

Diseminovaná borrelióza a její průkaz v laboratoři

Disseminated Lyme borreliosis and its laboratory diagnosis

Dagmar Hulínská, Jiří Votýpka, Jan Hořejší

Souhrn • Summary

Perzistující borrelióza přináší diagnostické i léčebné problémy, na které chceme v tomto příspěvku upozornit. Na základě našich vyšetření jsme prokázali pomocí přímých metod (PCR a elektronové mikroskopie) v období 2008–2010 výskyt borrelií v placentě pacientek, které měly v prvním trimestru erythema migrans a byly léčené penicilinem, dále v srdci u pacientů s myokarditidou a náhle vzniklou dilatační endomyokarditidou, v synovii a v synoviální tekutině pacientů s déle trvajících kloubními problémy.

Všichni pacienti byli posláni k našemu laboratornímu vyšetření lékaři, kteří se klinikou lymeské borreliózy (LB) zabývali. Pacienti měli symptomy, které lékaři uznali za možné pro LB. U některých pacientů s přímým průkazem byly pozitivní Western bloty ve třídě IgG proti borreliím až po opakované léčbě. V srdci, v placentě a v synoviu byly borreliie prokázány též elektronmikroskopicky. Někteří pacienti byli opakovaně léčeni vzhledem k opakovaně pozitivní PCR nebo séropozitivitě při opakovaných klinických symptomech v průběhu 3–4 let.

Persistent Lyme borreliosis is a diagnostic and therapeutic challenge to which we would like to draw attention. In 2008-2010, we detected the presence of Borrelia by direct methods (PCR assays and electron microscopy) in the placenta of patients who had been treated with penicillin for erythema migrans in trimester 1, in the heart of patients with myocarditis and fulminant endomyocarditis, and in the synovial fluid of patients with persistent joint complaints.

All these patients were referred to our laboratory by clinicians experienced in Lyme borreliosis (LB) because of the symptoms potentially suggestive of LB. Some patients only showed IgG Western blot positivity after repeated treatment. In the heart, placenta and synovial fluid, borreliae were also detected by electron microscopy. Some patients were treated repeatedly after presenting with re-emerging clinical symptoms and retesting PCR positive or seropositive over 3-4 years.

Zprávy EM (SZÚ, Praha) 2011; 20(1): 24–26.

Klíčová slova: real time PCR, *Borrelia*, placenta, srdce, synovium, protilátky, léčba

Keywords: real time PCR, *Borrelia*, placenta, heart, synovium, antibodies, treatment

V současné době se liší přístup lékařů k pacientům s lymeskou borreliózou v Evropě a v USA. Lze to též přisuzovat faktu, že v USA je pro lidi patogenní pouze jeden druh *B. burgdorferi* s.s., kdežto v Evropě jsou to nejméně čtyři patogenní druhy *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. valaisiana*, *B. burgdorferi*. Navíc např. druh *B. garinii* zahrnuje 5 OspA variant různé virulence, které jsou přenosné na člověka buď z ptáků a z šelem nebo OspA subtyp 4 z hlodavců. Druh *B. afzelii* převažuje u hlodavců, u ptáků nebyl nikdy prokázán. V Německu i u nás je ještě jeden druh, nedávno objevený, DN 127 později nazvaný jako *B. bissetii*, známý nejen z klíšťat [Derdáková a kol. 2002], ale i kultivačně z kůže a klíštěte [Hulínská a kol., 2007] a ze srdce pacientů s endomyokarditidou [Rudenko a kol., 2008]. Za hostitele tohoto druhu byla nedávno specifikována ovce.

Pro akutní borreliózu s příznakem erythema migrans (EM) jsou shodné názory v léčbě i diagnostice v Evropě, v USA a v Japonsku. Rozdíl byly hlášeny v četnosti těchto případů. V USA uvedli (CDCP) až 90 % projevů

EM po pokousání klíštětem, zatímco v Evropě 50–60 %. Klíště mnozí lidé ani nepoznají (larvy, nymfy) nebo si nepamatují a jejich prvním příznakem jsou bolesti kloubů, hlavy, šlach, sešlost, únava, třes, tachykardie, porucha vizu apod. To už může být fáze diseminování borrelií krví a lymfou po celém těle a jejich uschování ve vazivu různých orgánů [Hulínská a kol. 1999]. Rychlé šíření borrelií a jejich odolnost proti nepříznivým podmínkám, např. obalení fibrinogenem, plasminogenem, invaze do krevních destiček, tvorba cyst s jiným povrchem než má růstová fáze kmene *Borrelia*. Rychlý únik pomocí bičíků z krve s vysokým titrem protilátek a průnik, např. do kolagenu intimy okolo cév v srdci jsme prokázali experimentálně u myši [Pachner a kol., 1994]. Zásah borrelií bakteriocidními i bakteriostatickými ATB aplikovaný časné v akutní fázi borreliózy je úspěšný, ale v diseminované a pozdní fázi neurčitý.

Problémem je vznikající odolnost borrelií, podobně jako u jiných bakterií na antibiotika. Rezistence na peniciliny např. našeho kmene *B. garinii* OspA subtyp 5, který jsme izolovali z likvoru pacienta s encefalomeningitidou (kmen M192) byla již dříve prokázána [Janovská a kol. 2001].

VÝSLEDKY

Vzhledem k malému počtu vyšetřených tkání neuvádíme výsledky v procentech. V roce 2008 jsme vyšetřili 21 biopsií srdce, 11 placent, 67 vzorků synoviální tekutiny nebo synovia. V roce 2009 bylo vyšetřeno 46 biopsií srdce, 12 placent, 116 vzorků synoviální tekutiny. V roce 2010 bylo vyšetřeno 39 biopsií srdce, 6 placent, 72 vzorků synoviální tekutiny nebo synovia. Vzorky byly vyšetřeny pomocí PCR pro stanovení genomu a OspA plasmidu borrelií a zároveň byly části některých biopsií fixovány v 2,5 % glutaraldehydem v kakodylátovém pufru a zality do EPON 812 k získání ultrařezů pro pozorování v elektronové mikroskopii (ELM) nebo pro kultivaci v BSK-II mediu. Synoviální tekutina byla vyšetřena též v metodě negativního barvení v 1 % fosfomolybdenové kyselině.

Výsledky vyšetření biopsií srdce ukazuje graf 1. Nejvyšší počet pozitivních vzorků byl v r. 2009 tj. 16 vzorků z 29 pacientů s dilatační kardiomyopatií. Na výsledcích spolupracujeme s předními odborníky kardiologie I.LF UK a IKEM. Lékaři (doc. MUDr. Bartůněk, MUDr. Paleček, MUDr. Kuchyňka, MUDr. Kubánek) uvedli, že u řady pacientů se po léčbě antibiotiky stav rapidně zlepšil. U pěti pacientů s PCR pozitivní reakcí pro genom a plasmid byla prokázána borrelie elektronmikroskopicky a to v endomysiu a v kolagenu velké cévy a v jednom případě byly kultivovány.

Výsledky vyšetření PCR po porodu u žen s erythema migrans v prvním trimestru (graf 2) ukázalo pozitivní DNA borrelií v 5 placentách a to shodně v roce 2008 a 2009. Šest žen bylo pozitivních ve Western blotu ve třídě IgG před i po porodu. V žádném případě nebyla DNA v pupečnickové krvi a jen 2 novorozenci byli séropozitivní. Elektronmikroskopicky byly borrelie prokázány v kolagenu a v krevní cévě ve dvou vzorcích placenty a 2x byly borrelie kultivované. Histologicky byly v placentě zjištěny malé tromby, ale zánět byl minimální. Bohužel u řady pacientek přetrvávaly příznaky borreliózy a po porodu se znovu dlouhodobě léčily antibiotiky.

Vzorky synoviální tekutiny nebo synovia byly v roce 2008 více PCR pozitivní než v r. 2009 a 2010 jak ukazuje graf 3. V našem souboru pacientů s artritidou bylo více séropozitivních než bylo u těhotných žen s erytémem a u pacientů z kardiologie. Šest pacientů bylo opakovaně léčených. Dva pacienti byli vyšetřeni více než 4x a u jedné pacientky přestaly problémy až po totální endoprotéze kolenního kloubu.

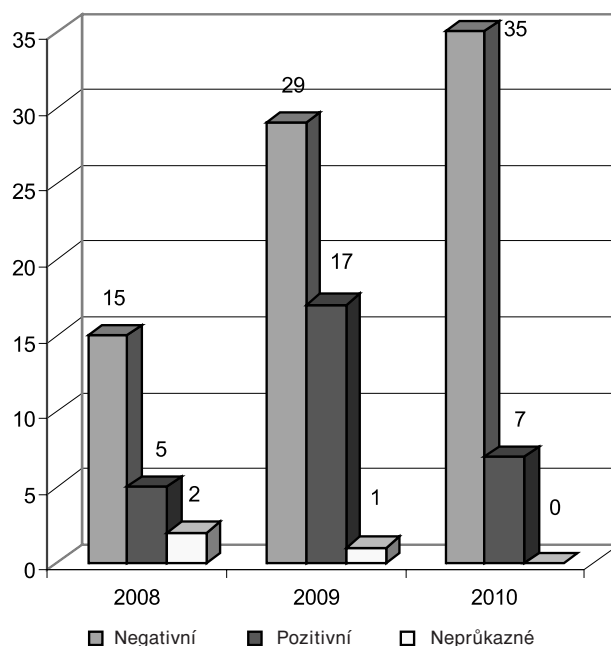
ZÁVĚRY

Příznaky např. pozdní artritidy, kardiomyopatie, encefalomyopatie jsou někdy považovány za post lyme syndrom a pacienti nejsou léčeni.

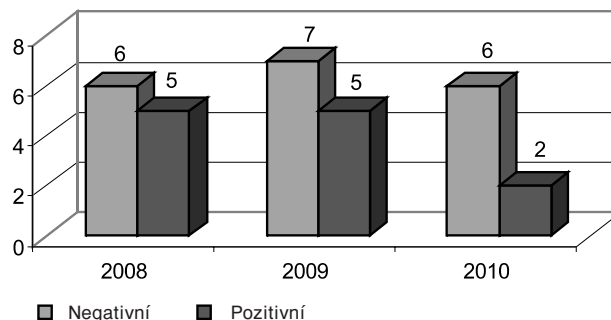
Pozitivní reakce přímých testů tj. PCR, elektronové mikroskopie, tkáňové kultury a kultivace jsou převážně v období bez léčby antibiotiky a v období, kdy je pacient séronegativní.

Zarážející je přímý průkaz a klinické potvrzení borreliózy u opakovaně léčených pacientů.

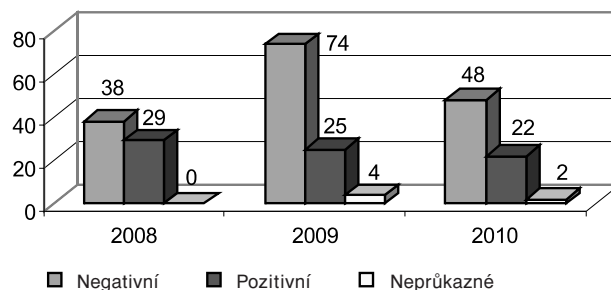
Graf 1: Počet negativních, pozitivních a neprůkazných vzorků srdce v letech 2008–2010



Graf 2: Počet negativních a pozitivních vzorků placenty v letech 2008–2010



Graf 3: Počet negativních, pozitivních a neprůkazných vzorků punktátu v letech 2008–2010



LITERATURA

- Derdáková M, Beati L, Peřko B, Stanko M, Fish D. Genetic variability within *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies established by PCR-single-strand conformation polymorphism analysis of the rrfA-rrlB integric spacer in *Ixodes ricinus* ticks from the Czech republic. *Appl Environ Microbiol* 2002; 69: 509-516.

- Hulínská D, Votýpka J, Kříž B, Holínková J, Nováková J, Hulínský V. : Phenotypic and genotypic analysis of *Borrelia* spp. isolated from *Ixodes ricinus* ticks by using electrophoretic chips and real-time polymerase chain reaction. *Folia Microbiol* 2007; 52: 315-324.
- Rudenko N, Golovchenko M, Mokráček A, Piskunová N, Růžek D, Mallatová N, Grubhoffer L. Detection of *Borrelia bissettii* in cardiac valve tissue of patient with endocarditis and aortic valve stenosis in the Czech republic. *J Clin Microbiol* 2008; 10: 3540-3543.
- Hulínská D, Votýpka J, Valešová M. Persistence of *Borrelia garinii* and *Borrelia afzelii* in patients with lyme arthritis. *Zent bl Bacteriol* 1999; 289: 301-318.
- Pachner AR, Delaney E, Hulínská D. Localization of *Borrelia burgdorferi* in murine lyme borreliosis by electron microscopy. *Am J Trop Med Hyg* 1995; 52: 128-133.
- Janovská D, Hulínská D, Godová T. Sensitivity of *Borrelia burgdorferi* strains isolated in the Czech Republic. *Cent Eur J Publ Health* 2001; 9: 38-40.

Dagmar Hulínská

Jiří Antonín Votýpka

Jan Hořejší

*Národní referenční laboratoř pro borreliózu
CLČ v OPVZ, Státní zdravotní ústav, Praha*