

Lymeská borelióza

Bolehovská R.¹, Plíšek S.², Plíšková L.¹, Čermáková Z.³, Palička V.¹

¹Ústav klinické biochemie a diagnostiky LF a FN Hradec Králové

²Klinika infekčních nemocí LF a FN Hradec Králové

³Ústav klinické mikrobiologie LF a FN Hradec Králové

SOUHRN

Lymeská borelióza je multiorgánové infekční onemocnění vyvolané spirochetami *Borrelia burgdorferi* sensu lato, v Evropě zejména *Borrelia garinii*, *Borrelia afzelii* a *Borrelia burgdorferi* sensu stricto. Vektorem jejich přenosu jsou nejčastěji infikovaná klíšťata rodu *Ixodes* (v našich podmínkách *Ixodes ricinus*). Od roku 1986 do současnosti bylo zaznamenáno 78 952 případů lymeské boreliózy, která je tak šestkrát častější než další onemocnění – klíšťová encefalitida, jehož virus je také přenášen klíšťaty.

Onemocnění může probíhat buď bezpříznakově, nebo symptomaticky s velmi rozmanitou klinickou manifestací, např. postižení kůže, kloubů, nervového systému, srdce, s možností přechodu do chronicity, kdy se uplatňují imunopatologické procesy s klinickými relapsy onemocnění. Diagnostika lymeské boreliózy je založena na posouzení klinických projevů, epidemiologické anamnéze a laboratorním vyšetření různých biologických materiálů (např. vyšetření protilátek pomocí ELISA a western blot, elektronová mikroskopie, PCR, eventuálně kultivace). Cílem kauzální antibiotické léčby je odstranění spirochet.

Klíčová slova: lymeská borelióza, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, genom borélií, patogeneze, klinická manifestace, diagnostika, léčba.

SUMMARY

Bolehovská R., Plíšek S., Plíšková L., Čermáková Z., Palička V.: Lyme Borreliosis

Lyme borreliosis is a multi-organ infectious disease caused by spirochetes of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato group, in Europe is primarily caused by *Borrelia garinii*, *Borrelia afzelii* and *Borrelia burgdorferi* sensu stricto. Most of the time, these bacteria are transmitted infected ticks of the genus *Ixodes* (in the Czech Republic by *Ixodes ricinus*). From 1986 till now, it has been described 78,952 cases of Lyme diseases, which is six times more frequent than further disorder transmitted by ticks – encephalitis caused by virus.

This infection can be in progress either asymptomatic or symptomatic with very various clinical manifestations as infliction of the skin, joints, nervous system, heart with possibility to chronic disease with immunopathologic processes and clinical relapses of the disease. The diagnosis of Lyme borreliosis is based on clinical manifestation, epidemiological anamnesis and laboratory testing of different biological materials (for example antibody detection by ELISA and western blot, electron microscopy, PCR, alternatively cultivation). The aim of causal treatment is elimination of spirochetes by antibiotics.

Key words: Lyme borreliosis, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, genome of *Borrelia*, pathogenesis, clinical manifestations, diagnostics, treatment.

Úvod

Lymeská borelióza je multisystémové infekční onemocnění, které představuje závažný zdravotní i socioekonomický problém. Je charakterizováno značnou variabilitou klinických projevů s možností vývoje do chronicity, provázené klinickými relapsy prokazatelnými laboratorně. Jde o nejrozšířenější onemocnění vyskytující se ve 43 zemích světa a na všech kontinentech kromě Antarktidy a Jižní Ameriky. Vektorem přenosu je klíště, ve střední a severní Evropě obvykle klíště rodu *Ixodes ricinus* a v Severní Americe *Ixodes scapularis* (dříve dammini) a *Ixodes pacificus* [1, 6, 11, 13, 14, 16, 21].

Vzhled, genom a antigenní struktura borélií

Původcem onemocnění jsou bakterie rodu *Borrelia* (B.) patřící do čeledi Spirochaetaceae, řádu Spirochaetales, třídy Spirochaetes. Jedná se o mikroaerofilní, gramnegativní spirochetu ve tvaru tenké (0,2 µm), dlouhé

(4–30 µm) spirály se 4–15 závitů pravidelně vzdálenými 2,2 µm a se 7–11 bičíky [1, 3, 6, 8, 22, 24]. Ty jsou ukotveny v periplazmatickém prostoru pomocí bazálních disků a obtáčejí buňku pod vnější stěnou. Borélie se pohybují rychlým rotačním pohybem kolem své podélné osy nebo smršťováním a natahováním. Mají velkou schopnost přežít v organismu a jejich rozmnožovací cyklus trvá 17 hodin [1, 4, 6, 8, 24, 25] – obrázek 1.

V dnešní době je známo 31 druhů borélií, ale v lidské patologii jsou nejdůležitější *B. burgdorferi* sensu lato – *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii*, *B. afzelii*, eventuálně *B. valaisiana*, *B. bissetti*. První z nich se vyskytuje pouze v Severní Americe, naopak v Evropě se nachází všechny druhy. *B. burgdorferi* je zde ale vzácná a navíc antigenně odlišná. V České republice jsou původcem onemocnění zejména *B. garinii* a *B. afzelii*. Jednotlivé druhy se mezi sebou liší antigenními vlastnostmi, počtem plazmidů a různou afinitou k určitým orgánům – *B. garinii* má většinou vztah k postižení centrálního nervového systému (CNS), *B. afzelii* k postižení kůže a *B. burgdorferi* sensu stricto ke kloubním postižením [1, 3, 4, 8, 9, 15, 16] – obrázek 2.

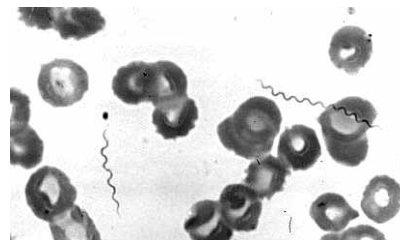
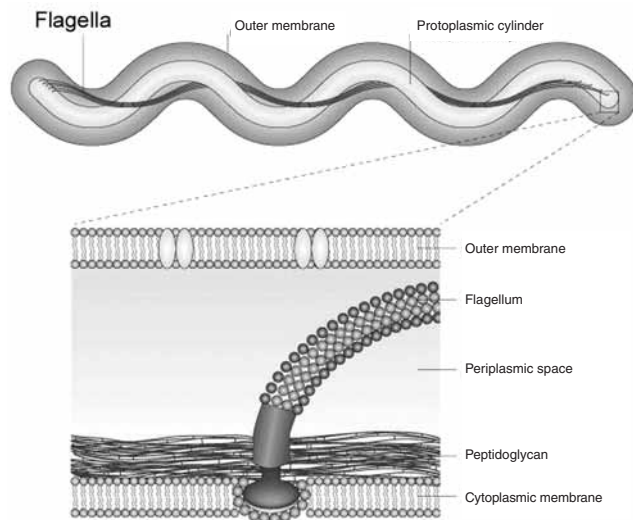


Fig. 1. Structure and physiognomy of *Borrelia burgdorferi* [17, 18]

Organizace genomu *B. burgdorferi* (kmen B31, NC_001318) je značně neobvyklá, neboť největší část tvoří lineární chromozom kódující základní proteiny nutné pro replikaci, transkripci a translaci proteinů spolu s geny kódujícími transportní bílkoviny a energetický metabolismus. Neobsahuje však geny pro biosyntézu látek. Zbytek genomu je uspořádán v 12 lineárních (lp 5, 17, 21, 25, 28-1, 28-2, 28-3, 28-4, 36, 38, 54 a 56) a 9 cirkulárních plazmidech (cp 9, 26, 32-1, 32-3, 32-4, 32-6, 32-7, 32-8, 32-9), jejichž geny většinou souvisejí s virulencí a infektivitou. Celý genom má velikost 910 725 párů bazí (bp), obsahuje celkem 874 genů, z nichž 851 kóduje určitý protein. Molekulová hmotnost jednoho lineárního chromozomu je $1,9 \cdot 10^8$, tedy 5krát méně než u jiných bakterií [1, 4, 5, 6, 7, 8, 20, 24, 26]. Pro porovnání jsou níže uvedeny informace o genomech jiných druhů:

- *Borrelia afzelii* PKo – NC_008277, lineární dsDNA, délka 905 394 bp, 894 genů, 8 plazmidů (6 lineárních a 2 cirkulární);
- *Borrelia garinii* Pbi – NC_006156, lineární dsDNA, délka 904 246 bp, 904 genů, 2 plazmidy (1 lineární a 1 cirkulární) [20, 26]. Borélie jsou vybaveny celou řadou antigenů neproteinové a proteinové povahy. Mezi nejdůležitější patří proteiny vnější membrány (Outer surface proteins, OspA až F), bičíkový flagelin FlaA a FlaB, VisE protein (variable major like sequence E) a další. Osp proteiny jsou zodpovědné za hostitelskou imunitní odpověď. OspA (adhezín, 31 kDa) a OspB (34 kDa) jsou umístěny na lineárním plazmidu a u evropských druhů jsou více variabilní. Dominantním povrchovým proteinem je OspC (reduktin, 21 až 25 kDa), který se nachází na cirkulárním plazmidu a je zároveň hlavním imunogenem v časně protilátkové odpovědi. Bičík borélií se skládá ze dvou jednotek, proteinu FlaA (37 kDa) a majoritního proteinu FlaB (41 kDa) a je důležitý pro chemotaxi a motilitu. VisE antigen, umístěný na lineárním plazmidu lp 28-1, hraje roli v přežití, neboť po vniknutí do hostitelského organismu borélie neustále mění expresi tohoto proteinu, a snaží se tak uniknout rozpoznání a eliminaci imunitním systémem [4, 6, 8, 10, 24, 25].

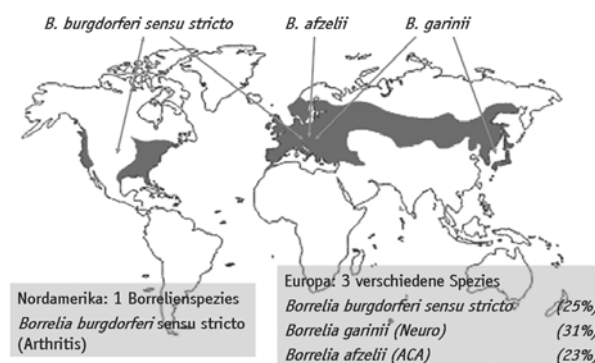


Fig. 2. The geographical distribution of the most considerable *Borrelia* [19]

Patogeneze onemocnění

Klíště je vybaveno zvláštním ústním ústrojím (tzv. hypostom), které je uzpůsobeno k proniknutí do kůže a k sání krve, neboť jsou na něm umístěny obrácené zubce. Pomocí nich se klíště zasekne hluboko do pokožky a postupně začne vylučovat sliny s obsahem neznámé látky, která začne kolem hypostomu vytvářet cementovou vrstvu pro zvýšení stability klíštěte. Ve slinách se dále nachází látky, které potlačují lokální imunitu, tiší bolest, brání srážení krve (enzym ixodin) a uzavření krevních kapilár. Buňky hostitele reagují na přítomnost klíštěte produkcí histaminu, který je ale ničen látkou přítomnou ve slinách se schopností jeho vyvázání [7, 21].

Pro příjem krve mají klíšťata přizpůsobené trávicí ústrojí, které obsahuje postranní laloky sloužící pro skladování nasáté krve. Borélie se vyskytují u klíšťat nejčastěji v jejich střevech, kde jsou ukotveny v epitelálních buňkách pomocí OspA proteinu. Ve střevě klíšťat dochází v průběhu několika hodin sání krve k pomnožení spirochet, k vzestupu teploty a snížení pH, jejichž vlivem se sníží exprese OspA a zvýší exprese OspC. To umožní boréliím odpoutat se od epitelii střev a dostat se asi po 24 hodinách do endolymfy a slinných žláz, kde se opět pomnoží. Nasátou krev klíště ve svém těle zahušťuje a do těla hostitele vrací

zpět přebytečnou vodu spolu s boréliemi. K jejich přenosu dochází obvykle po 48–72 hodinách od přisátí. V místě vstupu dochází k jejich dalšímu pomnožení a následně se dostávají na krátkou dobu do krevního oběhu, kterým jsou roznášeny dále do těla, a mohou tak napadat různé tkáně. Borélie přežívají extracelulárně, ale mají také schopnost prostupovat buňkami, jež je mohou následně chránit před imunitní odpovědí. Byl prokázán jejich vstup do fibroblastů, endotelových buněk a buněk monocytomakrofágového původu. Může docházet i k průniku borélií hematoencefalickou bariérou s vazbou na nervové a gliové buňky mozku [1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 16, 21].

Výrazná imunitní odpověď na infekci je indukována působením lipoproteinů vnější membrány borélií, které aktivují v hostitelských buňkách faktor NF- κ B a prostřednictvím TLR-2 receptorů a CD14 imunitní systém k produkci prozáněťových cytokinů. Ta probíhá v monocytomakrofágových buňkách, ale také ve fibroblastech, endotelových a žírných buňkách. Klíčové postavení má ale imunoregulační působení subsetů TH1 a TH2 T lymfocytů. Při zesílené aktivitě TH2 T lymfocytů vede k časně a dostatečné produkci specifických protilátek (zvýšená tvorba $\text{INF}\gamma$ a následně IL-4) a eliminaci patogenních spirochet. Naopak zesílená aktivita subsetů TH1 T lymfocytů je odpovědná za buňkami zprostředkovanou cytotoxickou reaktivitu, tj. poškození buněk a tkání hostitele, ale nevede k eliminaci borélií. Při poškození tkání hrají roli i zkříženě reagující protilátky – např. protilátky proti flagelinu *B. burgdorferi* zkříženě reagují s proteiny CNS. Borélie, pokud nejsou eliminovány, mají schopnost perzistovat. Byla vyslovena hypotéza, že v tkáních nemusí perzistovat celé spirochety, ale pouze část genetické informace ve formě plazmidů. V roce 1997 byla popsána schopnost vytvářet cystické formy, které vytváří borélie v době nepříznivého prostředí (vliv antibiotické léčby, protilátek), a mohou tak unikat imunitní obraně organismu. Významné jsou i genetické dispozice, byla prokázána signifikantní asociace mezi HLA DR2, HLA DR4 a chronickou artritidou v pozdních stádiích infekce. Je tedy velmi pravděpodobné, že na pozdní klinické manifestaci onemocnění má podíl zejména nepřiměřená a špatně regulovaná imunitní odpověď hostitele. Po prodělaném onemocnění nevzniká trvalá imunita, je tedy možné se opakovaně nakazit [3, 4, 6, 7, 9, 11, 12].

Klinické příznaky

Onemocnění může probíhat bezpříznakově nebo pouze s mírnými projevy, na které není kladen zvláštní význam. Symptomatické formy lymeské boreliózy jsou velmi rozmanité. Nejčastěji dochází k postižení kůže (65–67 %), muskuloskeletárního systému (17 %) a nervového systému (12–14 %). Klinické příznaky rozdělujeme do tří stadií, z nichž první dvě stadia jsou akutní, vyvolaná působením spirochet. Třetí stadium je chronické a uplatňují se při něm imunopatologické procesy [9].

- 1. časné lokalizované stadium je charakterizováno typickým exantémem v místě přisátí klíštěte, tzv. erythema chronicum migrans. Jedná se o pomalu se zvětšující skvrnu oválného nebo kruhovitého tvaru, která je nebolestivá, ostře ohraničená, postupně od centra bledne a perzistuje po dobu 2–3 týdnů. Erytém se vyskytuje u 50–80 % pacientů přibližně po 3–30 dnech. Pokud se zčervenání objeví během několika hodin po přisátí klíštěte, nejedná se o projev onemocnění, ale pouze o přecitlivělou reakci. K dalším příznaků může také patřit zvýšená teplota, únava, bolesti hlavy, nevolnost, eventuálně příznaky podobné chřipce [3, 6, 9, 11, 14, 21] – obrázek 3.

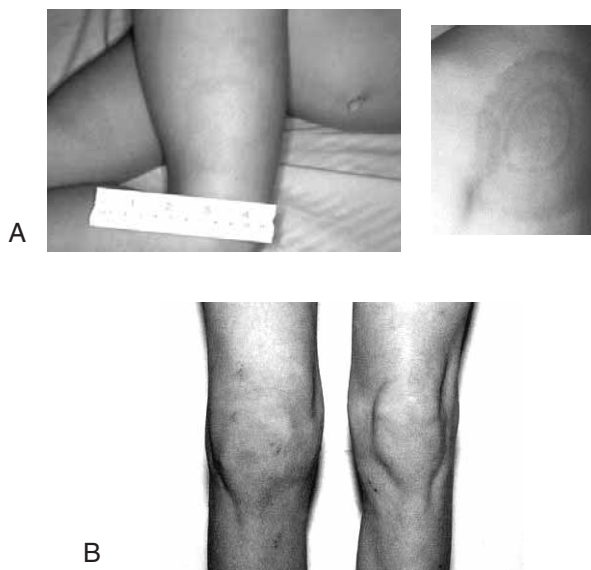


Fig. 3. The possible manifestation of Lyme borreliosis
A – Erythema migrans [22, 23]; B – Arthritis of the right knee joint [11].

- 2. časné diseminované stadium se může objevit do několika týdnů a trvá obvykle 4–6 měsíců. Je charakterizováno neurologickými příznaky, jako jsou časté bolesti hlavy, závratě, zvracení, ztuhlost šíje, poruchy hybnosti, poměrně častá je obrna lícního nervu. Symptomy jsou projevem aseptické meningitidy, meningoencefalitidy, radikulitidy, myelitidy. Muskuloskeletární postižení se manifestuje jako lymeská artritida spíše menších kloubů, záněty svalů (myozitidy) a šlach (tendinitidy). Mohou se objevit poruchy srdečního rytmu, kardiitidy a dušnost, ale také oční projevy jako konjunktivitida, edém víček. Postižení kůže (nejčastěji u dětí) se může projevit boréliovým lymfocytomem, vyznačujícím se fialovými uzlíky zejména na ušních lalůčkách, nosu, mamile a skrotu [3, 6, 9, 11, 14, 21].
- 3. pozdní stadium se vyznačuje dlouhou inkubační dobou a dlouhodobě trvajícím potížením. Typickými projevy jsou postižení velkých kloubů (kolenního, loketního a ramenního) pod obrazem mono- či oligoartritidy, postižení nervové soustavy chronickou encefalitidou, polyneuritidou, kdy stav může vyústit až do obrazu demence či do demyelinizačních projevů imitujících roztroušenou sklerózu. Pozdním kožním projevem je chronická atrofická akrodermatitida, kdy kůže je nejprve erytematózní, později dochází k ubývání elastických

vláken až propadá atrofii. Může také dojít k postižení rohovky chronickou keratitidou [3, 6, 9, 11, 14, 21].

Diagnostika

Diagnostika lymeské boreliózy je založena na klinickém obrazu, anamnéze přísátí klíštěte (okolo 60 % případů), eventuálně jiného hmyzu a laboratorní diagnostice. Laboratorní průkaz onemocnění je prováděn přímými a nepřímými metodami, vyšetřovaný materiál se volí v závislosti na klinických projevech a lokalizaci probíhajícího onemocnění. V případech likvorů je vhodné provést vyšetření leukocytů a celkové bílkoviny, neboť se může nacházet pleocytóza (zejména zvýšení mononukleárů) a zvýšené hodnoty celkové bílkoviny (někdy jsou zvýšeny pouze gamaglobuliny). U některých pacientů je však obraz likvoru naprosto normální.

Mezi přímé laboratorní metody patří elektronová mikroskopie, kultivace a průkaz DNA borélií pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) v různých biologických materiálech. Nepřímé metody se opírají o průkaz protilátek v tělních tekutinách pomocí ELISA metod, western blotu, eventuálně imunofluorescenční analýzy. Při primoinfekci začíná tvorba protilátek IgM obvykle za 3–4 týdny po infekci. Následuje produkce IgG protilátek po 4–8 týdnech, které však nemají protektivní charakter. U některých nemocných s jasnými klinickými projevy mohou být protilátky negativní, naopak u jiných mohou IgM přetrvávat dlouhou dobu.

Diagnostika lymeské boreliózy je však v důsledku pestrosti klinických projevů a časté nejednoznačnosti laboratorního průkazu značně svízelná [1, 3, 9, 11, 14, 15].

Léčba

U lymeské boreliózy lze léčbu rozdělit na kauzální a symptomatickou, při které jsou léčiva vybírána podle klinických projevů (např. analgetika, antirevmatika apod.). Hlavním cílem léčby je odstranění původce, tedy borélií, pomocí antibiotik. Vzhledem ke schopnosti borélií přežívat intracelulárně se volí antibiotika, která dobře pronikají do buněk a tkání. Zároveň se také zohledňuje forma a stadium lymeské boreliózy. Mezi používaná antibiotika patří: amoxicilin, doxycyklin, ceftriaxon, cefotaxim, benzylpenicilin a další. U těhotných a dětí do 8 let se nejčastěji podává amoxicilin, tetracykliny jsou plně kontraindikovány. V případě náhodného nálezu séropozitivity v průběhu těhotenství je zahájena 14denní zajišťovací léčba pomocí amoxicilinu. Preventivní podávání antibiotik po přísátí klíštěte se v České republice neprovádí. Délka léčby je doporučována podle stadia lymeské boreliózy, tj. v prvním stadiu po dobu 14 dní, ve druhém 21 dní a ve třetím stadiu 28 dní. Po proběhlé léčbě probíhá u pacientů ještě dispenzarizace po dobu 2 let [3, 6, 9, 11, 14, 16, 25].

Závěr

Přestože je lymeská borelióza známá již více než 20 let a je popsáno mnoho informací o etiologii, patogenезi a klinických manifestacích, její léčba a diagnostika způsobuje řadu problémů. Vzhledem k rozmanitosti klinických projevů zasahuje do různých klinických oborů, a proto při řešení tohoto onemocnění je vhodný, respektivě nutný multidisciplinární přístup.

Literatura

1. **Aguero-Rosenfeld, M. E., Wang, G., Schwartz, I., Wormser, G. P.** Diagnosis of Lyme borreliosis. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2005, 18, 3, p. 484–509.
2. **Barthold, S. W.** Spirochetes, ticks and DNA. *Parasitology Today*, 1998, 14, 11, p. 444.
3. **Bartůněk, P.** Lymeská borelióza. *Postgraduální medicína*, 2003, 5, 4, p. 378–385.
4. **Fikrig, E., Narasimhan, S.** Borrelia burgdorferi – Traveling incognito? *Microbes and Infection*, 2006, 8, p. 1390–1399.
5. **Fraser, C. M., Casjens, S., Huang, W. M. et al.** Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, Borrelia burgdorferi. *Nature*, 1997, 390, 11, p. 580–586.
6. **Hengge, U. R., Tannapfel, A., Tyring, S. K. et al.** Lyme borreliosis. *Lancet Infect. Dis.*, 2003, 3, p. 489–500.
7. **Krejsek, J., Kopecký, O.** Imunopatogeneze infekcí patogenními boréliemi. In Krejsek, J., Kopecký, O. *Klinická imunologie*. Hradec Králové: NUCLEUS Hradec Králové 2004, s. 499–502.
8. **Krupka, M., Raska, M., Belakova, J., Horynova, M., Novotny, R., Weigl, E.** Biological aspects of Lyme disease spirochetes: Unique bacteria of the Borrelia burgdorferi species group. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub.*, 2007, 151, 2, p. 175–186.
9. Lymeská borelióza a její léčba. *Farmakoterapeutické informace. Měsíčník pro lékaře a farmaceuty*, 2006, 4, p. 1–3.
10. **Ohnishi, J., Piesman, J., de Silva, A. M.** Antigenic and genetic heterogeneity of Borrelia burgdorferi populations transmitted by ticks. *PNAS*, 2001, 98, 2, p. 670–675.
11. **Roháčová, H.** Lymeská borelióza – onemocnění již bez otázek? *Remedia*, 2004, 14, 1, p. 46–51.
12. **Rupprecht, T. A., Koedal, U., Fingerle, V., Pfister, H. W.** The pathogenesis of Lyme borreliosis: From infection to inflammation. *Mol. Med.*, 2008, 14, 3-4, p. 205–213.
13. **Schwaiger, M., Péter, O., Cassinotti, P.** Routine diagnosis of Borrelia burgdorferi (sensu lato) infections using a real-time PCR assay. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2001, 7, p. 461–469.
14. **Vaňousová, D., Hercogová, J.** Lyme borreliosis treatment. *Dermatologic therapy*, 2008, 21, p. 101–109.
15. **Wilske, B., Fingerle, V., Schulte-Spechtel, U.** Microbiological and serological diagnosis of Lyme borreliosis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 2007, 49, p. 13–21.
16. **Yanagihara, Y., Masuzawa, T.** Lyme disease (Lyme borreliosis). *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 1997, 18, p. 249–261.
17. Obrázek detailní struktury spirochet borélií (Nature Reviews – Microbiology) [online]. [2008-10-20]. Dostupný na www.nature.com/nrmicro/journal/v3/n2/images/nrmicro1086-f1.gif.

18. Obrázek borélií v krvi [online]. [2008-10-20]. Dostupný na [www: http://www.accessmedicine.com/loadBinary.aspx?name=licha&filename=licha_III.A.003.jpg](http://www.accessmedicine.com/loadBinary.aspx?name=licha&filename=licha_III.A.003.jpg).
19. Obrázek geologického rozšíření borélií [online]. [2008-10-20]. Dostupný na [www: http://www.borreliose-initiative-berlin-brandenburg.de/bilder/verbreitung2.jpg/image_preview](http://www.borreliose-initiative-berlin-brandenburg.de/bilder/verbreitung2.jpg/image_preview).
20. BacMap genomový atlas [online]. [2008-10-15]. Dostupný na [www: http://wishart.biology.ualberta.ca/BacMap/index_1.html](http://wishart.biology.ualberta.ca/BacMap/index_1.html) (http://wishart.biology.ualberta.ca/BacMap/cgi/getSpeciesCard.cgi?accession=NC_001318&ref=index_1.html).
21. Materiály z diplomové práce Mgr. Radky Daňkové [online]. [2008-10-06]. Dostupné na [www: http://www.pr-lab.cz/downloads/clanky/lymeska-borrelioza.pdf](http://www.pr-lab.cz/downloads/clanky/lymeska-borrelioza.pdf).
22. Obrázek erythema migrans [online]. [2008-10-20]. Dostupný na [www: http://www.pedrhemonlinejournal.org/June%202006/June%2030%20issue/HTML/LYME.htm](http://www.pedrhemonlinejournal.org/June%202006/June%2030%20issue/HTML/LYME.htm).
23. Obrázek erythema migrans [online]. [2008-10-20]. Dostupný na [www: http://www.vin.com/ImageDBPub/VP05000/IMG01888.GIF](http://www.vin.com/ImageDBPub/VP05000/IMG01888.GIF).
24. Internetové stránky Lyme disease [online]. [2008-10-06]. Dostupné na [www: http://www.brown.edu/Courses/Bio_160/Projects2005/lyme_disease/organism.htm](http://www.brown.edu/Courses/Bio_160/Projects2005/lyme_disease/organism.htm).
25. Informační web Borelioza.cz [online]. [2008-10-06]. Dostupný na [www: http://www.borelioza.cz](http://www.borelioza.cz).
26. Bacteria Complete Chromosomes [online]. [2008-10-06]. Dostupné na [www: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/genlist.cgi?taxid=2&type=1&name=Bacteria%20Complete%20Chromosomes](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/genlist.cgi?taxid=2&type=1&name=Bacteria%20Complete%20Chromosomes).

Do redakce došlo 18. 12. 2008.

Adresa pro korespondenci:

Mgr. Radka Bolehovská

Fakultní nemocnice Hradec Králové

Ústav klinické biochemie a diagnostiky

Sokolská 581

500 05 Hradec Králové

e-mail: bolehrad@fnhk.cz

Detekce DNA *Borrelia burgdorferi* sensu lato pomocí real-time PCR

Bolehovská R.¹, Plíšková L.¹, Plíšek S.², Čermáková Z.³, Honegr K.², Palička V.¹

¹Ústav klinické biochemie a diagnostiky LF a FN Hradec Králové

²Klinika infekčních nemocí LF a FN Hradec Králové

³Ústav klinické mikrobiologie LF a FN Hradec Králové

SOUHRN

Cíl práce: 1. zavedení, optimalizace a validace polymerázové řetězové reakce v reálném čase pro detekci DNA borélií včetně kontroly přítomnosti inhibitorů DNA polymerázy; 2. shrnutí dosavadních výsledků získaných pomocí zavedené metody.

Materiál a metody: Izolace DNA byla prováděna pomocí komerčního kitu MagNA Pure Isolatín Kit III (Bacteria, Fungi) na automatickém izolačním přístroji MagNA Pure LC firmy Roche. Metoda byla koncipována jako multiplex real-time PCR s amplifikací DNA borélií a koamplifikací inhibiční kontroly v jedné zkumavce.

Výsledky: Zavedená metoda byla plně optimalizována, validována a následně použita pro vyšetření 1822 materiálů, z toho 1151 likvorů, 609 krví a 62 jiných materiálů. Pouze 17 vzorků bylo pozitivních a 4 vzorky vykazovaly přítomnost inhibitorů DNA polymerázy.

Závěr: Námí zavedená a validovaná metoda je velice rychlá, citlivá a specifická pro detekci DNA borélií. Přesto v diagnostice lymeské boreliózy není vždy stoprocentně spolehlivá a klinická korelace, stejně jako u jiných metod, není uspokojivá.

Klíčová slova: lymeská borelióza, real-time PCR, validace, primery, biologické materiály, kontrola kvality.

SUMMARY

Bolehovská R., Plíšková L., Plíšek S., Čermáková Z., Honegr K., Palička V.: Detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato DNA by real-time PCR

Objective: The aims of our work were to introduction, optimization and validation of real-time PCR for detection *Borrelia* DNA including control of DNA polymerase inhibitors presence and summary of the results obtained by the new method.

Material and methods: DNA was isolated by commercial kit MagNA Pure Isolatín Kit III (Bacteria, Fungi) on automatic isolation instrument MagNA Pure LC (Roche). The method is created as multiplex real-time PCR with *Borrelia* DNA amplification and co-amplification of inhibitor control in one tube.

Results: Established method was optimised, validated and then used for analysis of 1,822 biological materials, of it 1,151 cerebrospinal fluids, 609 blood samples and 62 other biological samples. Only 17 samples were positive and 4 samples contained inhibitors of DNA polymerase.

Conclusion: The established and validated method is very fast, sensitive and specific for detection of *Borrelia* DNA. In spite of, Lyme borreliosis diagnostics is not always unimpeachable and clinical correlation is not satisfactory as well as other methods.

Key words: Lyme borreliosis, real-time PCR, validation, primers, biological materials, quality control.

Úvod

Lymeská borelióza je nejčastější klíštětem přenášené onemocnění způsobené gramnegativními spirochetálními bakteriemi skupiny *Borrelia burgdorferi* sensu lato. V České republice se jedná zejména o *Borrelia garinii* a *Borrelia afzelii*, eventuálně *Borrelia burgdorferi* sensu stricto. Pro přenos borélií je zapotřebí dostatečně dlouhá doba záukusu klíštěte (minimálně 24 hodin), během níž dochází k uvolnění borélií ze střev do slin klíštěte vlivem změny exprese OspA, OspC genů. Poté se borélie dostávají prostřednictvím hypostomu klíštěte ze slin do kůže a krve člověka. Klinické projevy tohoto infekčního onemocnění jsou velice variabilní, někdy může probíhat i bezpříznakově [1, 3, 5, 6, 10].

Riziko lymeské boreliózy koreluje s přítomností vektoru, a to zejména klíštěte. V poslední letech dochází k posunu výskytu klíšťat i do vyšších nadmořských výšek a ke zvýšení počtu dní optimálních pro reprodukci a aktivitu klíšťat. Z tohoto důvodu má onemocnění neustále vzestupnou tendenci.

Diagnostika lymeské boreliózy je v dnešní době založena na zhodnocení klinických projevů, důkladné epidemiologické anamnéze a v neposlední řadě na laboratorních vyšetřeních, což je – vzhledem k rozmanitosti klinických projevů a rozmanitosti antigenních struktur borélií – velice obtížné [1, 3, 6, 10].

Materiál a metody

Vzhledem k riziku inhibice PCR reakce, respektive DNA polymerázy, je nutné v rámci dodržení správné vnitřní kontroly kvality (VKK) provádět tzv. inhibiční kontrolu (IC), která umožňuje vyloučení vydávání falešně negativních výsledků. Snažili jsme se proto zavést multiplex real-time PCR na přístroji RotorGene 3000 (Corbett Research) pro detekci DNA borélií se současnou amplifikací IC z oblasti lidského HLA-DQ genu v jedné zkumavce. Sekvence primerů a hydrolytické sondy specifické pro *Borrelia burgdorferi* sensu lato jsme vybrali z oblasti flagelinového genu, které

byly dříve publikovány (16). Sonda je značena fluorescenčním reporterem FAM (6-karboxyfluorescein) a nefluorescenčním zhášedčem BHQ (Black Hole Quencher). Sekvence primerů a hydrolytické sondy pro IC z oblasti lidského HLA-DQ genu byla vybrána z dříve publikované práce [5]. Sonda pro inhibiční kontrolu je značena jiným fluoroforem (HEX) a zhášedčem je opět BHQ.

Optimální složení reakční směsi bylo: TaqMan Universal Master Mix (2krát, Applied Biosystems), forward primer FLA F1A o koncentraci 0,3 $\mu\text{mol/l}$, reverse primer FlaR1 o koncentraci 0,9 $\mu\text{mol/l}$ a sonda o koncentraci 0,2 $\mu\text{mol/l}$ pro borélii a primery HLA-DQ F a HLA-DQ R o koncentraci 0,024 $\mu\text{mol/l}$, sonda HLA-DQ HEX o koncentraci 0,012 $\mu\text{mol/l}$ pro inhibiční kontrolu. Množství přidávané DNA vzorku bylo 5 μl a lidské DNA 0,5 μl .

Reakce využívá univerzální teplotní profil: 50 °C 2 min., 95 °C 10 min. 55 cyklů s teplotními kroky 95 °C 15 s a 60 °C 1 min., kdy dochází ke snímání fluorescence detekčním kanálem FAM (průkaz DNA borélií při 530 nm) a JOE (inhibiční kontrola při 555 nm).

Výsledky

Validace

V rámci validace metody jsme stanovili citlivost detekce metody, specifitu PCR reakce, opakovatelnost a mezilehlou přesnost metody, v neposlední řadě také porovnání s původně používanou metodou nested PCR s primery z chromozomální rDNA oblasti.

Citlivost detekce DNA borélií jsme zjistili pomocí ředění vzorku o koncentraci 1000 organismů/ml z externí kontroly kvality (Instand, Německo). Citlivost nové multiplex real-time PCR byla stanovena na 1–2 organismy/ml, respektive 0,39 pg/ml, a je srovnatelná s dříve používanou metodou s citlivostí 2,5 organismů/ml.

Specifita metody, respektive primerů a hydrolytické sondy, byla ověřena pomocí programu Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) na internetové stránce <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi> s výsledkem: real-time PCR specifická pro *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. valaisiana*. Specifita byla také ověřena provedením real-time PCR s kmeny *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. burgdorferi* sensu stricto inokulovanými do krve a likvoru zdravých jedinců (respektive jedinců bez přítomnosti DNA borélií), vždy s pozitivními výsledky zachytu uvedených borélií.

Pro stanovení opakovatelnosti metody bylo provedeno 10 měření v rámci jednoho běhu PCR pro 2 vzorky o různých koncentracích – nízká koncentrace (1,5 organismů/ml, na hranici detekce metody) s výsledným variačním koeficientem (CV) 6,38 % a vysoká koncentrace (5 · 10⁶ organismů/ml) s CV 1,34 %. Pro stanovení mezilehlé přesnosti metody bylo provedeno měření 2 vzorků o různé koncentraci během nejméně 5 dnů – nízká koncentrace (10 organismů/ml) s CV 2,44 %, střední koncentrace (50 organismů/ml) s výsledkem CV 2,31 % a vysoká koncentrace (100 organismů/ml) s CV 1,37 %. Výpočet

průměru, směrodatné odchylky a následně CV byl vždy proveden ze získaných Ct hodnot.

V roce 2007 a 2008 jsme se také účastnili externí kontroly kvality (EHK) pro průkaz DNA *Borrelia burgdorferi* sensu lato německé společnosti INSTAND e. V., vždy se správnými výsledky. Úspěšně jsme také zavedli vnitřní kontrolu kvality pomocí sledování Ct hodnot pozitivní kontroly, prostřednictvím nichž můžeme sledovat citlivost metody mezi jednotlivými reakcemi.

Soubor pacientů vyšetřených zavedenou metodou

Validovaná metoda multiplex real-time PCR byla zavedena do rutinního provozu v červenci roku 2007. Do konce října 2008, tj. za 15 měsíců, bylo vyšetřeno 1822 materiálů, z toho 1151 likvorů (63,2 %), 609 kreví (33,4 %) a 62 jiných materiálů (3,4 %), jako např. punktát kolene, moč, vzorek kůže, cysty. Pouze 17 vzorků bylo pozitivních (0,9 %), z toho 14 likvorů, 1 krev a 2 kolenní punktáty – od 12 mužů a 5 žen. Čtyři vzorky vykazovaly přítomnost inhibitorů DNA polymerázy (0,2 %), tj. negativní výsledek inhibiční kontroly.

Nízký počet pozitivit souvisí zejména s průkazem DNA borélií u chronických pacientů s lymeskou boreliózou a vyšetřením v rámci diferenciatní diagnostiky jiných onemocnění (např. roztroušené sklerózy, únavový syndrom). Navíc u pacientů s jasnými příznaky lymeské boreliózy, zejména erythema migrans, je ihned zahájena antibiotická terapie a laboratorně je provedeno sérologické vyšetření; vyšetření metodou PCR není vůbec požadováno. Počet jednotlivých materiálů v roce 2007 a 2008 je uveden v tabulce 1, ze které vyplývá, že mezi těmito roky došlo k významnému zvýšení počtu vyšetřovaných likvorů na úkor kreví (v roce 2007 byl poměr vyšetřovaných likvorů ku vyšetřovaným krevím přibližně 1 : 1, oproti tomu v roce 2008 to bylo 7 : 3). Tento posun je z hlediska průkazu DNA borélií správný, neboť v krvi zůstávají borélii pouze krátkou dobu a jsou z ní rychle eliminovány. Jejich zachyt je proto v krvi velice obtížný a vždy závisí na správném načasování odběru do doby boréliémie.

Diskuse

Lymeská borelióza je známá již více než 20 let, přesto je její diagnostika v řadě případů značně obtížná [3, 11]. Vzhledem ke každoročnímu nárůstu tohoto onemocnění je důležitá kvalitní laboratorní diagnostika borélií včetně molekulárně biologických metod [13]. V naší práci jsme se proto snažili o zavedení nové real-time PCR metody pro rychlou detekci DNA borélií, kterou jsme plně validovali. PCR metoda vhodně doplňuje mikrobiologickou diagnostiku, která je založena zejména na sérologickém průkazu protilátek třídy IgG a IgM, průkazu antigenů pomocí western blotu nebo na přímém průkazu organismů elektronovou mikroskopií.

Výběr primerů

Pro PCR diagnostiku je naprosto zásadní vhodný výběr oblasti genomu pro amplifikaci. Prvním problé-

Table 1. The number of analysed materials with percentage share in 2007 and 2008

Material	Year	2007 (5 months)	2008 (10 months)
	Results of PCR		
Total number of materials		605	1217
Total number of cerebrospinal fluids		323 (53.4%)	828 (68.1%)
Cerebrospinal fluids	positive	7 (2.2%)	7 (0.8%)
	negative	316 (97.8%)	821 (99.2%)
	inhibition	–	–
Total number of blood samples		258 (42.6%)	351 (28.8%)
Blood	positive	1 (0.4%)	–
	negative	254 (98.4%)	351 (100%)
	inhibition	3 (1.2%)	–
Total number of other materials		24 (4.0%)	38 (3.1%)
Other materials (synovial fluid, urine, etc.)	positive	2 (8.3%)	–
	negative	22 (91.7%)	37 (97.4%)
	inhibition	–	1 (2.6%)

mem je velmi neobvyklý genom borélií, obsahující lineární chromozom s variabilním počtem lineárních a cirkulárních plazmidů, které mohou borélie v průběhu svého života ztrácet. Byla vyslovena hypotéza, že u chronické lymeské boreliózy může perzistovat pouze část genetické informace v podobě plazmidů [1, 5, 11]. Vzhledem k vyšší ceně PCR reakcí, a zároveň k velké škále antigenních specifit není možné v rutinní diagnostice současně provádět detekci několika genů borélií. Proto je vhodné provést výběr cílového genu, sekvenční primerů, eventuálně sondy, které jsou ale velmi důležité pro účinnost dané PCR, tj. pro schopnost detekce DNA borélií [1, 7, 10].

První PCR specifická pro detekci chromozomálního genu *Borrelia burgdorferi* sensu lato byla v literatuře popsána v roce 1989 [1, 7]. Od té doby bylo publikováno velké množství sekvencí primerů z různých genů. Mezi nejčastěji publikované patří geny z chromozomální oblasti (5S/23S rRNA, recA, flagelin) nebo plazmidové oblasti (OspC, OspA) [1, 7, 10]. Po důkladné literární rešerši jsme vybrali primery z oblasti flagelinového genu (FlaB) [8], který je také nejčastěji využíván v komerčních kitech, např. firmy QIAGEN, GeneProof, Dynex, a který byl označen jako výborný cílový gen pro PCR [7]. Navíc genomová DNA (chromozomální DNA) je u akutních stadií lymeské boreliózy nalézána ve vyšších koncentracích, oproti tomu u chronických forem se však vyskytuje jen ve stopách [12]. Pro chronické formy by bylo vhodnější využít amplifikaci oblasti některého z plazmidů. Nicméně ale otázkou je, nakolik by se zvýšil počet pozitivních nálezů.

Analytické parametry zavedené metody

Citlivost naší mlutiplex real-time PCR je 1–2 organismy/ml (respektive 0,39 pg/ml), což je srovnatelné s publikovanou metodou [8], ze které jsme vybrali sekvenci primerů a sondy. Citlivost metody je rovněž srovnatelná s real-time PCR (0,42 pg DNA/ml) využívanou v Národní referenční laboratoři pro boreliu, vedenou dr. Hulínskou [12]. Při porovnání původní

nested PCR s novou real-time PCR jsme zjistili srovnatelnou citlivost.

Velkou výhodou nové metody je rychlost provedení vyšetření (možnost statimů), vyšší specifita detekce vzhledem k použití specifické hydrolytické sondy a velmi nízké riziko kontaminace oproti nested PCR, která je daleko náročnější na provedení. Pomocí internetového programu BLAST jsme dále zjistili, že metoda je plně specifická pro detekci DNA borélií. Opakovatelnost a mezilehlá přesnost naší PCR se pohybovala maximálně do 2,5 %, pouze v případě vzorku o koncentraci na hranici detekce byla zjištěná opakovatelnost necelých 6,5 %. Námi zjištěné údaje potvrdily již dříve publikované závěry [8].

Preanalytická fáze a izolace DNA

Z hlediska správné diagnostiky lymeské boreliózy je velmi důležité vhodně vybrat a načasovat odběr biologického materiálu. Detekci DNA borélií je možné provést v krvi, likvoru, moči, synoviální tekutině, tkáni nebo ve vzorcích kůže z oblasti erythema migrans [1, 2, 4, 7, 8, 10]. Vzhledem k nízkému množství borélií v infikovaných tkáních a tělních tekutinách je v detekci DNA borélií velmi zásadní transport vzorků do laboratoře, jejich uchování a zvolený způsob extrakce DNA [1, 7]. Biologický materiál je nutné vždy dodávat chlazený, ale ne zmražený [30]. Vysoká teplota při transportu materiálu může snížit procento pozitivity, respektive citlivost detekce. U krve může dojít k hemolýze a velké množství uvolněného hemoglobinu může způsobit inhibice DNA polymerázy, tj. znehodnocení PCR reakce. DNA extrakce a analýza PCR by měla být provedena co nejdříve po dodání do laboratoře, nebo by vzorky měly být zmrazeny, ale ne déle než tři měsíce [1, 2]. Po třech měsících je pozorováno snížení pozitivních výsledků [2]. Při uchování vzorků kůže v transportním nebo kultivačním médiu byla po 24 hodinách popsána migrace spirochet z kůže do média [1]. V těchto případech je nutné provést nejenom vyšetření kůže, ale i transportního média.

Výsledek PCR reakcí, tj. úspěšnost záchytu DNA borélií, závisí také na způsobu izolace DNA. Exner et al. se ve své práci snažili porovnat tři často používané izolační techniky – manuální izolaci DNA pomocí fenol-chloroformové extrakce, QIAamp DNA kity firmy QIAGEN a automatickou izolaci pomocí magnetických partikulí na přístroji MagNA Pure. Všechny způsoby izolace vykazovaly u vzorků krve, likvorů a synoviální tekutiny stejnou citlivost detekce DNA borélií. Výjimkou byla pouze moč, kde horší citlivost byla pozorována u QIAamp DNA kitů [4]. V naší laboratoři pro izolaci DNA různých patogenů využíváme všechny tři techniky, zejména v závislosti na typu materiálu, eventuálně na druhu mikroorganismu, jehož DNA má být detekována. V minulosti jsme také provedli porovnání manuální izolace DNA borélií pomocí QIAamp DNA Mini kitu a automatické pomocí MagNA Pure. Výsledkem byla srovnatelná citlivost obou izolačních způsobů. Nejčastěji proto provádíme izolaci DNA borélií pomocí automatického přístroje MagNA Pure a MagNA Pure LC DNA Isolation Kit III, který umožňuje snáze izolovat až 32 vzorků najednou. Izolovanou DNA uchováváme pouze při 2–8 °C, neboť při uchování při nižších teplotách jsme sledovali snížení citlivosti detekce.

V poslední době některé laboratoře v České republice nabízejí možnost vyšetřovat klíště na přítomnost DNA borélií. Naše laboratoř tyto požadavky odmítá, neboť pozitivní výsledek u klíštěte neznamená, že se člověk nakazil. Riziko rozvoje lymeské boreliózy je v případě odstranění klíštěte do 24 hodin velmi nízké. Pro přenos borélií z klíštěte je nejprve nutné jejich uvolnění z epitelů žaludku do slin klíštěte doprovázené změnou exprese OspA a OspC genů, aktivita imunitního systému a podobně. Vyšetřování klíšťat je významné pouze pro epidemiologické a další vědecké studie [10].

Kontrola kvality

V současné době jsou vysoké požadavky kladeny na kontrolu kvality používaných metod, skládající se z vnitřní kontroly kvality, tj. používání pozitivní a negativní kontroly v každé reakci a navíc inhibiční kontroly pro každý vzorek DNA. Pozitivní kontrola slouží pro kontrolu správného průběhu amplifikační reakce, eventuálně pro sledování citlivosti jednotlivých PCR reakcí. Negativní kontrola umožňuje sledovat, zda nedošlo ke kontaminaci templátu či amplifikační směsi PCR produktem, kontaminaci chemikálií určených pro přípravu PCR reakcí, čímž snižuje riziko vydávání falešně pozitivních výsledků. Inhibiční kontrola naopak slouží ke zmenšení rizika vydávání falešně negativních výsledků, a to u vzorků s přítomností inhibitorů DNA polymerázy, které se občas vyskytují v biologických vzorcích [1, 7]. Inhibitory, např. heparin, fenol, vyšší koncentrace hemoglobinu apod., zabíjejí aktivní centrum enzymu, čímž dojde ke snížení účinnosti, respektive citlivosti PCR reakce. Rozhodli jsme se, že v rámci průkazu DNA borélií zavedeme tuto inhibiční kontrolu jako součást reakce tak, jak je to běžné u komerčních kitů. V literatuře se všeobecně uvádí 5% podíl inhibičí

u biologických materiálů. V naší laboratoři jsme však během 15 měsíců, kdy jsme prováděli vyšetření DNA borélií pomocí nové metody, zjistili inhibici DNA polymerázy pouze u 0,2 % vzorků. Obdobný podíl inhibičí PCR reakcí sledujeme také u vyšetření jiných původců onemocnění. V molekulárně biologických laboratořích je dalším rizikem kontaminace vzorku vzorkem, pro jejíž zabránění je nutné dodržovat zejména správnou techniku pipetování.

Žádaná je také účast v externí kontrole kvality, která umožňuje porovnat výsledky dané laboratoře s výsledky ostatních laboratoří i v rámci celé Evropy. Z výsledků EHK může laboratoř vyvodit řadu cenných informací, nebo může použít vzorky o určité koncentraci pro zjištění citlivosti používané metody.

Soubor pacientů

Přestože je námi zavedená metoda velmi citlivá, v souboru 1822 vzorků jsme detekovali DNA borélií pouze v 17 případech, tj. v 0,9 %. Nízké procento pozitivita odráží řadu problémů a obtíží, které s sebou nese diagnostika lymeské boreliózy.

Výběr pacientů

Prvním problémem je výběr pacientů, u kterých je vyšetření prováděno. Nejvíce vyšetření v rámci našeho souboru je požadováno z infekční a neurologické kliniky Fakultní nemocnice Hradec Králové. Z infekčních klinik jsou požadavky posílány zejména u pacientů s nejasnými příznaky lymeské boreliózy nebo s chronickou lymeskou boreliózou, eventuálně v rámci diferenciální diagnostiky jiného onemocnění. Vyšetření u chronických pacientů je značně problematické, neboť v jejich tělních tekutinách je většinou velmi malé množství spirochet, které jsou obtížně detekovatelné [7]. V případě typických příznaků akutně probíhající lymeské boreliózy je zahájena antibiotická terapie a provedeno pouze sérologické vyšetření protilátek, molekulárně biologická detekce DNA však není požadována. V případě neurologické kliniky se jedná většinou o vyšetření v rámci diferenciální diagnostiky, např. roztroušené sklerózy, únavového syndromu apod.

Výběr biologických materiálů pro vyšetření

Dalším problémem je výběr materiálů. V případě krve je vyšetření velmi obtížné, neboť boreliémie může být nedostatečná nebo pouze krátkodobá, přechodná, v období tzv. diseminovaného onemocnění (u pacientů s erythema migrans, neuroboreliózy, kardiitidy) [1, 6]. Z tohoto důvodu byla popsána nízká senzitivita detekce DNA borélií pomocí PCR v krvi pacientů s lymeskou boreliózou [1]. Vyšetření DNA borélií v likvoru by se mělo provádět v případě neuroboreliózy. U likvorů byla navíc popsána nepřímá závislost záchytu DNA borélií na délce trvání onemocnění a také na délce trvání antibiotické léčby [1]. Lebech et al. zjistili pozitivitu PCR reakce až u 50 % likvorů odebraných pacientům s onemocněním trvajícím méně než dva týdny. Oproti tomu u pacientů s onemocněním trvajícím více než dva týdny byla

možnost záchytu borélií pouze u 13 % [7]. Nízká senzitivita detekce v pozdních stadiích onemocnění může souviset také s možností adheze borélií ke tkáním [7]. PCR se proto zdá být užitečná zejména v časných stadiích onemocnění [5]. V roce 2007 jsme vyšetřovali přibližně stejné množství krví a likvorů, v roce 2008 jsme vyšetřovali již více likvorů. Tento posun jsme shledali jako velmi významný i z hlediska možnosti záchytu borélií.

Během 15 měsíců jsme také vyšetřili 9 močí s negativním výsledkem. Malý počet vzorků močí souvisí s tím, že se v posledních letech od vyšetřování močí upouští z důvodu nízké senzitivity a nereprodukovatelnosti vyšetření [1, 2, 10]. Bergman et al. ve své práci zjistili, že pro úspěšnou analýzu močí je důležité neodebírat první ranní moč a při zpracování centrifugovat moč při 36000 g. V případě centrifugace při 14000 g byly všechny vzorky moče negativní [2]. Laboratoře většinou používají centrifugy s maximálně 15000 g, čímž je možnost záchytu DNA borélií v moči minimální.

Dále je možné provést vyšetření synoviální tekutiny u lymeské artritidy a kůže z oblasti erythema migrans. V našem souboru bylo vyšetřeno 42 kloubních punktátů, z nichž 2 byly pozitivní (tj. 4,8 %) a 1 vykazoval přítomnost inhibitorů DNA polymerázy. Oproti tomu v případě likvorů jsme pozorovali pouze 1,2 % pozitivit a u krví 0,2 %. Vyšší procento pozitivit v synoviální tekutině je také popisováno v literatuře [1, 7]. Úspěšnost detekce DNA borélií však také závisí na antibiotické léčbě, neboť u neléčených pacientů je zjištěn vyšší podíl pozitivních nálezů než u léčených [1]. Priem et al. zjistili, že DNA borélií může být detekována ve vzorcích synoviálních membrán pacientů po antibiotické léčbě a s negativním výsledkem PCR v synoviální tekutině [1]. Vyšetření vzorků kůže je vhodné u pacientů s kožní manifestací. Senzitivita detekce DNA borélií v lézích erythema migrans je obvykle vysoká (mezi 36–88 %), v případě vzorků kůže pacientů s chronickou atrofickou akrodermatitidou mezi 54–100 % [1, 9, 10]. Ačkoliv je vhodné provádět vyšetření kůže pomocí PCR metod, přesto jsme v naší laboratoři analyzovali pouze jeden vzorek s negativním výsledkem. Dumler ve své práci uvádí, že PCR metody jsou velmi citlivé v případě vyšetření vzorků kůže a synoviální tekutiny u pacientů s lymeskou boreliózou, zatímco význam diagnostiky v krvi a likvoru je malý [1].

Vzhledem k popsaným problémům je nutné konstatovat, že PCR metody nejsou v diagnostice lymeské boreliózy vždy stoprocentně spolehlivé. Proto negativní výsledky PCR nevylučují onemocnění, naopak pozitivní výsledky onemocnění potvrzují. Celkově lze říci, že klinická korelace PCR, stejně jako ostatních mikrobiologických metod, je neuspokojivá. V neposlední řadě je nutné si uvědomit, že pomocí molekulárně biologických metod detekujeme v klinických vzorcích DNA živých i mrtvých borélií [5].

Závěr

Diagnostika lymeské boreliózy je velmi náročná a nese s sebou řadu problémů, které mohou značně ovlivnit výsledek PCR reakcí. Zcela zásadní je také načasování odběru biologického materiálu, jeho transport, respektive preanalytická fáze vyšetření.

Literatura

1. **Aguero-Rosenfeld, M. E., Wang, G., Schwartz, I., Wormser, G. P.** Diagnosis of Lyme borreliosis. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2005, 18, 3, p. 484–509.
2. **Bergmann, A. R., Schmidt, B. L., Derler, A. M., Aberer, E.** Importance of sample preparation for molecular diagnosis of Lyme borreliosis from urine. *J. Clin. Microbiol.*, 2002, 40, 12, p. 4581–4584.
3. **Bartůněk, P.** Lymeská borelióza. *Postgraduální medicína*, 2003, 5, 4, p. 378–385.
4. **Exner, M. M., Lewinski, M. A.** Isolation and detection of *Borrelia burgdorferi* DNA from cerebral spinal fluid, synovial fluid, blood, urine, and ticks using the Roche MagNA Pure system and real-time PCR. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 2003, 46, p. 235–240.
5. **Hengge, U. R., Tannapfel, A., Tyring, S. K., Erbel, R., Arendt, G., Ruzicka, T.** Lyme borreliosis. *Lancet Infect. Dis.*, 2003, 3, p. 489–500.
6. **Roháčová, H.** Lymeská borelióza – onemocnění již bez otázek? *Remedia*, 2004, 14, 1, p. 46–51.
7. **Schmidt, B. L.** PCR in laboratory diagnosis of human *Borrelia burgdorferi* infections. *Clin. Microbiol. Rev.*, 1997, 10, 1, p. 185–201.
8. **Schwaiger, M., Péter, O., Cassinotti, P.** Routine diagnosis of *Borrelia burgdorferi* (sensu lato) infections using a real-time PCR assay. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2001, 7, p. 461–469.
9. **Wilske, B.** Epidemiology and diagnosis of Lyme borreliosis. *Ann. Med.*, 2005, 37, 8, p. 568–579.
10. **Wilske, B., Fingerle, V., Schulte-Spechtel, U.** Microbiological and serological diagnosis of Lyme borreliosis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 2007, 49, p. 13–21.
11. Internetové stránky Lyme disease [online]. [2008-10-06]. Dostupné na [www: http://www.brown.edu/Courses/Bio_160/Projects2005/lyme_disease/organism.htm](http://www.brown.edu/Courses/Bio_160/Projects2005/lyme_disease/organism.htm).
12. Internetové stránky Dr. Hulínské [online]. [2008-10-15]. Dostupné na [www: http://hulinska.xf.cz](http://hulinska.xf.cz).
13. Infekce v České republice – EPIDAT [online]. [2008-10-15]. Dostupné na [www: http://www.szu.cz/data/infekce-v-cr](http://www.szu.cz/data/infekce-v-cr).

Do redakce došlo 18. 12. 2008.

Adresa pro korespondenci:
Mgr. Radka Bolehovská
Fakultní nemocnice Hradec Králové
Ústav klinické biochemie a diagnostiky
Sokolská 581
500 05 Hradec Králové
e-mail: bolehrad@fnhk.cz