

Merjenje celičnega imunskega odziva pri okužbi z *Borrelia burgdorferi**

Cellular immune response to *Borrelia burgdorferi* infection in man*

Tadej Malovrh**, Alenka Paternoster***

Ključne besede
lymska borelioza – imunologija
limfociti blastno preoblikovanje
Borrelia burgdorferi

Key words
lyme disease – immunology
lymphocyte transformation
Borrelia burgdorferi

Izvleček. Namen naše raziskave je bil določiti vrednost in diagnostični pomen testa blastnega preoblikovanja limfocitov pri lymski boreliozi. Primerjali smo laboratorijske rezultate z diagnozami, ki so jih postavili zdravniki. Spremljali smo potek bolezni pri 213 preiskovancih, katerih kri je bila poslana na testiranje celične imunosti za *Borrelia burgdorferi*. Pri vseh obravnavanih bolnikih je klinična slika ustrezala tisti pri lymski boreliozi. Ugotovili smo, da se je pri 65 bolnikih ali 30,5 % od 213 bolnikov razvil celični imunski odziv, pri 4 ali 1,9 % imunski odziv ni bil značilen, pri 144 ali 67,6 % se celična imunost ni razvila. V nadaljevanju raziskave smo razdelili preiskovance po kliničnih znamenjih v 5 skupin. V prvi skupini smo pri 45,8 % bolnikov odkrili razvoj celičnega imunskega odziva, v drugi pri 57,1 %, v tretji pri 11,1 %, v četrti pri 22,1 % in v peti skupini pri 37,2 %.

Abstract. The purpose of this study was to determine the diagnostic value of the lymphocyte blast transformation test in Lyme disease. Our laboratory results were compared with the diagnoses established by physicians. The course of the illness was followed in 213 individuals whose blood samples were tested for cell immunity against *Borrelia burgdorferi*. All patients showed clinical picture compatible with *Borrelia burgdorferi* infection. Sixty-five of the 213 patients (30.5%) developed cellular immunity, 4 (1.9%) showed a non-specific cellular immune response, and 144 patients (67.6%) showed no cellular immune response to *Borrelia burgdorferi* antigens. The individuals were further divided into 5 groups by their clinical signs. In group 1, cellular immune response was observed in 45.8 per cent of patients, in group 2 in 57.1 per cent, in group 3 in 11.1 per cent, in group 4 22.1 per cent and in group 5 37.2 per cent of patients.

Uvod

Lymska borelioza je po celem svetu razširjena večsistemska bolezen, ki jo povzroča *Borrelia burgdorferi*. Mikroorganizem sodi v red *Spirochaetales*, družino *Treponemataceae* in rod *Borrelia*. Na človeka in živali ga prenašajo okuženi klopi in nekatere krvosesne žuželke (obadi, mušice, komarji). S krvjo ali limfo pride v različne organe (možgane, jetra, vranico, kožo ali sklepe). V začetku delujejo mikroorganizmi neposredno na gostiteljeve celice, pozneje pa se bolezen zaplete zaradi spodbuditve imunskega odziva (1–3).

Klinična znamenja so raznolika, pojavljajo pa se lahko šele po različno dolgi inkubacijski dobi. Bolezen poteka v treh fazah. Za prvo obdobje je značilen pojav vročine in pogosto kožne vzbrsti *erythema migrans* z dodatnimi kliničnimi znamenji ali brez njih. Včasih

*Objavljeno delo je bilo nagrajeno s Prešernovo nagrado za študente v letu 1996.

**Tadej Malovrh, štud. med., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Korytkova 2, 1000 Ljubljana.

***Alenka Paternoster, štud. med., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Korytkova 2, 1000 Ljubljana.

se razvijeta meningitis ali limfocitom. V drugem obdobju lahko pride do prizadetosti srca, živčevja in oči. V tretjem obdobju pa so pogosta nevrološka znamenja, artritis, *acrodermatitis chronica atrophicans*, kronična prizadetost srca in *scleroderma circumscripta* (4–13).

Namen

Namen naše raziskave je bil ugotoviti pojav celičnega imunskega odziva pri bolnikih z lymsko boreliozo. V laboratoriju za celično imunologijo Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo smo pregledali vzorce krvi bolnikov, ki so bili poslani zaradi suma na lymsko boreliozo. Bolnike so pregledali na Kliniki za infekcijske bolezni in vročinska stanja Kliničnega centra v Ljubljani. Pri vseh preiskovancih je zdravnik ugotovil upravičenost odvzema krvi za preskus ugotavljanja stika z *B. burgdorferi in vitro*. Navzočnost celičnega imunskega odziva smo merili s testom blastnega preoblikovanja bolnikovih limfocitov, ki smo jih spodbudili s pripravkom celokupnih antigenov *B. burgdorferi sensu stricto*.

Ker se klinična in laboratorijska diagnoza popolnoma skladata le pri redkih boleznih, smo želeli ugotoviti, kako je to pri lymski boreliozi. Zbrane klinične in laboratorijske rezultate smo razvrstili v organizirane skupine in nato izračunali skladnost ugotovitev. Iz dobljenih rezultatov smo sklepali na ustreznost metode preizkusa blastnega preoblikovanja limfocitov za laboratorijsko ugotavljanje lymske borelioze.

Materiali in metode

Bolniki

Pri obravnavanih bolnikih smo podatke o začetku in poteku bolezni zbrali iz ambulantnih kartonov in iz popisov bolezni.

Zbrali smo naslednje podatke:

- priimek in ime,
- rojstni datum,
- starost,
- spol bolnika,
- ali je bolnika pičil klop ali za prenos bolezni sumljiva žuželka,
- kolikšen je bil čas od pika do pojava prvih kliničnih znamenj,
- kakšna klinična znamenja so se pojavila,
- kako dolg je bil čas od začetka bolezni do prvega obiska pri zdravniku in
- kolikokrat je bil bolnik zdravljen.

V našo raziskavo smo zajeli 800 bolnikov. Pri vseh smo določili raven celičnega imunskega odziva. Za 305 od teh bolnikov smo dobili tudi podatke o protitelesni imunosti. Za 213 od 800 bolnikov smo zbrali vse zgoraj naštetе podatke. Te bolnike smo razvrstili v skupine glede na klinična znamenja:

- 1. skupina: *erythema migrans*, *lymphocytoma cutis*;
- 2. skupina: znaki na srcu, očesni in nevrološki znaki (meningitis, encefalitis, mielitis, poliradikulitis);
- 3. skupina: kronični encefalomielitis, *acrodermatitis chronica atrophicans*, artritis;

- 4. skupina: nespecifični splošni znaki, stalne bolečine v glavi, sklepih, mišicah, hrbtenici, slabo počutje in utrujenost, pozabljivost, vrtoglavica, boleznι ledvic, gastroenterokolitis;
- 5. skupina: stanje, ko se lahko pri bolniku istočasno pojavijo klinična znamenja iz več prejšnjih skupin.

Blastno preoblikovanje limfocitov

Iz bolnikove sveže venske krvi, ki smo ji dodali heparin, smo osamili mononuklearne celice na gostotnem gradientu Ficoll-Paque. Pri vsakem vzorcu, ki je bil poslan v laboratorij za celično imunost z napotno diagnozo lymfska borelioza, smo testirali odzivnost limfocitov T z dvema koncentracijama antigena (80 in 160 μ g) v treh vzporednih ponovitvah. Moč celičnega odziva na antigen smo določili glede na odzivnost limfocitov, ki jih nismo spodbudili z antigenom.

V vsako vdolbinico na mikroplošči smo nanесли 100 l suspenzije limfocitov z gostoto 1×10^6 celic/ml ter dodali 50 l prve ali druge koncentracije antigena. Pri negativni kontroli pa smo namesto antigena dodali 50 l celičnega gojišča. Tako pripravljeno mikroploščo smo inkubirali 7 dni v inkubatorju pri 37°C, 95 % zračni vlagi in 5 % CO₂, 20 ur pred koncem inkubacije smo v vse vdolbinice dodali 50 l radioaktivnega timidina (³H-timidin). Količino radioaktivnega timidina, ki se je vgradila v blastno spremenjene celice zaradi stimulacije z antigenom, smo izmerili v števcu beta in izrazili v cpm (angl. *count per minute*).

Računalniški program za obdelavo podatkov

Za zbiranje in obdelavo podatkov o bolnikih smo naredili računalniški podprogram v programu *Quattro Pro for Windows* verzija 5.0 (licenca Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo 1995). Program smo zasnovali tako, da smo lahko šifrirane podatke med seboj primerjali, razvrščali, preštevali ali izbirali glede na vprašanja, ki smo si jih zastavljali.

Z računalniškim programom smo določili tudi meje za značilno stimulacijo limfocitov ter količnike med njimi in slepo kontrolo.

Merila, po katerih smo ocenjevali navzočnost celičnega imunskega odziva kot značilnega:

- odziv v negativni kontroli, večji od 100 cpm,
- spodbujanje z vsaj eno koncentracijo antigena, večjo od 500 cpm,
- velikost vsaj enega količnika (količnik = cpm z antigenom/cpm negativne kontrole) večja od 2,8.

Kot pozitivne na celično imunost smo ocenili tudi vrednosti testa blastnega preoblikovanja limfocitov, kjer je bila spodbuda v negativni kontroli manjša od 100 cpm, ter vzpodbuda z vsaj eno koncentracijo antigena večja od 800 cpm.

Vzorke, pri katerih je bila vzpodbuda v mediju večja od 100 cpm, vzpodbuda z vsaj enim antigenom med 400 in 500 cpm in količnikom večjim od 2,5, smo opredelili kot dvomljive. Vse ostale vzorce, kjer je bila vgradnja ³H-timidina manjša, smo razvrstili kot negativne na celično imunost.

Statistične metode

Rezultate smo ovrednotili z metodo enosmerne analize variance (ANOVA) in s Studentovim t-testom, ki ju vsebuje računalniški analitični program *Quattro pro for Windows*. Vrednost $p \leq 0,05$ smo imeli za merilo statistično značilne razlike med skupinami.

Rezultati

Vsi preiskani vzorci so bili označeni z napotno diagnozo lymska borelioza. Pri 185 bolnikih od 800 (23,1 %) smo odkrili celični imunski odziv proti antigenom *B. burgdorferi*. Pri 602 (75,3 %) nismo ugotovili celične imunosti. Pri 13 bolnikih (1,6 %) dobljeni rezultati niso omogočili jasne opredelitve.

Za 305 (38,1 %) preiskovancev od 800 smo dobili podatke o njihovem protitelesnem odzivu na antigene *B. burgdorferi*. Od teh je imelo 31 bolnikov ali 10,2 % značilno povečan titer specifičnih protiteles razreda IgG ali IgM. 274 bolnikov ali 89,8 % je imelo negativen titer protiteles.

Za 213 ali 26,6 % od 800 preiskovancev smo proučili popolne ambulantne kartone in popise bolezni. V podrobnejšo analizo smo vključili teh 213 preiskovancev. Ugotovili smo, da jih je 65 ali 30,5 % imelo razvito celično imunost, pri 4 bolnikih ali 1,9 % tega nismo mogli potrditi, pri 144 ali 67,6 % bolnikov pa se celični imunski odziv ni razvil.

Pri 23 bolnikih ali 10,8 % smo našli značilno povečan titer protiteles, pri 151 ali 70,9 % je bil določen titer protiteles, ki je bil premajhen, da bi bil značilen, za 39 bolnikov ali 18,3 % pa nismo dobili podatka o titru protiteles. Pri 8 bolnikih (3,8 %) smo z laboratorijskimi testi dokazali navzočnost celične in protitelesne imunosti.

Tabela 1. Razdelitev preiskovancev v skupine glede na navzočnost celične in protitelesne imunosti.

Bolniki	Celična imunost (%)	Protitelesna imunost (%)
Reaktivni	65 (30,5)	23 (10,8)
Nereaktivni	144 (67,6)	151 (70,9)
Dvomljiva reaktivnost ali ni podatka	4 (1,9)	39 (18,3)
Skupaj	213 (100)	213 (100)

213 bolnikov s popolnimi podatki o poteku bolezni, zdravljenju in podatki laboratorijskih preskusov celične in protitelesne imunosti smo razvrstili po kliničnih znamenjih v 5 skupin.

Tabela 2. Navzočnost celične in protitelesne imunosti za 5 skupin bolnikov, v katere so bili razvrščeni v naši raziskavi.

Skupina	Celična imunost v %			Protitelesna imunost v %			Titer 1: 256 v %	
	poz.	neg.	dvom.	poz.	neg.	ni pod.	IgM	IgG
1	45,8	50,0	4,2	33,3	62,5	4,2	100	25,0
2	57,1	42,9	–	14,3	85,7	–	100	–
3	11,1	77,8	11,1	11,1	77,8	11,1	50,0	100
4	22,1	76,7	1,2	5,8	72,1	22,1	12,5	80,0
5	37,2	62,8	–	9,0	69,2	21,8	42,9	71,4

Tabela 3. Inkubacijska doba in število zdravljenj za skupine, v katere so bili bolniki razvrščeni.

Skupina	do 1	Inkubacijska doba (meseci) v %				ni pod.	1 x	Število zdravljenj v %			ni pod.
		2	3	4	5			2 x	3 x in več		
1	62,6	16,7	–	–	–	20,8	91,7	8,3	–	–	
2	14,3	28,6	–	–	14,3	42,9	71,4	14,3	–	14,3	
3	–	–	5,6	–	5,6	88,9	50,0	16,7	16,7	16,6	
4	2,3	–	–	3,6	27,9	66,3	53,5	26,7	16,3	3,5	
5	21,8	6,4	1,3	1,3	15,4	53,8	44,9	33,3	11,5	10,3	

Tabela 4. Anamnestični podatki o piku klopa ali žuželke za skupine, v katere so bili bolniki razvrščeni.

Skupina	Pik klopa ali žuželke v %	
	da	ne
1	75,0	25,0
2	85,7	14,3
3	55,6	44,5
4	72,1	27,9
5	78,2	21,8

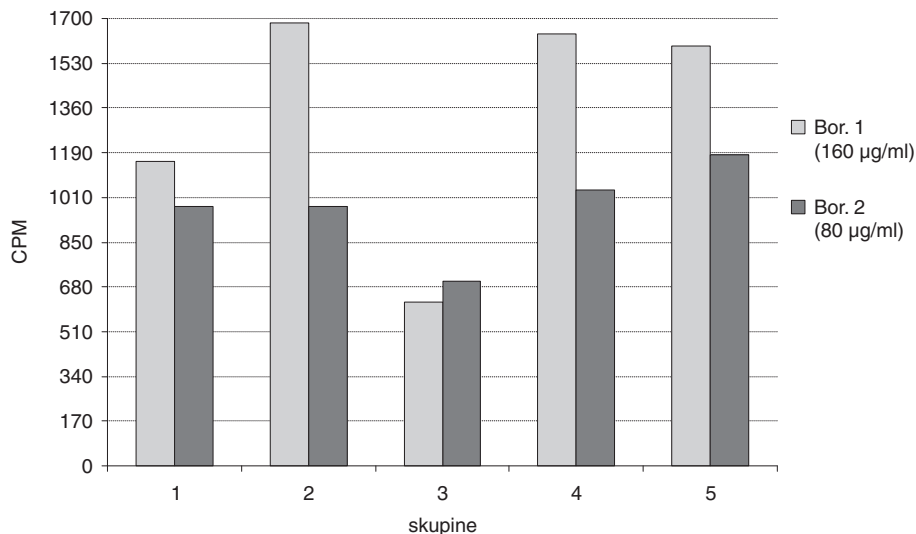
Statistično vrednotenje rezultatov testa blastnega preoblikovanja

Ugotovili smo, da se skupine preiskovancev od 1 do 5 med seboj statistično značilno razlikujejo ($p < 0,05$). Razlike obstajajo tudi znotraj skupin za bolnike s pozitivnim ali negativnim rezultatom testa celičnega imunskega odziva. Čeprav se limfociti oseb s pozitivnim rezultatom močnejše odzivajo na večjo koncentracijo borelijskega antigena ($160 \mu\text{g/ml}$) kot na manjšo ($80 \mu\text{g/ml}$), pa med odzivoma ni statistično značilnih razlik ($p > 0,05$).

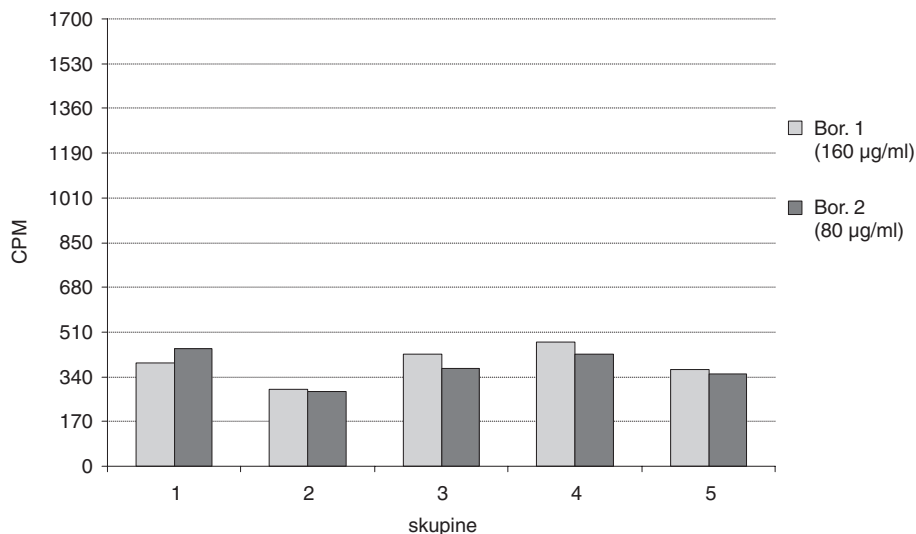
Razpravljanje

Imunski odziv na antigene *B. burgdorferi* je različno močan v posameznih obdobjih bolezni. Kaže se kot protitelesni ali celični imunski odziv ali pa oboje. Iz teh razlogov lahko pričakujemo zelo individualne bolezenske slike in različen imunski odziv na okužbo z borelijami v različnih obdobjih bolezni.

Diagnostika bolezni je s kliničnega vidika najbolj zanesljiva v zgodnjem obdobju bolezni, ko se pojavljajo prve kožne spremembe, pa tudi takrat je diagnoza bolezni pogosto napačna (15–19). V poznejših stadijih je klinična diagnoza že manj zanesljiva in jo je zato treba podpreti tudi z laboratorijskimi preiskavami na celično in protitelesno imunost. Kljub sodobnim tehnikam določanja celične in protitelesne imunosti dobimo včasih rezultate, ki se ne skladajo s klinično diagnozo (14, 35). Tudi takrat, ko je bolezen etiološko potrjena z izolacijo borelij iz tkiva bolnika, laboratorijski testi pogosto ostanejo nemi.



Slika 1. Različne količine antigena *Borrelie burgdorferi* spodbudijo limfocite bolnikov s celičnim imunskim odzivom v različnih obdobjih bolezni različno močno (CPM – celični imunski odziv; izražen s cpm – angl. count per minute, Bor. 1 – koncentracija borelijskega antigena 160 µg/ml, Bor. 2 – koncentracija borelijskega antigena 80 µg/ml).



Slika 2. Različne količine antigena *Borrelie burgdorferi* spodbudijo limfocite bolnikov brez celičnega imunskega odziva v različnih obdobjih bolezni enako močno (CPM – celični imunski odziv; izražen s cpm – angl. count per minute, Bor. 1 – koncentracija borelijskega antigena 160 µg/ml, Bor. 2 – koncentracija borelijskega antigena 80 µg/ml).

Znani so primeri značilnega *erythema migrans*, iz katerega je bila izolirana *B. burgdorferi*, imunskega odziva pa kljub večkratnim laboratorijskim preiskavam ni bilo (8, 18).

V naši raziskavi smo želeli spoznati zanesljivost in pomen testa na celično imunost s primerjavo laboratorijskih rezultatov z diagnozami, ki jih postavi zdravnik. Spoznati smo hoteli tudi potek celične imunosti v posameznih obdobjih bolezni. Podrobneje smo proučili potek bolezni pri bolnikih, katerih kri je bila poslana na testiranje celične imunosti proti *B. burgdorferi*. Pri vseh bolnikih je bil klinično postavljen sum na lymsko boreliozo. V raziskavo, ki je bila retrospektivna, smo vključili 213 preiskovancev z vsemi zahtevanimi podatki, ki smo jih razdelili v 5 skupin glede na klinična znamenja. Vrednotili smo odstotek pozitivnih in negativnih rezultatov testov na celično imunost in rezultate primerjali z rezultati testov na protitelesno imunost. Oboje smo primerjali z rezultati kliničnih ugotovitev.

Pri vrednotenju laboratorijskih in kliničnih izvidov smo naleteli na več pomembnih težav. Delitev preiskovancev v skupine glede na klinična znamenja načelno ni zapletena, vendar pa pogosto naletimo na vprašanje, ali so zbrani podatki iz anamneze in subjektivna ocena kliničnih znamenj dovolj izčrpni in natančni. Iz anamneze pogosto razberemo nasprotujoče si navedbe o piku žuželke in pojavu rdečine. Bolniki pogosto ne vedo za pik, vedo pa za kožno spremembo. Pogosto zatrjujejo, da so imeli več pikov klopa, ne vedo pa, kdaj se je to zgodilo. Zdravnik v anamnezi zapiše take nezanesljive podatke, čeprav *status praesens* ni značilen za začetno obdobje bolezni, pač pa je podoben kasnejšemu obdobju lymske borelioze. Za zbiralca podatkov je zato razbiranje zelo zahtevno, razvrščanje v skupine glede kliničnih znamenj pa nehote nenatančno ali tudi nepravilno. V naši raziskavi je bilo najbolj zahtevno razvrščanje v 4. in 5. skupino. V 4. skupino smo razvrstili bolnike z nespecifičnimi znamenji ter v 5. skupino bolnike, ki so imeli hkrati znamenja, ki so bila značilna za več skupin hkrati.

Rezultati so v skladu s teoretičnimi pričakovanji. Kmalu po stiku z antigenom pričakujemo odziv specifičnih limfocitov T. Klonska pomnožitev teh celic vodi do močnega odziva v testu blastnega preoblikovanja. Moč tega odziva pa ni vedno enaka. Odvisna je od števila spominskih celic, specifičnih za antigen, ki so v določenem trenutku na voljo. Poglavitni vsebnik teh celic so bezgavke. V krvi pa je navadno malo specifičnih krožečih spominskih celic. Krajši kot je čas od okužbe, manj takšnih celic je. Pomembno je tudi, ali je oseba s preiskovanim antigenom v stiku prvič ali ponovno. Spominske celice močno spremenijo razmere v krvi, posledica pa je zelo močan odziv *in vitro* (25, 26). Bolniki iz prve skupine sodijo med preiskovance, pri katerih so se znamenja pojavila hitro, in je bila torej inkubacijska doba kratka. Takšni bolniki so očitno imeli dovolj specifičnih limfocitov, ki smo jih lahko osamili iz krvi, in so se nato *in vitro* v navzočnosti antigena uspešno pomnožili. Podobne, celo še bolj uspešne, so ugotovitve pri drugi skupini. Z daljšanjem obdobja med trenutkom okužbe in pregledom pri zdravniku se večja verjetnost, da bodo tudi laboratorijski preskusi potrdili klinično diagnozo. Vendar pa lahko iz rezultatov, ki jih dobimo pri tretji skupini, sklepamo, da po določenem času verjetnost, da bomo še dobili odziv, postaja ponovno manjša. Za to je več vzrokov. Najbolj očiten vzrok je, da pri teh bolnikih že sam začetek bolezni ni dobro opredeljen, klinični znaki so skromno in neznačilno izraženi in od začetka bolezni je preteklo mnogo časa. Verjetnost, da

so v venski krvi ravno v trenutku odvzema specifični limfociti v veliki množini, je zato majhna. Naslednji vzrok je, da bolnik sploh ni zbolel za lymsko boreliozo, pač pa za neko drugo boleznijo, ki se kaže v določenem trenutku kot okužba z borelijo. Glede na mnoga dejstva, ki so znana in preverjena pri borelijski okužbi, pa je prav verjetno, da je razvoj bolezni nenavaden. V mnogih značilnostih namreč ne sledi klasičnim zakonitostim Kochovih postulatov. Pomanjkanje učinkovitega imunskega odziva na celični in protitelesni ravni pa je najbolj izrazito (20–24, 36, 37). Na mnogih živalskih modelih so dokazali, da umetna okužba z *B. burgdorferi* načelno sledi našim predstavam o razvoju imunskega odziva, vendar obstajajo tudi dela, ki trdijo, da se imunost pri lymski boreliozii močno razlikuje od imunosti pri drugih okužbah (38). Iz teorije o nastanku imunske tolerance namreč vemo, da so lastnosti antigena najpomembnejše za to, ali bo prišlo do učinkovitega imunskega odziva s tvorbo funkcijsko najustrežnejših protiteles in celičnega imunskega odziva ali pa do tolerance. Pri okužbi z *B. burgdorferi* se zdi, da pri naravni okužbi prevladuje zadnja možnost in da pride do zavore imunskega odziva vsaj pri polovici bolnikov.

Pri proučevanju imunskega odziva moramo vedno postaviti vprašanje, ali so metode, ki jih uporabljamo, res najustrežnejše in najučinkovitejše. Test blastnega preoblikovanja sodi med »železne teste« celične imunologije (28, 29). Teoretične osnove testa so jasne, razlaganje rezultatov, ki jih z njimi dobimo, pa je težavno. Najosnovnejša vprašanja, ki se pojavljajo, ko želimo predstaviti rezultate, so:

- ali smo izbrali najugodnejši trenutek za testiranje,
- ali smo izbrali najustrežnejšo obliko antigena,
- ali je bila predstavitev antigena zares učinkovita,
- ali smo izbrali najustrežnejšo koncentracijo,
- ali je zgradba antigena imunogena ali tolerogena,
- ali je potrebna za potek *in vitro* aktivacije sočasna vzpodbuda,
- kolikšno je minimalno število specifičnih limfocitov, ki se lahko v danem času pomnoži,
- ali je inkubacijski čas ustrezen,
- ali smo morda zamudili vrh pomnoževanja,
- ali pa smo test zaključili prehitro (30, 34).

Ko imamo rezultate, pa se sprašujemo, ali je moč *in vitro* odziva primerljiva z močjo odziva *in vivo*, ali so antigeni, ki smo jih uporabili *in vitro* isti kot antigeni, ki so pomembni *in vivo*, kaj pomeni v posameznem primeru blastno preoblikovanje – nastanek imunosti ali tolerance, in če je moč odziva majhna, ali je majhna zaradi šibkega odziva ali zaradi močne zavore. Kljub skrbnemu proučevanju navedenih vprašanj še nimamo dokončnega odgovora, posebno pa ga zapletajo raziskave imunskega odziva pri okužbi z *B. burgdorferi*. Podobno kot za celični imunski odziv lahko ugotovimo tudi za protitelesnega. Tudi ta se najpogosteje pojavlja v zgodnejših obdobjih bolezni. Smiselnost razvrščanja v skupine po kliničnih znamenjih kaže tudi dejstvo, da so bolniki iz 1. skupine imeli najboljše razmere za zdravljenje, saj so bili navadno zdravljeni le enkrat, v nasprotju z bolniki, ki so bili razvrščeni v skupine z znamenji, značilnimi za kasnejša obdobja. Pri teh so morali zdravljenje navadno večkrat ponoviti. Zanimivo je, da pogostnost pika klopa v posameznih skupinah ne predstavlja pomembnega podatka za diagnosticiranje bolezni. Bolniki so imeli bolezen ne glede na to, ali so opazili pik žuželke ali ne.

Na koncu lahko ugotovimo, da z laboratorijskimi preiskavami na imunost navadno le dopolnimo klinično diagnozo. Raziskava kaže tudi to, da se laboratorijske in klinične diagnoze bolj ujemajo v zgodnjih obdobjih lymške borelioze. S tega vidika je pomembno, da nadaljujemo s proučevanjem metodoloških problemov pri razvoju relevantnih testov, pri tem pa ne pozabimo na raznovrstnost imunskega odziva pri različnih boleznih in pri različnih povzročiteljih – antigenih. V danem trenutku je test blastnega preoblikovanja limfocitov iz venske krvi bolnikov s sumom na lymsko boreliozo ustrezen. V primerih, ko dobimo pozitiven celični imunski odziv, smo lahko prepričani, da je pri preiskovancu prišlo do učinkovitega stika med povzročiteljem bolezni in imunskimi celicami. V primerih, ko imamo izrazito klinično sliko lymške borelioze, ne pa celičnega imunskega odziva, si moramo zastaviti resno vprašanje, ali ni morda rezultat tak zaradi zaviralnega delovanja *B. burgdorferi*. V primeru, da dobimo pozitiven rezultat pri osebi, ki nima klasičnih znamenj bolezni, je lahko vzrok za imunski odziv navzkrižna reaktivnost ali pa poliklonska aktivacija, ki je posledica nespecifične spodbude imunskega sistema z borelijskimi antigeni. Kadar dobimo negativen izid preskusa na celično imunost in ima oseba izražena klinična znamenja ter navzoča specifična protitelesa, lahko to razložimo ali z zakasnitvijo celičnega imunskega odziva ali pa s tem, da je ta med potekom bolezni že usahnil. Tedaj, kadar imajo preiskovanci pozitiven rezultat testa na celični imunski odziv, ni pa protiteles, je lahko prenos signala na limfocite B zavrt, ali pa je še prezgodaj, da bi se protitelesa že ustvarila. Zanimivo razglabljanje je še, ali teče imunski odziv pri vseh preiskovancih na navaden način, ali morda v določenih okoliščinah ne pride do tega, da je ena vrsta odziva favorizirana. Malo je verjetno, da bi bila taka raznovrstnost poteka odziva posledica različne izraženosti antigenov na mikroorganizmu, čeprav tudi to ni nemogoče.

Razpravo lahko zaključimo z ugotovitvijo, da imunski odziv pri lymski boreliozni ni preprost, da je v mnogo primerih nenavaden in ne teče tako, kot smo tega navajeni pri drugih boleznih.

Sklepi

Pri osebah, ki so prišle v učinkovit stik z *B. burgdorferi*, se razvijeta celični in protitelesni imunski odziv.

Nastanek celičnega imunskega odziva pri lymski boreliozni lahko izmerimo s testom blastnega preoblikovanja limfocitov. Limfociti oseb, pri katerih se je razvil celični imunski odziv, se močneje odzovejo na večji odmerek antigena kot na manjši. Celični imunski odziv se pogosteje razvije pri osebah v skupinah 1 in 2, ki imata jasneje izražena klinična znamenja borelijske okužbe in pri katerih je preteklo manj časa od okužbe do pregleda pri zdravniku in odvzema krvi za preiskavo.

Pri polovici preiskovancev, za katere lahko iz anamneze in klinične slike sumimo, da imajo lymsko boreliozo, se celični imunski odziv ne razvije. Vzroka za zavrt imunski odziv na specifične antigene *B. burgdorferi* pri teh preiskovancih ne poznamo. V poročilih drugih raziskovalcev pa zasledimo idejo o imunosupresivnem delovanju določenih antigenov *B. burgdorferi*.

Test blastnega preoblikovanja limfocitov, spodbujenih z antigeni *B. burgdorferi*, lahko potrdi jasno klinično diagnozo, naredi dvomljivo diagnozo verjetnejšo, pri nejasni diagnozi pa opozori zdravnika na previdnost pri prehitri odločitvi, da bolnik bolezni nima. S ponovitvijo negativnega rezultata preiskave pri klinično sumljivem bolniku v nekaj tednih lahko pričakujemo nastanek celičnega imunskega odziva in protiborelijskih protiteles.

Zahvala

Zahvaljujeva se mentorju, prof. dr. Vladimirju Kotniku, dr. med., za vodenje in nasvete pri izdelavi raziskovalne naloge. Prav tako sva hvaležna Dušanu Trampužu, ki nama je izpopolnil in uresničil idejo o računalniškem programu za obdelavo podatkov.

Literatura

1. Vector-borne infections. Borrelia infections. In: Mims CA, Playfair JHL, Roitt MI, Wakelin D, Williams R, Anderson MA. *Medical microbiology*. St. Louis: Mosby. 1993; 30.6–30.8.
2. Lymška borelijoza. In: Marolt-Gomišček M, Radšel-Medvešček A. *Infekcijske bolezni*. Ljubljana: Tangram, 1992: 209–18.
3. Benjamin JL, Jiang W, Munoz P, Raymond JD, Gorevic PD. Biochemical and immunological characterization of the surface proteins of Borrelia burgdorferi. *Infect Immun* 1989; 57: 3637–45.
4. Barbour AG, Heiland RA, Howe TR. Heterogeneity of major proteins in Lyme disease. Borreliae: A molecular analysis of north American and European isolates. *J Infect Dis* 1985; 152: 478–84.
5. Norman GL, Antig JM, Bigaignon G, Hogrefe WR. Serodiagnosis of Lyme borreliosis by Borrelia burgdorferi sensu stricto, B. Garinii, and B. Afzelii Western blots (Immunoblots). *J Clin Microbiol* 1996; 34: 1732–8.
6. Bennett CE. Ticks and Lyme disease. *Adv Parasit* 1995; 36: 343–405.
7. Kramer MD, Moter SE, Hofman H, Schaible UE, Simon MM, Wallich R. Symptoms and diagnosis of Lyme borreliosis. *Dtsch Med Wochenschr* 1993; 118: 423–7.
8. Nadelman RB, Wormser GP. Erythema migrans and early Lyme disease. *Am J Med* 1995; 98: 158–238.
9. Feder HM, Gerber MA, Krause PJ, Ryan R, Shapiro ED. Early Lyme disease: a flu-like illness without erythema migrans. *Pediatrics* 1993; 91: 456–9.
10. Ilowite NT. Muscle, reticuloendothelial, and late skin manifestations of Lyme disease. *Am J Med* 1995; 98: 638–88.
11. Pachner AR. Early disseminated Lyme disease: Lyme meningitis. *Am J Med* 1995; 98: 308–78.
12. Cinco M, Murgia R, Ruscio M, Andriolo B. IgM and IgG significant reactivity to Borrelia burgdorferi sensu stricto, Borrelia garinii and Borrelia afzelii among Italian patients affected by Lyme arthritis or neuroborreliosis. *FEMS Immunol Med Mic* 1996; 14: 159–66.
13. Steere AC. Musculoskeletal manifestations of Lyme disease. *Am J Med* 1995; 98: 448–88.
14. Paparone PW. Polymyalgia rheumatica or Lyme disease? How to avoid misdiagnosis in older patients. *Postgrad Med* 1995; 97: 167–70.
15. Kamradt T, Krause A, Burmester GR. A role for T cells in the pathogenesis of treatment-resistant Lyme arthritis. *Mol Med* 1995; 1: 486–90.
16. Curtin SM, Pennington TH. The diagnosis of Lyme disease. *J Roy Soc Med* 1995; 88: 248–50.
17. Schneider E. Diagnosis of Lyme borreliosis. *Versicherungsmedizin* 1995; 47: 75–9.
18. Wilske B. Diagnosis of Borrelia burgdorferi infection. *Internist* 1995; 36: 114–9.
19. Chary Valckenaere I, Jaulhac B, Monteil H, Pourel J. Diagnosis of Lyme disease. Current difficulties and prospects. *Rev Rhum Engl ed* 1995; 62: 271–80.
20. Anda P, Rodriguez I, Loma A, Fernandez MV, Lozano A. A serological survey and review of clinical Lyme borreliosis in Spain. *Clin Infect Dis* 1993; 16: 310–9.

21. Kotnik V, Ružič E, Cimperman J, Kotnik A. Cellular immune response to *Borrelia burgdorferi* antigens. *Giorn Malt Infet Prarassit* 1993; 45: 420–3.
22. Chiao JW. Antigens of Lyme disease of spirochaete *Borrelia burgdorferi* inhibits antigen or mitogen-induced lymphocyte proliferation. *FEMS Immun Med Mic* 1994; 8: 151–6.
23. Callister SM, Schell RF, Lovrich SD, Jobe DA. Lyme disease: laboratory diagnosis and serologic testing. *Endeavour* 1994; 18: 80–4.
24. Golightly MG. Laboratory considerations in the diagnosis and management of the Lyme borreliosis. *Am J Clin Pathol* 1993; 99: 168–74.
25. Magnarelli LA. Current status of laboratory diagnosis for Lyme disease. *Am J Med* 1995; 98: 108–28.
26. Vozelj M. *Imunologija*. Ljubljana: DZS 1996.
27. Roitt MI, Brostoff J, Male D. *Immunology*. London: Mosby. 1996.
28. Malovrh T, Kotnik V. Funkcijska zmožnost limfocitov T-celična imunost. *Vet Nov* 1995; 2: 44–7.
29. Kotnik V, Vozelj M. Test blastnega preoblikovanja limfocitov – metoda za določanje funkcijske zmožnosti limfocitov T. *Med Razgl* 1981; 20: 33–9.
30. Bradley LM. Cell proliferation. In: Mishell BB, Shiigi SM. *Selected methods in cellular immunology*. New York: W H Freeman and company, 1980: 153–74.
31. Kotnik V, Vozelj M. Specifični celični imunski odziv: ali preskus blastnega preoblikovanja limfocitov s PPD in tuberkulinski test merita iste pojave. *Zdrav Vestn* 1983; 52: 491–3.
32. Kotnik V, Vozelj M. Correlation of the blast transformation of isolated and non isolated lymphocytes from venous blood. *Period biol* 1983; 85: 247–8.
33. Banič S, Kotnik V, Markič D. Stimulatory effect of Vitamin C on the development of cell-mediated immunity in persons vaccinated with human diploid vaccine. *AAMJ* 1994; 3: 31–7.
34. Viljanen MK, Eskola J. PPD-induced lymphocyte transformation in vitro using whole blood. *Clin Immunol Immunop* 1977; 8: 28–33.
35. Feder HM, Whitaker DL. Misdiagnosis of erythema migrans. *Am J Med* 1995; 99: 412–9.
36. Kotnik V, Vozelj M. Zmanjšanje imunske zmožnosti pri nekaterih boleznih, merjene s preskusom blastnega preoblikovanja limfocitov. *Zdrav Vestn* 1979; 48: 451–4.
37. Kotnik V. Primarna imunska odpoved. In: *Sodobna farmakoterapija*. Portorož: Slovensko farmacevtsko društvo, 1994: 7–16.
38. Philipp MT, Johnson BJ. Animal models of Lyme disease: pathogenesis and immunoprophylaxis. *Trends Mic* 1994; 2: 431–7.