



DR N. FARM. INŻ. PATRYK MATUSZEK

Borelioza (choroba z Lyme) – co nowego?

Rys historyczny

Pierwsze podejrzenia, że ukłucie przez kleszcza może skutkować występowaniem niektórych znanych dzisiaj objawów, pojawiły się na początku XX wieku. Na spotkaniu Szwedzkiego Towarzystwa Dermatologii w 1909 roku szwedzki dermatolog Arvid Afzelius przedstawił wyniki swoich badań nad rumieniem wędrującym i zasugerował, że może mieć on związek z ugryzieniami kleszcza. Była to pierwsza oficjalna praca wyjaśniająca etiologię choroby, znanej dziś jako borelioza. Charles Garin i Antoine Bujadoux w 1922 roku, niezależnie od siebie, opisali przypadki neuroboreliozy, a powiązanie ukąszeń kleszczy z objawami neurologicznymi udowodnił niemiecki neurolog Alfred Bannwarth w latach 40. W 1975 roku borelioza została rozpoznana w okolicy miasta Lyme, w stanie Connecticut (Stany Zjednoczone). Od nazwy tej miejscowości wzięła się nazwa – choroba z Lyme. Kolejne serie badań doprowadziły naukowców do odkrycia drobnoustroju odpowiedzialnego za rozwój choroby z Lyme w organizmie ludzkim. Dokonał tego doktor Willy Burgdorfer. W 1982 roku wyizolował z kleszcza krętki, które później na jego cześć nazwano *Borrelia burgdorferi*, ponieważ to on udowodnił związek między ukłuciem kleszcza a występowaniem choroby. Nazwa gatunkowa bakterii *Borrelia* pochodzi z kolei od nazwiska strasburskiego bakteriologa Amédée Borrel'a, który odkrył ją w 1905 roku.

Borelioza w Polsce

W Stanach Zjednoczonych, czyli w kraju, w którym dokonano odkry-

cia przyczyny choroby z Lyme, występuje tylko jeden patogenny dla człowieka genotyp – *Borrelia burgdorferi sensu stricto*. W Europie sytuacja jest bardziej zróżnicowana – występują przynajmniej cztery: *Borrelia burgdorferi*, *Borrelia garinii*, *Borrelia afzelii* oraz *Borrelia spielmani*. Problem boreliozy w Polsce jest monitorowany od 1996 roku, kiedy Państwowy Zakład Higieny opublikował pierwsze dane epidemiologiczne. Zanotowano wówczas 751 przypadków. Z roku na rok wykrywalność boreliozy w Polsce rosła, sięgając niemal 14 000 przypadków w 2014 roku.

Problemy w diagnostyce boreliozy

Długo utrzymujące się przeciwciała IgG

Z uwagi na liczbę wykrywanych co roku przypadków boreliozy rodzą się pytania: **Czy są to przypadki zgłoszone tylko na podstawie dodatniego wyniku serologicznego? Czy są to pacjenci również z rozpoznaniem klinicznym?** Podstawą rozpoznania boreliozy jest obraz kliniczny pacjenta. Wykonywanie badań serologicznych u osób bezobjawowych nie ma sensu, gdyż sama obecność przeciwciał nie świadczy o chorobie. O pewnej diagnozie boreliozy możemy mówić tylko w jednym przypadku: kiedy na skórze pacjenta pojawi się rumień wędrujący. Jest on na tyle specyficznym objawem, że wymaga antybiotykoterapii bez konieczności wykonywania badań laboratoryjnych. W pozostałych przypadkach (przy braku rumienia i wystąpieniu innych objawów) konieczne jest wykrycie swoistych przeciwciał anty-*Borrelia* w surowicy pacjen-

ta. W takiej sytuacji mówimy o rozpoznaniu prawdopodobnym, nie można bowiem wykluczyć sytuacji, w której wspomniane objawy towarzyszą innej chorobie, a obecne przeciwciała IgG (niekiedy również IgM) anty-*Borrelia* są śladem serologicznym po przebytych zakażeniu. Uważa się zatem, że jeżeli dwukrotna antybiotykoterapia nie przynosi poprawy stanu klinicznego pacjenta, należy rozważyć inne niż borelioza przyczyny dolegliwości pacjenta. Często zadawanymi pytaniami są:

- Jak długo po zakażeniu utrzymują się przeciwciała?
- Kiedy powtórzyć badanie po leczeniu?

Utrzymywanie się przeciwciał anty-*Borrelia* w surowicy jest kwestią osobniczą. U niektórych pacjentów stopniowo zanikają po antybiotykoterapii, u wielu utrzymują się jednak latami lub nawet wykazują niewielki wzrost. Odpowiadając zatem na drugie pytanie, można powiedzieć, że klasyczne badania serologiczne nie służą do monitorowania aktywności choroby. Jedynym wyznacznikiem skuteczności leczenia jest remisja objawów.

Przetrwale przeciwciała IgM

Przeciwciała klasy IgM najczęściej jako pierwsze wytwarzane są przez układ immunologiczny człowieka w efekcie zakażenia. W przypadku wielu infekcji mają one również tendencję do szybkiego zanikania. Obecność przeciwciał klasy IgM traktowana jest zatem jako dowód świeżej infekcji. W przypadku boreliozy może być nieco inaczej. Zdarza się, że obecne w surowicy pacjenta przeciwciała IgM są przetrwale. W takiej sytuacji ich **obecność nie**

oznacza świeżej infekcji, lecz świadczy o wcześniejszym kontakcie człowieka z bakterią. Z takim wynikiem spotykamy się najczęściej u pacjentów, u których leczenie wdrożone zostało we wczesnej fazie choroby (przed pojawieniem się przeciwciał klasy IgG). Znane są sytuacje, kiedy przetrwały IgM utrzymywały się w surowicy pacjenta 3–4 lata bez obecności IgG. Warto zatem ponownie zaznaczyć, że jedynie remisja objawów świadczy o skuteczności leczenia.

Brak standaryzacji testów

W 1995 roku, w Stanach Zjednoczonych pojawiły się pierwsze oficjalne rekomendacje dotyczące diagnostyki boreliozy. Wydane one zostały przez Center for Disease Control and Prevention (Atlanta). Kilka lat później zostały wprowadzone zalecenia Mikrobiologisch-Infektiologische Qualitätsstandards (MiQ 12 Lyme-Borreliose; Wilske i wsp. (2000)) w Niemczech. W Polsce pierwsze rekomendacje zostały wydane w roku 2007 przez Polskie Towarzystwo Epidemiologów i Lekarzy Chorób Zakaźnych, których uzupełnieniem są **rekomendacje Krajowej Izby Diagnostów Laboratoryjnych z 2014 roku**. Wszystkie wspomniane towarzystwa jednogłośnie uznają rumień wędrujący za objaw spełniający kryterium rozpoznania choroby bez konieczności wykonywania badań laboratoryjnych. W przypadku kiedy pierwszymi oznakami boreliozy są objawy niespecyficzne, należy wykonać stosowne badania laboratoryjne zgodnie z 2-etapową strategią:

- test przesiewowy ELISA w klasie IgM, IgG,
- test potwierdzenia Westernblot

w przypadku dodatniego testu ELISA. Jednym z problemów jest fakt, że każdy z producentów stosuje inne składniki antygenowe testów, co prowadzi do rozbieżności w uzyskanych wynikach. Modnym jest również licytowanie się, który z dostępnych testów jest bardziej czuły i swoisty. W przypadku testów do diagnostyki boreliozy można podać następujące definicje czułości i swoistości:

Czułość diagnostyczna – procent wyników pozytywnych w grupie osób chorych na boreliozę.

Swoistość diagnostyczna – procent wyników negatywnych u osób niechorujących na boreliozę.

Czułość i swoistość diagnostyczna to parametry względem siebie odwrotnie proporcjonalne. Test jest najczęściej albo czuły, albo swoisty, co determinuje konieczność zastosowania 2-etapowej strategii diagnostyki boreliozy, w której 1. etap (test ELISA) jest maksymalnie czuły, a 2. etap (Immunoblot) jest maksymalnie swoisty.

Zadaniem testu ELISA jest wydanie wiarygodnego wyniku negatywnego (prawdziwie negatywnego). Na tym etapie diagnostyki istotnym jest, aby mieć pewność, że pacjent, który otrzymuje wynik negatywny, nie wymaga dalszej diagnostyki w kierunku boreliozy. W tym celu należy wykluczyć obecność wszystkich możliwych przeciwciał, jakie układ immunologiczny człowieka może wytworzyć w efekcie zakażenia. Najlepiej sprawują się zatem testy oparte o tzw. pełen lizat bak-

teryjny (wszystkie antygeny obecne w ścianie komórkowej bakterii *Borrelia*), który wykrywa każdą możliwą kombinację odpowiedzi immunologicznej. Lizaty bakteryjne od czasu odkrycia tak swoistych antygenów jak VlsE (*Variable Major Protein-like Sequence Expressed*) są wzbogacane o to białko rekombinowane. Takie rozwiązanie gwarantuje wysoką czułość diagnostyczną, a wynik negatywny z bardzo wysokim prawdopodobieństwem można uznać za prawdziwy. Niestety, coraz częściej producenci testów ulegają pokusie podniesienia swoistości testów ELISA (kosztem czułości), eliminując ze składu testu określone antygeny. W ekstremalnych przypadkach dochodzi do sytuacji, kiedy skład testu przesiewowego zostaje zredukowany do 3 antygenów. W takiej sytuacji wynik ujemny testu może być fałszywy, gdyż wyklucza tylko 3 potencjalne przeciwciała, a nie wszystkie. **Bywa również, że jako test przesiewowy oferowany jest test CLIA (nieujęty w żadnych rekomendacjach) zamiast testu ELISA.**

Test Immunoblot ma za zadanie potwierdzić każdy dodatni i wątpliwy wynik testu ELISA, eliminując jednocześnie te, które były fałszywe (spowodowane przez nieswoiste przeciwciała, np. anty-p41). Pojęcie Westernblot ma dziś charakter bardziej umowny. Klasyczne testy Westernblot to takie, w których pełen ekstrakt antygenowy rozdzielony jest elektroforetycznie na pojedyncze pasma antygenowe. Rozwiązanie takie coraz częściej zastępowane jest przez testy Lineblot, w których producenci stosują oczyszczone antygeny lub antygeny rekombinowane. W przypadku testów Immunoblot również obserwuje się brak jednomyślności producentów co do składu antygenowego i kryteriów oceny. Rodzi to poważny problem braku zgodności pomiędzy laboratoriami korzystającymi z testów różnych producentów.

Nowości w diagnostyce boreliozy

Dimer OspC

Przeciwciała IgM przeciwko OspC (*Outer Surface Protein C*) są wysoko specyficznym markerem wczesnej fazy boreliozy. Najczęściej pojawiają się jako pierwsze w efekcie zakażenia i występują





u ok. 90% świeżo zakażonych pacjentów. Sam antygen OspC w ścianie komórkowej bakterii występuje w postaci dimeru. Taka forma białka zapewnia bardziej specyficzne, bivalentne wiązanie przeciwciał IgM. W konwencjonalnych testach ELISA oraz Immunoblot, w których używano rekombinowanego OspC, stosowany był monomer. W takiej postaci wiązanie przeciwciał IgM z antygenem jest mniej specyficzne. W roku 2012 naukowcom z Instytutu Immunologii Doświadczalnej EUROIMMUN AG (Lubeka) udało się stworzyć i opatentować technologię produkcji rekombinowanego OspC, w którym dwie monomeryczne podjednostki białka połączone są mostkiem disiarczkowym w dimer. W takiej postaci rekombinowane OspC posiada identyczne właściwości jak postać natywna, a w porównaniu do klasycznego rekombinowanego OspC wykazuje o 30% wyższą swoistość [1]. Nowy antygen zwany OspC – advanced zastosowany został w testach Immunoblot firmy EUROIMMUN (anty-Borrelia EUROLINE RN-AT IgG, IgM_{adv.}).

Monitorowanie skuteczności leczenia boreliozy

Najlepszym dowodem na skuteczność antybiotykoterapii jest remisja objawów klinicznych. Jeżeli dwukrotne leczenie

nie przyniosło pożądanych efektów, należy rozważyć inne przyczyny dolegliwości pacjenta. Przeciwciała anty-Borrelia mogą być obecne w ludzkiej surowicy nawet wiele lat, dlatego ich utrzymywanie się nie świadczy o niepowodzeniu leczenia. Klasyczne testy serologiczne (ELISA oraz Westernblot) nie powinny być zatem stosowane do monitorowania skuteczności leczenia.

W kilku niezależnych badaniach udowodniono, że poziom przeciwciał anty-VlsE u chorych na boreliozę rezu-sów i psów dynamicznie spada po wdro-żonej antybiotykoterapii [2-5].

Wspomniane badania pozwoliły zatem przypuszczać, że monospecyficzne oznaczanie przeciwciał anty-VlsE może być przydatne w monitorowaniu skuteczności leczenia boreliozy. 4 lata później ta sama grupa naukowców powtórzyła eksperyment na grupie 120 pacjentów z potwierdzoną klinicznie boreliozą. U 91% osób zaobserwowano **całkowity lub znaczący spadek przeciwciał anty-VlsE w okresie 12-15 miesięcy po leczeniu.**

NOWY test EUROIMMUN Lyme Trace ELISA stworzony został do ilościowego oznaczania przeciwciał anty-VlsE. Obecnie badanie nie jest uwzględnione w żadnych kryteriach rozpoznania boreliozy, dlatego należy uważać je za dodatkowe. Opierając się na dostępnych

publikacjach, można zaproponować następującą strategię:

- badanie przeciwciał anty-VlsE – przed wdrożeniem antybiotykoterapii (po wykonaniu diagnostyki zgodnej z obowiązującymi standardami),
- badanie przeciwciał anty-VlsE – 6 miesięcy po leczeniu,
- badanie przeciwciał anty-VlsE – 12 miesięcy po leczeniu.

Jednokrotne wykonanie badania Lyme Trace ELISA nie jest uzasadnione, ponieważ pojedynczy wynik nie jest interpretowany jako dodatni czy ujemny. Celem badania jest monitorowanie poziomu przeciwciał anty-VlsE, dlatego poleca się postępować wg powyższego schematu.

Jeżeli chodzi o interpretację wyników badania testem Lyme Trace to uważa się, że przynajmniej 4-krotny spadek poziomu przeciwciał anty-VlsE może świadczyć o powodzeniu terapii.

Chemokina CXCL13 – marker aktywności neuroboreliozy

Laboratoryjna diagnostyka neuroboreliozy opiera się przede wszystkim na ocenie wewnątrzoponowej syntezy przeciwciał anty-Borrelia w klasie IgM oraz IgG. Jest to badanie kluczowe w rozpoznaniu choroby, lecz nie powinno być używane w celu monitorowania skuteczności terapii. Wiadomo, że syntezę przeciwciał anty-Borrelia w ośrodkowym układzie nerwowym obserwuje się jeszcze przez pewien czas po skutecznym leczeniu. [6]

Pomocnym narzędziem monitorującym aktywność neuroboreliozy jest ocena **chemokiny CXCL13 w płynie mózgowo-rdzeniowym (PMR)**. Według dostępnych badań opisujących odpowiedź immunologiczną w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN), chemokina CXCL13 produkowana jest w płynie mózgowo-rdzeniowym na samym początku neuroboreliozy, a jej zanik obserwuje się równoległe z ustępowaniem objawów neuroboreliozy.

Badanie chemokiny CXCL13 jest narzędziem bardzo pomocnym w monitorowaniu zdiagnozowanej wcześniej neuroboreliozy. Nie powinno się stawiać diagnozy jedynie na podstawie poziomu CXCL13, gdyż jej podwyższone wartości obserwuje się również w zapaleniu opon mózgowo-rdzeniowych

związany z HIV, infekcją *Streptococcus*, *Toksoplazma* i w przebiegu stwardnienia rozsianego.

Podsumowanie

Borelioza jest jedną z najbardziej kontrowersyjnych chorób zakaźnych w Polsce. Wzrost jej wykrywalności wiąże się przede wszystkim z większą świadomością społeczeństwa, liczbą wykonywanych badań laboratoryjnych oraz z szerszym dostępem do lepszych testów diagnostycznych. Ostatnia dekada zaowocowała kilkoma istotnymi osiągnięciami naukowymi, które przyczyniły się do rozwoju nowych testów diagnostycznych. Najważniejsze dotyczą dwóch antygenów – OspC i VlsE.

Dokładne poznanie struktury OspC pozwoliło opracować technologię produkcji dimerycznego białka przypominającego postać natywną – tzw. **OspC_{adv.}** Tak zaprojektowany antygen pozwala wykrywać przeciwciała z większą o 30% swoistością. Potwierdzona została również wysoka immunogenność i swoistość antygeny VlsE. Dziś poznajemy rolę przeciwciał **anty-VlsE** w monitorowaniu leczenia.

Ze względu na wysoką specyficzność OspC i VlsE znajdują się w składzie antygenowym niemal każdego dostępnego testu.

W diagnostyce laboratoryjnej neuroboreliozy istotną trudność stanowi zawodność złotego standardu powszechnie stosowanego w mikrobiologii — hodowli wykonanej z PMR. Badaniem pomoc-

nym, włączonym jednocześnie w kryteria rozpoznania neuroboreliozy, jest ocena wewnątrzoponowej syntezy przeciwciał anty-Borrelia. Swoista odpowiedź humoralna w OUN jest jednak procesem wymagającym czasu. Na początku neuroboreliozy wartość CSQ_{rel.} może nie różnić się znacząco od wartości fizjologicznej. Pomocne w takim przypadku jest badanie chemokiny CXCL13, która pojawia się znacznie wcześniej i szybko zanika po skutecznym leczeniu.

Niezależnie od tego, ile nowych informacji dostarczyła nauka na temat boreliozy, kilka problemów jest nadal nierozwiązanych. Najważniejszym zadaniem jest dokładne wyjaśnienie roli pozostałych przeciwciał i ujednoczenie składu antygenowego testów różnych producentów. ■

LITERATURA:

1. C. Probst, A. Ott, T. Scheper, W. Meyer, et al. *N-terminal disulfide-bridging of Borrelia outer surface protein C increases its diagnostic and vaccine potentials.* Ticks and Tick-borne Diseases 3 (2012) 1–7.
2. M. Philipp, L. Bowers, P. Fawcett et al. *Antibody Response to IR6, a Conserved Immunodominant Region of the VlsE Lipoprotein, Wanes Rapidly after Antibiotic Treatment of Borrelia burgdorferi Infection in Experimental Animals and in Humans.* J Infect Dis. 2001 Oct 1;184(7):870-8. Epub 2001 Aug 30.
3. M. Philipp, G. Wormser, A. Marques et al. *Decline in C6 Antibody Titer Occurs in Successfully Treated Patients with Culture-Confirmed Early Localized or Early Disseminated Lyme Borreliosis.* Clin Diagn Lab Immunol. 2005 Sep; 12(9): 1069–1074.
4. A. Marangoni, V. Sambri, S. Accardo et al. *A Decrease in the Immunoglobulin G Antibody Response against the VlsE Protein of Borrelia burgdorferi Sensu Lato Correlates with the Resolution of Clinical Signs in Antibiotic-Treated Patients with Early Lyme Disease.* Clin Vaccine Immunol. 2006 Apr;13(4):525-9.
5. S. Norris. *The vls antigenic variation systems of Lyme disease Borrelia: eluding host immunity through both random, segmental gene conversion and framework heterogeneity.* Microbiol Spectr. 2014 Dec;2(6).
6. T. Rupprecht, U. Koedel, V. Fingerle et al. *The Pathogenesis of Lyme Neuroborreliosis: From Infection to Inflammation.* Mol Med. 2008 Mar-Apr; 14(3-4): 205–212.
7. http://kidl.org.pl/uploads/rekomendacje/05_kleszcze%20z%20okladka.pdf



BORELIOZAONLINE.PL — wyszukiwarka laboratoriów

Baza laboratoriów pracujących zgodnie z rekomendacjami Polskiego Towarzystwa Epidemiologów i Lekarzy Chorób Zakaźnych.

Aktualna lista laboratoriów w Polsce — dokładny adres i lokalizacja na mapie.

Wyszukiwanie laboratoriów, w których są wykonywane konkretne badania.

Odpowiedzi na pytania pacjentów.

50-543 Wrocław

ul. Widna 2a

tel. 71 373 08 08

fax 71 373 00 11

www.euroimmun.pl

EUROIMMUN POLSKA Sp. z o.o.