



DIJAGNOSTIKA BORELIOZE

Oktavija Đaković Rode
 Klinika za infektivne bolesti «Dr. Fran Mihaljević», Zagreb
 Travanj, 2008.

Lyme borelioza (LB)

UZROČNIK

Borrelia burgdorferi sensu lato:

Borrelia burgdorferi sensu stricto

Borrelia afzelii

Borrelia garinii

Borrelia spielmanii

Borrelia lusitaniae

Borrelia bissettii

Borrelia valaisiana



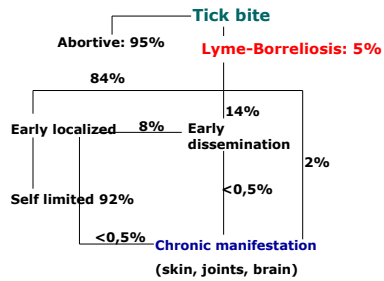
Kliničke manifestacije LB

- **LB JE MULTISISTEMNA UPALNA BOLEST!**
- Simptomi raznoliki, nespecifični:
 - upućuju na borelije
 - potpuno nespecifični
- Često diferencijalno dijagnostički nejasno
- ~64% pacijenata s LB se ne sjeća ugriza krpelja!

Lyme borelioza (LB)

- Povezana s genospecijesom koji uzrokuje bolest
 - *Borrelia afzelii*: kožne manifestacije (ACA)
 - *Borrelia garinii*: neuroborelioza
 - *Borrelia burgdorferi sensu stricto*: artritis

Lyme borelioza (LB)



Stage 1

Stage 2

Stage 3

Daghofer, 2005.

LB faza 1.

- 5-40 dana (najčešće 10 dana)
- Kožna manifestacija:
 - Erythema (chronicum) migrans (EM);
 - Lymphadenosis cutis benigna (borelijski limfocitom)
- Opći simptomi: “flu-like” bolest, mialgija, artralgija

LB faza 2.

- Rana diseminacija: 2-12 tjedana
 - Karditis
 - Neuroborelioza - Bannwarthov sy. – meningo-poliradikuloneuritis
 - Artritis

LB faza 3.

- Kronične manifestacije: 6-12 mjeseci
 - Dermatoborelioza: *Acrodermatitis chronica atrophicans* (ACA)
 - Neuroborelioza:
 - ACA - *associated mono(poly)-neuritis*;
 - progresivni encefalomijelitis
 - Artritis: *Mono (poly-) arthritis*

Lyme borelioz (Steer, 2001.)				
LB	KOŽA	ŽIVČANI SUSTAV	SRCE	MIŠIČNO-KOŠTANI SUSTAV
Akutna faza	Erythema (chronicum) migrans – sporo širenje, slabija upala, dulje trajanje; rijetko hematogena diseminacija, moguće lokalno i kontinuirano širenje; borelijski limfocitom rijetko (češće u djece)	Meningo-poliradikuloneuritis uz izrazitu radikularnu bol, pleocitoza i intratekalna produkcija antitijela	AV-blok i miokarditis	Oligoartikularni artritis (rijetko); manje izražena upala zgloba
Kronična faza	Acrodermatitis chronica atrophicans (ACA)	Suptilna senzorna neuropatija često u području ACA. Teški spastički encefalomijelitis; kognitivne promjene; značajna intratekalna produkcija antitijela	Dilatativna kardiomiopatija (rijetko)	Rijetko perzistentni artritis

TERAPIJA LB

(Strle 1999; Wormser 2000, 2006.)

- **PREPORUČENO TRAJANJE TERAPIJE: 2-4 tjedna**
- **Solitarni EM i borelijskim limfocitom** – doksiciklin, amoksicilin, cefuroksim-aksetil, fenoksimetilpenicilin (iznimno azitromicin) – uobičajeno trajanje **14 dana**.
- **SŽS i LB karditis** – ceftriakson, cefotaksim, penicilin G **2-3 tjedna**
 - Iznimno – po. doksiciklin, amoksicilin
- **ACA, artritis** – ceftriakson, penicilin G, doksiciklin, amoksicilin, cefuroksim
 - **trajanje th.** – 3 tj. ACA; 2 tj. artritis; 4 tj. po. th. artritisa
 - 10% artritisa ne odgovori na th.
- **PARENTERALNA TERAPIJA** – zahvaćenost SŽS; th. EM u trudnica (Maraspin 1996.); u imunodeficijentnih pacijenata

DIJAGNOSTIKA LB

- **KLINIČKA SLIKA** - tipične kliničke manifestacije
- **MIKROBIOLOŠKA DIJAGNOSTIKA**
 - IZRAVNA
 - KULTIVACIJA, IZOLACIJA
 - PCR
 - NEIZRAVNA
 - SEROLOŠKO TESTIRANJE

KULTIVACIJA → IZOLACIJA BORELIJA

- **UZORCI:** koža, likvor, krv, sinovijalna tekućina
- **HRANILIŠTE:**
 - modificirana podloga Kelly-Pettenkofer (MKP),
 - Barbour-Stoenner-Kelly (BSK-II, BSK-H)
- Uzgoj na 33°C 9 tjedana
- Borelije prisutne u uzorcima **periodično** i u **malom broju** → potreban što veći inokulum (npr. 2 mL likvora, 10 mL krvi)
- **Osjetljive** na vanjske promjene → što prije inokulirati u hranilište
- Pokušaj kultivacije posebno značajan kod **neprecifnih kliničkih manifestacija**

KULTIVACIJA → IZOLACIJA BORELIJA

- Uspjeh ovisi o:
 - Količini uzorka
 - Manipulaciji s uzorkom
 - Kliničkim manifestacijama:
 - Koža
 - EM 70%
 - ACA 40%
 - Krv, likvor, drugo <10%

Spoznaje o patogenezi borelioze prema rezultatima kultivacije borelija

- Izolirane iz krvi i likvora u pacijenata s EM
 - dokaz diseminacije rano nakon infekcije
- Izolirane u pacijenata s visokim titrom At.
 - specifična At. nisu sposobna eradicirati Bb
- Izolacija nakon provedene terapije
 - iako su Bb osjetljive na antibiotike posjeduju mehanizme kojima prežive

KULTIVACIJA → IZOLACIJA BORELIJA

- Genotipska i fenotipska karakterizacija izoliranih sojeva
- Pokazuje različitu geografsku distribuciju sojeva i grubu povezanost sojeva s kliničkim slikama

PCR

- CILJNE MOLEKULE → **SPECIFIČNOST:**
 - *B. burgdorferi* sensu lato DNK
 - kromosomna DNK (16S rRNK gen, gen flagelina)
 - plazmidna DNK (gen za OspC, OspA)
- **OSJETLJIVOST** → ovisi o broju borelija u uzorku (koža, likvor, krv, sinovijska tekućina)
 - Za neke pacijente kultivacija je osjetljivija
- Brza metoda
- Nije standardizirana
- Mogućnost lažno negativnih rezultata → heterogenost DNK – različite ciljne molekule
- Problem inhibicije
- Lažno pozitivni – kontaminacija

SEROLOŠKI TESTOVI

- Određivanje specifičnih IgM i IgG protutijela
- **Uzorci:** serum, likvor, sinovijska tekućina

Nastanak specifičnih protutijela u LB ovisi o:

- fenotipskim karakteristikama borelija
- različitoj antigenskoj strukturi borelija
- različitoj geografskoj rasprostranjenosti borelija
- sposobnosti bolesnika da reagira na infekciju

IMUNOSNI ODGOVOR NA *B. burgdorferi sensu lato*

- Javlja se relativno **kasno** - nekoliko tjedana do nekoliko mjeseci nakon infekcije
 - protutijela IgM nakon 3-6 tjedana
 - protutijela IgG od 6. tjedna do nekoliko mjeseci kasnije
- Kod nekih pacijenata imunosni odgovor se **ne razvija**
 - imunosna nereaktivnost bolesnika na infekciju
 - slabi ili spori reaktori
- Specifična protutijela **nisu protektivna**
 - dijagnostičko značenje
- Prisutna u zdravih osoba

Metode određivanja specifičnih protutijela IgM i IgG nakon infekcije *B. burgdorferi sensu lato*

- Imunoenzimski test (EIA)
- Imunofluorescentni test (IFA)
- Imunoblot test (Western blot (WB))
- Testovi hemaglutinacije

Serološki testovi

- Nisu standardizirani
- Specifičnost i osjetljivost je različita
- **Testovi se razlikuju prema:**
 - vrsti borelije, odnosno soju unutar vrste od kojeg se pripravlja antigen
 - načinu pripreme antigena
 - cijela borelija
 - pročišćeni borelijski antigeni
 - rekombinantni antigeni
 - metodi testiranja

Kriteriji serološke dijagnostike prema Centers for Disease Control (CDC)

- Serološka dijagnostika u dva koraka
- Sve reaktivne i granične rezultate EIA ili IFA treba potvrditi imunoblot (WB) testom
- Ako je nalaz WB negativan, reaktivne EIA/IFA testove treba interpretirati kao lažno pozitivne!

KRITERIJI INTERPRETACIJE TESTA WESTERN BLOT PREMA CDC

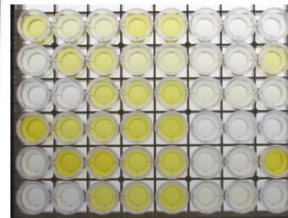
CDC kriteriji za pozitivna protutijela IgM:

- NAJMANJE DVIJE POZITIVNE FRAKCIJE OD TRI:
- 25 kD(OspC), 39 kD(BmpA), 41 kD(Fla)

CDC kriteriji za pozitivna protutijela IgG:

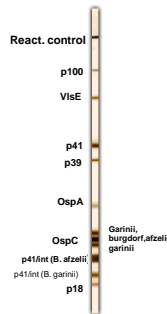
- POZITIVNO NAJMANJE 5 OD 10 FRAKCIJA:
- 18; 25 (OspC); 28; 30; 39(BmpA); 41(Fla); 45; 58; 66; 93

Imunoenzimski test (EIA)



ELISA assay
(b)

recomBlot Borrelia – kontrolna traka WB



INTERPRETACIJA SEROLOŠKIH NALAZA

- Serološki rezultat se interpretira kao **reaktivan** (pozitivan) ako prelazi «normalnu granicu» obično definiranu tako da obuhvaća 95% populacije.
- Prema tom kriteriju oko 5% zdravih pojedinaca imat će pozitivan serološki rezultat.
- Ako se testiranja izvode dovoljno često i pacijenti bez LB imat će barem jedan pozitivan ili graničan rezultat.

Pozitivna prediktivna vrijednost (PPV) i negativna prediktivna vrijednost (NPV) seroloških testova za Lyme boreliozu, temeljeno na testovima s pretpostavljenom osjetljivošću od 95% i specifičnošću od 90% i pretpostavljenom prevalencijom LB od 0,01%, 0,1%, 1%, 5%, 10% i 50%.

Pretpostavljena prevalencija	Rezultati testa	Prisutna bolest (broj osoba)	Odsutna bolest (broj osoba)	Ukupno (broj osoba)	PPV %	NPV %
0.01 %	pozitivno	95	99.990	100.085	0.09	99.9994
	negativno	5	899.910	899.915		
	ukupno	100	999.900	1.000.000		
0.1 %	pozitivno	95	9.990	10.085	0.94	99.994
	negativno	5	89.910	89.915		
	ukupno	100	99.900	100.000		
1 %	pozitivno	95	90	1.085	8.8	99.7
	negativno	5	8.910	8.915		
	ukupno	100	9.900	10.000		
5 %	pozitivno	475	950	1.425	33	99.7
	negativno	25	8.550	8.575		
	ukupno	500	9.500	10.000		
10 %	pozitivno	950	900	1.850	51.4	99.4
	negativno	50	8.100	8.150		
	ukupno	1.000	9.000	10.000		
50 %	pozitivno	950	100	1.050	90.5	94.7
	negativno	50	900	950		
	ukupno	1.000	1.000	2.000		

Rana faza LB

- Klinička slika nije specifična za LB
 - imunosni odgovor bolesnika sličan je imunom odgovoru zdrave populacije na tom geografskom području
 - serološki testovi mogu ostati nereaktivni
 - obavezno je testiranje parnog uzorka u razmaku od 4 - 6 tjedana, a zatim nakon 3, 6 i 12 mjeseci istom metodom u istom laboratoriju
- Serokonverzija može biti potvrda LB
- **Dijagnozu rane LB treba temeljiti na:**
 - kliničkoj slici
 - detaljnoj anamnezi
 - epidemiološkim podacima

Kasna faza LB

- Specifičan imunosni odgovor rijetko izostaje
 - većina bolesnika ima IgG, koji cijelo vrijeme mogu pratiti IgM
- Specifičnost protutijela treba potvrditi WB:
 - reaktivni IgM bez IgG kroz dulje vrijeme ne može se interpretirati kao pokazatelj nedavne (recentne) infekcije
 - za potvrdu dijagnoze u pacijenata koji su duže vrijeme bolesni, treba dokazati protutijela IgG!
- U pacijenata s **neuroboreliozom** protutijela se mogu stvarati samo **intratekalno!**

Kasna faza LB

- Kod ranog uvođenja antibiotske terapije ili kod slabih reaktora humoralni imunosni odgovor može biti prekinut
 - nakon antibiotske terapije titar protutijela sporo pada
 - IgG i IgM mogu perzistirati mnogo godina nakon provedene terapije
- **Ponavljanje serološkog testiranja nakon provedene terapije nije indicirano** budući da IgM može perzistirati nakon terapije
- Promjena titra IgG **nije** mjerilo uspješnosti terapije.

“Lažno pozitivni / reaktivni” odgovor protutijela za *B.burgdorferi* sensu lato

- autoimune bolesti
 - juvenilni reumatoidni artritis
 - reumatoidni artritis
 - SLE
- infekcije EBV, CMV (nespecifična aktivacija limfocita B)
- moguća križna reakcija s:
 - *Treponema pallidum*
 - oralnim treponemama
 - drugim vrstama borelija (*B.recurrentis*, *B.duttonii*, *B.hermsii*)
 - *Leptospira* spp.- rjede
 - *Escherichia coli*; hemofilusom

UPOZORENJA PRI INTERPRETACIJI SEROLOŠKIH REZULTATA



UPOZORENJA PRI INTERPRETACIJI SEROLOŠKIH REZULTATA 1

- Protutijela se mogu **detektirati dugo** nakon što je LB izliječena
 - Dugotrajno praćenje temeljeno samo na serološkim testovima može zavesti na krivi put
- Protutijela **IgM** mogu se koristiti samo u **ranj dijagnostici**
 - Seroreaktivnost IgM = marker nedavne ekspozicije, NIJE marker aktivne infekcije.
- U pacijenata s **kasnim manifestacijama**, seropozitivnost je gotovo univerzalna.
 - Iako postoje «seronegativne LB», **seronegativnost** pacijenata s navodnom kasnom LB povećava **sumnju** u dijagnozu LB

UPOZORENJA PRI INTERPRETACIJI SEROLOŠKIH REZULTATA 2

- Seropozitivnost **ne dokazuje uzročnost** bolesti
 - Pacijenti su mogli ranije imati LB (ili mogu imati lažno pozitivne EIA rezultate) te razviti simptome koji nisu vezani uz borelijsku infekciju
- Promjene EIA rezultata ne može se vrednovati usporedbom rezultata **različitih laboratorija**:
 - dva uzorka se moraju **testirati uvijek u istim laboratorijskim uvjetima**
- Rezultat serološkog testa mora se **pravilno interpretirati** poznavajući kriterije za «pozitivan» - «reaktivan» rezultat

UPOZORENJA PRI INTERPRETACIJI SEROLOŠKIH REZULTATA 3

- Testiranje **likvora ili sinovijske tekućine** na specifična protutijela koja se određuju u odnosu na istovremeno uzeti i testirani serum → dokaz **lokalne** upale uzrokovane borelijama:
 - određivanje **antibody index-a** prema razini ukupnih proteina i imunoglobulina u istom uzorku seruma i ispitivane tekućine

**Neke od ZABLUDA
iz kojih proizlaze alternativni pogledi na LB - 1**

- “Atipične manifestacije LB su češće nego što smatraju stručnjaci.”
- “Kronična LB može uzrokovati širok i do sada nepotpuno opisan (možda neograničen) spektar kliničkih simptoma.”
- “Mnogi pacijenti imaju ozbiljne simptome, ali izostaju objektivni klinički nalazi.”
- “Sindromi, čak i simptomi borelijskih infekcija tako su klasični i jedinstveni da se ne treba provjeravati druge potencijalne uzročnike – često nije potreban postupak diferencijalnog dijagnosticiranja.”
- “Mnogo je letalnih slučajeva LB, ali se informacije o tome ne objavljuju.”

**Neke od ZABLUDA
iz kojih proizlaze alternativni pogledi na LB - 2**

- “Seronegativnost u LB je tako česta da **negativan rezultat** serološkog testa nema značenje u dijagnostici.”
- “**Pozitivni serološki rezultat** potvrđuje dijagnozu, čak i kad seropozitivnost raste i pada, ne može se potvrditi imunoblotom i može se naći samo u jednom od više laboratorija koji su primili isti uzorak krvi uzet istog dana.”
- “Screening ELISA je vrijedan test za otkrivanje **atipičnih** slučajeva LB.”

**Neke od ZABLUDA
iz kojih proizlaze alternativni pogledi na LB - 3**

- “Standardna antibiotska **terapija** nije učinkovita ili je njezin učinak samo prolazan.”
- “Značajan udio svih slučajeva LB **nije izlječiv**; antibioticima se mikroorganizmi nikad ne eradiciraju već samo dolazi do remisije bolesti.”
- “Izostanak odgovora na antibiotsku terapiju je dosta čest u pacijenata s **kroničnom infekcijom**.”

**ZNANSTVENE ČINJENICE O LB KOJE
OSPORAVAJU
«ALTERNATIVNI POGLED»**

Znanstvene činjenice o LB koje osporavaju «alternativni pogled»

- ✓ Klinička slika LB relativno je dobro definirana.
- ✓ Prava LB je povezana s objektivnim kliničkim i laboratorijskim nalazima.
- ✓ Kad se koriste primjereno, serološki testovi mogu biti korisni za potvrdu dijagnoze bazirane na objektivnim kliničkim nalazima.
- ✓ **Negativan serološki rezultat jaki je dokaz protiv LB**, posebno ako se radi o neepidemijskom području i ako se uzmu u obzir kriteriji interpretacije seroloških rezultata.

Znanstvene činjenice o LB koje osporavaju «alternativni pogled»

- ✓ Standardna **antibiotska terapija** obično je učinkovita u liječenju bolesti i prevenciji progresije, iako ne univerzalno
- ✓ **Letalitet** opisan uz LB je izniman i obično slabo dokumentiran i može biti komplikacija uzrokovana drugom pratećom bolesti
- ✓ Prirodni tijek LB, čak i rane faze, može trajati u obliku nespecifičnih simptoma više mjeseci
 - ✓ mogu proći mjeseci i godine do nestanka kasnih manifestacija LB
 - ✓ u nekih pacijenata ostaju rezidualna oštećenja
- ✓ Većina kliničkih sindroma borelijske infekcije (osim *erythema migrans* i možda Bannwarthovog sindroma –meningo-poliradikuloneuritis) nije patognomonična za LB te nužno nameću potrebu sagledavanje problema diferencijalno-dijagnostički

Primjer dijagnostike neuroborelioze

CILJ:

- Prikazati serološki odgovor u pacijenata s kliničkom dijagnozom ili sumnjom na neuroboreliozu
- Ukazati na probleme u interpretaciji seroloških rezultata

MATERIJALI I METODE

- 28 pacijenata s kliničkom dijagnozom neuroborelioze (2001. g.)
- Serum i likvor su determinirani na anti-*B. burgdorferi* IgM i IgG pomoću rELISA (Biomedica, Wien, Austrija).
- Serumi pozitivni u rELISA potvrđeni su Western blotom (WB, Mikrogen, Njemačka ili DPC Biermann GmbH, Njemačka).
- Rezultati koji su upućivali na moguću neuroboreliozu obrađeni su testom za određivanje intratekalnih protutijela anti-*B. burgdorferi* IgM i IgG pomoću *capture* ELISA (cELISA, IDEIA Lyme Neuroborreliosis, Dako, Danska).
- Svi testovi su rađeni prema preporuci proizvođača.

REZULTATI

- 19/28 (67,9%) pacijenata imalo je WB potvrđeni EIA nalaz
- 21/28 (75,0%) pacijenata imalo je reaktivna at. u likvoru rELISA testom
- 11/28 (39,3%) pacijenata imalo je potvrđenu intratekalnu sintezu protutijela

Varijabilni serološki nalazi u 28 pacijenata s klinički mogućom neuroboreliozom

Anti- <i>B.burgdorferi</i> s.l. (METODA)	SEROLOŠKI NALAZI								
IgM/IgG serum (rELISA)	reaktivno	reaktivno	reaktivno	reaktivno	reaktivno	reaktivno	reaktivno	negativno	negativno
IgM/IgG CSF (rELISA)	reaktivno	reaktivno	reaktivno	negativno	negativno	reaktivno	negativno	reaktivno	reaktivno
IgM/IgG WB	pozitivno	pozitivno	negativno	pozitivno	pozitivno	negativno	negativno	pozitivno	negativno
AI* (cELISA) Neuroborelioz	pozitivno	negativno	negativno	negativno	pozitivno	pozitivno	negativno	pozitivno	negativno
Broj pacijenata	8 (28%)	6 (20%)	4 (14%)	3 (11%)	1 (4%)	1 (4%)	3 (11%)	1 (4%)	1 (4%)

ZAKLJUČAK

- Kod kliničke sumnje na neuroboreliozu nužno je testirati istovremeno serum i likvor
- Definirati značenje reaktivnih rezultata
- Odrediti *antibody index*
- DIJAGNOSTIČKO ZNAČENJE SEROLOGIJE OVISI O INDIVIDUALNOJ PROIZVODNJI PROTUTIJELA TIJEKOM BOLESTI I O KVALITETI SEROLOŠKE METODE.

SEROLOŠKE METODE

- Imunoenzimski test (EIA, ELISA)
- Imunofluorescentni test (IFA)
- Imunoblot (Western blot, WB)
- **Različiti antigeni:**
 - Cjelostanična *B.burgdorferi*
 - Bakterijski lizat
 - Specifični rekombinantni antigeni

NOVE DIJAGNOSTIČKE TEHNIKE

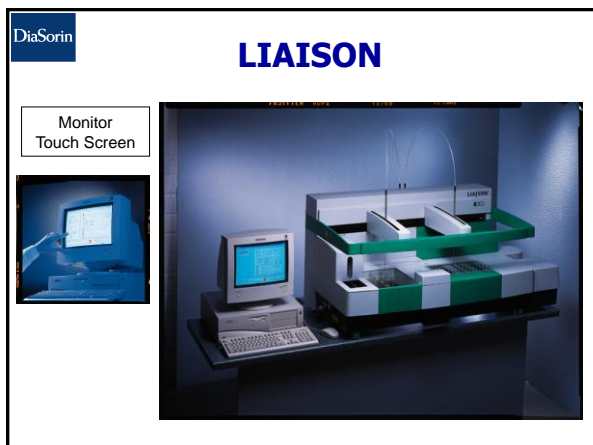
- Temelje se na rekombinantnim antigenima

- LIAISON
- LUMINEX

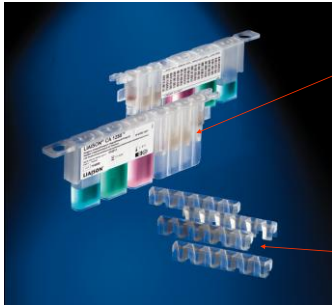
NOVE DIJAGNOSTIČKE TEHNIKE

- LIAISON

- Temelji se na tehnici “flash” kemiluminiscencije bazirane na **derivatu isoluminola** (ABEI) u kombinaciji s magnetiziranim mikročesticama
- Brzi rezultati visoke osjetljivosti



Liaison Integral



All the reagents, included calibrators, are on board. Reagents ready to use

Reaction module

NOVE DIJAGNOSTIČKE TEHNIKE

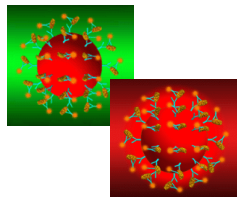
• LUMINEX

- Sustav koji se izvodi u jednoj fazi
- Može zamijeniti potvrđni imunoblot test budući da istovremeno određuje protutijela za različite antigene

BORRELIA

Luminex

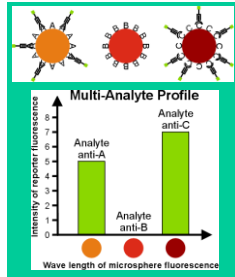
- Istovremena detekcija at. protiv različitih borelijskih antigena - MULTIPLEX
- Potpuno automatizirana analiza i evaluacija
- Specifičnost Western blota
- Osjetljivost ELISA



LUMINEX

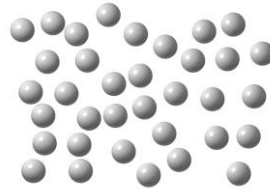


Multiplex detekcija

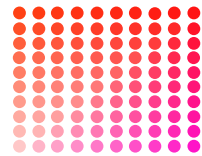


61

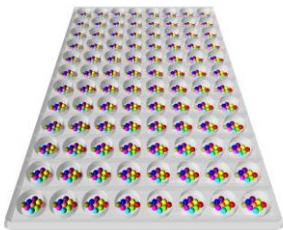
LUMINEX: kuglice kodirane bojom



2 Color Suspension Array *(100 distinctly different bead types)*

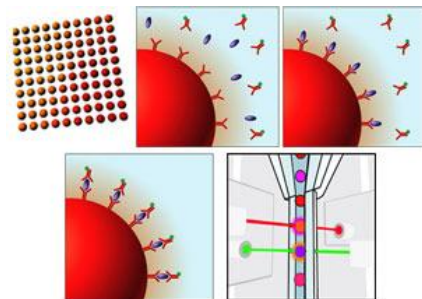


LUMINEX



Kuglice za platformu su kombinirane tako da tvore multiplex suspenziju. Suspenzija kuglica nalazi se u udubljanjima mikrotitarske ploče.

LUMINEX



ZAKLJUČAK

! SVI SEROLOŠKI REZULTATI MORAJU SE INTERPRETIRATI U SKLADU S KLINIČKIM I EPIDEMIOLOŠKIM PODACIMA !

! SEROLOŠKE TESTOVE TREBA KORISTITI KAO POTVRDU, A NE ZA DONOŠENJE DIJAGNOZE = «SEROLOŠKA DIJAGNOZA».

