

### Lymeská borelióza – onemocnění pro multidisciplinární diagnostiku

Lymeská borelióza, nazývaná též lymeská nemoc, představuje relativně nový globální zdravotní problém. V současné době je nejčastějším onemocněním přenášeným klíšťaty v Evropě a v Severní Americe.

První zmínku o lymeské borelióze učinil dermatolog Buchwald, který publikoval popis acrodermatitis chronica atrophicans. Po několika letech byly popsány další kožní projevy (lymfocytom a erythema migrans). K počtě A. Borrelovi byl nový rod bakterií v roce 1907 pojmenován mikrobiologem Swellengrebelem *Borrelia*. Po morfologickém srovnání s treponemami a leptospirami byl rod *Borrelia* zařazen do řádu Spirochaetales. V následujících desetiletích byly popisovány další klinické příznaky a publikována řada teorií a názorů o příčinných souvislostech tohoto multisystémového onemocnění. V 80. letech minulého století zkoumal Steere et al. zánětlivé arthropatie epidemického rázu u 39 dětí a 12 dospělých pacientů poblíž městečka Lyme (Connecticut). Většina dětí trpěla „juvenilní artritidou“ spojenou s erytémem. Vědcům neunikla skutečnost, že oblast je typická rozšířením klíšťat *Ixodes dammini* (nyní *Ixodes scapularis*).

V roce 1982 Willy Burgdorfer a jeho kolegové izolovali bakterii z rodu *Borrelia*, která byla brzy pojmenována po svém objeviteli *Borrelia burgdorferi*. Zlomovým okamžikem pro diagnostiku patogenních borélií bylo setkání CDC/ASPHLD (Centre for Disease Control/Association of state public health laboratory directors) v roce 1995 v Michiganu, kde byl dohodnut dvoufázový protokol k diagnostice a stanovena klinická a laboratorní kritéria pro Lymeskou nemoc.

Původcem lymeské boreliózy je mikroaerofilní, gramnegativní spirocheta *Borrelia burgdorferi* sensu lato, která byla na základě řady studií postupně taxonomicky rozdělena na tři klinicky nejvýznamnější druhy: *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* a *Borrelia afzelii*. Tři zmíněné druhy borélií jsou nejčastěji spojovány s typickými klinickými příznaky. *B. burgdorferi* sensu stricto s mono- i polyartritidami, srdečními poruchami a kožními projevy, *B. afzelii* je prakticky jedinou příčinou acrodermatitis chronica atrophicans a mezi dominantní projevy *B. garinii* patří především neuroborelióza – toto rozdělení není striktní, ale je velmi časté. V současnosti je již určeno, především na základě molekulárních biologických metod, více než 30 genetických druhů borélií, ale ve vztahu k onemocnění jsou nejvýznamnější uvedené tři druhy.

Vzhledem ke skutečnosti, že neléčená borelióza může vést k již popsaným komplikacím, je nezbytná včasná a kvalitní diagnostika klinická i laboratorní. Vysoká incidence, obtížná diagnostika, často nedostatečný léčebný efekt a v neposlední řadě i závažné komplikace a důsledky lymeské boreliózy učinily z této – u nás velmi rozšířené zoonózy – významnou nozologickou jednotku.

Vlastní původce – borélie – je bakterie velmi zajímavá. Vyznačuje se vysokými kultivačními nároky, dlouhým generačním časem a složitou strukturou bakteriálního těla, které je spirálovitého tvaru, o délce 10–30  $\mu\text{m}$  a šířce obvykle 0,2  $\mu\text{m}$ , s tupými až zašpičatělými konci. Na povrchu spirochety je S-vrstva (surface) bez charakteristické struktury, která přiléhá na vnější membránu tvořenou třemi vrstvami. Membrána obklopuje periplazmatický prostor, v němž se nachází 7–9 zatažitelných bičíků a protoplazmatický válec. Bičíky umožňují borélii pohyb, jsou upevněny do bazálních disků a procházejí pod vnější buněčnou stěnou, dávají také borélii spirální tvar. Intaktní spirocheta má jen málo volných, praceschopných bičíků vně buňky. Pokud ji však podrobíme působení TRIS pufru, respektive změně pH, zvýšené koncentraci lysozymu, ale také komplementu nebo antibiotik, množství volných bičíků se zvyšuje. Po určité době v nepříznivém prostředí začnou bičíky tvořit shluky a nakonec jsou odvrženy včetně antigenních epitopů na svém povrchu. Borélie tedy vytváří antigenní mimikry a jde zde o zcela zřejmou schopnost unikat působení imunitního systému. Tělesnou teplotou hostitele a podobnými faktory jsou rovněž ovlivňovány antigenní epitopy exprimované na povrchu bakterie.

Velká pružnost membrán umožňuje borélii – kromě aktivního pohybu – také tvorbu cyst a vylučování membránových vezikulů a „pupenů“ (blebs), které bakterie tvoří ze stejných složek jako buněčnou stěnu a které jsou rovněž vybaveny plazmidy. Pro virulenci borélií jsou významné vnější povrchové proteiny buněčné stěny (Osp – outer-surface protein), které umožňují bakterii atakovat savčí buňky a bičíkové proteiny, které zprostředkují šíření pohyblivých borélií v hostitelském organismu. Plazmidy nesou geny hlavních Osp proteinů, a pomáhají tak spirochetě adaptovat se a přežít ve značně odlišných podmínkách, v klíštěti při teplotě zevního prostředí a v teplokrevném savčím těle.

*Borrelia burgdorferi*, podobně jako jiné patogenní bakterie, disponuje širokým repertoárem adaptivních molekulárních odpovědí na signály zevního prostředí, který jí pomáhá přežít v různých podmínkách a úspěšně atakovat hostitele. Lze například pozorovat rozdílnou syntézu membránových proteinů během pobytu v klíštěti a v savci.

Důležitou biologickou vlastností *Borrelia burgdorferi* a patrně i jedním z důvodů problematické laboratorní i klinické diagnostiky je tvorba cystických forem. Různé atypické formy se vyskytují u četných bakteriálních druhů (L-formy) a vznikají částečným nebo kompletním narušením či odstraněním buněčné stěny či inhibicí syntézy jejích proteinů. *Borrelia burgdorferi* není schopna syntetizovat mastné kyseliny de novo, a proto je nucena je využívat z krevního séra, které je jejich významným zdrojem. V chudém médiu (bez séra) se bakteriální buňky z 90 % asi do 48 hodin transformují

do podoby nepohyblivých cystických forem. Cysty borélií byly nalezeny rovněž v krevní plazmě, likvoru, synoviální tekutině a dalších tkáních lidských a zvířecích těl. Jsou-li pohyblivé metabolicky aktivní borélie přeneseny do destilované vody, 95 % se jich do 15 minut transformuje v cysty, za 4 hodiny již nejsou vegetativní formy prakticky pozorovány. Boréliová cysta je patrně dormantní stadium, chráníci bakterii před působením nepříznivých vlivů zevního prostředí, nicméně si zachovává určitou metabolickou aktivitu, dokonce i v prostředí bez séra. Důkazem je zachovaná schopnost inkorporace S-methioninu a dalších aminokyselin do cyst. Zpětná konverze cyst v plně vybavenou spirální bakterii záleží na složení kultivačního média, stáří cyst a dalších faktorech. Suspenze cyst různého stáří zůstává infekční a indukuje onemocnění in vivo na modelu intraperitoneálně infikované myši.

Experimentálně již bylo zjištěno, že po transformaci v cystické formy získávají borélie defekt buněčné stěny, který vede k rezistenci na beta-laktamová antibiotika. Bylo též prokázáno, že významným induktorem cystických forem je Penicilin G.

Autoři, zabývající se problematikou tvorby cyst, uvádějí závislost tvorby na teplotě, délce inkubace a koncentraci testovaného léčiva *in vitro*. Lze předpokládat, že tvorba cyst je jedním z významných mechanismů, kterým borélie unikají imunitnímu systému hostitele, ale také významně ztěžují laboratorní diagnostiku. Imunohistochemické studie ukazují, že cystické formy borélií neexprimují některé antigeny na svém povrchu, což patrně vede k nepřítomnosti protilátek. Cystické formy syntetizují přibližně 20 proteinů a řada z nich si naopak zachovává antigenicitu. Z výše uvedených poznatků vyplývá, že cystické formy nejsou pouze pasivní spící stadium, ale představují stav nízkometabolické aktivity borélií. Schopnost konverze spirochet v cystické formy a zpět poskytuje borélii omezený, nicméně významný potenciál pro přežití nevhodných podmínek prostředí, patrně dokonce i pro přežití terapie hostitelského makroorganismu antibiotiky.

Dalším významným aspektem, který ztěžuje přesnou diagnostiku Lymeské nemoci, je fakt, že přísátí klíštěte si vybavuje pouze třetina pacientů (ovšem larvální stadia jsou miniaturní), erythema migrans nacházíme u méně než poloviny pacientů a u jedinců s tmavou pleťí jej lze dokonce přehlédnout. V Evropě je popisována mírnější reakce v místě zákusu klíštěte a také další symptomy počátku onemocnění jsou podle autorů četných studií mírnější než v USA, kde je v této fázi uváděn obvyklý flu-like syndrom. Takové rozdíly jsou patrně způsobeny různými vektory a druhy borélií.

Sérologické testování borélií je mnohem problematictější v Evropě než v Americe, neboť infekci v Evropě vyvolávají minimálně tři druhy borélií, zatímco v Americe jeden. Zajímavé rovněž je, že protilátková odpověď je v Evropě omezenější, protože zdejší populace je více „promořena“ nespecifickými boréliovými antigeny a subklinická infekce je v Evropě častější, což je navíc významný faktor komplikující diagnostiku.

Lymeská borelióza postihuje všechny věkové skupiny se vzestupem po 30. roce a vrcholem mezi 45. a 55. rokem života. Častěji je onemocnění diagnos-

tikováno u žen než u mužů, v poměru 1,7 : 1. Vnímavost k nákaze je všeobecná, postihuje i děti s maximem mezi 5.–15. rokem věku a s incidencí 140 na 100 000 obyvatel. Jsou pozorovány reinfekce, asymptomatické infekce a také relativně časté relapsy onemocnění.

Diagnostika lymeské boreliózy je založena na rozlišení charakteristických klinických příznaků, znalosti anamnézy (klíště, pohyb v terénu ...) a na výsledcích laboratorních testů. Laboratorní diagnostika borélií využívá pestrou paletu metod přímého i nepřímého průkazu. Mezi rutinně využívané laboratorní testy k průkazu protilátek – především z krevního séra, ale také z likvoru a synoviální tekutiny – patří imunoenzymatické metody (EIA, ELISA), imunofluorescence a také různé modifikace imunoblottu. Mezinárodní standardy doporučují pro screening soupravy se senzitivitou vyšší než 95% a v případě pozitivní konfirmaci průkazu protilátek další metodou. Toto doporučení je jinými autory považováno za poněkud problematické, neboť antigenní výbava diagnostických souprav od různých výrobců se může lišit a v takovém případě je spíše vhodnější metody vzájemně doplňovat. Především v Evropě je použití jediného antigenu nebo jejich úzkého spektra v testu velmi problematické, protože původci jsou minimálně tři, a je proto doporučováno vycházet při výrobě z endemických druhů v dané oblasti.

Pro diagnózu infekčních onemocnění je tzv. zlatým standardem izolace původce v čisté kultuře, ovšem kultivace borélií vyžaduje náročné vysoce obohacené půdy, které jsou saturovány králičím nebo koňským sérem prostým protilátek omezujících růst borélií. Kultivace je rovněž časově velmi náročná, neboť generační čas borélií může představovat i desítky hodin a také záchytnost z biologického materiálu (krevní plazma, bioptické kožní vzorky, likvor atd.) je proměnlivá a nedosahuje v nejlepších případech ani 50 %. V průběhu času byly pro diagnostiku borélií zkoušeny různé metody, např. histologické barvení, imunohistochemický průkaz, bakteriologické barvení, elektronová mikroskopie apod. Ovšem pro pozitivní průkaz je vždy nutná přítomnost dostatečného počtu bakterií ve vzorku. Vzhledem ke složitosti popsané laboratorní diagnostiky se jako velmi výhodné ukazují molekulární biologické metody, především polymerázová řetězová reakce (PCR). PCR byla poprvé použita k detekci cílového chromozomového genu *Borrelia burgdorferi* asociovaného s proteinem p66 v roce 1989.

Laboratorní diagnostika lymeské nemoci není jednoduchá a je vhodné vždy kombinovat různé diagnostické metody (např. přímý průkaz agens, respektive DNA, s některou ze sérologických metod). Naprosto nutná je úzká spolupráce různých typů laboratoří navzájem a s klinickými pracovišti, což umožní lépe diagnostikovat tak komplikované onemocnění, jakým lymeská borelióza nepochybně je.

MVDr. Zuzana Čermáková, Ph.D.

Ústav klinické mikrobiologie LF UK a FN  
Sokolská ul. 581, 500 05 Hradec Králové

e-mail: cermakovaz@fnhk.cz

ÚVZÚ Praha, Centrum biogické ochrany Těchotín