Epidemiol. Mikrobiol. Imunol., 53, 2004, č. 4, s. 183–191

Prevalence druhů *Borrelia burgdorferi* sensu lato u pacientů v České republice; přímá sekvenační analýza a polymerázová řetězová reakce v reálném čase

Hulínská D., Dřevová H., Votýpka J., Langrová K., Kurzová Z.

Přírodní ohniskovost nákaz, Národní referenční laboratoř pro borreliózu, Státní zdravotní ústav, Praha

Souhrn

Rozšíření borreliózy závisí na geografických, ekologických a klimatických faktorech, stejně jako na patogenezi vlastního agens skupiny *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Zájem vzbuzuje nárůst případů této choroby a objevení nových příznaků. Vztah genodruhů k symptomům, jejich geografické rozšíření a možnost spolupůsobení dalších patogenů je předmětem naší studie.

Do studie bylo zahrnuto 87 pacientů s borreliózou ze středních, východních Čech a z Moravy. Pacienti skupiny 1 (celkem 49) byli zařazeni podle pozitivní kliniky, pacienti skupiny 2 (celkem 21) se rekrutovali z pozitivních screeningovou metodou PCR a pacienti skupiny 3 (celkem 17) byli pozitivní kultivačně. Celkem 48 pacientů a 17 izolovaných kmenů bylo pozitivních v konvenční nested PCR pro plazmidy a genom *B. burgdorferi* sensu lato. Genodruhy a subtypy borrelií byly prokázány přímou sekvenací OspA a OspC produktů. Kvantitativní data byla determinována pomocí křivky tání specifického produktu užitím PCR v reálném čase.

Sekvenací fragmentů OspA genu jsme u pacientů ze středních Čech prokázali přítomnost *B. garinii*, subtypy 6, 5, 4, 3 v 51,8 % (14 z 27), *B. burgdorferi* s.s v 29,6 % (8 z 27) a *B. afzelii* v 18,5 % (5 z 27). Ve východní oblasti prevalovala *B. garinii*, subtyp 5 a v 7,6 % byla společná infekce s *Anaplasma phagocytophilum*. Prevalence *B. afzelii* v 44 % (11 z 25) následovaná *B. burgdorferi* s.s. v 36 % (9 z 25) a v 20 % zbývající infekcí *B. garinii* byla u pacientů z Moravy. Sekvence dvou hypervariabilních oblastí OspC a OspA genů a vzdálenosti sekvencí ve fylogenetických stromech ukázaly rozdíly nejen mezi genodruhy a subtypy ale i mezi „divokými" kmeny, prokázanými přímou sekvencí ve vzorcích pacientů a „arteficiálními" kmeny, kultivovanými *in vitro*. Největší rozdíly byly u dlouhodobě nemocných borreliózou.

Klíčová slova: borrelióza – PRC v reálném čase – sekvenační analýza.

Summary

Hulínská D., Dřevová H., Votýpka J., Langrová K., Kurzová Z.: Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato Species among Patients in the Czech Republic; Direct Sequencing Analysis and Real-time Polymerase Chain Reaction

The spread of borreliosis depends on geographical, environmental and climatic factors as well as on the pathogenesis of the causative agent of the group of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. The rise in the incidence of the disease and emergence of new symptoms are of concern. Relationships between genospecies and symptoms, their geographical spread and possible interference of other pathogens are the subject of the present study. Eighty-seven patients with borreliosis from Central and Eastern Bohemia and Moravia were enrolled in the study. Forty-nine patients of group 1 showed clinical positivity, 21 patients of group 2 tested positive at PCR screening and 17 patients of group 3 were culture positive. Forty-eight patients and 17 isolated strains showed positivity for plasmids and the *Borrelia burgdorferi* sensu lato genome in conventional nested PCR. Borrelial genotypes and subtypes were detected by direct sequencing of OspA and OspC products. Quantitative data were determined from specific product melting temperature curves for real time PCR.

Based on sequencing of the OspA gene, *B. garinii* (subtypes 6, 5, 4 and 3), *B. burgdorferi* s.s. and *B. afzelii* were detected in 14 (51.8 %), 8 (29.6 %) and 5 (18.5 %) out of 27 Central Bohemian patients, respectively. Eastern Bohemian patients showed predominance of *B. garinii* subtype 5 and co-infection with *Anaplasma phagocytophilum* in 7.6 %. The predominant causative agent in 25 Moravian patients was *B. afzelii* (11 patients, i.e. 44 %), followed by *B. burgdorferi* s.s. (9 patients, 36 %) and *B. garinii* 5 patients, i.e. 20 %). Sequences of two hypervariable regions of the OspA and OspC genes and distances in phylogenetic trees showed differences not only between genospecies and subtypes but also between wild strains detected by direct sequencing from patient specimens and in vitro cultured strains. The greatest differences were found for patients with long-term borrelial infection.

Key words: borreliosis – real time PCR – sequencing analysis.