



LYME BORELIOZA - DIJAGNOSTIKA -

Prim.dr.sc. Oktavija Đaković Rode
Klinika za infektivne bolesti «Dr. Fran Mihaljević», Zagreb

Lyme borelioza

UZROČNIK

Borrelia burgdorferi sensu lato:

Borrelia burgdorferi sensu stricto

Borrelia afzelii

Borrelia garinii

Borrelia spielmanii

Borrelia lusitaniae

Borrelia bissettii

Borrelia valaisiana



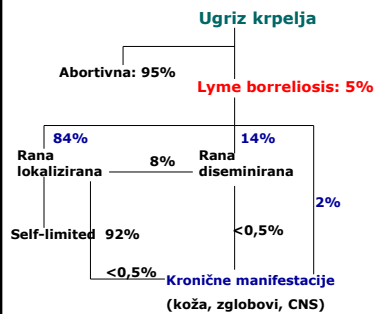
Kliničke manifestacije Lyme borelioze

- **MULTISISTEMNA UPALNA BOLEST!**
- Simptomi raznoliki:
 - upućuju na borelije – tipični (erythema migrans)
 - nespecifični
- Često diferencijalno dijagnostički nejasno
- ~64% pacijenata s LB se ne sjeća ugriza krpelja!

Lyme borelioza

- Manifestacije često povezane s vrstom borelija
- *Borrelia afzelii* → kožne manifestacije
- *Borrelia garinii* → neuroborelioza
- *Borrelia burgdorferi sensu stricto* → artritis

Lyme borelioza (LB)



Faza 1

Faza 2

Faza 3

Daghofer, 2005.

LB faza 1. – rana lokalizirana

- 5-40 dana (najčešće 10 dana)
 - Kožne manifestacije
 - Erythema migrans (EM)
 - Lymphocytoma benignum cutis (borelijski limfocitom)
 - Opći simptomi: “flu-like” bolest, mialgija, artralgija

LB faza 2. – rana diseminirana

- 2-12 tjedana
 - Erythema migrans disseminata (multipli EM)
 - Neuroborelioza
 - Bannwarthov sy. → meningo-poliradikuloneuritis
 - Artritis
 - Karditis

LB faza 3. – kasna

- 6-12 mjeseci
 - Dermaborelioza
 - Acrodermatitis chronica atrophicans (ACA)
 - Neuroborelioza
 - ACA - associated mono(poly)-neuritis
 - progresivni encefalomijelitis
 - Artritis
 - Mono (poly-) arthritis

DIJAGNOSTIKA LB

- **KLINIČKA SLIKA** - tipične kliničke manifestacije
- **MIKROBIOLOŠKA DIJAGNOSTIKA**
 - **IZRAVNA**
 - kultivacija, izolacija
 - PCR
 - **NEIZRAVNA**
 - serološko testiranje

KULTIVACIJA → IZOLACIJA BORELIJA

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

PCR

- **SPECIFIČNOST** → CILJNE MOLEKULE:
 - *B. burgdorferi* sensu lato DNK
 - kromosomna DNK (16S rRNK, 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

Osjetljivost metoda za izravno dokazivanje *B. burgdorferi*

UZORAK	OSJETLJIVOST
Koža <i>erythema migrans, acrodermatitis</i>	50-70% kultura ili PCR
Likvor akutna neuroborelioza	10-30% kultura ili PCR
Sinovijska tekućina Lyme arthritis	50-70% PCR - kultura je iznimno rijetko pozitivna

Wilske B. FEMS Immunol Med Microbiol 2007

SEROLOŠKI TESTOVI

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

Nastanak specifičnih protutijela u LB ovisi o:

- fenotipskim karakteristikama borelija
- antigenskoj strukturi borelija
- 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

Protutijela na *B. burgdorferi* s.l. u fazama LB

Faza LB	Osjetljivost	Razred protutijela
I	20-50%	Dominiraju IgM
II	70-90%	Kratko trajanje bolesti - IgM Dulje trajanje bolesti - IgG
III	Gotovo 100%	Gotovo isključivo IgG*

*prisutnost IgM bez IgG nije dijagnostički kriterij za kasne manifestacije

Rana faza LB

- Imunosni odgovor bolesnika sličan je imunom odgovoru zdrave populacije na tom geografskom području
 - serološki testovi mogu ostati nereaktivni
 - obavezno je testiranje parnog uzorka
 - Serokonverzija može biti potvrda LB
- **Dijagnozu rane LB treba temeljiti na:**
 - kliničkoj slici
 - detaljnoj anamnezi
 - epidemiološkim podacima

Kasna faza LB

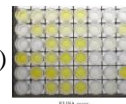
- Specifičan imunski odgovor rijetko izostaje
 - većina bolesnika ima IgG, koji cijelo vrijeme mogu pratiti IgM
- Specifičnost protutijela treba potvrditi WB:
 - reaktivni IgM bez IgG kroz dulje vrijeme ne može se interpretirati kao pokazatelj nedavne (recentne) infekcije
 - za potvrdu dijagnoze u pacijenata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

Kasna faza LB

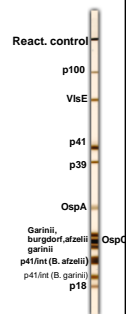
- Kod ranog uvođenja antibiotske terapije ili kod slabih reaktora humoralni imunski odgovor može biti prekinut
 - nakon antibiotske terapije titar protutijela sporo pada
 - IgG i IgM mogu perzistirati godinama nakon provedene terapije
- **Ponavljanje serološkog testiranja** nakon provedene terapije **nije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

Metode određivanja specifičnih protutijela IgM i IgG nakon infekcije *B.burgdorferi* s.l.

- Enzimski imunotest (EIA)



- Fluorescentni imunotest (IFA)
- Imunoblot test - Western blot (WB)
- *Test 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 EUCALB (European Union Concerted Action on Lyme Borreliosis)

- 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!

Stanek G et al. Clin Microbiol Infect 2011;17:69-79



INTERPRETACIJA SEROLOŠKIH NALAZA

- Serološki rezultat = **reaktivan** (pozitivan) ako prelazi «normalnu granicu» obično definiranu tako da obuhvaća 95% populacije
- ↓
- oko 5% zdravih pojedinaca može imati pozitivan nalaz
- ↓
- 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 LB prema testovima osjetljivosti 95% i specifičnosti 90% i različitim prevalencijama LB

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		

Sigal LH, 1998.

LAŽNO POZITIVNI - REAKTIVNI odgovor protutijela na *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.herssii*)
 - *Leptospira* spp.- rjeđe
 - *Escherichia coli*; *Haemophilus*



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
 - **seronegativnost** pacijenata s navodnom kasnom LB povećava **sumnju** u dijagnozu LB, iako «seronegativne LB» postoje

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

- Dokaz **lokalne** upale uzrokovane borelijama → rezultat testiranja **likvora** na specifična protutijela mora se definirati prema nalazu protutijela iz istovremeno uzetog i testiranog **seruma**

– **ANTIBODY INDEX**

- Izračun omjera količine protutijela likvora i seruma prema razini ukupnih proteina, albumina ili imunoglobulina iz istih uzoraka seruma i likvora

UPOZORENJA PRI INTERPRETACIJI SEROLOŠKIH REZULTATA - 4

- Nijedan dostupan serološki test ne može razlikovati **aktivnost** akutne LB od perzistiranja protutijela u osoba bez aktivne infekcije!

PROBLEMI DIJAGNOSTIKE LB - PODCJENJIVANJE ILI PRECJENJIVANJE DIJAGNOZE LB (underdiagnosis vs. overdiagnosis)

- U donošenju odluke o dijagnozi i terapiji LB važno je poznavati i poštovati:
 - ✓ geografsku i vremensku distribuciju
 - ✓ kliničku sliku
 - ✓ problem sagledati diferencijalno dijagnostički

UNDERDIAGNOSIS → manji problem

Primjeri neprepoznavanja LB:

- “Simptomatsko širenje eritema je zbog **ugriza pauka**”
- “Radikulneuropatija je posljedica **hernijacije cervikalnog diskusa**”
- “Limfocitni meningitis je **virusni**”
- “Izolirani monoartritis je atipični **reumatoidni artritis ili nekompletni Reiterov sindrom**”
- “Erythema migrans se ne liječi zbog **negativnih seroloških rezultata**”

ZABLUDE iz kojih proizlaze alternativni pogledi na LB



Neke od ZABLUDA o kliničkim simptomima

- “**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 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 o testovima

- “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 o terapiji

- “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 koje osporavaju «alternativni pogled» na LB

- ✓ Klinička slika LB relativno je dobro definirana.
- ✓ Prava LB je povezana s objektivnim kliničkim i laboratorijskim nalazima.
- ✓ Kad se koriste primjereno, serološki testovi su 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 koje osporavaju «alternativni pogled» na LB

- ✓ 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 ev. Bannwarthovog sindroma –meningo-poliradikuloneuritis) nije patognomonična za LB što nužno nameće potrebu sagledavanje problema diferencijalno-dijagnostički

DIJAGNOSTIKA 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 bolesnika s kliničkom dijagnozom neuroborelioze
- Serum i likvor su testirani na anti-*B.burgdorferi* IgM i IgG pomoću rELISA (Biomedica)
- Serumi pozitivni u rELISA potvrđeni su WB (Mikrogen)
- Rezultati koji su upućivali na moguću neuroboreliozu obrađeni su testom za određivanje intratekalnih protutijela anti-*B.burgdorferi* IgM i IgG pomoću *capture* ELISA (cELISA, Oxoid)
- Svi testovi su rađeni prema preporuci proizvođača

REZULTATI

- 19/28 (67.9%) - EIA reaktivni nalaz potvrđen WB
- 21/28 (75.0%) - reaktivna at. u likvoru rELISA testom
- 11/28 (39.3%) - potvrđena intratekalna anti-BB protutijela

Serološki nalazi u 28 bolesnika 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 likvor (rELISA)	reaktivno	reaktivno	reaktivno	negativno	negativno	reaktivno	negativno	reaktivno	reaktivno
IgM/IgG WB	pozitivno	pozitivno	negativno	pozitivno	pozitivno	negativno	negativno	pozitivno	negativno
AI* (cELISA) Neuroboreliozna	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:
 - Istovremeno testirati serum i likvor
 - Definirati značenje reaktivnih rezultata
 - Odrediti *antibody index*
- Dijagnostičko značenje serologije ovisi o individualnoj proizvodnji protutijela tijekom bolesti i o kvaliteti serološke pretrage

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»)

