

Układowe Wewnątrzkomórkowe Infekcje Bakteryjne (*Mycoplasma*, *Chlamydia* gatunki *Borrelia*) w chorobach neurodegeneracyjnych (Stwardnienie Rozsiane, Stwardnienie Zanikowe Boczne) i zaburzeniach zachowania (z zakresu chorób autystycznych) (Autyzm, Zespół Deficytu Uwagi, Zespół Aspergera)

Garth L. Nicolson

*Institut Medycyny Molekularnej (The Institute for Molecular Medicine)
16371 Gothard Street H, Huntington Beach, California 92647*

Streszczenie

U pacjentów przewlekle chorych na choroby neurodegeneracyjne oraz zaburzenia zachowania często stwierdza się uogólnione infekcje bakteryjne, wirusowe lub grzybicze, które mogą odgrywać istotną rolę w ich patogenezie. Nasi badacze oraz inni lekarze przebadali pacjentów cierpiących na różne schorzenia neurodegeneracyjne oraz zaburzenia zachowania różnego typu takie jak: Stwardnienie Zanikowe Boczne (ALS), Stwardnienie Rozsiane (MS), zaburzenia autystyczne (Autyzm, Zespół Aspergera, Nadpobudliwość Psychoruchowa ADHD).

Ich wyniki wskazują iż większość z nich cierpi na uogólnione międzykomórkowe, bakteryjne, wirusowe lub grzybicze infekcje. Na przykład wyniki badań leukocytów krwi obwodowej na obecność zakażeń patogenami takimi jak *Mycoplasma* spp, *Chlamydia pneumoniae*, *Borrelia burgdorferi* i innymi uzyskane przez łańcuchową reakcję polimerazy (PCR) ujawniły wysoką częstość przypadków koinfekcji których nie odnajdujemy w wynikach grupy kontrolnej) ($P < 0.001$). Uzyskane wyniki zostały porównane do chorób chronicznych których objawy chorobowe posiadają manifestacje neurologiczne takich jak Zespół Chronicznego Zmęczenia/Encefalopatia Mięśniowa, Fibromialgia, Choroba z Lyme, odniesiono je następnie do wyników chorych pacjentów weteranów Wojny w Zatoce Perskiej - Gulf War Illness (chorób zazwyczaj występujących u weteranów wojennych). Większość tych przewlekle chorych pacjentów posiada również różne wewnątrzkomórkowe infekcje bakteryjne. Po porównaniu z grupą kontrolną ($P < 0.001$) najczęściej odnajdywaną koinfekcją bakteryjną były różne gatunki mycoplazm we wszystkich badanych przypadkach. Dla kontrastu tylko w kilku przypadkach z grupy kontrolnej posiadających wynik pozytywny znaleziono pojedyncze znamiona infekcji. Wyniki badań sugerują iż międzykomórkowe infekcje bakteryjne często współistnieją z chorobami neurodegeneracyjnymi oraz różnego typu zaburzeniami zachowania. Protokoły leczenia tych chorób powinny uwzględniać złożone infekcje współistniejące w tych chorobach.

Słowa kluczowe: infekcje bakteryjne, stwardnienie rozsiane, stwardnienie zanikowe boczne, zaburzenia autystyczne, zespół chronicznego zmęczenia

Wstęp:

Choroby neurodegeneracyjne są chorobami degeneracyjnymi Centralnego Układu Nerwowego, które często powodują demencję. W znacznej większości przyczyny tego typu chorób mózgu oraz ich mechanizmy powstawania (patologia) są nieznane, notujemy jednak znaczny wzrost ich wykrywalności i występowania wraz z niedoszacowaniem częstości. Są one częściej wykrywane w starzejącej się populacji.

Choroby te są opisywane przez zmiany molekularne jakie zachodzą w komórkach nerwowych, które skutkują obumarciem lub zniszczeniem komórki nerwowej i ostatecznie powodują dysfunkcję nerwów oraz obumarcie komórki co daje wyraz w objawach neurologicznych oraz w szczególnych przypadkach powoduje demencję (1,2).

Pojawia się tutaj odniesienie do znanej teorii genetycznej powstawania tych chorób, jednak zmiany genetyczne które się ujawniają i zmiany w ekspresji genowej jakie są odnajdywane w tych chorobach się uzupełniają (2).

Jedną z typów zmian jakie zachodzą we wszystkich chorobach neurodegeneracyjnych jest nadekspresja wolnych rodników (stres oksydacyjny), który powoduje tłuszczowe, białkowe i genetyczne zmiany strukturalne (3,4).

Uważa się, iż przewlekle niedobory żywieniowe, urazy głowy, toksyny środowiskowe, chroniczne bakteryjne i wirusowe infekcje, immunologiczna odpowiedź z autoagresji, choroby naczyniowe, akumulacja płynu w mózgu, zmiany w koncentracji neuroprzekaźników i wiele innych może powodować powstanie chorób neurodegeneracyjnych (1,5). Interesujący model przyczyn degeneracji układu nerwowego skutkujący chorobami neurologicznymi ujmuje toksyczne produkty przemian metabolizmu mózgowego jako wynik chronicznej bakteryjnej lub wirusowej infekcji (6,7).

Czynniki infekcyjne mogą wnikać do centralnego układu nerwowego przez zainfekowanie migrujących makrofagów lub uzyskać dostęp międzykomórkowy przekraczający barierę krew mózg lub przez transfer wewnątrzneuronalny z nerwów peryferyjnych (6). Bakterie pozbawione ściany komórkowej (większość gatunków mykoplazm, chlamydii, coxiella, brucella, borrelia są pośród wielu innych głównymi podejrzanymi patogenami jakie mogą odgrywać dużą rolę w patologii chorób neurodegeneracyjnych (8).

Takie infekcje mogą również powodować szybszy rozwój choroby jak również przez to, że są zazwyczaj uogólnione, systemowe mogą wpływać na złe funkcjonowanie układu odpornościowego, centralnego układu nerwowego i innych układów.

2. Metody

Pobieranie krwi do badań

Krew była pobierana do probówek zawierających EDTA, natychmiast po pobraniu przeniesiona do pojemników z lodem które następnie drogą lotniczą dostarczono do Instytutu Medycyny Molekularnej do analizy. Wszystkie próbki umieszczono w ciemnym miejscu. Krew została zbadana metodą DNA przy użyciu systemu Chelex jako pierwotnie zalecanego (9, 10).

Amplifikacja Sekwencji Genowych metodą PCR

Amplifikacja docelowych sekwencji genowych metodą łańcuchowej reakcji polimerazy DNA (PCR) została wybrana jako pierwotnie opisana (zalecana). Negatywne i pozytywne wyniki były obecne w każdej eksperymentalnej próbie. Amplifikowane próbki krwi były odseparowane od siebie żelem agarowym poddanym elektroforezie.

Po denaturacji i neutralizacji za pomocą metody Southern Blottingu sprawdzono wyniki uzyskane metodą PCR (9, 10). Użyto zwielokrotnionej metody PCR dla każdego gatunku bakterii badanych aby zminimalizować możliwości krzyżowej reakcji wśród mikroorganizmów które zostały wykryte.

Statystyki

Podmioty charakterystyki demograficznej zostały oszacowane przy użyciu statystyk opisowych oraz testów t-studenta (niezależne próby czynnikowe, test t studenta dla sprawdzenia równości uzyskanych wyników, test dwustronny). Do badania statystycznego został wybrany 95 % przedział ufności dla uzyskanych wyników. Testu Chi kwadrat Pearsona użyto do porównania przeważających wyników pomiędzy pacjentami a grupą kontrolną.

3. Stwardnienie zanikowe boczne (ALS)

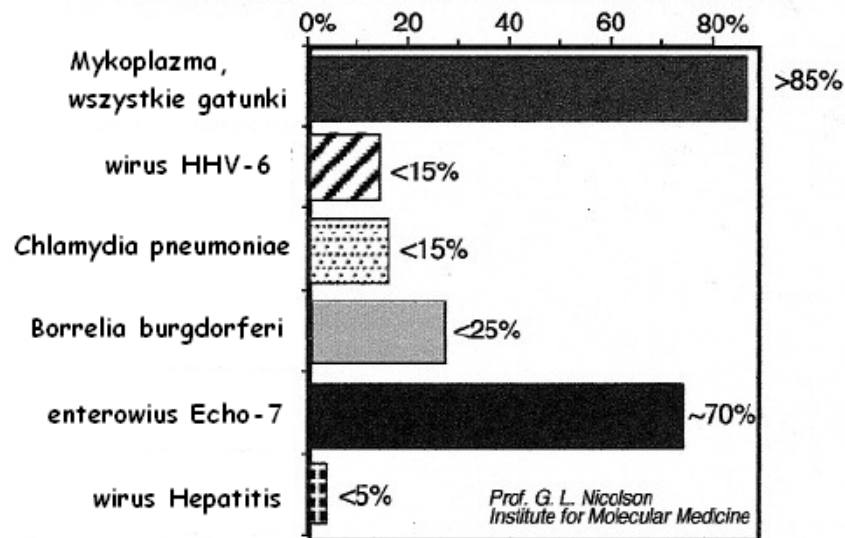
ALS jest chorobą ujawniająca się zazwyczaj we wczesnym okresie dorosłości, uznaje się ją za jednostkę pochodzenia idiopatycznego, chorobę progresywną, degeneracyjną zajmującą oba: centralne i peryferyjne neurony motoryczne. Pacjenci z ALS wykazują postępującą słabość i paraliż mięśniowy spowodowany zniszczeniem, wyższych neuronów motorycznych w korze ruchowej oraz niższych neuronów motorycznych w rdzeniu mózgu i korze rdzeniowej, ostatecznym skutkiem tego procesu jest śmierć chorego. Zazwyczaj z powodu niewydolności oddechowej (11, 12). Obraz kliniczny ALS może być różnorodny. Objawy uzależnione są od lokalizacji oraz stopnia zaawansowania zmian w komórkach nerwowych (13).

Odkrycie sekwencji enterowirusów w 15 z 17- nastu próbek kory rdzeniowej chorych na ALS pacjentów metodą łańcuchowej reakcji polimerazy PCR (14, 15) zwróciło uwagę na chroniczne infekcje układu nerwowego u chorych na ALS pacjentów, pomimo iż inne próbki kory rdzeniowej były wolne od sekwencji enterowirusów w badanym materiale (zarówno zdrowych jak i chorych na ALS pacjentów). Czynniki infekcyjne mogą odgrywać dużą rolę w etiologii zespołu Stwardnienia Zanikowego Boczego ALS.

Przestudiowaliśmy obecność systemowych infekcji mikrobiologicznych w na wstępnej grupie pacjentów z ALS. Odkryliśmy że 8/8 badanych weteranów wojny w Zatoce Perskiej ze zdiagnozowanym stwardnieniem zanikowym bocznym pochodzących z trzech różnych narodowości miało systemową infekcję mycoplazmalną.

Wszyscy byli pozytywni, z tym że jeden z pacjentów miał uogólnioną infekcję *M. fermentans* i jeden *M. genitalium*. U 22 na 28 pacjentów cywilnych z USA, Kanady i Wlk. Brytanii znaleźliśmy również mycoplazmalne zakażenie krwi. Pośród pacjentów cywilnych z potwierdzoną infekcją mycoplazmą którzy byli wcześniej badani na obecność *M. Fermentans*, *M. Hominis* i *M. Pneumoniae* większość była pozytywna na *M. fermentans* (13/22, 59 %), ale znaleźliśmy również inne gatunki mykoplazm takie jak *M. hominis* (7/22, 31 %) i *M. Pneumoniae* (2/22, 9 %), dwóch cywilnych pacjentów z ALS miało złożone infekcje mycoplazmą *M. fermentans* plus *M. hominis*, 9 %. Różnica w częstości obecności koinfekcji mycoplazmalnych pomiędzy pacjentami z ALS i grupą kontrolną była znacząca ($P < 0.001$) (17).

Procent pacjentów z ALS z chronicznymi infekcjami



Ryc. 1: Procentowa częstość uogólnionych infekcji bakteryjnych i wirusowych wśród 46 pacjentów ze stwardnieniem zanikowym bocznym (ALS)

Pacjenci cierpiący z powodu ALS mieli też wykrywane inne infekcje chroniczne: zakażenie wirusem opryszczki 6 (HHV-6), Chlamydia pneumoniae i Boreliozę z Lyme. Znamy już prawdopodobną rolę jaką mogą odgrywać u pacjentów z ALS enterowirusy, jednak o innych infekcjach hipotetycznie odgrywających podobną rolę w patogenezie i postępowaniu choroby ALS nic nie wiemy.

4. Stwardnienie Rozsiane (Multiple Sclerosis) (SM)

Stwardnienie rozsiane jest chorobą nerwów centralnego układu nerwowego, objawia się zarówno w młodości jak również w starszym wieku. Nerwy w różnych partiach mózgu są pokryte ochronną izolacją zawierającą białko mielinę oraz inne białka wchodzące w skład otoczki lipidowej dzięki czemu impulsy nerwowe które umożliwiają połączenie są chronione. W stwardnieniu rozsianym proces zapalny oraz czynniki autoimmunologiczne skierowane przeciwko mielinie oraz inne antygeny powodują że ochronna otoczka ulega zniszczeniu (demielinizacji). Skutkiem tego procesu jest spadek częstości lub całkowita utrata przewodzenia impulsów nerwowych wzdłuż nerwów. W postępującej chorobie komórki nerwowe zostają całkowicie zniszczone przez demielinizację oraz wyparcie zdrowych płytek na komórkach nerwowych do czasu w którym komórka nerwowa wydaje się martwa. Występuje również złamanie bariery krew mózg co jest związane z miejscowym procesem zapalnym spowodowanym przez komórki glejowe (18, 19).

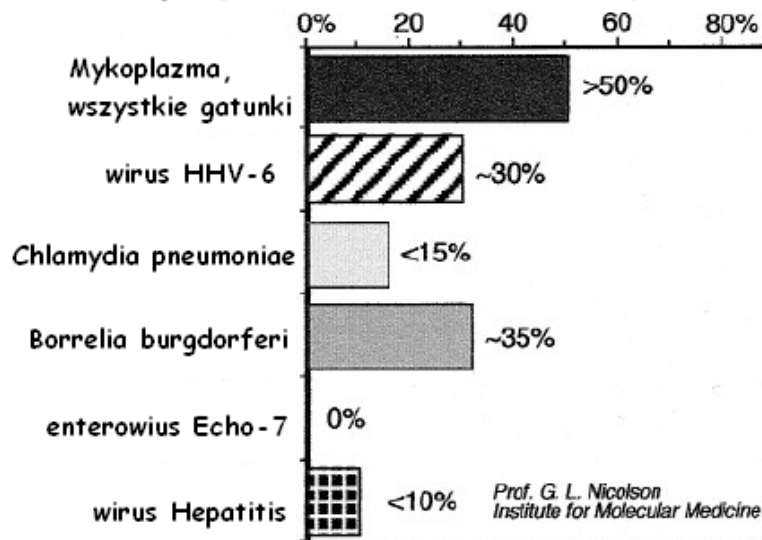
Efekty kliniczne demielinizacji oraz zniesienie bariery krew mózg są różnorodne ale zazwyczaj obejmują zaburzenia widzenia zmiany w poruszaniu się, czuciu i zaburzenia koordynacji ruchowej zaburzenia poznawcze. Często choroba przebiega z okresami nawrotów i remisji, ale u małej grupy pacjentów choroba postępuje regularnie (19).

Przez ostatnie lata testowano hipotezę, iż SM może wywoływać czynnik infekcyjny (20, 21). Badania epidemiologiczne oraz badania bliźniąt sugerują iż SM jest nabyte nie wrodzone. Do chwili obecnej ponad 90 % pacjentów wykazuje immunologiczne i żerne znamiona infekcji. Pacjenci zostali przebadani na obecność różnych czynników wirusowych i bakteryjnych. Patogenem najczęściej znajdowanym w mózgach pacjentów tej grupy chorych była Chlamydia pneumoniae, aczkolwiek nie była odkrywana przez wszystkich badaczy (25, 26).

Ostatnie badania prowadzone w Instytucie Medycyny Molekularnej (Institute of Molecular Medicine) oraz w wielu innych miejscach pokazują, że pewna odpowiedź immunologiczna z autoagresji wobec komórek nerwowych może być spowodowana infekcją toczącą się wewnątrz komórek nerwowych.

80 % pacjentów ze stwierdzonym SM może przechodzić wewnątrzkomórkową infekcję bakteryjną spowodowaną mycolasmą, chlamydią lub inną bakterią bez ściany komórkowej. Są one jednak znajdowane rzadko wśród badanych ($P < 0.001$). Ponadto inne infekcje komórkowe takie jak zakażenie Borrelia burgdorferi (choroba z Lyme) i innymi wewnątrzkomórkowymi bakteriami może również stanowić czynnik obciążający (przykład 2).

Procent pacjentów z SM z chronicznymi infekcjami



Ryc 2: Procentowa częstość uogólnionych infekcji bakteryjnych i wirusowych wśród 65 pacjentów ze stwardnieniem rozsianym (SM)

Infekcje mogą stymulować odpowiedź odpornościową i obecnie w szczególności wewnątrzkomórkowe infekcje bakteryjne komórek nerwowych mogą stymulować odpowiedź immunologiczną z autoagresji kiedy te wewnątrzkomórkowe bakterie uwalniają z komórek nerwowych antygeny komórkowe. W przypadku Stwardnienia rozsianego odkryto 20 różnych bakteryjnych i wirusowych infekcji, jednak rola tych zakażeń w patogenezie SM nadal nie jest jasna (27).

Chlamydia pneumoniae oraz różne gatunki mykoplazm są wykrywane w centralnym układzie nerwowym u chorujących wcześniej na SM w czasie autopsji (28, 29). Obecność tych bakterii wiąże się z wystąpieniem chorób neurologicznych (23). Ponadto zakażenia występujące u innych naczelnymi bakteriami takimi jak Mycoplasma fermentans dają rezultat w postaci poważnych komplikacji neurologicznych (30).

5. Zaburzenia Autystyczne (Autistic Spectrum Disorders) ASD

Dzieci z zaburzeniami autystycznymi takimi jak Autyzm, Zaburzenie Deficytu Uwagi, Zespół Aspergera itp. generalnie cierpią z powodu niemożności poprawnego komunikowania się z otoczeniem, prawidłowego nawiązania kontaktów z innymi ludźmi oraz nieadekwatnej reakcji na kontakt z otoczeniem. Nie wszyscy pacjenci mają te same wspólne objawy, sygnały i symptomy chorób, ale mają skłonność do wyrażania problemów z socjalizacją, komunikowaniem, poruszaniem się oraz z myślami które wyrażają się w ich zachowaniu w podobny sposób. Dzieci z tymi zaburzeniami często powtarzają te same ruchy i przejawiają chorobliwą fiksację na specyficznych przedmiotach, bardzo często przejawiają reakcję bólu na wybrane dźwięki, smaki lub zapachy. (31, 32).

Za przyczynę tych objawów uznano anomalia w budowie mózgu oraz jego funkcjonowaniu. U niektórych pacjentów z ASD występuje również pewna liczba innych mniej specyficznych chronicznych objawów i oznak zaburzeń. Wśród nich znajdujemy chroniczne zmęczenie, bóle głowy, problemy gastrologiczne oraz problemy ze wzrokiem i okazjonalnie stany podgorączkowe, i inne symptomy które zazwyczaj nie są wliczane do diagnozy ASD. Przyczyny ASD są nieznane i mogą zawierać defekty genetyczne, obecność metali ciężkich w organizmie, ekspozycję na czynniki chemiczne i biologiczne spośród których każdy jest inny u każdego pacjenta. Aczkolwiek wśród pacjentów z ASD jest obecna pewna zbieżność w występowaniu defektów genetycznych i czynników środowiskowych (31, 32), które są ważne w śmiertelności pacjentów i postępowaniu choroby.

Inne choroby chroniczne mają niektóre symptomy wspólne co sugeruje, iż może istnieć pewne powiązanie w przyczynach zaburzeń, które powodują chorobę, jej dalszy rozwój i śmiertelność.

Objawy choroby i znaki ostrzegawcze w wielu przypadkach (być może nawet większości przypadków chorych chronicznie pacjentów) mogą być wynikiem chronicznych infekcji układowych spowodowanych przez bakterie, grzyby, lub wirusy które mogą przeniknąć do ośrodkowego układu nerwowego. Takie infekcje często poprzedzają ostre lub przewlekłe zatrucia metalami ciężkimi, chemikaliami, lub ekspozycja na czynniki infekcyjne: wirusy, bakterie, grzyby oraz środowiskowe. Czynnikiem takim mogą być nawet złożone szczepionki które wyciszają układ odpornościowy i mogą czynić dzieci przez jakiś czas mniej odpornymi na infekcje oportunistyczne (33-35).

Zazwyczaj objawy choroby rozwijają się wolno w czasie przebiegając wieloetapowo co może sugerować, iż przyczyną chorób neurodegeneracyjnych jest połączenie pewnej podatności genetycznej z ekspozycją na zróżnicowane czynniki toksyczne.

Chroniczne infekcje mogą stanowić istotny element w poznaniu przyczyn ASD. Takie infekcje są zazwyczaj niszczone przez układ odpornościowy, ale mogą też przetrwać i stać się dużym problemem, kiedy ominą układ odpornościowy i dostaną się do komórek i tkanek (również OUN i peryferyjnego układu nerwowego). Kiedy pojawi się inny czynnik infekcyjny mogą spowodować wiele komplikacji i przejść w stadium choroby przewlekłej (34,35). Zmiany w odpowiedzi organizmu na zagrożenia środowiskowe oraz zwiększona podatność na zakażenia wirusami endogennymi podobnie jak czynnikami bakteryjnymi i grzybiczymi są bardzo często obserwowane u ludzi chorujących na choroby przewlekłe (34, 35).

Pacjenci z ASD często wykazują pierwsze oznaki choroby po otrzymaniu złożonych szczepień ochronnych (2). Rimland zauważył (2) że nagły wzrost przypadków autyzmu pojawił się po rozpoczęciu stosowania u dzieci złożonej szczepionki MMR która weszła do powszechnego użytku. W Stanach Zjednoczonych dzieci zazwyczaj otrzymują 33 szczepionki i stanowi to dramatyczny wzrost w stosowaniu szczepionek u dzieci na przestrzeni kilku ostatnich dekad. Takie szczepionki często zawierają rtęć i inne konserwanty (36).

Dostępne na rynku szczepionki zostały również przetestowane na obecność mikroorganizmów. Jedno z takich badań, dowiodło, iż około 6% szczepionek dziecięcych zawiera mykoplazmy (36). Te same które brałismy pod uwagę w bakteryjnych czynnikach infekcyjnych u pacjentów z ASD. U pacjentów z ASD w przeprowadzonych badaniach zauważyliśmy również iż występuje duży odsetek dzieci z autyzmem w rodzinach weteranów wojny w Zatoce Perskiej (37).

Jak zauważono wcześniej weterani wojny w Zatoce Perskiej chorujący na przewlekłe zmęczenie wykazują różne objawy. Po dokładniejszej analizie symptomy i objawy przewlekłego zmęczenia u weteranów były nie do odróżnienia od tych towarzyszących pacjentom cywilnym ze zdiagnozowanym Zespołem Chronicznego Zmęczenia oraz Encefalopatią Mięśniową (35), w szczególności dzieci z autyzmem i nadpobudliwością ADHD w wieku 3-12 lat dwoma zaburzeniami zaliczanymi do ASD (deficytu uwagi) (40).

W tych przypadkach 45 ze 110 weteranów (ok. 42% badanych) posiadało potwierdzoną infekcję mykoplazmalną (przykład 1), i prawie wszyscy w grupie zainfekowanych ok. 82 % posiadało jeden gatunek mykoplazm (37).

M. fermentans znaleziono w 85 % przypadków zakażenia jednym gatunkiem bakterii (przykład 3). Kiedy analizowano przypadki zakażeń złożonych większość z nich zawierała koinfekcje gatunkami: *Mycoplasma fermentans* plus *M. Pneumoniae*, *M. hominis*, *M. genitalium* (przykład 2). Dla kontrastu w zdrowej grupie kontrolnej tylko 6 z 70 przypadków (8.5 %) uzyskało pozytywny wynik dla jakiegokolwiek infekcji mykoplazmalnej i wszystkie z wykrytych przypadków infekcji były pojedynczym zakażeniem różnego typu (37).

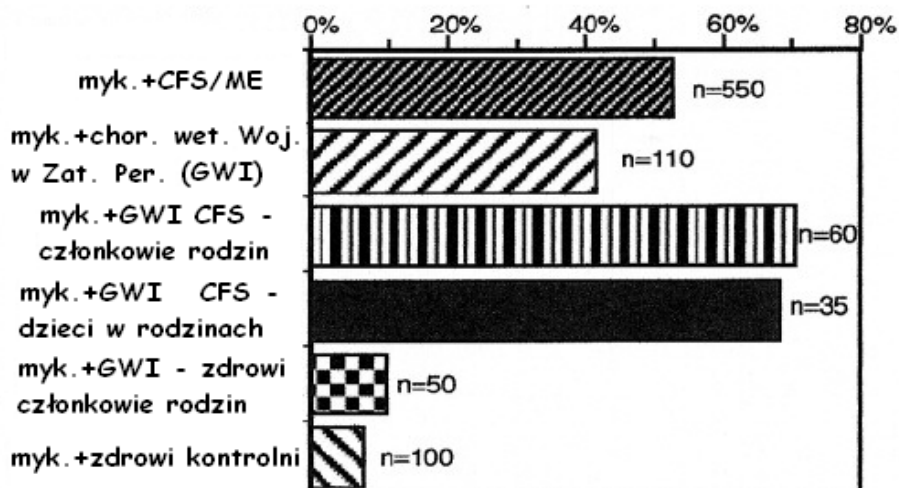
Porównując pacjentów – weteranów i niesymptomatyczną grupę kontrolną zauważamy znaczącą różnicę w występowaniu infekcji mycoplazmalnych ($P < 0.001$). Różnice w występowaniu infekcji oraz różnorodności gatunków mykoplazm pomiędzy kobietami i mężczyznami, weteranami wojennymi oraz grupą kontrolną nie były obserwowane (37).

W rodzinach weteranów wojny w Zatoce Perskiej chorujących na zespół przewlekłego zmęczenia [Gulf War veterans with chronic fatiguing illness (GWI)] istnieją dowody przekazywania choroby. Odkryliśmy, że 57/107 (53,2%) spośród członków rodzin weteranów z GWI i z pozytywnym testem na obecność infekcji mycoplazmalnej wykazuje symptomy CFS/ME (Chronic Fatigue Syndrome/ Myalgic Encephalomyopathy). Spośród członków rodziny z objawami CFS większość (40/57, lub 70,2%) ma infekcję mykoplazmalną (6/50 lub 12%).

Kiedy incydenty występowania infekcji zostały porównane pomiędzy rodzinami członkowie rodzin z CFS/ME mieli większą skłonność do infekcji mykoplazmalnej w porównaniu z członkami rodzin bez objawów ($P < 0.001$). Dzieci z objawami (większość ze zdiagnozowanym autyzmem i ADD) były również zainfekowane mykoplazmami, częstość występowania infekcji w tej grupie była duża (wykres 1), ale efekt nie był obserwowany w wymieszanej wiekowo grupie kontrolnej (nieznana data). Jakkolwiek pewna grupa członków rodziny wykazywała obecność mykoplazm niepotwierdzoną objawami (5/50 10 %), ich występowanie nie różniło się znacząco od grupy kontrolnej (6/70 8.5%) (wykres 3).

Gatunki wykrytych mykoplazm były również podobne w grupie pacjentów z GWI i ich objawowych członków rodziny z CFS/ME. W 45 osobowej grupie objawowych członków rodziny z CFS/ME, większość (31 z 40 lub 77,5%) posiada pojedyncze infekcje (*M. fermentans*), podobnie jak w grupie weteranów (37 z 45 czyli 82%). Te wyniki były znaczące ($P < 0.001$).

Procent pacjentów/osób z infekcjami mykoplazmowymi



Ryc. 3: Procentowa częstość infekcji mykoplazmowych wśród członków rodzin weteranów z chorobą weteranów Wojny w Zatoce Perskiej [Gulf War Illness] [37]

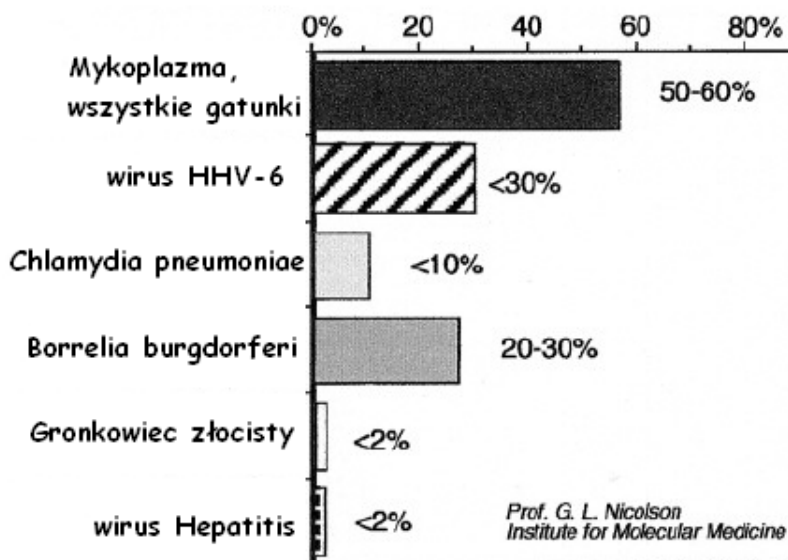
Nie odkryliśmy różnic w występowaniu infekcji lub typu infekcji zależnych od dychotomii płci, wieku (dorośli /dzieci czy małżonków / innych członków rodziny (data nie ujawniona - data not shown). Jakkolwiek, podobnie do poprzednich raportów czas ujawnienia się CFS/ME po wojnie w Zatoce Perskiej (Gulf War) wydaje się krótszy u małżonków niż innych członków rodziny, jednak te różnice nie osiągnęły poziomu znaczącego (40).

Następnie przebadaliśmy małą grupę (kohortę) pacjentów z ASD na terenie Centralnej Kalifornii (40) badaniem objęliśmy 28 pacjentów w wieku 3-12 lat u których zdiagnozowano ASD. Większość dzieci miało co najmniej jednego rodzica z chorobą chroniczną i najczęściej diagnozowanym schorzeniem w grupie dorosłych w tej samej rodzinie było CFS/ME lub fibromialgia. Kiedy pacjentów z autyzmem przebadano na obecność infekcji mykoplazmalnej 15 dzieci uzyskało wynik pozytywny (54%). Jakkolwiek w przeciwieństwie do dzieci z syndromem GWI które w większości miały tylko jeden typ infekcji mykoplazmalnej *M. fermentans* przetestowana grupa z Centralnej Kalifornii, która miała wynik pozytywny na zakażenia mykoplazmą posiadała również koinfekcje innymi gatunkami mykoplazm (40). Przeanalizowaliśmy również kilka przypadków rodzeństwa bez widocznych objawów i symptomów choroby i kilkoro z nich miało pozytywny wynik (5/41 badanych około 12%). Podobne wyniki uzyskiwaliśmy w rodzinach weteranów wojennych wśród których 12% nieobjawowych członków rodziny miało infekcje mykoplazmalne (39).

W większym badaniu oddaliśmy do analizy krew 48 pacjentów z ASD z Centralnej i Południowej Kalifornii i odkryliśmy, że szeroka grupa 28/48 czyli 58.3% pacjentów demonstruje objawy zakażenia *Mycoplasma spp.* Porównując do dwóch z 45 4.7% wymieszanych wiekowo grup kontrolnych współczynnik prawdopodobieństwa = 13,8 $P < 0.001$) (41). Odkąd pacjenci z ASD zaczęli wykazywać zakażenie jednym lub wieloma gatunkami mykoplazm, (niektórzy również wykazywali obecność *Chlamydia Pneumoniae*), przebadaliśmy pacjentów z ASD na obecność innych infekcji (wykres 3). Ponadto obecność jednej lub więcej infekcji systemowej może predysponować pacjentów z ASD do wystąpienia innych infekcji, ci pacjenci których przebadaliśmy w większości wykazywali obecność *Chlamydia pneumoniae* (4/48 czyli 8.3 % wyników pozytywnych, współczynnik prawdopodobieństwa = 5.6, $P < 0.01$) i ludzki wirus opryszczki -6 (HHV-6, 14.48 czyli 29.2%, współczynnik prawdopodobieństwa 4.5, $P < 0.01$).

Odkryliśmy, iż pacjenci z pozytywnym wynikiem zakażenia mykoplazmą i nie chorujący na ASD są w podobnym stopniu zakażeni *Ch. pneumoniae* i wirusem HHV-6, co sugeruje, iż infekcje te pojawiają się niezależnie u pacjentów z ASD, grupa kontrolna posiada również niskie wskaźniki zakażenia *Ch. pneumoniae* (1/48 czyli 2.1%) i HHV-6 (4/48, 8.3 %) nie wykrywaliśmy również koinfekcji w grupie kontrolnej. d wyniki badań wskazują że duża grupa pacjentów z ASD posiada potwierdzone bakteryjne lub wirusowe infekcje.

Procent pacjentów z ASD z chronicznymi infekcjami



Ryc. 4: Procentowa częstość infekcji bakteryjnych i wirusowych wśród 48 pacjentów z zaburzeniami autystycznymi (ASD). Zakres [range] wskazuje rezultaty z różnych laboratoriów.

6. Zespół Chronicznego Zmęczenia (Chronic Fatigue Syndrome CFS/ME)

Przewlekłe zmęczenie jest stwierdzane u 20% pacjentów szukających porady lekarskiej (42). Jest to związane z wieloma stanami w medycynie i może być drugoplanowym stanem towarzyszącym w wybranych chorobach chronicznych.

Jakkolwiek przewlekłe zmęczenie może być związane z wieloma chorobami zespół CFS i ME oraz fibromialgia (FMS – Fibromialgia Syndrome) są wyróżniane jako oddzielne stany chorobowe co jest oparte na aktualnych kryteriach klinicznych (43). Jakkolwiek oznaki kliniczne i symptomy choroby ściśle są ze sobą związane CFS/ME jest charakteryzowane jako niewyjaśnione utrzymujące się stale przewlekłe i długotrwałe zmęczenie fizyczne uniemożliwiające lub poważnie utrudniające wykonywanie codziennych czynności którym towarzyszyć mogą inne objawy podczas gdy pacjenci z FMS (Fibromialgia Syndrome) cierpią przede wszystkim z powodu bólów mięśni, osłabienia i opuchnięć (44). U pacjentów z jedną z tych chorób inne choroby które mogłyby wyjaśnić dodatkowo występujące objawy są nieobecne. Jakkolwiek istnieje wielu pacjentów u których objawy choroby nakładają się na siebie i niezwykle trudno jest postawić właściwą diagnozę odróżniając CFS/ME od FMS.

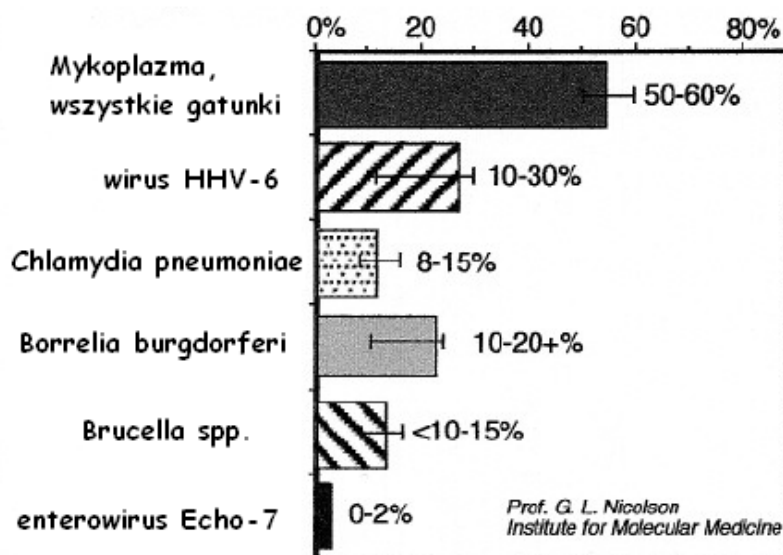
CFS/ME i FMS są chorobami spokrewnionymi z anomaliami w funkcjonowaniu układu odpornościowego i chorobami infekcyjnymi (34,45). Pacjenci z CFS/ME nie mogą być podzieleni na istotne kliniczne subkategorie które wyrażają różne stany choroby i zaburzenia okołochorobowe (46). Istotne ustalenie dla chorych na CFS/ME pacjentów stwierdza, iż charakterystyczna jest u nich obecność chronicznych bakteryjnych lub wirusowych infekcji (9, 10, 33, 35).

Określenie rodzaju infekcji systemowej występującej w CFS/ME takiej jak np. ta powodowana przez gatunek Mycoplazm, Chlamydię pneumoniae, różne gatunki Brucella, Borrelia burgdorferi i wirusa opryszczki HHV-6 (wykres 4.1), jest bardzo ważne w określeniu postępowania w leczeniu wielu pacjentów z CFS/ME.

Pomimo, iż nie została wyizolowana pojedyncza przyczyna która może powodować CFS/ME wzrasta liczba doniesień jakoby choroby te miały naturę infekcyjną, co może być również bezpośrednią przyczyną choroby, kofaktorem jej wystąpienia lub czynnikiem zwiększającym śmiertelność (34).

Istnieje kilka niezależnych powodów takiej sytuacji (39), włączając do nich nierzadkie lub grupowe przypadki pojawiania się CFS/ME, czasem u członków najbliższej rodziny, obecność szczególnych oznak i objawów choroby związanych z infekcją, częsty charakter cykliczny choroby i jej odpowiedź na terapie antyinfekcyjne (47).

Procent pacjentów z CFS z różnymi infekcjami bakteryjnymi/wirusowymi



Ryc. 4(1): Procentowa częstość różnych koinfekcji bakteryjnych i wirusowych wśród 100 pacjentów z CFS/ME. Przedziałki wskazują zakres wartości znalezionych w różnych niezależnych studiach.

Przy użyciu krwi 100 pacjentów z CFS/ME i reakcji łańcuchowej polimerazy w medycynie sądowej odkryliśmy że większość pacjentów wykazuje obecność złożonej systemowej infekcji bakteryjnej i wirusowej (współczynnik prawdopodobieństwa – 18.0, 95% CL 8.5-37.9), $P < 0.001$) które mogą odgrywać zasadniczą rolę w śmiertelności pacjentów z CFS/ME (10,48). Pacjenci z CFS/ME mają przewagę koinfekcji czterech gatunków mykoplazm (współcz. prawdopodobieństwa = 13.8, 95% CL 5.8-32.9), $P < 0.001$) i często wykazują dowody koinfekcji różnymi gatunkami mykoplazm, chlamydii pneumoniae (współcz. prawdopodobieństwa = 8.6, 95% CL 1.0 – 71.1), $P < 0.001$) i /lub aktywnym wirusem ludzkiej opryszczki – 6 (HHV-6), (współczynnik prawdopodobieństwa = 4.5, 95% CL 2.0 – 10.2, $P < 0.001$). Odkryliśmy, że 8% pacjentów z CFS wykazuje objawy zakażenia Ch. pneumoniae oraz 31 % aktywną infekcję HHV- 6. W oddzielnym badaniu odkryliśmy, że zbliżona procentowo grupa pacjentów z CFS/ME była zainfekowana krętkiem Borrelia burgdorferi i w takich sytuacjach cierpiała z powodu aktywnej infekcji Choroby z Lyme.

Wystąpienie jednej infekcji predysponuje pacjenta do wystąpienia kolejnej. Przebadaliśmy większość pacjentów z zakażeniem Chlamydia pneumoniae i aktywną infekcją HHV-6 u osób posiadających pozytywne i negatywne wyniki zakażenia mykoplazmą. Występowalność Ch. pneumoniae lub HHV-6 była podobna u pacjentów z dodatnim i negatywnym testem na obecność mykoplazm, co sugeruje, iż takie infekcje pojawiają się niezależnie u pacjentów z CFS. Również występowalność aktywnego zakażenia Ch. pneumoniae u pacjentów z negatywnym i pozytywnym wynikiem testu na HHV- 6 była podobna. Grupa kontrolna N-100 miała niskie wskaźniki mykoplazmalne (6%) aktywnego HHV- 6 (9%) i zakażenia chlamydia (1 %) infekcji i nie stwierdzano koinfekcji w grupie kontrolnej. Różnice w występowaniu infekcji bakteryjnej lub wirusowej w CFS/ME w porównaniu z grupą kontrolną były znaczące. Wyniki wskazują, że relatywnie szeroka grupa pacjentów z CFS/ME wykazuje dowody istnienia koinfekcji bakteryjnych i wirusowych.

7. Choroba z Lyme (Lyme Disease LD)

Choroba z Lyme jest najczęściej występującą po ugryzieniu chorobą w Ameryce Północnej. Pierwszy raz opisana w starym miasteczku Lyme w stanie Connecticut w 1975 roku. Infekcja jest spowodowana przez ugryzienie kleszcza i wniknięcie pod skórę spiralnego kształtu krętka bakterii Borrelia burgdorferi oraz innych koinfekcji (49). Borelioza i towarzyszące jej możliwe koinfekcje dostają się do nowego środowiska przez różne ugryzienia i towarzyszące im czynniki. Po okresie wylegania który trwa od kilku dni do miesiąca krętek boreliozy i/lub koinfekcji migruje przez skórę do tkanek podskórnych, do limfy i do krwi skąd nadal może podróżować dalej do bardziej i mniej oddalonych organów (50). Zakażenie krętkiem boreliozy i koinfekcji przez łożysko oraz przez

transfuzję krwi jest możliwe i zdarza się jednak jest nieudowodnione naukowo. Choroba z Lyme i koinfekcje po ugryzieniu mogą i zazwyczaj pojawiają się w tym samym czasie. Jak zaznaczono powyżej oznaki i objawy choroby z Lyme mogą się nakładać na występujące wcześniej choroby i zaburzenia. Więc pacjenci z chorobą z Lyme są często diagnozowani na obecność innej choroby takiej jak zazwyczaj CFS/ME lub reumatoidalne zapalenie stawów. Jakkolwiek wielu pacjentów nie uzyskuje właściwej diagnozy przez lata i przez ten czas doświadcza nieefektywnego leczenia co przyczynia się do wzrostu uporczywości choroby.

Około jednej trzeciej przypadków Choroby z Lyme rozpoczyna się od pojawienia się okrągłego, czerwonego, (zazwyczaj z przejaśnieniem w środku) rumienia erythema migrans po tej samej stronie ciała na której doszło do ugryzienia, zazwyczaj po około 3 do 30 dniach (50). W ciągu od kilku dni do kilku tygodni do łagodnych objawów grypopodobnych mogą dołączyć inne takie jak dreszcze, stany podgorączkowe oraz miejscowe powiększenie węzłów chłonnych. Po lokalnej fazie, która może trwać kilka tygodni do kilku miesięcy infekcja może się rozprzestrzenić w innych kierunkach i przejść w fazę rozsianą choroby w której pacjenci cierpią z powodu złego samopoczucia, przewlekłego zmęczenia gorączki i dreszczy, bólów głowy, sztywnego karku, porażenia nerwu twarzowego (porażenie Bella), bólów mięśni i stawów oraz innych objawów.

Choroba z Lyme może stać się chorobą przewlekłą i zająć centralny i peryferyjny układ nerwowy jak również spowodować inwazję mięśniową, kardiologiczną oraz zaatakować inne organy wewnętrzne (również oczy). W swojej późnej fazie przewlekłej zazwyczaj pojawiają się: reumatoidalne zapalenie stawów, zaburzenia neurologiczne, zaburzenia pamięci (łącznie z jej utratą), problemy kardiologiczne, zapalenie mięśnia serca (myocarditis), zapalenie wsierdzia (endocarditis), które mogą powodować palpacje, ból, bradykardię, duszność itp. Jak również często spotykane chroniczne zmęczenie (51,52).

W późnej chronicznej fazie choroby zazwyczaj nakładają się na siebie różne inne zaburzenia takie jak CFS/ME, FMS, reumatoidalne zapalenie stawów, pośród innych możliwych do pojawienia się zaburzeń, co powoduje trudności w postawieniu diagnozy i leczeniu tej fazy choroby. Niektórzy twierdzą, iż ta przewlekła faza nie jest nawet związana z chorobą z Lyme, czego skutkiem jest opóźnienie podjęcia właściwego leczenia. Wpływ koinfekcji na pogorszenie przebiegu i nasilenie objawów choroby nie został dokładnie przeanalizowany, jednak infekcje te zostały przeanalizowane oddzielnie i dowiedziono, iż powodują porównywalne objawy. Diagnostyka laboratoryjna choroby z Lyme w poszczególnych stadiach choroby jest niestety nie do końca możliwa do wykonania i eksperci używają korelacji występujących u pacjentów objawów oraz złożonych testów laboratoryjnych do diagnozy (53). Testy laboratoryjne używane do diagnozowania choroby z Lyme zawierają: wykrywanie antygenów powierzchniowych *Borelia burgdorferi* metodą próby enzymatycznej EIA, próbę immunofluorescencyjną IFA i metodę wykrycia białek *Borrelia* metodą Western Immunoblot, alternatywnie jest używana łańcuchowa reakcja polimerazowa PCR wykrywająca DNA bakterii i jest używana do wykrycia nieuszkodzonej bakterii we krwi. Pozytywny pewny wynik jest zazwyczaj uzyskiwany w przypadku otrzymania więcej niż jednego pozytywnego wyniku z testów wymienionych powyżej, zazwyczaj niepotwierdzonego Western Blottem (54).

Problem z tymi testami polega na tym, iż są to testy z krwi wymagające dla uzyskania miarodajnego wyniku obecności przeciwciał, białek lub DNA bakterii we krwi (PCR). Nasi badacze wraz z innymi odkryliśmy (55), że najczęściej spotykaną koinfekcją Boreliozy są różne gatunki Mykoplazm (wykres 5) około 50 - 70 % pacjentów z LD posiada również koinfekcje mykoplazmalne (*Mycoplasma fermentans*>*Mycoplasma hominis*>*Mycoplasma pneumoniae*> *M. genitalium*, *M. penetrans* i inne gatunki. W niektórych przypadkach u pacjentów z LD występują złożone infekcje mykoplazmalne.

Obecność koinfekcji mykoplazmalnej utrudnia diagnozę i leczenie LD, niektóre z najczęściej spotykanych objawów u pacjentów z boreliozą występuje również u pacjentów z zakażeniem mykoplazmą. Tak jak krętek boreliozy gatunki mykoplazm bytują wewnątrzkomórkowo w różnych tkankach i bardzo rzadko są odnajdywane we krwi.

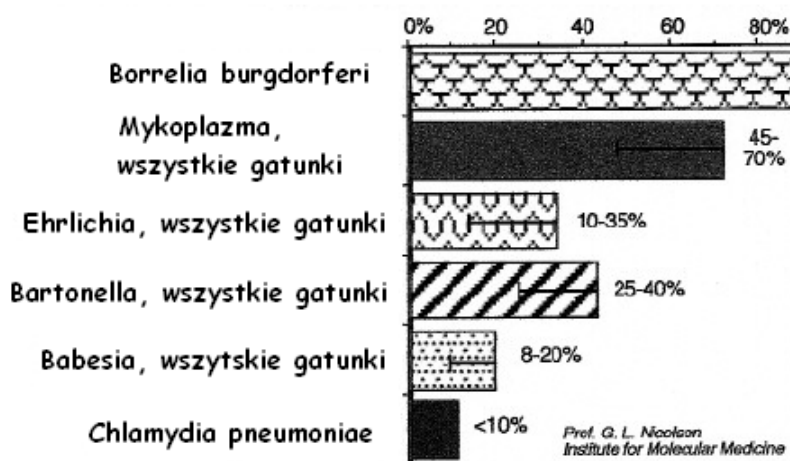
Taka sytuacja powoduje, że ich wykrycie staje się bardzo trudne, u pewnej grupy pacjentów pojawianie się krętków boreliozy i mykoplazm w ich białych komórkach krwi może być cykliczne.

Inna często spotykana u pacjentów chorych na boreliozę infekcją jest zakażenie różnymi gatunkami bakterii Ehrlichia (51). Te małe gram ujemne pleomorficzne zazwyczaj wewnątrzkomórkowe bakterie są podobne do mykoplazm w swojej strukturze wewnątrzkomórkowej, lokalizacji czego skutkiem jest podobnie objawiająca się infekcja. Najczęściej spotykane gatunki to *E. Chaffensis* i *E. Phagocytophila*. Organizmy te mogą powodować objawy 1-3 tygodni po ekspozycji takie jak: gorączka, dreszcze, bóle głowy, bóle mięśni, osłabienie, tkliwość oraz rzadziej spotykane nudności, wymioty, bóle brzucha, biegunkę, kaszel i uczucie rozbicia (51).

Badania laboratoryjne ujawniają łagodną do wyrównania postać przemijającej anemii hemolitycznej, spadki w liczbie białych krwinek leukopenię, trombocytopenię i podwyższone OB (elevated erythrocyte sedimentation

rate), czasami podwyższenie enzymów wątrobowych i jeszcze rzadziej wzrost poziomu mocznika, azotanów i kreatyniny. Pozytywne wyniki serologii udaje się uzyskać zazwyczaj po upływie 1-2 tygodni z ograniczeniami takimi jak omówione wcześniej. Odkład hodowla mikroorganizmów stała się mało użyteczna, do badań używamy metody badania poziomu przeciwciał i testów metodą PCR, aby móc potwierdzić infekcję. Koinfekcje utrudniają postawienie właściwej diagnozy i powodują dodatkowo objawy zbliżone do LD. Infekcje te mogą również pojawiać się w różnych kombinacjach. Na przykład wewnątrzkomórkowy pierwotniak *Babesia spp* (56), występuje ponad 100 jego gatunków które wywołują babeszjozę, ale większość infekcji u ludzi w Ameryce Płn. jest powodowana przez gatunek *Babesia microti*, natomiast w Europie przez *Babesia divergens* i *Babesia bovis*. Około 10-40% przypadków pacjentów z chorobą z Lyme wykazuje koinfekcje babeszjozy. Ponadto pacjenci z chorobą z Lyme posiadają również zakażenia różnymi gatunkami *Bartonella* (przykład 5).

Pacjenci z chorobą z Lyme są nosicielami różnych gatunków mikrobiologicznych



Ryc. 5: Procentowa częstość różnych koinfekcji bakteryjnych wśród 100 pacjentów z chorobą z Lyme [borelioza i koinfekcje]. Przedziałki wskazują zakres wartości uzyskanych w różnych laboratoriach.

Kiedy pacjent posiada złożone infekcje liczba objawów, sygnałów choroby, ich dotkliwość czas trwania mogą być bardziej nasilone już we wczesnych stadiach choroby (56), do nasilonych objawów zaliczamy: gorączkę, dreszcze, uogólnione osłabienie, objawy gastrologiczne: anorexię, nudności, bóle brzuszne, wymioty, biegunkę, (oraz pośród innych), anemię, bóle mięśni i stawów problemy z oddychaniem i ciemny moc. Koinfekcja zakażeń *Borrelia*, *Mycoplasma* i *Babesia* może być u niektórych pacjentów letalna, jednak około 7% pacjentów może mieć Rozsiane Wykrzepianie Śródnaczyniowe (DIC), Zespół Ostrej Niewydolności Oddechowej i zaburzenia pracy serca, ale większość pacjentów z babeszjozą choruje na przewlekłą postać choroby.

W infekcji babeszjozą pacjenci mogą mieć od łagodnej do ostrej hemolityczną anemię prawdopodobnie związaną z kolonizacją pierwotniaka w erytrocytach co może zostać wykryte podczas ręcznego rozmazu krwi obwodowej i lekko obniżoną liczbę leukocytów (56). Jakkolwiek jest to rzadko obserwowane u pacjentów w przewlekłej fazie choroby.

Pacjenci chorzy na chorobę z Lyme są zawsze w grupie ryzyka zakażenia przewlekłymi infekcjami bakteryjnymi wirusowymi i grzybiczymi. Może to komplikować postawienie rozpoznania i opóźnić podjęcie właściwego leczenia szczególnie poważny problem mogą one stanowić w późnej chronicznej fazie choroby. Pacjenci w późnym stadium choroby z zaburzeniami neurologicznymi, neuropatią peryferyjną, i innymi objawami mogą mieć powikłania związane z obecnością koinfekcji które nie zostały rozpoznane i leczone właściwie przez ich lekarza prowadzącego.