

LYME BORRELİYOZUNUN MİKROBİYOLOJİSİ

Prof. Dr. Kenan Midilli
İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi

- Amédée Borrel (1867–1936)

Antonie van Leeuwenhoek (2014) 105:1049–1072
DOI 10.1007/s10482-014-0164-x

ORIGINAL PAPER

- › Bacteria
 - › Spirochaetes
 - › Spirochaetia
 - › Spirochaetales
 - › Borreliaceae
 - › Borreliella

A phylogenomic and molecular marker based proposal for the division of the genus *Borrelia* into two genera: the emended genus *Borrelia* containing only the members of the relapsing fever *Borrelia*, and the genus *Borreliella* gen. nov. containing the members of the Lyme disease *Borrelia* (*Borrelia burgdorferi* sensu lato complex)

Mobolaji Adeolu · Radhey S. Gupta

Received: 15 January 2014 / Accepted: 25 March 2014 / Published online: 18 April 2014
© Springer International Publishing Switzerland 2014

Borrelialar:

Dönek ateşe grubu → *Borrelia* (bit ve *Ornithodoros* türü keneler)

Lyme hastalığı grubu → *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato (*Ixodes* cinsi keneler)

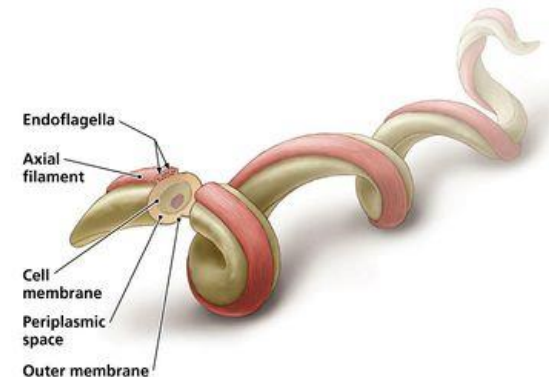
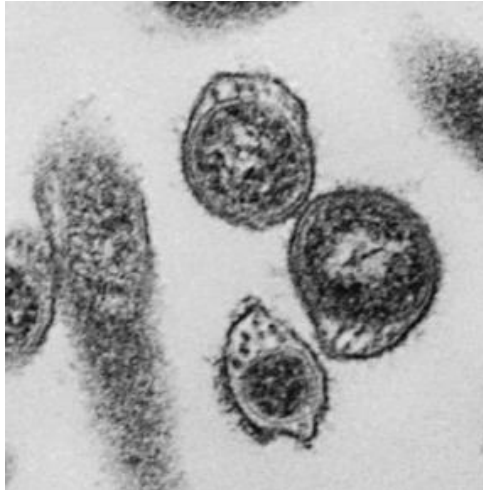
- *Eubacteria* içinde ayrı bir grup; gram pozitif ya da negatif olmayan
→ division (bölüm) D

- 8 to 30 μm uzunluğunda; ince 0.2 to 0.5 μm eninde
tirbuşon şeklinde

- Çok hareketli (endoflagella; dış membranla çevrili;
her bir uçta 7-20 adet)

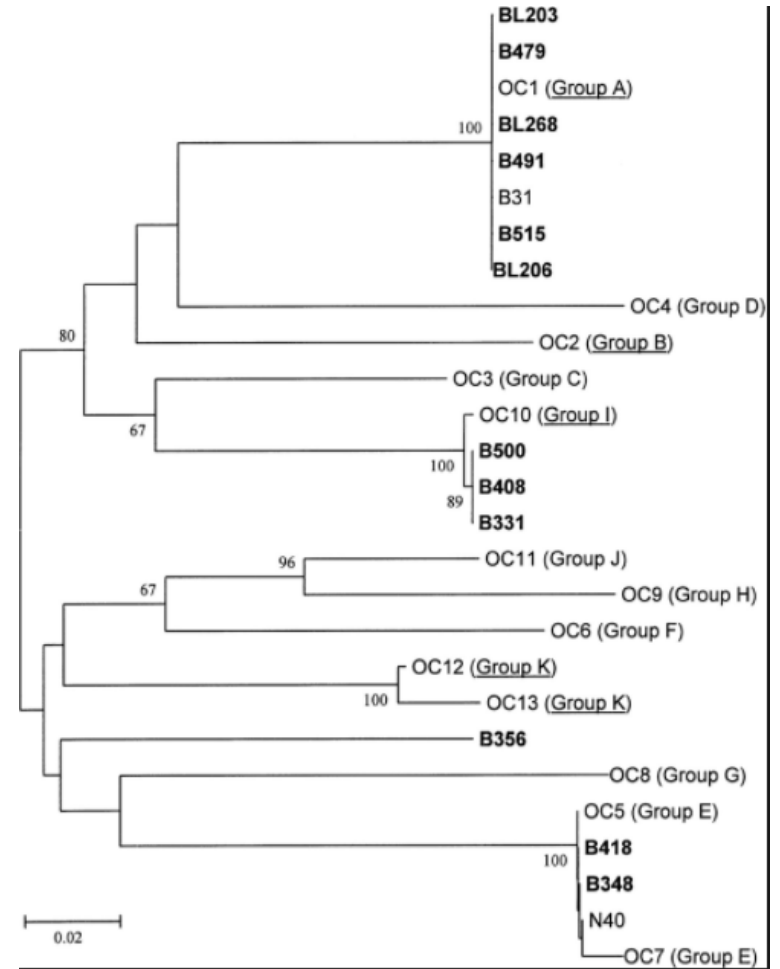


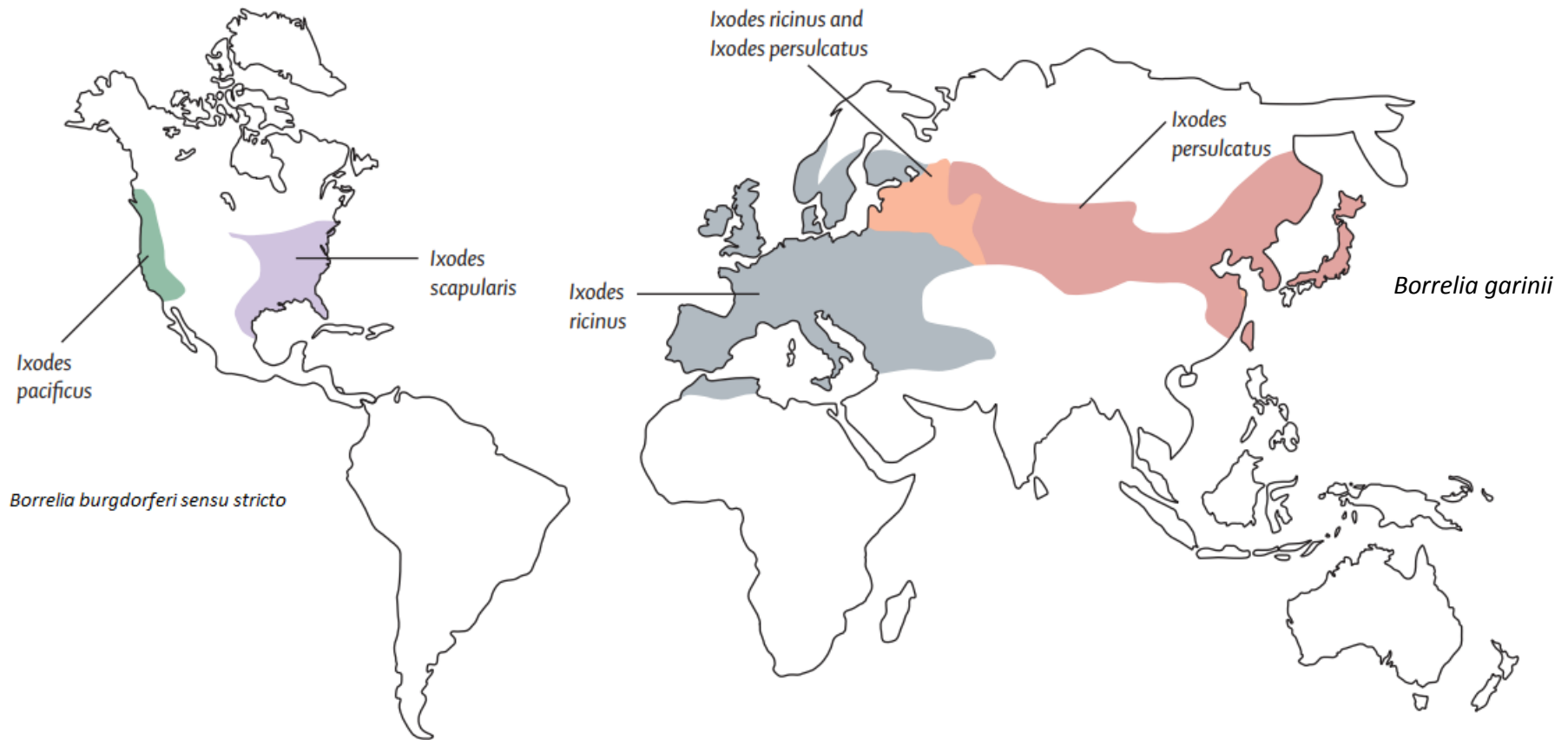
- *Küçük linear kromozom* (≈ 950 kilobaz); ayrıca tüm bakteri DNA'sının %40'ını oluşturan
17-21 sirküler (Cp) veya lineer (Lp) plasmid içerirler
- Barbour-Stoenner-Kelly medium ve Kelly-Pettenkofer medium (EM'de bile duyarlılık
%40-60)



- **Kromozomal proteinler:** Flagellin (41 kDa), ısı şok proteinleri (60 kDa), iç membran proteini 39 kDa), integral dış membran proteini (66 kDa) ile 58 kDa ve 93 kDa proteinler (işlevleri bilinmiyor)
- **Plasmidler üzerinde kodlanan proteinler:** Osp A (31 kDa), OspB (34 kDa), OspC (23 kDa), decorin-binding proteins A ve B (18 kDa) ile VlsE proteini

- **Genotiplendirme:** OspC, 16S-23S ribosomal RNA (rRNA) intergenic spacer region (RST or IGS) ve sekiz kromozomal referans genine dayalı MLST ile genotiplendirme
- **Boyanma:** Gümüşleme (dokularda), Wright, Giemsa, IF





Borrelia afzelii → Deri tutulumu

Borrelia garinii → Nörotropik

Borrelia burgdorferi sensu stricto → Artritojenik

Borrelia afzelii

Borrelia garinii

Borrelia burgdorferi sensu stricto

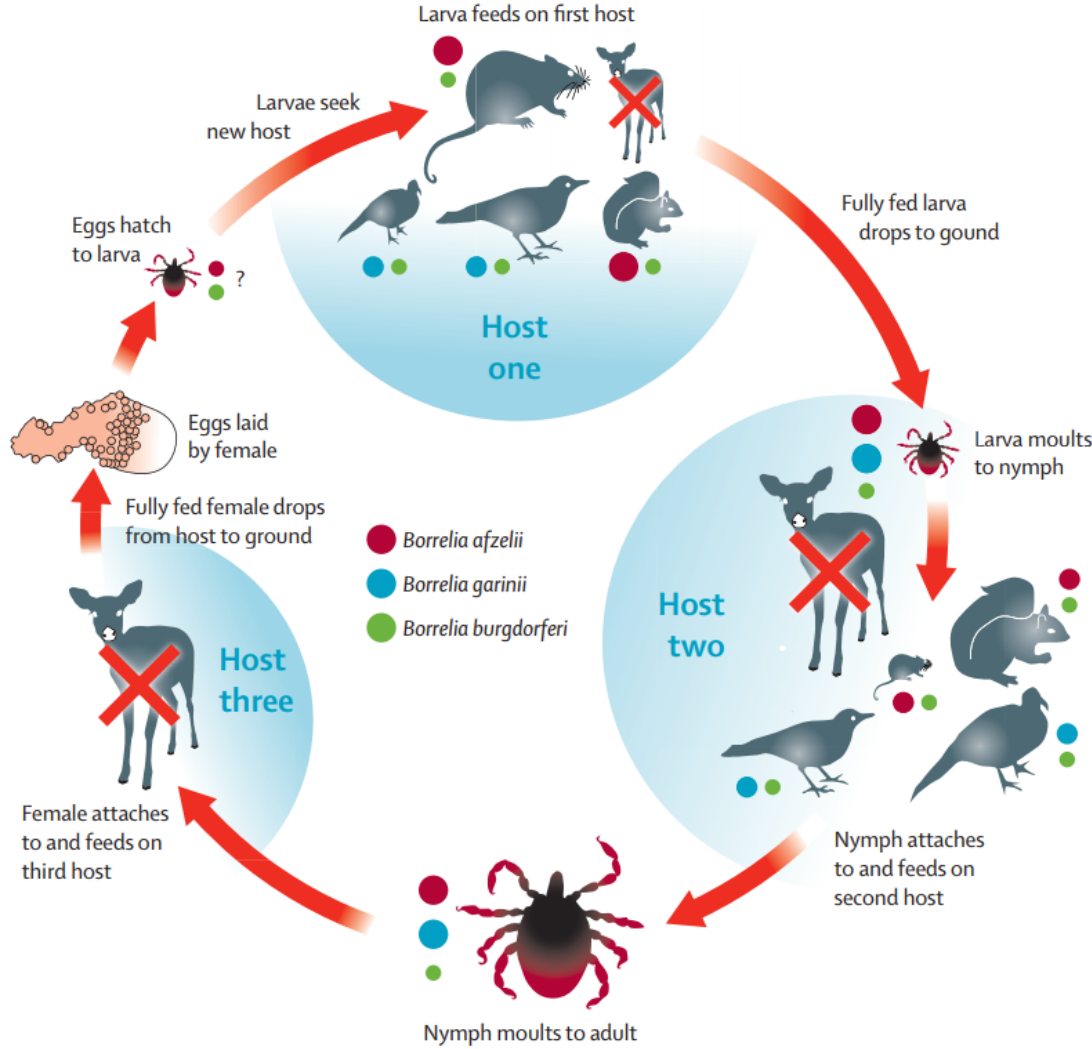
Borrelia spielmanii

Borrelia bavariensis

Borrelia bissettii,

Borrelia lusitaniae

Borrelia valaisiana



- Endemi bölgelerinde bulaşmalar periurban ya da kırsal bölgelerdeki orman çalışmaları ya da dinlenme etkinlikleri sırasında gerçekleşir.
- Keneler farklı mevsimsel özellikler gösterir. *I. ricinus* ve *persulcatus* baharın başından yaz ortasına kadar hatta nemli bölgelerde daha geç zamanlara kadar kan emer. *I. ricinus* sonbaharda ikinci bir doruk aktivite gösterir. *I. scapularis* nimfleri yaz başından sonbahar başına kadar aktiftirler, erişkinleri ancak son baharda aktif hale gelirler ve bahara kadar aktif kalırlar. *I. pacificus*, *I. ricinus* ve *persulcatus*'a benzer bir mevsimsel aktivite gösterir. Tüm kene türlerinde larvaların aktivitesi nimflerden biraz daha sonra başlar.

- Borrelialar küçük memelileri, kertenkele ve kuşları infekte ederler.
- Özellikle nimfler kan emerken bakteriyi edinirler. Erişkin ve nimfler nadiren insana tutunurlar.
- Erişkinler sadece büyük memelilere tutunabilir ancak bunlar bakteri için kompetan değildir.
- Kene dormant halde iken OSP A ekspresse edilir
- Bakteri kenenin ortabarsağında çoğalır ve bakteri farklı konaklara göre farklı genlerini ekspresse eder
- OSP C ekspresse edilmesi bakterinin kenenin tükürük bezlerine göç etmesini sağlar. Bu süreç birkaç günü alır → Bulaşma için uzun süre kan emme gereksinimi
- Kan emerken bakteriler konağın derisinde birikir ve daha sonra buradan kan yoluyla doku planları arasından yayılır
- Güçlü hücresel ve humoral konak yanıtlarına rağmen bakteri persiste eder. Bunda yüzey proteinleri ve major protein-like sequence expressed (VlsE)'nin sürekli olarak varyasyon göstermesi ya da ekspresyonlarının minimuma indirilmesinin payı vardır.
- Bakterinin toksinleri yoktur ve doku hasarı inflamatuvar yanıtla bağlıdır.
- Konak genetik özellikleri önemli; artrit belli HLA-DR doku tipleri ile bağlantılı

Kuluçka süresi 3-32 gün

TABLE 243-1 Manifestations of Lyme Disease by Stage			
SYSTEM [†]	EARLY INFECTION		LATE INFECTION
	Localized Stage 1	Disseminated Stage 2	Persistent Stage 3
Skin	Erythema migrans	Secondary annular lesions Malar rash Diffuse erythema or urticaria Evanescent lesions Lymphocytoma	Acrodermatitis chronica atrophicans Localized scleroderma-like lesions
Musculoskeletal		Migratory pain in joints, tendons, bursae, muscle, bone Brief arthritis attacks Myositis [‡] Osteomyelitis [‡] Panniculitis [‡]	Prolonged arthritis attacks Chronic arthritis Peripheral enthesopathy Periostitis or joint subluxations below acrodermatitis
Neurologic		Meningitis Cranial neuritis, facial palsy Motor or sensory radiculoneuritis Subtle encephalitis Mononeuritis multiplex Pseudotumor cerebri Myelitis [‡] Cerebellar ataxia [‡]	Chronic encephalomyelitis Spastic paraparesis Ataxic gait Subtle mental disorders Chronic axonal polyradiculopathy
Lymphatic	Regional lymphadenopathy	Regional or generalized lymphadenopathy Splenomegaly	
Heart		Atrioventricular nodal block Myopericarditis Pancarditis	
Eyes		Conjunctivitis Iritis [‡] Choroiditis [‡] Retinal hemorrhage or detachment [‡] Panophthalmitis [‡]	Keratitis
Liver		Mild or recurrent hepatitis	
Respiratory		Nonexudative sore throat Nonproductive cough	
Kidney		Microscopic hematuria or proteinuria	
Genitourinary		Orchitis [‡]	
Constitutional systems	Minor	Severe malaise and fatigue	Fatigue

Test endikasyonları

- Lyme'in endemik olduğu bölgeye kısa süre önce seyahat öyküsü

ve

- Kene tutunması açısından bir risk faktörünün varlığı

ve

- Erken disemine Lyme hastalığı ya da geç Lyme hastalığı (menenjit, radikülopati, mononörit, kraniyal sinir felçleri, artrit, kardit,vb.) ile uyumlu semptomların varlığı

	Primer test	Destekleyici testler
Erythema migrans	Test gerekmez	PCR, kültür
Borrelial lenfositoma	Seroloji genellikle pozitif; Negatifse 2-6 hafta sonra tekrar	Maligniteyi dışlamak için biyopsi gerekebilir, PCR ve kültür
Lyme neuroborreliosis	BOS'ta pleositoz, <u>Intratekal antikor yapımı : Antikor İndeksi</u> Seroloji genellikle pozitif; Negatifse 2-6 hafta sonra tekrar	PCR, kültür İntratekal antikor yapımı CXCL13
Kardiyak Lyme borreliosis	Seroloji genellikle pozitif; Negatifse ve kuvvetli şüphe varsa 2-6 hafta sonra tekrar	Biyopsilerden PCR
Oküler manifestasyonlar	Seroloji testleri	Oküler sıvıdan PCR ve kültür
Lyme artriti	Seroloji testleri; kural olarak yüksek IgG titreleri	Snoviyal doku ya da sıvıdan PCR
Acrodermatitis chronica atrophicans	Seroloji testleri; kural olarak yüksek IgG titreleri	Deri biyopsilerinden PCR ve kültür

Review

To test or not to test? Laboratory support for the diagnosis of Lyme borreliosis: a position paper of ESGBOR, the ESCMID study group for Lyme borreliosis

R.B. Dessau^{1,*}, A.P. van Dam², V. Fingerle³, J. Gray⁴, J.W. Hovius⁵, K.-P. Hunfeld⁶, B. Jaulhac⁷, O. Kahl⁸, W. Kristoferitsch⁹, P.-E. Lindgren¹⁰, M. Markowicz¹¹, S. Mavin¹², K. Ornstein¹³, T. Rupprecht¹⁴, G. Stanek¹¹, F. Strle¹⁵

Key points

- Diagnosis of Lyme borreliosis is based on a complete diagnostic workup, including medical history with compatible clinical symptoms, objective signs, possible exposure to tick bites, and exclusion of other diseases, but not laboratory testing alone.
- Patients with a typical erythema migrans should be diagnosed clinically and treated promptly without serological testing, which is insensitive at this stage of disease.
- Pathology is elicited by the host immune response. Detection of antibodies to *Borrelia burgdorferi* is necessary to support the clinical diagnosis of Lyme borreliosis manifestations other than erythema migrans.
- In patients with suspected Lyme neuroborreliosis examination of cerebrospinal fluid is strongly recommended.
- The use of *Borrelia* serology in patients with non-specific subjective symptoms is discouraged.
- In patients with disease duration >6 weeks a specific IgG response is a prerequisite, but an isolated IgM response is of no diagnostic relevance.
- Detection of antibodies to *B. burgdorferi* cannot discriminate between active, latent or past infection.

- Deri biyopsilerinden PCR duyarlılığı hastalığın ortaya çıkışından sonra birinci haftada % 80 iken aylar sonra %20'ye düşer
- BOS'tan P>CR'ın duyarlılığı %40 dolayında
- Hastaların %99'unda 6-8 hafta içerisinde antikorların pozitifleşmesi beklenir
- 6. haftadan sonraki izole IgM pozitifliklerinin bir anlamı yok
- Bazı kişilerde IgM antikorları yıllarca pozitif kalabilir ancak bu persistans için bir gösterge değildir
- Uzun süreli kronik nöroborelioz, ACA ya da artriti olanlarda IgM antikorlarının tanı değeri yoktur
- Nöroboreliozda serum ve BOS antikor düzeyleri için örnekler aynı gün içerisinde alınmalıdır
- BOS'ta AI yüksekliği yıllarca devam edebilir; aktif infeksiyon için bir kanıt olmayabilir
- Antikor saptanması infeksiyonun aktif, latent ya da geçirilmiş bir infeksiyon mu olduğu konusunda ayırtettirici bilgi vermez
- Normal popülasyonda yer yer seroprevalans %20'lere kadar çıkabilir
- Antikora dayalı testlerin negatif prediktif değeri yüksektir



Review

To test or not to test? Laboratory support for the diagnosis of Lyme borreliosis: a position paper of ESGBOR, the ESCMID study group for Lyme borreliosis

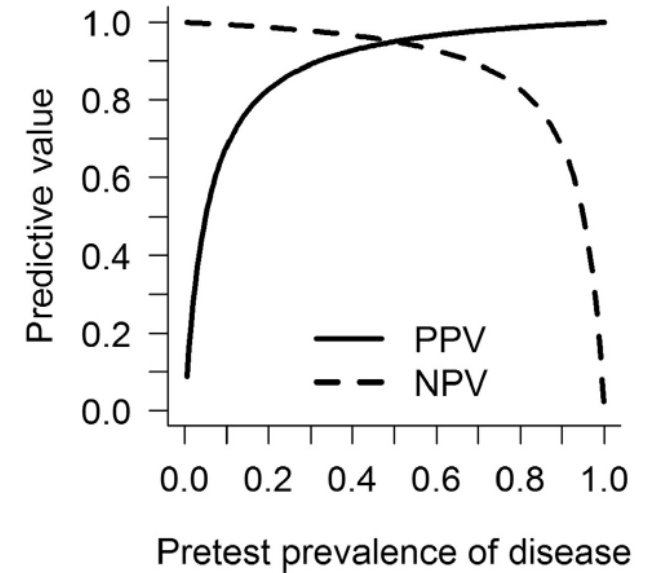
R.B. Dessau^{1,*}, A.P. van Dam², V. Fingerle³, J. Gray⁴, J.W. Hovius⁵, K.-P. Hunfeld⁶, B. Jaulhac⁷, O. Kahl⁸, W. Kristoferitsch⁹, P.-E. Lindgren¹⁰, M. Markowicz¹¹, S. Mavin¹², K. Ornstein¹³, T. Rupprecht¹⁴, G. Stanek¹¹, F. Strle¹⁵

Testing for antibodies to *Borrelia burgdorferi* to support the diagnosis of suspected Lyme borreliosis.

Clinical suspicion of	Detection of antibodies to <i>B. burgdorferi</i>	Expected sensitivity ^c	Incidence per 100 000 population ^d
Tick bite	Not relevant	Not relevant	High
Erythema migrans	Not recommended	50% (40–61)	10–100
Lyme neuroborreliosis	Specific CSF/serum antibody index	77% (67–85)	<10
Clinical duration <6 weeks			
Lyme neuroborreliosis	Specific CSF/serum antibody index	>99%	
Clinical duration >6 weeks			
Long-lasting Lyme neuroborreliosis	Specific CSF/serum antibody index	>99%	<1
>6 months			
Lyme carditis	Serum IgG and/or IgM	>80%	<1
Borrelial lymphocytoma	Serum IgG and/or IgM	>80%	<1
Lyme arthritis	Serum IgG	96% (93–100)	<1
Acrodermatitis chronica atrophicans ^a	Serum IgG	98% (84–100)	1
Ocular manifestations ^b	Serum IgG	?	Rare

İki aşamalı (two tier test) test algoritması

1. Aşama: ELISA test ile tarama (VlsEC6 peptid)
2. Aşama: Immunoblot (doğrulama) testi

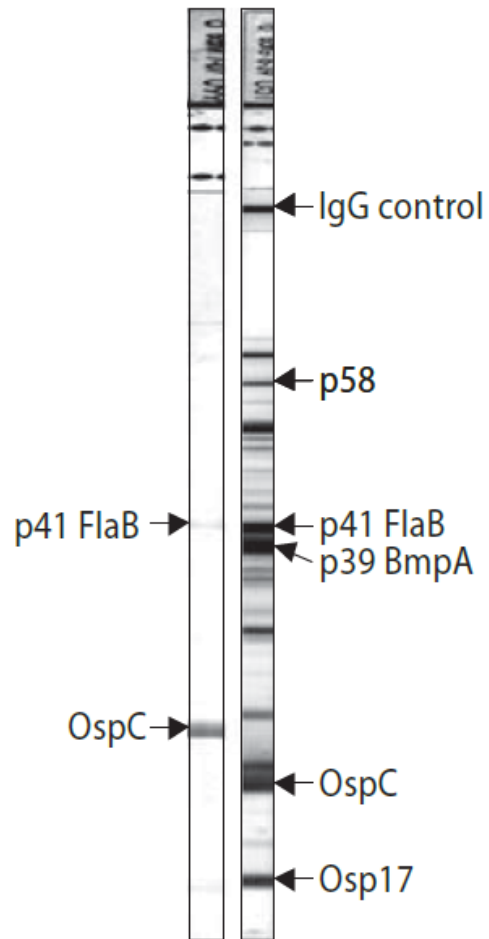


ELISA testinin duyarlılığı %95 ise → 5 olgu yanlış negatif bulunacak demektir
Ancak artritli hastalarda prevalans %2 (test öncesi olasılık) ise gerçek bir olgunun atlanma olasılığı $0.05 \times 0.02 = 0.001$ olacaktır

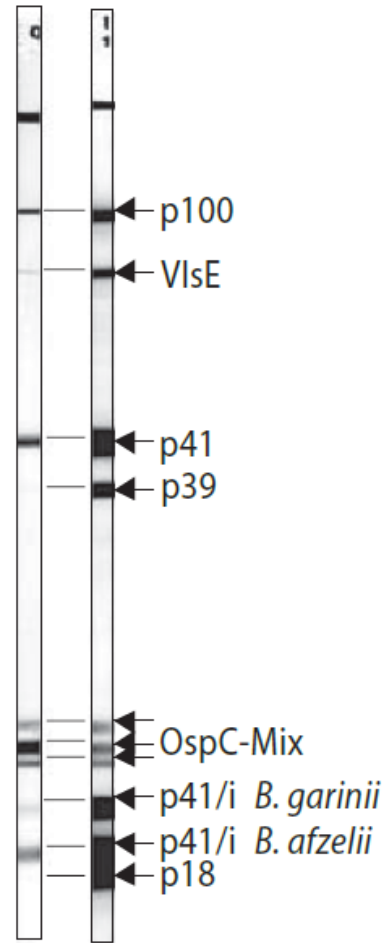
Örneğin Danimarka'da geç nöroborelyozda ortalama 5 yılda bir olgunun atlanma ihtimali olduğu hesaplanmış

Protein	Phase in which antigen expressed	Specificity	Cross-reactivity
p83/100	late	high	infrequent
p58	early/late	fair	infrequent
p43	early/late	fair	infrequent
p41 (flagellin)	early/late	low	common
p39 (BmpA)	late	fair	infrequent
OspA	late	fair	infrequent
OspC	early/late	high	infrequent
Osp17/p18 (DbpA)	late	fair	infrequent
VlsE	early/late	high	infrequent
p41 (flagellin, internal fragment)	early/late	fair	infrequent

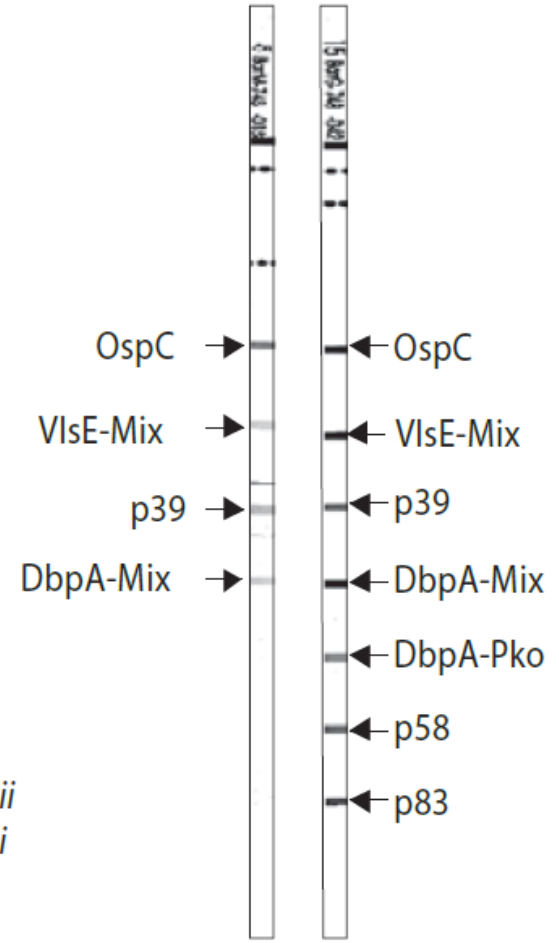
Whole cell
immunoblot
IgM IgG



Recombinant
immunoblot
IgM IgG

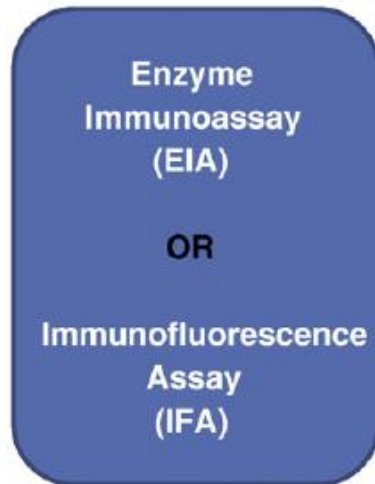


Line
immunoblot
IgM IgG



Two-Tiered Testing for Lyme Disease

First Test



Positive
or
Equivocal
Result

Negative
Result

Second Test

Signs or
symptoms
 ≤ 30 days

Signs or
symptoms
 > 30 days

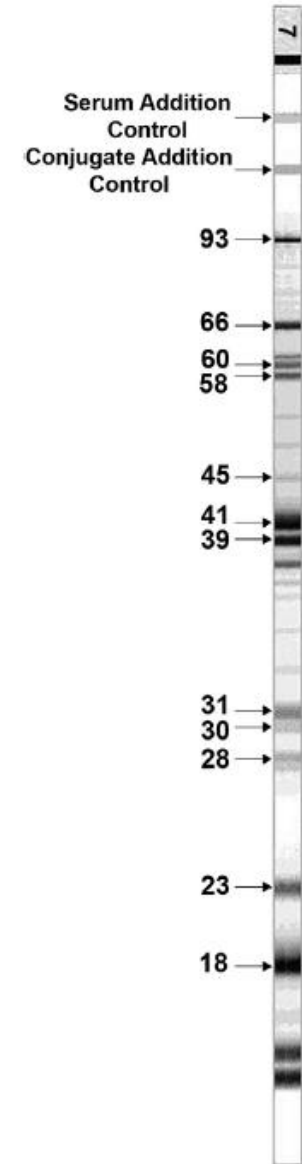
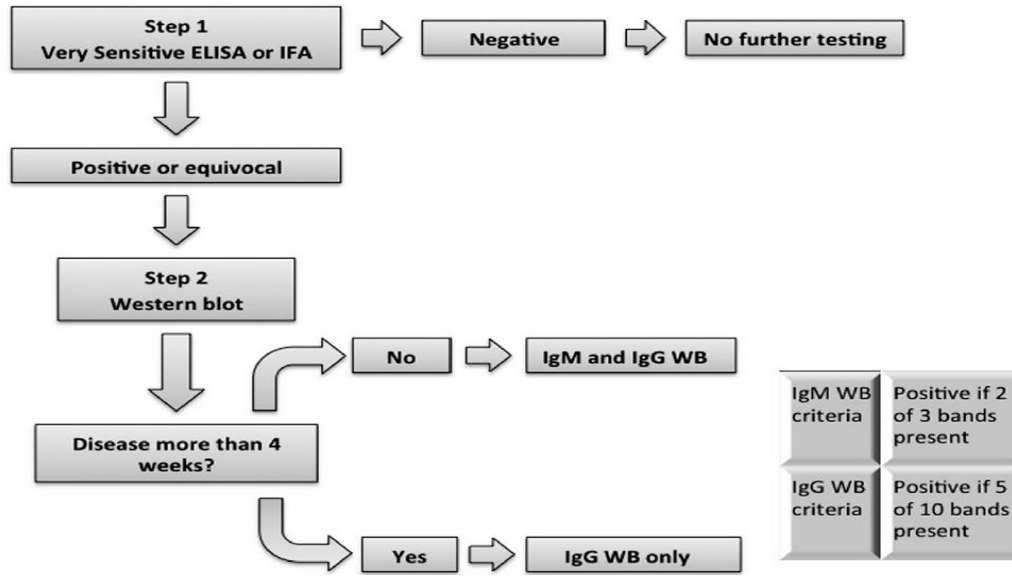
IgM and IgG
Western Blot

IgG Western Blot
ONLY

Consider alternative diagnosis

OR

If patient with signs/symptoms consistent
with Lyme disease for ≤ 30 days, consider
obtaining a convalescent serum



- IgM immunoblot 3 spesifik banttın 2'si varsa pozitif olarak değerlendirilir: 24 kDa (OspC), 39 kDa (BmpA) ve 41 kDa (Fla).
- IgG immunoblot 10 banttın 5'i varsa pozitif olarak bildirilir: 18 kDa, 21 kDa (OspC), 28 kDa, 30 kDa, 39 kDa (BmpA), 41 kDa (Fla), 45 kDa, 58 kDa (not GroEL), 66 kDa, and 93 kDa
- ELISA pozitif olduğu halde immunoblot negatifse ya da sonuç indetermine ise sonuç negatif olarak raporlanır.

B. afzelii (strain PKo) whole cell antigen immunoblot evaluation criteria for Europe according to Hauser et al. [10]

IgG positive: ≥ 2 bands
p100, p58, p43, p39, p30, OspC, p21, Osp17, p14

IgM positive: ≥ 1 bands
p41 (strongly positive), p39, OspC, Osp17

B. burgdorferi s.s. (strain G39/40) whole cell antigen immunoblot evaluation criteria according to the CDC recommendations for the USA only [11, 12]

IgG positive: ≥ 5 bands
p83/100, p66, p58, p45, p41, p39, p30, p28, OspC,
or p18

IgM positive: ≥ 2 bands
p39, OspC, p41

Recombinant immunoblot, according to Wilske et al. [13] and Schulte-Spechtel et al. [6]

IgG positive: ≥ 2 bands
p100, p58, p39, VlsE, OspC, p41 internal fragment,
Osp17/p18

IgM positive: ≥ 2 bands
p39, OspC, p41 internal fragment, Osp17/
p18; or strong reaction against OspC only

- **Az sayıda VlsE, OspC, p41 bantları → erken enfeksiyonu**
- **p100, p17/p18 dahil çok sayıda bant varlığı → geç enfeksiyon**

Destekleyici Test Olarak PCR

Sensitivities and specificities of PCR based on the references reviewed by AP van Dam [14]

Sample	Number of studies (groups)	Sensitivity (%)	Specificity (%)
Skin biopsy EM	11	69 (35–81)	100
Skin biopsy ACA ^a	3	16, 61, 92	100
CSF	17	40 (5–100)	100 (93–100)
Synovial fluid ^a	3	36, 85, 85	100
Serum or plasma	5 (6)	30 (15–100)	100 (95–100)
Urine	14 (9)	42 (0–92)	97 (94–100)

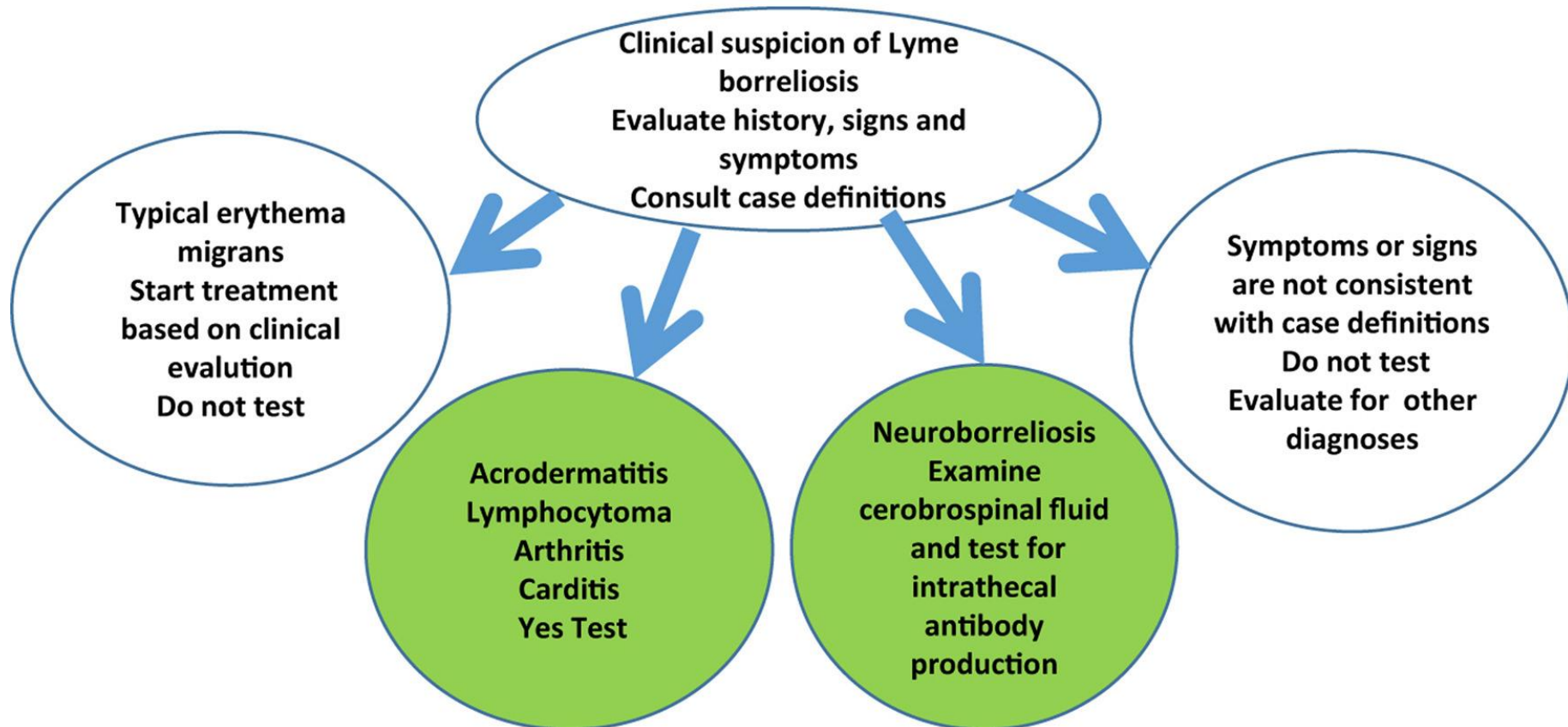
CXCL13

- B lenfositleri atraktanı bir kemokin
- Lyme nöroborelyozunda BOS'ta yüksek konsantrasyonlarda saptanabiliyor
- Ancak nörosifilis, HIV ve lenfomalarda da yüksek bulunabilir
- Özellikle henüz AI yüksekliği ve pleositozla desteklenmeyen erken böroborelyozlarda (<2 hafta) işe yarayabileceği düşünülüyor
- Ancak antibiyotik tedavisi ile hızla düşüyor ve henüz bir sınır değeri belirlenmiş değil

Diğer (önerilmeyen) testler

- Lenfosit transformasyon (aktivasyon) testi
- Single step VlsE C6 ELISA
- CD57 pozitif hücre sayımı
- Karanlık alan ya da faz-kontrast mikroskopi
- Immune complex disruption
- Hastadan çıkartılan kenenin test edilmesi
- Ksenodiagnosis
- Enzyme-Linked ImmunoSpot (ELISPOT)
- Sitokin düzeyleri
- Kompleman parçalanma ürünleri

When to test for Borrelia specific antibodies?



Lyme Hastalığı (Borrelia)

1. ➤ Borelyozun klinik, tanı ve tedavisi
2. ➤ Nöroborelyoz ile ilgili özel uygulamalar
3. ➤ Borrelia için Lenfosit Transformasyon Testi hakkında bilgi (LTT Borrelia)
4. ➤ Borrelia recomBead Testi, protein spesifik Borrelia antikorlarının kantitatif tayinini sağlar.
5. ➤ Borelyoz seyrinin teşhisinde ve değerlendirilmesinde HLA'nın belirlenmesinin etkisi nedir?
6. ➤ Borreliosis (Lyme Hastalığı) Belirti ve Teşhisi

➤ Alıntı yapılan literatürler

LYME HASTALIĞI NASIL TEŞHİS EDİLİR? Lyme hastalığının tanısı için CDC tarafından iki aşamalı bir yaklaşım önerilmiştir. Lyme hastalığı tanısı için alınan tüm serum örnekleri, birinci adım olarak EIA veya IFA gibi duyarlı bir serolojik yöntem ile incelenmelidir. Bu yöntemler ile pozitif yada sınırda bir değer bulunduğunda, standardize immüblot veya westernblot yöntemi uygulanmalıdır. Negatif bulunan örnekler için tekrar test yapılması önerilmemektedir. Ancak hastada erythema migrans oluşumu varsa, başka belirtiler veya test sonuçları beklenmeden hemen tedaviye başlanması gerekir. Lyme'in teşhisi ile ilgili asıl sorun bazı hastalarda devamlı negatif test sonuçları alınmasına rağmen hastalığın var olmasıdır. Bu nedenle **LYME HASTALIĞINDA TANI MUTLAKA KLİNİK VERİLER IŞIĞINDA KONMALIDIR.**