

# Laboratórna diagnostika Lymskej borreliózy v oftalmológii

Bojnice 7.- 8.10.2011



MUDr. Sylvia Frankovská  
očná ambulancia, Bratislava

K pochopeniu **zmyslu indikácie** laboratórnej diagnostiky boreliózy v oftalmológii môže priviesť **poznanie**:

- **etiologie choroby** (etiol. agens, vektory prenosu, medzihostitelia)
- **Prejavov a pôvodu** neliečených príznakov Lymскеj choroby
- **možností liečby** Lymскеj choroby
- **anamnézy** pacienta (cielená a komplexná) a ďalej
- **erudícia oftalmológa** pri očnom vyšetrení, ale aj **v posudzovaní a vyhodnocovaní protokolov zo sérologických vyšetrení na infekčné agens**
- **interaktívne laboratóriá** na základné i špecializované mikrobiologické vyšetrenia
- **kvalifikovaná vzájomná komunikácia** lekárov so zodpovednými laborantmi

- Dňa **30.7.2009** nadobudlo podpisom ministra zdravotníctva účinnosť **Odborné usmernenie MZ SR o štandardizácii mikrobiologickej diagnostiky lymskej boreliózy** (vestník MZ SR 2009 str.201-202).
- **„Základným vyšetrením** pri podozrení na očnú formu boreliózy je **paralelné stanovenie protilátok IgM a IgG v sére** ( bud' EIA, ELISA test, alebo test nepriamej imunofluorescencie) **a v materiáli z oka** (stanovenie intraokulárnej tvorby špecifických protilátok.)
- 
- **Výsledok sa v prípade potreby spresní imunoblotovým testom.“**

## Ciele odborného usmernenia MZ SR o štandardizácii mikrobiologickej diagnostiky LB

sú definované nasledovne:

- **štandardizácia** mikrobiologických diagnostických metód LB
- **skvalitnenie a reprodukovateľnosť** výsledkov mikrobiologického vyšetrenia
- **dostupnosť** mikrobiologickej diagnostiky LB
- **podmienky pre opakovanie** vyšetrení LB

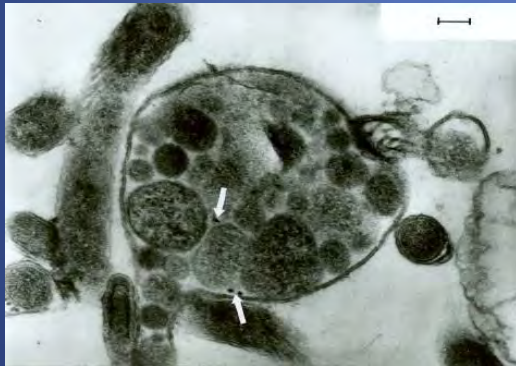
Splniť tieto ciele v prípade takto nastavenej očnej diagnostiky boreliózy podľa Vyhlášky MZ z roku 2009 je naozaj ťažké.

## Lymfská choroba

ochorenie, ktoré je spôsobené bakteriálnou infekciou v tele človeka

- 1883- prvú neznámu formu atrofie kože popísal v Európe už Buchvald
- 1910 Arvid Afzelius popísal erytema chronicum migrans
- 1941 Bannwarth publikoval o chronickej lymfocytárnej meningitíde so zápalmi, polyneuritídou a reumatizmom
- 1978 - mesto Lyme, Connecticut, USA miesto hromadného výskytu prípadu neznámeho pôvodcu zápalového ochorenia kĺbov najmä u detí
- 1982 entomológ Dr. Willy Burgdorfer objavil dlho hľadaného pôvodcu ochorenia, kliešťom prenášanú baktériu, ktorú pomenovali podľa neho ako **Borrelia burgdorferi**

**Borrelia burgdorferi** -je gramnegatívna 7-9 bičíkatá špirálovitá baktéria z rodu spirochét (leptospira, treponéma ) dĺžky 4-30um, 0.2um hrubá, s dlhým rozmnožovacím cyklom 12-17 hodín. V krvi mobilná a množiaca sa spirochéta existuje i v spheroplastickej L-forme a vo forme cýst vo vnútri tkanivových buniek. V týchto formách je ťažko detegovateľná protilátkami imunitného systému pre časté zmeny svojho antigénneho povrchu a necitlivá na bežnú ATB liečbu



Elektronmikroskopické  
zobrazenie cýst  
a mladých spirochét



Rast mladej borrelie z cysty

**Vektorom prenosu infekcie** je najčastejšie **kliešť Ixodes ricinus**. Existuje v podobe **larvy, nymfy a dospelého jedinca** - samičky a samčeka. Najčastejším prípadom uštipnutia je práve malá **nymfa**, následne samička, ktorá však býva častejšie infikovaná. Každá z týchto foriem potrebuje sať krv z medzihostiteľa na výživu, rast a samička na obnovu reprodukcie pri kladení vajíčok.

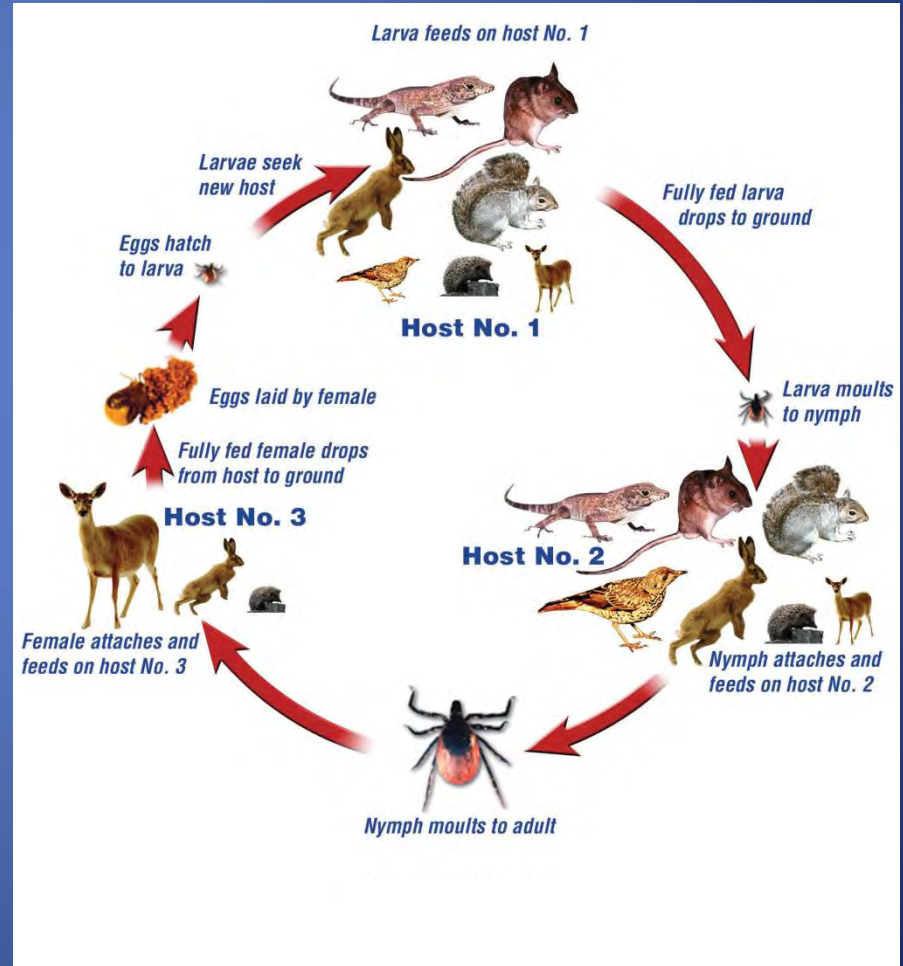
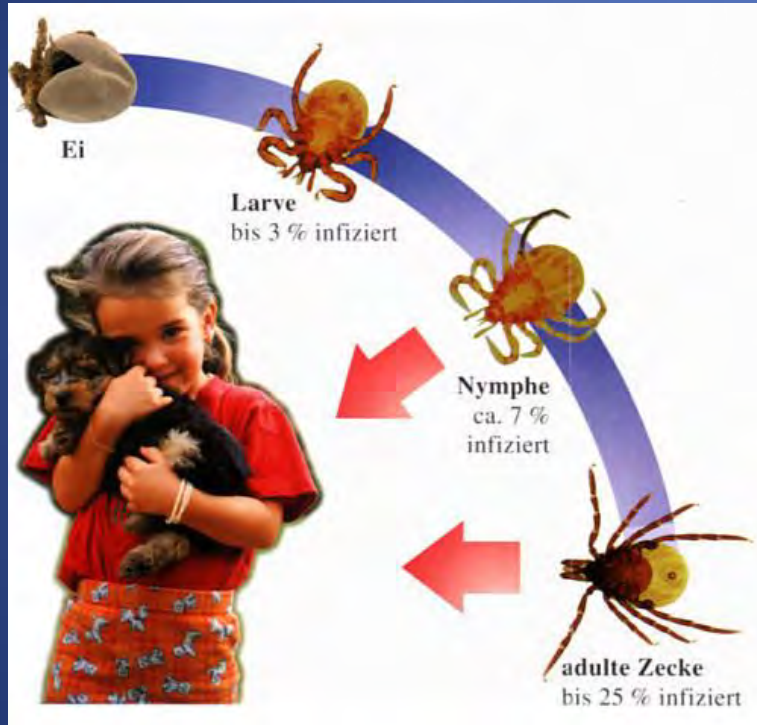
-borélie sa našli napr. i v tele **komárov, ovadov i bích**.

-do tela človeka sa dostávajú pri uštipnutí, buď priamo slinami kliešťa, predtým sa množia v jeho tráviacom trakte, alebo z jeho výkalov, ak sa infikuje poranená koža človeka.





**Medzihostiteľmi** sú väčšinou **drobné hlodavce, zajace, myši, veveričky, ale aj psy a vtáky** prenášajúce kliešťov, ktorí predtým nasali krv s prítomnosťou borélií najmä z vysokej lesnej zveri, ale aj koní, hovädzieho dobytku.

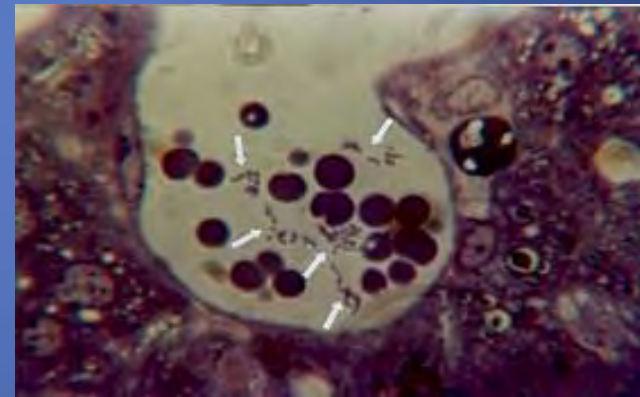
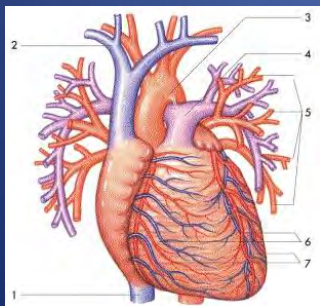
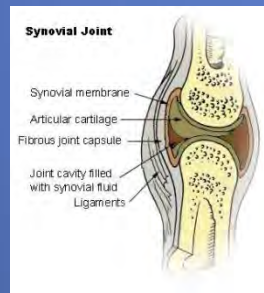
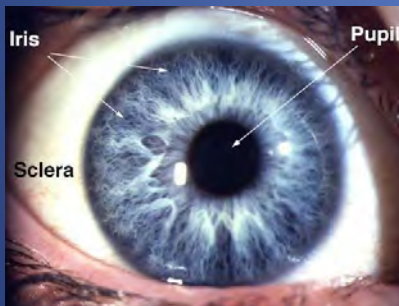




## Lymeská borelióza

sa neliečená stáva postupne progredujúcim rôznorodo penetrujúcim multisystémovým ochorením, ktoré postihuje viaceré orgány a tkanivá (mozog, koža, kĺby, srdce, oko, obličky, pečeň, GIT, lymfatické uzliny, krvné cievy atď)

Prejavuje sa celým radom často nešpecifických symptómov. U nemalej časti infikovaných osôb môže mať asymptomatický priebeh.



Prierez krvnou cievnou v pečeni obsahuje erythrocyty a medzi nimi spirochety

**Inkubačná doba** Lymfatickej choroby a jej prvé príznaky sa prejavujú obvykle **za 7-14 dní** po infikovanom uštipnutí. **Rozmanitosť je veľká**. Môže byť i kratšia, či výrazne dlhšia, **mesiace, či roky**.

Závisí to od:

- virulencie baktérie (od antigénnej výbavy daného kmeňa)
- imunitného stavu infikovaného organizmu
- včasnosti nasadenia ATB pri primoinfekcii
- správneho výberu ,ev. kombinácie ATB
- dostatočnej dĺžky podávania ATB
- dostatočnej dávky ATB
- poznania a liečby reinfekcie v priebehu života
- od stupňa infekcie pozit. matiek pri transplacentárnom prenose na plod
- vzácnne pri hand to hand transfúzii od pozit. darcu

# Klinické prejavy infekcie baktériou *Borelia burgdorferi* sensu lato

1. **Včasná lokalizovaná infekcia** sa prejavuje typickým **erytema migrans (EM)**, ktorý sa však asi v 40 % **nemusí vyskytnúť**. Ochorenie prebieha pod obrazom virózy so subfebríliami, bolesťou hlavy, **svetloplachosťou**, bolesťami svalov a únavovým syndrómom. Vo vzorkách z biopsie kože z EM sú prítomné spirochéty. EM je signál k okamžitej liečbe **bez sérologického vyšetrenia**. Po uštipnutí a neskoršom odstránení kliešťa ako 24 hod., aj keď nebol EM prítomný, treba následne sérológiu po 3-4 týždňoch pre istotu urobiť!



**2. Včasná diseminovaná infekcia** -za priaznivých okolností pre infekciu po viac než 3-4 mesiacoch baktéria preniká do kožných lymfocytov (Langerhansove bb), tie opúšťajú kožu a putujú do následne zdurených regionálnych lymfatických uzlín a odtiaľ do krvi. Tu sa dajú opäť **sérologicky z krvi eventuálne likvoru zachytiť protilátky.**

Infekcia môže postupovať pozdĺž nervových vlákien do mozgu a krvné šírenie obísť. K príznakom z prvého štádia sa môžu pridať i poruchy srdcového rytmu, akútne neurologické príznaky ako mono i bipolaréza tvárového nervu, aseptická meningitída, ľahká encefalitída s poruchami pamäti, spánku a psychiky. **Z očných príznakov sú to scleritída, keratitída, uveitída, vitritída, retinitída, neuritída.**

**3. Neskorá perzistentná infekcia** - po mesiacoch až rokoch môžu vzniknúť u niektorých pacientov závažné aj mnohopočetné chronické symptómy poškodenia mozgu, nervového systému, psychiky, kĺbov, najviac kolenných a srdca. **Z očných príznakov môže byť chronickým zápalom navodená ischemická atrofia zrakového nervu, perzistujúca progredujúca chorioretinitída.**

Samostatným prejavom boreliózy je **acrodermatitis chronica atrophicans**.

**Základné sérologické vyšetrenia sú nevyhnutné, špeciálne vyšetrenia často nutné.**

# Laboratórne vyšetrenia využívané v oftalmológii na dôkaz boreliózy

## I. Základné mikrobiologické vyšetrenie

- a. ELISA test - enzýmová imunoanalýza
- b) Western Blot - Imunoblot

## II. Nadstavbové (špecializované) mikrobiologické vyšetrenie:

- a) dôkaz prítomnosti špecifických sekvencií boreliózne DNA v bioptických vzorkách z biologického materiálu oka (PCR-polymerázová reťazová reakcia)
- b) genotypizácia izolátov *Borrelia burgdorferi sensu lato* (sekvenácia, druhovo-špecifické primery a pod.),
- c) izolácia, kultivácia a identifikácia izolátov *Borrelia burgdorferi sensu lato* z klinických vzoriek.

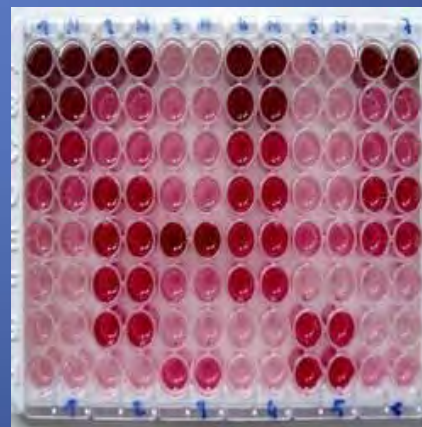


## ELISA test (Enzyme-linked immunosorbent assay)

je základným doporučeným testom laboratórnej diagnostiky, je rýchly, lacnejší, no menej presný (cca60%). Odčítava sa vizuálne, je viac subjektívny.

Presnejší je, ak pozostáva z rekombinantných antigénov. Vtedy má menej falošne pozitívnych antigénov so skríženými reakciami s inými baktériami. Kvôli nim má ale vysoko nastavené referenčné hodnoty. Je preto menej citlivý, t.j. falošne negatívny, lebo nezachytí niektoré špecifické borélieové antigény.

Výsledky sa udávajú v relatívnych jednotkách RU/ml, alebo v tzv.indexe.



## Western Blot – Imunoblot

- u nás je zatiaľ určený až na **konfirmáciu pozitívnych Elisa testov**. V prípade hraničných nálezov Elisa testu možno pri pretrvávajúciach klinických príznakoch požiadať laboratórium o ich opakovanie po 3mesiacoch.

Testuje sa:

**Borrelia burgdorferi sensu lato** (s endemickými antigénmi IgM, IgG):

-**Borelia burgdorferi s.l.** (najviac s afinitou ku kĺbom a oku)

-**Borelia garini** (s afinitou k nervovému tkanivu a oku)

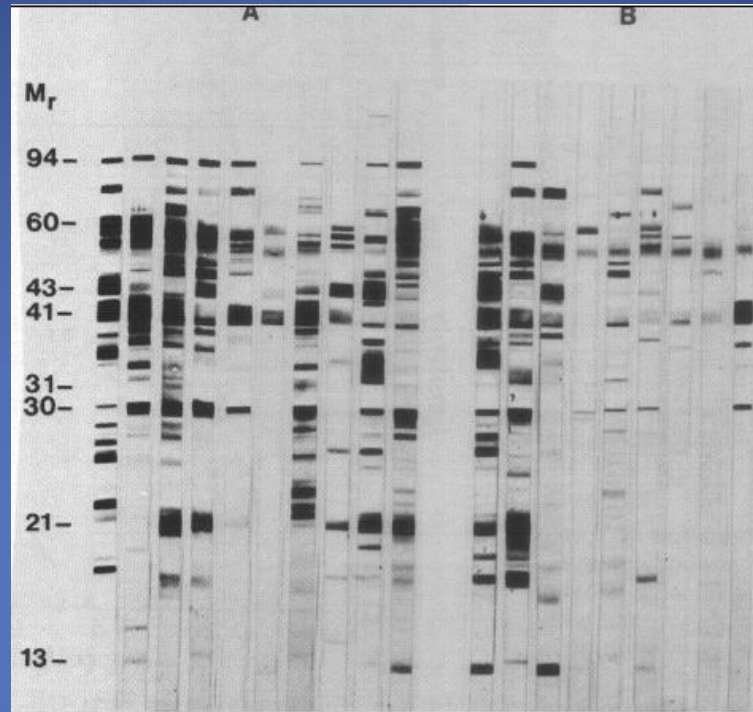
-**Borelia afzelii** (s afinitou ku kožným ochoreniam)

## Western Blot Borrelia B. sensu lato IgM, IgG

**slúži na hľadanie** protilátok z jednotlivých častí tela borélií vo vyšetrovanom sére a **svedčí o existencii a intenzite výskytu jednotlivých častí baktérií** v danom sére.

Jednotkou hmotnosti protilátok je kilodalton (kDa). Označuje mikroskopickú hmotnosť jednotlivých protilátok od 0 do 100.

Protilátky zo séra pacienta sa naviažu strip ( gélový prúžok obsahujúci viaceré z antigénov borélie) a utvoria s nimi komplex. Komplex sa naskenuje a automaticky prístrojom, alebo vizuálne vyhodnocuje.



Kmene borrelií izolované z mozgomiešneho moku a z krvi s rôznym obsahom povrchových antigénov

Podľa intenzity špecifických línií prúžku komplexu Ag - Ab a jeho miery významu antigénnej špecificity sa posudzuje výsledok ako negatívna, hraničná, alebo pozitívna línia.

**IgM protilátky** sa tvoria **vo včasnej fáze akútnej infekcie**, ale bývajú prítomné aj počas **akútne exacerbovanej chronickej infekcie** .

K vysoko špecifickým protilátkam patria:

Povrchová bielkovina **OspC -25kDa**, je **vysoko špecifický** antigénom, borélie ju začnú vytvárať na svojom povrchu okamžite po vniknutí do ľudského tela, aby se tak bránili pred útokom imunitného systému. Protilátky proti OspC sú preto imunodominantným znakom včasnej odpovede IgM

**VisE - marker 3. štádia** považovaný za jasnú známku včasnej infekcie, tvorí sa najmä v IgM. – zmiešaný vysoko špecifický antigén, ktorý vytvárajú borélie len v ľudskom tele, ale jeho pozitívna prítomnosť v IgG je aj markerom 3.pozdného štádia infekcie

**Osp A=30kDa**

**Osp B=34kDa**

**18 kDa, 19 kDa, 39kDa**

# Výsledný protokol z vyhodnoteného Western Blotu Borrelia Garini IgM

## Vyhodnocovací protokol - 9 [REDACTED]

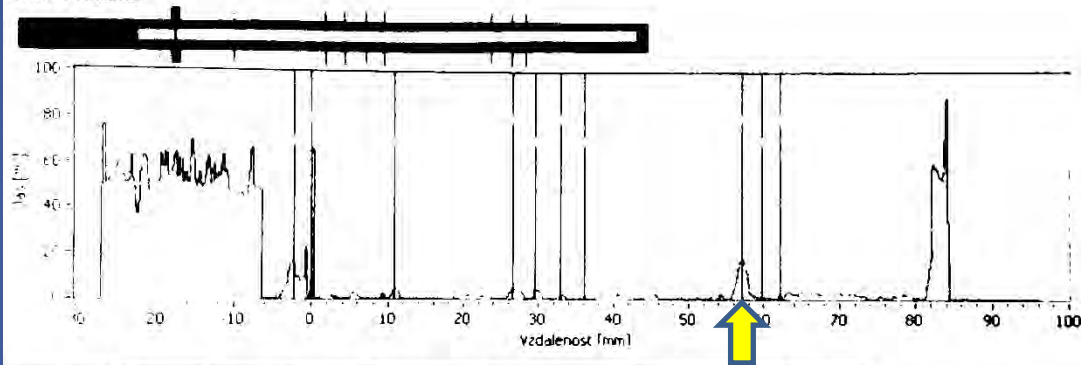
BLOT Borrelia garinii IgM

WB strip šarže: [REDACTED] (Imunoblot V2 2 12)

Vyhotovil: [REDACTED]

Čas vyhodnocení: 2 3 2011 [REDACTED]

Snímek skenu



Pořadí linie	Označení	Pozice	Intenzita zbarvení %Int.	Hodnocení
	Cut-Off	2.3 (305)	10	
0	Start	0.0 (332)	39	Pozitivní
1	83kDa	10.8 (460)	4	Negativní
2	41kDa	26.5 (645)	4	Negativní
3	39kDa BmpA	29.6 (682)	4	Negativní
4	30kDa	32.9 (720)	1	Negativní
5	29kDa OspA	36.1 (758)	0	Negativní
6	25kDa OspC	57.1 (1007)	17	Pozitivní
7	21kDa	59.7 (1037)	1	Negativní
8	19kDa	62.1 (1066)	2	Negativní
Celkové hodnocení				Pozitivní

Provedl: [REDACTED]

Datum: 2. 3. 2011

Schválil: [REDACTED]



**IgG protilátky sú neskoršou imunitnou fázou odpovede pri včasnej disseminovanej infekcii, ale svedčia aj o pretrvávaní chronickej infekcie**

**VlsE - marker 3. štádia** zmiešaný vysoko špecifický antigén, ktorý vytvárajú borélie len v ľudskom tele, jeho pozitívna prítomnosť aj v IgG je markerom 3.pozdného štádia infekcie

**Osp A=30kDa**

**Osp B=34kDa**

**18 kDa, 19 kDa, 39kDa**

**83 kD** - vysoko špecifický, genetický materiál membránových vezikúl,

**93 kD** - oba tieto antigény sú označované tiež ako p100, protilátky proti nemu sú typické pre neskorú, chronickú infekciu (p100 je oficiálne označený ako "marker 3. štadia boreliózy")

# Výsledný protokol z vyhodnoteného Western Blotu Borelia garini IgG

## Vyhodnocovací protokol - 8

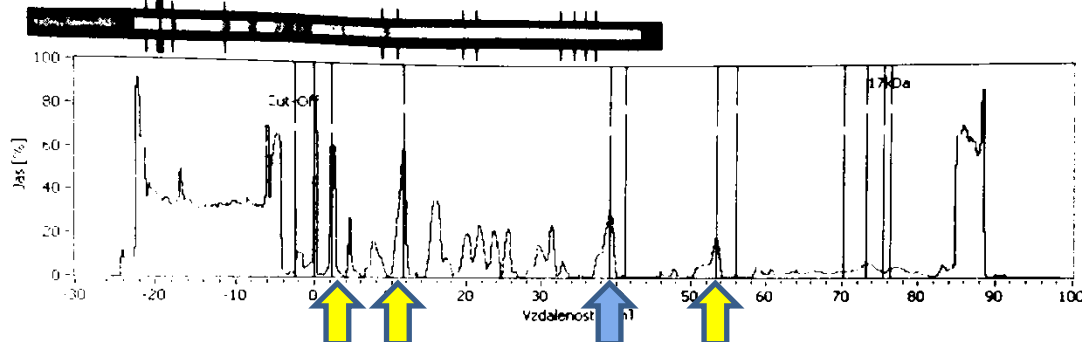
BLOT *Borrelia garinii* IgG

WB strip šarže: (Imunoblot V2.2.12)

Vyhotovil:

Čas vyhodnocení: 28. 3. 2011/

Snímek skenu



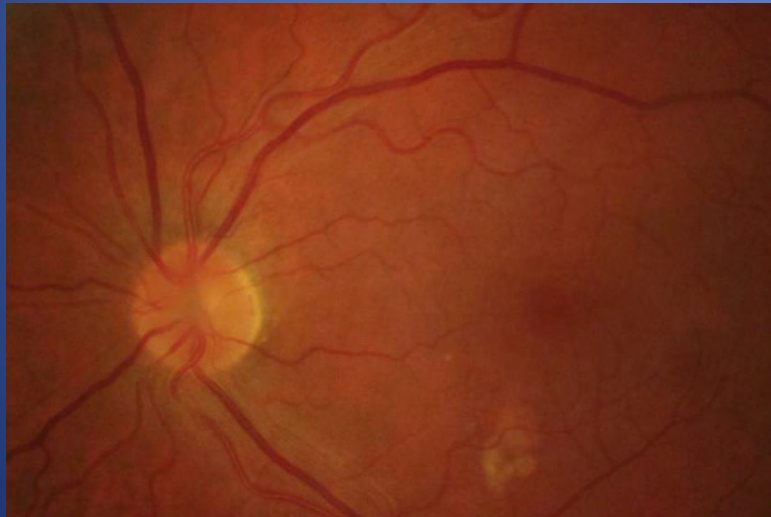
Pořadí linie	Označení	Pozice	Intenzita zbarvení %Int.	Hodnocení
	Cut-Off	2.4 (274)	10	
0	Start	0.0 (302)	81	Pozitivní
1	VIŠE	2.3 (329)	62	Pozitivní
2	83kDa	11.5 (438)	60	Pozitivní
3	41kDa	39.2 (765)	30	Pozitivní
4	39kDa BmpA	41.2 (789)	0	Negativní
5	30kDa	53.3 (932)	18	Pozitivní
6	29kDa OspA	56.0 (963)	1	Negativní
7	25kDa OspC	70.2 (1131)	2	Negativní
8	21kDa	73.2 (1166)	6	Negativní
9	19kDa	75.5 (1194)	3	Negativní
10	17kDa	76.4 (1204)	4	Negativní
Celkové hodnocení				Pozitivní

Provedl:

Datum: 28. 3. 2011

Schválil:

Pacienti s hraničnými a pozitívnymi  
nálezmi Elisa a Western Blotmi v sére.



Ložiská perzistujúcej chorioretinitídy

## Záver:

V našej očnej ambulancii sme dali vyšetriť oboma základnými metódami (Elisa, WB) cca 60 pacientov s pozit. anamnézou uštipnutia kliešťom a iným hmyzom. Tí, ktorí mali celkové subjektívne problémy i nález zapadajúci do príznakov včasnej diseminovanej, či chronickej perzistujúcej formy a očný nález, mali vo väčšej miere pozitivitu vo Western Blote, najmä v triede IgG, než v testoch Elisa.

Keďže je Western Blot metódou neinvazívnou, citlivejšou a zachytáva v prípade positivity vysokošpecifické boréliové antigény, mal by byť cestou prvej voľby laboratórneho screeningu v očnej diagnostike Lymfatickej choroby.

**Ďakujem za pozornosť**