odstupom času po prekonanej kožnej forme lymfskej boreliózy, prípadne sprevádzanej inými orgánovými príznakmi, objavia menlivo vyjadrené prejavy postihnutia centrálneho aj periférneho nervového systému. Diagnostický problém je v tom, že vzhľadom na časový odstup, väčšina pacientov ako aj lekárov si neuvedomuje súvislosť medzi predošlými kožnými, kĺbovými, srdcovými, resp. neurologickými obtiažami a súčasnou neurologickou symptomatológiou. Nástup a rozvoj ochorenia je typický pre demyelinizačné ochorenie. Choroba prebieha v atakoch a dochádza k remisiám. V klinickom obraze sa spočiatku kombinujú nevýrazné poruchy citlivosti, bývajú prechodné okohybné poruchy. Neskôr sa pridružujú paretické prejavy z postihnutia miechy a mozgových hemisfér. U takto postihnutých pacientov sa obvykle myslí v prvom rade na demyelinizačné ochorenie typu SM. Až s odstupom času sa zvažuje možný vzťah k boreliovej infekcii. Na možnosť boreliózy je potrebné myslieť u každého pacienta s podozrením, alebo aj v minulosti stanovenou diagnózou sclerosis multiplex. Vo väčšine súborov pacientov s neuroboreliózou prevažujú ženy, podobne ako u ostatných demyelinizačných ochorení nervového systému a ďalších autoimúnnych ochorení (Ovadia a spol., 1989). Magnetická rezonancia ukáže viacpočetné hyperintenzitné ložiská typické pre demyelinizáciu. Takéto ložiská však nie sú patognomické ani pre sclerosis multiplex, ani pre boreliózu, resp. iný zápalový demyelinizačný proces (napr. infekcie herpetickým vírusom, morbillami).

Pri rozhodovaní o tom, či sa jedná o demyelinizačné ochorenie typu sclerosis multiplex alebo o neuroboreliózu, sú dôležité okrem anamnestických a klinických údajov aj opakované cytologické a biochemické vyšetrenia cerebrospinálneho likvoru. Nálezy v cerebrospinálnom likvore sú často hodnotené ako „atypické“ a nepodporujú jednoznačne diagnózu sclerosis multiplex. Väčšinou býva monocytárna pleocytóza v asociácii s hyperproteinorhachiou. Prítomná býva i oligoklonálna skladba likvorových bielovín a aj intratekálna tvorná IgG (Stedingk a spol., 1990; Pohl a spol., 1986; Steere a spol., 1990).

5. Laboratórna diagnostika

Okrem klinickej diagnostiky, ktorú považujeme za rozhodujúcu pri diagnostike lymfkej boreliózy majú dôležitú úlohu i laboratórne vyšetrovacie metódy. Tieto môžu byť mikrobiologické- priame a nepriame a ostatné tzv. nemikrobiologické.

5.1. Ne-mikrobiologická diagnostika

Periférna krv

V rámci tzv. nemikrobiologických metód vyšetrujeme periférnu krv, v ktorej však nie je žiadny špecifický parameter, pacienti majú normálnu alebo mierne zvýšenú sedimentáciu, vrátane normálnej alebo mierne zvýšenej hodnoty bielych krviniek. Zvýšený hemoglobín a vyššie hodnoty červených krviniek sa zriedkavo našli pri aktívnej fáze ochorenia.

Likvor

U skorej neuroboreliózy sa v likvore nachádza mierna pleocytóza, prevažne prítomnosť lymfocytov, ktorá je veľmi dôležitá pre diagnostiku, avšak u niektorých pacientov bola pozorovaná iba zvýšená hladina celkových bielkovín. Lymfocytárna pleocytóza chýbala ojedinele u pacientov s izolovanou periférnou neuropatiou. Intratekálna IgM a IgG produkcia a oligoklonálna skladba IgG sú bežne prítomné a ich výskyt je podporným príznakom pri diagnóze. Celkové bielkoviny v likvore sú často zvýšené avšak hladina glukózy je obvyčajne v norme.

U chronickej neuroboreliózy intratekálna IgG produkcia a oligoklonálna skladba IgG je častým príznakom. Takýto likvorový nález je len ťažko odlišiteľný od nálezov pri SM. Pri lymfkej borelióze sa však podstatne častejšie pozoruje lymfocytárna (mononukleárna) pleocytóza a počet elementov býva vyšší ako u SM. U pacientov s chronickou polyneuropatiou boli pozorované normálne parametre cerebrospinálneho likvoru.

Histológia

Pri kožnej manifestácii lymfkej boreliózy sa využíva i **histopatológia** a predstavuje vzácny dodatok k diagnostike.

Histologický obraz pri erythema migrans (EM) je vo všeobecnosti nešpecifický s perivaskulárnou infiltráciou prevažne lymfocytov a občas plazmatických buniek.

Histopatologické vyšetrenie je zriedka potrebné u erythema migrans, ale môže pomôcť u atypických prípadov pri rozlišovaní EM od chorôb s podobnými klinickými charakteristikami.

U boréliového lymfocytómu je dominujúca lymfocytárna infiltrácia v oblasti kože, ale prítomné bývajú aj plazmatické bunky, makrofágy a eozinofily. Histologické vyšetrenie môže byť jednou z podporných metód v diagnostike boréliového lymfocytómu, ale tieto prejavy sú nešpecifické a môže byť obtiažne rozlíšiť toto ochorenie od malígneho lymfómu.

Histopatologický obraz ACA je charakterizovaný prítomnosťou teleangiektázií a lymfocytárnou infiltráciou, ktorá je zmiešaná s plazmatickými bunkami v koži a často taktiež v podkoží. Histologická diagnostika u ACA predstavuje len podpornú metódu diagnostiky, nakoľko nie je výhradným dôkazom diagnózy.

5.2. Mikrobiologická diagnostika

5.2.1 Priamy dôkaz

Priame metódy nemajú v klinickej praxi také uplatnenie ako serologické vyšetrenia pre svoju technickú a ekonomickú náročnosť (Keller a spol., 1992).

Kultivácia - nízka senzitivita, časové a finančne náročná, nehodí sa pre prax

V minulosti bolo zlatým štandardom pri diagnostike bakteriálnych ochorení mikrobiálna kultivácia biologického materiálu. Nakoľko je nízka záchytnosť žijúcich spirochét v bioptických materiáloch od pacientov, pretože borélie sú veľmi kultivačne náročné, negatívny výsledok nevylučuje aktívnu infekciu. Najvyššia záchytnosť borélií bola popisovaná z kožných biopsií erythema migrans 80% a biopsii z ACA 60%, z likvoru bola záchytnosť 17%. Spirochéty *B.burgdorferi* boli izolované aj z krvi u

pacientov so skorou lymfskou boreliózou a zo synoviálnej tekutiny u pacientov s lymfskou artritídou a v srdcovom tkanive, avšak ich záchytnosť je minimálna (Braune, 1991).

PCR (polymerázová reťazová reakcia)

- likvor 12-46%, synovia kľbu - 100%, v synoviálnej tekutine menej, moč len intermitentne

PCR technológia sa objavila v r. 1988 a mala veľký úspech, pretože pomohla pri detekcii doteraz nedidiagnostikovateľných ochorení. Teraz dostupné PCR metódy pri diagnostike *Borelia burgdorferi* sensu lato sú genomospecifické a sú schopné zachytiť aj malý počet borélií. Nakoľko PCR (na rozdiel od kultivácie) iba deteguje spirochetálnu DNA a nie živý organizmus, pozitívne PCR nevie určiť či je infekcia aktívna alebo nie. Aj napriek tomu ide o hodnotnú metódu pri diagnostike a klinickom postupe u pacientov s artritídou, nakoľko izolácia borélií a ich následná kultivácia zo synoviálnej tekutiny je vo väčšine prípadov neúspešná a serologickými metódami nie je možné spoľahlivo rozlíšiť medzi chronickou, aktívnou a prekonanou infekciou. PCR dokáže detegovať boréliovú DNA vo viac ako 50% zo vzoriek synoviálnej tekutiny, dokonca úspešnosť zo synoviálnej membrány býva až 100%. U EM a ACA pacientov boreliálna DNA bola detekovaná u 50-70% kožných biopsií a zriedkavo v sére. U pacientov s akútnou neuroboreliózou boreliálna DNA bola nájdená u 20-30% z likvorových vzoriek. PCR robená zo vzoriek moča nie je vzhľadom na nízku záchytnosť väčšinou autorov doporučovaná v rutinej diagnostike. V súčasnosti sú dostupné PCR metódy, ktoré dokážu identifikovať individuálne genomospecies *B.burgdorferi* sensu lato.

Tieto metódy buď používajú špecifické prajmery pre PCR alebo analyzujú PCR produkt pomocou sekvenčného spracovania DNA hybridizáciou na genomospecifické sondy, alebo reštrikciou vnútrojadrového polymorfizmu.

V Európe u pacientov s neuroboreliózou a pacientov s EM alebo ACA boli nájdené zmiešané infekcie z 2 alebo 3 druhov. Napriek objaveniu zmiešaných infekcií spojenie *B. afzelii* s ACA zostalo nevyvrátené. Pri neuroborelióze okolo 60-70% druhov pripadá na *B. garinii* a doteraz väčšina izolátov u prípadov európskej Lymfskej artritídy bola vyvolaná *B.burgdorferi* sensu stricto. V Európe u pacientov s neuroboreliózou, s EM alebo ACA boli nájdené zmiešané infekcie 2 alebo 3 genomospecies.

Iné diagnostické postupy pomocou PCR merania IgG a produkcie CXCL13.

Pri chronickej lymfkej infekcii dochádza k aktivácii B-buniek (B-lymfocytov), infiltrácii plazmatických buniek a k zvýšenej IgG produkcii v infikovaných tkanivách - tieto prejavy patria k hlavným znakom.

Avšak veľmi málo je známe o tom, že borélie napádajú B-lymfocyty a plazmatické bunky a prežívajú v bunkách cieľových orgánov. K. Narayan a spol.(2005) vyvinuli PCR merania IgG a produkcie CXCL 13 (chemokin C-X-C s ligandom 13 - gén, ktorý kóduje protein) a ukazuje sa, že ich pretrvávajúca produkcia CXCL13 a IgG vrámci napadnutého tkaniva má dve charakteristiky z ektopických germinálnych centier a sú zároveň definitívnymi známkami lymfkej neuroboreliózy (Narayan, 2005) a tento test môže byť nápomocný u séronegatívnych pacientov počas skorého štádia ochorenia a taktiež pri kontrole terapie. Avšak Wutte a spol. (2011) popisujú prítomnosť zvýšenej hladiny CXCL13 v sére pri autoimunitných ochoreniach ako sú lupus erythematosus a dermatomyozitíde a preto hladiny CXCL13 v sére pri LB, nemôžu byť použité ako ukazovateľ aktivity ochorenia alebo ako ukazovateľ nutnosti použitia antibiotickej liečby.

5.2.2. Nepriamy dôkaz – serologické testy

- majú len podpornú úlohu v diagnostike Imunoflorescenčné testy - nepriama imunoflorescencia

Táto technika bola jedna z prvých sérodiagnostických testov vyvinutých pre lymfskú boreliózu a je stále dôležitou testovacou metódou, ktorá sa používa v mnohých krajinách

Nepriama fluorescenčná metóda (NIF) je založená na reakcii protilátok v triede IgM a IgG boréliami naneseným na sklíčka. Hlavnou výhodou imunoflorescencie je dôkaz antigénu, ale do určitej miery je nevýhodný, pretože si vyžaduje veľké skúsenosti pri hodnotení, od tejto metódy sa postupne upúšťa.

Pri metóde NIF je potrebné vziať do úvahy, že pri nej bývajú oveľa častejšie falošne pozitívne testy ako pri metóde ELISA. Falošne pozitívne testy vychádzajú najmä pri reumatoidnej artritíde, systémovom lupus erythematosus, leptospirózy a ostatné

spirochétové ochorenia ako syfilis (Braune,1991).

ELISA

Sú najviac používané testy. Môžu sa používať samostatne alebo v kombinácii s imunoblotom, hlavnou výhodou tejto metódy je jej použiteľnosť pri testovaní vo veľkom počte. Pri týchto metódach sa používa celobunkový sonifikovaný antigén z bičikov a antigén vonkajšej steny (Osp). Pre laboratórnu diagnostiku sú vhodné synteticky pripravené antigény.

Predpokladom na ich výrobu je znalosť génov kódujúcich antigénne proteíny, výroba syntetických ekvivalentov týchto génov a vnesenie týchto sekvencií pomocou vektora (plazmidu fága) do expresného genómu *Escherichia coli*. Všetky metódy sú však ďaleko od ideálu z hľadiska senzitivity ako aj špecificity. Výsledky serologických testov je potrebné vzťahovať k epidemiologickej anamnéze a ku klinickému stavu pacienta. Doporučujú sa hlavne testy s rekombinantnými antigénmi. Nie sú zaťažené subjektívnou chybou pri interpretácii, ale testy od rôznych výrobcov môžu mať rôznu citlivosť a vedú k rozdielnym výsledkom.

Problémom pri sérologických vyšetreniach je skrížená reakcia s inými baktériami, zvlášť s *Treponema pallidum*, čím dochádza k falošne pozitívnym reakciám. Na odlíšenie je potrebné urobiť špecifické testy na *Treponema pallidum* - TPIT a VDRL, ktoré sú u boreliózy negatívne. Skrížená reakcia je aj so saprofytickou *Treponema phagedenes*, vyskytujúca sa príležitostne v orofarynxu (Wilske a spol., 1984) alebo *Treponema denticola* pri ochoreniach periodontia (Simonson a spol., 1988).

Immunoblot

Je tak isto známy ako westernblot. Je dôležitý v charakterizácii imunitnej odpovedi na špecifické *Borelia burgdorferi* sensu lato proteíny a je vo väčšine prípadov používaný ako dvojstupňová procedúra. **Umožňuje stanovenie protilátok proti jednotlivým definovaným antigénom a tým potvrdenie špecificity produkovaných protilátok zachytených skriningovými testami.** V súčasnosti interpretačné kritériá podľa Engstroma a spol. (1995) sú doporučované pre IgM bloty a Dresslerove a spol. (1994) pre IgG bloty. Avšak tieto pravidlá nie sú univerzálne platné pre imunoblotty v celej Európe. Interpretačné kritériá závisia na druhu použitom ako zdroj antigénu a je

potrebné charakterizovať diagnostické antigény s monoklonálnymi protilátkami pre správnu identifikáciu imunoblotových skupín (Hauser a spol., 1997).

Štandardizácia kritérií pre interpretáciu imunoblotov v Európe bola predmetom štúdie EUCALB (Robertson a spol., 2000). Táto multicentrická štúdia zahrňujúca 6 európskych laboratórií, ktoré používali odlišné imunoblotové protokoly, bolo určených po 8 skupín imunoblotov rozdelených do všetkých laboratórií s rozdielnou schopnosťou záchytnosti. Z tejto štúdie, bolo sformulovaných 5 základných postupov, ktoré dávajú prijateľnú senzitivitu a špecificitu. Univerzálny postup však nie je k dispozícii. Tento panel európskych pravidiel poskytuje návod pre interpretáciu vyšetrení imunoblotom, ktoré môžu byť adaptované vo vzťahu k charakteristikám lymskej borelióze k danej lokalite.

5.2.3. Senzitivita a špecificita sérologických vyšetrení.

Senzitivita

Protilátková odpoveď u skorej lymskej boreliózy môže byť slabá alebo chýbajúca, hlavne u erythema migrans a antibiotická liečba môže znížiť protilátkovú produkciu. Serológia môže byť tiež negatívna u akútnej neuroboreliózy s krátkym trvaním ochorenia u pacientov s imunodeficienciou. Väčšina pacientov s neskorou manifestáciou má pozitívny IgG test. Negatívny alebo hraničný výsledok sérologického testu sa občas pozoruje u pacientov s krátkym trvaním symptómov, u ktorých je nutné opakovať vyšetrenie. Tento stav sa nazýva „**séronegatívna lymská choroba**“.

Špecificita

Sérologické testy na stanovenie protilátok proti *B.burgdorferi* nie sú štandardizované. Problémy môžu vyplývať zo skutočnosti, že antigény použité v teste nekorelujú s antigénmi borélií kolujúcich v danej oblasti. Vzhľadom na heterogenitu antigénov *B.burgdorferi* kolujúcich v Európe, ako aj na spôsob ich spracovania, testy môžu mať rôznu špecificitu a senzitivitu. Výsledky testov z rôznych laboratórií nemusia byť zhodné. Protilátky môžu byť falošne pozitívne a ide len o krížové reakcie pri iných infekciách, ako napr. syfilis, erlichioza, kampylobakteriôza a iné, ako aj pri autoimunitných ochoreniach a ochoreniach neznámeho pôvodu ako SM, systémový lupus erytematosus, protilátky IgM bývajú v prítomnosti reumatoidného faktoru a pod. Pri prítomnosti protilátok v likvore treba brať do úvahy, že protilátky nemusia byť výsledkom intratekálnej tvorby, ale ide o protilátky v sére, ktoré prenikajú cez poškodenú hematolikvorovú bariéru.

Výsledky sérologických testov majú len podpornú hodnotu pri diagnóze LB a prítomnosť špecifických protilátok nemusí byť v príčinnom vzťahu k ochoreniu. Protilátky môžu pretrvávajú dlhodobo po prekonaní ochorenia alebo inaparentnej infekcii a asi 12% zdravej populácie u nás má protilátky proti antigénom *B.burgdorferi* (Bazovská a spol., 2005).

6. Doporučené diagnostické postupy

Lymská borelióza je ochorenie, ktorého diagnóza sa zakladá na klinických kritériách (anamnéza, symptómy a klinické nálezy) ktoré sú rozhodujúcimi faktormi pre diagnostiku a sú podporené výsledkom testov (serologické, PCR, kultivácia). Diagnóza sa opiera o anamnestické údaje, priebeh ochorenia a odpoveď na antibiotickú liečbu.

Sérologické vyšetrenie je indikované vo všetkých prípadoch u pacientov s klinickými príznakmi podobnými lymskej borelióze t.j. keď prítomné symptómy je možné asociovať s lymskou boreliózou, avšak čím menej sú špecifické symptómy, tým slabšia je prvotná pravdepodobnosť lymskej boreliózy a nižšia predpokladaná pozitivita testov. U klinicky typických prípadov t.j. patognomické manifestácie (EM), serodiagnostika nie je výlučne potrebná a negatívna serológia nevylučuje diagnózu EM alebo inej skorej manifestácie s krátkym trvaním symptómov.

Niektoré európske krajiny odporúčajú diagnostiku iba ELISA testom so špecifickou aspoň 95%, ale vhodnejšie sú so špecificitou 98%. V iných európskych krajinách atak isto v USA sa odporúča použitie minimálne dvoch testov. Senzitívny skriningový test ako napr. ELISA so špecificitou minimálne 95%, podporený imunoblotom A so špecificitou 90% ako skriningový test. Dvojstupňový postup môže byť nahradený za jedinou testovaciu metódu, ktorá má senzitivitu a špecificitu rovnakú alebo vyššiu ako hodnoty hore uvedené, ale aj tu je pravdepodobné že po vyšetrení bude musieť byť pozitívny následne imunoblot.

Kritéria pre definíciu lymskej boreliózy, ktoré môžu formovať základy štandardizovanej diagnostiky sú špecifikované podľa EUCALB v tab. č. 2.

Tab.č.2. Diagnostické postupy

Pojem	Klinický nález	Nevyhnutný laboratórny dôkaz	Podporný laboratórny dôkaz
Erythema migrans	Rozširujúca sa červená alebo červenomodrá škvrana, často s bledým stredom s prominujúcim lemom	Žiadna	Kultivácia kožnej biopsie. *Signifikantná zmena v hladinách špecif.protil., alebo prít. špec. IgM.
Boréliový lymfocytóm	Zriedkavý bezbolestný červenomodrý uzlík, zvyčajne na ušnom laloku, bradavke alebo miešku. Je to viacej frekventované u detí ako u dospelých.	Signifikantná zmena v hladinách špecifických protilátok**. Histológia v neistých prípadoch	Histológia. Detekcia <i>B.burg.s.l.</i> kultivovaním a/alebo PCR z kožnej biopsie.
Acrodermatitis chronica atrophicans	Dlhotrvajúca červ. Alebo modročervená lézia, obvykle na vonkajších povrchoch končatín. Počiat. Edém. Lézie sa event. Stanú atrofické.	Prítomnosť špecifíc. IgG protilátok (zvyčajne vysoké hladiny) **	Histológia. Detekcia <i>B.burg.s.l.</i> kultivovaním a/alebo PCR z kožnej biopsie.
Neuroborelióza	U dospelých hlavne meningoradikul. s alebo bez lézie n. facialis zriedkavo encefalitída, myelitída veľmi zriedkavo cerebr.vaskulitída. U detí hlavne meningitídy, mono (niek.bilat.) tvár. obrny.	Pleocytóza a prítomnosť intratekálna tvorba špecifických protilátok***	Detekcia <i>B.burg.s.l.</i> kultivovaním a/alebo PCR z likvoru. Intratekálny súčet IgM a IgG a IgA špec. protilátok a nedávna alebo prebiehajúca EM
Lyme arthritis	Rekurenté ataky alebo perzistujúce s opuchmi kĺbov, jedného alebo viacerých, veľkých kĺbov. Alternatívne vysvetlenia opuchov kĺbov.	Prítomnosť špecifíc. IgG protilátok (zvyčajne vysoké hladiny) **	Detekcia <i>B.burg.s.l.</i> kultivovaním a/alebo PCR zo synoviálnej tekutiny a/alebo tkaniva.
Lymská karditída (zriedkavá)	Akútny blok atrioventrikulárneho (I-III) uzla, poruchy vodivosti, rytmu, niekedy myokarditída alebo pankarditída	Špecifické protilátky v sére**	Kultivácia endomyokardiálnej biopsie.
Okulárna manifestácia (zriedkavá)	Conjunktivitída, uveitída, papilitída, episkleritída, keratitída	Špecifické protilátky v sére**	Nedávne alebo prebiehajúce manifestácie lymskej boreliózy. Detekcia <i>B.burg.s.l.</i> kultivovaním a/alebo PCR z okulárnej tekutiny
Pojem	Klinický nález	Nevyhnutný laboratórny dôkaz	Podporný labor. dôkaz.

Spracované podľa EUCALB 2011 (www.eucalb.com)

* je potrebná anamnéza uštipnutia kliešťom a neskoršie objavenie aspoň 2 dni po zakliešení a zväčšujúci sa červený flak menej ako 5 cm v priemere v mieste poštípania

** Hodnoty špecifických protilátok v sére sa môžu zvýšiť ako odpoveď na progresiu infekcie alebo sa môže znížiť pri odstránení infekčného procesu. Vzorky zozbierané v minimálnom 3 mesačnom odstupe sú potrebné na zistenie poklesu hladiny IgG protilátok, ako pravidlo pačiatkové a kontrolné vzorky by mali byť testované paralelne, aby sa zabránilo zmenám v interpretácii testov.

*** V skorých štádiách LB Intratekálna produkcia špecific. protilátok môže byť neprítomná

V tabuľke nie je uvedená chronická borelióza, ale International Lyme and Associated Disease Society (ILADS) (Stricker a Johnson, 2011) uznáva chronickú lymskú boreliózu a podporuje dlhodobú ATB terapiu, vzhľadom na komplikácie s koinfekciami a úlohu cystických foriem pri chronickej lymskej borelióze.

7. Patofyziológia

Borrelia burgdorferi sa v priebehu ochorenia môže šíriť do celého tela a jej prítomnosť sa zistila v koži, v srdci, v kĺboch, v periférnom nervovom a v centrálnom nervovom systéme. Mnohé príznaky lymskej choroby sú v dôsledku imunitnej odpovede na prítomnosť borélií v týchto tkanivách (Auwaerter a spol., 2004).

B. burgdorferi sa dostane do kože uhryznutím infikovanými kliešťami *Ixodes*. Sliny kliešťa, ktoré dostávajú do kože počas sania, obsahujú látky, ktoré narušujú imunitné reakcie v mieste uštipnutia. To zaisťuje prostredie, v ktorom borélie sa môžu uplatniť a vyvolať infekciu. Množiace sa borélie migrujú smerom von do dermis. Zápalová reakcia hostiteľa v koži sa prejaví charakteristickým kruhovým erythema migrans (EM). Neutrofilý, ktoré sú nevyhnutné pre odstránenie borélií z kože, nereagujú počas rozvíjajúceho sa štádia EM v dôsledku narušenej imunitnej odpovedi. Toto umožňuje baktériám prežiť a nakoniec sa rozšíriť do celého tela.

Niekoľko dní až týždňov po prisatí kliešťa borélie sa šíria krvným riečiskom do kĺbov, srdca, nervového systému, kože a do vzdialených miest v tele, kde ich prítomnosť vyvoláva rad príznakov diseminovaného ochorenia. K rozšíreniu *B. burgdorferi* napomáha prichytenie hostiteľovej plazmovej proteázy na povrchu borélií. Pri neliečených ochoreniach môžu baktérie pretrvávajúť v tele niekoľko mesiacov až rokov, napriek tvorbe protilátok proti *B. burgdorferi* imunitným systémom. Borélie sa môžu vyhnúť imunitnej odpovedi tým, že znižujú expresiu povrchových proteínov, proti ktorým sú protilátky zamerané. Antigénna variácia povrchových proteínov VlsE má za následok deaktiváciu kľúčových imunitných komponentov a zakrýva extracelulárny matrix, čo môže narušiť funkciu imunitných mechanizmov. Borélie môžu uniknúť ich vplyvu predovšetkým:

- znížením prítomnosti a zmenami imunogénnych povrchových proteínov,
- inaktíváciou efektorových mechanizmov,
- únikom do menej prístupných priestorov, ako je extracelulárny matrix. (Cabello a spol., 2007).

Aby borélie unikli imunitnej reakcii hostiteľa, dochádza k zmene expresii ich vysoko imunogénnych povrchových proteínov. Napr. OspA antigén je silný stimulátor neutrofilov a indukuje uvoľňovanie prozápalových cytokínov, ako sú interleukín (IL)-

1 β , tumor nekrotizujúci faktor (TNF)- α , IL-6. Tento antigén je produkovaný v čreve kliešťa a jeho produkcia sa rýchlo zníži počas zaklieštenia na hostiteľa. Aj keď OspA pozitívne borélie sú schopné vstúpiť do hostiteľa, nie sú schopné vyvolať infekciu a v experimentoch na myšiach borélie už štyri dni po vstupe boli OspA negatívne. Možno predpokladať, že iba OspA negatívne borélie sú schopné prežiť v hostiteľa, a preto v začiatkových fázach infekcie táto povrchová bielkovina sa neuplatňuje. Na rozdiel od OspA, antigén OspC sa začne rýchlo produkovať už pred šírením do slinných žliaz kliešťa a počas zaklieštenia, čo je najpravdepodobnejšie vyvolané zvýšením teploty a zmenou pH v krvi hostiteľa. Expresia OspC je najvýznamnejší faktor pri prenose z kliešťa na hostiteľa. V nedávnej štúdii bolo zistené, že *Bb* môže viazať na seba komplementárny inhibujúci proteín Salp15 zo slín kliešťa pomocou OspC, ktorý chráni boréliu pred komplementárnym systémom hostiteľa. Preto expresia OspC je nevyhnutná v prvých 48 hodinách infekcie, aby sa borélie vyhli prirodzenej imunite. OspC negatívne borélie nie sú schopné rozširovať sa a napadnúť hostiteľa.

Okrem Salp15 v slinách kliešov boli nájdené ďalšie komplement-neutralizujúce látky, ako napr. Salp20, ISACA, alebo IRAC. Možno predpokladať, že *B.burgdorferi* ich využíva, aby sa chránila pred nepriateľským imunitným systémom. Okrem týchto komplement blokujujúcich agensov kliešťa, borélie produkuje komplement viažuce proteíny na svojom povrchu: komplement regulujúci povrchový proteín (CRASPs), faktor H viažuci OspE, alebo regulačný proteín CD59 (protectin) hostiteľského komplementu. Tieto povrchové proteíny umožňujú boréliám aby sa bránili komplementu i vo vnútri hostiteľa. Ďalším mechanizmom, ktorý narušuje imunitný systém hostiteľa je spustenie prozápalových cytokínov. IL-10 je považovaný za kľúčový (negatívny) regulátor vylúčenia zápalových cytokínov alebo ich funkcií. Bolo dokázané, že *B. burgdorferi* indukuje sekréciu IL-10 v mononukleárných bunkách, čo naznačuje, že borélie ho využívajú k potlačeniu obranyschopnosti hostiteľa. Ďalej sa ukázalo, že *B. burgdorferi* môže uvoľňovať rozpustné antigény, ktoré agregujú s *Bb* špecifickými protilátkami, čo vedie k vzniku imunitných komplexov. To by mohlo narušiť opsonizáciu a v dôsledku toho efektívne zabíjanie mikróbov. Všetky zistenia poukazujú nato, že *B. burgdorferi* má komplexné vybavenie pre aktívne potlačenie imunity znížením imunitnej odpovede a neutralizovaním jej efektorových mechanizmov.

Ďalší spôsob, ako sa borélie dokáže skryť pred nepriateľským imunitným systémom, je invázia do "chráneného útočiska", ako sa ukazuje v pokusoch *in vitro*. Extracelulárny matrix je považovaný za jedno z imunologicky chránených miest. Je

dobre známe, že borélie môžu viazať plazminogén pomocou OspA na ich povrchu. K tejto väzbe dochádza veľmi rýchlo (60 min. od spustenia, saturačný bod je 300 min.), časový priebeh in vivo nebol analyzovaný. Plazminogén môže byť aktivovaný na plazmín, čo vedie k degradácii extracelulárneho matrixu a umožňuje jeho inváziu. Treba brať do úvahy, že borélie v skorých štádiách infekcie produkujú len malé množstvo OspA antigénu a preto môže byť plazminogén dôležitý pre disemináciu borélií v kliešťoch, ale nie u hostiteľa - cicavca. OspA-negatívne borélie môžu používať pre šírenie flagelín namiesto plazminogénu. Štúdia s použitím bezbičkového mutanta *B. burgdorferi* preukázala zníženú pohyblivosť borélií, ktorým chýbala flagella. Mnohí autori uvádzajú, že flagellum a pohyblivosť hrajú významnú rolu pri invázii *B. burgdorferi* do ľudského tkaniva. Okrem toho, borélie vedia lokálne zvýšiť hladinu matrix-metaloproteinázy-9, ktorý rozloží okolitý extracelulárny matrix a borélie sa vedia prichytiť na niektoré proteíny extracelulárneho matrixu (fibronektín, niekoľko integrínov alebo proteoglykany, ako napr. decorin). To umožňuje aj rozšírenie a prežitie borélií v decorin bohatých tkanivách a borélie sa môžu skrývať v extracelulárnych štruktúrach, čím sa vyhnú cirkulujúcim leukocytom.

V mozgu môže *B. burgdorferi* stimulovať astrocyty aby prešli astrogliozou (proces proliferácie s následnou apoptózou), ktorá môže prispieť k neurodysfunkcii. Borélie môžu vyvolať v hostiteľskej bunke vylučovanie produktov toxických pre nervové bunky (neurotoxíny), vrátane kyseliny chinolínovej a cytokínov IL-6 a TNF-alfa, čo môže k únave a malátnosti. Mikroglie aj astrocyty vylučujú v prítomnosti borelie IL-6 a TNF-alfa. Táto cytokínová odpoveď môže prispieť k poškodeniu kognitívnych funkcií.

Pôsobením baktérie *Borrelia burgdorferi* počas lymskej choroby pravdepodobne dochádza k dlho trvajúcej a ničivej zápalovej reakcii, včítane patogénom vyvolaného autoimunitného ochorenia. Táto reakcie môže byť v dôsledku určitej formy molekulárneho napodobňovania, kde borélie sa snaží vyhnúť zabitiu imunitným systémom tým, že napodobňuje antigény normálnych častí telesných tkanív. Je teda možné, že niektoré chronické príznaky sú výsledkom autoimunitnej reakcie a to by mohlo vysvetliť, prečo niektoré symptómy pretrvávajú aj po eliminovaní borélií z tela. Táto hypotéza môže vysvetľovať chronickú artritídu, ktorá pretrváva aj po antibiotickej liečbe, podobne ako reumatická horúčka, ale jej širšie použitie je sporné.

8. Terapia lymskej boreliózy

8.1. Niektoré doporučované terapeutické postupy pri jednotlivých štádiach LB:

1. Liečba pri zaklieštení (Nadelman a spol., 2001)

Pri zaklieštení a po odstránení kliešťá niektorí autori doporučujú v rámci prevencie Doxycyclin 200 mg užiť jednorázovo, ak bol kliešť zaklieštený dlhšie ako 24 hod. sa doporučuje užiť Doxycyclin 2x100 mg v trvaní minálne 7 dní (Nadelman a spol., 2001).

2. Liečba včasnej lokalizovanej formy (EUCALB., 2009 , OUMZ SR., 2010)

Erythema migrans, možné terapeutické postupy:

1. Doxycyclin 2x200 mg p.o. 10-21dni
2. Penicilin V 3x1000 mg p.o. 10-21 dní
3. Amoxicillin 3x500 mg p.o. 10-21 dní alebo 2x1000mg

3. Liečba včasnej disseminovanej formy (EUCALB., 2009, OUMZ SR., 2010)

a., Neuroborelioza akútna, možné terapeutické postupy:

1. Ceftriaxone 1x2000 mg i.v. minimálne 28 dní
2. Cefotaxime 3x2000 mg i.v. minimálne 28 dní
3. Penicillin G 3x3000 mg i.v. 21-30 dní

Následne perorálne po i.v. liečbe.

Doxycyclin 2x100 mg p.o. 30 dní, alebo Amoxicillin 3x 500-1000 mg p.o. 14-30 dní.

b., Artritis, možné terapeutické postupy:

1. Ceftriaxone 1x2000 mg i.v. 14-21 dní
2. Cefotaxime 3x2000 mg i.v. 14-21 dní
3. Doxycyclin 2x200 mg p.o. 14-30 dní
4. Amoxicillin 3x 500-1000 mg p.o. 14-30 dní

c., Carditis, možné terapeutické postupy:

1. Ceftriaxone 1x2000 mg i.v. 14 dní
2. Cefotaxime 3x2000 mg i.v. 14 dní
3. Penicillin G 3x3000 mg i.v. 14 dní

4. Chronická lymská borelióza (EUCALB., 2009, OUMZ SR., 2010)

a., Acrodermatitis chronica atrophicans, možné terapeutické postupy:

1. Ceftriaxone 1x2000 mg i.v. 14-30 dní
2. Cefotaxime 3x2000 mg i.v. 14-30 dní
3. Penicillin G 3x3000 mg i.v. 14-30 dní
4. Doxycyclin 2x100 mg p.o. 14-30 dní
5. Amoxicillin 3x 500-1000 mg p.o. 14-30 dní

b., Neuroborelióza chronická, možné terapeutické postupy:

1. Ceftriaxone 1x2000 mg i.v. minimálne 28 dní
2. Cefotaxime 3x2000 mg i.v. minimálne 28 dní
3. Penicillin G 3x3000 mg i.v. 21-30 dní

Ak dôjde k recidíve ťažkostí, napriek adekvátnej liečbe včasnej formy LB, ktorá sa prejavuje celkovou slabosťou, a zvýšenou únavnosťou, artralgiami, myalgiami, poruchy koncentrácie a novopamäti a pod., jedná sa pravdepodobne o **chronickú formu neroboreliózy**. Liečba sa stáva komplikovanejšou, pretože sa môže jednáť aj o koinfekciu s inými baktériami, protozoami a pod. Liečba LB je ľahšia, keď sa koinfekcie eliminujú (Nadelman a spol., 1997).

Skúsenosti niektorých najmä amerických autorov v posledných rokoch odporúčajú užívať antibiotikum tetracyklínovej rady Doxycyclin v dávke 400-600 mg/ deň až v trvaní do 60 dní (Donta, 1997, Burrascano, 2008).

Doxycyclin je schopný preniknúť hematolymphatickou bariérou a dávka 500 mg/deň p.o. sa považuje za baktericídnu, nižšie dávky doxycyclínu sa považujú za bakteriostatické.

Ak sa spirochéty *B.burgdorferi* dostanú pre nich do nepriaznivého prostredia (napr. pri užívaní antibiotickej liečby) sú schopné vytvoriť cystickú formu, ktorá sa javí rezistentná i niekoľko týždňov voči imunitnému systému a bežnej antibiotickej liečbe. Tieto „spiacie“ baktérie sa môžu aktivovať pri predčasnom ukončení antibiotickej liečby (Brorson a Brorson, 1998). Pri priaznivých podmienkach pre baktériu dochádza k vzniku infiltrátov cievnej steny a perivaskulárnych priestorov, čo umožňuje perzistenciu spirochét rádovo i niekoľko rokov (Meier a Grehl, 1988).

V súčasnosti sa doporučuje, že správna liečba pozostáva z **prvotnej eliminácie koinfekcie**. (Nadelman a spol., 1997). Keď boli eliminované koinfekcie, je potrebné eliminovať baktérie jednak **v krvnom riečisku, intracelulárne a v cystickej forme**.

Antibiotiká tetracyklínovej rady, penicillinovej rady a cefalosporíny sú väčšinou schopné eradikovať baktérie v krvnom riečisku (Donta, 1997). Makrolidy ako Rulid (Roxytromycin),

Zitromax (Azytromycin) a Klacid (Klaritromycin) sú požívané intracelulárne (Donta, 2003). Flagyl (Metronidazol), Fasigyn (Tinidazol, Fluconazol) a Plaquenil (Chloroquine) sú účinné na cystickú formu (Brorson a Brorson, 1999).

Výhodou kombinovanej liečby je zabránenie vytvorenia bakteriálnej rezistencie. Doterajšie klinické skúsenosti poukazujú, že pacient by mal byť aspoň 2 mesiace bez ťažkostí pred ukončením antibiotickej liečby. V prípade pretrvávania ťažkostí, je potrebné vylúčiť inú príčinu (Donta, 2003).

V texte dole informujeme o prípravkoch, ktoré sa uplatňujú pri liečbe rôznych štádií lymskej choroby a koinfekcie. Táto liečba odráža skúsenosti prevažne amerických autorov u pacientov s lymskou boreliózou.

8.2. Prehľad antibiotickej a chemoterapeutickej liečby:

Antibiotiká tetracyklínovej a penicilínovej rady – včasná fáza (Burrascano, 2008).

Doryx; Terramycin; Vibramycin,	Doxycycline	300-600 mg/deň
Doxybene	Tetracycline	1500-2000 mg/deň
Doxyhexal		
Minocin; a pod.	Minocycline	200-400 mg/deň

Uvedené vyššie dávky sú potrebné, aby sa dosiahla baktericídnosť a aby bol zabezpečený prestup hematolikvorovou bariérou. Doxycyclin je často prvá voľba v liečbe, nakoľko eliminuje koinfekciu erlichiami/anaplazmami.

Amoxil; Biomox; Polymox;	Amoxicillin , Ampicillin	1500-4000 mg/deň
--------------------------	--------------------------	-------------------------

Antibiotiká penicilínovej rady – včasná diseminovaná forma (Wormser a spol, 2003).

Ceftin, Ceclor	Cephalosporin	3 x1000 mg/deň
Rocephin	Ceftriaxone Sodium	1x2000 mg/deň
Lendacin	Ceftriaxone	1x2000 mg/deň

Makrolidy – včasná diseminovaná forma (Donta, 2003, Burrascano, 2008).

Rulid, Rothricin	Roxithromycin	2x300 mg /deň
Zithromax	Azithromycin	250 mg – 600 mg/deň
Klacid	Clarithromycin	1500 mg/deň

Prechádzajú hematolickorovou bariérou, pôsobia na intracelulárnej úrovni ak sa kombinujú s Trimethoprim-sulfamethaxozolom sú účinné na liečbu babeziozy.

Antiparazitiká– včasná aj chronická diseminovaná forma (Brorson a Brorson, 2002, Burrascano, 2008,).

Plaquenil	Chloroquine	200 mg – 400 mg /deň
	Hydroxychloroquine	

Plaquenil sa v kombinácii s Doxycyklinom s Clarithromycinom používa na liečbu cystickej formy lymfatickej choroby.

Chemoterapeutiká – včasná aj chronická diseminovaná forma (Brorson a Brorson, 1999, Klein a Cunha, 2001, Burrascano, 2008).

Flagyl	Metronidazole	2x 750 mg / deň
Fasigyn	Tinidazole	1500 mg - 3000 mg / deň

Tieto látky sa používajú na liečbu cystickej formy Lymfatickej choroby, nemali by sa užívať s tetracyklínom. Používajú sa radšej v kombinácii s cefalosporínmi.

Ansamycínové antibiotiká– včasná aj chronická diseminovaná forma (Burrascano, 2008).

Rifadin, Rimactane	Rifampicin	1200 mg / deň
--------------------	------------	----------------------

Užíva sa v kombinácii s Doxycyklinom ako liečba koinfekcií bartonellou a ehrlichiou.

Aminoglykozidy – včasná aj chronická diseminovaná forma (Burrascano, 2008).

Tobradex	Tobramycin/Dexamethasone	
Gentamycin	Gentamycin	

Obe sú vhodné na liečbu koinfekcie bartonellou.

Hypolipidemiká- chronická diseminovaná forma (Shoemaker a spol., 2005).

Questran (cholestyramine) obvykle 1 tbl 4x denne

Predpokladá, sa že podieľa na odstraňovaní toxínov, ktoré vylučujú spirochéty B. burgdorferi.

Antimykotika – včasná aj chronická diseminovaná forma (Schardt, 2004).

Mycostatin; Mycostatin Pastilles; Nystatin

Nilstat; Nystex Diflucan Fluconazole **200 mg/deň**

Tieto látky sa používajú na kvasinkové infekcie a liečbu cystickej formy lymfatickej choroby

Imunologická liečba – chronická diseminovaná forma (Katz, 2009, Wilner, 2009).

IMUNOGLOBULINY IVEGA **2g/kg 1x mesačne v dĺžke 6 mesiacov**

8.3. Alternatívne spôsoby liečby

Novšie sa skúša liečba pomocou:

Hyperbaric Oxygen Treatment (HBOT) Je to liečba, ktorá sa deje vo vysokotlakovej kyslíkovej komore.
Hyperbarická kyslíková liečba

ICHT (internal heat by use of Dinitrophenol, Usnic acid) Je to experimentálny liečebný postup pre lym. chorobu, kde sa zvyšuje intracelulárna teplota na hladiny dostačujúce na zabitie spirochét.
Intracelulárna hypertermická liečba pri použití Dinitrophenolu alebo kys. Urónovej (vzniká enzymat. oxidáciou glukózy)

Tzv. Rife Machine Je to terapia, ktorá zahŕňa vyslanie slabého elektrického prúdu pri rôznych frekvenciách.

Alternatívne spôsoby liečby sa môžu aplikovať ako doplnková liečba popri antibiotickej liečbe. V súčasnosti sú však tieto prístupy ešte len v štádiu overovania (Taylor a Simpson, 2005).

9. Ciele dizertačnej práce

Lymfská borelióza je multisystémové ochorenie s heterogénnou klinickou symptomatológiou. Laboratórna diagnostika naráža na mnohé problémy vzhľadom na jej nedostatočnú špecifickosť a senzitivitu a jedným z problémov je aj diagnostika u pacientov najmä s chronickou formou ochorenia a s negatívnym skriningovým vyšetrením na prítomnosť protilátok proti *B. burgdorferi*.

PCR vyšetrenie nepatrí medzi štandardné postupy. U neurologických pacientov jej záchytnosť je nízka, najmä u chronických foriem, na druhej strane PCR pozitivita sa zistila aj u pacientov s inou diagnózou. S neurologickými ochoreniami sa najčastejšie spája genomospecies *B. garinii*, ktorá v našich oblastiach sa najčastejšie vyskytuje aj u kliešťov.

Vzhľadom na problémy so stanovením diagnózy u týchto pacientov sme sa zamerali na zlepšenie diagnostiky rozšírením laboratórných vyšetrovacích metód, aj za použitia genetických metód a s overovaním ich významu. Cieľom našej práce bolo zhodnotiť:

1. využitie konfirmačného testu-westernblotu a imunologického vyšetrenia pre stanovenie diagnózy ochorenia u pacientov s dlhotrvajúcimi ťažkosťami a s podozrením na lymfskú boreliózu,
2. prínos imunomodulačnej liečby a ďalších postupov v terapii diseminovanej formy lymfskej boreliózy.
3. využitie PCR diagnostiky u pacientov s podozrením na neuroboreliózu a identifikácia jednotlivých genomospecies *B. burgdorferi* a ich vzťah ku klinickému ochoreniu.

10. Materiál a metódy

Pacienti

Celkovo sme vyšetrovali 238 pacientov s podozrením na lymskú boreliózu. Klinická diagnóza bola založená na epidemiologickej anamnéze a klinickej symptomatológii (Blanck a spol., 2007, Stanek a spol., 2011) a pri stanovení konečnej diagnózy sme sa opierali o kritériá EUCALB (2011). Pacienti boli rozdelení do 3 skupín:

1. skupinu tvorilo 77 pacientov (M:40 a Ž:37) s priemerným vekom 43,8 rokov. Boli to pacienti s dlhotrvajúcimi ťažkosťami, kde klinicky diferenciálne diagnosticky prichádzala do úvahy LB ale skriningové testy na prítomnosť protilátok ELISA, IFT proti *B. burgdorferi* boli negatívne, preto sme doplnili základné vyšetrenie westernblotom anti *B. burgdorferi* IgG a imunologickým vyšetrením.

Overovali sme prínos konfirmačného testu – westernblotu a imunologického vyšetrenia pre stanovenie diagnózy lymskej boreliózy.

2. skupinu tvorilo 179 pacientov s diseminovanou formou lymskej boreliózy, ktorých sme rozdelili do 2 podskupín:
 - I. podskupinu tvorilo 73 pacientov s dg. lymská borelióza včasná diseminovaná forma (M:44, Z:29) s priemerným vekom 42,7 rokov,
 - II. podskupinu tvorilo 106 pacientov s dg. lymská borelióza chronická diseminovaná forma (M:44, Z:62) s priemerným vekom 45,6 rokov.

Overovali sme možné ďalšie postupy v terapii diseminovanej formy LB, s využitím imunomodulačnej liečby.

3. skupinu tvorilo 82 pacientov (M:39, Z:43) s priemerným vekom 50,6 rokov, s podozrením na neuroboreliózu, u ktorých sme robili kompletne klinické a laboratorné vyšetrenia, vrátane stanovenia protilátok proti *B. burgdorferi* v likvore (intratekálna tvorba) a prítomnosti antigénov polymerázovou reťazovou reakciou (PCR). Overovali sme význam PCR diagnostiky a stanovenia genomospecies *Borrelia burgdorferi* s.l vo vzťahu ku klinickej diagnóze.

Imunologické vyšetrenie

sme realizovali v spolupráci s oddelením klinickej imunológie FN a UNB, resp. s niektorými neštátnymi imunologickými ambulanciami, pevažne s MUDr. M. Ondrišovou.

Imunologické vyšetrenie na bunkovú a humorálnu imunitu pozostávalo z testov:

- stanovenia *monoklonálnych CD protilátok*- metódou prietokovej cytometrie,
- *vyšetrenia autoprotilátok IFT metódou* - proti jadram buniek (ANA), proti bazálnym membránam (ABMA), proti bazálnym membránam glomerulov (ABMG), proti bazálnym membránam tubulov (ABMT), proti mitochondriám (AMA), proti srdcovému svalu (AMCA), proti neutrofilným leukocytom (ANCA), proti jadierkam (ANLA), proti parietálnym bunkám (APCA), proti retikulínu (ARA), proti priečne pruhovaným svalom (ASKmA), proti hladkému svalu (ASMA), proti štítnej žľaze (ATA), proti cievnemu endotelu (AVEA) (Atassi MZ a spol., 2008).

Stanovenie protilátok proti antigénom *B. burgdorferi*

sme realizovali v spolupráci s Ústavom epidemiológie LFUK (doc. MUDr. S. Bazovská, CSc).

Stanovenie protilátok v sére. Skriningové vyšetrenia na prítomnosť antiboreliových protilátok sa robili testom nepriamej imunofluorescencie (IFT) s endemickými antigénmi *B. burgdorferi* (Kmetz, 2000) a stanovením celkových protilátok (IGAM), resp. IgG a IgM. Pri teste ELISA sme využívali komerčný test ELISA Euroimmun IgG a IgM s Vls antigénom.

Westernblot. U pacientov s hranične pozitívnym testom, s klinicky nejasnými príznakmi, resp. u pacientov s negatívnym výsledkom skriningových testov sme vyšetrenie doplnili konfirmačným testom Westernblot Euroimmun IgG na stanovenie špecifických protilátok proti jednotlivým antigénom.

Stanovenie protilátok v likvore Skriningové vyšetrenie sme robili IFT a stanovenie intratekálnej tvorby protilátok (IA) testom ELISA Euroimmun. IgG pre stanovenie protilátok v likvore, po porovnaní hladín protilátok v sére a likvore (Oschman a spol., 1997).

Stanovenie prítomnosti antigénov *B. burgdorferi* v likvore PCR

Vyšetrenie sa robilo na Ústave mikrobiológie LF UK (RNDr. Záborská). Na dôkaz prítomnosti borélií sa použil komerčný kit –AMPLISENS- *Borrelia burgdorferi* s.l. – (E.coli) založený na detekcii 16SrRNA *Borrelia burgdorferi* s.l.

Stanovenie genomospecies sa robilo v spolupráci s MVDr. M. Derdakovou, PhD (SAV Bratislava). Izolácia DNA sa robila s easy tissue Qiagen kitom a diagnostika *rrf(5S)* nested PCR s aplikáciou intergénového medzerníka *5S-23 RNA* a s využitím 4 prajmerov podľa Rijpkema a spol. (1995). Výsledky sa overovali v Referenčnom laboratóriu pre lymfskú boreliózu ČR v Prahe (RNDr. D. Hulínská, CSc).

11. Výsledky

Výsledky imunologického vyšetrenia a westernblotu u pacientov s negatívnym skriningovým vyšetrením na prít. protilátok proti *Borrelia burgdorferi* s.l. Tieto sú zhrnuté v nasledujúcich publikáciách.

Bratisl Lek Listy 2010; 111 (3)

153–155

CLINICAL STUDY

Our experience with examination of antibodies against antigens of *Borrelia burgdorferi* in patients with suspected Lyme disease

Durovska J¹, Bazovska S², Ondrisova M³, Pancak J¹

1st Department of Neurology, Faculty of Medicine, Comenius University, Bratislava, Slovakia.
durovska@borelioza.sk

Abstract: *Background:* Lyme borreliosis is a multisystemic disease which affects several organs such as skin, nervous system, joints and the heart. The presented study focused on patients with persisting symptoms of the disease, which could be in correlation with Lyme disease but antiborrelial antibodies were not confirmed by screening tests.

Material and methods: 32 patients with anamnestic data and suspected clinical signs of Lyme borreliosis were tested for the presence of antiborrelia antibodies by using ELISA and westernblot analysis and the state of cellular and humoral immunity.

Results: All patients had specific antiborrelial antibodies confirmed by using the westernblot in spite of negative ELISA. Immunological investigations revealed a deficiency of cellular immunity in all patients and in a part of them (15.6 %) a deficiency of humoral immunity was also found. The presence of different types of autoantibodies was detected in 17 (53.1 %) patients.

Conclusion: In patients with persisting difficulties that could be associated with Lyme disease, it is necessary to use the westernblot test which could prove the presence of specific antibodies. It is probably due to the very low production of specific antibodies caused also by the status of immune deficiency detected in all our patients (Tab. 1, Ref. 11). Full Text (Free, PDF) www.bmj.sk.

Key words: Lyme borreliosis, serological diagnosis, immunodeficiency.

Lyme borreliosis is the most common tick born disease in Europe. The extensive abundance of vectors of this disease (*Ixodes ricinus* ticks) and high prevalence of *B. burgdorferi* (2.1–41.7 %) (4, 10) places Slovakia to a high risk area.

Lyme borreliosis is a multisystemic disease which may affect several organs including skin, nervous system, joints and heart. The disease can have a subclinical or clinical course with symptoms varying from local changes to generalized forms or it can lead to a chronic form to which with high probability immunopathogenic mechanisms lead (9). The occurrence of recidivating symptoms is attributed to cystic forms of borrelia potentially developing when the bacteria encounter unfavourable conditions enabling their survival despite antibiotic treatment (2). The overall clinical picture is broad and may suggest many other diseases as it presents with a wide variety of differential diagnostic ideas. Diagnosis is a result of complex evaluation of the clinical picture, epidemiological data, and microbiological examination. Additionally, in neurological patients, spinal fluid examination

and magnetic resonance imaging examination (MRI) of the brain are also necessary. Microbiological diagnosis is based on presence of specific antibodies in serum which suggests infection with *B. burgdorferi* and a possible development of Lyme disease.

One of the most common screening tests is ELISA, used for detection of antibodies against *B. burgdorferi* (11), which enables to evaluate a large amount of samples and its accurate interpretation. As a confirmatory test westernblot (WB) is used, this allows to specify the immune response. During diagnosis of the disease it is necessary to consider that we don't have to capture antibodies against *B. burgdorferi* and a negative examination of antibodies against *B. burgdorferi* doesn't exclude the diagnosis of Lyme borreliosis. The antibodies are not always present in early stages of the disease, in the presence of immunocomplexes, or in patients with insufficient ability to create antibodies. There is a number of cases of patients immunosuppressed after chemotherapy or with a different disease who showed numerous symptoms which could be caused by *B. burgdorferi* infection but serologically they were negative. Diagnosis was concluded only after positive cultivation examination or polymerase chain reaction (PCR) (3, 5, 6). In some patients with negative screening tests for presence of antiborrelia antibodies the presence of specific antibodies was concluded and proven by using westernblot (7).

In our work we have focused on patients with persisting symptoms of the disease, which could be in correlation with Lyme disease but the presence of antiborrelial antibodies was not found by using screening tests.

¹1st Department of Neurology, Faculty of Medicine, Comenius University, Bratislava, Slovakia, ²Institute of Epidemiology, Faculty of Medicine, Comenius University, Bratislava, Slovakia, and ³Private Immunological and Allergology Clinic, Bratislava, Slovakia

Address for correspondence: J. Durovska, MD, 1st Dept of Neurology, Faculty of Medicine, Comenius University, Mickiewiczova 13, SK-813 69 Bratislava, Slovakia

Acknowledgement: The work was supported partially by GRANT VEGA No 1/4282/7 and 1/4281/07 of the Slovak Republic.

Tab. 1. Patients with false negative screening tests for presence of antibodies against antigen *B. burgdorferi*.

	Name	Sex	Age	ELISA	WB	Immunol.	Autoantibodies*	Tick/year**	EM	ATB***
1	B.S.	F	29	negat.	pozit.	ID-c	negat.	2005		Azitrox 250 mg/3days
2	R.M.	F	11	negat.	pozit.	ID-c	negat.	2005		Rocephin 28 days
3	T.Š.	M	52	negat.	pozit.	ID-c	negat.	2002		Penicilin 14 days
4	H.M.	F	58	negat.	pozit.	ID-c	ANCA, ANA, ASKmA	2002		Summamed 3x3days
5	J.M.	F	59	negat.	pozit.	ID-c	AMA			0
6	B.R.	M	33	negat.	pozit.	ID-c	ATA	2004		Summamed 3x3days
7	T.T.	M	28	negat.	pozit.	ID-c	ASKmA	2005		0
8	B.P.	M	7	negat.	pozit.	ID-c,h	AMCA, ATA	2005	2005	Summamed 2x3days
9	K.J.	M	35	negat.	pozit.	ID-c	negat.	2006		Summamed 2x3days
10	S.I.	M	25	negat.	pozit.	ID-c	ASKmA	2004		Doxybene 1x200 mg/30days
11	S.L.	F	18	negat.	pozit.	ID-c	ASKmA			0
12	K.L.	M	42	negat.	pozit.	ID-c	AMCA, ABMA			0
13	P.M.	M	27	negat.	pozit.	ID-c	ABMG	2005		Summamed 2x3days
14	B.R.	M	74	negat.	pozit.	ID-c	AMCA, ANCA	2005		Doxycklin 2x100 mg/30days
15	A.A.	M	52	negat.	pozit.	ID-c	AMCA, ASKmA	2006	2006	Doxycklin 1x100 mg/33days
16	D.Š.	M	61	negat.	pozit.	ID-c,h	APCA, ATA	2000		Doxyhexal 200 mg/30days
17	K.R.	M	29	negat.	pozit.	ID-c	AMCA, ARA	2006		Summamed 2x3days
18	Š.R.	M	29	negat.	pozit.	ID-c	ASKmA			Azitrox 2x3days
19	S.M.	M	34	negat.	pozit.	ID-c	negat.	2006	2006	Doxybene 1x200 mg/21days
20	B.J.	M	58	negat.	pozit.	ID-c	negat.			0
21	Č.P.	F	15	negat.	pozit.	ID-c	negat.	2005		Penclen 1 month
22	B.K.	F	62	negat.	pozit.	ID-c	negat.	1997	1997	Doxybene 2x100 mg/20 days
23	D.M.	M	38	negat.	pozit.	ID-c	negat.	2004	2004	Doxybene 2x100 mg/40 days
24	E.M.	F	61	negat.	pozit.	ID-c	ANA	1997		Summamed 40 days
25	K.M.	F	51	negat.	pozit.	ID-c,h	ANA	2002	2002	Lendacin 2g/i.v.21days
26	M.A.	M	23	negat.	pozit.	ID-c,h	negat.	2003		Doxycklin 2x100 mg/7days
27	S.A.	F	54	negat.	pozit.	ID-c	ATA, AMCA	1988		Summamed 5days
28	Š.L.	F	15	negat.	pozit.	ID-c	negat.			Summamed 5days
29	T.M.	F	55	negat.	pozit.	ID-c	negat.		2004	Lendacin 2g/i.v.28days
30	K.P.	M	55	negat.	pozit.	ID-c,h	negat.	2005	2005	Ceroxim 500 mg/3x1/42days
31	R.M.	F	73	negat.	pozit.	ID-c	negat.	2006		Lendacin 2g/i.v.15days
32	J.V.	F	21	negat.	pozit.	ID-c	negat.	2006		Deoxyymkoin 2x100 mg/21days

ID-c – cellular immunity disorder, ID-c,h – humoral and cellular immunity disorder, * antibodies against cell nuclei (ANA), basal membranes (ABMA), basal membrane of glomeruli (ABMG), mitochondria (AMA), myocardium (AMCA), neutrophil leukocytes (ANCA), parietal cells (APCA), reticulin (ARA), striated muscle (ASKmA), thyroid gland (ATA), ** year in which the tick bite occurred, *** previous treatment with antibiotics

Material and methods

Patients. A group of 32 patients (18 male, 14 female with average age of 40.1 years) with multiple long-lasting symptoms such as arthralgias, myalgias, headaches, fatigue, and increased exhaustion was negative by using the screening test for antibodies against *B. burgdorferi*

Epidemiological anamnesis was oriented on data regarding tick bites during the previous years, presentation symptoms compatible with erythema migrans and previous treatments with antibiotics.

Determination of antibodies. To determine antibodies against antigens of *B. burgdorferi* in serum commercial test ELISA Anti-Borrelia plus VLsE IgG Euroimmun was used. Additionally, all sera were tested using westernblot Anti-Borrelia Euroline IgG.

Immunological examination. The state of cellular and humoral immunity was determined in all patients. The numbers of (the number of CD3+ T Lymphocytes, CD3+CD4+ T Lymphocytes, CD3+CD8+ T Lymphocytes, CD4/CD8, CD3-CD16+56+NK Cell, CD19+ B Lymphocytes) cells were determined using specific monoclonal antibodies by means of flow cytometry analysis (autoantibodies against cell nuclei (ANA), basal mem-

branes (ABMA), basal membrane of glomeruli (ABMG), basal membrane of tubuli (ABMT), mitochondria (AMA), myocardium (AMCA), neutrophil leukocytes (ANCA), nucleoli (ANLA), parietal cells (APCA), reticulin (ARA), striated muscle (ASKmA), smooth muscle (ASMA), thyroid gland (ATA), vascular endothelium (AVEA) (1).

Results

All the important data are summarized in Table 1, which include patients demographic data, results of determination of antiborrelial antibodies and immunological tests, exposure to ticks, symptoms compatible with erythema migrans and type of antibiotics used for the treatment before. All patients had specific antiborrelial antibodies confirmed by the westernblot, conversely negative screening test. Immunological investigations showed that all of them (100 %) had immunodeficiency and in some cases (15.6 %) also a deficiency of humoral immunity. Moreover, the presence of different types of autoantibodies was detected in 17 patients (53.1 %). 25 (78.1 %) patients had anamnesis of tick bite. Erythema migrans has been present only in 8 (25 %) patients. 27 (84.4 %) patients had previous antibiotic treatment. According to these findings patients were classified as suspected Lyme disease, disseminated chronic form, further examination and observation required.

Discussion

Immunological tests of patients with false negative screening tests to prove antiborrelial antibodies and with confirmed specific antibodies by using westernblot, have proven in all patients some immunological disorders which could explain insufficient productions of antibodies. Patients had often references in their anamnesis about tick bites and some were even treated for Lyme disease, but according to the negative screening test for antibody presence their lurking difficulties were not connected with a possible borrelia infection. Large variability of clinical picture with Lyme borreliosis and the presence of easier or asymptomatic forms make the diagnosis of this disease difficult. Our results of antibody examination confirm experiences with a problematic value of the specific antibodies against *B. burgdorferi* using ELISA kits, especially in some patients. When testing for antibodies it is necessary to consider the potential for false negativity of screening tests (8), the heterogeneity of the agents of Lyme borreliosis in Europe (4), variability of antibody-based responses of human organism. In some patients the presence of specific antibodies can be in the amount under upper limit of the screening test. It is also necessary to consider the fact that diagnostic tests used are not standardized and results of various commercial tests does not have to be the same, especially with lower antibody-based response of the organism.

Diagnosis of chronic form of Lyme borreliosis is difficult. There are no reliable and generally accepted diagnostic criteria.

In a lot of cases the only criteria used are positive anamnesis and presence of specific antibodies. In some cases more clinical and laboratory tests can support diagnosis of chronic borreliosis. One of the possible explanations of immunological insufficiency in our patients is affection of immune system by untreated or insufficiently treated infection of *B. burgdorferi*. Considering the immunological insufficiency in these patients it would be advisable to think about supportive immunotherapy.

This study suggests negative diagnostic tests for presence of antiborrelial antibodies may be caused by immunological insufficiency. In patients who present with persistent symptoms clinically associated with Lyme borreliosis westernblot test should be performed which may confirm the presence of specific antibodies.

References

1. Atassi MZ, Casali P. Molecular mechanisms of autoimmunity. *Autoimmunity* 2008; 41 (2): 123—132.
2. Brorson O, Brorson S. An in vitro study of the susceptibility of mobile and cystic forms of *Borrelia burgdorferi* to Metronidazole. *APMIS* 1999; 107 (6): 566—576.
3. Dejmková H, Hulínska D, Tegzová D, Pavelka K, Gatterová J, Vavřík P. Seronegative Lyme arthritis caused *Borrelia garinii*. *Clin Rheumatol* 2002; 21 (4): 330—334.
4. Derdákova M, Lenčáková D. Association of genetic variability within *Borrelia burgdorferi* sensu lato with the ecology, epidemiology of Lyme borreliosis in Europe. *Ann Agric Environ Med* 2005; 12: 165—172.
5. Harrer T, Geissdörfer W, Schoerner C, Lang E, Heim G. Seronegative Lyme neuroborreliosis in patient on treatment for chronic lymphatic leukemia. *Infection* 2007; 35 (2): 110—113.
6. Holt-Wieden A, Suerbaum S, Girschick HJ. Seronegative Lyme arthritis. *Reumatol Int* 2007; 27: 1091—1093.
7. Honegr K, Hulínska D, Dostál V, Gebouský P, Hanková E, Horáček J, Vysložil L, Havlasová J. Perzistencia *Borrelia burgdorferi* sensu lato u pacientov s lymeskou borreliózou. *Epidem Mikrobiol Imunol* 2001; 50 (1): 10—16.
8. Kaiser R. False negative serology in patients with neuroborreliosis and the value of employing of different borrelial strains in serological assays. *J Med Microbiol* 2000; 49 (10): 911—915.
9. Rupprecht TA, Koedel U, Fingerle V, Pfister HW. The pathogenesis of Lyme neuroborreliosis — from infection to inflammation. *Mol Med* 2008; 14 (3—4): 205—212.
10. Smatanová K, Burri C, Pérez D, Gern L, Kocianová E. Detection and identification of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies in ticks from three different regions in Slovakia. *Wien Klin Wschr* 2008; 119 (17—18): 534—537.
11. Wilske B, Fingerle V, Schulte-Spechtel U. Microbiological and serological diagnosis of Lyme borreliosis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2007; 49: 13—21.

Received June 18, 2009.
Accepted January 5, 2010.

Príspevok k diagnostike lysmej boreliózy – chronická forma, význam imunologického vyšetrenia

Abstrakt:

Lysmeá choroba (borelióza) je multisystémové infekčné ochorenie. Prejavom skoréj infekcie je erythema migrans – makulopapulózny erytém veľkosti asi 15 cm, ktorý sa objaví o niekoľko dní až týždňov po zaklieštení. Neskorá lysmeá borelióza sa manifestuje pri nestotočnej liečbe o niekoľko mesiacov až rokov po infekcii a môže atakovať kĺby (lysmeá artritída), kožu (acrodermitis chronica atrophicans), alebo nervový systém, alebo srdce. V práci sa snažíme upozorniť, že pri negatívnom serologickom vyšetrení na prítomnosť protilátok proti *B. burgdorferi* a pri klinickom podozrení na diagnózu lysmej boreliózy je potrebné doplniť vyšetrenie konfirmačným testom – western blotom a imunologickým vyšetrením, ktoré by nás informovalo o bunkovej a humorálnej imunite. V prípade pozitivity western blotu a prítomnosti neurologických obtiaží a psychologických zmien, je potrebné realizovať i vyšetrenie cerebrospinálneho likvoru, MR mozgu a niektoré ďalšie pomocné vyšetrenia, ktoré nás informujú o stave možného neurologického ochorenia, za účelom možnej ďalšej antibiotickej a imunomodulačnej terapie.

Kľúčové slová: lysmeá choroba, erythema migrans, chronická forma, stanovenie protilátok a význam imunologického vyšetrenia

Đurovská J., Bazovská S., Ondrišová M., Pancák J.: Diagnostics of Lyme borreliosis – chronic form, importance of immunological tests

Abstract:

Lyme disease (borreliosis) is a multisystemic infectious disease. Early manifestation of infection is erythema migrans – maculopapular erythema of about 15 cm, which occurs a few days to weeks after tick bite. Late Lyme disease is manifested after insufficient treatment for several months to years after infection and can attack the joints (Lyme arthritis), skin (acrodermitis chronica atrophicans), or the nervous system, or the heart. In this paper, we note that after a negative serological test for antibodies to *B. burgdorferi* and the clinical diagnosis of suspected Lyme disease testing is necessary to add confirmation test – western blot and immunological examination, which would reported on the cellular and humoral immunity. In the case of western blot positivity and presence of neurological discomfort and psychological changes should a cerebrospinal fluid examination be implemented, brain MR and some other auxiliary tests that tell us about the state of the possible neurological disorders for possible further antibiotic and immunomodulatory therapy.

Keywords: Lyme disease, erythema migrans, chronic form, the determination of antibodies and the importance of immunological tests

Úvod

Lysmeá choroba (borelióza) je multisystémové infekčné ochorenie postihujúce najčastejšie kožu, kĺby, srdce a nervový systém. Etiologickým agensom je baktéria – spirochéta

Borrelia burgdorferi s.l., pričom v Európe dominuje genotyp *Borrelia afzelii*, vyvolávajúca najmä kožné prejavy, a *Borrelia garinii*, ktorá sa manifestuje najčastejšie neurologickými prejavmi. Prenášačom je najčastejšie kliešť *Ixodes ricinus*.

Prejavom skoréj infekcie je erythema migrans – makulopapulárny erytém veľkosti asi 15 cm, ktorý sa objaví o niekoľko dní až týždňov po zaklieštení. Včasné formy ochorenia sa prejavujú u 70 % všetkých hlásených prípadov (Bazovská a spol., 2005). Neskorším prejavom infekcie sú veľmi často artralgie a myalgie. Komplikáciou môže byť i myokarditída alebo perikarditída, ktoré môžu byť i prvou klinickou manifestáciou. U neliečených pacientov sa môžu objaviť i prejavy postihnutia nervového systému. Udáva sa, že v Európe sú poškodenia nervového systému relatívne častejšie. U neliečených pacientov sa objavujú v 40-60 % (Bojar, 1996). Izolovaná lézia tvároveho nervu sa ako samostatný príznak vyskytuje u 7 % pacientov s lysmeou chorobou a v endemických oblastiach až u 25 % (Halperin a spol., 1992). Popísané boli meningoencefalitidy, prípadne i polyradikuloneuritidy, psychologické zmeny v podobe depresii, chronického únavového syndrómu, panické ataky a podobne. Vyskytujú sa i radikulitidy, ktoré môžu imitovať vertebro – diskogénne podmienené radikulopatie (Pachner, 1991).

Neskorá lysmeá borelióza sa manifestuje pri nedostatočnej liečbe o niekoľko mesiacov až rokov po infekcii a môže atakovať kĺby (lysmeá artritída), kožu (acrodermitis chronica atrophicans), alebo nervový systém.

Chronická lysmeá artritída – jej výskyt je viac frekventovaný v USA ako v Európe (Halperin a spol., 2007). Typicky sa manifestuje ako intermitentná alebo chronická, mono alebo oligoartritída veľkých kĺbov, v zriedkavých prípadoch s eróziou chrupavky alebo kosti. Niekedy sa to vyvinie u pacientov, ktorí prekonali intermitentné artralgie alebo oligoartritidu v skorších štádiách ochorenia, ktoré prešli do chronicity. Najčastejšie postihnutým kĺbom je kolenný zhyb. Spofahli-vým dôkazom lysmej artritidy je kultivácia a DNA detekcia spirochét z kĺbového punktu.

Acrodermatitis chronica atrophicans (ACA) – ide o postupné trofické zmeny kože, spojené s jej zriadením a s presvitáním žilovej kresby. Najčastejšie sa objavuje u starších ľudí v nižších častiach končatin s modrastým zafarbením kože s postupnou epidermálnou atrofiou, ktorá sa manifestuje leskom a „papierovým“ vzhľadom. Tento prejav je spôsobený pretrvávajúcou aktívnou infekciou, živé spirochety boli izolované z biopsie kože pacientov s ACA až 10 rokov po prvotnej infekcii. ACA sa môže tak isto objaviť u mladých ľudí a nedávno bola publikovaná kazuistika 11 ročného pacienta s postihnutím všetkých štyroch končatin (Brzonova a spol., 2002).

Niektoré manifestácie lysmej choroby môžu pripomínať „Chronic fatigue syndróm“ (CFS), čiže chronický únavový syndróm. Iné môžu vzbudzovať podozrenie na fibromyalgiu. Niektorí americkí autori používajú aj pojem perzistujúca in-

fekcia, čiže Post-Lyme Disease Syndrom (Wormser a spol., 2006).

Tieto prejavy môžu byť spustené predchádzajúcou infekciou *B. burgdorferi*, ale v čase ich manifestácie nie sú prítomné príznaky aktívnej infekcie. Vyskytujú sa aj u preliečených pacientov, u ktorých došlo k remisii. Vyskytujú sa tiež psychiatrické ochorenia, ako sú poruchy osobnosti, poruchy pamäti, poruchy koncentrácie, depresie, psychózy, anorexia nervosa a panické ataky. Symptómy fibromyalgie a chronický únavový syndróm sa v súvislosti s lyskou chorobou môžu prejavovať ako ľahšie formy. Okrem toho aj ako chronické manifestácie chripky podobným syndrómom (Flu-like syndróm) spojených so skorou dissemináciou. Pomerne často sa v praxi neurologa vyskytuje klinický obraz disseminovaného poškodenia CNS, ktoré imponuje ako rozstrúsená skleróza a pritom ide o ochorenie súvisiace s lyskou boreliózou. Zvykne sa označovať ako SM-like syndróm (Reik, 1991, Halperin a spol., 1991). Magnetická rezonancia ukáže viacpočetné hyperintenzívne ložiská typické pre demyelinizáciu. Takéto ložiská však nie sú patognomické ani pre sclerosis multiplex, ani pre boreliózu, resp. iný zápalový demyelinizačný proces, (napr. infekcie herpetickým vírusom, morbillami).

Z uvedeného vyplýva, že neexistuje klinický obraz, ktorý by bol pre boreliózu patognomický.

Ciel práce

Diagnóza lyskej boreliózy by mala byť stanovená na podklade epidemiologickej anamnézy, klinického obrazu a výsledkov pomocných vyšetrení. Laboratórna diagnostika naráža na mnohé problémy, vzhľadom na jej nedostatočnú špecifitu a senzitivitu a jedným z problémov je aj diagnostika u pacientov s podozrením na chronickú formu ochorenia s negatívnym vyšetrením na prítomnosť protilátok proti *B. burgdorferi* (test ELISA, IFT). Cieľom našej práce bolo zhodnotiť prínos imunologického vyšetrenia pre stanovenie diagnózy a liečby lyskej boreliózy.

Materiál

Materiál tvorilo 77 pacientov (40 M a 37 Ž) s priemerným vekom 43,8 rokov, s podozrením na lyskú boreliózu - disseminovanú formu.

U všetkých sme po klinickom neurologickom vyšetrení realizovali stanovenie protilátok proti *B. burgdorferi* skríningovými vyšetreniami IFT, ELISA a konfirmačným testom westernblot. Imunologické vyšetrenie na bunkovú a humórnu imunitu pozostávalo z testov stanovenia monoklonálnych CD protilátok metódou prietokovej cytometrie a vyšetrenie autoprotilátok IFT metódou - proti jadrom buniek (ANA), proti bazálnym membránam (ABMA), proti bazálnym membránam glomerulov (ABMG), proti bazálnym membránam tubulov (ABMT), proti mitochondriám (AMA), proti srdcovému svalu (AMCA), proti neutrofilným leukocytom (ANCA), proti jadričkám (ANLA), proti prietálnym bunkám (APCA), proti retikulínu (ARA), proti priečne pruhovanému svalom (ASKmA), proti hladkému svalu (ASMA), proti štitnej žľaze (ATA), proti cievnemu endotelu (AVEA), (Atassi MZ a spol., 2008).

Na základe výsledkov sme rozdelili pacientov do troch

skupín. V 1. skupine boli pacienti s negatívnym ELISA a IFT testom a pozitívnym westernblot testom. V 2. skupine boli pacienti s pozitívnym ELISA, IFT a westernblot testami a v 3. skupine mali pacienti IFT, ELISA a westernblot testy negatívne.

Výsledky

I. skupina

Tab.č.1 Výsledky vyšetrení pacientov I.skupiny

V I. skupine 32 pacientov (18 mužov, 14 žien s priemerným vekom 40,1) bol výsledok IFT a ELISA negat, ale westernblotu anti *B. burgdorferi* bol pozitívny. Imunologické vyšetrenie poukazyvalo u všetkých (100 %) na imunodeficientný stav - poruchu celulárnej imunity a u niektorých aj humórálnej imunity. U 17 (53,1 %) pacientov bola prítomná pozitívna autoprotilátok. 25 (78,1 %) pacientov udávalo poštípacie kliešťom, 8 (25 %) pacientov malo v anamnéze erytéma chronicum migrans, 30 (93,6 %) pacientov bolo po preliečení antibiotickou liečbou v anamnéze (tab.č.1). V klinickom obraze boli artralgie, myalgie, bolesti hlavy, celková únava, zvýšená vyčerpanosť. Pacienti boli po kompletnom vyšetrení diagnosticky uzavretí ako lyská borelióza disseminovaná chronická forma.

II. skupina

Tab.č.2 Výsledky vyšetrení pacientov II.skupiny

V II. skupine bolo 28 pacientov (15 mužov, 14 žien s priemerným vekom 48,6), ktorí mali pozitívny IFT, ELISA (100 %), westernblot (100 %), 18 (64,2 %) pacientov malo imunodeficientný stav a 11 (39,2 %) pacientov malo pozitívnu autoprotilátok. 25 (89,2 %) pacientov malo anamnézu poštípacia kliešťom, 17 (60,7 %) pacientov malo erytéma chronicum migrans, 17 (60,7 %) pacientov bolo po preliečení

I skupina										
Meno	Pohlavie	Vek	ELISA	WB	Imunol.	Autoprotilátky	Kliešť/rok	ECH	MATB	
1.B.S.	Ž	29	negat.	pozit.	ID-c	negat.	2005	0	Azitrox	250mg/3dni
2.R.M.	Ž	11	negat.	pozit.	ID-c	negat.	2005	0	Rocphin	28 dni
3.T.S.	M	52	negat.	pozit.	ID-c	negat.	2002	0	Penicilin	14 dni
4.H.M.	Ž	58	negat.	pozit.	ID-c	ANCA, ANA, ASKmA	2002	0	Summamed	3x3dni
5.J.M.	Ž	59	negat.	pozit.	ID-c	AMA	0	0	0	0
6.B.R.	M	33	negat.	pozit.	ID-c	ATA	2004	0	Summamed	3x3dni
7.T.T.	M	28	negat.	pozit.	ID-c	ASKmA	2005	0	0	0
8.B.P.	M	7	negat.	pozit.	D-c,h	AMCA, ATA	2005	2005	Summamed	2x3dni
9.K.J.	M	36	negat.	pozit.	ID-c	negat.	2006	0	Summamed	2x3dni
10.S.T.	M	25	negat.	pozit.	ID-c	ASKmA	2004	0	Doxybene	1x200mg/30dni
11.S.L.	Ž	18	negat.	pozit.	ID-c	ASKmA	0	0	0	0
12.K.L.	M	42	negat.	pozit.	ID-c	AMCA, ABMA	0	0	0	0
13.P.H.	M	27	negat.	pozit.	ID-c	ABMG	2005	0	Summamed	2x3dni
14.B.R.	M	74	negat.	pozit.	ID-c	AMCA, ANCA	2005	0	Doxycline	2x100mg/30dni
15.A.A.	M	52	negat.	pozit.	ID-c	AMCA, ASKmA	2006	2006	Doxycline	1x100mg/33dni
16.D.S.	M	61	negat.	pozit.	ID-c,h	APCA, ATA	2000	0	Doxyhexal	200mg/30dni
17.K.R.	M	29	negat.	pozit.	ID-c	AMCA, ARA	2006	0	Summamed	2x3dni
18.S.R.	M	29	negat.	pozit.	ID-c	ASKmA	0	0	Azitrox	2x3dni
19.S.M.	M	34	negat.	pozit.	ID-c	negat.	2006	2006	Doxybene	1x200mg/21dni
20.B.J.	M	58	negat.	pozit.	ID-c	negat.	0	0	0	0
21.C.P.	Ž	15	negat.	pozit.	ID-c	negat.	2005	0	Penclen	1 mesiac
22.B.K.	Ž	62	negat.	pozit.	ID-c	negat.	1997	1997	Doxybene	2x100mg/20 dni
23.D.M.	M	38	negat.	pozit.	ID-c	negat.	2004	2004	Doxybene	2x100mg/40 dni
24.E.M.	Ž	61	negat.	pozit.	ID-c	ANA	1997	0	Summamed	40 dni
25.K.M.	Ž	51	negat.	pozit.	ID-c,h	ANA	2002	2002	Lendacin	2gfl.v.21dni
26.M.A.	M	23	negat.	pozit.	ID-c,h	negat.	2003	0	Doxycline	2x100mg/7dni
27.S.A.	Ž	54	negat.	pozit.	ID-c	ATA, AMCA	1988	0	Summamed	5dni
28.S.L.	Ž	15	negat.	pozit.	ID-c	negat.	0	0	Summamed	5dni
29.T.M.	Ž	55	negat.	pozit.	ID-c	negat.	0	2004	Lendacin	2gfl.v.28dni
30.K.P.	M	55	negat.	pozit.	ID-c,h	negat.	2005	2005	Ceroxim	500mg/3x1/42dni
31.R.M.	Ž	73	negat.	pozit.	ID-c	negat.	2006	0	Lendacin	2gfl.v.15dni
32.J.V.	Ž	21	negat.	pozit.	ID-c	negat.	2006	0	Deoxymycin	2x100mg/21dni

Tab. 1

II skupina										
Meno	Pohlavie	Vek	ELISA	WB	Imunol.	Autoprotitilátky	Kliešť/rok	ECHM	ATB	
1 K.L.	Ž	58	pozit.	pozit.	ID-c	ASKmA, ATA	2000	2000	Lendacin 2g/v.-21dni	
2 M.J.	Ž	48	pozit.	pozit.	negat.	negat.	2002	0	0	
3 H.A.	Ž	48	pozit.	pozit.	ID-c	negat.	1996	0	0	
4 H.I.	Ž	40	pozit.	pozit.	ID-c-h	ATA, ANCA	1997	1997	0	
5 L.M.	M	46	pozit.	pozit.	ID-c	negat.	2005	2005	Summamed 11dni	
6 P.B.	Ž	54	pozit.	pozit.	ID-c	negat.	1999	0	Summamed 3x3dni	
7 A.O.	M	56	pozit.	pozit.	negat.	negat.	1992	1992	Rulit 10 dni	
8 R.D.	Ž	24	pozit.	pozit.	ID-c	ANCA	0	0	0	
9 S.J.	M	58	pozit.	pozit.	negat.	negat.	2004	2004	0	
10 K.M.	Ž	38	pozit.	pozit.	ID-c	AMCA	2001	2001	0	
11 J.K.	Ž	20	pozit.	pozit.	ID-c	AMCA, ASKMA	2005	2005	Doxyhexal 100mg/20dni	
12 Š.K.	M	56	pozit.	pozit.	negat.	negat.	2005	0	0	
13 K.A.	Ž	52	pozit.	pozit.	negat.	negat.	2005	2005	Amoxicilin 21 dni	
14 D.V.	Ž	59	pozit.	pozit.	negat.	negat.	2005	2005	Summamed 3x3dni	
15 M.Z.	Ž	70	pozit.	pozit.	negat.	negat.	2005	2005	Summamed 3x3dni	
16 S.I.	Ž	47	pozit.	pozit.	ID-c	ATA, ANA, ANA, ASMA, ASKMA	2006	2006	Penicilin 750mg/7dni	
17 T.L.	M	59	pozit.	pozit.	ID-c	negat.	0	0	0	
18 Z.L.	M	29	pozit.	pozit.	ID-c	negat.	2005	0	Doxybene 1x200mg/28dni	
19 H.E.	Ž	75	pozit.	pozit.	negat.	negat.	0	0	0	
20 P.T.	M	20	pozit.	pozit.	ID-c	AMCA	2000	2000	Amoksklav 625mg 2x1-10dni	
21 X.R.	M	40	pozit.	pozit.	ID-c	negat.	2006	2006	Doxyhexal 200mg/20dni	
22 Š.M.	M	42	pozit.	pozit.	ID-c	ASKMA, ANCA	2003	2003	Lendacin 2g/v.-21dni	
23 M.L.	M	55	pozit.	pozit.	ID-c	AMCA	1996	0	0	
24 Š.J.	M	81	pozit.	pozit.	ID-c-h	negat.	2006	0	Summamed 6 dni	
25 P.M.	Ž	29	pozit.	pozit.	ID-c	negat.	2006	0	0	
26 P.D.	M	51	pozit.	pozit.	ID-c	ANCA	2004	2004	Deoxykoin 100mg/28dni	
27 M.R.	M	56	pozit.	pozit.	negat.	negat.	2004	2004	Deoxykoin 2x100mg/21dni	
28 S.A.	M	48	pozit.	pozit.	negat.	negat.	2003	2003	Doxybene 2x100mg/21dni	

Tab. 2

III skupina										
Meno	Pohlavie	Vek	ELISA	WB	Imunol.	Autoprotitilátky	Kliešť/rok	ECHM	ATB	
1 M.E.	Ž	46	negat.	negat.	ID-c	ASKmA	0	0	0	
2 H.M.	Ž	96	negat.	negat.	negat.	negat.	0	0	0	
3 K.R.	M	10	negat.	negat.	ID-c	ASKmA, AMCA	0	0	0	
4 Š.M.	Ž	18	negat.	negat.	negat.	negat.	2006	0	0	
5 B.M.	M	32	negat.	negat.	ID-c	negat.	2003	0	Amoksklav 2x1 g/v.-28	
6 H.Z.	Ž	57	negat.	negat.	negat.	negat.	2007	0	0	
7 P.A.	Ž	58	negat.	negat.	negat.	AMCA	0	0	0	
8 K.L.	Ž	64	negat.	negat.	ID-c	ATA	0	0	0	
9 P.A.	Ž	29	negat.	negat.	negat.	negat.	0	0	Ceroxim 500 mg 2x1-25	
10 M.G.	M	50	negat.	negat.	ID-c	AMCA, ANCA	1976	0	Doxycyklin	
11 A.J.	M	31	negat.	negat.	ID-c	ANCA	1992	1992	0	
12 K.J.	M	41	negat.	negat.	ID-c	ANCA, ASKmA, AMKA	2006	2006	Deoxykoin 28dni	
13 K.M.	Ž	39	negat.	negat.	ID-c	negat.	0	0	0	
14 B.V.	Ž	75	negat.	negat.	ID-c	AMCA, ANA	1979	0	0	
15 P.M.	M	24	negat.	negat.	ID-c	negat.	2005	2005	0	
16 I.D.	Ž	25	negat.	negat.	ID-c	ATA	0	0	0	
17 H.P.	M	41	negat.	negat.	negat.	negat.	2006	0	0	

Tab. 3

antibiotickou liečbou v anamnéze (tab.č.2). V klinickom obraze boli artralgie, myalgie, bolesti hlavy, celková únava, zvýšená vyčerpanosť.

Pacienti boli po kompletnom vyšetrení diagnosticky uzavretí ako lymská borelióza diseminovaná chronická forma.

III. skupina

Tab.č.3 Výsledky vyšetrení pacientov III.skupiny

V III. skupine 17 pacientov (7 mužov, 10 žien s priemerným vekom 43,6) bolo IFT, ELISA (100 %) aj westerblot negatívne (100 %), 11 (64,7 %) pacientov malo imunodeficientný stav a 9 (52,9 %) pacientov malo pozitívitu autoprotitilátok. 9 (52,9 %) pacientov mali anamnézu poštípania kliešťom, 3 (17,6 %) pacienti mali erytema chronicum migrans, 4 (23,5 %) pacienti boli po preliečení antibiotickou liečbou v anamnéze (tab.č.3). V klinickom obraze boli artralgie, myalgie, bolesti hlavy, celková únava, zvýšená vyčerpanosť. Pacienti boli po kompletnom vyšetrení diagnosticky uzavretí ako iné neurologické ochorenia.

Diskusia:

Diagnostický problém chronickej formy lymskej boreliózy je v tom, že vzhľadom na časový odstup, väčšina pacientov ako aj lekárov si neuvedomuje súvislosť medzi predosými kožnými, kĺbovými, srdcovými, resp. neurologickými obtiažami a súčasťou neurologickou symptomatológiou. Ide väčšinou o pacientov, u ktorých sa s odstupom času po prekonanej kožnej forme lymskej boreliózy, prípadne spravidlanej inými orgánovými príznakmi, objavila menšivito vyjadrené prejavy postihnúť centrálného aj periférneho nervového systému. Niektoré naše doterajšie skúsenosti poukazovali aj na určité zmeny v imunologickom statuse pacientov, ktoré by mohli ovplyvňovať niektoré diagnostické postupy a mohli by byť v dôsledku neliečenej, resp. nedostatočne liečenej infekcie *B. burgdorferi*. V literatúre sme sa stretli len s hodnotením komplementu C3 a C4 ako markerov, ktoré by mohli poukazovať na akútnu a chronickú formu ochorenia (Stricker a spol., 2009) a sledovaním subpopulácie CD 57 lymfocytov a ich pokles sa ukázal ako užitočný marker, poukazujúci na dlhodobú infekciu spirochétou *Borrelia burgdorferi*. (Stricker a spol., 2002).

Pri stanovení cieľov tejto práce sme predpokladali, že imunodeficientný stav u pacientov môže meniť výsledky niektorých testov, používaných na stanovenie diagnostiky lymskej boreliózy. Preto, v I. skupine pacientov, u ktorej bol výsledok IFT a ELISA testu negatívny, ale klinický stav poukazoval na možnosť chronickej formy lymskej boreliózy, sme sa rozhodli doplniť vyšetrenia imunologickými testami, ktoré ukázali imunodeficientný stav. Predpokladali sme, že imunodeficiencia ovplyvnila negatívny výsledok IFT a ELISA testu, a preto sme doplnili vyšetrenie protitilátok voči *B. burgdorferi* konfirmačným testom westernblot, ktorý potvrdil prítomnosť špecifických protitilátok. Ordinovaná antibiotická liečba odporúčovaná u chronickej formy boreliózy spolu s imunomodulačnou liečbou, viedla k zlepšeniu klinického nálezu pacientov (nepublikované údaje). Stav pacientov sme preto uzavreli ako lymská borelióza diseminovaná chronická forma. V II. skupine boli pacienti, ktorí mali pozitívny IFT, ELISA aj westernblot test a časť pacientov mala imunodeficientný stav. Všetci pacienti boli záverovaní s diagnózou lymská borelióza diseminovaná chronická forma. U pacientov bola ordinovaná antibiotická liečba odporúčovaná u chronickej formy boreliózy spolu s imunomodulačnou liečbou u pacientov, ktorí mali imunodeficienciu a taktiež viedla k zlepšeniu klinického nálezu. V III. skupine boli u pacientov testy IFT, ELISA aj westernblot negatívne, napriek anamnéze a klinickým príznakom, ktoré by mohli byť aj v súvislosti s lymskou boreliózou a časť pacientov malo aj poruchu imunity, ale sme stav uzavreli ako iné neurologické ochorenia.

Záver:

V práci sa snažíme upozorniť, že pri negatívnom sérologickom vyšetrení a pri klinickom podozrení na diagnózu lymskej boreliózy je potrebné doplniť vyšetrenie konfirmačným testom - westernblotom a zhodnotením imunologického nálezu, ktoré by nás informovalo o bunkovej a humorálnej imunite. V prípade pozitívity westernblotu a prítomnosti neurologických obtiaží a psychických zmien, je

potrebné realizovať i vyšetrenie cerebrospinálneho likvoru, MR mozgu a niektoré ďalšie pomocné vyšetrenia, ktoré nás informujú o stave možného neurologického ochorenia, za účelom možnej ďalšej antibiotickej a imunomodulačnej terapie.

Literatúra:

1. Atassi MZ, Casali P: Molecular mechanisms of autoimmunity. *Autoimmunity*. 2008, 41(2):123-32.
2. Bazovská S., Macháčová E., Špaleková M., Kontrošová S.: Hlásený výskyt lymskej choroby na Slovensku a výskyt protilátok proti antigénom *B.burgdorferi* u zdravej populácie. *Bratisl Lek Listy* 2005,106 (8-9):270-3.
3. Bojar M.: Lymeská borrelióza. Praha, Maxdorf/Jessenius, 1996, 224 s.
4. Brzonova L, Wollenberg A., Prinz J.C.: Acrodermatitis chronica atrophicans affecting all four limbs in an 11-year-old girl. *Brit J Dermatol*, 2002, 147, s. 375.
5. Halperin J.J., Volkman D.J., Wu P.: Central Nervous System Abnormalities in Lyme neuroborreliosis. *Neurology*. 1991, 41, s. 1571.
6. Halperin J.J., Golightly M.: Lyme borreliosis in Bels palsy. *Neurology*. 1992, 42, s. 1268-1270.
7. Halperin J.J., Shapiro E.D., Logigian E., Belman A.L., Dovevall L., Wormser G.P. et al. Practice parameter: treatment of nervous system Lyme disease (an evidence-based review): report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology*. 2007 Jul 3,69(1):91-102.
8. Pachner H.W.: Neurologie manifestation of Lyme disease, the „new imitator“. *Rev.Infect.Dis*. 1991, 11, s. 1482
9. Reik L. Jr.: Lyme Disease and the Nervous System. Thieme Medical Publishers, New York 1991, 128 s.- ak ide o knihu s. sa dáva na konci.
10. Stricker RB, Burrascano J, Winger E: Longterm decrease in the CD57 lymphocyte subset in a patient with chronic Lyme disease. *Ann Agric Environ Med*. 2002, 9(1):111-3.
11. Stricker RB, Savely VR, Motanya NC, Giclas P.C.: Complement split products C3a and C4a in chronic lyme disease. *Scand J Immunol*, 2009 Jan, 69(1):64-9.
12. Wormser G.P., Dattwyler R.J., Shapiro E.D., Halperin J.J., Steere A.C., Klampner M.S., et al. The clinical assessment, treatment, and prevention of Lyme disease, human granulocytic anaplasmosis, and babesiosis: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America. *Clin.Infect.Dis*. 2006 Nov 1:43(9):1089-134.

Výsledky terapie u diseminovanej formy LB spolu s prehľadom terapeutických postupov sú uvedené v nasledujúcej publikácii – 2. skupina 179 pacientov.

I. neurologická klinika LFUK a UNB Nemocnica Staré mesto Bratislava
Ústav epidemiológie LFUK Bratislava
Neštatná imunologická ambulancia, Cukrová 3, Bratislava

J. Ďurovská, S. Bazovská, M. Ondrišová, J. Pancák

Novšie poznatky o liečbe diseminovanej formy lymsej boreliózy

Súhrn:

Práca podáva prehľad o postupoch pri liečbe včasnej a chronickej diseminovanej formy lymsej boreliózy (LB). Popri štandardnej antibiotickej liečbe v spolupráci s imunológom sa ordinovala aj imunomodulačná liečba. U pacientov s včasnou diseminovanou formou LB bola ordinovaná liečba Immodinom, resp. Polyoxidoniom alebo Imunorom v trvaní 6 mesiacov a u chronickej diseminovanej formy LB bola táto imunomodulačná liečba realizovaná v trvaní 12 mesiacov. U oboch skupín sme pozorovali ústup subjektívnych ťažkostí, objektívneho nálezu, zlepšenie niektorých imunologických parametrov, najmä u včasnej diseminovanej formy LB.

Kľúčové slová: lymská borelióza, prehľad antibiotickej (ATB) liečby, imunomodulačná liečba u včasnej a chronickej diseminovanej formy LB

Ďurovská J., Bazovská S., Ondrišová M., Pancák J.: New knowledge about treatment of disseminated Lyme borreliosis

Summary:

The work gives an overview of procedures for the treatment of early and chronic forms of disseminated Lyme borreliosis (LB). In addition to standard antibiotic treatment in collaboration with immunologists an immunomodulatory therapy was used. In patients with early disseminated LB Immodin treatment was prescribed, in some cases Polyoxidonium or Imunor for 6 months and in chronic disseminated forms of LB that immunomodulatory therapy was used for a period of 12 months. For both groups, we observed regression of both symptoms and objective findings, and some improvement in immunological parameters, particularly for early forms of disseminated LB.

Key words: Lyme disease, an overview of antibiotic (ATB) therapy, immunomodulatory therapy in early and chronic forms of disseminated LB

Úvod

Lymská borelióza je multisystémové infekčné ochorenie postihujúce najčastejšie kožu, kŕby, srdce a nervový systém. Etiologickým agensom je baktéria – spirochéta *Borrelia burgdorferi sensu lato*. V Európe dominuje genotyp *Borrelia afzelii* vyvolávajúca prevažne kožné prejavy a *Borrelia garinii*, ktorá sa manifestuje neurologickými prejavmi a *B. burgdorferi sensu stricto*, príležitostne aj iné druhy ako *B. spielmanii*. Prenášačom je kliešť *Ixodes ricinus*. (Bazovská a spol., 2005). Žiadne klinické manifestácie však nie sú pre boreliózu patognomické. Diagnóza sa stanovuje na podklade epidemiologickej anamnézy, klinického obrazu a výsledkov pomocných vyšetrení, vrátane serologických.

Prejavom skoršej infekcie je erythema migrans – makulopapulárny erytém veľkosti v priemere 10-15 cm, ktorý sa ob-

javí o niekoľko dní až týždňov po zaklieštení (Berger, 1989). Zle a neliečení pacienti prechádzajú do včasnej diseminovanej formy, kde sa už môžu objaviť i prejavy postihnutia nervového systému – periférna lézia n.VII, meningoencefalitidy, myelopolyradikuloneuritidy a iné prejavy poškodenia nervového systému.

Ak dôjde k recidíve klinických ťažkostí napriek liečbe, a to najmä ak sa objaví celková slabosť, únavnosť, artralgie, myalgie a pod., môže ísť o chronickejšiu formu LB. Liečba sa stáva komplikovanejšia, môže ísť aj o koinfekciu inými baktériami, najčastejšie ide o *Babesia*, *Ehrlichia*/anaplazmy a iné.

V súčasnosti v zásade existujú 2 názory na spôsob liečby diseminovanej formy LB, ktoré sa líšia najmä v dĺžke podávania antibiotík. V Spojených štátoch amerických sú zástancami dlhšieho podávania ATB liečby najmä autori Burrascano a Donta (Donta, 2003, Burrascano, 2008). ATB liečba pacientov v Európe je kratšia, riadi sa najmä odporúčením vydaným European Union Concerted Action on Lyme Borreliosis (EUCALB 1997-2009). Dôvodom dlhšieho podávania ATB liečby je najmä predpokladaná možná cystická forma borelií, o ktorej prítomnosti sa zatiaľ uvažovalo len in vitro (Brorson a Brorson, 1999).

V r. 2008 však publikovali kanadskí autori (Miklosy J. a spol., 2008) prítomnosť spirochét v cystickej a granularnej forme v mozgu u 3 pacientov s potvrdenou neuroboreliózou. Rozdiely v spôsobe liečby môžu byť dané i výskytom rozdielnych druhov kmeňov borelií v USA a v Európe.

Jedna z najčastejšie používaných látok v liečbe počiatočných štádií je Doxycyklin, ktorý je schopný preniknúť do mozgu v dávke 500 mg /p.o. denne, ktorý prechádza hematolymphovarovou bariérou. Nižšie dávky Doxycyklinu sa považujú za bakteriostatické, čo nie je efektívne na eradikáciu choroby (Donta, 1997).

Neskorším prejavom infekcie sú veľmi často artralgie a myalgie (Ostrov a Athreya, 1991). Komplikáciou môže byť i myokarditída alebo perikarditída, ktoré môžu byť i prvou klinickou manifestáciou (Kimball a spol., 1989).

Po eliminácii koinfekcie je potrebné liečiť LB jednak v krvnom riečisku, intracelulárne a aj v cystickej forme. Sú rôzne možné kombinácie a odporúčené postupy, ale v zásade je potrebné eliminovať baktérie v krvnom riečisku antibiotikami tetracyklinovej, penicilínovej rady a cefalosporínmi.

Makrolidy ako Rulit, Zytromax a Klacid sa používajú pre schopnosť prenikať intracelulárne (Donta, 2003). Antiparazitiká (napr. Plaquenil) sa používajú na predpokladanú cystickú formu. Výhodou kombinácie týchto liekov je zabránenie vytvoreniu bakteriálnej rezistencie.

Uvádame i niektoré ďalšie kombinácie liekov, ktoré sa realizujú najmä u pacientov s alergickými alebo inými prejavmi neznašanlivosti už uvedených liekov (Burrascano, 2008).

V Európe v roku 1997 bol vypracovaný systém diagnostiky a liečby jednotlivých štádií LB, ktorý vypracovala European

Union Concerted Action on Lyme Borreliosis (EUCALB 1997-2009).

V Slovenskej republike t.č. platí Odborné usmernenie Ministerstva zdravotníctva SR (OUMZ SR) na diagnostiku a liečbu lymfkej choroby v Slovenskej republike číslo: 06486-XX/2010-OZS ver. 2.008 v ktorom, okrem definície, klinických manifestácií choroby, laboratórnej a mikrobiologickej diagnostiky, rôznych štádií choroby ich diagnostiky sú i odporúčané spôsoby liečby, ktoré vychádzajú z odporúčení EUCALB.

Niektoré odporúčané terapeutické postupy pri jednotlivých štádiách LB:

1. Liečba pri zaklieštení (Nadelman a spol., 2001)

Pri zaklieštení a po odstránení kliešťa niektorí autori odporujú v rámci prevencie Doxycyclin 200 mg užiť jednorázovo, ak bol kliešť zaklieštený dlhšie ako 24 hod. sa odporúča užiť Doxycyclin 2x100 mg v trvaní minálne 7 dní (Nadelman a spol., 2001).

2. Liečba včasnej lokalizovanej formy (EUCALB., 2009, OUMZ SR., 2010) Erythema migrans, možné terapeutické postupy:

1. Doxycyclin 2x200 mg p.o. 10-21 dni
2. Penicilin V 3x1000 mg p.o. 10-21 dni
3. Amoxicillin 3x500 mg p.o. 10-21 dni alebo 2x1000mg

3. Liečba včasnej diseminovanej formy (EUCALB., 2009, OUMZ SR., 2010)

a., Neuroborelioza akútna, možné terapeutické postupy:

1. Ceftriaxone 1x2000 mg i.v. minimálne 28 dní
2. Cefotaxime 3x2000 mg i.v. minimálne 28 dní
3. Penicillin G 3x3000 mg i.v. 21-30 dni

Následne perorálne po i.v. liečbe.

Doxycyclin 2x100 mg p.o. 30 dní, alebo Amoxicillin 3x 500-1000 mg p.o. 14-30 dni.

b., Artritis, možné terapeutické postupy:

1. Ceftriaxone 1x2000 mg i.v. 14-21 dni
2. Cefotaxime 3x2000 mg i.v. 14-21 dni
3. Doxycyclin 2x200 mg p.o. 14-30 dni
4. Amoxicillin 3x 500-1000 mg p.o. 14-30 dni

c., Carditis, možné terapeutické postupy:

1. Ceftriaxone 1x2000 mg i.v. 14 dni
2. Cefotaxime 3x2000 mg i.v. 14 dni
3. Penicillin G 3x3000 mg i.v. 14 dni

4. Chronická lymfská borelióza (EUCALB., 2009, OUMZ SR., 2010)

a., Acrodermatitis chronica atrophicans, možné terapeutické postupy:

1. Ceftriaxone 1x2000 mg i.v. 14-30 dni
2. Cefotaxime 3x2000 mg i.v. 14-30 dni
3. Penicillin G 3x3000 mg i.v. 14-30 dni
4. Doxycyclin 2x100 mg p.o. 14-30 dni
5. Amoxicillin 3x 500-1000 mg p.o. 14-30 dni

b., Neuroborelioza chronická, možné terapeutické postupy:

1. Ceftriaxone 1x2000 mg i.v. minimálne 28 dní

2. Cefotaxime 3x2000 mg i.v. minimálne 28 dní
3. Penicillin G 3x3000 mg i.v. 21-30 dni

Ak dôjde k recidíve ťažkostí, napriek adekvátnej liečbe včasnej formy LB, ktorá sa prejavuje celkovou slabosťou, a zvýšenou únavnosťou, artralgiami, myalgiami, poruchy koncentrácie a novopamäti a pod., ide pravdepodobne o **chronickú formu neroboreliózy**. Liečba sa stáva komplikovanejšou, pretože môže ísť aj o koinfekciu s inými baktériami, protozoami a pod. Liečba LB je ľahšia, keď sa koinfekcie eliminujú (Nadelman a spol., 1997).

Skúsenosti niektorých najmä amerických autorov v posledných rokoch odporúčajú užívať antibiotikum tetracyklínovej rady Doxycyclin v dávke 400-600 mg/ deň až v trvaní do 60 dní (Donta, 1997, Burrascano, 2008).

Doxycyclín je schopný preniknúť hematolymphovorovou bariérou a dávka 500 mg/deň p.o. sa považuje za baktericídnu, nižšie dávky doxycyclínu sa považujú za bakteriostatické.

Ak sa spirochéty *B.burgdorferi* dostanú pre nich do nepriaznivého prostredia (napr. pri užívaní antibiotickej liečby), sú schopné vytvoriť cystickú formu, ktorá sa javí rezistentná i niekoľko týždňov voči imunitnému systému a bežnej antibiotickej liečbe. Tieto „spiacie“ baktérie sa môžu aktivovať pri predčasnem ukončení antibiotickej liečby (Brorson a Brorson, 1998). Pri priaznivých podmienkach pre baktériu dochádza k vzniku infiltrátov cievej steny a perivaskulárnych priestorov, čo umožňuje perzistenciu spirochét rádoivo i niekoľko rokov (Meier a Grehl, 1988).

V súčasnosti sa odporúča, že správna liečba pozostáva z prvotnej eliminácie koinfekcie. (Nadelman a spol, 1997). Keď boli eliminované koinfekcie, je potrebné eliminovať baktérie jednak v krvnom riečisku, intracelulárne a v cystickej forme.

Antibiotiká tetracyklínovej rady, penicilínovej rady a cefalosporíny sú väčšinou schopné eradikovať baktérie v krvnom riečisku (Donta, 1997). Makrolidy ako Rulid (Roxytromycin), Zitromax (Azytromycin) a Klacid (Klaritromycin) sú požívané intracelulárne (Donta, 2003).

Flagyl (Metronidazol), Fasigyn (Tinidazol, Fluconazol) a Plaquenil (Chloroquine) sú účinné na cystickú formu (Brorson a Brorson, 1999).

Výhodou kombinovanej liečby je zabránenie vytvorenia bakteriálnej rezistencie. Doterajšie klinické skúsenosti ukazujú, že pacient by mal byť aspoň 2 mesiace bez ťažkostí pred ukončením antibiotickej liečby. V prípade pretrvávania ťažkostí je potrebné vylúčiť inú príčinu (Donta, 2003).

Tabuľka č.1-11 informuje o prípravkoch, ktoré sa uplatňujú pri liečbe rôznych štádií lymfkej choroby a koinfekcie. Táto liečba odráža skúsenosti prevažne amerických autorov u pacientov s lymfskou boreliózou.

Doryx; Terramycin; Vibramycin, Doxybene	Doxycycline	300-600 mg/deň
Doxyhexal	Tetracycline	1500-2000 mg/deň
Minocin; a pod.	Minocycline	200-400 mg/deň

Tab.č.1 - Antibiotiká tetracyklínovej a penicilínovej rady - včasná fáza (Burrascano, 2008).

Amoxil; Biomox; Polymox;	Amoxicilín, Ampicilín	1500-4000 mg/deň
Ceftin, Ceclor Rocephin Lendacin	Cefalosporín Ceftriaxoné Sodium Ceftriaxoné	3 x1000 mg/deň 1x2000 mg/deň 1x2000 mg/deň

Tab.č. 2 - Antibiotiká penicilínovej rady - včasná diseminovaná forma (Wormser a spol, 2003).

Uvedené vyššie dávky sú potrebné, aby sa dosiahla baktericidnosť a aby bol zabezpečený prestup hematolikorovou bariérou. Doxycyclín je často prvá voľba v liečbe, nakoľko eliminuje koinfekciu erlichiami/anaplazmami.

Rulid, Rothricin Zithromax Klacid	Roxithromycin Azithromycin Clarithromycin	2x300 mg /deň 250 mg - 600 mg/deň 1500 mg/deň
---	---	---

Tab.č. 3 - Makrolidy - včasná diseminovaná forma (Donta, 2003, Burrascano, 2008).

Prechádzajú hematolikorovou bariérou, pôsobia na intracelulárnej úrovni, ak sa kombinujú s Trimethoprim-sulfamethaxazolom sú účinné na liečbu babeziózy.

Plaquenil	Chloroquine Hydroxychloroquine	200 mg - 400 mg /deň
-----------	-----------------------------------	----------------------

Tab.č. 4 - Antiparazitiká- včasná aj chronická diseminovaná forma (Brorson a Brorson, 2002, Burrascano, 2008).

Plaquenil sa v kombinácii s Doxycyklinom s Clarithromycinom používa na liečbu cystickej formy Lymfkej choroby.

Flagyl Fasigyn	Metronidazole Tinidazole	2x 750 mg / deň 1500 mg - 3000 mg / deň
-------------------	-----------------------------	--

Tab.č. 5 - Chemoterapeutiká- včasná aj chronická diseminovaná forma (Brorson a Brorson, 1999, Klein a Cunha, 2001, Burrascano, 2008).

Tieto látky sa používajú na liečbu cystickej formy Lymfkej choroby, nemali by sa užívať s tetracyklínom. Používajú sa radšej v kombinácii s cefalosporínmi.

Rifadin, Rimactane	Rifampicín	1200 mg / deň
--------------------	------------	---------------

Tab.č. 6 - Ansamycinové antibiotiká- včasná aj chronická diseminovaná forma (Burrascano, 2008).

Užíva sa v kombinácii s Doxycyklinom ako liečba koinfekcii bartonellou a ehrlichiou.

Tobradex Gentamycin	Tobramycin/Dexamethasone Gentamycin	
------------------------	--	--

Tab.č. 7 - Aminoglykozidy- včasná aj chronická diseminovaná forma (Burrascano, 2008).

Obe sú vhodné na liečbu koinfekcie bartonellou.

Questran (cholestyramine)	obvykle 1 tbl 4x denne
---------------------------	------------------------

Tab.č. 8 - Hypolipidemiká- chronická diseminovaná forma (Schoemaker a spol., 2005).

Predpokladá, sa že podieľa na odstraňovaní toxínov, ktoré vylučujú spirochety B. burgdorferi.

Mycostatin; Mycostatin Pastilles; Nistat; Nystex Diflucan	Nystatin Fluconazole	200 mg/deň
---	-------------------------	------------

Tab.č. 9 - Antimykotika- včasná aj chronická diseminovaná forma (Schardt, 2004).

Tieto látky sa používajú na kvasinkové infekcie a liečbu cystickej formy Lymfkej choroby

Imunoglobulíny IVEGA	2g/kg 1x mesačne v dĺžke 6 mesiacov
----------------------	--

Tab.č. 10 - Imunologická liečba - chronická diseminovaná forma (Katz, 2009, Wilner, 2009)

Novšie sa skúša liečba pomocou:

(HBOT) Hyperbaric Oxygen Treatment

Hyperbarická kyslíková liečba - je to liečba, ktorá sa deje vo vysokotlakovej kyslíkovej komore.

ICHT (internal heat by use of Dinitrophenol, Usonic acid)

Intracelulárna hypertermická liečba pri použití Dinitrophenolu alebo kys. Urónovej (vzniká enzymat. oxidáciou glukózy) - je to experimentálny liečebný postup pre lym. chorobu, kde sa zvyšuje intracelulárna teplota na hladiny dostačujúce na zabitie spirochét.

Tzv. Rife Machine

Je to terapia, ktorá zahrňuje vyslanie slabého elektrického prúdu pri rôznych frekvenciách.

Tab. č. 11 - Alternatívne spôsoby liečby

Ciel' práce

Cieľom našej práce je informovať o možných ďalších postupoch v terapii diseminovanej formy LB, s využitím imunomodulačnej liečby.

Materiál a metodika

Vyšetřili sme 179 pacientov s diseminovanou formou LB, ktorých sme rozdelili do 2 skupín:

I. skupina - lymfská borelióza včasná diseminovaná forma (73 pacientov, priemerný vek 42.7, M:44, Z:29)

II. skupina lymfská borelióza diseminovaná chronická forma (106 pacientov, priemerný vek:45.6, M:44, Z:62).

U pacientov v I. a II. skupine, ktorí k nám prišli už v neskoršom štádiu ochorenia, sme u všetkých doplnili anamnézu, zhodnotili predchádzajúce vyšetřenia a liečbu a po klinickom neurologickom vyšetření sme realizovali stanovenie protitátok proti B. burgdorferi skríningovými vyšetřeniami IFT, ELISA a konfirmačným testom westernblot. Pri klinickom podozrení na LB aj pri negatívnom sérologickom vyšetření (IFT, ELISA) sme na základe našich doterajších skúseností (Đurovská a spol., 2010) doplnili vyšetřenie konfirmačným testom - westernblotom a realizovali imunologické vyšetřenie.

Imunologické vyšetřenie na bunkovú a humorálnu imunitu pozostávalo z testov stanovenia monoklonálnych CD protitátok- metódou prietokovej cytometrie a vyšetřenie autoprotilátok IFT metódou - proti jadram buniek (ANA), proti bazálnym membránam (ABMA), proti bazálnym membránam glomerulov (ABMG), proti bazálnym membránam tubulov (ABMT), proti mitochondriám (AMA), proti srdcovému svalu (AMCA), proti neutrofilným leukocytom (ANCA), proti jadierkam (ANLA), proti parietálnym bunkám (APCA), proti retikulínu (ARA), proti priečne pruhovaným svalom (ASKMA), proti hladkému svalu (ASMA), proti štit-

nej žláze (ATA), proti cievnemu endotelu (AVEA), (Atassi MZ a spol., 2008).

U pacientov I. a II. skupiny sme vychádzali pri ATB liečbe z odporúčaní OUMZ a EUCALB, ktoré sme čiastočne modifikovali na základe klinického nálezu a výsledkov pomocných vyšetrení.

Na základe získaných výsledkov o imunologickom stave sme rozdelili pacientov podľa závažnosti deficitu imunologického stavu do 2 skupín a v spolupráci s imunológom bola realizovaná imunomodulačná liečba Immodinom, Polyoxidoniom alebo Imunorom popri základnej ATB liečbe. Pacienti I. skupiny s včasnou fázou diseminovanej formy LB mali ľahší imunodeficientný stav a boli liečení 6 mesiacov imunomodulačnou liečbou. Pacienti II. skupiny s chronickou formou LB mali ťažšie postihnutie imunologického stavu a boli liečení 12 mesiacov imunomodulačnou liečbou. Stav pacientov sme hodnotili na základe subjektívnych údajov pacienta o zlepšení, či nezlepšení stavu, objektívnych klinických príznakov a zmeny laboratórných parametrov.

Výsledky:

V I. skupine 51 pacientov sme po ATB liečbe a 6 mesačnej imunomodulačnej liečbe zaznamenali po 6 mesiacoch od ukončenia liečby ústup klinických príznakov - artralgií a celkovej únavnosti a zlepšenie laboratórných parametrov. U 22 pacientov prišlo len k čiastočnému zlepšeniu, ústup artralgií, myalgii, pretrvávala celková únavnosť.

V II. skupine 65 pacientov sme po ATB liečbe a 12 mesačnej imunomodulačnej liečbe zaznamenali po 6 mesiacoch od ukončenia liečby zlepšenie (ústup klinických príznakov artralgií a celkovej únavnosti a zlepšenie niektorých laboratórných parametrov. U 35 pacientov po 6 mesiacoch po ukončení liečby došlo k čiastočnému zlepšeniu (ústup artralgií, myalgii, pretrvávala celková únavnosť). U 9 pacientov bol stav po ukončení liečby prakticky nezmenený. Nepozorovali sme zhoršenie stavu pacientov.

Diskusia a závery:

Lymfská borelióza v súčasnosti predstavuje diagnostický a terapeutický problém. Začína sa predlžovať ATB liečba, zvyšujú sa dávky, vzhľadom na novšie poznatky vývoja jednotlivých foriem. Dôvodom dlhšieho podávania ATB liečby je najmä predpokladaná možná cystická forma borelií, o ktorej prítomnosti sa zatiaľ uvažovalo len in vitro (Brorson a Brorson, 1999). V r. 2008 však poukázali kanadskí autori (Miklosy J. a spol., 2008) na prítomnosť spirochét v cystickej a granulárnej forme v mozgu u 3 pacientov s potvrdenou neuroboreliózou.

Podľa skúsenosti amerických autorov (Donta, 2003, Burrascano, 2008), má správna liečba neskorej diseminovanej formy pozostávať z prvotnej eliminácie koinfekcie a po jej eliminácii je potrebné eradikovať baktériu jednak v krvnom riečisku, intracelulárne a i v cystickej forme. Sú rôzne možné kombinácie a odporúčené postupy, ale v zásade je potrebné eradikovať baktériu v krvnom riečisku antibiotikami tetracyklínovej, penicilínovej rady a cefalosporínmi. Makrolidy ako Rulit, Zytromax a Klacyd sú používané pre prenikavosť intracelulárne. Flagile, Fastigin a Plaquenil sú používané na

Skupina(pacienti)	Zlepšení	Čiast. zlepšení	Nezmenení	Zhoršení
I. (73)	51	22	0	0
II. (106)	65	35	9	0

Výsledky

cystickú formu. Výhodou kombinácie týchto liekov je zabránenie vytvoreniu bakteriálnej rezistencie. Pri chronických formách je odporúčaná komplexná liečba až 6-11 mesiacov a pacient by mal byť bez symptómov 2 mesiace pred ukončením antibiotickej liečby (Donta, 2003). Oproti týmto predstavám o liečbe existujú najmä v Európe doporučované postupy, ktoré sú z hľadiska dĺžky ATB liečby kratšie (EUCALB, 2009, OUMZ SR., 2010).

V poslednom období niektorí autori (Katz 2009, Wilner 2009) okrem ATB liečby zvažujú aj prínos imunologickej liečby, ktorá sa javí prospešná najmä pri chronických formách LB, kde sú v popredí neuropatické bolesti.

Tieto ojedinelé literárne údaje spolu s našimi skúsenosťami nás viedli k úvahe o potrebe skúmania imunologického statusu u pacientov s LB a na základe získaných výsledkov po konzultácii s imunológom zvažiť potrebu imunomodulačnej terapie.

Práca podáva prehľad o postupoch pri liečbe včasnej a chronickej diseminovanej formy lyskej boreliózy (LB). Popri štandardnej antibiotickej liečbe v spolupráci s imunológom sa ordinovala aj imunomodulačná liečba. U pacientov s včasnou diseminovanou formou LB bola ordinovaná liečba Immodinom, resp. Polyoxidoniom, alebo Imunorom v trvaní 6 mesiacov a u chronickej diseminovanej formy LB bola táto imunomodulačná liečba realizovaná v trvaní 12 mesiacov. U oboch skupín sme pozorovali ústup subjektívnych ťažkostí, zlepšenie objektívneho nálezu a niektorých imunologických parametrov, najmä u včasnej diseminovanej formy LB.

Literatúra:

1. Atassi MZ., Casali P.: Molecular mechanisms of autoimmunity. *Autoimmunity*. 2008 Mar.41 (2), 123-32.
2. Bazovská S., Macháčová E., Špaleková M., Kontrošová S.: Reported Incidence of Lyme Disease in Slovakia and Antibodies to B. burgdorferi Antigens detected in a Healthy population. *Bratisl Lek Listy*, 2005, 106, 8-9, 270-273.
3. Berger, B.W.: Dermatologic manifestation of Lyme disease. *Rev Infect Dis*, 1989, 11 (6), 1475-1481.
4. Burrascano J. JR.: Advanced topics in Lyme disease diagnostic hints and treatment guidelines for Lyme and other tick borne illnesses. *Managing Lyme disease*, 16th edition, October, 2008, 1-37.
5. Brorson O., Brorson S.: In vitro conversion of Borrelia burgdorferi to cystic forms in spinal fluid, and transformation to mobile spirochetes by incubation in BSK-H medium. *Infection*. 1998, 26, (3), 144-150 (R).
6. Brorson O., Brorson S.: An in vitro study of the susceptibility of mobile and cystic forms of Borrelia burgdorferi to Metronidazole. *APMIS*, 1999, 107, (6), 566-576.

...

Ďalšia literatúra u autora

Výsledky 3.skupiny 82 pacientov.

PCR V DIAGNOSTIKE LYMSKEJ BORELIÓZY U NEUROLOGICKÝCH PACIENTOV PREDBEŽNÉ VÝSLEDKY

PCR IN THE DIAGNOSTICS OF LYME BORRELIOSIS IN NEUROLOGICAL PATIENTS. PRELIMINARY RESULTS

M. Záborská¹, S. Bazovská², J. Ďurovská³, J. Pancák³

¹ Mikrobiologický ústav LF UK a FN Bratislava,

² Ústav epidemiológie LF UK Bratislava

³ I.neurologická klinika FN LF UK Staré mesto, Mickiewiczova 13, Bratislava

Abstrakt

Cieľom našej práce je sledovanie spoľahlivosti PCR vyšetrenia, kde sme sa zamerali na dôkaz prítomnosti 16S *Borrelia burgdorferi sensu lato* v likvore. Ide o metódu s elektroforetickou detekciou produktov amplifikácie v agarózovom géli komerčným kitom «AMPLISENS® *Borrelia burgdorferi sensu lato* » poskytnutý firmou Ecoli .

Lymfická borelióza je polysystémové zápalové ochorenie, ktorého klinická diagnostika je dosť obtiažna, hlavne v neskorších štádiách. Okrem postihnutia orgánov a tkanív priamym pôsobením mikroorganizmov sa totiž na klinickom stave pacienta môžu uplatňovať aj imunopatologické procesy podporované mnohoročným prežívaním borélií v postihnutých tkanivách. Z toho tiež vyplýva aj obtiažnosť mikrobiologickej diagnostiky, ktorá bola doteraz zameraná hlavne na dôkaz protilátok. V ostatnom období sa však čoraz častejšie začína využívať na detekciu prítomnosti borélií metóda PCR, aj keď literárne údaje v hodnotení tejto diagnostiky sú dosť rozdielne.

V období od decembra 2007 do mája 2009 sme vyšetřili likvor od 62 pacientov. Likvor bol odoberaný od pacientov s už klinicky diagnostikovanou Lymfskou boreliózou resp. s podozrením na neuroboreliózu na I.neurologickej klinike FN Staré mesto v Bratislave a na neurologickej klinike v Žiari n/Hronom.

Pozitívny PCR nález sme zistili u 22 pacientov (35,5 %), negatívnych bolo 40 (63,5 %).

Naše predbežné výsledky poukazujú na to, že test «AMPLISENS® *Borrelia burgdorferi sensu lato* » (firma Ecoli) je vhodný na doplnenie mikrobiologickej diagnostiky u pacientov s neuroboreliózou. V ďalšej práci sa zameriame na súčasnú

klinickú a mikrobiologickú analýzu výsledkov viacerými diagnostickými metódami, nakoľko výsledky sérologických vyšetrení pri diagnostike boreliózy môžu byť variabilné a ich interpretácia vyžaduje úzku spoluprácu ošetrojúceho lekára a mikrobiológa.

Kľúčové slová: Lymfská borelióza, diagnostika, neuroborelióza, amplifikácia, elektroforéza

Táto práca bola čiastočne podporená projektom VEGA 1/4282/7 a 1/4281/07

Abstract

The aim of this study was to monitor the reliability of PCR examination, and to detect the presence of 16S *Borrelia burgdorferi* sensu lato in CFS. It is a method with electrophoretic detection of the products of amplification in agarose gel using the commercial kit „AMPLISENS® *Borrelia burgdorferi* sensu lato“ that was supplied by the firm Ecoli. Poly-systemic Lyme disease is an inflammatory disease in which the clinical diagnosis is quite obscure, especially in the late stages. Not only the organs and tissues are affected by the direct activity of the microorganisms, but there are also some immunopathological processes that play a part in the clinical status of the patient, which are mainly supported by the fact that borrelia are able to survive inside the affected tissues for many years. From this point we can also derive the obscurity that was mentioned earlier in achieving a clear microbiological diagnosis, that has been carried on mainly by serological methods focused to the detection of antibodies. Recently, there has been an increased interest in using PCR method in confirming the presence of *Borrelia*. The discussion in scientific literature however is still going on regarding the feasibility of this method as a diagnostic tool for specific and sensitive confirmation of the diseases.

In the period between December 2007 and May 2009, we examined cerebrospinal fluid from specimens that were obtained from 62 patients. All samples were obtained from patients who were already clinically diagnosed with Lyme disease respectively with suspected neuroborreliosis who were hospitalized in Neurology Clinic - The Medical Faculty Hospital - The University of Comenius - Old Town and at the neurological clinic in Žiari nad Hronom.

Positive PCR findings were detected in 22 patients (35.5%), negative in 40 (63.5%).

Our preliminary results point to the fact the kit „AMPLISENS® *Borrelia burgdorferi* sensu lato“ (Ecoli) is convenient for completing the microbial diagnostics in patients with neuroborreliosis. In the other study we are concentrating on the current clinical and microbiological analysis of results using several diagnostics methods, due to the fact that the results of serological examinations in the diagnostics of Lyme borreliosis can be variable and the interpretation requires close cooperation between the physician and the microbiologist.

Key words: Lyme disease, diagnostics, neuroborreliosis, amplification, and electrophoresis.

This work was partially supported by the project VEGA 1/4282/7 and 1/4281/07.

Úvod

Lymfická borelióza je polysystémové zápalové ochorenie, ktorého klinická diagnostika je dosť obtiažna, hlavne v neskorších štádiách. Okrem postihnutia orgánov a tkanív priamym pôsobením mikroorganizmov sa totiž na klinickom stave pacienta môžu uplatňovať aj imunopatologické procesy podporované mnohoročným prežívaním borélií v postihnutých tkanivách. Z tohoto tiež vyplýva aj obtiažnosť mikrobiologickej diagnostiky, ktorá bola doteraz zameraná hlavne na dôkaz protilátok. V ostatnom období sa čoraz častejšie začína využívať na detekciu prítomnosti borélií metóda PCR, aj keď ešte nie je štandardizovaná a literárne údaje sú v hodnotení tejto diagnostiky dosť rozdielne. Citlivosť a špecifickosť reakcie umožňuje detekciu patogéna, ak je v klinickej vzorke menej ako 10 spirochét. Na dôkaz je vhodným materiálom kožná biopsia, moč, sérum, plná krv. Významným prínosom je detekcia zo synoviálnej tekutiny (85%), synoviálneho tkaniva a likvoru (24 - 100 %). Preto je predpoklad, že PCR metóda by mohla prispieť k diagnostike zmiešaných infekcií vyvolaných viacerými genotypmi borélií. Požiadavkou je ale rešpektovanie genotypovej heterogenity podľa geografickej distribúcie.

Cieľ práce

Kit «AMPLISENS® *Borrelia burgdorferi sensu lato*», poskytnutý firmou Ecoli v rámci grantovej úlohy, je pôvodne určený na dôkaz prítomnosti borélií v biologickom materiáli, predovšetkým u kliešťov. Cieľom našej práce bolo otestovanie tohto kitu na detekciu *Borrelia burgdorferi* s.l. v likvore u pacientov s podozrením na neuroboreliózu.

Materiál a metódy

V období od decembra 2007 do mája 2009 sme vyšetrili likvor od 62 pacientov. Likvor bol odoberaný od pacientov s už klinicky diagnostikovanou lymfickou boreliózou resp. s podozrením na neuroboreliózu na I. neurologickej klinike FN Staré mesto v Bratislave a na neurologickej klinike v Žiari n/Hronom.

Sérológická diagnostika sa vykonávala na Ústave epidemiológie LF UK, odkiaľ nám bol na PCR vyšetrenie odosielaný likvor od vybraných pacientov.

Na dôkaz prítomnosti borélií sme použili 0,5 ml likvoru a komerčný kit «AMPLISENS® *Borrelia burgdorferi sensu lato*» (Ecoli) založený na detekcii 16S rRNA *Borrelia burgdorferi* s.l. Charakteristika diagnostického testu je uvedená v tabuľke 1. Vyhodnotenie výsledkov analýzy kontrolných reakcií je v tabuľke 2.

Tabuľka 1: Charakteristika diagnostického testu

Komplex 1 - « RIBO-sorb-50 »	na izoláciu RNA/DNA z klinického materiálu.
Komplex 2 - « Reverta-L-50 »	na získanie cDNA z RNA
Komplex 3 - « Amplisens-50-R »	na PCR amplifikáciu cDNA <i>Borrelia burgdorferi sensu lato</i> (<i>B. burgdorferi sensu stricto</i> , <i>B. afzelii</i> , <i>B. garinii</i>).

Odpočet výsledkov analýzy sa vykonáva na základe prítomnosti alebo neprítomnosti špecifických DNA bandov, vizualizovaných na elektroforetickom géli.

Dĺžka špecifických bandov amplifikovaných fragmentov cDNA :

- *Borrelia burgdorferi sensu lato* - 370 bp,
- vnútornej kontroly - 571 bp

Tabuľka 2: Vyhodnotenie výsledkov analýzy kontrolných reakcií

Kontrolná vzorka	Kontrolná etapa PCR analýzy	Špecifické bandy na elektroforetickom géli	
		Band 370 bp	Band 571 bp
PK	Izolácia RNA	prítomný	prítomný
NK	Izolácia RNA	neprítomný	prítomný
K-	PCR reakcia	neprítomný	neprítomný
K+	PCR reakcia	prítomný	neprítomný

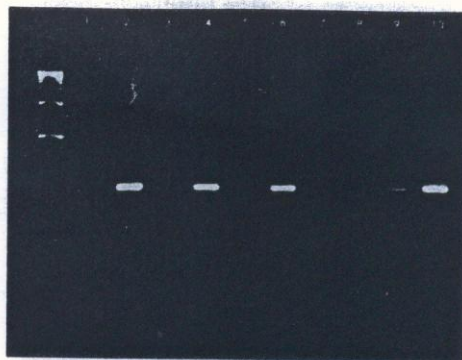
Pod pozitívnymi sa chápu vzorky, ktoré obsahujú špecifický svietiaci band na úrovni 370 bp väčšej alebo menšej intenzity, nezávisle od prítomnosti alebo neprítomnosti bandu vnútornej kontrolnej vzorky. Band vnútornej kontrolnej vzorky môže chýbať vo vzorkách s vysokou koncentráciou rRNA *Borrelia burgdorferi sensu lato*.

Negatívnymi sa chápu vzorky, ktoré obsahujú band 571 bp väčšej alebo menšej intenzity (okrem negatívnej kontroly etapy PCR « K- »).

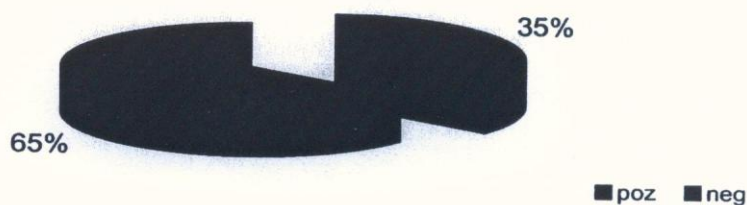
Výsledky

Vyšetrili sme materiál od cielene vybraných 62 pacientov (100%) s diagnózou *sus.* neuroborelióza, u ktorých bola sérodiagnostikou dokázaná pozitivita (graf 1).

PCR pozitívny nález sme zistili u 22 pacientov (35,5%), negatívnych bolo 40 (63,5%). Ako pozitívnu sme hodnotili vzorku, ktorá obsahovala špecifický band svietiaci s menšou alebo väčšou intenzitou na úrovni 370 bp. Negatívna bola vzorka, ktorá obsahovala band 571 bp (obr. č.1).



Obrázok 1: Vyhodnotenie výsledkov PCR analýzy



Graf 1: Výsledky vyšetrenia likvoru

Diskusia a závery

Naše predbežné výsledky zatiaľ poukazujú na to, že komerčný kit « AMPLI-SENS » *Borrelia burgdorferi sensu lato* » (Ecoli) by bolo možné v indikovaných prípadoch použiť aj priamo na vyšetrenie likvoru u pacientov s neuroboreliózou. Všeobecne senzitivita a tiež špecificita PCR testu závisí od niekoľkých ukazovateľov, ako je napríklad optimalizácia podmienok, charakter primerov, množstvo a čistota nukleovej kyseliny v materiáli, atď.

Výhody testu:

1. kompletne vybavenie všetkými komponentmi (tab.1),
2. menšie riziko kontaminácie primerov.

Nevýhody testu:

1. pracnosť,
2. izolácia najprv RNA ktorá je dosť nestabilná a v krátkom čase sa rozpadáva, z toho vyplýva nutnosť rýchleho pretransformovania do stabilnej do cDNA,
3. obmedzené množstvo vyšetrení.

¹ V ďalšej práci by sme sa chceli zamerať predovšetkým na súčasťnú klinickú a mikrobiologickú analýzu výsledkov viacerými diagnostickými metódami, nakoľko výsledky v diagnostike lymfkej boreliózy môžu byť variabilné a ich interpretácia vyžaduje úzku spoluprácu ošetrojúceho lekára a mikrobiológa.

V rámci vyšetrení by sme potom chceli využiť ďalšie typy PCR metód, ktoré by poskytli primery na bližšie identifikovanie jednotlivých genospecies.

Literatúra

1. HONEGR, K., DOSTÁL, V.: klinické prejavy a liečba lymfkej boreliózy. Klin. Mikrobiol. A inf. Lék. 2004; 10(1): s. 5 - 10.
2. ŽUREK, M.: Lymeská borelióza a muskuloskeletálny systém. Interní med. 2007; 9(9): s. 398 - 400.
3. BARTŮNĚK, P. Et al.: lymeská borelióza. Garda.publishing. Praha, 2006, s.11-60
4. PÍCHA, D., MORAVCOVÁ, L., LÁSIKOVÁ, Š., PATAKIOVÁ, E., ROHÁČOVÁ, H., MAREŠOVÁ, V.: Příspěvek k problematice postboreliového syndromu. Čes. A slov. Neurol. Neurochir., 67/100,2004, no. 6, s. 450 - 455.
5. JÁGEROVÁ, S., KLEMENT, C., MATEIČKA, F., MAĐAROVÁ, L.: séroepidemiologické aspekty lymfkej boreliózy. Antibiotiká a rezistencia 2.7.2008, s. 48 - 55.
6. CHMIELEWSKI, T., FIETT, J., GNIAKOVSKI, M., TYLEWSKA-WIERRBAMOVSKA, S.: Improvement in the laboratory recognition of lyme borreliosis with the combination of culture and pcr methods. mol diagn., 2003, 7 (3 - 4) s. 155 - 162.
7. MATEIČKA, F.: Klinické aspekty lymfkej boreliózy na Slovensku s dôrazom na muskuloskeletálnu symptomatológiu, diagnostiku a terapiu. Antibiotiká a rezistencia 1.3.2004, s. 21 - 24.
8. SIŃSKI, E., PAWELCZYK, A., BAJER, A., BEHNKE, J. M.: Abundance wild rodents, ticks and environmental risk of lyme borreliosis: a longitudinal study in an area of mazury likes dostrict of poland ann agric environ med. 2006, 13, 295 - 300.
9. WILSKA, B.: Epidemiology and diagnosis of lyme borreliosis. ann agric environ med. 2005, 37, 8, 568 - 579.
10. DERDÁKOVÁ, M., LENCÁKOVÁ, D.: Association of genetic variability within the *Borrelia burgdorferi* sensu lato with the ecology, epidemiology of lyme borreliosis in europe. Ann agric environ med. 2005, 12(2), 165 - 172.

Kontaktná adresa:

magda.zaborska@fmed.uniba.sk

Lymfská borelióza a demyelinizačné ochorenie CNS

Bazovská S.¹, Ďurovská J.², Pancák J.², Záborská M.³, Derdákova. M.⁴

¹Ústav epidemiológie, Lekárska fakulta UK v Bratislave

²I. neurologická klinika, Univerzitná nemocnica v Bratislave

³Mikrobiologický ústav, Lekárska fakulta UK v Bratislave

⁴Parazitologický ústav SAV v Košiciach

SÚHRN

Práca popisuje ochorenie u 55-ročného pacienta, u ktorého bolo diagnostikované demyelinizačné ochorenie nejasnej etiológie. Pacient prekonal v roku 2004 lymfskú boreliózu. V sére boli prítomné špecifické protilátky IgG proti *B. burgdorferi* s. l. V likvore sa nedokázala prítomnosť intrathekálnych protilátok, ale PCR vyšetreniami sa potvrdila prítomnosť DNA genotypu *B. garinii*. Možno predpokladať, že perzistencia borélií v organizme by mohla byť jedným zo spúšťačov autoimunitného procesu, ktorý viedol k vzniku demyelinizačného ochorenia CNS.

Kľúčové slová: demyelinizačné ochorenie CNS – DNA *B. garinii* v likvore.

SUMMARY

Bazovská S., Ďurovská J., Pancák J., Záborská M., Derdákova. M.: Lyme Borreliosis and Demyelinating Disease of the Central Nervous System

A case report is presented of a 55-year-old patient diagnosed with a demyelinating disease of unclear etiology. The patient had Lyme borreliosis in 2004. Specific IgG antibodies against *B. burgdorferi* s. l. were detected in the serum. Intrathecal antibodies were not found in the cerebrospinal fluid, but the presence of *B. garinii* DNA was confirmed by PCR analysis. It can be hypothesized that the borrelial persistence in the body may have been one of the triggers of the autoimmune process resulting in demyelination of the central nervous system (CNS).

Keywords: demyelinating disease of the CNS – *B. garinii* DNA in the cerebrospinal fluid.

Úvod

Lymfská borelióza je multisystémové ochorenie, ktorého klinické príznaky v neskorších štádiách môžu pripomínať rôzne iné ochorenia. V patogeneze ochorenia sa tu uplatňujú predovšetkým autoimunitné procesy, ktoré sa uplatňujú aj pri demyelinizačných ochoreniach CNS. Ich etiológia je multifaktoriálna, podmienená geneticky a enviromentálnymi vplyvmi [10]. Niektoré štúdie poukazujú aj na riziko vzniku týchto ochorení v súvislosti s niektorými infekciami, ako napr. Epstein-Barrovej vírusom [1], resp. s mikroorganizmami, ktoré dlhodobo perzistujú v organizme a priamo alebo nepriamo aktivujú autoimunitné procesy v CNS. Experimentálne práce poukazujú nato, že aspoň niektoré demyelinizačné procesy sú mediované makrofágmi a perzistencia patogénnych mikroorganizmov sa považuje za dôležitý faktor indukujúci demyelinizáciu [7]. Schmutzhard [9] poukázal nato, že aj infekcia *Borrelia*

burgdorferi by mohla byť v kauzálnom vzťahu ku sclerosis multiplex a progresívna forma sclerosis multiplex môže aj klinicky pripomínať progresívnu boréliovú encefalomyelitídu [3]. Uvádzame kazuistiku 54-ročného pacienta s demyelinizačným ochorením CNS nejasnej etiológie, kde laboratórne vyšetrenia poukazujú na možný vzťah k lymfskej borelióze.

Kazuistika

Pacient G. M., 55-ročný, prekonal v roku 2004 po poštípaní kliešťom lymfskú boreliózu, preliečený bol ATB. V tom istom roku bol operovaný pre herniu diskov L4/5 a L5/S1. V roku 2006 a 2007 bol hospitalizovaný pre poruchy artikulácie, poruchy jemnej koordinácie rúk, mravenčenie v stehnách s dg. sclerosis multiplex/vaskulitída. Vyšetrenie MRI mozgu bolo opakované s nálezom T2 hyperintenzívneho ložiska vysoko P vľavo + ďal-

šie bilat. P, popísané ako ischemické. V likvore boli prítomné zvýšené gamaglobulíny, oligoklonálna skladba nebola prítomná. Stav bol na základe klinických vyšetrení uzavretý ako sclerosis multiplex, SP forma a liečený interferónom (Betaferon). Pre vedľajšie účinky, napriek stabilizovanému stavu, liečba bola zmenená na Copaxone-glatimeracetat. V tom čase bola zahájená liečba aj Seroxatomom pre depresie. Následne došlo k podstatnému zhoršeniu zdravotného stavu a v januári 2009 bol pacient hospitalizovaný na prehodnotenie základnej diagnózy.

Vyšetrenie likvoru ukázalo ľahkú proteinocytologickú disociáciu a hypergamaglobulinémiu bez porušenia hematolikorovej bariery. Protilátky proti *B. burgdorferi* s. l. – sérum ELISA IgG pozit. (semikvantitatívne hodnotenie R 2,5), IgM negat., WB IgG pozitívny (Vls++, p17++, p18++ a 5 nešpecifických línií), likvor IF IgG 1 : 4, IgM negat., IA 0,68 negatívne.

PCR vyšetrenie likvoru na prítomnosť *B. burgdorferi* s. l. kitom Amplisens na detekciu 16 S rRNA bolo pozitívne, po izolácii DNA komerčným kitom DNA easy tissue (Qiagen) vyšetrenie nested PCR v dvoch ďalších laboratóriách potvrdilo prítomnosť *B. garinii*.

Vzhľadom k novej cievnjej etiológii boli realizované vyšetrenia: echo-flow, ktoré bolo v norme, embolidetektia, kde boli zaznamenané ojedinelé nepresvedčivé hyperintenzívne signály vpravo a TEE, ktoré bolo v norme. EEG, LTM a CT mozgu boli v norme. Diagnóza bola uzavretá ako demyelinizačné ochorenie CNS nejasnej etiológie.

Diskusia

Klinický priebeh a laboratórne vyšetrenie u pacienta potvrdili diagnózu demyelinizačného ochorenia CNS nejasnej etiológie. Laboratórne vyšetrenie na prítomnosť špecifických protilátok proti *B. burgdorferi* poukázalo na ich prítomnosť v sére, ale intrathekálna produkcia protilátok, ktorá je typická pre chronickú boreliózu sa nepotvrdila. Na druhej strane vyšetrenia PCR testami potvrdili prítomnosť DNA genotypu *B. garinii* v likvore. Samotné vyšetrenie PCR má nízku senzitivitu a v telesných tekutinách sa borelie nachádzajú v nízkej koncentrácii [5]. Testy nie sú štandardizované, a preto sme vyšetrenie likvoru robili v 3 nezávislých laboratóriách. Samotný význam nálezu borélií alebo DNA v likvore pacienta nie je vždy jasný. I keď u väčšiny pacientov tento nález je v spojení s klinicky diagnostikovanou neuroboreliózou, u niektorých pacientov bol prekvapujúci [11].

Nezistili sa u nich klinické príznaky charakteristické pre diagnózu lysmskej boreliózy, čo sa pozorovalo skorej v súvislosti s izoláciou *B. afzelii* ako pri náleze *B. garinii*, ktorý bol skoro vždy spojený s typickými klinickými príznakmi lysmskej boreliózy.

Lysmská borelióza prebieha veľaokrát nepoznane, subklinicky alebo s miernymi klinickými príznakmi [6], načo poukazuje aj výskyt antireliéových protilátok u zdravej populácie [2]. DNA *B. burgdorferi* môže po ochorení alebo aj po nepoznanej infekcii pretrvávajúť v organizme mesiace až roky [4, 6, 11]. Pacient G. M. prekonan v roku 2004 lysmskú boreliózu, na ktorú bol liečený a nie je jasné, či pretrvávanie DNK *B. garinii* u pacienta mohlo viesť k reakcii organizmu, ktorá podporila vznik demyelinizačného ochorenia. Slovensko patrí medzi endemické oblasti výskytu lysmskej boreliózy a vyšetrenie kliešťov poukazuje nato, že najčastejšie sa vyskytuje genotyp *B. garinii* [8], ktorý sa dáva najviac do súvislosti s neurologickým poškodením. V patogeneze neskorších štádií lysmskej boreliózy ako aj rôznych ochorení CNS sa uplatňujú autoimunitné procesy. Možno predpokladať, že infekcia *B. garinii*, ktorá má za následok perzistenciu borélií v organizme, môže byť jedným zo spúšťačov autoimunitného procesu vedúceho k vzniku ochorenia CNS.

Záver

Perzistencia patogénnych mikroorganizmov v organizme sa považuje za jeden z faktorov, ktoré vedú k demyelinizačným ochoreniam. Prítomnosť *B. garinii* v likvore u pacienta G. M. roky po prekonaní lysmskej boreliózy, by mohla byť jedným zo spúšťačov autoimunitného procesu, ktorý viedol k tomuto ochoreniu CNS.

Literatúra

1. Ascherio, A., Munger, K. L. Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part I: the role infection. *Ann. Neurol.*, 2007, 4, p. 288–299.
2. Bazovská, S., Guryčová, D., Výrosteková, V. et al. Protilátky proti pôvodcom niektorých prírodných ohniskových nákaz v sérach darcov krvi zo západného Slovenska. *Epidem. Microbiol. Immunol.*, 2010, 59, 4, s. 168–171.
3. Hartmann, M., Pfadenhauer, K. Intrathecal antibody production against *Borrelia burgdorferi* in a patient with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Europ. J. Neurol.*, 2003, 10, 6, p. 747–748.
4. Honegr, K., Hulínská, D., Dostál, V. et al.: Perzistence *Borrelia burgdorferi* sensu lato u pacientu s lymeskou boreliózou. *Epidem. Microbiol. Immunol.*, 2001, 50, 1, p. 10–16.

5. **Moravcová, L., Pícha, D., Vaňoušová, D., Hercogová, J.** Průkaz boreliové DNA u pacientů s neuroboreliózou a erythema migrans. *Klin. Mikrobiol. infek. Lék.*, 2009, 5, s. 159–164.
6. **Pícha, D., Moravcová, L., Holečková, D. et al.** Examination of specific DNA by PCR in patients with different forms of Lyme borreliosis. *Int. J. Dermatol.*, 2008, 47, p. 1004–1010.
7. **Sarma Das Jayasri A** Mechanism of Virus-Induced Demyelination. *Inderdiscip. Perspect. Infect. Dis.*, 2010, 21 June, p. 1–35.
8. **Smetanová, K., Burri, C., Peréz et al.** Detection and identification of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies in ticks from three different region in Slovakia. *Wien. Klin. Wochenschr.* 2007, 119, p. 17–18, p. 534–537.
9. **Schmutzhard, E.** Multiple sclerosis and Lyme borreliosis. *Wien. Klin. Wochenschr.*, 2002, 114, p. 13–14, p. 539–543.
10. **Staines, D. R.** Are multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis autoimmune disorders of endogenous vasoactive neuropeptides? *Med. Hypothesis*, 2008, 70, p. 413–418.
11. **Strle, F., Ruzič-Sabljič, J., Cimperman, S. et al.** Comparison of Findings for Patients with *Borrelia garinii* and *Borrelia afzelii* Isolated from Cerebrospinal Fluid. *Clin. Infect. Dis.*, 2006, 43, p. 704–710.

Práce bola podporená Grantom VEGA č.1/4282/7.

Do redakce došlo dne 27. 10. 2010.

Adresa pro korespondenci:
 Doc. MUDr. Sylvia Bazovská
 Ústav epidemiologie LF UK
 Špitálska 24
 813 72 Bratislava
 e-mail: sylvia.bazovska@fmed.uniba.sk

Infection with *B. burgdorferi* s.l., and the CNS demyelinating disease

Judita ĎUROVSKÁ¹, Sylvia BAZOVSKÁ², Jaroslav PANCÁK¹, Magdaléna ZÁBORSKÁ³,
Markéta DERDÁKOVÁ⁴, Pavel TRAUBNER¹

¹ First Neurological Clinic, Faculty of Medicine, Comenius University – Teaching Hospital,
Bratislava, Slovak Republic

² Institute of Epidemiology, Faculty of Medicine, Comenius University, Bratislava, Slovak Republic

³ Institute of Microbiology, Faculty of Medicine, Comenius University, Bratislava, Slovak Republic

⁴ Institute of Parasitology, Slovak Academy of Sciences, Košice, Slovak Republic

Correspondence to: Judita Ďurovská, MD.
1st Department of Neurology, Faculty of Medicine, Comenius University,
Mickiewiczova 13, Bratislava, Slovak Republic.
TEL: +421 257 290 446; E-MAIL: durovaska@borelioza.sk

Submitted: 2011-06-10 Accepted: 2011-07-20 Published online: 2011-08-29

Key words: CNS demyelinating disease; *B. burgdorferi* infection; positive PCR

Neuroendocrinol Lett 2011;32(4):411–414 PMID: 21876503 NEL320411C05 © 2011 Neuroendocrinology Letters • www.nel.edu

This paper is dedicated to the 70th birthday of Prof. Traubner

Abstract

The work describes three cases of patients at various ages, diagnosed for CNS demyelinating disease. The presence of specific antibodies to *B. burgdorferi* sensu lato, and findings of *B. burgdorferi* s.l. DNA, identified in one case as the genospecies *B. garinii* in the liquor, indicated previous experience with the infection. Presumably, persistence of borrelia in the organism could act as one of the autoimmune process triggers, resulting in the demyelinating disease.

INTRODUCTION

Lyme borreliosis (LB) is a multisystem disease, showing clinical symptoms which, at later stages, may be suggestive of various other disorders. Late-stage Lyme borreliosis may become manifest several months or years after the infection, and attack joints (Lyme arthritis), the skin (acrodermatitis chronica atrophicans), or the nervous system. In Europe, damage to the nervous system appears relatively more frequently – 40% to 60% in untreated patients (Bojar 1996). Isolated lesions of the facial nerve as a separate symptom appear in 7% of Lyme disease patients, or as much as 25% in endemic regions (Halperin *et al.* 1992). The disease presents a very variegated clinical picture, afflicting periph-

eral as well as central nervous systems. Nearly all neurological syndromes, ranging from meningoencephalitis, neuritis of cranial nerves or even polyradiculoneuritis, psychical changes in the form of depressions, chronic fatigue syndrome to panic attacks, etc., were referred to be borreliosis connected. Radiculitis, imitating vertebro-disco-genically preconditioned radiculopathy may also appear (Pachner 1989).

Certain authors in the U.S. use the persistent infection designation, i.e. the Post-Lyme Disease Syndrome. Such manifestations may be triggered by prior *B. burgdorferi* infections, with active symptoms of the infection absent at the time

To cite this article: Neuroendocrinol Lett 2011;32(4):411–414

CASE REPORT

of their demonstration. They appear also in treated patients who are in remission. The clinical image of disseminated damage to the central nervous system (CNS), appearing as sclerosis multiplex (SM), relatively frequently occurs in neurological practice, while the disorder is, in fact, linked to Lyme borreliosis, usually designated as the SM-like syndrome (Reik 1991; Halperin *et al.* 1991). Cerebral MRI of these patients shows multiple hyper-intense foci typical for demyelination, although neither sclerosis multiplex nor borreliosis nor any other inflammatory demyelination (e.g. herpesvirus infections or morbilli) are characterized by such foci. It follows from this that a pathognomonic clinical picture for borreliosis is nonexistent; therefore the disease is very difficultly diagnosed and may, in some case, result in misdiagnosis.

Late-stage LB pathogenesis is primarily expressed in autoimmune processes with CNS affections, also appearing in demyelinating CNS disorders. Their etiology is multifactorial, preconditioned genetically as well as environmentally (Staines 2008; Pohl 2009). Some studies point upon the risks of occurrence of such diseases in connection with specific infections, e.g. with the Epstein-Barr virus (Ascherio & Munger 2010) or with prolonged persistence microorganisms, which directly or indirectly activate autoimmune processes in the central nervous system. Experimental works have indicated that at least some demyelination processes are macrophage mediated, and the persistence of pathogens is considered an important factor indicative of demyelination (Jayasri 2010). Schmutzhard (2002) pointed out that *Borrelia burgdorferi* infection could also be in a causal relationship with sclerosis multiplex, and the progressive SM form may clinically resemble a case of progressive encephalomyelitis caused by borrelia (Hartmann & Pfadenhauer 2003).

Three patient cases, diagnosed as CNS demyelinating disease, whose laboratory results indicate an association with Lyme borreliosis are described below.

CASE REPORT 1

Patient B.D. (28), treated for psoriasis and hypertension, was admitted for feelings of stiffened lips, tongue, palate, teeth, nose and dextral parts of the forehead since mid-May 2007. Stiffening started to recede approximately two weeks from the first symptoms. The anamnesis showed tick bite, without subsequent erythema.

Cerebral MRI showed a small noninvasive focus in the dextral cerebellar peduncle + changes in the adjacent n. trigeminus l. dx. part along with sporadic minute nonspecific foci bilaterally in the white cerebral matter, and a venal temporo-parietal angioma sinistrally and also in the frontal dextral position. No substantial topical neurological findings were found. After admittance, vascular etiology of the condition was also considered but, due to the patient age, inflammatory etiology or potential occurrence of the demyelinating disease could

not be excluded. A second cerebral MRI showed moderate regression of the cerebellar focus, without gadolinium enhancement.

The liquor showed moderate pleocytosis, hyperproteinorachia and hyper- γ -globulinaemia.

Antibodies to *B. burgdorferi* s.l. – serum enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) Immunoglobulin G (IgG) positive (semi-quantitative evaluation R 1,3), Immunoglobulin M (IgM) negat., Western blot (WB) IgG – positive outer surface protein (OspC+, OspA+, p41+++ and 6 nonspecific lines), liquor immunofluorescence (IF) IGAM 1:2. Presence of *B. burgdorferi* s.l. in the liquor was proven by the polymerase chain reaction (PCR) (Amplisens kit for 16S rRNA detection). Ultrasonography (USG) of the cerebrum was carried out to exclude vascular genesis, USG extra-, and intracranially without stenotic changes, cerebral computed tomography (CT) and trans-oesophageal echocardiography, all of which were within the norm. After a comprehensive reevaluation of the anamnesis, objective findings and test results, the condition was concluded as a CNS demyelinating disease case.

CASE REPORT 2

Patient O.I. (46) without tick bite anamnesis. In May 2007 she experienced a non-rotational vertigo attack lasting 2 days, then receding spontaneously. She had not consulted a physician. She had difficulties over the last half-year, first expressed as fatigue and heavy-leg feelings dextrally, stumbling but not falling during a walk. Gradually, dextral coxalgia evolved with radiation into the thigh and anterior through the knee to the big toe. Frequent urination was observed, without incontinence. Cerebral CT was normal, MRI of the lumbo-sacral spine, taken in 2008, showed minimal L4 retrolistesis, L3/4 and L4/5 discs protrusion with sinistral neuroforaminal stenosis and instability in the segment. Injection of the dextral hip joint in orthopedic treatment had only temporary effects, without improvement of overall conditions. Objective findings showed quadrihyperreflexion, slight atrophy m. triceps surae dextrally, weakened dorsal flexion of the big toe dextrally, dead planta sinistrally, sigmoid spinal scoliosis Th-L. Potential vertebrogenic etiology of the complaints was assumed, but the patient's central symptomatology pointed upon possible pyramidal tract lesions. Cerebral MRI showed numerous demyelinating foci in the CNS meeting the Barkhof criteria for SM, correlated with the liquor test showing increased γ -globulin levels and the presence of intrathecal oligoclonally structured IgG synthesis. Antibodies to *B. burgdorferi* s.l. – serum IF IgG 1:256, IgM negative, WB IgG – positive antigen (p30+, Vls+, p41+++), liquor IF IGAM 1:2. PCR in liquor proved the presence of *B. burgdorferi* s.l. (kit Amplisens for detection 16S rRNA). Transcranial magnetic stimulation supported the assumed presence of lesions in the central motor tract. Evaluation of the clinical picture of

the anamnesis and of the ancillary tests resulted in the diagnostic conclusion of Type SM CNS demyelinating disease.

CASE REPORT 3

Patient G.M. (55), treated 5 years earlier for L.B. with antibiotics. In that year he had also surgery for L4/5 and L5/S1 discs hernia. Hospitalized in the years 2006 and 2007 with SM diagnosis for disorders of articulation, of the fine coordination of hands, tingling in the thighs. Repeated cerebral MRI in T2 found hyperintensity foci highly parietally to the left, and further bilateral foci parietally. The liquor showed increased γ -globulins, without the presence of oligoclonal structure. Based on clinical tests, the patient condition was concluded as Type SM demyelinating disease, secondary progressive form. The patient was again hospitalized in 2009 for worsening of the condition. The liquor showed slight proteinocytological dissociation and hyper- γ -globulinaemia without damage to the blood-liquor barrier. Antibodies to *B. burgdorferi* s.l. – serum ELISA IgG positive, (semiquantitative evaluation R 2,5), IgM negative, WB IgG – positive (VIs++, p17++, p18++ and 5 nonspecific lines), liquor IF IgG 1:4, IgM negative, liquor was positively PCR tested for *B. burgdorferi* s.l. using the Amplisens 16S rRNA detection kit, after isolation of deoxyribonucleic acid (DNA) using the commercial DNA easy-tissue (Qiagen) kit, nested PCR confirmed the presence of *B. garinii*.

Considering the vascular etiology possibility the following tests were carried out: USG cerebral circulation extra-, and intracranially, without substantial stenotic changes; cerebral CT and trans-oesophageal echocardiography were both within norm. The condition was concluded as CNS demyelinating disease of unclear etiology.

DISCUSSION

The clinical course and laboratory tests of these patients pointed toward the demyelinating CNS disease diagnosis. Laboratory tests for specific *B. burgdorferi* s.l. antibodies showed their presence in the serum, but intrathecal production of these antibodies, typical of chronic borreliosis, was not confirmed. On the other hand, PCR tests showed the presence of *B. burgdorferi* s.l. DNA, and in the case of one patient, also of the genospecies *B. garinii* in the liquor. In itself, PCR examination manifests low sensitivity, the tests are not standardized, and borrelia are present in low concentrations in the biological material (Moravcová *et al.* 2009). The importance of finding borrelia or *B. burgdorferi* s.l. DNA in the liquor is not always clear. Although this finding is linked to clinically diagnosed neuroborreliosis in the majority of patients, it appears as a surprise in some cases (Strle *et al.* 2006) in which the clinical symptoms characteristic for Lyme borreliosis were not

found; this was previously observed more often in connection with the isolation of *B. afzelii* than in *B. garinii* findings, which was nearly always linked to the typical clinical symptoms of Lyme borreliosis.

Cerebral MRI has, in all three patients, shown multiple hyperintensity foci, typical for demyelination. Lyme borreliosis frequently proceeds in a masked way, subclinically or with only moderate clinical symptoms (Plícha *et al.* 2008); this is shown also by the occurrence of antibodies to Borrelia in the healthy population (Bazovská *et al.* 2010). *B. burgdorferi* DNA may, after an infection, be retained for months or even years in the organism (Honegr *et al.* 2001, Plícha *et al.* 2008, Strle *et al.* 2006). Patient G.M. had been treated for L.B. in the year 2004, and it remains unclear whether or not the persistence of *B. garinii* DNA could have resulted in such response of the organism that supported the occurrence of the demyelinating disease, while the anamneses of the remaining two patients show no previous L.B. experience, notwithstanding the positive ELISA IgG as well as positive PCR in the lab tests.

Slovakia is an area with endemic occurrence of Lyme borreliosis, and tick examinations showed that the genospecies *B. garinii* (Smatanova *et al.* 2007), which is prevalently linked to neurological damage, appears most frequently. The later-stage pathogenesis of Lyme borreliosis as well as of different CNS diseases entails autoimmune processes.

This work was aimed at the provision of information relating to three case histories of patients where, considering their anamnesis, age, clinical picture and laboratory test results, an unequivocal diagnosis could not be easily reached, and the respective conditions were concluded as CNS demyelinating disease. Presumably, all three patients had been infected with L.B., resulting in persistence of borrelia in the organism, which could have been one of the triggers of the autoimmune process leading to the CNS demyelinating disease.

ACKNOWLEDGEMENT

This work was supported with the VEGA 1/4281/07 grant.

REFERENCES

- Ascherio A, Munger KL (2007) Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part I: the role infection. *Ann Neurol.* **4:** 288–299.
- Bazovská S, Guryčová D, Výrosteková V, *et al.* (2010) Protilátky proti pôvodcom niektorých prírodných ohniskových nákaz v sérach darcov krvi zo západného Slovenska. *Epidem Microbiol Immunol.* **4:** 168–171.
- Bojar M (1996) Lymeská borrelióza. Praha, Maxdorf/Jessenius, 224 s.
- Halperin JJ, Volkman DJ, Wu P (1991) Central Nervous System Abnormalities in Lyme neuroborreliosis. *Neurology.* **41:** 1571–1582.
- Halperin JJ, Golightly M (1992) Lyme borreliosis in Bells palsy. *Neurology.* **42:** 1268–1270.

- 6 Hartmann M, Pfadenhauer K (2003) Intrathecal antibody production against *Borrelia burgdorferi* in a patient with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Europ J Neurol.* **10**: 747–748.
- 7 Honegr K, Hulinská D, Dostál V, et al. (2001) Perzistence *Borrelia burgdorferi* sensu lato u pacientu s lymeskou boreliózou. *Epidem Microbiol Immunol.* **50**: 10–16.
- 8 Jayasri Das Sarma (2010) A Mechanism of Virus-Induced Demyelination. *Interdiscip. Pespect Infect Dis.* **10**: 1–35.
- 9 Moravcová L, Plička D, Vaňousová D, Hercogová J (2009) Pukaz boreliové DNA u pacientu s neuroboreliózou a erthema migrans. *Klin mikrobiol infek. lek.* **5**: 159–164.
- 10 Pachner AR (1989) Neurologie manifestation of Lyme disease, the „new imitátor“. *Rev. Infect. Dis.* **6**: 1482–1486.
- 11 Plička D, Moravcová L, Holečková D, et al. (2008) Examination of specific DNA by PCR in patients with different forms of Lyme borreliosis. *Int J Dermatol.* **47**: 1004–1010.
- 12 Pohl D (2009) Epstein-Barr virus and multiple sclerosis. *J Neurol Sci.* **286**: 62–64.
- 13 Reik LJ (1991) *Lyme Disease and the Nervous System.* Thieme Medical Publishers, New York. **338**: 128–129.
- 14 Smetanova K, Burri C, Peréz D, Gern L, Kocianová E (2007) Detection and identification of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies in ticks from three different region in Slovakia. *Wien Klin Wochenschr.* **119**: 17–18, 534–537.
- 15 Schmutzhard E (2002) Multiple sclerosis and Lyme borreliosis. *Wien Klin Wochenschr.* **114**: 539–543.
- 16 Staines DR (2008) Are multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis autoimmune disorders of endogenous vasoactive neuropeptides? *Med Hypothesis.* **70**: 413–418.
- 17 Strle F, Ruzič-Sabljič J, Cimperman S, et al. (2006) Comparison of Findings for Patients with *Borrelia garinii* and *Borrelia afzelii* Isolated from Cerebrospinal Fluid. *Clin Infect Dis.* **43**: 704–10.

The genospecies *B. burgdorferi* s.l., isolated from ticks and from neurological patients with suspected Lyme borreliosis

Sylvia BAZOVSKÁ¹, Judita ĎUROVSKÁ², Markéta DERDÁKOVÁ^{3,4},
Veronika TARAGELOVÁ⁴, Jaroslav PANCÁK², Magdaléna ZÁBORSKÁ⁵, Pavel TRAUBNER²

¹ Institute of Epidemiology, Faculty of Medicine CU, Bratislava, Slovakia

² 1st Department of Neurology, Faculty of Medicine CU, Bratislava, Slovakia

³ Parasitological Institute, Slovak Academy of Sciences, Košice, Slovakia

⁴ Institute of Zoology, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Slovakia

⁵ Institute of Microbiology, Faculty of Medicine CU, Bratislava, Slovakia

Correspondence to: Assoc. Prof. Sylvia Bazovska, MD., PhD.
Comenius University, Faculty of Medicine, Institute of Epidemiology,
Špitálska 24, 813 72 Bratislava, Slovakia.
TEL: +421-2-59357487; E-MAIL: sylvia.bazovska@fmed.uniba.sk

Submitted: 2011-06-10 Accepted: 2011-07-25 Published online: 2011-08-29

Key words: *B. burgdorferi*; tick infestation; identification in CSF

Neuroendocrinol Lett 2011; 32(4):491–495 PMID: 21876490 NEL320411A22 © 2011 Neuroendocrinology Letters • www.nel.edu

This paper is dedicated to the 70th birthday of Prof. Traubner

Abstract

OBJECTIVE: Lyme borreliosis (LB) is the most disseminated tick-borne disease in the Northern hemisphere, and infestation with ticks is one of the essential factors influencing transmission of the disease to humans. This work intends to compare the occurrence of borrelia circulating in indigenous ticks and in patients suffering from neurological diseases.

MATERIALS & METHODS: The total of 660 nymphs and 567 adult ticks from the Bratislava and Košice areas was examined over the years 2001–2004, and the cerebrospinal fluid (CSF) of 82 neurological patients suffering from suspected Lyme borreliosis infection was investigated in the 2007–2009 period, using the polymerase chain reaction method (PCR).

RESULTS: PCR investigation proved presence of borrelia in 23.3% of the total 1227 ticks; of these, co-infection was found in 2.7% of all ticks. *Borrelia garinii* (9.9%) and *B. valaisaina* (9.2%) were the prevalent types. PCR investigation of the CSF samples of 32 patients with clinically diagnosed Lyme borreliosis showed the presence of *B. burgdorferi* s.l. in 17 cases. Positive results were found also in patients with unclear or different diagnoses. In cases where the genospecies could be identified, *B. garinii* was most frequently found (8x), followed with *B. burgdorferi* s.s. (4x) and *B. afzelii* (3x).

CONCLUSIONS: The high infestation level of ticks with borrelia, mainly with *B. garinii* which is the most-often documented borrelia species identified in neurological patients, is indicative of a high risk of this contamination in Slovakia. *B. garinii* were found also in our neuroborreliosis patients, whereas their proof in the CSF of patients with suspected neuroborreliosis or with a different clinical diagnosis pointed upon their persistence after an infectious experience. However,

To cite this article: Neuroendocrinol Lett 2011; 32(4):491–495

knowledge of not only the genospecies but also of the genotypes capable of eliciting an invasive disorder would be necessary for better clarification of the relationship between borrelia and their peccant capacity. Identification of the invasive borrelia types circulating in nature, and clarification of the vector vs. human infection incidence relationship is of importance from the aspect of detailed knowledge of the epidemiology of this disease.

INTRODUCTION

Lyme borreliosis (LB) is the most disseminated tick-borne disease in the Northern hemisphere. In nature, *Borrelia burgdorferi* s.l. (sensu lato) circulates among various hosts (wild animals) and ticks, whereby the tick *Ixodes ricinus* is known as the main European vector. Of the 18 known genospecies (Stanek and Reiter, 2011), *B. burgdorferi* s.s. (sensu stricto), *B. garinii* and *B. afzelii* represent the etiological agents of localized, disseminated and chronic Lyme borreliosis in Europe, while in the North American population affected with the disease only *B. burgdorferi* s.s. has been appearing. Other European types, viz. *B. spielmanii*, were described in connection with localized early disorders, along with *B. bissettii* and *B. valaisiana* linked to very sporadically occurring diseases and *B. lusitaniae*, the significance of which in human afflictions is not known. The extensive variability of borrelia and their different geographic distribution in relatively small areas were pointed out in several studies (Bunikins *et al.* 2004, Derdáková and Lenčáková, 2005, Lenčáková *et al.* 2006). Tick infestation is one of the essential factors influencing trans-

mission of the disease also to humans. Repeated tick studies in Slovakia confirmed the high level of infestation of this country, oscillating between 2.1% and 41.7% in dependence on the region and the method of detection (Derdáková and Lenčáková, 2005, Smatanová *et al.* 2007). Different genospecies are linked to specific clinical diseases; *B. garinii*, found in Europe, mostly connects to neurological diseases, *B. afzelii* to dermal disorders, as e.g. erythema migrans and acrodermatitis chronica (Lebech 2002, Strle *et al.* 2006). The objective of our work was to compare the occurrence of borrelia circulating in ticks originating in Slovakia, and in patients suffering from neurological diseases.

MATERIALS AND METHODS

During years 2001–2004 questing ticks were flagged in suburban forests around two largest cities in Slovakia (Bratislava and Košice). Total of 567 adult and 660 nymphal *I. ricinus* were analyzed. Extracted DNA was subjected to nested or single PCR targeting the 5S – 23S intergenic spacer (IGS) (Rjipkema *et al.* 1995; Derdáková *et al.* 2003). Spirochetes were assigned to a species by RFLP (Derdáková *et al.* 2003) or reverse-line blot assay (Rjipkema *et al.* 1995).

Cerebrospinal fluid (CSF) from 82 neurological patients suffering from suspected Lyme borreliosis was examined in the 2007 – 2009 period, using the polymerase chain reaction (PCR) – commercial Amlisens test, detecting 16S rRNA *Borrelia burgdorferi* s.l. and, in parts of the patients, also by DNA isolation with the easy tissue Qiagen kit and diagnostics rrf(5S) – rrl nested PCR method.

Clinically, the disease was diagnosed on the basis of recommendations for Lyme borreliosis and neuroborreliosis diagnoses (Blanc *et al.* 2007; Stanek *et al.* 2011).

RESULTS

In the PCR examination of 1227 ticks, borrelias were found in 23.3% of all cases, with co-infection appearing in 2.7% (Tables 1 and 2). Findings of *Borrelia garinii* (9.9%) and of *B. valaisiana* (9.2%) prevailed, with infestation appearing in adult ticks more profoundly than in nymphs. *B. valaisiana* was most frequently found in West Slovakia. Least incidence of the main pathogen types was found in *B. burgdorferi* s.s., relatively more often found in ticks captured in the Košice area, as opposed to ticks around Bratislava.

Of all 32 patients clinically diagnosed with Lyme borreliosis, the presence of *B. burgdorferi* s.l. was proven in 17 cases by PCR in the CSF (Table 3). In addition, 11 out of 23 patients were also found positive for the organism, although their diagnoses were not unequivocal and failed to fully meet the criteria of neuroborreliosis, mainly in cases of protracted duration of the disease; nevertheless, the clinical course of the disorder and overall examination had been pointing toward this

Tab. 1. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* s.l. in *Ixodes ricinus* ticks from two areas in Slovakia.

locality		No. of ticks examined	No. of ticks Positive	% of positive ticks
Košice area	nymphs	240	36	15
	adults	279	71	25.5
	Total	519	107	20.6
	co-infections	519	18	3.5
Bratislava area	nymphs	420	88	21
	adults	288	91	31.6
	total	708	179	25.3
	co-infections	708	15	2.1
Total	nymphs	660	124	18.8
	adults	567	162	28.6
	total	1227	286	23.3
	co-infections	1227	33	2.7

Tab. 2. Distribution of *Borrelia burgdorferi* s.l. genospecies in *I. ricinus* ticks from two areas in Slovakia including co-infections, in Bratislava district 17 borrelial infections could not be typed to the species.

Locality	stage	No of ticks Examined	Distribution of <i>Borrelia</i> genospecies in <i>I. ricinus</i> *			
			<i>B.garinii</i>	<i>B. valaisiana</i>	<i>B. afzelii</i>	<i>B. burgdorferi</i> s.s.
Košice area	Nymphs	240	18	9	7	8
	Adults	279	29	21	16	17
	Total (%)	519	47 (9.1)	30 (5.8)	23 (4.5)	25 (4.8)
Bratislava area	Nymphs	420	39	32	31	1
	Adults	288	35	51	9	3
	Total (%)	708	74 (10.5)	83 (11.7)	40 (5.6)	4 (0.6)
Total (%)		1227	121 (9.9)	113 (9.2)	63 (5.1)	29 (2.4)

aetiology, and these patients were conclusively characterized as suspected neuroborreliosis. Furthermore, 5 patients suffering from other basic diseases were also found positive.

In patients where the genospecies could be identified, *B. garinii* was most frequently found (8× – Table 4); of these, neuroborreliosis was clinically confirmed in five cases, and suspected in one case. The diagnoses of 2 patients were different (demyelinating disease); the anamnesis of one of these showed past LB experience. *B. burgdorferi* s.s. was found in 4 patients, two of whom were clinically confirmed as neuroborreliosis, and 2 clinically concluded as suspected neuroborreliosis. *B. afzelii* was found in 3 patients in the form of co-infections with *B. garinii* (1× – susp. neuroborreliosis, 2× – other diagnoses).

DISCUSSION

The high infestation of ticks with borrelia, mainly *B. garinii* is indicative of a high risk to contract neuroborreliosis. We wished to clarify this relationship by examining the cerebrospinal fluid (CSF) of suspected Lyme borreliosis patients, using the polymerase chain reaction method (PCR). The importance of this examination in the diagnostics of neuroborreliosis is not quite clear. The tests are not standardized, and the results are affected by a multitude of factors including procedural methodology, sample provenience, and different aspects applied in the individual studies (Cerar *et al.* 2008; Moravcová *et al.* 2009). Most often, the declared test sensitivity range is 12–46% (Honegr *et al.* 2001; Pícha *et al.* 2008; Cerar *et al.* 2008; Stanek *et al.* 2011), or somewhat higher at early-stage neurological patients (Moravcová *et al.* 2009); the findings in our study were comparable. The low sensitivity level is caused mainly by the low primary concentration of borrelia in the organism, their genetic heterogeneity, and technical factors relating to sample processing and to the selection of patient groups. Our patients diagnosed with neuroborreliosis most manifested *B. garinii*,

Tab. 3. Detection of *B. burgdorferi* s.l. by polymerase chain reaction in CSF in patients with suspected Lyme borreliosis.

Clinical diagnosis	number of patients	PCR	
		posit.	negat.
neuroborreliosis	32	17	15
Lyme arthritis	8	–	8
susp. neuroborreliosis	19	11	8
	59	28	
Other diseases:			
demyelinating disease	4	4	–
M. Parkinson	2	1	1
tumor	2	–	2
lumboischiating sy	3	–	3
cervical myelopathy	3	–	3
cephalea	8	–	8
neurolues	1	–	1
Total	82	33	49

Tab. 4. Distribution of genospecies *B. burgdorferi* in CSF in patients with suspected lyme borreliosis

Genospecies	neuroborreliosis	clinical diagnosis	
		susp. neuroborreliosis	other
<i>B. burgdorferi</i> s.s.	2	2	–
<i>B. garinii</i>	5	1	2
<i>B. ajzelii</i>	–	1	2

which is the most frequent type of borrelia confirmed in patients with neurological disorders (Strle *et al.* 2006, Cerar *et al.* 2008). We have found *B. garinii* also in patients suffering from other basic diseases. Prolonged persistence of borrelia after an infectious experience is well documented – presence of the organism was found

in the central nervous system also after an asymptomatic infection (Pícha *et al.* 2008; Cerar *et al.* 2008). The anamnesis of one of our patients with *B. garinii* DNA found in the CSF and diagnosed with demyelinating disease showed LB experience (Ďurovská *et al.* 2011), while others, positively tested by PCR, might have been subclinically affected, or the infection remained unnoticed with slight and non-specific clinical symptoms. References report that major parts (minimally 20–30%) of *B. burgdorferi* infections are asymptomatic, or show nonspecific symptoms (Honegr *et al.* 2001; Pícha *et al.* 2008).

Several genotypes are known within the genospecies *B. garinii*, based on analyses of OspC and Osp A genes; of these, OspC is linked to tick saliva and host invasiveness (Fingerle *et al.* 2002; 2007). The genes are differently distributed within geographic regions, hosts and vectors, and their capability to induce invasive diseases is different (Jones *et al.* 2006). From this viewpoint, determination of genotypes in the identification of *B. garinii* would be of interest in our patients and in ticks.

In our examination, 2.7% of all ticks were co-infected with two or three genospecies. Recent studies pointed out high incidence of compound tick infection (Lenčáková *et al.* 2006; Smatanova *et al.* 2007; Crowder *et al.* 2010). In North America as much as 39% of all examined adult *Ixodes scapularis* ticks were infected with more than one *B. burgdorferi* s.s. genotype. The examination of tick genotypes in Slovak regions would obviously show even more co-infections, which are the potential sources of growing dissemination risks of the disease in humans.

Borrelia are highly variable, and their multilocus sequential analysis and typification point upon their higher diversity than originally reported (Bunikis *et al.* 2004). Recently, 53 genotypes were identified within the genospecies *B. burgdorferi* s.s. alone, of these 44 were found in Northern America. Only 6.6% American genotypes were found in Europe as well, while 27% of European genotypes were observed in America (Crowder *et al.* 2010). The capability of individual genotypes to induce a local or invasive disease is not known. Further studies may be necessary to clarify whether a specific combination of genotypes is involved in the tick co-infection, or relates to affliction in humans.

CONCLUSION

Different clone complexes of *B. burgdorferi* prefer different host types, and their pathogenicity to humans varies, some of them being more frequently linked to invasive disorders. Identification of the invasive types of *borrelia* circulating in the natural environment, and their relation to the disease contracted by humans is important from aspects of improved knowledge of its epidemiology. From this viewpoint close cooperation is necessary between workers in the field of environmental and microbial ecology on one hand, and health care

researchers on the other hand. The capability to rapidly identify, from clinical materials, the individual types of *borrelia* and mainly the genotypes linked to invasive disorders would be very important from viewpoints of treatment of these patients.

ACKNOWLEDGEMENTS

The work was supported with grants from VEGA 1/4282/7, VEGA 2/0161/09 and Research & Development Operational Programme, funded by ERDF (code ITMS 26240220044)

REFERENCES

- Blanc F, Jaulhac B, Fleury M, de Seze J, de Martino SJ, Remy V *et al.* (2007) Relevance of the antibody index to diagnose Lyme neuroborreliosis among seropositive patients. *Neurology*. **69**: 953–958.
- Bunikis J, Garpmo U, Tsao J, Berglund J, Fish D, Barbour AG (2004) Sequence typing reveals extensive strain diversity of the Lyme borreliosis agents *Borrelia burgdorferi* in North America and *Borrelia afzelii* in Europe. *Mikrobiol.* **150** (Pt 6): 1741–55.
- Crowder DC, Matthews HE, Chutzer S, Rounds MA, Luft BJ, Nolte O *et al.* (2010) Genotypic Variation and Mixtures of Lyme *Borrelia* in *Ixodes* Ticks from North America and Europe. *PloS One*. **5**: e10650
- Cerar T, Ogrine K, Cimperman J, Lotrič-Furlan S, Strle F, Ružič-Sabljčič E (2008) Validation of Cultivation and PCR Methods for Diagnosis of Lyme neuroborreliosis. *J Clin Microbiol.* **46**: 3375–3379.
- Derdánková M, Beati L, Petko B, Stanko M, Fisch D (2003) Genetic variability within *Borrelia burgdorferi sensu lato* genospecies established by PCR-SSCP analysis of the rrfA-rrlB intergenic spacer in *Ixodes ricinus* ticks from the Czech Republic. *Appl Environ Microbiol* **69**: 509–516.
- Derdánková M, Lenčáková D (2005) Association of genetic variability the *Borrelia burgdorferi sensu lato* with the ecology, epidemiology of Lyme borreliosis in Europe. *Ann Agric Environ Med.* **12**: 165–172.
- Ďurovská J, Bazovská S, Pancák J, Záborská M, Derdánková M, Traubner P (2011) Infection of *Borrelia burgdorferi* s.l. and demyelinating disease CNS. *Neuroendocrinol Lett.* In press
- Fingerle V, Rauser S, Hammer B, Kahl O, Schulte-Spechtel U, Gern L, Wilske B (2002) Dynamics of dissemination and outer surface protein expression of different European *Borrelia burgdorferi sensu lato* strains in artificially infected *Ixodes ricinus* nymphs. *J Clin Microbiol.* **40**: 1456–63.
- Fingerle V, Goettner G, Gern L, Wilske B, Schulte-Spechtel U (2007) Complementation of *Borrelia afzelii* OspC mutant highlights the crucial role of OspC for dissemination of *Borrelia afzelii* in *Ixodes ricinus*. *Int J Med Microbiol.* **297**: 97–107.
- Honegr K, Hulínská D, Dostál V, Gebousky P, Hanková E, Horáček J *et al.* (2001) Persistence *Borrelia burgdorferi sensu lato* u pacientu s lymeskou boreliózou. *Epidem Microbiol Immunol.* **50**:10–16.
- Jones KL, Glickstein LJ, Damle N, Sikand VK, McHugh G, Steere AC (2006) *Borrelia burgdorferi* Genetic Markers and Disseminated Disease in Patients with Early Lyme Disease. *J Clin Microbiol.* **44**: 4407–4413.
- Lebech AM (2002) Polymerase chain reaction in diagnosis of *Borrelia burgdorferi* infections and studies on taxonomic classification. *APMIS suppl.* **105**: 1–40.
- Lenčáková D, Hizo-Teufel C, Petko B, Schulte-Spechtel U, Stanko M, Wilske B, Fingerle V (2006) Prevalence of *Borrelia burgdorferi* s.l. OspA types in *Ixodes ricinus* ticks from selected localities in Slovakia and Poland. *Int J Med Microbiol.* **40**: 108–18.
- Moravcová L, Pícha D, Vaňousová D, Hercogová J (2009) Pukaz boreliové DNA u pacientu s neuroboreliózou a erythema migrans. *Klin mikrobiol infek lek.* **5**: 159–164.

- 15 Pliha D, Moravcová L, Holečková D, Žďárský E, Valešová M, Marešová V *et al.* (2008) Examination of specific DNA by PCR in patients with different forms of Lyme borreliosis. *Int J Dermatol.* **47**: 1004–1010.
- 16 Rijpkema SGT, Molkenboer MJCH, Schouls LM, Jongejan F, Schellekens JFP (1995) Simultaneous detection and genotyping of three genomic groups of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Dutch *Ixodes ricinus* ticks by characterization of the amplified intergenic spacer region between 5S and 23S rRNA genes. *J Clin Microbiol.* **33**: 3091–3095.
- 17 Smetanova K, Burri C, Peréz D, Gern L, Kocianová E (2007) Detection and identification of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies in ticks from three different region in Slovakia. *Wien Med Wochenschr.* **119**: 17–18, 534–537.
- 18 Stanek G, Reiter M (2011) The expanding Lyme Borrelia complex—clinical significance of genomic species? *Clin Microbiol Infect.* **17**: 487–93.
- 19 Stanek G, Fingerle KP, Hunfeld B, Jaulhac B, Kaiser R, Krause W *et al.* (2011) Lyme borreliosis: Clinical case definition for diagnosis and management in Europe. *Clin Microbiol Infect.* **17**: 69–79.
- 20 Strle F, Ruzić-Sabljčić J, Cimperman S, Lotrič-Furlan S, Maraspi V *et al.* (2006) Comparison of Findings for Patients with *Borrelia garinii* and *Borrelia afzelii* Isolated from Cerebrospinal Fluid. *Clin Infect Dis.* **43**: 704–10.

12. Diskusia

Lymfská borelioza prebieha veľaokrát nepoznane, subklinicky alebo s miernymi klinickými príznakmi (Pícha a spol., 2008), načo poukazuje aj výskyt antiboreliových protilátok u zdravej populácie (Bazovská a spol., 2010). Laboratórna diagnostika naráža na mnohé problémy vzhľadom na jej nedostatočnú špecificitu a senzitivitu.

V skupine 77 pacientov, u ktorej bol u 32 pacientov výsledok IFT a ELSA testu negatívny na prítomnosť antiboreliových protilátok, ale klinický stav poukazoval na možnosť chronickej formy lymfskej boreliózy, sme sa rozhodli doplniť vyšetrenia imunologickými testami (tab. str. 54). Vychádzali sme z predpokladu, že imunodeficiencia by mohla ovplyvniť výsledok skriningových testov a imunologické vyšetrenie u všetkých týchto pacientov aj ukázalo určité poruchy imunity, ktoré by mohli vysvetľovať nedostatočnú tvorbu protilátok a poukázalo na vysoký výskyt autoprottilátok. Vyšetrenie protilátok westerblotom (WB), ktorý je senzitívnejší, potvrdilo prítomnosť špecifických protilátok. Rozdiel vo výsledkoch imunologických testov medzi skupinou pacientov s pozitívnymi a negatívnymi antiboreliovými protilátkami v skriningových testoch bol signifikantný (tab. str. 57). Naši pacienti mali často v anamnéze údaje o poštípaní kliešťom alebo o prekonaní ochorenia, ale vzhľadom na negatívny skriningový test na prítomnosť protilátok ich pretrvávajúce ťažkosti sa nedávali do súvislosti s možnou infekciou boréliami. Veľká variabilita klinického obrazu pri lymfskej borelióze a existencia ľahších až asymptomatických ochorení sťažuje diagnostiku tohto ochorenia. Pri stanovení protilátok treba počítať s falošnou negativitou v skriningovom teste (Kaiser, 2000) aj vzhľadom na vysokú variabilitu antigénov kolujúcich v Európe (Derdáková a spol. 2005) a variabilitu protilátkovej odpovedi organizmu, použitý test nemusí dostatočne zachytiť špecifické protilátky. Treba brať do úvahy aj skutočnosť, že používané diagnostické testy nie sú štandardizované a výsledky rôznych komerčných testov nemusia byť zhodné hlavne pri nižšej protilátkovej odpovedi organizmu.

Diagnostika chronickej formy lymfskej diagnózy je ťažkým klinickým a terapeutickým orieškom. Neexistujú spoľahlivé a všeobecne akceptované diagnostické kritéria. Často je jediným kritériom je pozitívna anamnéza a prítomnosť

špecifických protilátok. V niektorých prípadoch ďalšie klinické a laboratórne vyšetrenia môžu podporiť diagnózu chronickej boreliózy. V terapii začína sa predlžovať ATB liečba, zvyšujú sa dávky, vzhľadom na novšie poznatky o vývoji jednotlivých foriem. Dôvodom dlhšieho podávania ATB liečby je najmä predpokladaná možná cystická forma borelií, o ktorej prítomnosti sa zatiaľ uvažovalo len in vitro (Brorson a Brorson, 1998). V r. 2008 však poukázali kanadskí autori (Miklossy a spol., 2008) na prítomnosť spirochét v cystickej a granulárnej forme v mozgu u 3 pacientov s potvrdenou neuroboreliózou.

Podľa skúsenosti amerických autorov (Donta, 2003, Burrascano, 2008), má správna liečba neskorej disseminovanej formy pozostávať s prvotnej eliminácie koinfekcie a po jej eliminácii je potrebné eradikovať baktériu jednak v krvnom riečisku, intracelulárne a i v cystickej forme. Sú rôzne možné kombinácie a doporučené postupy, ale v zásade je potrebné eradikovať baktériu v krvnom riečisku antibiotikami tetracyklinovej, penicillinovej rady a cefalosporínmi. Makrolidy ako Rulit, Zytromax a Klacyd sú používané pre prenikavosť intracelulárne. Flagile, Fastigyn a Plaquenil sú používané na cystickú formu. Výhodou kombinácie týchto liekov je zabránenie vytvoreniu bakteriálnej rezistencie. Pri chronických formách je doporučená komplexná liečba až 6-11 mesiacov a pacient by mal byť bez symptómov 2 mesiace pred ukončením antibiotickej liečby (Donta, 2003). Oproti týmto predstavám o liečbe existujú najmä v Európe doporučované postupy, ktoré sú z hľadiska dĺžky ATB liečby kratšie (EUCALB, 2009, OUMZ SR, 2010), ale na druhej strane International Lyme and Associated Disease Society (ILADS) (Stricker a Johnson, 2011) podporuje dlhodobú ATB terapiu, vzhľadom na komplikácie s koinfekciami a úlohu cystických foriem pri chronickej lymskej borelióze.

V poslednom období niektorí autori (Katz 2009, Wilner 2009) okrem ATB liečby zvažujú aj prínos imunologickej liečby, ktorá sa javí prospešná najmä pri chronických formách LB, kde sú v popredí neuropatické bolesti. Tieto ojedinelé literárne údaje spolu s našimi skúsenosťami nás viedli k úvahe o potrebe skúmania imunologického statusu u pacientov s LB a na základe získaných výsledkov po konzultácii s imunológom zväžiť potrebu imunomodulačnej terapie.

U 179 pacientov včasnej a chronickej disseminovanej formy lymskej boreliózy (LB), popri štandardnej antibiotickej liečbe v spolupráci s imunológom sa ordinovala aj imunomodulačná liečba (str. 61). U pacientov s včasnou disseminovanou formou LB bola ordinovaná liečba Immodinom, resp. Polyoxidoniom alebo Imunorom v trvaní 6

mesiacov a u chronickej diseminovanej formy LB bola táto imunomodulačná liečba realizovaná v trvaní 12 mesiacov. U oboch skupín sme pozorovali ústup subjektívnych ťažkostí, zlepšenie objektívneho nálezu a niektorých imunologických parametrov, najmä u včasnej diseminovanej formy LB.

Naše doterajšie skúsenosti potvrdzujú správnosť zvolených diagnostických a terapeutických postupov.

V laboratórnej diagnostike lysmskej boreliózy nepatrí vyšetrenie polymerázovou reťazovou reakciou (PCR) medzi štandardné metódy pre jej nízku senzitivitu a problémy so štandardizáciou, ale v niektorých prípadoch sa využíva na podporu tejto diagnózy. Vyšetrovaním likvoru od neurologických pacientov s podozrením na lysmskú boreliózu sme chceli prispieť k objasneniu významu vyšetrenia PCR pri diagnóze neuroboreliózy a zároveň stanovením genomospecies poukázať na ich vzťah ku klinickým formám ochorenia a kolujúcim boréliam v prírodnom prostredí na Slovensku, predovšetkým v kliešťoch.

U pacientov s diagnostikovanou neuroboreliózou sa pri vyšetrení likvoru PCR záchytnosť pohybuje od 17 – 40 % ale u niektorých pacientov prítomnosť DNA *B. burgdorferi* je možné dokázať aj dlhšiu dobu po prekonaní ochorenia. Samotný nález borélií alebo DNA v likvore pacienta nie je vždy jasný. U väčšiny pacientov je v spojení s klinickou diagnózou neuroboreliózy, ale u niektorých pacientov je prekvapujúci (Strle a spol., 2006). Podobne aj pri vyšetrení našich pacientov pozitívny nález bol väčšinou spojený s klinickou diagnózou lysmskej boreliózy (tab. str. 79). Ale aj pri našich vyšetreniach sme u štyroch pacientov zistili prítomnosť *B. burgdorferi* s.l., kde sa nejednalo o neuroboreliózu, ale klinická diagnóza bola demyelinizačné ochorenie, resp. M.Parkinson. U jedného z ich v anamnéze boli údaje o prekonaní lysmskej boreliózy. V tomto prípade išlo o *B. garini*, bližšie neurčeného genotypu, ale ďalšie vyšetrenie nepotvrdilo (nepublikované údaje), že sa jedná o invazívny typ OsA typ 4, ktorý je dnes už odčlenený ako samostatné genomospecies *B. bavariensis* (Stanek a Reiter, 2011), (kazuistika str. 71). Možno predpokladať, že perzistencia *B. burgdorferi* u týchto pacientov by mohla byť jedným zo spúšťačov autoimunitného procesu, ktorý viedol k demyelinizačným ochoreniam.

V Európe podľa izolácii *B. burgdorferi* z likvoru najčastejším pôvodcom neuroboreliózy bola *B. garinii* (Strle a Stanek, 2009), potom *B. afzelii* a *B. burgdorferi* s.s., čo potvrdzovali aj naše zistenia.

Štúdiá v Slovinsku (Strle a spol., 2006), zamerané na vzťah klinického ochorenia a genomospecies *B. burgdorferi* poukázala na skutočnosť, že ochorenia spojené s *B. garinii* sú spojné s typickou včasnou neuroboreliózou (Garin-Bujadoux-Bannwathov syndróm) a ochorenia spojené s *B. afzelii* sú menej špecifické a ťažšie diagnostikovateľné. S podobnými skúsenosťami sme sa stretli aj u našich pacientov. Aj všetky vyšetrenia zamerané na kliešťov *Ixodes ricinus* na našom území poukazujú na dominantnú úlohu *B. garinii* (tab.str. 79), čomu zrejme zodpovedajú aj izolácie od našich pacientov, ale štúdie zamerané na ich genotypizáciu izolátov doteraz neboli robené.

Kmene *B. burgdorferi* sú antigénne veľmi variabilné, v rámci genomospecies existuje veľké množstvo genotypov. Štúdie z posledných rokov poukazujú na vyššiu genetickú diverzitu, ako sa pôvodne myslelo (Bunikis a spol., 2004). V rámci OspC je známych 16 genotypov, z ktorých 4 sú zodpovedné za 80 % invazívnych ochorení (Wormser a spol., 2008). Ale multilokulárna sekvenčná analýza izolátov z kliešťov poukázala na ešte vyššiu diverzitu (Crowder a spol., 2010) a v rámci *B. burgdorferi* s.s. bolo identifikovaných 53 genotypov. Väčšina kliešťov bola infikovaná viac ako jedným genotypom, čo poukazuje na skutočnosť, že v prírode existujú borélie ako zmes genotypov. Ďalšie štúdie by mohli objasniť, či práve kombinácia genotypov môže skorej viesť k diseminovanému ochoreniu u ľudí a ktoré genotypy sa podieľajú na týchto ochoreniach. Pri porovnávaní kmeňov izolovaných z kliešťov, z kože pacientov a pri diseminovaných infekciách (Brisson a spol., 2011) sa ukazuje, že biodiverzita borélií v kliešťoch je vyššia ako u izolátov z kože, a izoláty z diseminovaných infekcií sú signifikantne menej diverzifikované ako izoláty z kože. Tieto výsledky poukazujú nato, že infekcia u ľudí je možná len populáciou s určitými patogénnymi vlastnosťami. Rozdielne biologické vlastnosti medzi kmeňmi *B. burgdorferi* zodpovedajú za ich schopnosť vyvolať alebo nevyvolať infekciu a za ich schopnosť viesť k lokálnej alebo diseminovanej infekcii.

Je otázkou základného výskumu, aby sa objasnili niektoré vlastnosti *B. burgdorferi* a vzťah jednotlivých genotypov k ochoreniam u ľudí, čo vyžaduje bližšiu spoluprácu medzi pracovníkmi zaoberajúcimi sa enviromentálnou a mikrobiálnou ekológiou a pracovníkmi vo výskume v oblasti humánnej medicíny. Stanek a Reiter (2011) navrhujú, aby vzťah genotypov, genomospecies a ich klinickej prezentácii sa riešil v Európe v rámci multicentrického výskumu.

13. Závěry

Lymfská borelióza prebieha veľakrát nepoznane, subklinicky alebo s miernymi klinickými príznakmi a laboratórna diagnostika naráža na mnohé problémy vzhľadom na jej nedostatočnú špecificitu a senzitivitu.

1. U pacientov s dlhotrvajúcimi ťažkosťami, kde klinický stav poukazuje na možnosť chronickej formy lymfskej boreliózy, sa u 32 z 77 pacientov pri negatívnych výsledkoch IFT a ELISA na prítomnosť antiboreliových protilátok v sére, zistila prítomnosť špecifických protilátok pri vyšetrení westerblotom. To poukazuje na potrebu u takýchto pacientov doplniť vyšetrenie:
 - imunologickými testami, kde sme u všetkých 32 pacientov potvrdili imunodeficienciu a
 - protilátok westerblotom (WB), ktorý je senzitivnejší, a ktorý napriek negatívnym skriningovým testom potvrdil prítomnosť špecifických protilátok.
2. V skupine 179 pacientov s diseminovanou formou lymfskej boreliózy sa pri terapii ukázalo, že je vhodné podávať popri dlhšej antibiotickej terapii s využitím antibiotík, ktoré sú účinné aj na cystické formy borélií, aj imunomodulačnú liečbu, po ktorej sme zaznamenali zlepšenie klinického nálezu.
3. V rámci využitia PCR metód sme u skupiny 82 pacientov s podozrením na neuroboreliózu vyšetrovali likvor, u pacientov s diagnostikovanou neuroboreliózou bol v 17 prípadoch pozitívny. Ale pozitivita sa zistila aj 4 pacientov s demyelinizačným ochorením (v.s. sclerosis multiplex). Najčastejším pôvodcom neuroboreliózy bola *B. garinii*, potom *B. afzelii* a *B. burgdorferi* s.s., čo podporuje doterajšie údaje o vzťahu *B. garinii* k neurologickým ochoreniam.

Laboratórna diagnostika lymfskej boreliózy naráža stále na množstvo problémov. Zlepšenie laboratórnej diagnostiky, ktorá by umožňovala odlišenie protilátok pretrvávajúcich po prekonanej infekcii od protilátok pri aktívnej infekcii je stále otázkou výskumu. K bližšiemu objasneniu vzťahu *B. burgdorferi* a vzniku invazívnych ochorení by boli potrebné ďalšie detailnejšie štúdie, ktoré by mohli objasniť, ktoré genotypy sa podieľajú na týchto ochoreniach a či práve kombinácia

genotypov môže skorej viesť k diseminovanému ochoreniu u ľudí. Je na základnom výskume, aby sa objasnili niektoré vlastnosti *B. burgdorferi* a predovšetkým vzťah jednotlivých genotypov k ochoreniam u ľudí, čo vyžaduje bližšiu spoluprácu medzi pracovníkmi zaoberajúcimi sa enviromentálnou a mikrobiálnou ekológiou a pracovníkmi vo výskume v oblasti humánnej medicíny.

14. Zoznam použitej literatúry

1. Agüero-Rosenfeld M., Wang G., Schwartz I., Wormsev G.: Diagnosis of Lyme borreliosis. In Clin Microbiol Rev 2005, 18, 484-509.
2. Altaie S.S., Mookherjee S., Assian E., Al-Taïre F., Nakeeb S., Siddiqui S. :
Trasplacental Trasmision of Bb In a Murine Model , 10th Annual International Scientific Conference on Lyme Disease and Other Tick-Borne Disorders, National Institutes of Health, Bethesda, 1997, April 28-30., Abs. 34
3. Al-Qudah A.A; Mostratos A., Quesnel L.B.: A Proposed Life Cycle f ör the Reiter Treponeme. J Appl Bacteriol 1983, 55, s.426-427.
4. Ascherio A., Munger K.L.: Enviromental risk factors for multiple sclerosis. Part I: the role infection. Ann Neurol 2007,4, s. 288-299.
5. Atassi MZ, Casali P.: Molecular mechanisms of autoimmunity. Autoimmunity. 2008 Mar;41(2):123-32.
6. Auwaerter PG, Aucott J, Dumler JS (January 2004). "Lyme borreliosis (Lyme disease): molecular and cellular pathobiology and prospects for prevention, diagnosis and treatment". Expert Rev Mol Med 6 (2): 1-22. doi:10.1017/S1462399404007276. PMID 14987414
7. Bartúněk P.: Lymeská borelióza. Praha, Grada Publishing, Praha, 1996 s. 11-60.
8. Bazovská, S.: Lymeská borelióza a tehotnosť. Praktická gynekol 1997, 2, 3, 97-98.
9. Bazovská S: Lymeská borelióza - mikrobiologická diagnostika ochorenia. Praktická medicína. - ISSN 1803-3849. - Roč. 2, č. 5, 2008, s. 5-6.
10. Bazovská S., Ďurovská. J., Derdákóvá M., Tarageľová V., Pancák J., Záborská M., Traubner P.: The genospecies *B. burgdorferi* s.l., isolated from ticks and from neurological patients with suspected Lyme borreliosis. Neuroendocrinology Letters, 2011 32, 4, 491-495.
11. Bazovská, S., Ďurovská, J., Pancák, J., Záborská, M.: Laboratórna diagnostika lymskej boreliózy u neurologických pacientov. XII. Prowádzkove dni, Komárno 22.-23.10. 2009. Správy klin. Mikrobiol. SB 2009, roč .IX., 32.
12. Bazovská S., Ďurovská J., Pancák J., Záborská M., Derdákóvá M.: Lymeská borelióza a demyelinizačné ochorenie. Epidemiol.Mikrobiol.Imunol.60,2011, 1, s.45-47.
13. Bazovská S., Guryčová D., Výrosteková V.: Protilátky proti pôvodcom niektorých prírodne ohniskových nákaz v sérach darcov krvi zo západného Slovenska. Epidem Microbiol Immunol 2010, 59, 4, s. 168-171.
14. Bazovská S., Macháčová E., Špaleková M., Kontrošová S.: Reported incidence of lyme borreliosis in Slovakia and antibodies to *B. burgdorferi* antigens in healthy population. Bratisl Lek Listy 2005, 106, 8-9, 270-173.

15. Berger, B.W.: Dermatologic manifestation of Lyme disease. *Rev Infect Dis* 1989, 11 (6), s. 1475-1481.
16. Berger B.W.: Cutaneous Manifestations of Lyme Borreliosis. *Rheumat Dis Clin N Am* 1989, 15, (4), s. 627-634.
17. Blanc F., Jaulhac B., Fleury M., de Seze J., de Martino S.J., Remy V. et al.: Prevalence of the antibody index to diagnose Lyme neuroborreliosis among seropositive patients. *Neurology*. 2007, 69, s. 953-958.
18. Bojar M.: Multifokální postižení nervového systému podmíněné herpetickými viry nebo *Borrelia burgdorferi*. Kandidátska disertační práce. Praha, 1987,
19. Bojar, M. :Lymeská borrelióza. Praha, Maxdorf/Jessenius, 1996.
20. Braune H.J.: Lyme-Borreliose - Epidemiologie, Aetiologie, diagnostik und Therapie. *Fortschr Neurol Psychiat* 1991, 59, s. 456-467.
21. Brisson D., Baxamusa N., Schwartz I., Wormser G.P.: Biodiversity of *Borrelia burgdorferi* Strains in Tissues of Lyme Disease Patients. *PLoS One*. 2011,6(8),e22926.
22. Brorson O.: Transformation of cystic forms of *Borrelia burgdorferi* to normal, mobile spirochetes. *Infection* 1997, 25,(4), s. 240-246.
23. Brorson O.: Susceptibility of motile and cystic forms of Bb to rantidine bismuth citrate. *Int Microbiol* 2001, 4,(4), s.209-215.
24. Brorson O.: An in vitro study of the susceptibility of mobile and cystic forms of Bb to hydroxychloroquine. *Int Microbiol* 2002, 5, (1), s.25-31.
25. Brorson O., Brorson S.: In vitro conversion of *Borrelia burgdorferi* to cystic forms in spinal fluid, and transformation to mobile spirochetes by incubation in BSK-H medium. *Infection* 1998,(26),(3), s. 144-150 (R).
26. Brorson O., Brorson S.: An in vitro study of the susceptibility of mobile and cystic forms of *Borrelia burgdorferi* to Metronidazole. *APMIS* 1999,107,(6), s.566-576.
27. Brorson O., Brorson S.: An in vitro study of the susceptibility of mobile and cystic forms of *Borrelia burgdorferi* to tinidazole. *Int Microbiol* 2004, (7), s 139-142.
28. Brzonova L, Wollenberg A., Prinz J.C.: Acrodermatitis chronica atrophicans affecting all four limbs in an 11-year-old girl. *Brit J of Dermat* 2002, 147, s. 375.
29. Bunikins J., Garpmo U., Tsao J., Berglund J., Fish D., Barbour A.G.: Sequence typing reveals extensive strain diversity of the Lyme borreliosis agents *Borrelia burgdorferi* in North America and *Borrelia afzelii* in Europe. *Mikrobiol* 2004, 150, 6, s. 1741-1755.
30. Burgdorfer W., Barbour A.G., Hayes S.F., et al.: Lyme Disease - a tick borne

- spirochetosis , Science. 1982, 216 , s. 1317 - 1319.
31. Burgdorfer W., Keirans J.E.: Ticks and Lyme disease in the United States. *Ann Intern Med.* 1983, 99, s. 121
 32. Burrascano JJ. Lyme disease. In *Coments Current Therapy*. Philadelphia: WB Saunders Company, 1997, pp 140-3 (latest edition of this paper is Diagnostic hints and treatment guidelines for Lyme and other tick borne illnesses, 14. Edition November, 2002)
 33. Burrascano J.J.: Diagnostic Hints and Treatment *Guidelines* for Lyme and Other Tick Borne Illnesses. 16th Edition, September, 2008.
 34. Cabello FC, Godfrey HP, Newman SA (August 2007). "Hidden in plain sight: *Borrelia burgdorferi* and the extracellular matrix". *Trends Microbiol* 2007, 15, (8): 350–4. doi:10.1016/j.tim.2007.06.003. PMID 17600717.
 35. Cerar T., Ružič-Sabljič E., Glizek U., Zore A., Strle F.: Comparison of PCR methods and culture for the detection of *Borrelia* sp. in patients with erythema migrans. *Clin Microbiol Infec* 2008 ,14, s. 653-658.
 36. Cerar T., Ogrine K., Cimperman J., Lotrič-Furlan S., Strle F., Ružič-Sabljič E.: (2008). Validation of Cultivation and PCR Methods for Diagnosis of Lyme neuroborreliosis. *J Clin Microbiol* 2008, 46, s. 3375-3379.
 37. Collares-Pereira M., Couceiro S., Franca I. Et al.: First isolation of *Borrelia lusitaniae* from a human patient. *J Clin Microbiol* 2004, 42, s.1316-1318.
 38. Crowder D.C., Matthews H.E., Chutzer S., Rounds M.A., Luft B.J., Nolte O. et al.: Genotypic Variation and Mixtures of Lyme *Borrelia* in *Ixodes Ticks* from North America and Europe. *PloS One*. 2010, 14, 5,(5), e.10650.
 39. Datwyller R.J., Volkman D.J., Luft B.J.: Immunologic Aspects of Lyme Borreliosis. *Rev Inf Dis* 1989, 2, (6), s. 1494-1498.
 40. Datwyller D.J., Halperin J.J., Volkman D.J., Luft B.J.: Treatment of late Lyme Borreliosis - randomised comparison of ceftriaxone and penicillin. *Lancet* 1988, 1, s.1191-1194.
 41. Dejmková H., Hulínska D., Tegzová D., Pavelka K., Gatterová J., Vavřík P.: Seronegative Lyme arthritis caused *Borrelia garinii*. *Clin Rheumatol* 2002, 21, 4, s. 330-334.
 42. Derdákova M., Beati L., Peřko B., Stanko M., Fisch D.: Genetic variability within *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies established by PCR-SSCP analysis of the rrfA-rrlB intergenic spacer in *Ixodes ricinus* ticks from the Czech Republic. *Appl Environm Microbiol* 2003, 69, s. 509-516.

43. Derdákóvá M, Lenčákóvá D.: Association of genetic variability within *Borrelia burgdorferi* sensu lato with the ecology, epidemiology of Lyme borreliosis in Europe. *Ann Agric Environ Med* 2005, 12, (2), s 165-172.
44. Diza E., Papa A., Vezyri E. Et al: *Borrelia valaisiana* in cerebrospinal fluid. *Emerg Meet Dis* 2004,10, s. 1692-1693.
45. Donta S.T.: Tetracycline therapy for chronic Lyme disease. *Clin Infect Dis* 1997, 25, (1), s.2-6.
46. Donta S.T.: Macrolide therapy of chronic Lyme Disease. *Med Sci Monit* 2003, 9,(11), s. 36-42.
47. Dotevall L., Alestig K., Hanner P., Norkrans G., Hagberg L.: The use of doxycycline in nervous system *Borrelia burgdorferi* infection. *Scand J Inf Dis* 1988, 53, s.74-79.
48. Dressler F., Ackermann R., Steere A.C.: Antibody responses to the three genomic groups of *Borrelia burgdorferi* in European Lyme borreliosis. *J Infect Dis* 1994,169, s. 313-318.
49. Ďurovská J., Bazovská S., Ondrišová M., Pancák J.: Príspevok k diagnostike lymfkej boreliózy – chronická forma, význam imunologického vyšetrenia. *Klin Imunol a Alerg* 2010, (1), 10-13.
50. Ďurovská, J., Bazovská, S., Ondrišová, M. Pancák, J.: Our experience with examination of antibodies against to *Borrelia burgdorferi* in patients with suspected Lyme disease. *Bratisl lek Listy*, 2010, 111, 3, s.153-155.
51. Ďurovská J., Bazovská S., Ondrišová M., Pancák J.: Novšie poznatky o liečbe diseminovanej lymfkej boreliózy. . *Klinická Imunológia a Alergológia*. 2011, 6, s.4- 7.
52. Ďurovská J., Bazovská S., Pancák J., Záborská M., Derdákóvá M., Traubner P.: Infection of *Borrelia burgdorferi* s.l. and demyelinating disease CNS. *Neuroendocrinol Lett* 2011, 32, 4, s. 411-414.
53. Ďurovská J., Traubner P., Kondáš M., Bazovská S., Pancák J.: Niektoré novšie poznatky k liečbe lymfkej boreliózy. *Správy klinickej mikrobiológie*, 2005, V, SC/2005, s.21-22.
54. Engstrom S.M, Shoop E., Johnson R.C.: Immunoblot interpretation criteria for serodiagnosis of early Lyme disease. *J Clin Microbiol* 1995, 33, s. 419-427.
55. EUCALB 1997-2011 (European Union Concerted Action on Lyme Borreliosis) www.eucalb.com
56. Fingerle V., Rauser S., Hammer B., Kahl O., Schulte-Spechtel U., Gern L., Wilske B.: Dynamics of dissemination and outer surface protein expression of different European *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains in artificially infected *Ixodes ricinus* nymphs. *J Clin Microbiol* 2002, 40, s. 1456-63.
57. Fingerle V., Goettner G., Gern L., Wilske B., Schulte-Spechtel U.: Complementation of

Borrelia afzelii OspC mutant highlights the crucial role of OspC for dissemination of *Borrelia afzelii* in *Ixodes ricinus*. Int J Med Microbiol 2007, 297, s. 97-107.

58. Gerber M.A., Zalneraitis E.L.: Childhood neurologic disorders and Lyme disease during pregnancy. *Pediatr Neurol* 1994, 11,(1), s. 41-43.
59. Gruntar L, Malovrh T., Murgia R., Cinco M.: Conversion of *B. garinii* cystic forms to motile spirochetes in vivo. *APMIS* 2001, 109,(5), s. 383-388.
60. Gurčík L.: Súčasný trendy v diagnostike a liečbe neuroboreliózy. *Neurologia pre prax*. 2009, 10,(3) s. 170-176.
61. Halperin J.J., Golightly M.: Lyme borreliosis in Bell's palsy. *Neurology* 1992, 42, s.1268-1270.
62. Halperin JJ, Shapiro ED, Logigian E, Belman AL, Dotevall L, Wormser GP, Krupp L, Gronseth G, Bever CT Jr. Practice parameter: treatment of nervous system Lyme disease (an evidence-based review). Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* 2007 Jul 3;69:1-12.
63. Halperin J.J., Volkman D.J., Wu P.: Central Nervous System Abnormalities in Lyme borreliosis. *Neurology* 1991, 41, s. 1571.
64. Hartmann M., Pfadenhauer K.: Intrathecal antibody production against *Borrelia burgdorferi* in a patient with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Europ J Neurol* 2003, 10, 6, s. 747-748.
65. Hauser U., Lehnert G., Lobentanzer R., Wilske B.: Interpretation criteria for a standardized Western blots for three European species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *J Clin Microbiol* 1997, 35, (6), s.1433-1444.
66. Harrer T., Geissdörfer W., Schoerner C., Lang E, Heim G.: Seronegative Lyme neuroborreliosis in patient on treatment for chronic lymphatic leukemia. *Infection* 2007, 35 (2), s.110-113.
67. Hercogova J., Tomankova M., Frosslova D., Janovská D.: Early-stage Lyme borreliosis during pregnancy: treatment in 15 women with erythema migrans CS. *Gynekol* 1993, 58, (5), s. 229-232.
68. Holt-Wieden A., Suerbaum S., Girschick H.J.: Seronegative Lyme arthritis. *Reumatol Int* 2007, 27, s 1091-1093.
69. Honegr K., Dostál V.: Klinické projevy a léčba lymfské boreliózy. *Klin Mikrobiol a Inf Léč* 2004, 10,(1), s 5-10.
70. Honegr K., Hulínska D, Dostál V, Gebouský P, Hanková E, Horáček J, Vysložil L, Havlasová J.: Perzistencia *Borrelia burgdorferi* sensu lato u pacientov s lymeskou boreliózou. *Epidem Mikrobiol Imunol* 2001, 50, (1), 10–16.
71. Hulínska D., Drevová H., Votýpka J., Langrová K., Kurzová Z.: Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato species among patients in the Czech Republic; direct sequencing analysis and real-time polymerase chain reaction. *Epidemiol Mikrobiol*

- Imunol 2004, 53, (4), s. 183.
72. Chmielewski T., Fielt J., Gniakovski M., Tylewska-Wierrbamovska S.: Improvement in the laboratory recognition of Lyme borreliosis with the combination of culture and PCR methods. *Mol Diagn* 2003, 7, (3-4), s. 155-162.
73. Jágerová S., Klement C., Mateička F., Maďarová L.: Séroepidemiologické aspekty lymskej boreliózy. *Antibiotiká a rezistencia* 2.7.2008, s. 48-55.
74. Jones K.L., Glickstein L.J., Damle N., Sikand V.K., McHugh .G, Steere A.C. : *Borrelia burgdorferi* Genetic Markers and Disseminated Disease in Patients with Early Lyme Disease. *J Clin Microbiol* 2006, 44, s 4407-4413.
75. Kaiser R.: False negative serology in patients with neuroborreliosis and the value of employing of different borrelial strains in serological assays. *J Med Microbiol* 2000, 49, (10), s. 911-915.
76. Katz A.: Immunoglobulin Therapy Effective for Neuropathy in Patients With Post-Treatment Lyme Syndrome. Researchers stated here on April 28 at the American Academy of Neurology (AAN) 61st Annual Meeting. Seattle, Wash, May 2, 2009.
77. Katz A: Diminished Epidermal Nerve Fiber Density in Patients With Antibodies to Outer Surface Protein A (OspA) of *B.burgdorferi* improves with intravenous immunoglobulin Therapy. Presentation Title. American Academy of Neurology. 61st. AAN annual meeting April 28, 2009. Seattle, Wash.
78. Kastruj O., Šankr L, Maschke Matthias: Neuroimaging in the Therapy of Neurological Disorders: Neuroimaging of Infections *NEURORX* 2005, 2, (2), s. 324-332.
79. Keller T.L., Halperin J.J., Whitman M.: PCR detection of *Borrelia burgdorferi* DNA in cerebrospinal fluid of Lyme neuroborreliosis patients. *Neurology* 1992, 42, s.32.
80. Kersten A., Poitschek C., Rauch S.: Effects of Penicillin, Ceftriaxon and Doxycycline on Morphology of Bb. *Antimicrobial Agents and Chemotherapie* 1995, 39, (5), s.1 127-1133.
81. Kimball S.A., Janson P.A., LaRaia P.J.: Complete heart block as the sole presentation of Lyme disease. *Arch Int med* 1989, 149, s. 1897-1898.
82. Klein N.C., Cunha B.A. :New uses of older antibiotics. *Med Clin North Am* 2001, 85,(1), s. 125-132.
83. Lebech A.M.: Polymerase chain reaction in diagnosis of *Borrelia burgdorferi* infections and studies on taxonomic classification. *APMIS suppl.* 2002, 105, s. 1 - 40.
84. Lenčáková D., Hizo-Teufel C., Peťko B., Schulte-Spechtel U., Stanko M., Wilske B., Fingerle V.: Prevalence of *Borrelia burgdorferi* s.l. OspA types in *Ixodes ricinus* ticks

- from selected localities in Slovakia and Poland. *Int J Med Microbiol* 2006, 40, s. 108-118.
85. Ljosdat U., Skogvoll E., Eikeland R., Midgard R., Skarpaas T., Berg A., Mygland A. Oral doxycycline versus intravenous ceftriaxone for European Lyme neuroborreliosis: a multicentre, non-inferiority, double-blind, randomised trial. *Lancet Neurol* 2008, 7, s. 690-695.
86. Masuzawa T.: Terrestrial Distribution of the Lyme Borreliosis Agent *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato in East Asia. *Jpn J Infect Dis* 2004, 57,(6), s. 229.
87. Mateička F.: Klinické aspekty lymskej boreliózy na Slovensku s dôrazom na muskuloskeletálnu symptomatológiu, diagnostiku a terapiu. *Antibiotiká a rezistencia* 1.3.2004, s. 21-24.
88. Meier C., Grehl H.: Vaskulitische Neuropathie bei Garin-Bujadoux-Bannwarth-Syndrom *Dtsch med Wschr* 1988, 11, s. 135-138.
89. Miklossy J., Kasas S., Zurn A.D. et al.: Persisting atypical and cystic forms of *Borrelia burgdorferi* and local inflammation in Lyme neuroborreliosis. *J Neuroinflam* 2008, 5, 40, 1-18.
90. Moravcová L., Pícha D., Vaňousová D., Hercogová J.: Průkaz boréliové DNA u pacientů s neuroborreliozou a erythema migrans. *Klin Mikrobiol infek Léč* 2009, 5, s. 159-164.
91. Mursic V.P., Wanner G., Remhardt S., Wilske B., Busch U., Marget W., Formation and cultivation of *Borrelia burgdorferi* spheroplast-L-form variants. *The Lyme Disease Network Medical Infection* 1996, 24,(3), s. 218-226.
92. Nadelman R.B., Nowakowski J., Durland Fish M.D., Falco R.C., Freeman K., McKenna D., Welch P., Marcus R., Agiero-Rosenfeld M. E., Dennis D.T., Wormser G.P.: Prophylaxis with Single-Dose Doxycycline for the Prevention of Lyme Disease after an *Ixodes scapularis* Tick Bite. *N Engl J Med* 2001, 345, s. 79-84.
93. Nadelmann R.B., Horowitz H.V., Hsieh T.C. a spol.: Simultaneous human Ehrlichiosis and Lyme borreliosis. *N Engl J Med* 1997, 337, s. 27-30.
94. Narayan K., Dail D., Li L., Cadavid D., Amrute S., Fitzgerald-Bocarsly P., Pachner A.R.: The nervous system as ectopic germinal center: CXCL13 and IgG in Lyme neuroborreliosis *Ann Neurol* 2005, 57, (6), s. 813 - 823.
95. Odborné usmernenie Ministerstva zdravotníctva SR (OUMZ SR) na diagnostiku a liečbu lymskej choroby v Slovenskej republike číslo: 06486-XX/2010-OZS ver. 2.008.
96. Oschmann, P., Wellensiek, H. J., Dorndorf, W., Pflughaupt, K.W.: Intrathecal synthesis of specific antibodies in neuroborreliosis: Comparison of immunoblotting, indirect immunofluorescence assay and enzyme-linked immunosorbent assay. *J Lab Med* 21: 528-534 (1997).

97. Ostrov B.E., Athreya O.B.: Difficulties in Diagnosis and Management. *Ped Clin N Am* 1991,38, 3: s. 535-550.
98. Ovadia H., Saphier D., Weidenfeld J., Abramsky O.: Neuroimmunomodulation: the Interaction between the Nervous System and the Immune System. *Israel J Med Sci* 1989, 25, s. 7.
99. Ovcinnikov N.M., Delectorsku V.V. : Current Concepts of the Morphology and Biology of *Treponema Pallidum* Based on Electron Microscopy. *Brit J Venereal Dis* 1971, 47, s.316.
100. Pachner H.W.. : Neurologie manifestation of Lyme disease, the "new imitátor". *Rev Infect Dis* 1991, 11, s. 1482.
101. Piesman J., Mather T.N., Sinsky R.J.: Duration of tick attachment and *Borrelia burgdorferi* transmission. *J Clin Microbiol* 1987, 25, 3, s. 557-558.
102. Pícha D., Moravcová L., Lásiková Š., Patakiová E., Roháčová H., Marešová V.: Příspěvek k problematice postboréliového syndromu. *Čes a Slov Neurol Neurochir* 67/100, 2004, 6, s. 450-455.
103. Pícha D., Moravcová L., Holečková D., Žďárský E., Valešová M., Marešová V. et al: Examination of specific DNA by PCR in patients with defferent forms of Lyme borreliosis. *Int J Dermatol* 2008, 47, s. 1004-1010.
104. Pohl D.: Epstein-Barr virus and multiple sclerosis. *J Neurol Sci* (2009), 286, s 62-64.
105. Pohl P., Schmutzhardt E., Stanek G.: Cerebrospinal fluid findings in neurological manifestation of Lyme disease. *Zbl Bakteriolog Mikrobiol Hyg A* 1986, 263, s. 314.
106. Praec-Mursic V.B., Wilske B., Schierz G.: European *Borrelia burgdorferi* isolated from humans and ticks, Culture conditions and antibiotic susceptibility. *Zbl Bakt Hyg A* 1986, 263, s, 112-118.
107. Reik L. Jr.: Lyme Disease and the Nervous System. Thieme Medical Publishers, NewYork 1991, s. 128.
108. Reik L.Jr, Smith A., Khan A., Nelson W.: Demyelinating encephalopathy in Lyme disease. *Neurology* 1985, 35, s. 267.
109. Rijpkema SGT, Molkenboer MJCH, Schouls LM, Jongejan F, Schellekens, JFP.: Simultaneous detection and genotyping of three genomic groups of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Dutch *Ixodes ricinus* ticks by characterization of the amplified intergenic spacer region between 5S and 23S rRNA genes. *J Clin Microbiol.* 1995, 33, s. 3091–3095.
110. Robertson J., Guy E., Andrews N., Wilske B., Anda P., Granstrom M., Hauser U., Moosmann Y, Sambri V., Schellekens J., Stanek G., Gray J.: A European Multicenter Study of Immunoblotting in Serodiagnosis of Lyme Borreliosis *J Clin Microbiol* 2000, 38, (6), s. 2097-2102.

111. Rupprecht T.A., Koedel U., Fingerle V., Pfister H.W.: The pathogenesis of Lyme neuroborreliosis – from infection to inflammation. *Mol Med* 2008, 14, (3-4), s.205-212.
112. Sarma Das Jayasri.: A Mechanism of Virus-Induced Demyelination. *Interdiscip. Perspect Infect Dis* 2010, 21, 6, s. 1-35.
113. Shoemaker R.C.: Lyme and Infectious Disease and a Neurotoxin Illness. *Lyme Times*, 2002, 33, s. 13-16.
114. Shoemaker R.C., Hudnell K.H., House D.E., Van Kempen A., Pak G.E. : Atovaquone plus cholestyramine in patients co- infected with *Babesia microti* and *Borrelia burgdorferi* refractory to other treatment. Manuscript, *Clin Inf Dis* 2005 , 2.
115. Shoemaker R.C., Hudnell K.H., House D.E., Van Kempen A., Pak G.E. : Atovaquone plus cholestyramine in patients co- infected with *Babesia microti* and *Borrelia burgdorferi* refractory to other treatment. *Adv Ther* 2006 Jan-Feb; 23, (1), 1-11.
116. Schardt F.W. : Clinical effects of Fluconazole in patients with neuroborreliosis . *Eur J Med Res* 2004 , 9, (7), s. 334- 336.
117. Schlesinger P, Duray P, Burke B, Steere A, Stillman A. Maternal-fetal transmission of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Ann Int Med* 1985:(Vol 103) 67-68.
118. Schmutzhard E.: Multiple sclerosis and Lyme borreliosis. *Wien Klin Wochenschr* 2002, 114, 13-14, s. 539-543.
119. Schmid G.P.: The global distribution of Lyme disease. *Rev Infect Dis* 1985, 7, s. 41-50.
120. Sigal, L.H.: Current Recommendations for Treatment of Lyme Disease. *Drugs* 1992,43, 5, s. 683-699.
121. Simonson, L.G., Goodman, C.H., Bial, J.: Quantitative relationship of *Treponema denticola* to severity of periodontal disease. *Infect Immun* 1988, 56, s. 726-728.
122. Singh S.K., Morbach H., Nanki T., Girschick H.J. : Differential expression of chemokines in synovial cells exposed to different *Borrelia burgdorferi* isolates. *Clin Exp Rheumatol* 2005, 23,(3), s. 311.
123. Smetanová K., Burri C., Pérez D., Gern L., Kocianová E.: Detection and identification of *Borrelia burgdorferi sensu lato* genospecies in ticks from three different regions in Slovakia. *Wien Klin Wochenschr* 2007, 119, (17-18), s. 534-537.
124. Siński E., Pawelczyk A., Bajer A., Behnke J.M.: Abundance wild rodents, ticks and environmental risk of Lyme borreliosis: a longitudinal study in an area of Mazury lakes district of Poland. *Ann agric environ med* 2006, 13, s.295-300.
125. Staines D. R.: Are multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis autoimmune disorders of endogenous vasoactive neuropeptides? *Med. Hypothesis* 2008, 70, s. 413-418.

126. Stanek G, Fingerle KP, Hunfeld B, Jaulhac B, Kaiser R, Krause W et al. : Lyme borreliosis: Clinical case definition for diagnosis and management in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2011, 17, s 69-79.
127. Stanek G., Reiter M.: The expanding Lyme *Borrelia* complex – clinical significance of genomic. *Clin Microbiol Infect* 2011, 17, s. 487–493
128. Stedingk L.V., Stedingk M., Hardenark H.G., Brauner A.: Intrathecally produced antibodies to *Borrelia burgdorferi* measured by IgG - capture ELISA. *Serodiagnosis and Immunotherapy in Infectious Disease* 1990, 4, s. 387.
129. Steere A.C., Berardi V.P., Weeks K.E., Logigian E.L., Ackermann R.: Evaluation of the intrathecal antibody response to *Borrelia burgdorferi* as a diagnostic test for Lyme neuroborreliosis. *J Infect Dis* 1990, 161, s. 1203.
130. Steere A.C., Gibofsky A., Hardm J.A., Winchester R.J., Malavista S.E.: Lyme arthritis: immunologic and immunogenetic markers. *Arthritis Rheum* 1979, 22, s. 662-663.
131. Steere A.C., Grodzicki R.L., Kornblatt A.N., Craft J.E., Barbour A.G.: The spirochetal etiology of Lyme Disease, *New Engl J Med* 1983, 308, s. 733-740.
132. Steere A.C., Schon R.T., Taylor E.: The clinical evolution of Lyme arthritis. *Ann Intern Med* 1987, 107, s. 725-731.
133. Stricker R.B., Johnson L.: Lyme disease: the next decade. *Infect Drug Resist* 2011, 4, s.1-9.
134. Strle F., Stanek G.: Clinical manifestations and diagnosis of Lyme borreliosis. *Curr Probl Dermatol* 2009, 37, s.51-110.
135. Strle F., Ruzič-Sabljič J., Cimperman S.: Comparison of Findings for Patients with *Borrelia garinii* and *Borrelia afzelii* Isolated from Cerebrospinal Fluid. *Clin Infect Dis* 2006, 43, s. 704-710.
136. Taylor R.S, Simpson I.N.: Review of treatment options for Lyme borreliosis. *J Chemother* 2005,17,(2), s.3-16.
137. Wilner A.: Intravenous immunoglobulin (IVIG) therapy may improve neuropathic symptoms in patients with post-treatment Lyme syndrome, researchers stated here on April 28 at the American Academy of Neurology (AAN) 61st Annual Meeting. Seattle, Wash -- May 2, 2009.
138. Wilner A.: Immunoglobulin Therapy Effective for Neuropathy in Patients With Post-Treatment Lyme Syndrome. Presentation Title. American Academy of Neurology. 61st. AAN annual meeting April 28, 2009. Seattle, Wash.
139. Wilske B.: Epidemiology and diagnosis of Lyme borreliosis. *Ann agric environ med* 2005, 37, 8, s. 21-24.
140. Wilske B, Fingerle V, Schulte-Spechtel U.: Microbiological and serological diagnosis

- of Lyme borreliosis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2007 Feb;49(1), s 13-21.
141. Wilske B., Schierz G., Preac-Mursic V., Busch von K., Kuhbeck R., Einhäupl K.: Serological diagnosis of erythema migrans disease and related disorders. *Infection* 1984, 12, s. 331-337.
142. Woodrum J.E., Oliver J.H. Jr.: Investigation of venereal, transplacental, and contact transmission of the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*, in Syrian hamsters. *J Parasitol* 1999, 85,(3), s.426-430.
143. Wormser G.P., Ramathan R., Nowakowski J., McKenna D., Holmgren D., Visintainer P., Dornbush R., Singh B., Nadelman R.B.: Duration of antibiotic therapy for early Lyme disease. A randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Int Med* 2003, 138, (9), s.697 - 704.
144. Wutte N., Berhold A., Laffler S., Zenz W., Daghofer E., Krainberger I., Kleinert G., Aberer E.: CXCL13 chemokine in pediatric and adult neuroborreliosis. *Acta Neurol Scand* DOI: 10.1111/J ISSN.1600-0404.2010.01477.X. ©
145. Záborská, M., Bazovská, S., Ďurovská, J., Pancák, J. Shunnar, A.: PCR v diagnostike Lymsej boreliózy u neurologických pacientov. II. medzinárodný kongres Zoonózy a spoločná ochrana zdravia ľudí a zdravia zvierat. Bratislava 27.-29. X. 2009, abstrakt.
146. Záborská M., Bazovská S., Ďurovská J., Pancák J.: PCR v diagnostike lymsej boreliózy u neurologických pacientov, predbežné výsledky. Spoločná ochrana zdravia ľudí a zdravia zvierat. Recenzovaný zborník vedeckých prác. ISBN 978-80-970523-0-0, 2010, s.180-185.
147. Záborská M., Bazovská S., Ďurovská J., Pancák J.: PCR v diagnostike lymsej boreliózy u neurologických pacientov. II. Labudove dni. Zborník abstraktov. ISBN 978-80-970692-5-4, 2011, s.44-45.
148. Žurek M.: Lymeská borelioza a muskuloskeletální systém. *Interní med* 2007, 9, (9), s. 398-400.