Průkaz specifické deoxyribonukleové kyseliny v diagnostice lymeské borreliózy

Hulínská D.,Votýpka J.,

Serologický průkaz

Diagnostika původce lymeské borreliózy (LB)je od popsání této nemoci a identifikace jejího původce *Borrelia burgdorferi* (BB) postavena na průkazu specifických protilátek metodou (ELISA) a protilátek pomocí imunoblotu (Westernblot).Obě zmíněné metody jsou v naší laboratoři akreditovány.Serologické metody jsou velmi přesné, standardizovány, obecně přijaté a nejčastěji využívané při průkazu LB.Výhodou metod je vysoká specifičnost, a možnost poměrného kvantitativního stanovení protilátek.Ze zasílaného materiálu je pozitivita nalezena v 14-50 % u Elisy a v 23-26 % u imunoblotu. Vlastní průkaz protilátek však není průkazem akutního onemocnění, velmi často potvrzuje kontakt s původcem onemocnění nebo prodělané onemocnění.V tomto směru bývá u některých metod problémem nalézt zcela negativní vzorky. Význam serologických metod může být ovlivněn i stále se více vyskytujícími imunodeficientní stavy vyšetřovaných pacientů a měnící se antigenní skladbou genomospeciés BB.Popsání jednotlivých serotypů , více i méně patogenních , vnáší další problémy do serologické diagnostiky.Problémem je i odlišnost antigenů v jednotlivých oblastech a odlišnost „divokých“ a sbírkových-kultivovaných kmenů používaných pro přípravu antigenů diagnostických souprav. Zde může docházet k rozdílům ve výsledcích laboratoří , které používají diagnostické soupravy od různých výrobců.Výsledek by měl být vždy doprovázen sdělením, který ,místní, nebo sbírkový kmen byl použit i kdy a kde byl kmen izolován.Využití monoklonálních látek vznáší do diagnostiky další proměnné, a nemůže odrážet měnící se antigenní vybavení , která způsobuje v určitém regiónu onemocnění .

Kultivace a mikroskopický průkaz.

Přímý průkaz BB je možný pomocí kultivace v BSK mediu, mikroskopií v zástinu a pomocí imunofluorescence, imunoelektronopticky .Kultivace původce nemoci je obtížná při izolacích z tělních tekutin,úspěšnější je z tkání. Nejlepším zdrojem pro kultivaci borrelií (BB) jsou infikovaná klíšťata, která obsahují desetitisíce spirochét. Optická mikroskopie v zástinu, případně doplněná imunofluorescencí, se uplatňuje jen při vyšetřování vzorků s větší koncentrací borrelií. Výtěžnější je již kombinace elektronové mikroskopie s koncentrací vzorků pomocí centrifuagace a imunosorbce doplněné negativním barvením.Tato dnes akreditovaná metoda dokáže již průkaz těl borrelií,určení druhu,identifikaci části těl borrelií (flagella) nebo „pobytové stopy" přítomnosti borrelií ve formě cyst.Dlouhodobá výtěžnost metody je od 2 do 7 % ze zaslaného materiálu.

Průkaz deoxyribonukleové kyseliny *Borrelia burgdorferi*

Brzy po zavedení polymerázové řetězové reakce(PCR,1988) ,ale i velmi záhy po popsání původce lymeské borreliózy (1982) zkoušela naše laboratoř v retrospektivní studii možnost přímého průkazu DNA v tkáňových tekutinách a ve tkáních.Pro nedostupnost komerčních setů pro průkaz borreliové DNA museli jsme vyzkoušet řadu metodik i materiálů.Do začátku roku 1996 jsme vyzkoušeli postup pro izolaci DNA,vybrali sety primerů – specifických sekvencí z DNA chromozómu Borrelia burgdorferi.Vyzkoušeli variace termálních programů pro cyklery, zavedli kontrolu citlivosti reakce. Od téhož data jsme zavedli paralelní vyšetření materiálu zasílaného na vyšetření serologické a elektronoptické s využitím evidence vzorků a výsledků vyšetření pomocí programu EPI INFO. Časem jsme definovali podmínky pro správný odběr i zacházení s vyšetřovaným materiálem i způsob hodnocení získaných výsledků.Potěšilo nás,když jsme později zjistili,že tato naše závěry jsou v souhlase s publikovanými pracemi předních zahraničních pracovišť v problematice laboratorní

diagnostiky lymeské borreliózy.Od roku 1996 jsme vyšetřili pomocí PCR 18690 vzorků tělních tekutin a tkání.(Viz tabulka č.1)

Tabulka č,1: Počty vyšetřeného materiálu v letech 1996-2003

Rok vyšetření	Počet vyšetřených Vzorků PCR
1996	143
1997	1592
1998	2446
1999	3355
2000	2839
2001	2548
2002	2581
2003	3186
Celkem	**18690**

O vyšetření metodou PCR zájem narůstal tak, že od roku 2000 bylo nutné každý rok omezovat počet vyšetření.Vedli nás k tomu jak pohnutky ekonomické i technické i výzkumný záměr.Omezili jsme především počty vyšetřené krve.Zájem nás vedl k přednostnímu vyšetření mozkomíšního moku, výpotků a tkání.Výběr sekvence DNA z genomu bakterie má rozhodující význam pro specifičnost a citlivost reakce PCR Při srovnání primerů jsme měli možnost vyzkoušet primery odvozené z genů genomové i plasmidové DNA. Kriteriem pro výběr byla genetická stabilita vybrané sekvence, specifičnost a dostatečná citlivost i při jednokrokové PCR. (Viz tabulka č.2)

Tabulka č.2: Zkoušené primery pro průkaz DNA *Borrelia burgdorferi s.lato*

Označení primeru	Druh PCR	Autor a rok publikace	Z čeho je primer odvozen
bb	Jednokrokové,i nested	Rosa,P.A.,1991	Klonovany fragment genomu
cc	Jednokrokové i nested	Rosa,P.A.,1991	Klonovaný fragment genomu
bb-cc	Nested	Melchers,W.,1991	Klonovaný fragment genomu
LD	Jednokrokové, a sonda	Marconi,R.T.,1992	16S rRNA genom
BB	Jednokrokové, a sonda	Marconi,R.T.,1992	16S rRNA genom

BG	Jednokrokové, a sonda	Marconi,R.T.,1992	16S rRNA genom
VS	Jednokrokové, a sonda	Marconi,R.T.,1992	16S rRNA genom
WK1,WK2	Jednokrokové, a sonda	Kru"ger,W.H.,1991	Flagellin gen
F1,F2	Jednokrokové, a sonda	Lebech,A.M.,1991	Flagellin gen
P 41	Jednokrokové, a sonda	Luft,B.J.,1992	Gen P41 antigenu flagellin
OSPB	Jednokrokové. a sonda	Luft,B.J.1992	Gen P41 antigenu flagellin
16 S	Jednokrokové, a sonda	Luft.B.J.,1992	Gen 16S rRNA
BBUTP-BBURT	Jednokrokové, a sonda	Adam,T.,1992	Gen 16S rRNA
OSPA	Nested	Luft.B.J.1995	Plasmidová DNA OSPA gen
OSPA L5,R5	Jednokroková, a sonda	Manak,M.M.,1997	Plasmidová DNA, OSPA gen

Specifičnost primerů používaných pro identifikaci původce lymeské borreliózy nemusí být vždy jednoznačná jak jsme si ověřili testováním používaných primerů s DNA z narostlé kultury sbírkových kmenů různých bakterií.(viz tabulka 3)

Tabulka 3.: Specifita primerů používaných pro identifikaci DNA *Borrelia burgdorferi sensu lato* .Srovnání s DNA některých sbírkových mikroorganismů.

I Z O L O V A N Á D N A		**Pozitivita primerů při uvedené teplotě anilingu)****					
Sbírkový mikrooragnismus	**Označení kmene)***	**LD 47**	**LD 57**	**OSPA 57**	**VS 47**	**BG 47**	**bb.cc 37/55**
Bacillus cereus	Bc 8/78	-	-	-	-	-	-
Corynebacterium murium	Cor 35/70	-	-	-	-	-	-
Enterobacter aerogens	Ae 1/43	-	-	-	-	-	+
Escherichia coli	EcK 141/59	+	-	-	-	-	+
Klebsiella ozaenae	Klo 1/35	+	+-	+-	-	-	-
Micrococcus luteus	M 8/58	-	-	-	-	-	+-
Proteus hauseri	PrK 4/57	-	-	-	-	-	+
Proteus morganii	Prm 1/37	-	-	-	-	-	+
Proteus mirabilis	Prmi 26/77	-	-	-	-	-	+
Pseudomonas aeruginosa	Ps 37/65	+-	-	-	-	-	+
Serratia marcescens	Sr 20/61	+-	-	-	+	-	-
Staphylococcus aureus	Mau 1/45	-	-	-	-	-	+

Yersinia enterocolitica	Y 1/64	-	-	-	-	-	-
Candida albicans	55/79	-	-	-	-	-	-
Borrelia burgdorferi s.s.	B 31)x	++	++	++	-	-	++
Borrelia garinii	M192) x	++	++	-	-	++	++
Borrelia afzelii	Kc90)x	++	++	-	++	+-	++

)* CNCTC –Czechoslovak National Collection of Type Cultures,SZÚ Praha

)x Národní referenční laboratoř pro lymeskou borreliózu ,CEM,SZÚ Praha

)** Uveden název primeru a teplota annealing ,druhého kroku polymerázové řetězové reakce

Ze získaných výsledků je zřejmé, že k identifikaci je nutné použít vždy několik primerů s odlišnými sekvencemi.Dále je nutné důsledně používat u pozitivních vzorků další identifikaci produktu pomocí druhově specifické hybridizační sondy,případně restrikční analýzu nebo sekvenci produktu.V tabulce nejsou uvedeny všechny zkoušené organismy,jejichž DNA byla vyšetřena specifickými primery pro *Borrelia burgdorferi*. Jedná se o následující druhy: *Legionella pneumophila, Anaplasma phagocytophilum,Human herpes 1 simplexvirus,Human herpes 2 simplex virus a Human herpes 4 lymphocryptovirus, Human herpes 5 cytomegalovirus* a DNA 30 izolátů blíže neidentifikovaných bakterií, které kontaminovaly vzorky při kultivaci borrelií v BSK mediu z lidských i zvířecích vzorků.Vyšetření výše uvedených druhů DNA bylo při použití používaných primerů k průkazu agens lymeské borrelliózy negativní.Množství primerů používaných k identifikaci DNA Borrelia burgdorferi sensu lato je od počátku používání této metody velké množství. Jednokroková PCR umožňuje spolehlivě identifikovat 40-400 fentogramů DNA Borrelia burgdorferi sensu lato v 1 mililitru tělní tekutiny nebo ve vyšetřované tkáni. Při obsahu 20 fentogramů chromozomové DNA v jedné buňce BB, můžeme při ideálních podmínkách prokázat 2-20 spirochét .Citlivější nested PCR – prokáže i menší množství DNA v materiálu.Zvyšování citlivosti přináší vzrůstající riziko kontaminace. U nested PCR dochází k manipulaci s namnoženým produktem a riziko kontaminace je již reálné a tato metoda se neupoužívá při

vyšetřování většího množství vzorků. Jednokroková PCR bezpečně odhalí patogenní spirochetémie, navíc je možné u ní používat účinnou ochranu před kontaminací - systému carry-over prevence. Pro zvýšení specifity je možné dále použít horký start.Přesto ,že počet organismů je u lymeské borreliózy v těle velmi nízký v porovnání s jinými bakteriálními i virovými původci onemocnění stačí jednokroková PCR prokázat původce BB v materiálu. Viz tabulka 4.

Tabulka 4: Množství spirochét ve vyšetřovaném materiálu nemocného jedince a nejnižší počet pro úspěšnou izolaci DNA(podle B.L.Schmidta (1))

Druh materiálu	**Počet spirochét v materiálu v ml**	**Nejnižší počet spirochét pro izolaci DNA v ml**
Infikované klíště	4 500-55 000 /jedinci	?(10)
Krevní plasma	Pod 50	10
Krevní plasma u pacientů s erythema migrans	4000	10
Moč	Pod 50	50
Výpotek kloubní	5000-10000	10
Mozkomíšní mok	1-20	10
Plná krev	Pod 50	100
Krevní sérum	Pod 50	50

Výsledky

Vybraný panel vyšetření

Výsledkem pokusů a srovnání s dostatečným počtem vyšetření byl výběr postupu při vyšetření vzorků na přítomnost DNA původce lymeské borreliózy.Byl tak vytvořen panel pro vyšetření,který byl z větší části převzat do akreditované metody.DNA se získává z citrátové krevní plasmy(krvinky v EDTě rychle hemolysují), nativního mozkomíšního moku,nativního výpotku a z tkání ve fyziologickém roztoku.Vzorky se nesmí zmrazovat mimo umístění tkáně v tekutém dusíku. Serum a moč se k vyšetření nepoužívá.Tekutiny se koncentrují centrifugací do 6000 g.K přípravě se používá komečních kitů pro izolaci geonomové DNA.Komerčně

vyráběný mix pro amplifikaci v systému horký start obsahuje 10 % templátu izolovaného ze vzorku, vyvážené množství dvou párů primerů Jedna sada primerů je odvozena z 16SrRNA genu geonomové DNA a druhá sada z OSPA genu plastidové DNA *Borrelia burgdorferi.*Rozpustidlem je výhradně sterilní destilovaná voda pro parenterální použití,bez pyrogenů.Reakční směs o objemu nejméně 25 mikrolitrů je amplifikována v 35 cyklech programu v teplotním profilu pro multiplex PCR. 10 % produktu je použito pro elektroforézu v 1,5 % agarozovém gelu za přítomnosti velikostního DNA markeru.Po obarvení je produkt odečítán proti pozitivním a negativní kontrole,velikostnímu markeru . Pozitivní vzorky jsou verifikovány hybridizací nebo sekvenací.

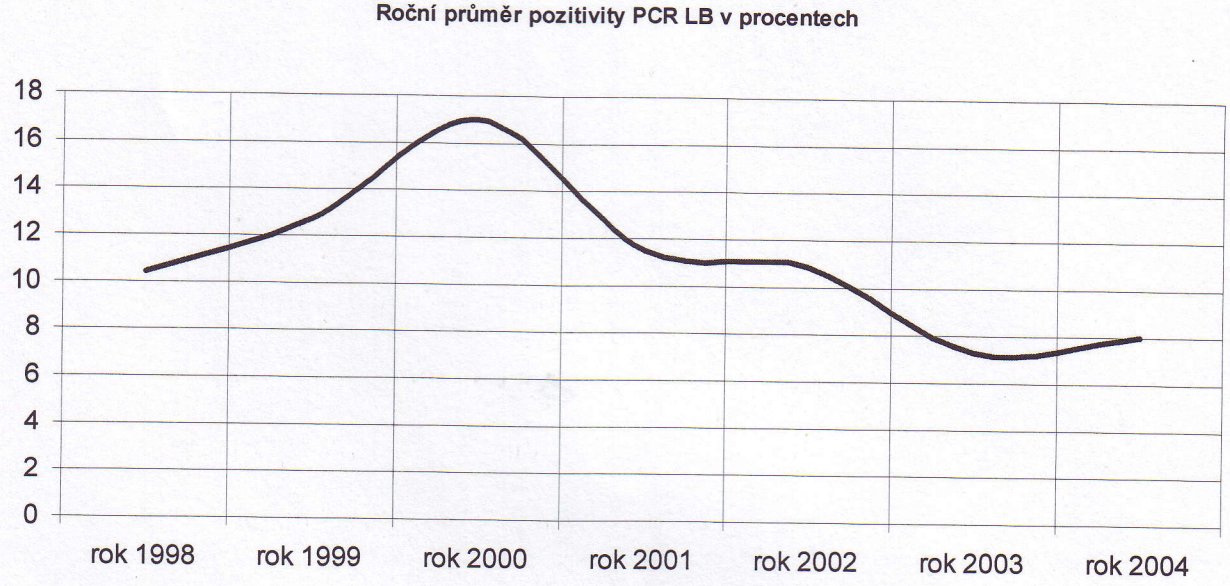
Výsledky vyšetření materiálu podle druhu

Během retrospektivní studie jsme měli možnost zpracovávat materiál zasílaný z oddělení infekčních, neurologických , revmatologických a dermatologických, menší část vzorků i z jiných pracovišť.Většina zaslaných vzorků byla od pacientů s chronickou LB.Akutní případy jsme měli většinou z vlastních odběrů, z řad pracovníků Státního zdravotního ústavu velmi často s prokazatelným erythema migrans. Průměrné roční **procento pozitivity krevní plasmy bylo 9,8 %** (8,9-12,1 % v posledních třech letech). **U mozkomíšního moku bylo průměrné procento 8,0 %** (s rozptylem 4,4-12 % v jednotlivých letech).Nejvyšší procento pozitivních vzorků z průměru posledních tří let bylo zjištěno **u kloubních výpotků 23,1%(**od 14,1 do 36 % ročních průměrů).Poměrná pozitivita u jednotlivých druhů odpovídá výsledkům jiných laboratoří používajících diagnostiku PCR pro identifikaci DNA *Borrelia burgdorferi.*Nižší procento pozitivních výsledků u mozkomíšního moku je dáno tím,že zpracováváme převážně vzorky z chronických , často již léčených případů.Ve sledovaném období jsme neměli možnost vyšetřit biopsie kůže z akutních případů s průkazným erythema migrans, kde bývá pozitivita nejvyšší , nad 50 %. (2).

Vývoj procenta pozitivity během posledních čtyř let

O roku 1998 jsme zjistili kolísán počtu pozitivních výsledků v jednotlivých letech. Počty jsme vztáhli k počtu vyšetřených vzorků a dostali tak roční procento pozitivity vyšetření v naší laboratoři. Od roku 1998 narůstalo procento pozitivity z 10 na 17 % v roce 2000. Od tohoto vrcholu dochází k minimu v roce 2003 (7 %), letos již v prvé třetině zaznamenáváme mírný nárust počtu pozitivních vzorků. (Viz graf č.1)

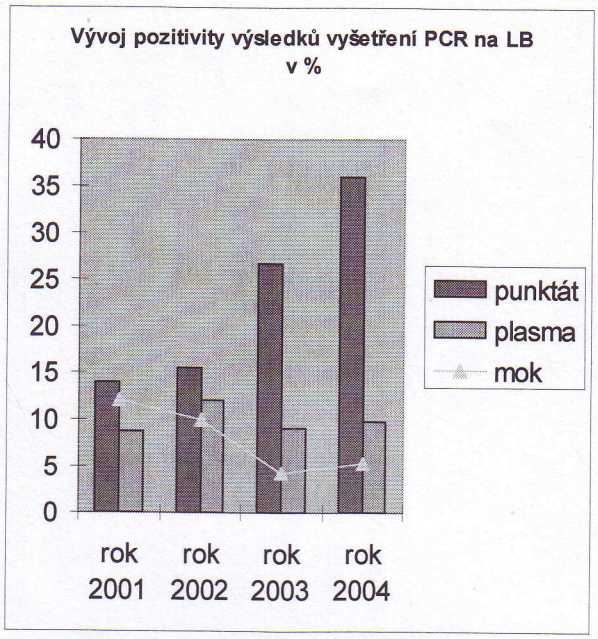
Graf č.1



Při porovnání poměrného počtu vyšetřených druhů klinického materiálu v posledních letech zjišťujeme že počty pozitivních vzorků v krvi zůstávají prakticky stejné,počty pozitivních kloubních výpotků se rychle zvyšují .Naopak počty pozitivních mozkomíšních moků se dlouhodobě snižují.To může souviset se změnou počtu jednotlivých genospeciés BB ve zkoumaných oblastech. (Viz graf č.2)

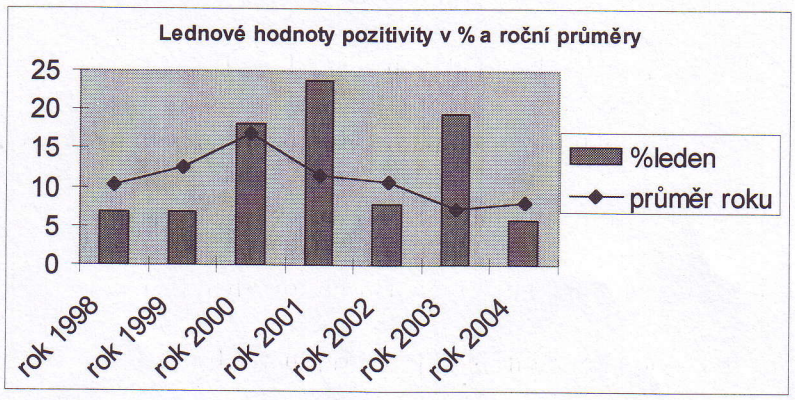
Graf č.2

Graf č.2



Při měsíčním rozboru počtu pozitivních vzorků během roku jsme pravidelně zjišťovali dvě roční maxima. Jedno bylo na jaře,většinou v březnu až květnu a pak na podzim v září až říjnu. Několikrát nás překvapil vysoký počet pozitivních vzorků v lednu některých roků.Situace se opakovala a tak jsme tomuto zjištění věnovali větší pozornost.V jednotlivých letech od roku 1998 jsme stanovili roční průměr pozitivity a ten porovnali s počty pozitivních v měsíci lednu všech sledovaných let od roku 1998 do roku 2004.V letech 2000, 2001 a 2003 jsme zjistili procento pozitivity v lednu vyšší než je průměr pro celý rok. Přitom v letech 2001 a 2003 byla tato odchylka velmi výrazná.Viz graf č.3

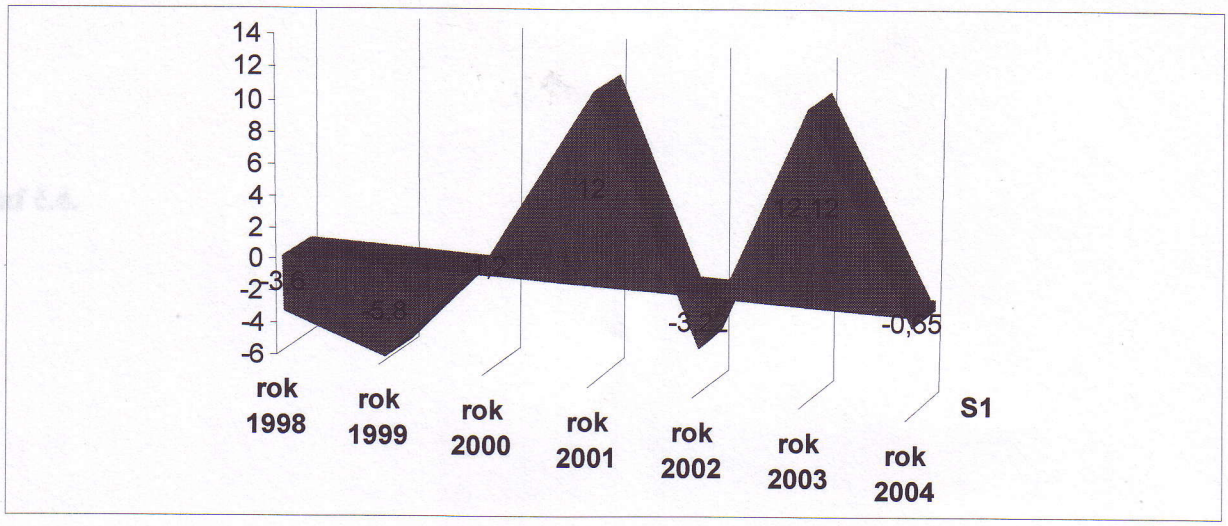
Graf č.3



Zajímalo nás co ovlivnilo lednové nárusty pozitivity.Hledali jsme spojitost s oslabením

organismu během probíhající epidemie, nebo souvislost s výrazným podchlazením organismu a vytvořením podmínek pro množení borrelií (růstové optimum je u BB 32-33 C)v akrálních částech těla, nebo v podchlazených kloubech. Další podezření bylo na užívání léku snižujících obranyschopnost organismu (krtikoidy aj.) a umožňující vycestování spirochét do tělních tekutin.Sledovali jsme i možnost,že borrelie perzistující v organismu člověka prodělávají svůj životní cyklus a v určitých období se v organismu pomnoží a připraví tak podmínky pro následnou možnost opuštění hostitelského organismu v rámci dalšího životního cyklu.

Lednové odchylky pozitivních výsledků proti ročnímu průměru



Citace:

1. Schmidt,B.L., PCR in Laboratory Diagnosis of Human *Borrelia burgdorferi* Infections,Clinical Mikrobiology Reviews,Jan.1997,p.185-201
2. Informace z EUCALB 1997-2004 European Union Concerted Action on Lyme Borreliosis http://vie.dis.strath.ac.uk/vie/LymeEU/diagnosis_clinical-features-pcr.html