

Lymeská borrelióza – kultivace *Borrelia burgdorferi* sensu lato

Lyme disease - cultivation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato

Kateřina Kybicová, Alena Lukavsk, Pavla Balátová

Souhrn • Summary

Lymeská borrelióza (LB) je způsobena bakterií *Borrelia burgdorferi* s. l.; tento komplex obsahuje alespoň 21 genodruh. Pt druh borrelií m jiř prokázanou patogenitu a tří dalř byly alespoň jednou izolovány z lidských vzorků. V České republice se jedná o zvařný zdravotn problém, neboť ron je hlřeno více neř 4000 přpad onemocnění LB, mnoho dalřch vřak pravdpodobn nemá diagnostikováno. Dleřit pro průběh nemoci je i genodruh původce onemocnění, neboť rzn genodruhy mj odliřnou patogenitu a tknovou afinitu. Alternativn metodou přm diagnostiky LB je příkaz spirochet v lidských vzorcch kultivc ve specilnm tekutm mdiu. Tato metoda přstavuje „zlat standard“ pro potvrzen diagnzy LB. Pro svou nzkou senzitivitu, časovou i finann nronost se vřak metoda vyuřv převřn pro vzkumn ucely.

Lyme borreliosis (LB) is caused by the bacterium Borrelia burgdorferi s.l., with the s.l. complex consisting of at least 21 genospecies. Five species of Borrelia have already proven pathogenic and three other were isolated at least once from human samples. In the Czech Republic, LB is a serious health problem, with about 4,000 cases reported per year and probably many more cases remaining undiagnosed. The genospecies of the causative agent is significant since various genospecies may differ in pathogenicity and tissue affinity. An alternative to the direct diagnosis is the detection of live spirochetes from patients' samples by culturing them in a special liquid medium. This method is considered the gold standard for the confirmation of an LB diagnosis. However, it has low sensitivity and is time-consuming and expensive, so it is mostly used only for research purposes.

Zprvy CEM (SZ, Praha) 2018; 27(5): 113–115

Klov slova: *Borrelia burgdorferi* sensu lato; erythema migrans; lymesk borrelióza; PCR; kultivace; MKP a BSK-H medium; srologie; sekvenace

Keywords: *Borrelia burgdorferi* sensu lato; erythema migrans; lyme borreliosis; PCR; cultivation; MKP and BSK-H medium, serology; sequencing

VOD

Lymeská borrelióza (LB) je nejastji se vyskytujcm onemocnnm přenřenm vektory na uzem evropskho kontinentu. Pvodcem jsou gramnegativn spirlovit mikroaerofilní bakterie s nepravidelnými zvty – *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Na zklad analýzy molekulrn biologických vlastností je tento komplexn členěn v nejméně 21 genodruh. Jednotliv druhy borrelií se liř svou antigenn výbavou a afinitou k rznm tkáním. V České republice byla dosud diagnostikována onemocnění zpsoben druhy *B. burgdorferi* sensu stricto (kloubní a nervov systém), *B. afzelii* (kořn manifestace), *B. garinii* (neurologick projevy), *B. bissetii* a *B. valaisiana*.

Tato bakterie m dlouh spirlovit vinut tělo o délce 4–30 μm a přmru 0,2–0,5 μm . Na obou koncích těla vyrstj bičíky, kter ovj tělo borrelie mezi vnitřn a vnjř membránou a umořuj pohyb rychlostí ař 2 mm za minutu. Borrelie tak mohou voln procházet epitelem, i hema-toencefalickou bariérou chránící mozek. Přestože jsou přmrn extracelulárními patogeny, mohou vstupovat do buněk hostitele a přezvat v nich. Rozmnořj se relativn

pomalu, přnm nebo podlnm dlenm, zhruba kařdch 12–18 hodin.

EPIDEMIOLOGIE

LB je zoonza s přrodn ohniskovostí, rezervoáry jsou střdn velcí a mal savci, plazi a ptáci.člověk je pouze nhodnm hostitelem. Vektorem je v mrnm pásu klřt obecn (*Ixodes ricinus*), zdrojem infekce mohou být dvě stádia (nymfa, dospělec) – transstadiln přens patogena. O mořnost přensu nákazy komáry, roztoči, blechami nebo ovdy se diskutuje, nebyl vřak doposud dokázán. Vhodným biotopem pro klřtata jsou vlhk lesy a louky s nízkými křovisky, vlivem oteplování se v současn době mohou pohybovat ve vřkch ař okolo 1200 m.n.m. Optimln je teplota okolo 20 °C a vlhkost 80 %. V přírodě se přpokld vývoj jedné generace na 2 roky ař 5 let. Vhodným prostorem pro život nkařench klřtat jsou i mstsk parky a lesoparky.

KLINICK PROJEVY

Klinick projevy Lymeská borreliózy se dělí do tří stádií: asn lokalizovan, asn diseminovan a pozdn. asn stádiím pozorujeme v prvních týdnech ař měsících po nákaze, pozdn stádiím probíhá měsíce ař roky po infekci. Bakterie mj afinitu k tkáním a pořkozuj hlavn centřln a perifern nervov systém, klouby, myokard, kosterní svalstvo, nkter struktury oka a kře.

Pro kořn projevy je charakteristick, že se mohou vyskytovat ve vřech třech stádiích nemoci, mohou být dále komplikovány mimokořnmi manifestacemi – neurobor-

reliózou, myokarditidou, artritidou, myalgií, dysrytmiemi, keratitidou atd.

V České republice bylo v roce 2017 hlášeno 3939 případů osob, které onemocněly LB v jakékoliv formě. Incidence hlášených případů má v posledních letech setrvalý trend s lehkými meziročními výkyvy. Největší počet hlášených případů připadá na 26. až 31. týden v roce, což je způsobeno dlouhou inkubační dobou. Infekcí jsou nejvíce ohroženy děti ve věku 5 až 9 let a dospělí nad 55 let věku. Nejvyšší počet infekcí byl hlášen podle programu EpiDat v kraji Vysočina, dále pak v kraji Jihočeském, Libereckém, Olomouckém a Zlínském.

DIAGNOSTIKA

Nepřímá diagnostika LB je založena na průkazu časných (IgM) a pozdních (IgG) imunoglobulinů (protilátek). Povrchové antigeny přítomné v zevní membráně nazýváme OspA – outer surface protein, dále se označují písmeny A–F. OspA protein je exprimován u borrelie v nenasátem klíštěti, po přísátí na hostitele jeho tvorba vlivem změny pH a teploty ustává a bakterie začne exprimovat OspC protein. Tohoto lze využít v diagnostice. Časné protilátky proti OspC a dalším proteinům se tvoří nejčastěji 3. až 6. týden od přísátí klíštěte, poté jejich hladina v krvi většinou klesá. U řady nemocných s LB nejsou však IgM protilátky prokazatelné. Významným lipoproteinem je také VlsE, vysoce specifický antigen indukující pozdní infekci. IgG protilátky se tvoří přibližně v 6. až 10. týdnu od přísátí klíštěte a mohou přetrvávat i řadu let po infekci. V současné době lze k průkazu protilátek použít metody: nepřímá imunofluorescence (IFA), enzymová imunoanalýza (ELISA, EIA), Imunoblot – Western Blot (WB), případně Micro-Blot Array (MBA). Jednou z nutných podmínek pro stanovení diagnózy neuroborreliózy je průkaz intratékální syntézy borreliových protilátek.

Přímá diagnostika LB spočívá v přímém průkazu borrelií metodami mikroskopickými, histologickými či kulturačními nebo v průkazu nukleových kyselin (DNA) molekulárními metodami. Metody mikroskopické a histologické jsou pouze doplňkové, nejsou standardizovány a jsou spíše používány pro výzkumné účely.

Obrázek 1: Kultura – *Borrelia afzelii* z klíštěte 2010, nativní preparát, mikroskopie v temném poli (zvětšení 400x)



KULTIVACE

Kultivace borrelií je časově a finančně náročná metoda. Využívá se pro výzkumné účely, nikoli pro rutinní diagnostiku. Borrelie jsou nutričně náročné a kultivují se ve speciálních tekutých médiích (MKP, BSK-H) v mikroaerofilních podmínkách při teplotě 34 °C. Úspěšná kultivace může trvat 4 až 12 týdnů, neboť borrelie mají dlouhou generační dobu (7 až 20 hodin). BSK-H médium podporuje rychlý počáteční růst, ale pak následuje deformace buněk a smrt. MKP médium se jeví výhodnější z hlediska úspěšnosti míry izolace, morfologie a pohyblivosti buněk [14]. Tato zjištění byla pozorována i v naší laboratoři. Porovnání úspěšnosti izolace borrelií z kožních biopsií, se ukazuje lepší v MKP (43,4 %) oproti BSK-H (25,1 %). Druhové zastoupení v MKP a BSK-H médiu: pro *Borrelia afzelii* 89,8 % a 86,3 %, pro *Borrelia garinii* 9,2 % a 11,8 %, pro *Borrelia burgdorferi sensu stricto* 1,0 % a 1,9 %. Vizualizace kultury během růstu se provádí mikroskopicky v temném poli a rovněž se úspěšnost kultivace kontroluje pomocí PCR. Vhodným materiálem pro kultivaci jsou biopsie tkání i tělní tekutiny jako synoviální tekutina, mozkomíšni mok a krev. Materiál pro kultivaci je nutné do laboratoře dopravit co nejdříve, nejlépe do 24 hodin při teplotě 2 až 8 °C. Vzorek biopsie je třeba transportovat ve zkumavce na suchu.

Barbour AG ve své knize „Lyme disease“ uvádí, že ze všech dostupných vyšetření na diagnostiku LB je nejvhodnější kultivace borrelií v tělních tekutinách a tkáních. Uvádí, že izolace borrelií je „zlatým standardem“, podle kterého jsou jiné testy posuzovány. S výjimkou typického projevu erythema migrans (EM), diagnóza ostatních projevů borreliové infekce vyžaduje laboratorní confirmaci. U většiny pacientů v počátečním stadiu onemocnění mohou být borrelie vykultivovány ze vzorku kožní biopsie odebrané z místa erytému. Biopsie může být provedena během několika minut v lékařské ordinaci. Alternativní vzorek na kultivaci je vzorek plné krve odebraný během časné infekce, tj. během dvou až třech týdnů od nákazy. Výsledek kultivace je nejpravděpodobnější ve stadiu diseminace doprovázené teplotou a hematogenním rozsevem. Úspěšnost

Obrázek 2: Kultura – *Borrelia afzelii* z kožní biopsie Erythema migrans 2017, nativní preparát, mikroskopie v temném poli (zvětšení 400x)



kultivace biopsií nebo krve je za těchto podmínek 50 % nebo vyšší. Jakmile se borrelie dostane z krve do tkáně, zřídka kdy se dostane opět do krve. S výjimkou klinické formy acrodermatitis chronica atrophicans (ACA), kde spirochety mohou být přítomny měsíce až roky, je izolace spirochét ze vzorku kůže mizivá. Po léčbě antibiotiky je už kultivace obtížná.

Během roku 2016 a 2017 jsme v Národní referenční laboratoři pro lymeskou borreliózu (NRL LB) vykultivovali borrelie ze třech klinických vzorků (2 vzorky likvoru, 1 vzorek kožní biopsie). Ve vzorcích likvoru byla přítomna *Borrelie garinii* (kultivace v BSK-H mediu), ve vzorku kožní biopsie *Borrelia afzelii*. U jednoho vzorku likvoru byly přítomny kontaminanty kůže (*Staphylococcus hominis*), prostředí či pomůcek (*Cupriavidus metallidurans*). Borrelie z této kultivační směsi se nepodařilo ani za pomoci cílených antibiotik vyizolovat. U vzorku kožní biopsie se jako kontaminant prostředí vyskytovalo *Microbacterium ginsengisoli*. Borrelie se z tohoto vzorku podařilo vyizolovat. Třetí vzorek likvoru byl čistý.

LITERATURA

1. Bartůněk P. Lymeská borrelióza. 3. vydání, Praha, Grada Publishing 2006.
2. Beneš J. Infekční lékařství, Lymeská borrelióza. 1. vydání, Praha, Galén 2009: 289–292.
3. Votava M. Lékařská mikrobiologie speciální. 2. vydání, Brno, Neptun 2006.
4. Státní zdravotní ústav ČR, www.szu.cz (Kříž B., 2017).
5. Boštíková V, Salavec M, Šplího M, *et al.* Lymeská borrelióza – významný problém nejen v České republice. *Vakcinologie* 2014; 8(1): 11–19.
6. Dlouhý P, Honegr K, Krbková L, *et al.* Lymeská borrelióza doporučený postup v diagnostice, léčbě a prevenci. *Klinická mikrobiologie a infekční lékařství* 2011; 17(4): 144–149.
7. Krbková L, Náterová Z, Erythema migrans. *Klinická mikrobiologie a infekční lékařství* 2012; 18(6): 172–179.
8. Prokeš Z. Lymeská borrelióza, *Dermatol. praxi* 2015; 9(1): 36–39.
9. Valešová M. Lymeská artritida, Praha, Grada Publishing 1999.
10. Samuels DS and Radolf JD. Borrelia: Molecular Biology, Host Interaction and Pathogenesis. The University of Montana, Missoula, USA and University of Connecticut Health Center, Farmington, USA, Caister Academic Press 2010.
11. Auwaeter PG. Lyme disease and other infections transmitted by *Ixodes scapularis*. Philadelphia, USA, Elsevier 2015.
12. Gray J. Lyme borreliosis: biology, epidemiology and control. Wallingford, UK, CABI Publishing 2002.
13. Barbour AG. Lyme disease. Baltimore, USA, Johns Hopkins University Press 2015, p.315.
14. RuzĐić-Sabljić E, Maraspin V, Stupica D, Rojko T, *et al.* Comparison of MKP and BSK-H media for the cultivation and isolation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *PLOS ONE* February 7, 2017, p.1–11. 2.
15. RuzĐić-Sabljić E, Maraspin V, Cimperman J, Strle F, *et al.* Comparison of isolation rate of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in two different culture media, MKP and BSK-H. *Clinical Microbiology and Infection*. 2014; 20(7): 636 – 641.

Kateřina Kybicová
Alena Lukavská
Pavla Balátová
NRL pro Lymeskou borreliózu
CEM-SZÚ