

Wybrane aspekty patogenезы i diagnostyki neuroboreliozy

Joanna M. Zajkowska, Sławomir A. Pancewicz

Klinika Chorób Zakaźnych i Neuroinfekcji Akademii Medycznej w Białymstoku

STRESZCZENIE

Neuroborelioza nazywana jest postacią boreliozy z Lyme, w której objawy dotyczą układu nerwowego. Symptomatologia neuroboreliozy wynika z możliwości lokalizacji procesu chorobowego w każdym miejscu układu nerwowego. Zażycie układu nerwowego może nastąpić tuż po zakażeniu, po kilku miesiącach, a nawet po kilku lub kilkunastu latach. Bezpośrednia interakcja krętków z komórką nerwową powoduje jej uszkodzenie oraz odpowiedź immunologiczną przeciw krętkom. Bezpośrednia interakcja krętków z komórką nerwową powoduje jej uszkodzenie oraz odpowiedź immunologiczną przeciw krętkom. Naczyniopochodny i demielinizacyjny charakter zmian obserwuje się w centralnym, jak również w obwodowym układzie nerwowym. Uważa się, że ustępujące po leczeniu neuropatie są następstwem uszkodzenia *vasa nervosum*. Neuropatie pierwotnie aksonalne, których pojawienie wiąże się z zaburzeniami immunologicznymi, słabiej odpowiadają na leczenie. Prawdopodobnie generowana jest autoreaktywność przeciwko endogennym struktutom neuronowym, prawdopodobnym jest również istnienie reakcji krzyżowej między antygenami neuronowymi i flageliną *B. burgdorferi*. Utrzymywaniu się zakażenia sprzyjają niezwykle właściwości krętków polegające na zmianie ich morfologii, zmienności antygenowej oraz unikaniu działania mechanizmów obronnych zakażonego. Rozpoznanie boreliozy z Lyme może nastąpić na podstawie obrazu klinicznego (rumień wędrujący) lub na podstawie dodatniego wyniku testu diagnostycznego u osoby z objawami klinicznymi i wywiadem epidemiologicznym wskazującym na boreliozę w innych postaciach klinicznych. Cel ten

można osiągnąć metodami bezpośrednimi i pośrednimi. Zalecona metoda diagnostyki serologicznej boreliozy w Europie dwustopniowa, polega na zastosowaniu testu o mniejszej swoistości i dużej czułości ELISA, a następnie wykonanie testu metodą *Western blot*. W praktyce klinicznej nie należy zapominać, że borelioza z Lyme jest rozpoznaniem klinicznym, potwierdzonym w badaniu laboratoryjnym.

Słowa kluczowe: (neuro)borelioza z Lyme, patogenеза, diagnostyka

Wstęp

Borelioza wywołana przez krętka *Borrelia burgdorferi s.l.* (*B. burgdorferi sl*) jest chorobą, która może się rozwinąć w kompleks zaburzeń wieloukładowych.

Neuroborelioza nazywana jest postacią boreliozy z Lyme, w której objawy dotyczą układu nerwowego. Symptomatologia wynika z możliwości lokalizacji procesu chorobowego w każdym miejscu układu nerwowego, a jego zajęcie może nastąpić tuż po zakażeniu, po kilku miesiącach, a nawet po kilku lub kilkunastu latach [1].

Należy zwrócić uwagę, że postaci neuroboreliozy, szczególnie przewlekłej, mogą odpowiadać symptomatologii innych chorób, szczególnie stwardnienia rozsianego (SM, *sclerosis multiplex*), początkowym etapom procesów rozrostowych, stwardnienia zanikowego bocznego (SLA, *sclerosis lateralis amyotrophica*) czy pewnym chorobom psychicznym. Duże podobieństwo objawów klinicznych występujących w neuroboreliozie i SM — schorzeniu rokującemu niepomyślnie — powoduje, że wiele osób poszukuje potwierdzenia krętko-

Adres do korespondencji: dr hab. med. Joanna M. Zajkowska
Klinika Chorób Zakaźnych i Neuroinfekcji
Akademii Medycznej w Białymstoku
ul. Żurawia 14, 15-540 Białystok
tel.: 0 85 74 09 519
e-mail: zajkowsk@neostrada.pl
Polski Przegląd Neurologiczny 2007, tom 3, 2, 116-122
Wydawca: Wydawnictwo Via Medica
Copyright © 2007 Via Medica

kowej etiologii swojej choroby i weryfikacji wcześniej postawionej diagnozy.

Objawy psychiczne mogą się pojawiać w znacznym odstępie czasowym od ukłucia przez kleszcze i nie zawsze bywają poprzedzone innymi postaciami boreliozy. Rozpoznanie neuroboreliozy wielokrotnie następuje ogromnych trudności. W obszarach endemicznych odsetek osób z dodatnimi przeciwciałami przeciw *B. burgdorferi* może być znaczny, co nie musi się wiązać z przebiegiem choroby. Trudności diagnostyczne wynikają zarówno ze złożonego patomechanizmu tego schorzenia, wielu mechanizmów unikania odpowiedzi immunologicznej, jak i zmienności morfologicznej oraz antygenowej krętka, a także braku wystandaryzowanych, porównywalnych, jednoznacznych testów diagnostycznych. W rozpoznaniu i interpretacji wyników laboratoryjnych istotny jest obraz kliniczny, dane epidemiologiczne, ale także znajomość parametrów diagnostycznych stosowanych testów.

Przedmiotem obecnych badań nad patogenезą boreliozy są następujące zagadnienia: skuteczność początkowej kolonizacji tkanek przez krętka, gwałtowny rozsiew i szybka penetracja do ośrodkowego układu nerwowego (OUN), zdolność do zakażenia niemal wszystkich tkanek, unikanie odpowiedzi odpornościowej zakażonego, ustalenie stanu przewlekłego zakażenia przez miesiące, a nawet lata, z możliwością nawrotów, indukcja odpowiedzi zapalnej (jako główna przyczyna niszczenia tkanek i objawów choroby), indukcja zespołów neurologiczno-psychiatrycznych niepoddających się leczeniu.

Kliniczne zróżnicowanie przebiegu boreliozy z Lyme prawdopodobnie ma związek nie tylko z efektywnością działania układu odpornościowego zakażonego człowieka, ale również z własnościami genogatunku bakterii *B. burgdorferi* *sl* i heterogenności, nawet w obrębie jednego genogatunku, co pozwala wyróżnić nie tylko genotypy, ale i patotypy. Część zakażeń, mimo odpowiedzi serologicznej, jest bezobjawowa i nie prowadzi do rozwoju choroby. *Borrelia garinii* jest genogatunkiem szczególnie predysponowanym do układu nerwowego [2].

Wydaje się, że istnieje więcej niż jeden mechanizm odpowiadający za zmiany powstające w OUN. Bezpośrednia interakcja krętków z komórką nerwową powoduje jej uszkodzenie oraz wzbudza odpowiedź immunologiczną przeciwko tym bakteriom. W neuroboreliozy wykazano autoreaktywność przeciwko endogennym strukturom neuronów. Może to być powodem uruchomienia media-

torów zapalnych prowadzących do zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych. Zapalne i angiopatyczne zmiany nerwów obwodowych mogą powodować uszkodzenia aksonów, powodując w efekcie obwodową neuropatię [3].

W patogenezie boreliozy z Lyme coraz większą uwagę przykuwa zmienność morfologicznej krętka *B. burgdorferi*, a także zmiana ekspresji jego antygenów pod wpływem środowiska. Wyniki prac nad genomem *B. burgdorferi* sugerują, że krętki mają jedynie szczątkowe mechanizmy własnego metabolizmu i są niemal całkowicie uzależnione od gospodarza w zakresie przemiany tłuszczów, białek, węglowodanów, aminokwasów i żelaza. Z uwagi na różne środowiska (kleszcz i stałocieplny ssak, a także różne jego tkanki) krętki muszą się adaptować do tych odmiennych warunków przez ekspresję nie tylko powierzchniowych protein, ale dopasowują swój metabolizm do zupełnie innych substancji odżywczych, co powoduje zarówno znaczne zmiany biologiczne, jak i zmiany w składzie antygenowym. Brak w środowisku niezbędnych składników wywołuje przejście form ruchliwych, spiralnych w nieruchome, mało aktywne metabolicznie, postaci sferyczne — cysty (sferoplasty, formy L). W niekorzystnych warunkach tworzą się również pęcherzyki zwane „blebs” (*gemmae*) [4].

Jest prawdopodobne, że krętki w postaci nieaktywnej, ale immunogennej mogą być odpowiedzialne za utrzymującą się antygenową stymulację, powodując objawy przewlekłej boreliozy [5]. Wydaje się, że obecnością bakterii w postaci cyst w ludzkim organizmie można tłumaczyć długie okresy latencji w przebiegu boreliozy z Lyme, okresy jej nawrotów, oporność na pewne antybiotyki, negatywne wyniki serologiczne i niską czułość badania metodą polimerazy łańcuchowej (PCR, *polymerase chain reaction*). Forma sferoplastyczna, pozbawiona ściany komórkowej, uniemożliwia eliminację krętków za pomocą antybiotyków, działających na jej syntezę (antybiotyki β -laktamowe), a znacznie mniejsza ilość protein powierzchniowych uniemożliwia skuteczne działanie niektórych swoistych przeciwciał. Powstanie takich form bakterii ułatwia jej przetrwanie w niekorzystnych warunkach, uniemożliwia ich wykrycie przez układ odpornościowy oraz eliminuje działanie antybiotyku. Obecność form granulanych niektórzy autorzy wiążą z zachorowaniem na stwardnienie rozsiane (związek demielinizacji z obecnością patogenów w postaci cyst w OUN) [6].

Wraz ze zmianą środowiska *Borrelia burgdorferi* ulega metamorfozie, łącznie ze zmianami w zakre-

sie ekspresji wielu różnych lipoprotein. W czasie mnożenia się i przemieszczania, krętki zmieniają swój płaszcz antygenowy [4]. Ekspresja białek powierzchniowych Osp A i B jest widoczna w trakcie pobytu krętka w jelitach kleszcza, natomiast zmniejsza się po przejściu do organizmu ssaka. OspC jest niewykrywalny w jelitach kleszcza, natomiast pojawia się w tkankach ssaka. Pojawiają się też Osp E, spF, OspEF-related proteins, oznaczone jako Erps. Scharakteryzowano nowe białka pojawiające się na krętku w środowisku ssaka: Rev, DbpA i VraA. Ponadto Vmps (variable major proteins), grupa białek Vsps (variable small proteins), które mogą być identyfikowane z OspC. Zmiana antygenów powierzchniowych krętka umożliwia zakażenia uniknięcie jego eliminacji w początkowym okresie. Prezentacja innych antygenów w zmienionych warunkach może utrudniać rozpoznanie przez układ odpornościowy. Słabo prezentowany w hodowli i w ciele kleszcza OspC, a intensywnie — w ciele ssaka staje się znacznie bardziej polimorficzny w sekwencjach i reaktywności w porównaniu z OspA. Zmienność antygenowa OspC może zapewniać dłuższe utrzymanie się patogenu we krwi oraz odpowiadać za zróżnicowaną lokalizację narządową [4].

Zarówno niezwykle cechy krętka, jak i odmienne warunki immunologiczne mózgowia mogą spowodować, że *B. burgdorferi* może przez miesiące lub lata, przed pojawieniem się pierwszych objawów choroby, nie ujawniać swojej obecności w OUN. W badaniach doświadczalnych wykazano, że znalezione w mózgu badanych zwierząt krętki uległy takiej zmianie w składzie protein powierzchniowych, że nie były rozpoznawane przez przeciwciała znajdujące we krwi.

Przemieszczanie się krętków z miejsca wniknięcia do miejsc wtórnej infekcji może następować drogą hematogenną, limfatyczną lub przez ciągłość w wyniku aktywowania przez krętki plazminogenu. Nie wyklucza się też ich wędrówki wzdłuż nerwów obwodowych. Zmiany zapalne stawów oraz nerwów obwodowych występują częściej po stronie zaatakowanej przez kleszcza, co wskazuje, że rozsiew tkankowy odgrywa większą rolę niż hematogenny. Budowa krętka umożliwia mu łatwiejsze poruszanie się w środowisku tkanek stawiających opór, a niepłynnych. Krętek ma zdolność aktywowania enzymów proteolitycznych gospodarza (np. metaloproteinaz) i wnikania w przygotowane w ten sposób tkanki. Większość autorów podkreśla obecność pozakomórkową *B. burgdorferi* w zakażonym organizmie, głównie we wczesnej postaci choroby z możliwością przetrwania w miejscach immuno-

logicznie uprzywilejowanych, takich jak mózg czy oko. Wewnątrzkomórkową lokalizację krętków wykazano głównie w późnej lub przetrwałej fazie zakażenia. Stwierdzono je w fibroblastach, skórze, komórkach maziówki, komórkach śródbłonna [5]. W badaniach *in vitro* *B. burgdorferi* przylegają do fibrocytów, wpuklając się głęboko w powierzchnię komórki. Dzięki ruchom skrętnym owijają się w błonę komórkową, nie wnikając do wnętrza. Ukrycie takie pozwala uchronić się przed rozpoznaniem komórkowym, a także humoralnym. Interakcja krętków z fibrocytami tłumaczy również ich predyspozycje do tkanki łącznej i udział w procesie zapalnym w *Lyme arthritis*. Składowe dopełniacza należą do wrodzonych mechanizmów obronnych i są bardzo ważną linią pierwszej obrony przeciw atakującym mikroorganizmom. Niezwykle interesującym zagadnieniem jest różna zdolność unieczynniania przez bakterię kaskady aktywacyjnej komplementu, który jest obecny w surowicy kręgowców. Umożliwia to nie tylko jej przetrwanie, ale i determinuje rezerwuar kompetentny dla danego genogatunku bakterii. Za zdolność unieczynniania komplementu odpowiedzialne są białka CRASP (complement regulator-acquiring surface protein), odmienne w 3 patogennych genogatunkach *B. burgdorferi* [7]. W dystrybucji patogenu znaczenie ma zdolność łączenia się krętków z glikozaminoglikanami (GAG, glycosaminoglycan): heparyną, siarczanem heparyny, siarczanem dermatanu. Dekoryna jest proteoglikanem macierzy pozakomórkowej, związanym z kolagenem w skórze i innych tkankach, dobrze rozpoznawanym przez lipoproteiny DbpA i DbpB (decorin binding protein) *B. burgdorferi* obecne na powierzchni krętka w czasie spirochetemii [4].

W patogenezie choroby z Lyme istotną rolę mogą też odgrywać toksyczne produkty komórek żernych, degradacyjne enzymów proteolitycznych i metaloproteinazy. Tlenek azotu, jako jeden z uwalnianych wolnych rodników, wykazuje działanie cytotoksyczne, wazodylatacyjne w OUN, będąc ważnym czynnikiem w rozwoju ostrej i przewlekłej postaci neuroboreliozy. W encefalopatii to one mogą być przyczyną zaburzeń metabolizmu komórki nerwowej bez wzbudzenia odpowiedzi zapalnej. Niemal wszystkim postaciom klinicznym boreliozy z Lyme mogą towarzyszyć zarówno objawy w postaci bólów głowy, zaburzeń koncentracji, pamięci, jak i — w różnym stopniu — nasilone objawy encefalopatii [8]. Makrofagi aktywowane interferonem γ są zdolne do zwiększonej przemiany L-tryptofanu z następowym wzrostem stężenia

kwasu chinolinowego (QUIN, *quinolinic*) oraz metabolitów — kwasu kinureninowego i L-kinureniiny. Kwas chinolinowy, agonista receptorów N-metyl-D-asparaginianowych, pojawiający się w nadmiarze może niszczyć neurony. Podwyższone stężenie QUIN w płynie mózgowo-rdzeniowym u chorych z nieneurologiczną postacią boreliozy z Lyme, pojawiający się prawdopodobnie w wyniku biernej dyfuzji przez barierę krew–mózg, może powodować zmiany typu encefalopatii w mózgu, mimo braku lokalnej infekcji [9].

Inną wskazywaną przyczyną encefalopatii mogą być zarówno następstwa działania toksyczno-metabolicznego, jak i efektu wędrówki limfocytów przez tkankę nerwową mózgowia. Opisuje się możliwość przenikania zaktywowanych limfocytów przez nieuszkodzoną barierę krew–płyn mózgowo-rdzeniowy. Limfocyty T zaktywowane w tkance limfatycznej w odpowiedzi na czynnik zakaźny lub inny środowiskowy bodziec, krążąc w organizmie, przechodzą również przez OUN. Wykazano, że aktywowane w innej części organizmu, na przykład w przebiegu *erythema migrans* czy *Lyme arthritis*, limfocyty T mogą wnikać do OUN, zanim rozwinie się w nim proces zapalny. Przemieszczające się przez OUN limfocyty w stanie aktywacji, skierowanej na swoisty antygen, nie znajdując go, mogą produkować cytokiny pozapalne. Wydaje się, że podobnym zjawiskiem można tłumaczyć zmiany encefalopatyczne i zaburzenia psychiczne obserwowane w chorobie z Lyme [9].

Badania eksperymentalne wskazują na zdolność do przylegania bakterii *B. burgdorferi* do komórek pochodzenia neuronalnego, co może zapoczątkować proces prowadzący do uszkodzenia komórek. Dowiedziono, że chorzy na kiłę i neuroboreliozę wytwarzają przeciwciała przeciw gangliozydom. Przeciwciała te mogą inicjować objawy choroby lub być produktem związanym z odpowiedzią na nią. Wielu badaczy poszukiwało udziału autoprzeciwciał w immunopatogenezie boreliozy z Lyme. Wykazano istnienie przeciwciał przeciw takim strukturalom, jak: białko neurofilamentów, podstawowe białko mieliny, ludzkie białko aksonalne SP60, kardiolipina, gangliozydy, komórki wyściełające maziówkę. Zarówno wykrycie przeciwciał w płynie mózgowo-rdzeniowym, reagujących z podstawowym białkiem mieliny, jak i obecność komórek T produkujących czynnik martwicy nowotworu α (TNF- α , *tumor necrosis factor α*) może być przykładem autoimmunologicznej odpowiedzi występującej po uszkodzeniu tkanki. Uwolnione antygeny neuronalne stanowiące cel dla układu odpor-

nościowego stają się przyczyną dalszych uszkodzeń neurologicznych w neuroboreliozy. Stąd wynikają trudności w odróżnieniu późnej neuroboreliozy od innych procesów demielinizacyjnych [10]. Predyspozycje krętków do układu nerwowego wynikają, z jednej strony, z neurotropizmu szczepu, z drugiej zaś — ze specyficznej, odmiennej immunologicznie sytuacji OUN, zwanej „immunitetem immunologicznym”. Polega on na separacji tkanki nerwowej od reszty płynów ustrojowych, zapewnianej przez barierę krew–płyn mózgowo-rdzeniowy (kompartmentalizacja) oraz modyfikowaniu reakcji immunologicznej przez własne, specyficzne środowisko mózgowia. Aktywna inwazja naczyń mózgowych przez krętki oraz ich zdolność przylegania do ściany tych naczyń może być źródłem zarówno ogniskowego, jak i rozlanego procesu zapalnego naczyń mózgowia, w postaci ostrych zmian zapalnych oraz łagodnej angiopatii. Zarówno obecność krętków w tkance zrębu, jak i pozanaczyniowe gromadzenie się leukocytów może powodować uszkodzenie naczyń od *perivasculitis* do *endarteritis obliterans*, które towarzyszy przewlekłym procesom zapalnym. Możliwe, że krętki *B. burgdorferi* stanowią jedną z przyczyn zapalenia naczyń w OUN. W przypadku *encephalitis* i *leukoencephalitis* w boreliozy z Lyme prawdopodobny jest udział przeciwciał antyaksonalnych i antyglukosfingolipidowych. U niektórych chorych z neuroboreliozą wykryto obecność przeciwciał IgM i IgG przeciw kwaśnym gangliozydom, które są ważnym elementem struktury mózgowia. Przeciwciała antyaksonalne mogą zakłócać sprawność aksonów, jednak nie zawsze powodują ich zniszczenie [10]. Uszkodzenie istoty białej uwidoczniane w badaniu metodą rezonansu magnetycznego, niezwykle podobne do zmian występujących w SM, może wiązać się z uszkodzeniem komórek produkujących mielinę, prawdopodobnie przez przeciwciała powstałe wskutek reakcji krzyżowej [5].

Próbując wyjaśnić kolejność zjawisk immunopatogenetycznych w przebiegu boreliozy z Lyme, zaszeregowano je jako miejscowe, gdy krętki są jeszcze żywe w miejscu wtargnięcia „*live in situ*”. Wówczas zjawiska immunopatogenetyczne przebiegają z udziałem komplementu, płynu mózgowo-rdzeniowego oraz makrofagów i odpowiedzi limfocytów T, połączonej z miejscową produkcją cytokinową. W postaciach, w których obecne są nieaktywne krętki (postacie atypowe, latentne) lub fragmenty zdegradowanych krętków, istotną rolę odgrywają antygeny, stanowiące nadal cel dla układu immunologicznego. Powodują zarówno powsta-

nie kompleksów immunologicznych, miejscowe zapalenie naczyń, miejscową produkcję cytokin, jak i stwarzają możliwość powstania molekularnej mimikry, sprzyjając przedłużaniu się procesu chorobowego [11].

Do grupy zaburzeń związanych z układem nerwowym należy zespół objawów, który stanowi trudny problem kliniczny. Ma on wiele określeń, między innymi „*post lyme syndrome*” (PLS), „*chronic Lyme disease*”. Należą do nich także objawy zespołu przewlekłego zmęczenia czy fibromialgii. Zmienne zaburzenia układu nerwowego w przebiegu PLS często nie odzwierciedlają uszkodzenia jego struktury, lecz mają charakter czynnościowy. Charakteryzują się rozdrażnieniem, zmianą osobowości, sennością, ospałością bądź też ubytkami pamięci, zaburzeniami artykulacji, trudnościami w skupieniu uwagi, upośledzeniem szybkości myślenia. Ogólnie, stwierdza się gorszą sprawność umysłową. Natężenie objawów jest zmienne: jednego dnia nie występują w ogóle, natomiast w ciągu kilku dni mogą się pojawić głębokie zaburzenia funkcji poznawczych. Poza tym występują: artralgia, zmęczenie, drętwienie kończyn, zaburzenia psychomotoryczne i gorsze codzienne funkcjonowanie z powodu bólu. Po leczeniu antybiotykiem często utrzymują się dolegliwości, w większości o charakterze subiektywnym, które bardzo trudno leczyć. Steere [11] uważa, że przewlekłe zakażenie *B. burgdorferi* indukuje w mózgu procesy immunologiczne lub neurohormonalne, które są przyczyną przewlekłego bólu, zaburzeń poznawczych, zmęczenia i utrzymują się mimo eliminacji czynnika zakaźnego za pomocą antybiotyków. Szczególnie podatni na występowanie tych objawów są chorzy cierpiący wcześniej na zaburzenia lękowo-depresyjne. Wydaje się, że u większości pacjentów można rozpoznać równocześnie więcej niż jeden zespół objawów, co określa się mianem „zespołów nakładających się”. Należą do nich fibromialgia (FMS, *fibromyalgia syndrome*), zespół przewlekłego zmęczenia (CFS, *chronic fatigue syndrome*), mnogi zespół nadwrażliwości chemicznej (MCS, *multiple chemical sensitivity syndrome*), zespół bólu powięziowego (MPS, *myofascial pain syndrome*), zespół niespokojnych nóg (RLS, *restless legs syndrome*), zespół jelita drażliwego (IBS, *irritable-bowel syndrome*) i wiele innych należących do tej grupy. Według autora jest to zespół dysregulacji (DSS, *dysregulation spectrum syndrome*). Autor ten sugeruje, że przyczynami obserwowanych zaburzeń biofizjologicznych są zaburzenia systemu neurohormonalnego [7]. Innym problemem jest niecharakterystyczny

zespół określony przez Coyle [12] jako „*pre meningitis*”, który początkowo objawia się uporczywymi bólami głowy, bez zmian zapalnych w płynie mózgowo-rdzeniowym.

Rozpoznanie boreliozy z Lyme

Do właściwego rozpoznania i interpretacji wyników badań laboratoryjnych niezbędna jest znajomość nie tylko obrazu klinicznego choroby, danych epidemiologicznych pacjenta, ale również parametrów diagnostycznych stosowanego testu. Diagnostyka laboratoryjna boreliozy polega na potwierdzeniu lub wykluczeniu udziału *B. burgdorferi* w zakażeniu — w monitorowaniu leczenia diagnostyka ma mniejsze znaczenie. Cel ten można osiągnąć metodami bezpośrednimi i pośrednimi.

Testy bezpośrednie

Do testów bezpośrednich (pozwalających bezpośrednio wykryć obecność czynnika zakaźnego) należą metoda PCR (amplifikacja DNA bakteryjnego), hodowla bakterii *Borrelia burgdorferi* lub uwidocznienie ich obecności w materiałach biologicznych. Metody te nie mają zastosowania w rutynowej diagnostyce, choć w wybranych przypadkach pozwalają na identyfikację patogenu. Biopsje tkanek i bezpośrednie ich badanie pod kątem obecności komórek *Borrelia burgdorferi* mają małe znaczenie diagnostyczne. Mikroskopia elektronowa w różnych modyfikacjach może być przydatna zwłaszcza w wykrywaniu komórek bakteryjnych przebywających wewnątrzkomórkowo. Testy służące do bezpośredniego wykrywania obecności czynnika zakaźnego pozwalają wykorzystać następujące materiały biologiczne: surowicę krwi, płyn mózgowo-rdzeniowy, płyn stawowy, materiał uzyskany z użyciem biopsji, na przykład ze skóry. Najnowsze techniki badania DNA (N-PCR, *real-time PCR* i sekwencjonowanie DNA) umożliwiają wykrycie nawet pojedynczych komórek borelii już kilka dni po zarażeniu, a także na oszacowanie ich liczby.

Testy pośrednie

Najczęściej stosuje się diagnostykę serologiczną, polegającą na poszukiwaniu przeciwciał w surowicy lub płynie mózgowo-rdzeniowym. Istnieje jednak wiele pułapek interpretacyjnych, takich jak trudności techniczne związane z konstruowaniem testów. Test **ELISA** (*enzyme-linked immunosorbent assay*) jest jednym z najpowszechniej stosowanych w badaniach biomedycznych — zarówno naukowych, jak i diagnostycznych. Testów ELISA raczej nie można stosować do monitorowania leczenia,

ponieważ u części zakażonych miano przeciwciał jest podwyższone przez wiele miesięcy, a nawet lat po wyleczeniu. Powoduje to często błędną diagnozę i skierowanie pacjenta na niepotrzebną antybiotykoterapię. Jest to jednak najczęściej stosowana metoda diagnostyczna, zalecana jako badanie przesiewowe. Testy mogą być jakościowe, półilościowe, ilościowe. Testy różnych firm, posługujących się własnymi jednostkami, są nieporównywalne. Patenty chronią produkty poszczególnych firm, co nie poprawia jakości innych testów. Standaryzacja i powtarzalność testów dotyczy jednego produktu (własne jednostki). Wiele wątpliwości wynika z faktu, że testy diagnostyczne opracowuje się na podstawie różnych zestawów antygenowych.

Wybór klasy

Przeciwciała IgM pojawiają się najwcześniej, utrzymują się długo, często są skierowane przeciwko flagelli (41 kDa) i występują wraz z poliklonalną aktywacją limfocytów B. Obecność izolowanych przeciwciał IgM nie powinna być podstawą rozpoznania późnej boreliozy, ponieważ może się ona utrzymywać przez wiele miesięcy, często dając wynik fałszywie dodatni.

Odpowiedź w klasie IgG, pojawia się około 3.–6. tygodnia po zakażeniu i może się utrzymywać przez lata. Przeciwciała w klasie IgG towarzyszą zmianom narządowym, podlegają ewolucji w czasie — reagują z czasem na większą liczbę antygenów. Mogą nie zapobiegać reinfekcjom. Przeciwciała w klasie IgG mogą pozostawać wykrywalne nawet po latach od klinicznej remisji choroby, nawet po wyleczeniu boreliozy. Są bardziej swoiste od przeciwciał klasy IgM.

Testy nieróżnicujące klasy przeciwciał nie są zalecane. Wskazane jest wykonywanie oznaczeń dla obu klas [13].

Wybór antygenów

Wśród białek immunogennych generujących przeciwciała zidentyfikowano liczną grupę **białek pospolitych** (dających reakcje krzyżowe z innymi krętkami, a nawet niespokrewnionymi bakteriami) i **białka specyficzne**, uznane za charakterystyczne dla *Borrelia burgdorferi*. W diagnostyce laboratoryjnej boreliozy stosuje się obie wymienione grupy białek — zarówno antygeny pochodzące ze szczepów laboratoryjnych, natywne (lizaty), jak i celowo syntetyzowane, tak zwane rekombinowane. Należy pamiętać, że szczepy laboratoryjne mogą się różnić od szczepów podlegających zmianom w czasie zakażenia. Aby poprawić jakość testów (czułość i swoistość), stosuje się grupę antygenów uważanych za

„klasyczne”, to znaczy kluczowych dla rozpoznania, a także antygeny, tak zwane *in vivo*, czyli takie, których nie ma w szczepach laboratoryjnych, a pojawiają się dopiero w zakażonym kręgowcu. Ważne są również komponenty białkowe o stałej masie molekularnej 41 kDa (p41 lub flagellina) i 60 kDa (HSP60). Obie wymienione grupy białek pospolicie występują w przyrodzie i w związku z tym często dają reakcje krzyżowe z innymi bakteriami. Jednak obecność przeciwciał przeciwko nim wraz z przeciwciałami przeciw antygenom swoistym ma znaczenie w interpretacji uzyskanych wyników. Obecność przeciwciał skierowanych przeciw antygenowi p41 stanowi potwierdzenie odpowiedzi immunologicznej na kontakt z krętkami (brak tych przeciwciał przemawia za zakażeniem innym niż krętkowe). Inne często stwierdzane antygeny pospolite to: p66, p68, p71, p73. Do **białek specyficznych** należą: OspA (31 kDa), OspB (34 kDa), OspC (21–24 kDa), BmpA (p39), p93, p83/100, OspE (19 kDa), OspF (26 kDa). Białkiem, które zwiększyło jakość testów jest VlsE — powierzchniowa lipoproteina, która podlega antygenowej zmienności. Wysoko heterogenne białko VlsE zawiera konserwatywne, wspólne dla wszystkich genogatunków, epitopy [14].

Aby uzyskać możliwie najbardziej wiarygodny wynik, stosuje się dwa etapy diagnostyczne. **Zalecona metoda** 2-stopniowa polega na zastosowaniu testu o mniejszej swoistości i dużej czułości, ELISA lub EIA, a następnie wykonaniu testu metodą immunoblottingu [13]. Metoda ta polega na rozdzielaniu antygenów pochodzących z lizatów szczepów metodą elektroforezy (*Western-blot*) lub naniesieniu na pasek diagnostyczny znanych antygenów w oznaczonych polach (*line-blot*). Po wykonaniu testu można rozpoznać przeciwciała przeciw poszczególnym antygenom. W wyniku rozdziału elektroforetycznego lizatu całych komórek udało się zidentyfikować 30 różnych pasm białkowych o różnym znaczeniu. Diagnostyka boreliozy z Lyme, poza uwzględnieniem znacznej heterogenności szczepów *B. burgdorferi*, stwarza również inne trudności interpretacyjne.

Wyniki fałszywie ujemne

Negatywny wynik badania serologicznego nie wyklucza choroby; szczególnie we wczesnej, zlokalizowanej postaci wynik większości testów jest ujemny (u ok. 50% badanych). Leczenie antybiotykiem we wczesnym etapie może spowodować supresję odpowiedzi immunologicznej i żadne przeciwciała nie są wówczas wykrywane. Zatem negatywny wynik nie wyklucza boreliozy, ponie-

waż próbkę surowicy można pobrać, zanim pojawią się przeciwciała lub pojawią się one w ilości poniżej wykrywalności testu.

Wyniki fałszywie dodatnie

Reakcja krzyżowa może spowodować wynik fałszywie dodatni będący przyczyną nadrozpoznawalności boreliozy. W zdrowej populacji stwierdza się 5–8% wyników fałszywie dodatnich. Reakcja krzyżowa może nastąpić zarówno z niektórymi bakteriami (*Treponema pallidum*, *Treponema pertenuis*, inne borelie niepatogenne, leptospiry), jak i w czasie niektórych zakażeń wirusowych, wzbudzających poliklonalną produkcję przeciwciał, takich jak na przykład wirus Epsteina-Barr (EBV, *Epstein-Barr virus*). Fałszywie dodatnia odpowiedź może się pojawić w chorobach autoimmunologicznych, schorzeniach wątroby (WZW C), a także może być spowodowana bakteriami *B. burgdorferi*, które nie wykazują cech patogennych.

Problemem klinicznym jest odsetek wyników dodatnich u osób klinicznie zdrowych, przetrwanie przeciwciał po zakończeniu leczenia i ustąpieniu objawów chorobowych.

Oznaczanie przeciwciał potwierdzających zakażenie z zajęciem układu nerwowego jest trudne. Stężenie przeciwciał w różnych przestrzeniach płynowych może być różne. Zależy to od kompartmentalizacji zjawisk immunologicznych, innych w miejscach immunologicznie uprzywilejowanych, takich jak płyn mózgowo-rdzeniowy. Zatem wykazanie syntezy przeciwciał w płynie mózgowo-rdzeniowym wymaga pomiaru przeciwciał w surowicy i płynie mózgowo-rdzeniowym oraz przeliczenia uwzględniającego różnice stężeń białek w obu przestrzeniach.

W praktyce klinicznej nie należy zapominać, że (neuro)borelioza z Lyme jest rozpoznaniem klinicznym potwierdzanym w badaniu laboratoryjnym.

PIŚMIENNICTWO

- Zajkowska J., Hermanowska-Szpakowicz T., Kondrusik M. i wsp. Zespoły neurologiczne w boreliozie z Lyme. *Pol. Merk. Lek.* 2000; 9 (50): 584–588.
- Hubalek Z., Halouzka J. Distribution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genomic groups in Europe, a review. *Eur. J. Epidemiol.* 1997; 13 (8): 951–957.
- Weller M., Stevens A., Sommer N. i wsp. Are CSF or serum ganglioside antibodies-related to peripheral nerve demyelination in neuroborreliosis, Guillain-Barré syndrome, or chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy? *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 1992; 242 (2–3): 122–126.
- Zajkowska J., Hermanowska-Szpakowicz T. Nowe aspekty patogenetyczne boreliozy z Lyme. *Przegl. Epidemiol.* 2002; 56 (supl. 1): 57–67.
- Aberer E., Koszik F., Silberer M. Why is chronic Lyme Borreliosis chronic? *CID* 1997; 25 (supl. 1): S66–S70.
- Singh S.K., Girschick H.J. Molecular survival strategies of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Lancet Inf. Dis.* 2004; 4 (9): 575–583.
- Zajkowska J., Grygorczuk S., Kondrusik M. i wsp. Patogeneza boreliozy — nowe aspekty. *Przegl. Epidemiol.* 2006; 60: 167–170.
- Zajkowska J., Pancewicz S., Hermanowska-Szpakowicz T. Neuroborelioza. *Neur. Neurochir. Pol.* 1998; 32, 1: 111–124.
- Zajkowska J., Popławska R., Pancewicz S. Zaburzenia psychiczne w przebiegu neuroboreliozy — obserwacje własne. *Psychiatr. Pol.* 1999; 6: 939–946.
- Ercolini A.M., Miller S.D. Role of immunologic cross-reactivity in neurological diseases. *Neurol. Res.* 2005; 27 (7): 726–733.
- Steere A., Coburg J., Glickstein L. The emergence of Lyme disease. *J. Clin. Invest.* 2004; 113: 1093–1101.
- Coyle P.K., Schutzer S.E. Neurologic aspects of Lyme disease. *Med. Clin. North Am.* 2002; 86: 261–284.
- Wilske B. Diagnosis of Lyme borreliosis in Europe. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2003; 3 (4): 215–227.
- Liang F.T., Aberer E., Cinco M. i wsp. Antigenic conservation of an immunodominant invariable region of the VlsE lipoprotein among European pathogenic genospecies of *B. burgdorferi*. *J. Infect. Dis.* 2000; 182: 1455–1462.