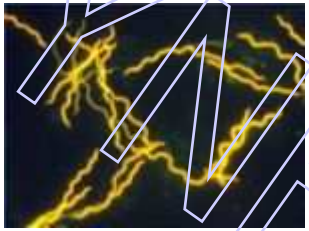
# Priama diagnostika v klinických vzorkách pacientov s Lymeskou boreliózou.

*Molekulárno – biologická analýza, kazuistiky*



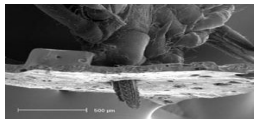
DYNEX

***Schwarzová K.[1], Rudenko N.[2], Golovchenko M.[2], Hupková H.[1], Kozub P.[3], Lesňáková A.[4]***

**Mikrobiologický ústav LFUK a UNB, Bratislava[1]; Parazitologický ústav AVČR, České Budějovice[2]; Dermatovenerologická klinika LFUK a UNB, Bratislava[3]; Fakulta zdravotníctva KU Ružomberok[4]**

# Lymeská borelióza

- najčastejšia antropozoonóza s prírodnou ohniskovosťou v Európe
- multiorgánové ochorenie, pre veľkú variabilitu klinických príznakov nazývané aj „Veľký imitátor“
- stala sa vážnym celospoločenským problémom (dopad na zdravie, náročnosť diagnostiky, liečby, prevencie)
- Kliešte sa v prenose infekcie LB uplatňujú v cca 78%, iný hmyz v 14%, v 8% sa vektor v anamnézach neuvádza (zdroj EPIS ÚVZ SR)



*Simulium* sp.

*Culex* sp.

DYNEX

- V r. 1997 bol prvýkrát sekvenovaný kompletný genóm borélií a zistilo sa, že genómová štruktúra týchto spirochét je jedným z najzložitejších komplexov známych u prokariontov.
- Malá veľkosť genómu borelií je spojená so zrejmou absenciou genov zahrnutých v syntéze aminokyselín, mastných kyselín, enzymových kofaktorov a nukleotidov. Tým se môžu vysvetliť aj vysoké nároky borelií na médium pri in vitro kultiváciach.

•**Jednotlivé druhy borélií (19 genospecies), 6 genospecies patogénnych (*B. afzelii, B. garinii, B. burgdorferi* s.s, *B. bavariensis* (*B. garinii* OspA serotyp 4) a *B. spielmanii. 3 genospecies - B. lusitaniae, B. valaisiana, B. bissetii* možné patogény, vyvolávajú rôzne klinické formy LB.**

•**Organotropizmus: *B. burgdorferi* s.s. môže spôsobiť artritídu a neuroboreliózu., *B. garinii* vyvoláva vážne neurologické komplikácie a neuroboreliózu, *B. afzelii* je zodpovedná za rôzne kožné abnormality (ACA). Každá z genospecies *Borrelia* vyvoláva EM.**

•***B. burgdorferi* s.s. a *B. afzelii* sú najčastejšie izolované humánne patogenické genospecies v Európe.**

•**Izoláty *B. garinii* sú signifikantne citlivejšie na viaceré ATB ako *B. afzelii*, *B. burgdorferi* s.s. , *B. bissettii* a *B. valaisiana*. Liekmi voľby sú Doxycyklin, Cefotaxim, Ceftriaxon, Clarytromycin..**

•**Rezistencia na ATB vzrastá...**

DYNEX

# Expanzia *Borrelia spp.* komplexu

| N | 1982 | 1984 | 1992 | 1993 | 1995 | 1996 | 1997 | 1998 | 2001 | 2006 | 2007 | 2008 | 2009 | 2010 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 19 | | | | | | | | | | | | | | *Borrelia kurtenbachii* |
| 18 | | | | | | | | | | | | | *Borrelia americana* | |
| 17 | | | | | | | | | | | | | *Borrelia bavariensis* | |
| 16 | | | | | | | | | | | | | *Borrelia carolinensis* | |
| 15 | | | | | | | | | | | | *Borrelia yangtze* | | |
| 14 | | | | | | | | | | | genomo-species 2 | | | |
| 13 | | | | | | | | | | | *Borrelia californiensis* | | | |
| 12 | | | | | | | | | | *Borrelia spielmanii* | | | | |
| 11 | | | | | | | | | *Borrelia sinica* | | | | | |
| 10 | | | | | | | | *Borrelia bissettii* | | | | | | |
| 9 | | | | | | | *Borrelia lisitanie* | | | | | | | |
| 8 | | | | | | | *Borrelia valaisiana* | | | | | | | |
| 7 | | | | | | *Borrelia tanuki* | | | | | | | | |
| 6 | | | | | | *Borrelia turdi* | | | | | | | | |
| 5 | | | | | *Borrelia andersonii* | | | | | | | | | |
| 4 | | | | *Borrelia japonica* | | | | | | | | | | |
| 3 | | | | *Borrelia afzelii* | | | | | | | | | | |
| 2 | | | *Borrelia garinnii* | | | | | | | | | | | |
| 1 | Lyme spirochaete | *Borrelia burgdorferi* | *B. burgdorferi* sensu stricto | | | | | | | | | | | |
| | 1982 | 1984 | 1992 | 1993 | 1995 | 1996 | 1997 | 1998 | 2001 | 2006 | 2007 | 2008 | 2009 | 2010 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| | Európa | | Afrika |
| | USA | | Japonsko |
| | Ázia | | Čína |

DVEK

# Patogenetický potenciál genospecies *Borrelia*

| Borrelia - druhy | Organotropizmus | Zdroj |
|---|---|---|
| *B.burgdorferi* sensu stricto | musculoskeletálne symptómy (Lymeská artritída) | viaceré zdroje |
| *B. garinii* | neuroborelióza | viaceré zdroje |
| *B. afzelii* | kožné lézie | viaceré zdroje |
| *Borrelia spielmanii* | ??? hlásené prípady pacientov s EM v Holandsku, Nemecku, Maďarsku a Slovinsku | Maraspin et al., 2006 |
| *Borrelia valaisiana* | ??? Erythema migrans (EM) | Rijpkema et al., 1997; Ryffel et al., 1999 |
| *Borrelia lusitaniae* | ??? klinické prejavy sa líšia od doteraz známych prejavov infekcií, vyvolaných *Borrelia* spp. | Collares-Pereira et al., 2004 |
| *Borrelia bissettii* | artritída; problémy s kĺbami??? detekcia DNA v klinických vzorkách pacientov v Slovinsku a Čechách | Strle et al., 1997; Rudenko et al., 2008, 2009 Girard et al., 2010 |
| *Borrelia bavariensis* | ??? neuroborelóza | Wilske et al., 1995 Marconi et al., 1999 |
| *Borrelia kurtenbachii* | ??? ??? | Margos et al., 2010 |

DEMO EX

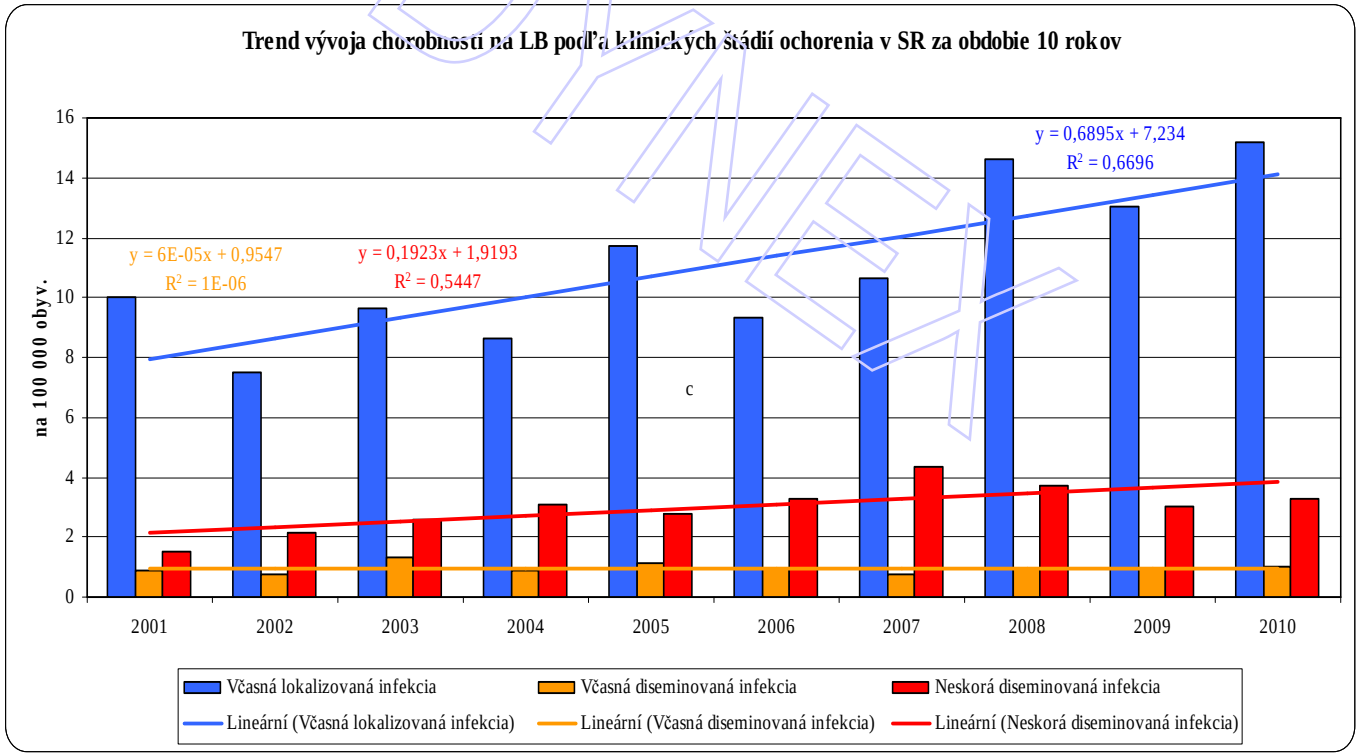
# STAV LB NA SLOVENSKU

- **V bývalom Československu sa LB prvýkrát diagnostikovala v r. 1984.**
- **Na existenciu prírodných ohnísk LB u nás poukazovali nálezy borélií v kliešťoch *Ixodes ricinus* zbieraných od r. 1985 na lokalitách západného Slovenska a južnej Moravy.**
- **V SR sa vyskytujú hlavne *B. garinii* (40%), *B. afzelii* (20–25%), *B. valaisiana*, *B. lusitaniae* a *B. burgdorferi* s.s.**
- **Od r. 1987 sa datuje postupné zavádzanie povinného hlásenia LB, ako samostatnej nozologickej jednotky v SR.**
- **V podmienkach SR je v súčasnosti LB na prvom mieste v štatistických údajoch o nákazách prenášaných kliešťami. V priebehu prvých 10 rokov sledovania bola priemerná chorobnosť LB na Slovensku 8,06/100000 obyvateľov, za posledných 10 rokov sa priemer chorobnosti zvýšil na 12,81/100000 obyvateľov (EPIS).**
- **Za posledných 10 rokov (2003-2012) bol na Slovensku zaznamenaný až 48,26% nárast ochorení na túto zoonózu (EPIS, 2012).**

DMEX

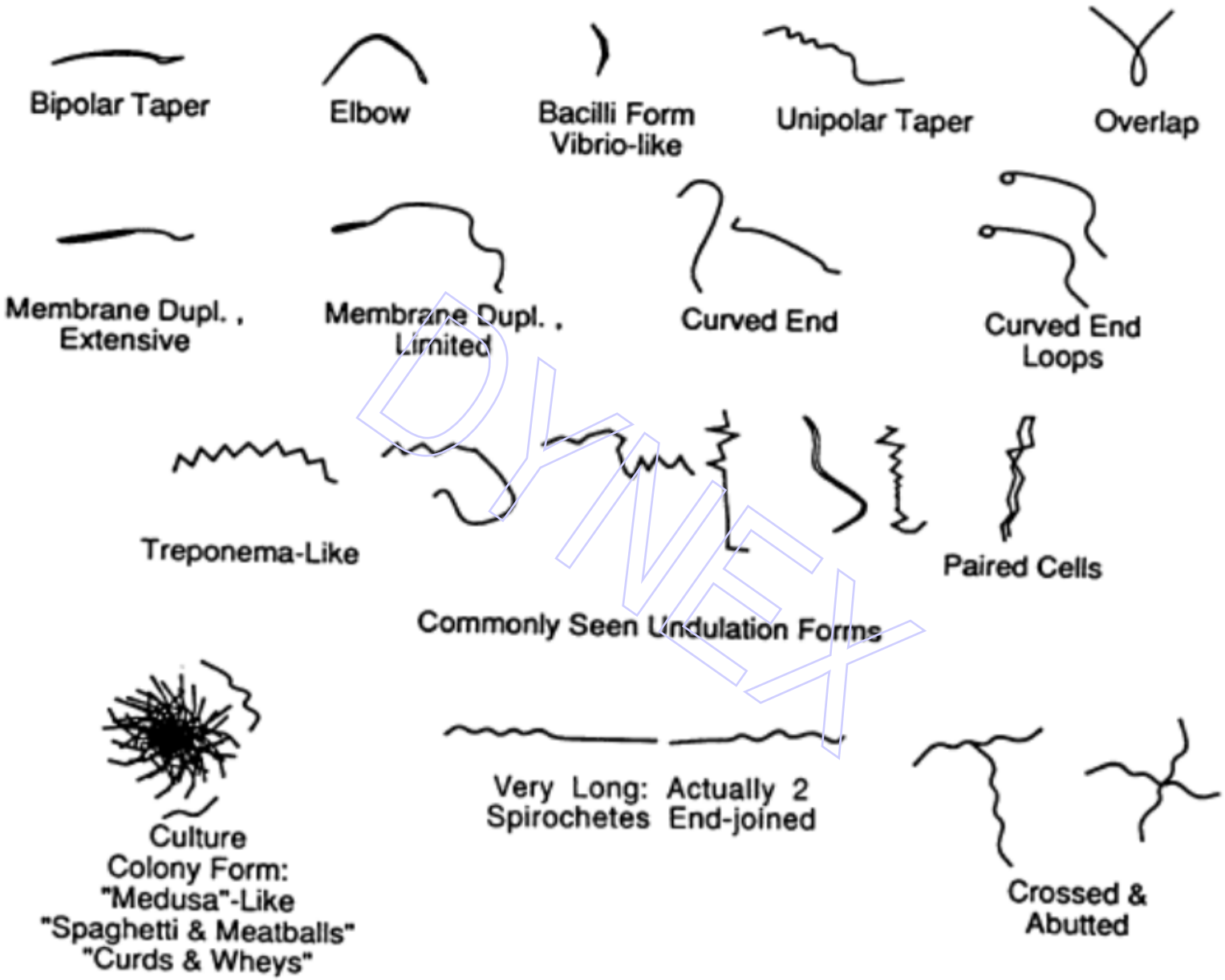
**Z databázy informačného systému prenosných ochorení (EPIS) v rokoch 2003-2007 vyplýva, že z hlásených ochorení na LB pri pozitívnej kliešťovej anamnéze a pri prítomnosti klinických príznakov, bol sérologický výsledok pri diagnóze A69.2 (LB) v 11% negatívny. Výsledky sérologického vyšetrenia boli negatívne v 14% aj pri diagnóze G63.0 (polyneuropatia) a v 9% pri kĺbnej forme ochorenia s diagnózou M01.2 (artritída).**

**CHOROBNOSŤ NA LB PODĽA JEDNOTLIVÝCH ŠTÁDIÍ. SR, 2001-2010.**



# Laboratórna diagnostika

- **Ťažiskom laboratórnej diagnostiky LB sú sérologické metódy na detekciu protilátkovej odpovede proti komplexu *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Ich stanovenie má len podpornú hodnotu pri diagnóze ochorenia. Testy na stanovenie protilátok nie sú dodnes štandardizované, dostatočne špecifické a senzitívne.**
- **Prítomné protilátky môžu byť po starších inaparentných infekciách a nemusia byť v príčinnom vzťahu k prebiehajúcemu ochoreniu.**
- **Vysoká genotypová a fenotypová heterogenita borélií v Európe výrazne ovplyvňuje výber vhodných antigénov pre diagnostické testy.**
- **Výsledky analýz môžu byť falošne pozitívne (syfilis, autoimunné ochorenia a pod). resp. falošne negatívne (v skorých fázach ochorenia, pri skorej ATB terapii – aj ako prevencia.. a pod.).**
- **Priama diagnostika LB (kultivácia, PCR) je významná, no finančne väčšinou nedostupná. Vzhľadom na nízku záchytnosť sa pre bežnú prax nedoporučuje (záchytnosť borélií in vitro je cca 5%, vyššia je u excízií z kože).**




Common morphologies of *B. burgdorferi* B31.

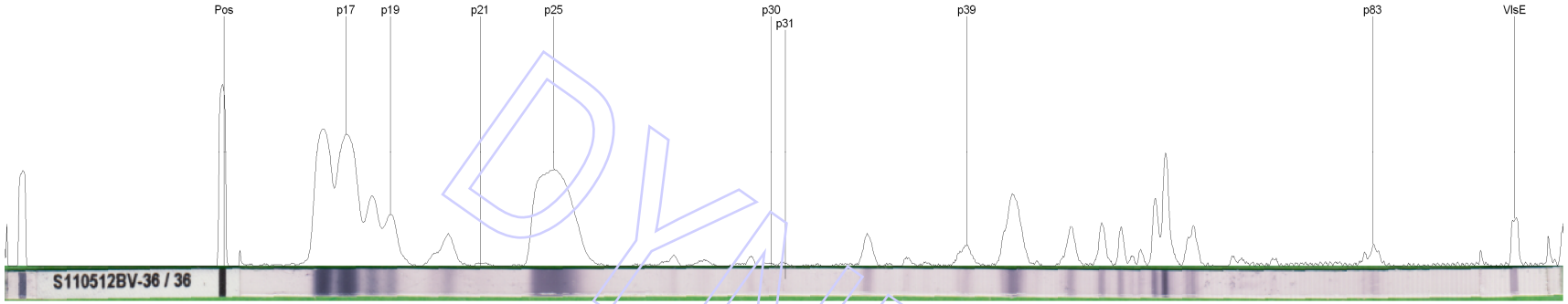
***(Aberer and Duray 1991)***

DYNEX

**Sérologické laboratórium** **Mikrobiologický ústav LFUK**

**Pacientovo ID:** 234 **Test:** Borrelia EUROLINE-WB IgG

**Dátum príjmu:** 15.2.2012 **Výsledky z:** 15.2.2012 **Dg**.: uhryznutie iným hmyzom




DYNEX

| Molekulová hmotnosť | Intenzita | |
|---|---|---|
| VlsE (VlsE) | 49 | + |
| p 83 (p83) | 22 | + |
| p 39, BmpA (p39) | 21 | + |
| p 31, OspA (p31) | 0 | o |
| p 30 (p30) | 0 | o |
| p 25, OspC (p25) | 99 | + |
| p 21 (p21) | 0 | o |
| p 19 (p19) | 53 | + |
| p 17 (p17) | 135 | + |

Test *Borrelia* Výsledok EUROLINE-WB IgG pozitívne

- Vzorky pacientov (sérum, likvor) sme vyšetrovali duálne, skríningovými analýzami a immunoblotom.
- Vzorky sér boli zasielané na MÚLFUK s požiadavkami na vyšetrenie antiboréliových protilátok.
- Uvedené boli klinické diagnózy: LB, psoriáza, alergické žihľavky, lámka, bolesti brucha, poranenie hlavy, kolaps, epilepsia, embólia, neplodnosť, ale aj poruchy psychiky a správania zapríčinené požitím alkoholu.

- Duálnou metódou (Anti-*Borrelia* ELISA a WB, Euroline) sme v sérologickom laboratóriu MÚ LFUK analyzovali 3172 vyšetrení vzoriek pacientov s uvedenými diagnózami.
- Vybrané vzorky („punch biopsia“ infikovanej kože a likvor) boli kultivované v BSK-H kultivačnom médiu minimálne 9 týždňov. Vzorky kultúr sme analyzovali pomocou PCR.
- K izolácii génomovej DNA sa použil DNeasy Blood and Tissue kit (Qiagen). Detekcia *B. burgdorferi* s.l. sa realizovala na základe amplifikácie génov, kódujúcich *flagelín* a *OspC* proteín *B. burgdorferi* s.l. Sekvenčná analýza prebehla pomocou DNAStar softvéru. Výsledky analýz sa porovnávali s databázami pomocou programu BLAST NCBI (Bethesda).

**Duálne vyšetrovanie pacientov na prítomnosť protilátok proti boréliam – falošne negatívne výsledky vyšetrení ELISA+/WB - od júna 2011 do marca 2013).**

| Vybrané diagnózy | Počet prípadov | % |
|---|---|---|
| *Artritída* | 110 | 22 |
| *Dermatitída* | 108 | 16 |
| *Granuloma annulare* | 9 | 33 |
| *Spirochetálne infekcie* | 41 | 7 |
| *Zápal.choroby ústr. NS* | 45 | 29 |
| *Poruchy krč./ bedr. koreňov/nervov.* | 72 | 21 |
| *Bolesť hrudníka, hlavy, choroby srdca* | *26* | *15* |
| *Iné (únava, nešpec. infekcie, neplodnosť)* | 132 | 20 |

DYNEX

# Výsledky:

- Výsledky duálnej analýzy antiboréliových protilátok vo vzorkách pacientov boli v ELISA testoch v 3,8 % falošne pozitívne a v 17,2 % falošne negatívne.
- Sekvencie génov pre *flagelín* a *ospC* z izolátov pacienta č. 1 (kultúra z kožnej biopsie) a č. 2 (kultúra z likvoru) boli identické s európskymi kmeňmi *Borrelia burgdorferi* sensu stricto.
- Predbežná analýza izolátov z kožnej biopsie pacienta č. 3 poukazuje na prítomnosť *B. garinii* (flagelín).
- Analýza oboch sekvencií u izolátov pacienta č. 4 (izolát z likvoru) poukazuje na možnú koinfekciu *B. burgdorferi* s.s. a *B. garinii*. Prebiehajú ďalšie potrebné analýzy, ktoré by mali upresniť tento výsledok.

- Priamou diagnostikou borélií vo vzorkách pacientov s LB sme potvrdili, že v prípade 2 izolátov *B. burgdorferi* s.s. sa jedná o *ospC* typy, najrozšírenejšie a najinfekčnejšie v Európe. Jedna sekvencia je identická so vzorkou z biopsie kože pacienta v Chorvátsku, ďalšia vzorka je identická so vzorkou z kliešťa zo Švajčiarska a so vzorkami pacientov z Moravy a Chorvátska.

# *KAZUISTIKY*

***Pacient M.Z.***

- Štyridsaťročný pacient, od **augusta 2012** pozoroval centrifugálne sa šíriaci erytém na bruchu, s výbledom v centre, na periférii anulárny erytém hladkého povrchu. Kliešťa nepozoroval, v minulosti sa už na boreliózu liečil. Kĺby ho neboleli.
  Dg. *susp. erythema migrans,* dif. dg.: granulomatózne resp. mucinóze ochorenie

Odber krvi a výsledky laboratórnych analýz na LB (**Dermatovenerologická klinika LFUK a UNB, december 2012**):

ELISA IgM: negat
ELISA IgG: **pozit**
WB IgM: negat
WB IgG: **pozit**

- Histologické vyšetrenie: *nešpecifická superficiálna dermatitída*, nález pripúšťa aj dg. erythema migrans.
- Terapia: doxycyklínom v dávke 200 mg/deň po dobu 30 dní, erytém sa rezorboval
- Excízia (priebojníkom priemeru 4 mm, tzv. punch biopsia) bola odobratá z erytému na bruchu
- Kultivácia bioptického materiálu v BSK-H médiu, 9 týždňov
- ***Borrelia burgdorferi* sensu stricto - ospC typ** - najrozšírenejší a najinfekčnejší typ borelií v Európe, izolát identický s izolátom z kožnej biopsie pacienta zo Slovinska.
- Sekvencie génov pre flagelín a *ospC* z izolátov pacienta M.Z. boli identické s európskymi kmeňmi *Borrelia burgdorferi* s.s.

DYNEX

***Pacientka K.P.***

•15-ročná pacientka vyšetrená infektológom (**Fakulta zdravotníctva KU Ružomberok**) v októbri 2012 pre bolesti bedrových kĺbov, trvajúcich vyše roka a kolenných, trvajúcich mesiac. Vyšetrená aj obvodným pediatrom pre bolesti hrdla. Udáva viacnásobné poštípanie malými muškami.

•V novembri 2012 laboratórne potvrdená akútna infekčná mononukleóza a borelióza. Ordinovaný Sumamed, po ktorom sa objavil toxoalergický exantém.
•Objavený migrujúci svrbivý erytém na predlaktí a krku, s jasne-červeným ohraničením s centrálnym vyblednutím. Rozsah erytému cca 2,5x7 cm.
•Dg. záver: A69.2 Boréliová infekcia, B27.8 Infekčná mononukleóza
•Pred zahájením parenterálnej terapie III.-generačným cefalosporínom bola analyzovaná excízia kože (punch biopsia) z kubitálnej oblasti.

•ELISA IgM: negat.
•ELISA IgG: **pozit**
•Western blot IgM: negat
•Western blot IgG: **pozit**

•Kultivácia bioptického materiálu v BSK-H médiu, 9 týždňov
•Analýzy spirochetálnych sekvencii pre *flagelín* a *ospC* gény izolátov zo vzorky pacientky K.Z. potvrdili prítomnosť ***Borrelia garinii*.**

DYNEX

# Záver:

•Duálna analýza antiboréliových protilátok vo vzorkách pacientov (ELISA + WB) je pre možné falošne negatívne/pozitívne výsledky v laboratórej diagnostike LB v dnešnej situácii bezpodmienečne potrebná.

•Priamou diagnostikou borélií vo vzorkách pacientov s LB sme potvrdili, že v prípade 2 izolátov *B. burgdorferi* s.s. sa jedná o *ospC* typy, najrozšírenejšie a najinfekčnejšie v Európe. Jedna vzorka je identická so vzorkou izolátov z biopsie kože pacienta zo Slovinska, ďalšia vzorka je identická so vzorkou z kliešťa zo Švajčiarska a so vzorkami pacientov z Moravy a Slovinska.

•Sekvencie génov pre flagelín a ospC z izolátov pacienta M.Z. (kultúra z kožnej biopsie) a č. 1 (kultúra z likvoru, neuroborelióza) boli identické s európskymi kmeňmi *Borrelia burgdorferi* sensu stricto (*B. burgdorferi* s.s.). Predbežná analýza izolátov z kožnej biopsie pacientky K.P. poukazuje na prítomnosť *B. garinii* (flagelín). Ďalšie analýzy spirochetálnych sekvencii pre ospC gény sú ešte v procese. Analýza oboch sekvencií u izolátov pacienta č. 2 (izolát z likvoru, neuroborelióza) poukazuje na možnú koinfekciu *B. burgdorferi* s.s. a *B. garinii*.

Výskum bol finančne podporený grantom MZSR č. 2007/11-SZU-07

***Ďakujem za pozornosť!***

katarina.schwarzova@fmed.uniba.sk

DYNEX