

Metoda Western blot jako niezbędny etap diagnostyki serologicznej w kierunku boreliozy z Lyme

Western blot method as a necessary step of serodiagnosis of Lyme disease

Jacek Noworyta, Maja Machcińska, Maria Brasse-Rumin, Jakub Ząbek, Jolanta Gago

Zakład Mikrobiologii i Serologii Instytutu Reumatologii im. prof. dr hab. med. Eleonory Reicher w Warszawie

Słowa kluczowe: borelioza z Lyme, potwierdzanie przeciwciał, krzyżowa reaktywność.

Key words: Lyme borreliosis, confirmation of antibodies, cross-reactivity.

Streszczenie

Wstęp: Z uwagi na różnorodność objawów klinicznych choroby z Lyme i ich późniejsze konsekwencje zdrowotne diagnostyka serologiczna boreliozy wymaga bezwzględnego potwierdzenia obecności swoistych przeciwciał. Zastosowanie jedynie skriningowej metody ELISA, bardzo czułej, ale niezbyt swoistej, często może dawać wyniki fałszywie dodatnie. Dopiero użycie zdecydowanie bardziej swoistej metody Western blot, opartej na wykrywaniu przeciwciał klasy IgG i IgM dla antygenów rekombinowanych *Borrelia burgdorferi*, znacznie zwiększa wiarygodność diagnozy.

Materiał i metody: Badaniami objęto 354 surowice dodatnie w teście skriningowym ELISA na obecność przeciwciał klasy IgG i/lub IgM przeciwko *B. burgdorferi*. Wyniki były weryfikowane metodą Western blot, w której zostały zastosowane swoiste rekombinowane antygeny.

Wyniki: Uzyskane wyniki znacznie różniły się w zależności od potwierdzonej klasy przeciwciał. W klasie IgG uzyskano potwierdzalność w 79,4% surowic, w klasie IgM – zaledwie w 34,2% (ryc. 1). W obu klasach przeciwciał (IgG i IgM) uzyskano korelację odsetka przeciwciał dla *Borrelia* potwierdzonych metodą Western blot z ich poziomem określonym metodą ELISA (ryc. 2). Szczegółowa analiza wykazała, że w klasie IgG najczęściej występowały przeciwciała przeciwko rekombinowanemu antygenowi VlsE (96,9%), a w klasie IgM przeciwko antygenowi OspC (96,8%) genogatunków *B. garinii* i *B. afzelii* (ryc. 3).

Wnioski: Wyniki poddano szerokiej dyskusji w aspekcie użyteczności w diagnostyce i określenia etapu ewentualnego zakażenia *B. burgdorferi*, a także przyczyn niskiego (zwłaszcza w klasie IgM) potwierdzania wyników dodatnich uzyskanych w metodzie skriningowej ELISA.

Summary

Introduction: Concerning the variety of clinical symptoms of Lyme disease, and their subsequent health consequences, serological diagnosis of Lyme disease requires an absolute confirmation of the presence of specific antibodies. The only use of the screening ELISA test, very sensitive but not specific, may lead to false-positive results. Use of the much more specific Western blot method, based on recombinant *B. burgdorferi* antigens, increases the reliability of diagnosis.

Material and methods: The study included 354 positive sera in the ELISA screening test for the presence of IgG and/or IgM anti-*B. burgdorferi* antibodies. Positivity of sera was confirmed by Western blot, with specific recombinant antigens.

Results: The results varied significantly depending on the confirmed class of antibodies. The presence of specific antibodies against *B. burgdorferi* was confirmed in about 79.4% of positive sera in ELISA for IgG class and in 34.2% for IgM class (Fig. 1). In both classes of antibodies (IgG and IgM), a correlation between the percentage of anti-*Borrelia* antibodies confirmed by Western blot and their level in the ELISA test was found (Fig. 2). Detailed analysis showed that the most common antibodies to recombinant antigens were VlsE (96.9%) in IgG class and OspC (96.8%) for genospecies of *B. garinii* and *B. afzelii* in IgM class (Fig. 3).

Conclusions: The results were discussed regarding usefulness in the diagnosis and determination of the stage of possible infection of *B. burgdorferi*. The reasons for the low (especially in IgM class) confirmation of positive results obtained in the ELISA screening method were also discussed.

Adres do korespondencji:

dr n. biol. Jacek Noworyta, Zakład Mikrobiologii i Serologii, Instytut Reumatologii im. prof. dr hab. med. Eleonory Reicher, ul. Spartańska 1, 02-637 Warszawa, tel. +48 22 844 42 41 wew. 413, 386, e-mail: jacek.noworyta@ir.ids.pl

Praca wpłynęła: 24.05.2012 r.

Wstęp

Choroba z Lyme jest szeroko opisywana w aspekcie etiologii, epidemiologii, patogenezы [1, 2], występujących objawów klinicznych [3–5], diagnostyki laboratoryjnej [1, 6, 7], a nawet profilaktyki i szczepień ochronnych.

Przejawia się ona różnorodnością objawów klinicznych, do których należą: zmiany skórne, zaburzenia mięśniowo-szkieletowe, objawy neurologiczne, objawy chorobowe ze strony układu limfatycznego, mięśnia sercowego, zapalenie oka, wątroby, płuc, nerek. W diagnostyce klinicznej wielonarzędowość objawów choroby utrudnia różnie klasyfikowana etapowość choroby. Steere [3] wyróżnia trzy etapy choroby z Lyme. Dla etapu 1. charakterystyczny jest rumień wędrujący (*erythema migrans* – EM). Po nim może następować etap 2., z objawami ze strony układu nerwowego (objawy neurologiczne, np. zespół Bujadoux-Bannwartha). Wystąpienie zapalenia stawów (*Lyme arthritis*) to 3. etap choroby z Lyme.

Asbrink [8] zmodyfikował ten podział na fazę wczesnej i późnej infekcji. Wczesna infekcja charakteryzuje się wyraźnie zlokalizowanym rumieniem (EM), po którym w ciągu kilku dni lub tygodni infekcja się rozszerza, zwłaszcza jeśli nie jest leczona. Objawy dotyczą różnych narządów i układów, pojawiają się okresowo w ciągu kilku tygodni lub miesięcy. Późna infekcja wyrażająca się zapaleniem stawów (*Lyme arthritis*) lub przewlekłym zanikowym zapaleniem skóry (*acrodermatitis chronica atrophicans* – ACA) występuje po roku, a nawet po kilku latach od początku choroby. Pacjent z chorobą z Lyme może przechodzić wszystkie etapy choroby lub tylko jeden z etapów. Początkowo choroba może przebiegać bezobjawowo.

O ile w Stanach Zjednoczonych drobnoustroj związany z chorobą z Lyme jest prawie wyłącznie ograniczony do *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, o tyle w Europie występują także inne genogatunki, takie jak: *Borrelia garinii*, *Borrelia afzelii* i *Borrelia spielmanii* [9]. Mikrobiologiczna diagnoza pacjentów europejskich musi zatem uwzględniać heterogenność rodzaju *Borrelia*.

Poza diagnostyką kliniczną opartą na wiarygodnym i rzetelnie przeprowadzonym wywiadzie, znaczenie diagnostyczne mają również metody hodowlane (płyn mózgowo-rdzeniowy, płyn stawowy) [10] oraz łańcuchowa reakcja polimerazy (*polymerase chain reaction* – PCR) [11, 12]. Są to jednak metody trudne oraz pracochłonne i mogą być wykonywane tylko w wyspecjalizowanych laboratoriach, dlatego najprostszym rozwiązaniem jest zastosowanie bardzo czułych, a jednocześnie najbardziej swoistych metod serodiagnostyki [6]. Należy do nich immunoblotting oparty na zastosowanych w nim antygenach rekombinowanych w odpowiednich ilościach, które nie zostałyby zdominowane przez wspólne antygeny, np. HSP (*heat shock proteins*). Trzeba również pamiętać, że wyniki serologiczne zależą nie

tylko od etapu choroby, lecz także od czasu trwania zakażenia i ewentualnie uprzednio zastosowanej terapii antybiotykowej [13–15].

Celem przedstawianych retrospektywnych badań była analiza potwierdzonych dodatnich wyników badań serologicznych na obecność przeciwciał dla czterech genogatunków *Borrelia burgdorferi*, tj. *Borrelia sensu stricto*, *Borrelia garinii*, *Borrelia afzelii* i *Borrelia spielmanii*, uzyskanych skринingową metodą ELISA w surowicach pacjentów. U pacjentów z podejrzeniem choroby z Lyme i niesklasyfikowanymi zapaleniami stawów, potwierdzenie seropozytywności i korelacja z objawami klinicznymi może skłaniać klinicystę do ukierunkowania diagnozy i zastosowania terapii antybiotykowej, zalecanej w przypadkach boreliozy.

Materiał i metody

Materiałem wykorzystywanym do badań były surowice pacjentów hospitalizowanych w Instytucie Reumatologii w Warszawie od stycznia 2010 r. do kwietnia 2011 r. Badaniom poddano surowice, w których wcześniej za pomocą skринingowej metody immunoenzymatycznej (ELISA) wykryto przeciwciała dla badanych drobnoustrojów.

Dołki płytek testu skринingowego *Borrelia Elisa* (*Biomedica Medizinprodukte*) optaszczone były następującymi antygenami rekombinowanymi:

- p21 = OspC (zewnętrzne białko powierzchniowe C – *B. afzelii*, stem Pko),
- p21 = OspC (zewnętrzne białko powierzchniowe C – *B. garinii*, stem 20047),
- p41/1 (wewnętrzny fragment flagelliny *B. garinii*, stem PBi),
- VlsE (białko fuzyjne różnych genogatunków).

Obecność swoistych przeciwciał klasy IgG dla *Borrelia burgdorferi* weryfikowano w 30 surowicach dzieci oraz w 67 surowicach dorosłych. W klasie IgM przebadano 123 surowice dzieci oraz 134 surowice dorosłych.

Materiałem kontrolnym dla badanych surowic były surowice zdrowych dawców krwi, w których weryfikowano obecność swoistych przeciwciał dla badanych drobnoustrojów, wykrytych wcześniej metodą ELISA. Krew pochodziła z Regionalnego Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Warszawie od osób w wieku 18–65 lat. Dawcy wyrazili zgodę na pobranie krwi do badań. Obecność swoistych przeciwciał dla *Borrelia burgdorferi* w klasie IgG potwierdzano w 2 surowicach zdrowych dawców krwi, a w klasie IgM – w 9 surowicach.

W celu potwierdzenia swoistości przeciwciał wykrytych metodami immunoenzymatycznymi stosowano metodę immunoblotting. Używano testu *recomLine Borrelia* (*Mirogen Diagnostik*), w którym na paskach nitrocelulozowych optaszczone były, charakterystyczne dla *Borrelia burgdorferi*

sensu stricto, *Borrelia garinii*, *Borrelia afzelii* i *Borrelia spielmanii*, następujące antygeny rekombinowane:

- p100 – białko ściany komórkowej; prawdopodobnie związane z rzęską, pochodzące od *B. afzelii*,
- VlsE – (*Variable like sequence Expressed*), lipoproteina powierzchniowa, białko fuzyjne, reprezentujące immunodominanty epitopowe VlsE różnych gatunków *Borrelia*,
- p58 – antygen nieokreślony, swoisty dla *Borrelia*, pochodzący od *B. garinii*,
- p41 – białko flagelina (rzęskowe) – pochodzące od *B. burgdorferi sensu stricto*,
- p39 – antygen BmpA (*Borrelial membrane protein A*) pochodzący od *B. afzelii*,
- OspA (*Outer surface protein A*) – białko pochodzące od *B. afzelii*,
- OspC (*Outer surface protein C*) – białko pochodzące od *B. sensu stricto*, *B. afzelii*, *B. garinii* i *B. spielmanii*,
- p18 – inaczej *Decorin binding protein A* (DbpA), białko powierzchniowe pochodzące od *B. sensu stricto*, *B. afzelii*, *B. garinii* i *B. spielmanii*.

Wyniki

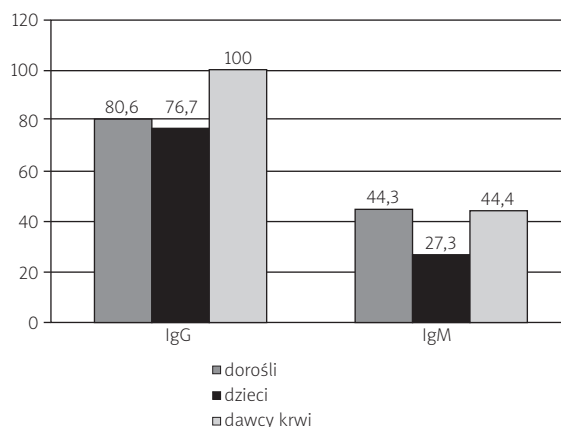
Wykonano szczegółową analizę potwierdzania obecności swoistych przeciwciał dla *Borrelia burgdorferi*, które wykrywano skринingową metodą ELISA u pacjentów diagnozowanych w kierunku reaktywnych zapaleń stawów i niesklasyfikowanych zapaleń stawów o podejrzewanej etiologii infekcyjnej.

Potwierdzalność metodą Western blot dodatnich surowic otrzymanych metodą ELISA dla *Borrelia burgdorferi* w klasie IgG była większa niż w klasie IgM. Porównywalne odsetki wyników dodatnich w klasie IgG potwierdzono u dzieci (76,7%) i u dorosłych (80,6%). W klasie IgM więcej wyników dodatnich potwierdzono u dorosłych (44,3%) niż u dzieci (27,3%) (ryc. 1). Łącznie, u dorosłych i dzieci, potwierdzalność przeciwciał w klasie IgG (79,4%) była większa niż w klasie IgM (34,2%).

W grupie kontrolnej dodatnie wyniki uzyskane w metodzie ELISA dla *Borrelia burgdorferi* w klasie IgG potwierdzono w 100%, a w klasie IgM w 44,4% surowic (ryc. 1).

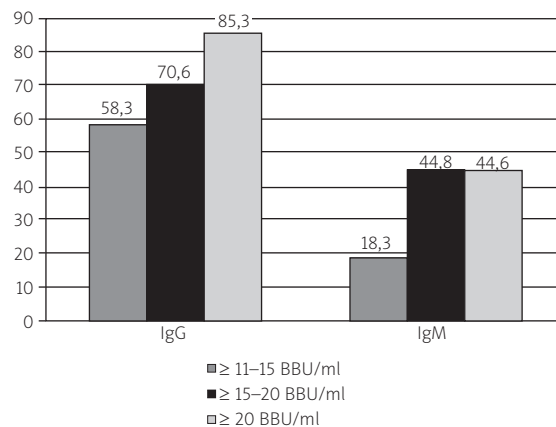
Szczegółowa analiza wykazała zależność potwierdzania swoistości przeciwciał dla *Borrelia burgdorferi* z ich poziomem oznaczonym w badaniu metodą ELISA. Poziom przeciwciał określano w przedziałach: słabo dodatni (≥ 11 –15 BBU/ml), średni (≥ 15 –20 BBU/ml) oraz wysoki (≥ 20 BBU/ml). Łącznie, we wszystkich przebadanych surowicach (dzieci i dorośli) wyniki słabo dodatnie w ELISA potwierdzono testem Western blot w klasie IgG w 58,3%, średnie w 70,6%, a wysokie w 85,3% surowic. W klasie IgM wyniki słabo dodatnie w ELISA potwierdzono testem Western blot w 18,3%, średnie w 44,8%, a wysokie w 44,6% surowic (ryc. 2).

Następnie dokonano analizy występowania przeciwciał klasy IgG i IgM dla poszczególnych antygenów rekombinowanych (ryc. 3). W klasie IgG najczęściej wykrywano przeciwciała dla antygeny VlsE (96,9%), p41 (80,3%) i p18



Ryc. 1. Odsetek potwierdzonych metodą Western blot dodatnich surowic na obecność przeciwciał klasy IgG i IgM dla *Borrelia burgdorferi* wykrytych metodą ELISA.

Fig. 1. The percentage of positive sera (in IgG and IgM class) of *Borrelia burgdorferi* detected by ELISA and confirmed by Western blot.

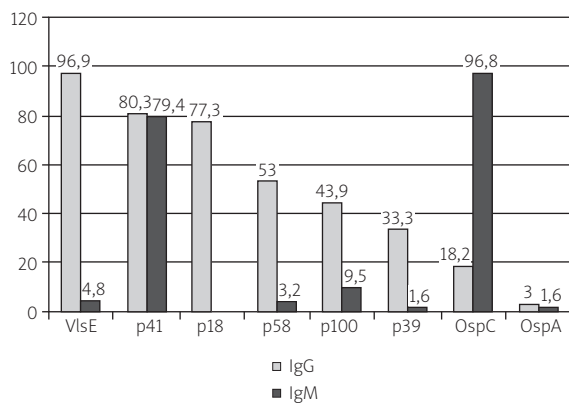


Ryc. 2. Odsetek potwierdzonych metodą Western blot swoistych przeciwciał klasy IgG i IgM dla *Borrelia burgdorferi* w surowicach dodatnich w metodzie ELISA (dane przedstawione łącznie dla dzieci i dorosłych z uwzględnieniem poziomu przeciwciał (BBU/ml) oznaczonego metodą ELISA).

Fig. 2. The percentage of specific antibodies (IgG and IgM class) of *Borrelia burgdorferi* detected by ELISA and confirmed by Western blot (data presented in total for both children and adults with the level of antibodies (BBU/ml) marked by ELISA).

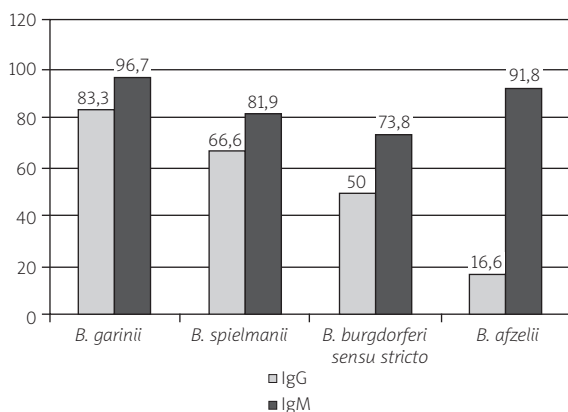
(77,3%). W klasie IgM zdecydowanie najczęściej swoiste przeciwciała potwierdzono dla antygeny OspC (96,8%) oraz p41 (79,4%).

W zastosowanym teście zarówno antygen OspC, jak i p18 są rozdzielone na podjednostki charakterystyczne dla poszczególnych patogennych genogatunków (*B. afzelii*, *B. garinii*, *B. sensu stricto* i *B. spielmanii*). W klasie IgG przeciwciała dla antygeny OspC potwierdzano w niewielkim odsetku (18,2%) (ryc. 3). Dominowały tutaj przeciwciała dla antyge-



Ryc. 3. Odsetek swoistych przeciwciał klasy IgG i IgM dla poszczególnych antygenów *Borrelia burgdorferi* wykrytych metodą Western blot.

Fig. 3. The percentage of specific antibodies (IgG and IgM class) of *Borrelia burgdorferi* antigens detected by Western blot.



Ryc. 4. Odsetek swoistych przeciwciał klasy IgG i IgM dla antygeny OspC dla poszczególnych genogatunków *Borrelia burgdorferi* wykrytych metodą Western blot.

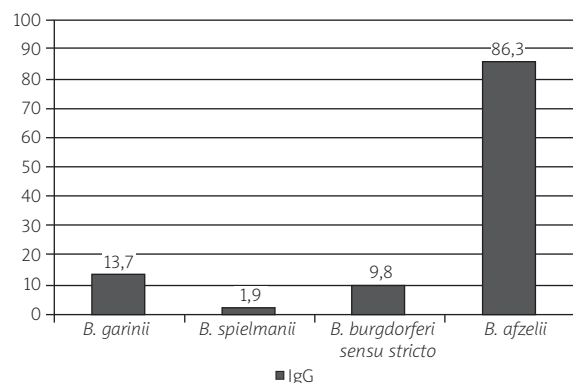
Fig. 4. The percentage of specific antibodies (IgG and IgM class) of OspC antigen for different *Borrelia burgdorferi* genospecies which were detected by Western blot.

nu swoistego dla *B. garinii* (83,3%), następnie dla *B. spielmanii* (66,6%) oraz dla *B. burgdorferi sensu stricto* (50%) (ryc. 4). W klasie IgM najczęściej potwierdzano przeciwciała dla *B. garinii* (96,7%) oraz *B. afzelii* (91,8%). Przeciwciała dla antygeny p18 potwierdzono jedynie w klasie IgG. Najczęściej (86,3%) wykrywano przeciwciała dla genogatunku *B. afzelii* (ryc. 5).

Dyskusja

W ustaleniu rozpoznania boreliozy bardzo ważna jest dwustopniowa diagnostyka serologiczna. Weryfikowanie testem Western blot dodatnich wyników uzyskanych skринingową metodą ELISA staje się obligatoryjne, głównie z uwagi na różnorodność objawów klinicznych występujących na poszczególnych etapach choroby. Uzyskane wyniki w badaniach diagnostyki serologicznej mają zatem szczególne znaczenie w podejmowaniu decyzji o zastosowaniu terapii antybiotykowej [8, 14, 15].

Diagnostyka serologiczna boreliozy jest często związana zarówno z etapem choroby, jak i z sytuacją epidemiologiczną. Na danym terenie można się spodziewać dominacji jednego z kilkunastu patogennych genogatunków krętka *Borrelia burgdorferi sensu lato*. Badania epidemiologiczne wskazują, że w Europie najczęściej występują 4 genogatunki: *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia garinii*, *Borrelia afzelii* i *Borrelia spielmanii* [9], w odróżnieniu np. od Stanów Zjednoczonych, gdzie opisuje się głównie *B. burgdorferi sensu stricto*. Z tego powodu w przedstawianych badaniach używano testu *recomLine Borrelia*, w którym stosuje się m.in. antygeny rekombinowane potwierdzające swoistość przeciwciał klasy IgG i IgM dla ww. genogatunków.



Ryc. 5. Odsetek swoistych przeciwciał klasy IgG dla antygeny p18 dla poszczególnych genogatunków *Borrelia burgdorferi* wykrytych metodą Western blot.

Fig. 5. The percentage of specific antibodies (IgG class) of p18 antigen for different *Borrelia burgdorferi* genospecies which were detected by Western blot.

W przedstawianych badaniach dotyczących potwierdzenia swoistości przeciwciał dla *B. burgdorferi* wykrywanych skринingową metodą ELISA wykazano, że zdecydowanie częściej (ok. 80%) potwierdzano wyniki dodatnie w klasie IgG. W klasie IgM potwierdzono stosunkowo niski odsetek surowic od dorosłych (44,3%) oraz od dzieci (27,3%). Wyniki te dowodzą, jak bardzo istotne jest wykonywanie testów Western blot, które dzięki wysokiej swoistości eliminują wyniki fałszywie dodatnie [6]. Błędne rozpoznanie boreliozy powoduje bowiem częste stosowanie niepotrzebnej długotrwałej (3–4 tygodnie) antybiotykoterapii. Fałszywie dodatnie wyniki, świadczące głównie o reakcjach krzyżowych, mogą być odzwierciedleniem innych infekcji, np. krętkiem *Treponema pallidum* [16], *Leptospira* spp., *Borrelia recurrentis* [17], Gram-dodatnimi *Bacillus subtilis* [18], wirusem Epsteina-Barr, ale także różnymi drobnoustrojami z rodziny *Enterobacteriaceae*.

Na częstość występowania fałszywie dodatnich wyników może wpływać także hipergammaglobulinemia, zwłaszcza w przebiegu chorób autoimmunologicznych, których objawy kliniczne, takie jak zapalenie i bóle stawów czy zaburzenia neurologiczne, mogą przypominać boreliozę.

Fałszywie ujemne wyniki mogą się pojawiać w przypadku defektu układu immunologicznego pacjenta, obecności swoistych niezdysonocjonowanych kompleksów immunologicznych zawierających niewykrywalne przeciwciała dla *B. burgdorferi* czy w wyniku lokalnej produkcji przeciwciał (w płynie stawowym, płynie mózgowo-rdzeniowym) [6, 19, 20]. Obecne przeciwciała mogą pozostać niewykryte również w przypadku, kiedy krętek *B. burgdorferi* przebywa wewnątrz komórki i po zastosowaniu antybiotykoterapii w początkowym stadium choroby. Należy pamiętać, że przeciwciała dla *B. burgdorferi* powstają w organizmie człowieka po upływie 4–8 tygodni od zakażenia, dlatego zbyt wczesne wykonanie badania może dać wynik fałszywie ujemny.

W przedstawianych badaniach spodziewano się użyć korelację odsetka przeciwciał dla *Borrelia* klasy IgG i IgM potwierdzonych metodą Western blot z ich poziomem określonym metodą ELISA. W obu klasach przeciwciał (IgG i IgM) potwierdzono tę zależność. Im wyższy poziom przeciwciał oznaczono w badaniu metodą ELISA, tym obserwowano wyższy odsetek surowic z potwierdzonymi wynikami metodą Western blot. W klasie IgM potwierdzalność była wyraźnie wyższa w surowicach z uprzednio stwierdzonym średnim oraz wysokim poziomem przeciwciał (≥ 16 BBU/ml).

Analiza wyników dotyczących wykrywania przeciwciał klasy IgM i IgG przeciwko poszczególnym rekombinowanym antygenom *B. burgdorferi* i jego patogennym genogatunkom potwierdziła dane z piśmiennictwa [21]. Podkreśla się, że w klasie IgG, świadczącej przeważnie o dawnej infekcji, indukowane są najczęściej przeciwciała dla jednego lub więcej z następujących antygenów: p100, VlsE, p58, p39 i p18. Prze-

ciwiała dla VlsE uważa się za wczesny marker odpowiedzi w klasie IgG. Przeciwciała dla antygenów OspA wykrywane są zaś bardzo rzadko. Dane te znajdują odzwierciedlenie w przedstawianych wynikach, gdzie w klasie IgG najczęściej potwierdzano obecność przeciwciał dla antygenów: VlsE (96,9%), p41 (80,3%), p18 (77,3%) oraz p58 (53%), p100 (43,9%) i p39 (33,3%), a najrzadziej dla OspA (3%).

Zastosowany test *recomLine Borrelia* umożliwił oznaczenie przeciwciał klasy IgG dla homologów antygenów p18 czterech patogennych genogatunków. Okazało się, że zdecydowanie najczęściej wykazano przeciwciała dla gatunku *B. afzelii* (86,3%), który mógł być dominującym genogatunkiem we wczesnej odpowiedzi IgG, sugerującej nierzadko początkowy etap neuroboreliozy [21]. Odmienne wyniki uzyskano w badaniach przeciwciał dla homologów antygenów OspC czterech genogatunków w klasie IgG. Najczęściej wykazano odpowiedź dla *B. garinii* (83,3%), następnie dla *B. spielmanii* (66,6%) i *B. burgdorferi sensu stricto* (50%), natomiast najrzadziej dla *B. afzelii* (16,6%). Podobna analiza przeciwciał klasy IgM dla homologów antygenów OspC genogatunków wykazała dość wyrównane, wysokie ich odsetki, z nieznaczną przewagą *B. garinii* (96,7%) i *B. afzelii* (91,8%).

Należy nadmienić, że w klasie IgM przeciwciała dla antygenów OspC (96,8%) występowały najczęściej wspólnie z przeciwciałami dla antygenów p41 (79,4%) i – jak opisuje się w piśmiennictwie [21] – są one charakterystyczne dla wczesnej fazy infekcji *Borrelia burgdorferi*, tj. dla rumienia wędrującego i neuroboreliozy. Być może wykryta w badaniach niska potwierdzalność przeciwciał klasy IgM dla *B. burgdorferi* (łącznie dla dzieci i dorosłych w 34,2% surowic), wynikała z tego, że surowice nie pochodziły od pacjentów z powyższymi objawami, a najprawdopodobniej głównie z zapaleniem stawów.

Przedstawione wyniki w pełni potwierdziły wcześniejsze spostrzeżenia i sugestie wskazujące na przewagę swoistych przeciwciał dla odpowiednich rekombinowanych antygenów i niektórych ich homologów genogatunku w aspekcie etapu i/lub objawów klinicznych zakażenia *B. burgdorferi* [21].

Oceniając badania potwierdzające swoistości wyników dodatnich w metodzie skринingowej ELISA (*recomWell Borrelia*) i Western blot (test *recomLine Borrelia*), z dużym prawdopodobieństwem można wykluczyć krzyżową reaktywność przeciwciał (np. *Treponema pallidum*, *Borrelia* spp. innych niż *B. burgdorferi*, *Leptospira* spp.) z uwagi na selektywne zastosowanie rekombinantów antygenów *B. burgdorferi*. Nie można jednak wykluczyć nieswoistej, poliklonalnej stymulacji limfocytów B, prowadzącej do indukcji przeciwciał, zwłaszcza klasy IgM, w czasie infekcji wirusem Epsteina-Barr. Wiadomo, że nosicielstwo tego wirusa w populacji jest powszechne (może nawet sięgać 98%), a prawdopodobieństwo wykrycia przeciwciał klasy IgM dla *Borrelia* w czasie rozwijającej się infekcji mononukleozy zakaźnej jest duże.

Niezwykle istotna jest korelacja wyników badań serologicznych z obrazem klinicznym. Interesujące dane przedstawiają producenci testu *recomLine Borrelia*, którzy wykonali badania potwierdzające na grupie 116 surowic pacjentów z południa Niemiec, z dobrze klinicznie udokumentowaną boreliozą z Lyme. Okazało się, że w przypadku stwierdzonego zapalenia stawów przeciwciała w klasie IgG potwierdzono w 96% wyników dodatnich, a w klasie IgM – zaledwie w 21%, natomiast przy wystąpieniu objawów neurologicznych (neuroborelioza) przeciwciała w klasie IgG potwierdzono w 83%, a w klasie IgM w 51% wyników dodatnich. W przypadku objawów skórnych (*erythema migrans*) odwrotnie – w klasie IgM potwierdzono w 71%, a w klasie IgG – w 43% wyników dodatnich na obecność przeciwciał dla *B. burgdorferi*. Badania niemieckie na 200 surowicach zdrowych dawców krwi wykazały potwierdzalność przeciwciał w klasie IgG w 10,5%, a w klasie IgM zaledwie w 2,5% surowic.

Wnioski

1. Uzyskane wyniki w dużej mierze wskazują na krzyżową reaktywność przeciwciał anty-*Borrelia* wykrytych metodą ELISA oraz znaczny odsetek występowania wyników fałszywie dodatnich.
2. Zaskakująco niska potwierdzalność obecności swoistych przeciwciał (zwłaszcza klasy IgM) dla *B. burgdorferi* nakazuje bezwzględne stosowanie dwustopniowej diagnostyki serologicznej (ELISA + Western blot) w kierunku wykrywania zakażeń wywołanych przez ten drobnoustrój.
3. Istnieje możliwość występowania przeciwciał dla *Borrelia* w krążących kompleksach immunologicznych (CIC), co może być powodem niewykrywania ich metodą Western blot.
4. Potrzebna jest ścisła korelacja uzyskanych wyników serologicznych z obrazem klinicznym i wywiadem epidemiologicznym wskazującym na ułtucie przez kleszcza potencjalnie zakażonego krętkiem.

Autorzy deklarują brak konfliktu interesów.

Piśmiennictwo

1. Schnarr S, Franz JK, Krause A, et al. Lyme borreliosis. *Best Pract Res Clin Rheum* 2006; 20: 1099-1118.
2. Zajkowska J. Transmisja i krążenie patogenów odkleszczowych (KZM i boreliozy) i rola zmieniającego się środowiska. *Przegl Epidemiol* 2010; 64: 525-531.
3. Steere AC, Coburn J, Glickstein L. The emergence of Lyme disease. *J Clin Invest* 2004; 113: 1093-1101.
4. Steere AC, Bartenhagen NhH, Draft IE, et al. The early clinical manifestations of Lyme disease. *Ann Intern Med* 1983; 99: 76-82.
5. Marques A. Chronic Lyme disease: a review. *Infect Dis Clin North Am* 2008; 22: 341-360.
6. Chmielewski T, Tylewska-Wierzbanska S. Borelioza z Lyme, laboratoryjne metody rozpoznania zakażenia. *Diagn Lab* 2007; 14: 5-7.
7. Witecka-Knysz E, Klimczak M, Lakwa K i wsp. Borelioza: dlaczego diagnostyka jest taka trudna. *Diagnosta Lab* 2007; 13: 11-13;
8. Asbrink E, Hovmark A. Early and late cutaneous manifestations of Ixodes – borne borreliosis (erythema migrans borreliosis, Lyme borreliose). *Ann N Y Acad Sci* 1988; 4-5.
9. Richter D, Schlee DB, Algoter R, et al. Relationships of a novel Lyme disease spirochete, *Borrelia spielmani* sp. nov. with its hosts in Central Europe. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70: 6414-6419.
10. Wormser GP, Bittker S, Cooper D, et al. Yield of large-volume blood cultures in patients with early Lyme disease. *J Infect Dis* 2001; 184: 1070-1072.
11. Nocton JJ, Dressler F, Rutledge BJ, et al. Detection of *Borrelia burgdorferi* DNA by polymerase chain reaction in synovial fluid from patients with Lyme arthritis. *New Engl J Med* 1994; 330: 229-234.
12. Schmidt BL. PCR in laboratory diagnosis of human *Borrelia burgdorferi* infections. *Clin Microbiol Rev* 1997; 10: 185-201.
13. Robertson J, Guy E, Andrews N, et al. A European multicenter study of immunoblotting in serodiagnosis of Lyme borreliosis. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 2097-2102.
14. Dinser R, Jendro MC, Schnarr S, et al. Antibiotic treatment of Lyme borreliosis: what is the evidence? *Ann Rheum Dis* 2005; 64: 519-523.
15. Borg R, Dotevall L, Hagberg L, et al. Intravenous ceftriaxone compared with oral doxycycline for the treatment of Lyme neuroborreliosis. *Scand J Infect Dis* 2005; 37: 449-454.
16. Coleman JL, Benach JL. Identification and characterization of an endoflagellar antigen of *Borrelia burgdorferi*. *J Clin Invest* 1989; 84: 322-330;
17. Bruckbauer HR, Preac-Mursic V, Fuchs R, et al. Cross-reactive proteins of *Borrelia burgdorferi*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1992; 11: 224-232.
18. Wallich R, Moter SE, Simon MM, et al. The *Borrelia burgdorferi* flagellum – associated 41-kilodalton antigen (flagellin): molecular cloning, expression, and amplification of the gene. *Infect Immun* 1990; 58: 1711-1719.
19. Schutzer SE, Coyle PK, Belman AL, et al. Sequestration of antibody to *Borrelia burgdorferi* in immune complexes in seronegative Lyme disease. *Lancet* 1990; 335: 312-315.
20. Miąskiewicz K, Walczak E, Rogulska K i wsp. Propozycja nowego podejścia metodycznego i interpretacji wyników oznaczania przeciwciał przeciwko *Borrelia burgdorferi* – analiza składu przeciwciałowego krążących kompleksów immunologicznych. *Reumatologia* 2011; 49: 1-7.
21. Wilske B, Preac-Mursic V, Fuchs R, et al. Immunodominant proteins of *Borrelia burgdorferi*: implications for improving serodiagnosis of Lyme borreliosis. In: *New Antibacteriological Strategies Neu HC* (ed.). Churchill Livingstone, London 1990; 47-63.