

Borelioza: dlaczego diagnostyka jest tak trudna?

Elżbieta Witecka-Knysz², Małgorzata Klimczak², Karol Lakwa³, Joanna Żajkowska¹, Sławomir Pancewicz¹, Maciej Kondrusik¹, Sambor Grzegorzczuk¹, Renata Świerżbińska¹, Teresa Hermanowska-Szpakowicz¹

¹ Klinika Chorób Zakaźnych i Neuroinfekcji Akademii Medycznej w Białymstoku

² Wojewódzki Zespół Specjalistycznej Opieki Zdrowotnej we Wrocławiu

³ EUROIMMUN POLSKA Sp. z o.o.

Wstęp

Wykonywane rutynowo w laboratoriach testy serologiczne w kierunku boreliozy często sprawiają trudności interpretacyjne, ponieważ odpowiedź immunologiczna może przebiegać odmiennie od typowego schematu opisywanego w przypadku innych chorób infekcyjnych. Główne problemy, jakie napotykamy w diagnostyce laboratoryjnej boreliozy, są wynikiem strategii życiowych *Borrelia burgdorferi*, skomplikowanej odpowiedzi immunologicznej i niedoskonałości metod diagnostycznych.

Strategie życiowe

Borrelia burgdorferi

i ich konsekwencje diagnostyczne

1. Zmienność morfologiczna *Borrelia burgdorferi*

Żywe komórki *Borrelia burgdorferi* charakteryzują się unikalnymi, wyróżniającymi je spośród większości bakterii, cechami. W odpowiedzi na stres środowiskowy ruchliwe formy spiralne przeobrażają się w cysty (forma L, bakteria pozbawiona ściany komórkowej, która przybiera formę sferyczną), ukrywając materiał genetyczny w oczekiwaniu na powrót sprzyjających warunków. Proces ten jest odwracalny, zarówno w warunkach *in vitro*, jak *in vivo*. Z chwilą powstania cyst znikają specyficzne antygeny, które były dotychczas rozpoznawane przez układ immunologiczny, co prowadzi do zahamowania produkcji przeciwciał. Spadek poziomu przeciwciał lub ich brak sprzyja odtworzeniu spiralnej formy krętka z cysty.

Alternatywnym wyjaśnieniem nawracającej lub przewlekłej manifestacji narządowej jest przetrwanie w tkankach składników bakterii, które prowokują reakcje zapalne. *Borrelie* mogą wytwarzać również formy **l e b s**, które zawierają głównie lipoproteiny OspA, OspB, OspD i niskocząsteczkową lipoproteinę o masie od 6 do 10 kDa. Lipoproteiny te są silnymi induktorami reakcji zapalnych. Obecność tych pęcherzyków pozakomórkowych z czynnymi biologicznie lipopeptydami w zajętych tkankach może przyczyniać się do utrzymywania się stanu zapalnego nawet wówczas, gdy nieobecne są zdolne do namnażania bakterie.

2. Zmienność antygenowa *Borrelia burgdorferi*

W diagnostyce serologicznej trzeba brać pod uwagę ogromną, niespotykaną u innych bakterii heterogenność i polimorfizm antygenów. W związku z tym równie zróżnicowane są powstające w odpowiedzi na kontakt z nimi przeciwciała. Stwarza to poważne trudności w konstruowaniu testów laboratoryjnych, które powinny wychwytywać z dużą czułością wszystkie wyprodukowane przeciwciała, przy równoczesnym uniknięciu reakcji krzyżowych z przeciwciałami powstałymi po kontakcie z innymi patogenami.

Borrelia dokonuje zmiany swoich antygenów powierzchniowych jako wyraz adaptacji na zmieniające się warunki środowiska (kleszcz / kręgowiec / różne tkanki). Natomiast zmienność w obrębie tego samego antygeny np. OspC prezentują również inne gatunki *Borrelia*, np. *B. recurrentis* powodująca dur powrotny, uciekając w ten sposób przed wytworzonymi już specyficznymi przeciwciałami.

Unikanie odpowiedzi immunologicznej poprzez zmiany antygenów powierzchniowych prowadzi do prezentacji nowych antygenów układowi immunologicznemu, przeciwko którym nie ma on jeszcze wytworzonych przeciwciał. Dlatego przeciwciała skierowane przeciwko pierwotnym antygenom nie mogą spełniać swoich ochronnych funkcji, a odpowiedź immunologiczna staje się nieadekwatna.

Dodatkowym utrudnieniem jest pojawianie się, lub też zanikanie wielu antygenów w różnych stadiach choroby i w różnych stanach fizjologicznych *Borrelia burgdorferi*, wynikających z uruchomienia unikalnych strategii życiowych.

3. Wewnątrzkomórkowe przebywanie *Borrelia burgdorferi* oraz ukrywanie się patogenu w obszarach immunologicznie uprzywilejowanych

Podczas infekcji produkcja przeciwciał jest wolna, a ilość przeciwciał ochronnych może być zbyt niska, co jest powodem niewystarczającej skuteczności obrony immunologicznej. Daje to szansę bakteriom dotarcia do stref organizmu, gdzie są chronione przed atakiem przeciwciał. Takimi niszami mogą być przestrzenie wewnątrzkomórkowe (k. śródłonka i fibroblasty), ośrodkowy układ nerwowy, aparat ruchu i inne. Oprócz niemożności przedostania się antybiotyków do niektórych przestrzeni zajmowa-

nych przez bakterie, utrudniony jest też kontakt układu immunologicznego zakażonego pacjenta z przebywającymi wewnątrzkomórkowo krętkami *Borrelia burgdorferi*, czego efektem jest brak lub osłabienie odpowiedzi immunologicznej i nieefektywne leczenie. Przebywanie żywych bakterii wewnątrz komórek i w miejscach niedostępnych dla komórek układu immunologicznego wiąże się z niebezpieczeństwem wznowy choroby po wydstaniu się krętków z ukrycia. W takich sytuacjach w późnym okresie choroby może niekiedy dojść do produkcji przeciwciał typowych dla wczesnych stadiów choroby.

Wykonując badania serologiczne należy wziąć pod uwagę możliwość lokalnej produkcji przeciwciał (kompartmentalizacji odpowiedzi immunologicznej), ograniczonej do określonych przestrzeni (płyn stawowy, PMR). W takich sytuacjach badanie surowicy krwi może nie wykazać obecności spodziewanych przeciwciał, lub odpowiedź serologiczna może być wyrażona słabo. Jednorazowo uzyskany ujemny wynik badania serologicznego, szczególnie we wczesnej fazie choroby, nie wyklucza zakażenia. Wiąże się to ze stopniowym rozwojem odpowiedzi humoralnej, w miarę prezentowania nowych antygenów.

Odpowiedź immunologiczna na zakażenie *Borrelia*

Po ukłuciu przez kleszcza bakterie *Borrelia burgdorferi* zajmują skórę, skąd w ciągu kilku dni potrafią się przedostać do wielu tkanek. Ciągłe brak jest jednak kompletnych i pewnych informacji wyjaśniających przebieg kolejnych faz infekcji boreliozowej, takich jak: mechanizm transportu bakterii *Borrelia burgdorferi* wewnątrz naczyń, rodzaj czynników umożliwiających krętkom opuszczenie systemu naczyniowego oraz szczegóły potwierdzonego już klinicznie organotropizmu.

W wyniku zakażenia *Borrelia burgdorferi*, podobnie jak w wyniku innych infekcji, uruchomiony zostaje cały szereg reakcji immunologicznych, zarówno swoistych, jak nieswoistych, mających na celu eliminację patogenu.

Rozwój odpowiedzi immunologicznej w zakażeniu *Borrelia burgdorferi* przebiega w kilku etapach. Pierwszy etap, w którym nie wykrywa się swoistych przeciwciał, trwa około trzech tygodni od momentu zakażenia. W tym czasie funkcjonują wrodzone mechanizmy obrony polegające na działaniu komórek żernych (makrofagów, granulocytów), lizozymu, interferonu, układu dopełniacza komórek cytotoskycznych. W drugim etapie rozwija się odpowiedź nabyta, czyli następuje rozpoznanie obcych antygenów i przygotowanie do rozpoczęcia pełnej swoistej odpowiedzi immunologicznej. Powstają zarówno limfocyty B produkujące swoiste przeciwciała, jak limfocyty T z receptorami wiążącymi obcy antygen. Etap ten ma wielkie znaczenie dla roz-

woju pełnej i prawidłowej odpowiedzi immunologicznej. Wszelkie zaburzenia mechanizmów nieswoistych we wczesnym okresie zakażenia mogą uniemożliwić skuteczną eradykację patogenu w dalszych etapach odpowiedzi i w konsekwencji doprowadzić do rozwoju stanu przewlekłego choroby.

Podobnie jak w większości zakażeń, jako pierwsze pojawiają się przeciwciała w klasie IgM. Uwalniane są na początku pierwotnej odpowiedzi immunologicznej. Charakteryzują się małym powinowactwem do antygeny, sprzyjają silnej aktywacji dopełniacza (do 400x bardziej niż IgG) i wiązaniu receptorów FcR na komórkach żernych oraz fagocytozie. Następnie pojawiają się przeciwciała w klasie IgG, które stanowią główne immunoglobuliny w walce z patogenami.

W miarę rozwoju procesu chorobowego, to jest przechodzenia infekcji przez kolejne stadia, obserwuje się ewolucję produkcji przeciwciał skierowanych przeciwko różnym antygenom, zależnie od stadium choroby. Wczesna odpowiedź immunologiczna (głównie przeciwciała w klasie IgM) skierowana jest przeciwko białku flagelliny p41 oraz do białka OspC związanego z błoną zewnętrzną. We wczesnym etapie infekcji *Borrelia burgdorferi* układ immunologiczny rozpoznaje zaledwie kilka antygenów. W miarę upływu czasu odpowiedź immunologiczna rozszerza się na coraz większą liczbę białek antygenowych. Późniejsze stadia choroby charakteryzują się obecnością przeciwciał skierowanych do wielu różnych białek, takich jak: p39 ip58, a następnie: p83/100, p53, p43, p39, p30, p21, Osp17, pl4 (pojawiają się one tygodnie, miesiące i lata później). Przeciwciała anty OspC w klasie IgG w późniejszych stadiach choroby są obecne bardzo rzadko. Dla kontrastu, przeciwciała anty-OspC w klasie IgM mogą utrzymywać się u niektórych pacjentów przez lata, nawet po skutecznej terapii. Tak więc obecność specyficznych przeciwciał w klasie IgM nie może stanowić jedynego kryterium diagnostycznego potwierdzającego świeżą infekcję.

Podobnie jak w przypadku przeciwciał w klasie IgM, odpowiedź immunologiczna w klasie IgG może utrzymywać się przez lata i dlatego nie może służyć np. monitorowaniu leczenia. Przeciwciała, które zostały wyprodukowane w wyniku infekcji, mogą być stwierdzone we krwi nawet po 10, a niekiedy po 20 latach od momentu stwierdzenia choroby (w obu klasach), ale ich obecność nie jest wskaźnikiem aktywnego zakażenia. Oprócz stanów związanych ze wznową choroby, z reinfekcją, z prawidłową pamięcią immunologiczną, mogą wystąpić zjawiska nie związane z infekcją *Borrelia burgdorferi* np. reakcje krzyżowe z nieswoistymi antygenami krętków.

Trudności w diagnostyce boreliozy

Laboratoryjną diagnostykę boreliozy utrudnia interpretacja wyników, a mianowicie niemożność odróżnienia aktywnego zakażenia od przebytego w przeszłości, nawet w sytuacji gdy wykrywane przeciwciała są całkowicie swoiste. Ponadto stężenie wykrywanych przeciwciał nie koreluje ze stanem klinicznym pacjenta. Często wysokie stężenia przeciwciał klasy IgG stwierdzone są u pacjentów bez objawów choroby. Prowadząc diagnostykę boreliozy należy pamiętać o jej ograniczeniach i brać pod uwagę sytuacje prowadzące do fałszywych wyników.

1. Wyniki fałszywie dodatnie w serodiagnostyce boreliozy

Ograniczenie diagnostyki do testów skryningowych. Niestety, w laboratoriach w Polsce najczęściej diagnostyka boreliozy polega tylko na wykonaniu testu przesiewowego. Przeprowadzono badania dotyczące częstości występowania reakcji fałszywie dodatnich testów skryningowych. Grupę 202 leśników z okolic Białegostoku oceniono pod względem obecności przeciwciał przeciwko *Borrelia burgdorferi* klasy IgG i IgM (osobno) za pomocą testów skryningowych ELISA trzech producentów. Wszystkie wyniki pozytywne i wątpliwe potwierdzono testami Western blot z pełnym ekstraktem *Borrelia afzelii* i rekombinowanym antygenem VlsE. W przypadku przeciwciał klasy IgG uzyskano wyniki fałszywie dodatnie testów ELISA u od 3 do 27 osób (w zależności od producenta). W przypadku przeciwciał klasy IgM uzyskano wyniki fałszywie dodatnie testów ELISA u od 20 do 74 osób! Dane te obrazują, jak bardzo istotne jest wykonywanie testów Western blot, które dzięki wysokiej swoistości eliminują wyniki fałszywie dodatnie. Rezygnacja z wykonania testów potwierdzających może być przyczyną błędnego rozpoznania boreliozy, czego skutkiem często jest stosowanie niepotrzebnej, długotrwałej (3-4 tygodnie!) antybiotykoterapii.

Reakcje krzyżowe są wynikiem innych infekcji, np. zakażenia krętkiem *Treponema pallidum*, *Ehrlichia*, zakażenia wirusami *Herpes* (szczególnie *Epstein-Barr*). Problem ten dotyczy przede wszystkim przeciwciał wykrywanych w klasie IgM. Powodem reakcji krzyżowych są niektóre antygeny *Borrelia*, które występują licznie również w innych mikroorganizmach, np.: p41, p58-60, p66, p68, p71, p73. Reakcje krzyżowe wpływają na wynik testów przesiewowych i mogą być zweryfikowane w testach Western blot.

Hypergammaglobulinemia. W przypadku chorób autoimmunologicznych z wysokim mianem auto-przeciwciał dodatnie wyniki oznaczeń przeciwciał przeciw *Borrelia burgdorferi* charakteryzują się często nietypowym obrazem w odniesieniu do stadium choroby i rodzaju antygenów, przeciwko któ-

rym skierowane są przeciwciała. Manifestacje kliniczne chorób tkanki łącznej mogą przypominać boreliozę (np. zapalenie i bóle stawów, objawy neurologiczne), dlatego w wątpliwych przypadkach należy przeprowadzić diagnostykę różnicową z chorobami autoagresyjnymi.

2. Wyniki fałszywie ujemne w serodiagnostyce boreliozy

Zbyt wczesnie wykonane badanie: Przeciwciała w klasie IgM pojawiają się zwykle ok. 4 tygodni po zakażeniu, zaś przeciwciała IgG pojawiają się zazwyczaj między 4 a 8 tygodniem od zakażenia. Dlatego testy serologiczne (również Western blot) są mało przydatne w diagnostyce wczesnych stadiów boreliozy z powodu niskiej czułości testów na początek choroby. Testy serologiczne stają się bardziej użyteczne w późniejszych stadiach choroby, kiedy ich czułość jest lepsza.

Defekt immunologiczny stwierdzany u pacjenta: słaba odpowiedź immunologiczna lub całkowity jej brak. W sytuacjach takich metody pośrednie zawiodą.

Obecność kompleksów immunologicznych. W przypadku masywnego zakażenia bakteriami *Borrelia burgdorferi* może dojść do związania krążących przeciwciał przez antygeny bakteryjne. Powstawanie kompleksów immunologicznych obserwuje się szczególnie w stanach ostrych, gdy zakażenie jest masywne. Przeciwciała występujące w postaci kompleksów immunologicznych nie mogą być wykryte przez powszechnie stosowane metody serologiczne (np. ELISA). Istnieje możliwość rozbijania kompleksów immunologicznych w celu uwolnienia przeciwciał, co stwarza szansę ich oznaczenia. W związku z trudnościami natury technicznej związanymi ze standaryzacją tych metod, nie są jeszcze dostępne testy komercyjne, które mogłyby być stosowane rutynowo. W takiej sytuacji można spróbować powtarzać badania serologiczne na przestrzeni długiego czasu (niekiedy kilku miesięcy), ponieważ w późniejszym okresie choroby wzrasta szansa wykrycia wolnych przeciwciał.

Lokalna produkcja przeciwciał. Opiswane są przypadki lokalnej produkcji przeciwciał, np. wyłącznie w płynie stawowym lub w płynie mózgowo-rdzeniowym (PMR). W związku z istnieniem bariery płyn mózgowo-rdzeniowy-krew, produkowane lokalnie przeciwciała w PMR, mogą nie być wykrywane w surowicy krwi. Należy w takich sytuacjach badanie wykonać w obu materiałach: we krwi i w PMR, po czym obliczyć indeks przeciwciał.

Wpływ antybiotykoterapii wdrożonej w początkowym stadium choroby. W tym przypadku może mieć miejsce osłabienie odpowiedzi humoralnej. Wprawdzie istnieje szansa wykrycia przeciwciał w kolejnych badaniach, ale czasami wyniki są stale negatywne, mimo klinicznego rozpoznania boreliozy (np. obecność rumienia wędrującego).

Wewnątrzkomórkowe przebywanie *Borrelia burgdorferi*. Kontakt układu immunologicznego z patogenem jest niemożliwy i w konsekwencji powoduje brak oczekiwanych przeciwciał. Do chwili pojawienia się antygenów bakteryjnych we krwi i rozpoznania ich przez układ immunologiczny, nie ma możliwości wykrycia swoistych przeciwciał.

Wnioski

Diagnostyka boreliozy nie jest łatwa, ponieważ nie dysponujemy jednoznacznym testem (co wynika ze złożonej budowy i zmienności antygenowej bakterii) oraz z powodu trudności interpretacyjnych. Niestety, żadna z dostępnych metod diagnostyki laboratoryjnej boreliozy nie pozwala na odróżnienie aktywnego zakażenia od śladu po przebyłym zakażeniu. Wyjątek stanowi hodowla, która jako jedyna dowodzi obecności żywych bakterii w badanym materiale.

W diagnostyce serologicznej boreliozy należy zwrócić szczególną uwagę na to kiedy i jaki materiał pobierany jest do badania oraz czy diagnostyka prowadzona jest zgodnie z obowiązującymi standardami postępowania. **Wyniki należy interpretować zawsze uwzględniając stan kliniczny pacjenta.** O ewentualnym powtarzaniu badań serologicznych powinien decydować lekarz po przeanalizowaniu dotychczasowych wyników i postępu choroby. W przypadku utrzymywania się wyraźnych objawów klinicznych przy stałej seronegatywności należy przeprowadzić narządową diagnostykę różnicową w kierunku obecności innych schorzeń o podobnym obrazie klinicznym jak stwierdzany w boreliozie.

Literatura

- Murgia R, Piazzetta C, Cinco M.: *Cystic forms of Borrelia burgdorferi sensu lato: induction, development, and the role of RpoS*. Wiener Klinische Wochenschrift, 114(13-14): 574-9(2002).
- Brorson O., Brorson: *An in vitro study of the susceptibility of mobile and cystic forms of Borrelia burgdorferi to metronidazole*. APMIS. 107(6): 566-576,(1999).
- Brorson O, Brorson SH.: *Transformation of cystic forms of Borrelia burgdorferi to normal mobile spirochetes*. Infection, 25: 240-6 (1997).
- Gruntar et al: *Conversion of Borrelia garinii cystic forms to motile spirochetes in vivo*. APMIS2001 May; 109(5): 383-8.
- *Outer Surface Lipoproteins of Borrelia burgdorferi Activate Vascular Endothelium in Vitro* Sellati TJ, Abrescia LD, Radolf JD, Furie MB, Infection and Immunity, Aug. 1996, p. 31803187
- Widhe Mona: *Immune Responses in Human Lyme Borreliosis*. Linköping University Medical Dissertations No.778,2003.
- Hauser U, Lehnert G, Lobentanzer r, Wilske B.: *Interpretation Criteria for Standardized Western Blots for Three European Species of Borrelia burgdorferi Sensu Lato*. Journal of Clinical Microbiology, June 1997, 35(6): 1433-1444.
- Akin E, McHugh GL, Flavell RA, Fikrig E, Steere AG: *The immunoglobulin (IgG) antibody response to OspA and OspB correlates with severe and prolonged Lyme arthritis and the IgG response to P35 correlates with mild brief arthritis*. Infect Immun 1999 Jan; 67(1): 173-81.
- Kalish RA, McHugh G, Granquist J, Shea B, Ruthaxer R, Steere AC: *Persistenz von Immunoglobulin M oder Immunoglobulin G Antikörper Reaktionen auf Borrelia burgdorferi 10-20 Jahre nach einer aktiven Borreliose (Lyme Krankheit)*. Clin. Infect. Dis. 2001, Sept.15; 33(6): 780-5.