

## Diagnostyczne znaczenie potwierdzania obecności swoistych przeciwciał przeciwko *Yersinia* spp. oraz *Chlamydia trachomatis* i *Chlamydophila pneumoniae* w surowicach pacjentów z podejrzeniem etiologii infekcyjnej zapaleń stawów

*Diagnostic significance of the confirmation of the prevalence of antibodies to Yersinia spp., Chlamydia trachomatis and Chlamydophila pneumoniae in the sera of patients with suspected infectious etiology of arthritis*

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:** potwierdzanie przeciwciał, krzyżowa reaktywność, *Yersinia* spp., *Chlamydia* spp.

**Key words:** confirmation of antibodies, cross-reactivity, *Yersinia* spp., *Chlamydia* spp.

### Streszczenie

**Cel pracy:** Praca jest kontynuacją badań nad swoistymi przeciwciałami antybakteryjnymi przydatnymi diagnostycznie w rozpoznawaniu chorób układu ruchu o podejrzaną etiologię infekcyjnej drobnoustrojami znacznie różniącymi się taksonomicznie. Dotyczy ona pałeczek Gram-ujemnych – *Yersinia enterocolitica/pseudotuberculosis*, *Chlamydia trachomatis* oraz *Chlamydophila pneumoniae*.

**Materiał i metody:** Badaniami objęto 159 surowic dodatnich w teście skriningowym ELISA na obecność przeciwciał klasy IgA i/lub IgG przeciwko *Yersinia* spp. oraz 38 surowic dodatnich na obecność przeciwciał klasy IgA i/lub IgG przeciwko *Chlamydia trachomatis*. Były one potwierdzone metodą Western Blot, w której zastosowano swoiste rekombinowane antygeny dla poszczególnych drobnoustrojów. Metodą Western Blot potwierdzono ok. 60% wyników dodatnich z badania ELISA w klasie IgA i 75% w klasie IgG dla *Yersinia* spp. oraz *Chlamydia trachomatis* i/lub *Chlamydophila pneumoniae* (ryc. 1 i 2).

**Wyniki:** Szczegółowa analiza wykazała, że najczęściej występowały przeciwciała przeciw rekombinowanym antygenom: YOP D dla *Yersinia* spp. zarówno w klasie IgA (98,9%), jak i IgG (95,3%) (ryc. 3) oraz MOMP dla *Chlamydia trachomatis* (ryc. 6) i *Chlamydophila pneumoniae* (ryc. 7) w klasie IgA i IgG (85–100%). Zaskakujące było uzyskanie w teście potwierdzenia obecności swo-

### Summary

**Background:** This paper presents the results of continued research on specific antibacterial antibodies, which are useful in the diagnosis of musculoskeletal diseases of suspected Gram-negative bacterial origin: *Yersinia enterocolitica/pseudotuberculosis*, *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydophila pneumoniae*.

**Material and methods:** The study included 159 positive sera in ELISA screening test of anti-*Yersinia* spp. antibodies (IgA and/or IgG class) and 38 positive sera of anti-*Chlamydia trachomatis* antibodies (IgA and/or IgG class). They were confirmed by Western blot, with specific recombinant antigens for these microorganisms. The presence of specific antibodies against *Yersinia* spp. and *Chlamydia trachomatis* and/or *Chlamydophila pneumoniae* (Fig. 1, 2) was confirmed in about 60% of positive sera in ELISA for IgA class and in 75% for IgG class.

**Results:** Detailed analysis showed that the most common antibodies to recombinant antigens were YOP D for *Yersinia* spp., for both IgA (98.9%) and IgG (95.3%) class (Fig. 3) and MOMP for *Chlamydia trachomatis* (Fig. 6) and *Chlamydophila pneumoniae* (Fig. 7) in the IgA and IgG class (about 85–100%). Unexpected results for anti-*Chlamydia* spp. antibodies confirmed by Western blot were obtained. It was disclosed that in about 56% of sera were confirmed anti-*Chlamydia trachomatis* and anti-*Chlamydophila pneumoniae* antibodies at the same time. This may indi-

### Adres do korespondencji:

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

Praca wpłynęła: 9.12.2011 r

istych przeciwciał przeciw *Chlamydia* spp., najczęściej (w 56%) przeciwciał klasy IgG jednocześnie przeciw *Chlamydia trachomatis* + *Chlamydia pneumoniae*, co może świadczyć o przebytej w przeszłości infekcji lub o kontakcie pacjenta z obydwoma gatunkami drobnoustrojów (ryc. 4a i 4b).

**Omówienie:** Uzyskane wyniki wskazują, jak wielkie znaczenie w rozpoznaniu infekcji *Yersinia* i *Chlamydia* spp. może mieć potwierdzenie metodą Western Blot dodatnich wyników na obecność przeciwciał różnych klas, dzięki wysokiej specyficzności testu Western Blot, przy zastosowaniu wysoce swoistych antygenów dla badanych drobnoustrojów. Należy również pamiętać, że diagnostyka serologiczna reaktywnych i niesklasyfikowanych zapaleń stawów o podejrzewanej etiologii infekcyjnej musi zawsze przebiegać w ścisłej korelacji z obrazem klinicznym oraz dokładnie przeprowadzonym wywiadem lekarskim.

**Wnioski:** Wiarygodność uzyskanych wyników badań serologicznych wymaga dodatkowego potwierdzenia obecności w surowicy i/lub w krążących kompleksach immunologicznych (*circulating immune complexes* – CIC) swoistych antygenów dla odpowiedniego drobnoustroju. Jest to wskazaniem do dalszych już rozpoczętych badań w tym kierunku.

## Wstęp

*Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis* oraz *Chlamydia trachomatis* i *Chlamydia pneumoniae* należą do zupełnie różnych jednostek taksonomicznych, ale w piśmiennictwie są opisywane jako najczęściej odpowiedzialne za m.in. różnego rodzaju stany zapalne stawów o ewentualnej etiologii zakaźnej i ich różnorodne powikłania układowe [1–4].

Diagnostyka laboratoryjna tych zapaleń opiera się na trzech głównych kryteriach: metodach hodowlanych, metodzie reakcji łańcuchowej polimerazy (*polymerase chain reaction* – PCR) oraz badaniach serologicznych. Każde z nich ma swoje zalety i wady, wynikające m.in. ze specyfiki hodowlanych i postępowań genetycznych w przypadku drobnoustrojów, które można podejrzewać o wywoływanie stanu chorobowego. Niemniej metody serologiczne mogą ułatwić rozpoznanie, głównie z racji najczęstszego opóźnienia objawów klinicznych w stosunku do ewentualnego zakażenia. Ich stosunkowo nieskomplikowana metodyka, ale przeważnie wysoka czułość i różna swoistość sprawiają, że firmy dynamicznie opracowują testy wykrywające przeciwciała dla coraz szerszego asortymentu drobnoustrojów, ich cząstkowych, rekombinowanych i syntetycznych antygenów. Jednakże ta wysoka czułość, zwłaszcza metod immunoenzymatycznych ELISA, sprawia, że w badaniach [5–9] stwierdza się często reakcje krzyżowe przeciwciał, których swoistość wymaga – o ile to możliwe – potwierdzenia, np. różnie modyfikowaną metodą immunoblotting.

Wynik potwierdzający swoistość wykrywanych antybakteryjnych przeciwciał w korelacji z obrazem klinicznym ułatwia lekarzowi postawienie diagnozy zapalenia stawów o możliwej etiologii infekcyjnej, jak również współist-

cate previous infection or contact with these two species of microorganisms and the antibodies' cross-reactivity (Fig. 4a, 4b).

**Discussion:** The obtained results indicate how important is the confirmation by Western blot of *Yersinia* and *Chlamydia* spp. infection, due to the high specificity of the Western blot test. It should also be remembered that the serological diagnosis of reactive and undifferentiated arthritis of suspected bacterial origin has to be always in close correlation with the clinical picture and carefully conducted medical history.

**Conclusions:** The reliability of the serological findings requires additional confirmation of the prevalence of specific antibodies to particular microorganisms in serum and/or circulating immune complexes (CIC). It points to the need for further research in this field that has been already initiated.

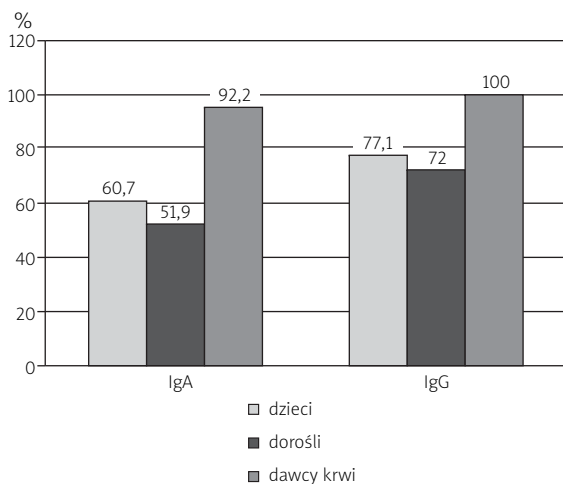
niejących objawów układowych. W znacznym stopniu ukierunkowuje to postępowanie lecznicze i tak kontrowersyjne co do celowości stosowania antybiotykoterapii, czasu jej trwania i wyboru odpowiedniego leku [10–12]. Znaczenie diagnostyczne ma także klasa wykrywanych przeciwciał, która często może świadczyć o etapie zaistniałej infekcji, niejednokrotnie sugerując zarówno świeże zakażenie (klasa IgM), ciągłą indukcję przeciwciał przez antygeny bakteryjne (klasa IgA), jak i odległy kontakt z drobnoustrojem (klasa IgG) [5].

Celem pracy były badania nad stopniem potwierdzenia obecności swoistych przeciwciał przeciw *Yersinia* spp. oraz *Chlamydia trachomatis* i *Chlamydia pneumoniae*, które wykrywano skryningową metodą ELISA u pacjentów diagnozowanych w kierunku reaktywnych zapaleń stawów i niesklasyfikowanych zapaleń stawów o podejrzewanej etiologii infekcyjnej. Ważne było także określenie antygenów cząstkowych poszczególnych drobnoustrojów, przeciwko którym najczęściej produkowane są przeciwciała istotne diagnostycznie.

## Materiał i metody

Materiałem wykorzystywanym do badań były surowice pacjentów hospitalizowanych w Instytucie Reumatologii w Warszawie od marca 2010 r. do maja 2011 r. Badano surowice, w których wcześniej za pomocą skryningowej metody immunoenzymatycznej (ELISA) oznaczono dodatni poziom przeciwciał przeciw badanym drobnoustrojom.

Obecność swoistych przeciwciał przeciw *Yersinia* spp. w klasie IgA potwierdzano w 107 surowicach dzieci (pacjenci do 18. roku życia) oraz w 52 surowicach osób dorosłych. W klasie IgG przebadano 35 surowic dzieci oraz 25 surowic dorosłych pacjentów.



**Ryc. 1.** Odsetek potwierdzonych metodą Western Blot dodatnich surowic na obecność przeciwciał klasy IgA i IgG przeciw *Yersinia* spp. wykrytych metodą ELISA w surowicach pacjentów Instytutu Reumatologii oraz zdrowych dawców krwi.

**Fig. 1.** The percentage of positive patients' and healthy donors' sera (in IgA and IgG class) of *Yersinia* spp. detected by ELISA and confirmed by Western blot.

Obecność swoistych przeciwciał przeciw *Chlamydia trachomatis*/*Chlamydophila pneumoniae* klasy IgA i IgG potwierdzano jedynie w surowicach pacjentów dorosłych, odpowiednio dla klas, w 22 i 16 surowicach.

Grupą kontrolną dla badanych surowic były surowice zdrowych dawców krwi, w których potwierdzano obecność swoistych przeciwciał przeciw badanym drobnoustrojom, oznaczonym wcześniej metodą ELISA. Krew pochodziła z Regionalnego Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Warszawie, była pobrana od kobiet i mężczyzn w wieku 18–65 lat. Dawcy wyrazili zgodę na pobranie krwi do badań. Obecność swoistych przeciwciał przeciw *Yersinia* spp. w klasie IgA potwierdzano w 21 surowicach zdrowych dawców krwi, w klasie IgG w 44 surowicach. Obecność swoistych przeciwciał przeciw *Chlamydia trachomatis*/*Chlamydophila pneumoniae* klasy IgA potwierdzano w 5 surowicach, w klasie IgG w jednej surowicy.

Metodyka skriningowych metod immunoenzymatycznych dla *Yersinia* spp. i *Chlamydia trachomatis* została już uprzednio opisana [9].

W celu potwierdzenia swoistości przeciwciał wykrytych metodami immunoenzymatycznymi stosowano metodę immunoblotting, w której błony (paski) nitrocelulozowe zawierały wysoce oczyszczone antygeny (białka) rekombinowane.

Dla *Yersinia* spp. (recomLine *Yersinia*, Microgen Diagnostic) wykrywano swoiste przeciwciała przeciw markerom wirulencji (kodowanym plazmidowo), do których należały

także białka YOPs (*Yersinia outer membrane proteins*) *Y. enterocolitica* i *Y. pseudotuberculosis* o różnych ciężarach cząsteczkowych: YOP M (58 kDa), YOP H (46 kDa), V-AG (38 kDa), YOP D (33 kDa) i YOP E (25 kDa). Kluczowa w diagnostyce była obecność antygeny YOP D.

RecomLine *Chlamydia* (Microgen Diagnostic) pozwala na oznaczenie nie tylko swoistych przeciwciał przeciw *Chlamydia trachomatis*, lecz także przeciwko *Chlamydophila pneumoniae* i *Chlamydia psittaci*. W teście wykorzystano antygeny rekombinowane: MOMP (*Major Outer Membrane Proteins*), OMP2, HSP60, MIP, OMP4, OMP5, TARP, CPAF.

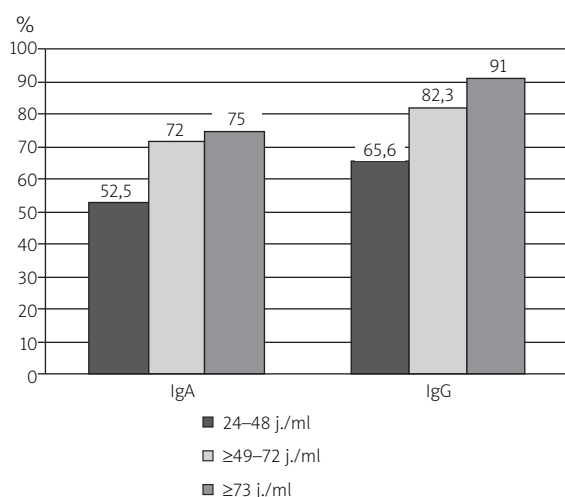
## Wyniki

Wykonano szczegółową analizę potwierdzania obecności swoistych przeciwciał przeciw *Yersinia* spp. oraz *Chlamydia trachomatis* i *Chlamydophila pneumoniae*, które wykrywano skriningową metodą ELISA u pacjentów diagnozowanych w kierunku reaktywnych zapaleń stawów i niesklasyfikowanych zapaleń stawów o podejrzewanej etiologii infekcyjnej.

Potwierdzalność metodą Western Blot dodatnich wyników otrzymanych metodą ELISA dla *Yersinia* spp. w klasie IgG była większa niż w klasie IgA. Więcej wyników dodatnich potwierdzono u dzieci (60,7% dla klasy IgA i 77,1% dla klasy IgG) niż u dorosłych (51,9% dla klasy IgA i 72% dla klasy IgG) (ryc. 1). Łącznie (u dorosłych i dzieci) również potwierdzalność przeciwciał w klasie IgG (75%) była większa niż w klasie IgA (57,8%).

W grupie kontrolnej dodatnie wyniki uzyskane metodą ELISA dla *Yersinia* spp. w klasie IgA potwierdzono w 95,2%, a w klasie IgG w 100% surowic (ryc. 1).

Interesujące było zbadanie zależności potwierdzania swoistości przeciwciał przeciw *Yersinia* spp. z ich poziomem oznaczonym w badaniu metodą ELISA. Poziom przeciwciał określano w przedziałach: słabo dodatni (24–48 j./ml), średni ( $\geq 49$ –72 j./ml) oraz wysoki ( $\geq 73$  j./ml). Łącznie we wszystkich przebadanych surowicach (dzieci i dorośli) wyniki słabo dodatnie w ELISA potwierdzano testem Western Blot w klasie IgA w 52,5%, średnie w 72%, a wysokie w 75% surowic. W klasie IgG wyniki słabo dodatnie w ELISA potwierdzano testem Western Blot w 65,6%, średnie w 82,3%, a wysokie w 91% surowic (ryc. 2). Następnie dokonano analizy występowania przeciwciał klasy IgA i IgG dla poszczególnych antygenów YOP, które wchodziły w skład testu potwierdzającego obecność przeciwciał wykrywanych metodą ELISA (ryc. 3). W klasie IgA w 98,9% potwierdzono obecność swoistych przeciwciał dla antygeny YOP D, a tylko w 1,1% dla antygeny V-AG. W klasie IgG zdecydowanie najczęściej swoiste przeciwciała potwierdzono dla antygeny YOP D (95,3%). Potwierdzano – w różnym stopniu – również obecność przeciwciał przeciw pozostałym antygenom: YOP H (32,5%), YOP M (27,3%), V-AG (20,9%)



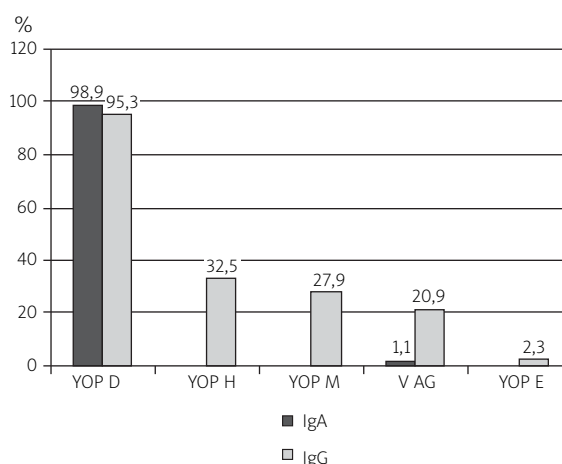
**Ryc. 2.** Odsetek potwierdzonych metodą Western Blot swoistych przeciwciał klasy IgA i IgG przeciw *Yersinia* spp. w surowicach dodatnich metodą ELISA (dane przedstawione łącznie dla dzieci i dorosłych z uwzględnieniem poziomu przeciwciał oznaczonego metodą ELISA).

**Fig. 2.** The percentage of specific antibodies (IgA and IgG class) of *Yersinia* spp. detected by ELISA and confirmed by Western blot (data presented in total for both children and adults with the level of antibodies marked by ELISA).

oraz YOP E (2,3%). W surowicach kontrolnych zdrowych dawców krwi obecność przeciwciał dla antygenu YOP D potwierdzano w 100% surowic.

Analiza potwierdzalności dodatnich wyników badań surowicy na obecność przeciwciał przeciw *Chlamydia trachomatis* uzyskanych metodą ELISA wykazała, że w 59% potwierdzono testem Western Blot obecność tych przeciwciał w klasie IgA (ryc. 4a). W jednakowym odsetku (22,7%) potwierdzono obecność przeciwciał zarówno przeciw *Chlamydia trachomatis*, jak i *Chlamydophila pneumoniae*. W 13,6% surowic występowały jednocześnie przeciwciała przeciw obu tym drobnoustrojom. W klasie IgG (ryc. 4b) dodatnie wyniki z testu ELISA potwierdzono w 75%, w tym aż w 56,2% występowały jednocześnie przeciwciała przeciw *Chlamydia trachomatis* i *Chlamydophila pneumoniae*. Nie potwierdzono obecności wyłącznie przeciwciał przeciw *Chlamydia trachomatis* i tylko w 18,7% potwierdzono obecność przeciwciał przeciw *Chlamydophila pneumoniae*.

W grupie kontrolnej badanych surowic zdrowych dawców krwi testem Western Blot potwierdzono obecność przeciwciał przeciw *Chlamydia trachomatis* w 80% surowic w klasie IgA (ryc. 4a), z czego w 40% surowic potwierdzono obecność wyłącznie przeciwciał przeciw *Chlamydia trachomatis*. W jednakowym odsetku (20%) potwierdzono



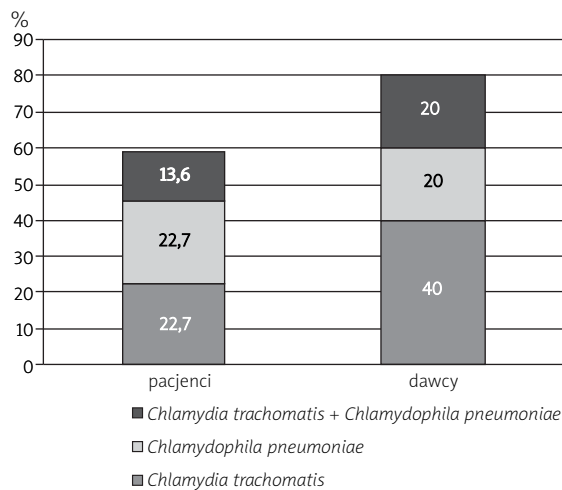
**Ryc. 3.** Odsetek swoistych przeciwciał klasy IgA i IgG przeciw poszczególnym antygenom YOP *Yersinia* spp. wykrytych metodą Western Blot.

**Fig. 3.** The percentage of specific antibodies (IgA and IgG class) of *Yersinia* outer proteins (YOP) detected by Western blot.

obecność przeciwciał przeciw *Chlamydophila pneumoniae* oraz jednocześnie dla obu tych drobnoustrojów. W klasie IgG w badanej surowicy potwierdzono obecność tylko przeciwciał przeciw *Chlamydophila pneumoniae* (ryc. 4b).

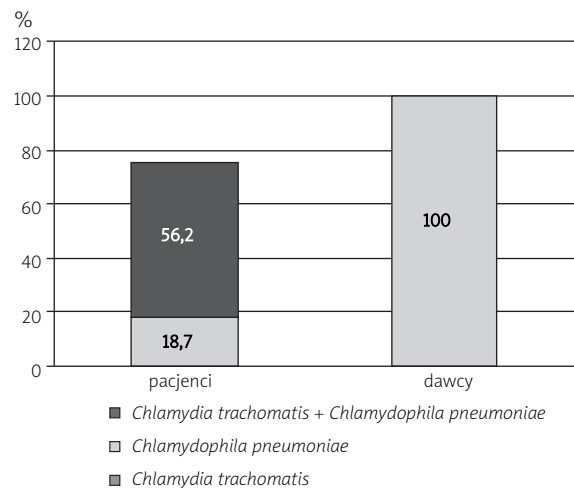
W przypadku tych drobnoustrojów przeanalizowano również wyniki potwierdzonych przeciwciał (w klasach IgA i IgG), w zależności od poziomu przeciwciał wykrytych wcześniej metodą ELISA: niski (11–15 j./ml), średni (16–20 j./ml) i wysoki (> 21 j./ml). W przypadku przeciwciał klasy IgA (ryc. 5a) przeciw *Chlamydia trachomatis* odsetek potwierdzonych przeciwciał zwiększał się wraz z poziomem przeciwciał oznaczonych metodą ELISA (odpowiednio dla poziomów: 12,5%, 25% i 30%). W tej samej klasie przeciwciała przeciw *Chlamydophila pneumoniae* najczęściej (37,5%) potwierdzano w surowicach o niskim poziomie przeciwciał. Nie potwierdzono żadnego wyniku z testu ELISA z przedziału 16–20 j./ml, natomiast przeciwciała z przedziału wysokiego potwierdzono w 20% surowic. Z kolei jednoczesną obecność przeciwciał przeciw *Chlamydia trachomatis* i *Chlamydophila pneumoniae* w 12,5% surowic potwierdzano wyniki z przedziału niskiego, a w 20% z przedziału wysokiego; nie potwierdzono żadnego wyniku z przedziału średniego.

W klasie IgG (ryc. 5b) testem Western Blot nie potwierdzono żadnego wyniku dodatniego na obecność przeciwciał przeciw *Chlamydia trachomatis* otrzymanego wcześniej metodą ELISA. Dla *Chlamydophila pneumoniae* potwierdzono wyniki z przedziału niskiego (w 25%) oraz wysokiego (w 25%). Jednoczesną obecność przeciwciał przeciw *Chlamydia trachomatis* i *Chlamydophila pneumoniae* potwier-



**Ryc. 4a.** Odsetek surowic dodatnich badanych metodą ELISA na obecność przeciwciał przeciw *Chlamydia trachomatis*, w których potwierdzono metodą Western Blot występowanie swoistych przeciwciał klasy IgA dla *Chlamydia* spp. w surowicach pacjentów Instytutu Reumatologii oraz zdrowych dawców krwi.

**Fig. 4a.** The percentage of patients' and healthy donors' positive sera (in IgA class) of *Chlamydia trachomatis* detected by ELISA and confirmed by Western blot used for detection of specific antibodies to *Chlamydia* spp.



**Ryc. 4b.** Odsetek surowic dodatnich badanych metodą ELISA na obecność przeciwciał przeciw *Chlamydia trachomatis*, w których potwierdzono metodą Western Blot występowanie swoistych przeciwciał klasy IgG przeciw *Chlamydia* spp. w surowicach pacjentów Instytutu Reumatologii oraz zdrowych dawców krwi.

**Fig. 4b.** The percentage of patients' and healthy donors' positive sera (in IgG class) of *Chlamydia trachomatis* detected by ELISA and confirmed by Western blot used for detection of specific antibodies to *Chlamydia* spp.

dzono odpowiednio dla przedziałów wartości w 50%, 100% i 50% surowic.

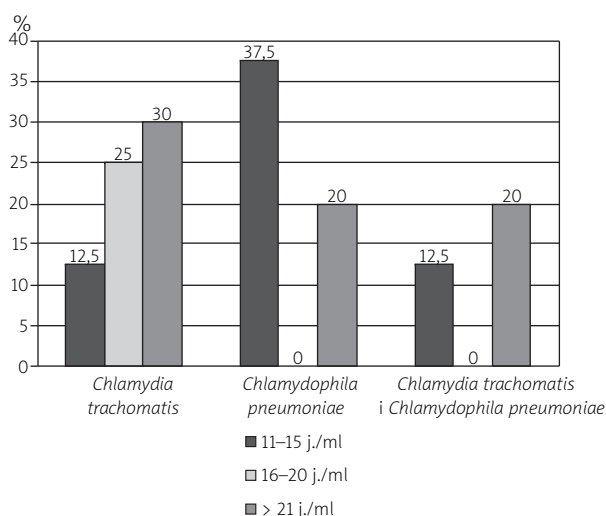
Przeprowadzono również analizę występowania swoistych przeciwciał surowicznych przeciw poszczególnym antygenom *Chlamydia trachomatis* i *Chlamydomphila pneumoniae* w teście potwierdzenia metodą Western Blot (ryc. 6 i 7).

Dla *Chlamydia trachomatis* najczęściej, zarówno w klasie IgA (85,7%), jak i IgG (100%), stwierdzano przeciwciała przeciw antygenowi MOMP (ryc. 6). Pozostałe swoiste przeciwciała przeciw poszczególnym antygenom stwierdzano w dość wysokim odsetku. W klasie IgA dla antygeny: OMP2 – 57,1%, HSP60 – 42,8%, MIP – 28,6%, a dla TARP oraz CPAF – 14,3%. W klasie IgG również przeciwciała przeciw antygenom: OMP2 (90,9%), HSP60 (81,8%) oraz MIP (54,5%), potwierdzano w wysokim odsetku. Dla pozostałych antygenów: TARP i CPAF, przeciwciała potwierdzano w 9,1% surowic.

Dla *Chlamydomphila pneumoniae* w klasie IgA potwierdzono jedynie obecność przeciwciał przeciw antygenom: MOMP (100%), OMP4 (66,6%) oraz OMP5 (66,6%) (ryc. 7). W klasie IgG wykrywano przeciwciała przeciw wielu rekombinowanym antygenom: MOMP (92,8%), OMP2 (57,1%), OMP5 (50%), OMP4 (42,8%) i zaledwie w 7,1% dla pozostałych (TARP, CPAF, YWBM).

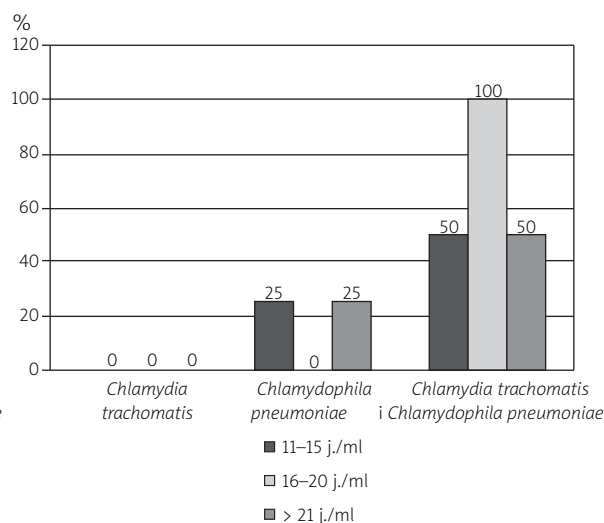
## Dyskusja

Przewlekła jersinioza w odróżnieniu od postaci ostrej (mniej więcej tygodniowej) charakteryzuje się innymi objawami klinicznymi, takimi jak: reaktywne zapalenie stawów, rumień guzowaty, *ileitis*, limfadenopatia, odmiedniczkowe zapalenie nerek, zapalenie mięśnia sercowego, oraz występowaniem odpowiedzi humoralnej, która może trwać latami z utrzymującą się obecnością przeciwciał klasy IgA i IgG [5, 13]. W serologicznej diagnostyce przeciwciała tych klas, a zwłaszcza IgA, stanowią podstawę w diagnozowaniu m.in. stanów zapalnych narządu ruchu o podejrzewanej etiologii *Yersinia* spp. (*Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*). W obecnie stosowanych metodach immunoenzymatycznych (ELISA, Western Blot) jako antygenów używa się rekombinowanych białek, wobec których indukowane są przeciwciała. Białka te, z racji uwalniania się ze ściany komórkowej drobnoustrojów, zostały nazwane YOPs (*Yersinia* outer membrane proteins) [14, 15]. Uważane są one za czynniki wirulencji, zarówno *Y. enterocolitica*, jak i *Y. pseudotuberculosis* (w tym wszystkich ich serotypów). O ile test ELISA jest szczególnie czuły, o tyle metody Western Blot są bardziej swoiste, a w przypadku *Yersinia* bezpośrednio wskazują na wirulencję patogenu, wobec którego stwierdza się przeciwciała. Jak podkreśla pro-



**Ryc. 5a.** Odsetek potwierdzonych metodą Western Blot swoistych przeciwciał klasy IgA przeciw *Chlamydia trachomatis* i/lub *Chlamydophila pneumoniae*. Poziom przeciwciał przeciw *Chlamydia trachomatis* oznaczono testem ELISA.

**Fig. 5a.** The percentage of specific antibodies (IgA class) to *Chlamydia trachomatis* and/or *Chlamydophila pneumoniae* confirmed by Western blot. The level of antibodies detected by ELISA for *Chlamydia trachomatis*.



**Ryc. 5b.** Odsetek potwierdzonych metodą Western Blot swoistych przeciwciał klasy IgG przeciw *Chlamydia trachomatis* i/lub *Chlamydophila pneumoniae*. Poziom przeciwciał przeciw *Chlamydia trachomatis* oznaczono testem ELISA.

**Fig. 5b.** The percentage of specific antibodies (IgG class) to *Chlamydia trachomatis* and/or *Chlamydophila pneumoniae* confirmed by Western blot. The level of antibodies detected by ELISA for *Chlamydia trachomatis*.

ducent testu, recomLine *Yersinia* nie wykazuje krzyżowej reakcji z drobnoustrojami z rodzaju *Brucella* ani z innymi patogenami, a jego wysoką swoistość uzyskano właśnie poprzez zastosowanie jasno zdefiniowanych, rekombinowanych i wysoce oczyszczonych antygenów, których optymalny poziom zwiększa również czułość testu. Mogło to służyć za test potwierdzenia wyników dodatnich na obecność przeciwciał „wirulentnych” wykrytych wcześniej skringową metodą ELISA.

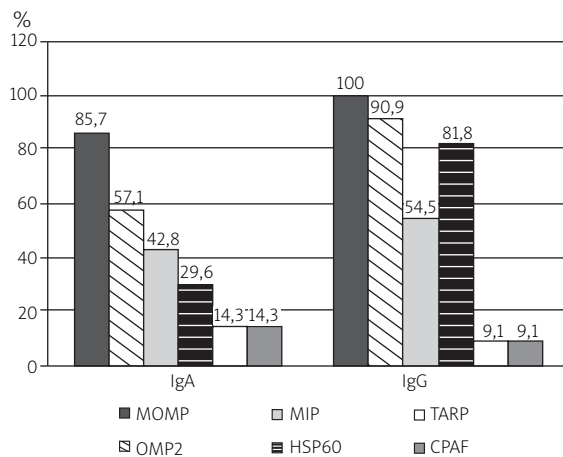
W przedstawianych badaniach częściej (75%) potwierdzano przeciwciała przeciw *Yersinia* w klasie IgG niż w klasie IgA (57,8%) (ryc. 1). Szukając wytłumaczenia, warto pamiętać, że w zdrowej populacji aż w 50% w przypadku klasy IgG i do 30% w klasie IgA wykrywano przeciwciała przeciw *Yersinia* spp. Jednym z wytłumaczeń tak wysokiego poziomu potwierdzalności przeciwciał u badanych pacjentów może być stałe występowanie przeciwciał przeciw *Yersinia* po przebytej infekcji wiele lat wcześniej i niebędącej czynnikiem etiologicznym dla diagnozowanej obecnie choroby reumatycznej. Nieco niższa potwierdzalność przeciwciał obu klas dla *Yersinia* w grupie dorosłych (IgA – 51,9%, IgG – 72%) niż w grupie dzieci (IgA – 60,7%, IgG – 77,1%) może jednak sugerować, że dzięki uprzednio zastosowanej skringowej, bardzo czułej metodzie ELISA można było wykryć przeciwciała nie tylko przeciw *Yersinia*, lecz także przeciwko innym Gram-ujemnym drobn-

ustrojom zbliżonym antygenowo. Wiadomo, że z wiekiem osoby starsze mogły mieć kontakt z większą liczbą różnorodnych drobnoustrojów. Dlatego tak ważną jest ocena zależności wyników badań potwierdzania przeciwciał przeciw *Yersinia* spp. z obrazem klinicznym.

W badaniach dotyczących korelacji odsetka przeciwciał przeciw *Yersinia* klasy IgA i IgG, potwierdzonych metodą Western Blot, z ich poziomem określonym metodą ELISA (ryc. 2) zaobserwowano, że wraz ze wzrostem ich poziomu zwiększały się odsetki surowic z potwierdzonymi wynikami badań. W związku z tym można przypuszczać, że wysoki poziom przeciwciał otrzymanych metodą ELISA może świadczyć o istniejącej infekcji, co sugeruje bardzo wysoki odsetek (IgA – 75%, IgG – 91%) potwierdzonych wyników dodatnich metodą Western Blot.

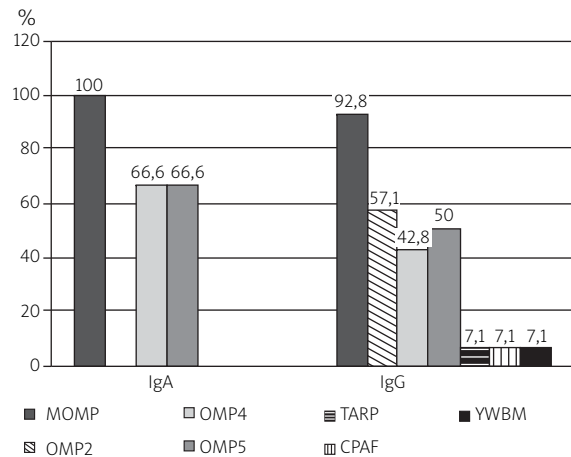
Szczegółowe badania dotyczące występowania przeciwciał klasy IgA i IgG przeciw poszczególnym antygenom YOP wykazały zdecydowaną dominację przeciwciał w klasie IgA (98,9%) i IgG (95,3%) dla wirulentnego antygeny YOP D (ciężar cząsteczkowy 33 kDa) – antygeny, który przez producentów testu jest określany jako podstawowy dla potwierdzenia swoistości przeciwciał przeciw *Yersinia* spp. wykrywanych metodą ELISA (ryc. 3). Przeciwciała przeciwko temu antygenowi występowały w każdej badanej surowicy, mimo obecności także różnych innych antygenów tworzących rozmaite kombinacje. Wczesne badania przy





**Ryc. 6.** Odsetek swoistych przeciwciał klasy IgA i IgG przeciw rekombinowanym antygenom *Chlamydia trachomatis* wykrytym metodą Western Blot.

**Fig. 6.** Percentage of specific antibodies (IgA and IgG class) to recombinant antigens of *Chlamydia trachomatis* detected by Western blot.



**Ryc. 7.** Odsetek swoistych przeciwciał klasy IgA i IgG przeciw rekombinowanym antygenom *Chlamydia pneumoniae* wykrytym metodą Western Blot.

**Fig. 7.** Percentage of specific antibodies (IgA and IgG class) to recombinant antigens of *Chlamydia pneumoniae* detected by Western blot.

użyciu immunoblottingu [16] wyraźnie wskazywały na najczęstszą obecność przeciwciał surowiczych w przypadku reaktywnego zapalenia stawów dla antygen o ciężarze cząsteczkowym 36 kDa, uznanego nawet za antygen wirulencji. Być może stanowił on wówczas złożony antygen, obecnie zróżnicowany na V-AG (38 kDa) i YOP D (33 kDa).

Serodiagnostyka infekcji wywołanych przez drobnoustroje z rodzaju *Chlamydia* odgrywa decydującą rolę z uwagi na często niecharakterystyczny i utajony przebieg choroby. Tak jak i w przypadku *Yersinia* spp., jest ona ważna głównie w przewlekłych stanach, w których bezpośrednia identyfikacja drobnoustroju jest niemożliwa, a ponadto skomplikowana i kosztowna w większości laboratoriów. Obecność przeciwciał poszczególnych klas zależy od etapu infekcji [17]. Przeciwciała klasy IgM zwykle są wykrywane w ciągu 2–4 tygodni od zakażenia, następnie najczęściej mniej więcej po 4 tygodniach pojawiają się przeciwciała klasy IgA i klasy IgG. Przeciwciała klasy IgM zanikają po 2–6 miesiącach, przeciwciała klasy IgA po 6 miesiącach od wykrycia, natomiast przeciwciała klasy IgG mogą się utrzymywać latami.

W reinfekcjach poziom przeciwciał klasy IgA i IgG zwykle zwiększa się ponownie w czasie pierwszych 2 tygodni. Z uwagi na asymptomatyczność przebiegu infekcji *Chlamydia*, wskazuje to na istotną rolę odpowiedzi w klasie IgA/IgG. Stanowią one swego rodzaju markery: przeciwciała klasy IgA dla infekcji pierwotnych, przewlekłych i wtórnych, a przeciwciała klasy IgG, a zwłaszcza ich wysoki poziom, dla ostrej i przewlekłej fazy choroby.

Należy jednak pamiętać, że samo wykrycie przeciwciał jest czasami nie w pełni miarodajne diagnostycznie

i powinno być uzupełnione badaniem dynamiki ich występowania. Co więcej, indukowane przeciwciała przeciwko jednemu gatunkowi *Chlamydia* mogą dawać reakcje krzyżowe z pozostałymi gatunkami w badaniach metodą ELISA. Tym większego znaczenia nabiera potwierdzenie swoistości wykrywanych przeciwciał różnych klas metodą immunoblotting, wykrywającą przeciwciała przeciw rekombinowanym antygenom poszczególnych gatunków *Chlamydia* [18, 19].

Analiza przedstawianych badań wykazała potwierdzenie wyników dodatnich w 59% surowic w przypadku przeciwciał klasy IgA i 75% w klasie IgG (ryc. 4a, b). Szczególnie wyróżniła się odpowiedź w klasie IgG, gdzie nie potwierdzono w ogóle przeciwciał wyłącznie przeciw *Chlamydia trachomatis*, a aż w 56,2% surowic zostały potwierdzone przeciwciała jednocześnie przeciw *Chlamydia trachomatis* + *Chlamydia pneumoniae*. Może to świadczyć o przebytej w przeszłości infekcji spowodowanej przez jeden i/lub oba te drobnoustroje, ale nadal pozostaje nieokreślone, który z badanych drobnoustrojów może być czynnikiem etiologicznym zapalenia stawów oraz ewentualnych objawów pozastawowych. Warto mieć również na uwadze, iż sami producenci testu nie wykluczają możliwości występowania reakcji krzyżowych pomiędzy *Chlamydia trachomatis* i *Chlamydia pneumoniae*, co może dawać fałszywie dodatnie wyniki.

W badaniach dotyczących porównania odsetka potwierdzeń metodą Western Blot z poziomem przeciwciał przeciw *Chlamydia* spp. klasy IgA i IgG określonym metodą ELISA (ryc. 5a, b) spodziewano się, że im wyższy poziom przeci-

ciat otrzymany w badaniu metodą ELISA, tym większy będzie odsetek potwierdzanych wyników dodatnich metodą Western Blot. Otrzymane wyniki wskazują jednak na taką zależność tylko w przypadku *Chlamydia trachomatis* w klasie IgA (ryc. 5a). Dla *Chlamydophila pneumoniae* oraz w wynikach potwierdzających jednoczesne występowanie przeciwciał przeciw *Chlamydia trachomatis* i *Chlamydophila pneumoniae* nie uzyskano spodziewanych wyników. Otrzymane wyniki wskazują na istnienie realnej potrzeby potwierdzenia metodą Western Blot wyniku dodatniego z badania metodą ELISA na obecność przeciwciał przeciw *Chlamydia* spp., niezależnie od wykrytego poziomu tych przeciwciał. Wyniki te zawsze powinny być analizowane razem, należy również pamiętać o częstym braku możliwości wykrycia przeciwciał na bardzo wczesnym etapie zakażenia.

Wyniki dodatnie potwierdzano poprzez oznaczanie przeciwciał klasy IgA i IgG dla charakterystycznych, rekombinowanych antygenów wszystkich trzech gatunków *Chlamydia*. Wśród nich występowały antygeny charakterystyczne dla trzech gatunków *Chlamydia*, takie jak: MOMP – najważniejszy immunodominant białkowy zewnętrznej błony ściany komórkowej, TARP (*translocated actin-recruiting protein*), wiążący aktynę i czynnik wirulencji CPAF (*chlamydial protease-like activity factor*). Inne antygeny były specyficzne tylko dla konkretnego gatunku, np. HSP60 – białko szoku termicznego, główny marker przewlekłych zapaleń dróg moczowo-płciowych i reaktywnego zapalenia stawów po infekcji *Chlamydia trachomatis*, i swoisty gatunkowo dla *Chlamydia trachomatis* antygen MIP (*macrophage infectivity potentiator*), wzmacniający infekcyjność makrofagów. Dla *Chlamydophila pneumoniae* identyfikowano przeciwciała przeciw swoistym gatunkowo białkom OMP4 i OMP5, zlokalizowanym na powierzchni *Chlamydophila pneumoniae*. Ważnym antygenem było także białko o dużym stężeniu cysteiny – OMP2, będące uniwersalnym markerem infekcji *Chlamydia trachomatis* i *Chlamydophila pneumoniae*.

W kontekście uzyskanych wyników i mając na uwadze znaczenie poszczególnych antygenów w diagnostyce serologicznej *Chlamydia* spp., należy pamiętać o możliwości zarówno nadkażenia, jak i reinfekcji powtórnej. Często nie można określić kolejności infekcji poszczególnych gatunków *Chlamydia*. Ponieważ podejrzewa się, że *Chlamydia trachomatis* i *Chlamydophila pneumoniae* mogą być czynnikami etiologicznymi chorób układu moczowo-płciowego i oddechowego z powikłaniami stawowymi, wykrycie przeciwciał przeciwko nim i potwierdzenie ich swoistości jest przydatne w diagnozowaniu chorób narządu ruchu. Wymaga to zatem ścisłej korelacji obrazu klinicznego z wynikami badań serologicznych. Dla klinicysty niezwykle istotna staje się decyzja dotycząca zastosowania odpowiedniej terapii antybiotykowej. Powinna być ona uzależniona m.in. od potwierdzenia swoistych przeciwciał dla jednego i/lub

obu drobnoustrojów, a następnie obserwowana głównie jej skuteczność i w mniejszym stopniu obecność swoistych przeciwciał, które mogą się utrzymywać przez bardzo długi czas.

## Wnioski

1. Wyniki badań wskazują na konieczność wykonywania testów potwierdzenia obecności swoistych przeciwciał antybakteryjnych wynikającą z:
  - występowania reakcji krzyżowych i mniejszej swoistości badania metodą ELISA,
  - wysokiej specyficzności testu Western Blot, dzięki zastosowaniu wysoce swoistych antygenów dla badanych drobnoustrojów.
2. Uzyskane metodą ELISA wyniki dodatnie potwierdzano w 60–70% w zależności od badanej klasy przeciwciała i/lub drobnoustroju.
3. Stosunkowo wysokie odsetki surowic z niepotwierdzoną obecnością swoistych przeciwciał nakazują zwrócić szczególną uwagę na ich związek z objawami klinicznymi ze strony narządu ruchu i innych układów. Trzeba również uwzględnić możliwość występowania zarówno wyników fałszywie dodatnich, jak i fałszywie ujemnych.

## Piśmiennictwo

1. Carter JD, Hudson AP. Reactive arthritis: clinical aspects and medical management. *Rheum Dis Clin North Am* 2009; 35: 21-44.
2. Carter JD. Bacterial agents in spondyloarthritis: a destiny from diversity? *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2010; 24: 701-714.
3. Hannu T, Puolakkainen M, Leirisalo-Repo M. Chlamydia pneumoniae as a triggering infection in reactive arthritis. *Rheumatology* 1999; 38: 411-414.
4. Kuipers JG, Zeidler H, Köhler L. How does Chlamydia cause arthritis? *Rheum Dis Clin North Am* 2003; 29: 613-629.
5. Rihl M, Klos A, Köhler L, et al. Reactive arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2006; 20: 1119-1137.
6. Noworyta J, Brasse-Rumin M, Ząbek J. Ocena wartości serodiagnostyki bakteriologicznej u chorych na niesklasyfikowane zapalenie stawów. *Reumatologia* 2008; 46: 115-124.
7. Noworyta J, Brasse-Rumin M, Ząbek J. Ocena wartości serodiagnostyki bakteriologicznej u chorych na niesklasyfikowane zapalenie stawów. Część II. Analiza badań surowic na obecność przeciwciał dla *Salmonella enteritidis* i *Salmonella typhimurium*; reakcje krzyżowe z *Yersinia enterocolitica* O3, *Chlamydia trachomatis* i *Borrelia burgdorferi*. *Reumatologia* 2008; 46: 198-209.
8. Noworyta J, Brasse-Rumin M, Ząbek J. Ocena wartości serodiagnostyki bakteriologicznej u chorych na niesklasyfikowane zapalenie stawów. Część III. Metoda immunoenzymatyczna (ELISA) jako test skriningowy w diagnostyce serologicznej zapaleń stawów o podejrzanej etiologii *Borrelia burgdorferi*; krzyżowa reaktywność przeciwciał dla *Borrelia burgdorferi*; z *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium* *Yersinia enterocolitica* O3, *Chlamydia trachomatis*. *Reumatologia* 2009; 47: 249-257.
9. Noworyta J, Brasse-Rumin M, Budziszewska M, Ząbek J. Występowanie, swoistość i krzyżowa reaktywność przeciwciał antybakteryjnych (*Yersinia* spp., *Salmonella enteritidis*, *Chlamydia*



- trachomatis i *Borrelia burgdorferi*) oraz ich znaczenie w diagnostyce niesklasyfikowanych zapaleń stawów. *Reumatologia* 2011; 49: 32-39.
10. Hoogkamp-Korstanje JA, Moesker H, Bruyn GA. Ciprofloxacin vs. placebo for treatment of *Yersinia enterocolitica* triggered reactive arthritis. *Ann Rheum Dis* 2000; 59: 914-917.
  11. Kvien TK, Gaston JS, Bardin T, et al. Three months treatment of reactive arthritis with azithromycin: a EULAR double blind, placebo controlled study. *Ann Rheum Dis* 2004; 63: 1113-1119.
  12. Sieper J, Fendler C, Laitko S, et al. No benefit of long term ciprofloxacin treatment in subjects with reactive arthritis and undifferentiated oligoarthritis. A three-month, multi-center, double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Arthritis Rheum* 1999; 42: 1386-1396.
  13. Kwiatkowska B, Maślińska M. Postępy w diagnostyce i leczeniu reaktywnego zapalenia stawów. *Reumatologia* 2011; 49: 354-360.
  14. Stahlberg TH, Heesemann J, Granfors K, et al. Immunoblot analysis of IgM, IgG and IgA response to plasmid encoded released protein of *Yersinia enterocolitica* in patients with or without yersinia triggered reactive arthritis. *Ann Rheum Dis* 1989; 48: 577-581.
  15. Cremer J, Putzker M, Faulde M, et al. Immunoblotting of *Yersinia* plasmid-encoded released proteins: A tool for diagnosis. *Electroforesis* 1993; 14: 952-959.
  16. Heesemann J, Eggers C, Schröder J. Serological diagnosis of yersiniosis by immunoblot technique using virulence-associated antigen of enteropathogenic *Yersiniae*. *Contr Microbiol Immunobiol* 1987; 9: 285-289.
  17. Bas S, Muzzin P, Ninet B, et al. Chlamydial serology: Comparative diagnostic value of immunoblotting, microimmunofluorescence test, and immunoassays using different recombinant proteins as antigens. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 1368-1377.
  18. Brunham RC, Peeling RW. Chlamydia trachomatis antigens: role in immunity and pathogenesis. *Inf Agents Dis* 1994; 3: 218-233.
  19. Iijima Y, Miyashita N, Kishimoto T, et al. Characterization of *Chlamydia pneumoniae* species – specific proteins immunodominant in humans. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 583-588.