

Jacek Gąsiorowski<sup>1</sup>

Elżbieta Witecka-Knysz<sup>2</sup>

Brygida Knysz<sup>1</sup>

Hanna Gerber<sup>3</sup>

Andrzej Gładysz<sup>1</sup>

## DIAGNOSTYKA BORELIOZY

### DIAGNOSTICS OF LYME DISEASE

<sup>1</sup>Katedra i Klinika Chorób Zakaźnych, Chorób Wątroby i Nabytych Niedoborów Odpornościowych  
Akademia Medyczna, Wrocław

<sup>2</sup>Wojewódzki Zespół Specjalistyczny Opieki Zdrowotnej, Wrocław

<sup>3</sup>Katedra i Klinika Chirurgii Szczykowo-Twarzowej  
Akademia Medyczna, Wrocław

#### STRESZCZENIE

Pomimo długiego czasu, jaki upłynął od identyfikacji krętka *Borrelia burgdorferi* i postępu w badaniach nad biologią, kliniką i diagnostyką boreliozy, ta jednostka chorobowa nadal przysparza wielu problemów głównie diagnostycznych, co często prowadzi do błędnego rozpoznania choroby i/lub wdrożenia niepotrzebnego leczenia. W pracy przedstawiono analizę aktualnych danych na temat diagnostyki boreliozy, ze zwróceniem szczególnej uwagi na ograniczenia diagnostyczne i właściwą interpretację wyników. W rutynowej diagnostyce boreliozy najbardziej przydatne są testy pośrednie, bazujące na poszukiwaniu swoistych przeciwciał w klasach IgM i IgG. Diagnostykę laboratoryjną boreliozy rozpoczyna się od testów przesiewowych, które charakteryzują się wysoką czułością, ale niską swoistością, co stwarza prawdopodobieństwo uzyskania wyników fałszywie dodatnich. Wszystkie osoby, u których wynik badania uzyskanego w teście przesiewowym jest dodatni, powinny mieć wykonane badanie testem potwierdzającym. Umożliwia to wykluczenie osób zdrowych z wynikami fałszywie dodatnimi i wykrycie chorych z wynikami prawdziwie dodatnimi. Med. Pr. 2007;58(5):

Słowa kluczowe: diagnostyka, borelioza, testy przesiewowe, testy potwierdzenia

#### ABSTRACT

Although many years have passed since *Borrelia burgdorferi* was first identified, advances in understanding biology and clinical course of infection made and new diagnostic procedures developed, Lyme disease is still difficult to diagnose. Therefore, it is often wrongly diagnosed and unnecessarily treated. In this paper we analyzed the latest data on Lyme disease diagnostic methods, paying much attention to their limitations and correct interpretation of results. In routine diagnosis of this diseases, indirect tests, based on the detection of specific IgM and IgG antibodies, are most useful. The Lyme disease diagnosis should begin with screening tests, which are highly sensitive but not specific enough and sometimes yield false positive results, then all positive results should be verified by confirmation tests, which allow to distinguish between true positive results and healthy individuals with false positive ones. Med Pr 2007;58(5):439–447

Key words: diagnostics, Lyme disease, screening test, confirmation test

Adres autorów: ul. Koszarowa 5, 51-149 Wrocław, e-mail: jacekgasiorowski@yahoo.co.uk

Wpłynęła 28.08.2007

Zaakceptowana: 28.09.2007

## WSTĘP

Pomimo długiego, ponad 20-letniego okresu, jaki upłynął od identyfikacji krętka *Borrelia (B.) burgdorferi* i postępu w badaniach nad biologią, kliniką i diagnostyką boreliozy, ta jednostka chorobowa nadal przysparza wielu problemów, głównie diagnostycznych. Często prowadzi to do błędnego rozpoznania choroby i/lub wdrożenia niepotrzebnego leczenia (1). W wielu przypadkach takie niewłaściwe rozpoznanie choroby ciąży na zdrowym pacjencie przez wiele lat, wywołując u niego trwałe poczucie choroby, reakcje depresyjne, w wielu przypadkach skutkując również niepotrzebnie udzielanymi świadczeniami, z orzeczeniem o niezdolności do pracy włącznie.

Z tego powodu podjęliśmy się analizy aktualnych danych na temat diagnostyki boreliozy, ze zwróceniem szczególnej uwagi na ograniczenia diagnostyczne i właściwą interpretację wyników.

## WPROWADZENIE

Rodzaj *Borrelia* należy do licznej grupy Gram-ujemnych bakterii spiralnych wymagających do życia warunków beztlenowych (2). W zakresie budowy *B. burgdorferi* posiada wszystkie cechy krętków. Fakt ten decyduje o wyborze metod badawczych i diagnostycznych, takich jak ustalenie warunków hodowli, barwienia czy

identyfikacji i wykrywania obecności patogenu w materiale biologicznym (2,3).

W wyniku rozdziału elektroforetycznego lizatu całych komórek udało się zidentyfikować 30 różnych pasm białkowych, spośród których dla celów klinicznych istotne znaczenie mają głównie białka immunogenne. Wśród białek immunogennych zidentyfikowano liczną grupę białek pospolitych (dających reakcje krzyżowe z innymi krętkami, a nawet niespokrewnionymi bakteriami) i białka specyficzne, uznane za charakterystyczne dla *B. burgdorferi*. W diagnostyce laboratoryjnej boreliozy zastosowanie znalazły obie wymienione grupy białek (1,3,4).

Niezależnie od geograficznego lub biologicznego pochodzenia borelie mają dwie główne komponenty białkowe o stałej masie molekularnej 41 kDa (p41 lub flagellina) i 60 kDa (HSP60), nazywane inaczej białkiem szoku termicznego. Obie wymienione grupy białek pospolicie występują w przyrodzie i w związku z tym często dają reakcje krzyżowe z innymi bakteriami (3,5,6). Flagellina (p41), obok innych antygenów uznawanych za bardziej swoiste dla *B. burgdorferi*, często jest wykorzystywana w testach diagnostycznych (3). Obecność przeciwciał skierowanych do antygeny p41 stanowi potwierdzenie odpowiedzi immunologicznej na kontakt z krętkami, natomiast brak tych przeciwciał przemawia za zakażeniem innym niż krętkowe (5–7). Inne często stwierdzane antygeny pospolite to: p66, p68, p71, p73 (1,5–7). Do białek specyficznych należą: OspA (31kDa), OspB (34kDa), OspC (21–24kDa), BmpA (p39), p93, p83/100, OspE (19kDa), OspF (26kDa) (3,5).

Również w przypadku antygenów swoistych występuje zjawisko heterogenności molekularnej, co manifestuje się problemami diagnostycznymi (np. niemożnością wykrycia przeciwciał przy zastosowaniu określonych testów) (1,6). W wyniku zakażenia *B. burgdorferi*, podobnie jak w przypadku innych infekcji, uruchomiony zostaje cały szereg reakcji immunologicznych, zarówno swoistych, jak i nieswoistych, mających na celu eliminację patogenu. Podobnie jak w większości zakażeń jako pierwsze pojawiają się przeciwciała w klasie IgM. Uwalniane są na początku pierwotnej odpowiedzi immunologicznej (3,6) i charakteryzują się małym powinowactwem do antygeny (8). Następne wg kolejności powstawania są przeciwciała w klasie IgG (3,6). W miarę rozwoju procesu chorobowego obserwuje się ewolucję produkcji przeciwciał (w obu klasach), skierowanych do różnych antygenów, zależnie od stadium choroby (7). Wczesna odpowiedź immunologiczna (głównie przeciwciała w klasie IgM) skierowana jest przeciwko

białku flagelliny (p41) oraz białku OspC związanemu z błoną zewnętrzną bakterii (5,7). Wykrywane są też przeciwciała do innych antygenów, np. p35 i p37 (8). U pacjentów w Europie bardzo rzadko w tym stadium choroby pojawiają się przeciwciała antyOspA (8). Późniejsze stadia choroby charakteryzują się obecnością przeciwciał skierowanych do wielu różnych białek, takich jak p39 i p58, a następnie p83/100, p53, p43, p39, p30, p21, Osp17 i p14 (pojawiają się one tygodnie, miesiące i lata później) (8). Przeciwciała antyOspC w klasie IgG w późniejszych stadiach choroby są obecne bardzo rzadko, natomiast przeciwciała antyOspC w klasie IgM mogą utrzymywać się u niektórych osób przez lata, nawet po skutecznej terapii antybiotykowej (6).

Tak więc obecność swoistych przeciwciał w klasie IgM nie może stanowić jedyne kryterium diagnostycznego potwierdzającego świeżą infekcję (1). Przeciwciała, które zostały wyprodukowane w wyniku zakażenia mogą być wykrywane we krwi nawet po 10, a niekiedy po 20 latach od momentu stwierdzenia choroby (w obu klasach), ale ich obecność rzadko jest wskaźnikiem aktywnego zakażenia (9). Przeciwciała przeciwko krętkom mogą być także stwierdzane w przypadku wznowy choroby (po wieloletnim okresie latencji krętków) lub nadkażenia (po ponownym zakażeniu przez kleszcza), jak również wystąpić w przebiegu zjawisk niezwiązanych z zakażeniem *B. burgdorferi* (reakcje krzyżowe nieswoiste, błędy w produkcji przeciwciał niezwiązane z obecnością patogenu) (6,10).

## DIAGNOSTYKA LABORATORYJNA BORELIOZY

W przypadku boreliozy do badania można wykorzystać następujące materiały biologiczne (2,4,5,8): surowica krwi (najczęściej), płyn mózgowo-rdzeniowy, płyn maziowy stawów, materiał uzyskany na drodze biopsji (np. skóry) i mocz (rutynowo jeszcze niebadany). Testy, które znalazły zastosowanie w diagnostyce boreliozy można ogólnie podzielić, ze względu na metodykę, na pośrednie i bezpośrednie. Do testów pośrednich, bazujących na wykrywaniu specyficznych przeciwciał w klasach IgG i IgM należą (1,4,5): ELISA (metoda immunoenzymatyczna), IFT (metoda immunofluorescencyjna), IHA (hemaglutynacja) i Western blot (test potwierdzający). Inne metody pośrednie potwierdzające zakażenie, np. badanie komórek biorących udział w odpowiedzi immunologicznej, test Gundersona z komórkami bakteryjnymi, rutynowo nie są stosowane (11). Wśród testów bezpośrednich, wykrywających bezpośrednio obecność czynnika zakaźnego wykorzystuje się

następujące metody (1,12–15): PCR (amplifikacja DNA bakteryjnego), test LUAT (Lyme Urine Antigen Test — metoda wykrywania antygenów *B. burgdorferi* w moczu, niedostępna w Europie), hodowla *B. burgdorferi* ze skóry, krwi, płynu mózgowo-rdzeniowego, moczu i innych materiałów biologicznych, testy na obecność kompleksów immunologicznych w płynach ustrojowych, biopsje tkanek i bezpośrednie ich badanie pod kątem obecności komórek *B. burgdorferi* (małe znaczenie diagnostyczne).

### Rutynowa strategia diagnostyczna

W rutynowej diagnostyce boreliozy najbardziej przydatne okazały się testy pośrednie, bazujące na poszukiwaniu swoistych przeciwciał w klasach IgM i IgG (5,11). Diagnostykę laboratoryjną boreliozy rozpoczyna się od testów przesiewowych, które charakteryzują się wysoką czułością, ale niską swoistością (1,5), co stwarza prawdopodobieństwo uzyskania wyników fałszywie dodatnich. Wszystkie osoby, u których wynik badania uzyskanego w teście przesiewowym jest dodatni, powinny mieć wykonane badanie testem potwierdzającym (1,5). Umożliwia to wykluczenie osób zdrowych z wynikami fałszywie dodatnimi i wykrycie chorych z wynikami prawdziwie dodatnimi.

### Omówienie poszczególnych testów

Test immunoenzymatyczny (ELISA, EIA)

Jest to metoda immunoenzymatyczna, najtańsza, prosta w wykonaniu, wykorzystywana najczęściej. Jest ponadto powtarzalna, odtwarzalna, można ją standaryzować, kontrolować i automatyzować (6,12). W diagnostyce laboratoryjnej boreliozy test ELISA wykorzystywany jest jako badanie przesiewowe, służące do wyselekcjonowania pacjentów wymagających dalszej diagnostyki pozwalającej na potwierdzenie lub wykluczenie zakażenia (1,5). Jako test przesiewowy nie daje podstaw do potwierdzenia boreliozy, ale pozwala na wyeliminowanie przypadków niebędących boreliozą i, co istotne, uniknięcie zbędnych kosztów oraz ukierunkowanie diagnostyki na inne schorzenia. Pozwala on ponadto na rozróżnienie klas immunoglobulin w obrębie wykrytych swoistych przeciwciał, co ma istotne znaczenie kliniczne dla rozpoznania fazy zakażenia. Niestety, w wielu przypadkach niezadowolająca jest zarówno czułość metody, jak i swoistość oraz brak satysfakcjonującej porównywalności wyników uzyskiwanych w różnych laboratoriach (17). Przyczyny tego stanu rzeczy są złożone. Między innymi odpowiada za to zróżnicowanie metodologiczne, brak jednoznacznych standardów opisujących, jakich

antygenów należy używać, zróżnicowanie gatunkowe *B. burgdorferi*, różne wzorce i materiały kontrolne, często również nadmierna oszczędność w zakresie prowadzenia kontroli jakości (17). Wynik negatywny nie zawsze może być podstawą do wykluczenia zakażenia *B. burgdorferi*, szczególnie gdy krew do badania pobrano w ciągu pierwszych dwóch tygodni od zachorowania (18). Natomiast wynik dodatni lub wątpliwy oznacza jedynie prawdopodobieństwo zakażenia *B. burgdorferi*. Zawsze powinien być potwierdzony testem potwierdzającym i nie może być wydany pacjentowi zanim diagnostyka nie będzie kompletna (17). W praktyce klinicznej niestety często spotykamy się z przypadkami rozpoznania boreliozy jedynie na podstawie dodatniego wyniku ELISA.

Test immunofluorescencji pośredniej (IFT)

Testy IFT, podobnie jak ELISA, służą jedynie do wstępnej diagnostyki przesiewowej. Pozwalają również na wykrywanie przeciwciał w obu klasach, są relatywnie tanie i łatwe w wykonaniu (1,5,17). Ich czułość jest porównywalna z testami ELISA, ale w niektórych przypadkach jest nieznacznie niższa. Wynika to z tego, że w testach IFT wykorzystane są całe komórki bakteryjne prezentujące niezmodyfikowany skład swoich antygenów (19). Stężenie poszczególnych antygenów może w tym przypadku być niekiedy zbyt niskie do wykrycia przeciwciał obecnych w materiale badanym. Częściej też przy obecności całych komórek bakteryjnych mogą wystąpić reakcje krzyżowe z innymi przeciwciałami niż skierowanymi do antygenów *B. burgdorferi* (17,18). Zabiegi polegające na preabsorpcji badanego materiału przy użyciu krętków Reitera eliminują częściowo reakcje krzyżowe, ale zmniejszają czułość testu, szczególnie gdy badanie wykonywane jest na początku choroby (1). Jeśli pamiętać się o ograniczeniach wynikających ze specyfiki tej metody, test IFT można stosować do badań przesiewowych boreliozy, szczególnie gdy laboratorium dysponuje dobrej klasy sprzętem w postaci mikroskopu fluorescencyjnego. W interpretacji wyniku uzyskanego w teście IFT należy kierować się tymi samymi zasadami, jak przy interpretowaniu wyniku ELISA (1,17).

Inne metody służące do serologicznych badań przesiewowych w kierunku boreliozy, jak na przykład, test hemaglutynacji pośredniej IHA, nie mają znaczenia we współczesnej diagnostyce laboratoryjnej boreliozy. Żaden test, który nie różnicuje przeciwciał na klasy i daje liczne reakcje krzyżowe nie może być brany pod uwagę przy diagnozowaniu tego schorzenia (1).

## Western blot

Western blot zaliczany jest do testów potwierdzających, stosowanych w przypadkach, gdy testy przesiewowe dały wynik dodatni lub wątpliwy (6,10). Nie stosuje się go wówczas, gdy testy przesiewowe dały wynik jednoznacznie ujemny (1,3,5). Western blot tworzy rodzaj mapy złożonej z różnych antygenów bakteryjnych. Jest to elektroforetycznie rozdzielony ekstrakt z pełnego spektrum antygenów *B. burgdorferi*, unieruchomiony na pasku diagnostycznym (2). Wykorzystuje się tu różnice w ruchliwości elektroforetycznej rozdzielanych białek i różnice w ich ciężarze, wyrażone w kilodaltonach. W teście Western blot stosowane są coraz częściej antygeny bakteryjne rekombinowane, uzyskiwane metodami inżynierii genetycznej (8,19). Obie wyżej wymienione wersje tego testu mają swoje zalety i wady. Niewątpliwą korzyścią wynikającą z zastosowania pełnych lizatów komórkowych jest to, że można wykryć większą liczbę białek immunoreaktywnych, ale powoduje to też trudność w odróżnieniu białek reagujących krzyżowo (8,19). Białka rekombinowane natomiast stwarzają dodatkowe możliwości wykrywania przeciwciał boreliozowych skierowanych do różnych gatunków borelii przy zastosowaniu jednego testu (jest to ważne przy założeniu, że nie zawsze wiadomo, którym gatunkiem pacjent jest zakażony). Ponadto białka rekombinowane zmniejszają prawdopodobieństwo wystąpienia reakcji krzyżowych poprzez wyselekcjonowanie tych białek, lub nawet ich fragmentów, które są najbardziej swoiste dla analizowanych gatunków, a nie są reprezentowane przez inne mikroorganizmy (10).

Jak wspomniano wcześniej, w odpowiedzi na każdy z tych antygenów mogą być produkowane w organizmie swoiste przeciwciała, zarówno w klasie IgM jak i IgG. Test Western blot daje możliwość ich precyzyjnej identyfikacji. Wprowadzając do diagnostyki boreliozy metodę Western blot, spodziewano się, że rozwiąże ona wszystkie problemy związane z potwierdzaniem zakażenia, ale później, mimo udoskonalenia techniki tego testu (m.in. poprzez stosowanie antygenów rekombinowanych), pojawiły się poważne nieporozumienia dotyczące interpretacji wyników. Dotyczyły one zarówno rodzaju reagujących antygenów, ich ilości pozwalającej na zakwalifikowanie wyniku do dodatniego, jak i optymalnego okresu choroby do przeprowadzenia badania (1,10). W Europie i w Azji rozwój zunifikowanych metod diagnostyki serologicznej jest skomplikowany przez obecność trzech gatunków *B. burgdorferi* i zmienność antygenową w obrębie tych gatunków (1,10).

Wydaje się, że najwłaściwszym rozwiązaniem problemu interpretacji wyniku Western blot jest stworzenie osobnych testów immunologicznych dla konkretnych obszarów geograficznych, bazujących na specyficznych antygenach prezentowanych przez gatunki *B. burgdorferi* występujące na tych endemicznych obszarach (1). Prace zmierzające do stworzenia standardów w diagnostyce laboratoryjnej boreliozy zostały już zapoczątkowane w Europie, między innymi w Instytucie Higieny i Mikrobiologii Lekarskiej Uniwersytetu w Monachium oraz w Europejskim Multicentrum Badań nad Immunoblotem w Serodiagnostyce Boreliozy w Southampton w Wielkiej Brytanii (10). Na podstawie badań przeprowadzonych z użyciem prób zebranych w różnych częściach Europy przez European Union Concerted Action on Lyme *Borreliosis* (EUCALAB), zalecono stosowanie następujących kryteriów diagnostycznych (19):

- Western blot w klasie IgM:
  - dla *B. afzelii* — obecność co najmniej jednego pasma spośród: p39, OspC, p17, p41;
  - dla *B. garinii* — obecność co najmniej jednego pasma spośród: p39, OspC, p41;
- Western blot w klasie IgG:
  - dla *B. afzelii* — obecność co najmniej dwóch pasm spośród: p83/100, p58, pP43, P39, p30, OspC, p21, p17, p14;
  - dla *B. garinii* — obecność co najmniej jednego pasma spośród: p83/100, p39, p30, OspC, p21, p17.

Uważa się, że Western blot z użyciem gatunku *B. afzelii* jest najbardziej czuły, i w związku z tym ten gatunek jest szczególnie rekomendowany do stosowania w serodiagnostyce boreliozy w Europie (1).

Test Western blot, podobnie jak inne badania laboratoryjne, musi być wykonywany łącznie z próbami kontrolnymi dodatnimi i ujemnymi. Jedynie uzyskanie oczekiwanego obrazu badań kontrolnych upoważnia do interpretowania wyniku badania pacjenta. Wynik powinien ponadto zawierać pełną informację na temat ujawnionych pasm, to znaczy, że powinny być wymienione wszystkie reagujące dodatnio pasma (1).

Badanie i znaczenie przeciwciał przeciwko VlsE  
Przeciwciała te mogą być wykrywane przy zastosowaniu testu ELISA oraz Western blot. Zmienność antygenowa jest efektywną strategią mikroorganizmów służącą ucieczce przed niszczącymi mechanizmami układu immunologicznego. *B. burgdorferi* również dysponuje zmiennymi antygenami nazwanymi vls (VMP — like sequence), które pozwalają przetrwać bakterii przez lata

w organizmie człowieka mimo żywej odpowiedzi immunologicznej. Sekwencje DNA homologiczne do *vlsE* zidentyfikowano u każdego z patogennych gatunków *Borrelia*, zlokalizowane są one na plazmidzie. Bakterie, u których nie występuje plazmid zawierający locus *vls* charakteryzują się zmniejszoną zakaźnością, co jest kolejnym dowodem świadczącym o znaczeniu *vlsE* w patogenezie (20,21). Pacjenci chorujący na boreliozę stale produkują przeciwciała skierowane przeciwko *VlsE*, które mogą być przydatne w diagnostyce, ponieważ przynajmniej część tych przeciwciał indukowana jest przez regiony niezmiennie *vlsE*.

#### Metoda amplifikacji DNA — PCR

(polymerase chain reaction, reakcja łańcuchowa polimerazy)

Zakłada się, że metoda ta może być stosowana do potwierdzenia boreliozy u pacjentów z rumieniem wędrującym, zanim pojawią się w surowicy przeciwciała (22). Ocenia się, że czułość jej dochodzi do 68%, a specyficzność do 100% (22). Warunkiem uzyskania dodatniego wyniku PCR jest prawidłowy dobór materiału do badania. Najlepszym materiałem są biopsaty tkankowe, co wynika z wewnątrzkomórkowej lokalizacji (dotyczy to również cyst, które mogą przebywać zarówno w cytozolu, jak i w jądrze komórkowym) oraz skłonnością tych drobnoustrojów do łączenia się ze strukturami komórek gospodarza. Podstawowym warunkiem osiągnięcia sukcesu diagnostycznego przy zastosowaniu PCR jest znajomość sekwencji nukleotydów DNA, który będzie podlegał amplifikacji. Wiedza ta umożliwia zaprojektowanie primerów (starterów), komplementarnych do jednej z nici poszukiwanego DNA (12,23). Jest to najtrudniejszy etap badania, ograniczający w dużym stopniu możliwość stosowania PCR.

Biorąc pod uwagę obecność trzech patogennych gatunków *Borrelia* w Europie, test powinien uwzględniać wszystkie te gatunki. Na rynku usług laboratoryjnych w Polsce są już osiągalne komercyjne testy PCR wykrywające DNA *B. burgdorferi*, które ten problem częściowo uwzględniają, ale ze względu na małą liczbę przeprowadzonych badań nie można wypowiedzieć się na temat ich skuteczności. Metoda ta, chociaż charakteryzuje się dużą swoistością i wysoką czułością, oraz stwarza szansę na potwierdzenie zakażenia w przypadkach seronegatywnych, w rutynowej diagnostyce ma jednak poważne ograniczenia (wykonanie w specjalistycznych laboratoriach, trudności techniczne, które mogą spowodować uzyskanie wyniku fałszywie ujemnego, wysoka cena badania). Rozważając możliwości i zalety

szerszego stosowania metody PCR w diagnostyce boreliozy, nie można pominąć faktu, że wykrycie materiału genetycznego patogenu nie musi świadczyć o obecności żywych bakterii (17,19). Badanie to nie rozstrzyga więc problemu aktywnego zakażenia, co z klinicznego punktu widzenia jest sprawą istotną.

#### Hodowla bakterii *B. burgdorferi*

Krętki *B. burgdorferi* hodują się trudno na podłożach sztucznych (pożywka Kelly). Hodowla musi przebiegać w warunkach beztlenowych, a wzrost bakterii trwa od 1 do 5 tygodni. Z badań statystycznych wynika, że rzadko udaje się wyhodować bakterie *B. burgdorferi* z materiału pobranego od osób leczonych, będących w późnym stadium choroby (15). Częściej wynik pozytywny uzyskiwany jest z płynu mózgowo-rdzeniowego i maziowego niż z surowicy krwi. Biorąc pod uwagę zasygnalizowane ograniczenia w stosowaniu tej metody, hodowla nie znalazła zastosowania w rutynowej diagnostyce boreliozy, ale powinna stanowić uzupełnienie procesu diagnostycznego w przypadkach charakteryzujących się ciężkim lub nietypowym przebiegiem (1,15).

#### Testy LUAT i LDA

Testy te polegają na wykrywaniu antygenów *B. burgdorferi* w moczu pacjentów z infekcją boreliozową (13,14). Są to unikalne metody opracowane w referencyjnym laboratorium IGeneX w Kalifornii. Pierwszy z nich — LUAT (Lyme Urine Antygen Test) — zaliczany jest do testów drugiej generacji i powstał wcześniej, w 1995 roku (13,14). Test LDA (Lyme Dot-Blot Antygen Assay) jest ulepszoną modyfikacją LUAT i zaliczany jest do testów trzeciej generacji.

Zasada testu LUAT i jego modyfikacji — LDA — opiera się na konkurencyjnym wiązaniu antygeny z moczu ze specyficznymi przeciwciałami wprowadzonymi do układu reakcyjnego. Obecne w moczu antygeny (lub jego fragmenty) po związaniu przez specyficzne przeciwciała w pierwszym etapie badania blokują wiązanie zastosowanych przeciwciał z analogicznymi antygenami przytwierdzonymi do fazy stałej układu reakcyjnego. Wynik reakcji uwidoczniiony jest przy zastosowaniu reakcji immunoenzymatycznej w postaci niebieskiej kropki na fazie stałej (14).

Po przeanalizowaniu wyników badań przeprowadzonych na dużej liczbie przypadków boreliozy, potwierdzonych między innymi metodą hodowli i PCR, wyniki uzyskane nowymi metodami były bardzo obiecujące (13). Przebadano około 700 osób (w tej liczbie 425 jedynie z symptomami choroby Lyme). Okazało się,

że wśród ponad 30% pacjentów z podejrzeniem boreliozy wyniki uzyskane przy zastosowaniu testu LUAT były dodatnie, podczas gdy w tej samej grupie osób zaledwie 8% miało pozytywny wynik badań serologicznych (14).

Główną zaletą testu LUAT jest to, że daje on wynik dodatni we wszystkich trzech fazach choroby (14). Według twórców testu LDA przewyższa czułością wszystkie dotychczasowe metody wykrywające antygeny bakteryjne *B. burgdorferi*. O ile do wykrycia materiału genetycznego *B. burgdorferi* metodą PCR potrzebna jest ilość DNA w badanym materiale odpowiadająca co najmniej zawartości jednej komórki bakteryjnej, o tyle do uzyskania pozytywnego wyniku metodą LDA wystarczą zaledwie fragmenty antygeny (14). Niestety w Europie oba omawiane testy nie są dostępne.

### **Problemy pojawiające się w laboratoryjnej diagnostyce boreliozy**

#### **Diagnostyka neuroboreliozy**

W diagnostyce laboratoryjnej neuroboreliozy istotną trudność stanowi zawodność złotego standardu badawczego stosowanego w mikrobiologii — hodowli wykonanej z płynu mózgowo-rdzeniowego (PMR), której wynik często wypada ujemnie. Tłumaczy się to zjawisko efektem przywierania bakterii *B. burgdorferi* do struktur mielinowych będącego efektem organotropizmu (16,24). Spośród wszystkich dostępnych metod z zakresu diagnostyki laboratoryjnej boreliozy jedynie dodatni wynik uzyskany w hodowli stanowi niepodważalny dowód obecności żywych komórek *B. burgdorferi* w badanym materiale. Również PCR nie gwarantuje w przypadku badania PMR sukcesu diagnostycznego, ponieważ większość bakterii *B. burgdorferi* przywiera do mieliny, podczas gdy w krążącym płynie można nie wykrywać patogenu (ani jego materiału genetycznego). Ponadto samo wykrycie materiału genetycznego patogenu nie musi świadczyć o obecności żywych krętków. Potwierdza jedynie, że zakażenie miało miejsce.

Badaniem, które może pomóc w rozstrzygnięciu diagnostycznego problemu neuroboreliozy jest poszukiwanie swoistych przeciwciał produkowanych lokalnie w obrębie ośrodkowego układu nerwowego, ale swoista odpowiedź humoralna jest procesem wymagającym czasu, tak więc wcześniej na początku choroby wyniki badań serologicznych mogą być ujemne (1,5). W diagnostyce różnicowej z innymi stanami patologicznymi zachodzącymi w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) bardzo pomocne jest oznaczanie indeksu swoistych przeciwciał: PMR/surowica, z uwzględnieniem całkowitego stężenia swoistych IgG w PMR i w surowicy

krwi. Oznaczenie tego indeksu może zapobiec pochopnemu rozpoznaniu boreliozy przy braku zakażenia *B. burgdorferi* u pacjenta, który jest seropozytywny i wykazuje objawy stanu zapalnego w obrębie OUN i, odwrotnie, wydaniu wyniku fałszywie ujemnego przy braku przeciwciał w surowicy i współistniejącym zakażeniu OUN przez *B. burgdorferi* (1,5).

#### **Zróżnicowanie antygenów użytych w testach serologicznych**

Wiele antygenów rozpoznawanych przez układ immunologiczny nie ma dużego znaczenia diagnostycznego. Część antygenów charakteryzuje się wysoką specyficznością, inne natomiast — bardzo dużą reaktywnością krzyżową (1,18). Jak wspomniano wcześniej, w testach diagnostycznych, w których znalazły zastosowanie pełne lizaty komórkowe znacznie częściej, obok przeciwciał swoistych, wykrywane są również przeciwciała skierowane do antygenów pospolitych. Są to głównie testy przesiewowe, które zgodnie ze standardem postępowania zawsze wymagają potwierdzenia (1). Reakcje krzyżowe dotyczą zarówno krętków, jak i innych typów bakterii (17,18). Do białek reagujących krzyżowo należą między innymi: flagellina i białka szoku termicznego (1,17,18). Obecność niektórych białek pospolitych jest również użyteczna, zwłaszcza w sytuacjach wątpliwych, czego przykładem może być dodatnia reakcja z antygenem p41 (podjednostka flagelliny) potwierdzająca krętkowe zakażenie, co zawęży diagnostykę tylko do krętków (2).

Wziąwszy pod uwagę polimorfizm antygenowy *B. burgdorferi*, jednym z poważnych problemów pojawiających się w diagnostyce laboratoryjnej boreliozy jest wybór genogatunku *B. burgdorferi*, który powinien być zastosowany do przygotowania testu, ponieważ różnią się one reaktywnością z surowicami pacjentów (10). W Europie, przy obecnej sytuacji epidemiologicznej, uznano że gatunkiem satysfakcjonującym pod względem składu antygenowego jest *B. afzelii*, która zabezpiecza najwyższy stopień czułości (1). W przypadku neuroboreliozy zaleca się dodatkowe wykonanie badania z użyciem gatunku *B. garinii*, uznanej za najczęstszy patogen odpowiedzialny za tę postać boreliozy, zwłaszcza gdy badanie z użyciem *B. afzelii* daje wynik ujemny, a są podstawy, by podejrzewać boreliozę (1,7).

Docelowo w badaniach rutynowych zastosowanie znajdują testy zawierające antygeny najbardziej reprezentatywne dla wszystkich trzech europejskich gatunków *Borrelia* (24). Badania wykonane przy pomocy metody Western blot z użyciem surowic zawierających

przeciwciała skierowane do wielu patogenów wykazały, że pasma specyficzne dla *B. burgdorferi* i pasma reagujące krzyżowo leżą bardzo blisko siebie na pasku testowym, co może spowodować błędne odczytanie wyniku (1). Dotyczy to testów Western blot, które podobnie jak większość testów przesiewowych opierają się na pełnym spektrum antygenów *B. burgdorferi*. Jak już wcześniej wspomniano, nowoczesne testy Western blot konstruowane są coraz częściej na bazie antygenów rekombinowanych, co umożliwia zastosowanie białek specyficznych i swobodne rozmieszczenie ich na pasku testowym, tak aby odczyt mógł być jednoznaczny (24). Ponadto istnieje możliwość skomponowania składu antygenowego paska testowego zawierającego antygeny charakterystyczne dla każdego z europejskich gatunków *B. burgdorferi*, zwiększając tym samym czułość diagnostyczną testu. W testach opartych na antygenach rekombinowanych znalazły zastosowanie najbardziej swoiste i immunogenne białka *B. burgdorferi* (również te, których ekspresja jest zależna od obecności komplementu krwi ssaka). Należą do nich między innymi: OspA, OspC, p39, BBK32, VlsE (4,25). Stwarzają one szansę wykrycia przeciwciał skierowanych do antygenów, których ekspresja w komórkach *B. burgdorferi* wyhodowanych na sztucznym podłożu jest słaba lub nieobecna (1,19).

#### Ograniczenia serodiagnostyki

Kolejny problem, który utrudnia laboratoryjną diagnostykę boreliozy, jest niemożność odróżnienia aktywnego zakażenia od przebytego w przeszłości, nawet w sytuacji, gdy wykrywane przeciwciała są całkowicie swoiste. Szczególnie komplikuje interpretację wyniku obecność przeciwciał w obu klasach, niezależnie od czasu, jaki upłynął od momentu zachorowania (9). Ponadto stężenia wykrywanych przeciwciał często nie korelują ze stanem klinicznym pacjenta. Często wysokie stężenia przeciwciał towarzyszą łagodnym postaciom boreliozy, podczas gdy u pacjentów z ciężkim przebiegiem choroby przeciwciała mogą występować w niskich wartościach lub być nieobecne (25).

#### Wyniki fałszywie ujemne lub fałszywie dodatnie

##### Wyniki fałszywie ujemne w serodiagnostyce boreliozy

1. Stadium zakażenia — zbyt wcześnie lub zbyt późno wykonane badanie mające na celu wykrycie przeciwciał w określonych klasach. Przeciwciała w klasie IgM pojawiają się zwykle 2–4 tygodni od zakażenia i utrzymują się około 6 miesięcy; po tym czasie ich stężenie może być zbyt niskie, uniemożliwiając ich

wykrycie (1,17). Przeciwciała IgG pojawiają się zazwyczaj między 4. a 8. tygodniem zakażenia i mogą zanikać przed upływem 12 miesięcy (1,3). Testy serologiczne są mało przydatne w diagnostyce wczesnych stadiów boreliozy z powodu niskiej ich czułości we wczesnej fazie choroby (1). Problem interpretacji wyniku ujemnego w badaniu serologicznym dotyczy również badań wykonanych metodą Western blot. Negatywny wynik testu Western blot nie może stanowić podstawy do wykluczenia boreliozy (1). Testy serologiczne stają się bardziej użyteczne w późniejszych stadiach choroby, kiedy ich czułość i specyficzność jest lepsza (3).

2. Upośledzenie odpowiedzi immunologicznej — w przypadku upośledzonej funkcji układu immunologicznego, ujemny wynik badania uzyskanego w metodzie pośredniej jest niemiernodajny. Rozwiązaniem diagnostycznym może być zastosowanie metody PCR lub założenie hodowli (17,19).
3. Obecność kompleksów immunologicznych — w przypadku masywnego zakażenia krętkami *B. burgdorferi* może dojść do związania krążących przeciwciał przez antygeny bakteryjne (7,26). 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 (26). W związku z trudnościami natury technicznej, związanymi ze standaryzacją tych metod, nie są jeszcze dostępne testy komercyjne. Próby stworzenia takich testów są jednak podejmowane, czego przykładem jest test EMIBA, wykrywający związane w kompleksy swoiste przeciwciała boreliozowe w klasie IgM (dostępny w USA) (26). Jest to obiecujący test laboratoryjny potwierdzający wczesną lub/i aktywną boreliozę. W naszych warunkach można próbować rozbić kompleksy immunologiczne w oparciu o ogólne zasady dotyczące metod postępowania z kompleksami. Ponadto uzasadnione jest powtarzanie badań serologicznych na przestrzeni długiego czasu (niekiedy kilku miesięcy). Powstawanie kompleksów immunologicznych obserwuje się szczególnie w stanach ostrych, gdy zakażenie jest masywne (26). W późniejszym okresie choroby wzrasta szansa wykrycia wolnych przeciwciał.
4. Wybór niewłaściwego materiału do badania — opisywane są przypadki lokalnej produkcji przeciwciał, np. wyłącznie w płynie maziowym lub w PMR (17). W związku z istnieniem bariery płyn mózgowo-

rdzeniowy – krew produkowane miejscowo przeciwciała w PMR mogą być niewykrywane w surowicy krwi. Należy w takich sytuacjach badanie wykonać w obu materiałach, we krwi i w PMR, po czym obliczyć indeks przeciwciał. Do oznaczania przeciwciał można również wykorzystać płyn maziowy (1).

5. Wpływ antybiotykoterapii wdrożonej w początkowym stadium choroby – w tym przypadku może mieć miejsce osłabienie odpowiedzi humoralnej (17,18). Czas wykrycia pierwszych przeciwciał jest zróżnicowany u poszczególnych pacjentów. Dlatego wskazane jest powtarzanie badania (1,3). W sytuacjach uzasadnionych pozostają badania bezpośrednie (PCR). O kontynuowaniu badań serologicznych w miarę upływu czasu powinien decydować stan kliniczny pacjenta. W przypadku utrzymywania się wyraźnych objawów klinicznych przy seronegatywności potwierdzonej przy każdym badaniu należy przeprowadzić narządową diagnostykę różnicową na obecność innych schorzeń o podobnym obrazie klinicznym jak stwierdzany w boreliozie (27).

#### Wyniki fałszywie ujemne w testach bezpośrednich

Istnieje również możliwość uzyskania fałszywie ujemnego wyniku w czułych badaniach bezpośrednich. W przypadku metody PCR przyczyną fałszywie ujemnego wyniku może być niezachowanie wszystkich wymaganych warunków pobrania i przesłania materiału do badania, obecność w materiale badanym inhibitorów polimerazy, np. heparyny, hemoglobiny, pochodnych porfiryn, posługiwanie się wadliwymi primerami, nieodpowiednia temperatura na poszczególnych etapach reakcji (1,18). Fałszywie ujemny wynik hodowli może być spowodowany niewłaściwym składem podłoża, niezachowaniem beztlenowych warunków hodowli, zbyt wcześnie wykonanym odczytem wyniku (wzrost *B. burgdorferi* trwa od 1 do 5 tygodni), niewłaściwym doбором materiału do badania, obecnością tylko cyst krętków (1,3,17), posiewem na krętki dopiero po wdrożeniu antybiotykoterapii. Ocenia się, że u około 70% pacjentów z przewlekłą boreliozą po leczeniu antybiotykami utrzymują się objawy kliniczne, natomiast nie udaje się uzyskać pozytywnej hodowli (15). Istnieje kilka hipotez tłumaczących ten fenomen (15):

- infekcja jest opanowana, ale utrzymuje się proces zapalny,
- bakterie we krwi są nieobecne, lecz zlokalizowane w innych przestrzeniach,

- patogen jest obecny w badanym materiale, ale w zmienionej postaci, niepoddającej się hodowli w standardowych podłożach.

#### Wyniki fałszywie dodatnie w serodiagnostyce boreliozy

Uzyskanie fałszywie dodatniego wyniku może być spowodowane reakcją krzyżową, spowodowaną istnieniem innej infekcji, nie tylko krętkowej. Wyniki fałszywie dodatnie dają najczęściej zakażenia bakteryjne takie, jak: *Treponema pallidum*, *Helicobacter pylori* oraz riketsje, ehrlichie, a także wirusy, np. HIV-1, herpeswirusy, szczególnie wirus Epsteina-Barr. Problem ten dotyczy szczególnie przeciwciał wykrywanych w klasie IgM (1,6). *B. burgdorferi* posiada wiele antygenów w swoim składzie, które występują licznie również w innych mikroorganizmach, np. p41, p58–60, p66, p68, p71, p73 (10). Reakcje krzyżowe wykrywane są głównie w testach przesiewowych. W przypadku chorób autoimmunologicznych z wysokim mianem autoprzeciwciał wykrywane dodatnie wyniki oznaczeń przeciwciał przeciwko *B. burgdorferi* charakteryzują się często nietypowym obrazem w odniesieniu do stadium choroby, rodzaju antygenów, do których są skierowane przeciwciała i klas immunoglobulin, w których zostały stwierdzone (10). W zależności od objawów choroby należy wykonać badania pozwalające na przeprowadzenie diagnostyki różnicowej z innymi niż borelioza stanami patologicznymi.

Należy dodać, że aby zminimalizować ryzyko otrzymania wyniku nieprawdziwego, oczywiście wyłącznie w zakresie czynników laboratoryjnych wpływających na błąd, należy wybierać optymalne, dostosowane do populacji i regionu geograficznego testy, które ponadto powinny być dobrze opisane pod względem zastosowanych standardów jakości przez producenta (1).

#### PIŚMIENNICTWO

1. Wilske B., Zoller L., Brade V., Eifert M., Gobel U., Stanek G. i wsp.: MIQ-12 Lyme-Borreliose. W: Mauch H., Lutticken R., Gatermann S. [red.]. Qualitätsstandards in der mikrobiologisch-infektiologischen Diagnostik. Urban&Fischer, München Jena 2000
2. Zaremba M., Borowski J.: Mikrobiologia lekarska. Wyd. 3. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2004, ss. 330–333
3. Oschmann P., Kraiczy P., Halperin J., Brade V.: Lyme Borreliosis and Tick-Borne Encephalitis. UNI-MED, Bremen 1999, ss. 20–24, 80–103
4. Liang F.T., Steere A.C., Marques A.R., Johnson B.J.B., Miller J.N., Philipp M.T.: Sensitive and Specific Serodiagnosis of Lyme Disease by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay with a Peptide Based on an Immunodominant



- Conserved Region of *Borrelia burgdorferi* VlsE. *J. Clin. Microbiol.* 1999;37(12):3990–3996
5. Bakken L.L., Coyle P.K., Liegner K.B.: Diagnostik der Lyme-Borreliose — Eine Zusammenstellung. *Immunol. Invest.* 1997;26(1–2):117–128
  6. Brown L., Hamen S.L., Langone J.J., Lowe N., Pressly N.: Lyme Disease Test Kits: Potential for Misdiagnosis. *FDA Med. Bull.* Summer 1999, final issue
  7. Hauser U., Lehnert G., Lobentanzer R., Wilske B.: Interpretation Criteria for Standardized Western Blots for Three European Species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *J. Clin. Microbiol.* 1997;35(6):1433–1444
  8. Gołąb J., Jakóbiński M., Lasek W.: *Immunologia*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2002, ss. 25–33
  9. Kalish R.A., McHugh G., Granquist J., Shea B., Ruthazer R., Steere A.C.: 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;33(6):780–785
  10. Hauser U., Lehnert G., Wilske B.: Validity of interpretation criteria for standardized Western blots (immunoblots) for serodiagnosis of Lyme borreliosis based on sera collected throughout Europe. *J. Clin. Mikrobiol.* 1999;37(7):2241–2247
  11. Grier T.: Laboratory Tests. Canadian Lyme Disease Foundation [serial online] 2006:[4 ss. ekranowe]. Adres: <http://www.canlyme.com>
  12. Dembińska-Kieć A., Naskalski J.: *Diagnostyka laboratoryjna z elementami biochemii klinicznej*. Wydawnictwo Volumed, Wrocław 1998, ss. 761–769
  13. Harris N.S.: Lyme (*Borrelia*) antigen assays: questions and answers. *The Official IGenEX, Inc. Newsletter* [serial online] styczeń 2002;1(1):[8 ss. ekranowych]. Adres: <http://www.igenex.com/innovations1.htm>
  14. Harris N.S., Stephens B.G.: Detection of *Borrelia burgdorferi* Antigen in Urine from Patients with Lyme Borreliosis. *Journal of Spirochetal and Tick-Borne Diseases* [serial online] 1995;2(2):[8 ss. ekranowych]. Adres: <http://www.igenex.com/luatart.htm>
  15. Phillips S.E., Mattman L.H., Hulińska D., Moayad H.: A Proposal for the Reliable Culture of *Borrelia burgdorferi* from Patients with Chronic Lyme Disease, Even from Those Previously Aggressively Treated. *Infection* 1998;26:364–367
  16. Priem S., Burmester G.R., Kamradt T., Wolbart K., Rittig M.G., Krause A.: Detection of *Borrelia burgdorferi* by polymerase chain reaction in synovial membrane, but not in synovial fluid from patients with persisting Lyme arthritis after antibiotic therapy. *Ann. Rheum. Dis.* 1998;57(2):118–121
  17. Reed K.D.: Laboratory Testing for Lyme Disease: Possibilities and Practicalities. *J. Clin. Microbiol.* 2002;40(2):319–324
  18. Coyle P.K.: *Borrelia burgdorferi* Infektion: Klinische Diagnostische Techniken. *Immunol. Invest.* 1997;26(1–2):117–128
  19. Robertson J., Guy E., Andrew N., Wilske B., Anda P., Granstrom M. i wsp.: A European Multicenter Study of Immunoblotting in Serodiagnosis of Lyme Borreliosis. *J. Clin. Microbiol.* 2000;38(6):2097–2102
  20. Eicken C., Sharma V., Klabunde T., Lawrenz M., Hardham J., Norris S. i wsp.: Crystal Structure of Lyme Disease Variable Surface Antigen VlsE of *Borrelia burgdorferi*. *J. Biol. Chem.* 2004;277(24):21691–21696
  21. Oksi J., Uksila J., Marjamaki M., Nikoskelainen J., Viljanen M.: Antibodies against Whole Sonicated *Borrelia burgdorferi* Spirochetes, 41-Kilodalton Flagellin and P39 Protein in Patients with PCR — or Culture-Proven Late Lyme Borreliosis. *J. Clin. Microbiol.* 1995;33(9):2260–2264
  22. Zore A., Ruzic-Sabljić E., Maraspin V., Cimperman J., Lotric-Furlan S., Pikelj A. i wsp.: Sensitivity of culture and polymerase chain reaction for the etiologic diagnosis of erythema migrans. *Wien. Klin. Wochenschr.* 2002;114(13–14):606–609
  23. Brzezińska-Błaszczak E.: *Zarys immunodiagnostyki*. Wydawnictwo Uniwersytetu Łódzkiego, Łódź 1994
  24. Hauser U., Lehnert G., Wilske B.: Diagnostic Value of Proteins of Three *Borrelia* Species (*Borrelia burgdorferi* sensu lato) and Implications for Development and Use of Recombinant Antigens for Serodiagnosis of Lyme Borreliosis in Europe. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1998;5(4):456–462
  25. Lahdenne P., Panelius J., Saxen H., Heikkilä T., Sillanpää H., Paltomaa M. i wsp.: Improved serodiagnosis of erythema migrans using novel recombinant borrelial BBK32 antigens. *J. Med. Microbiol.* 2003;52:563–567
  26. Brunner M., Sigal L.H.: Use of Serum Immune Complexes in a New Test That Accurately Confirms Early Lyme Disease and Active Infection with *Borrelia burgdorferi*. *J. Clin. Microbiol.* 2001;39(9):3213–3221
  27. Blaauw A., Van Loon A., Schellekens J., Bijlsma J.: Clinical evaluation of guidelines and two-step approach for Lyme disease. *Rheumatology* 1999;38:1121–1126