

## Propozycja nowego podejścia metodycznego i interpretacji wyników oznaczeń przeciwciał przeciwko *Borrelia burgdorferi* – analiza składu przeciwciałowego krążących kompleksów immunologicznych

*The proposition of a new methodological approach and interpretation of results of the tests for the presence of specific antibodies to Borrelia burgdorferi: analysis of antibody composition in circulating immune complexes*

Karolina Miąskiewicz<sup>1</sup>, Ewa Walczak<sup>2</sup>, Katarzyna Roguska<sup>3</sup>, Jacek Noworyta<sup>3</sup>,  
Maria Brasse-Rumin<sup>3</sup>, Elwira Biernacka<sup>3</sup>, Marta Legatowicz-Koprowska<sup>2</sup>, Agnieszka Palacz<sup>3</sup>,  
Paweł Lewandowski<sup>4</sup>, Jakub Ząbek<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Oddział Chorób Wewnętrznych i Kardiologii, Wojewódzki Szpital Chirurgii Urazowej św. Anny w Warszawie

<sup>2</sup>Zakład Anatomii Patologicznej Instytutu Reumatologii im. prof. dr hab. med. Eleonory Reicher w Warszawie

<sup>3</sup>Zakład Mikrobiologii i Serologii Instytutu Reumatologii im. prof. dr hab. med. Eleonory Reicher w Warszawie

<sup>4</sup>Klinika Kardiologii Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego, Szpital Grochowski w Warszawie

**Słowa kluczowe:** borelioza z Lyme, krążące kompleksy immunologiczne (KKI), fałszywie ujemne wyniki testów serologicznych, związanie swoistych dla *Borrelia burgdorferi* przeciwciał w KKI.

**Key words:** Lyme borreliosis, circulating immune complexes (CIC), false-negative results of the tests, sequestration of specific anti-*Borrelia burgdorferi* antibodies in CIC.

### Streszczenie

Borelioza z Lyme ma bogatą symptomatologię i w znacznym odsetku przypadków może przypominać wczesne stadia układowej choroby tkanki łącznej. Część pacjentów trafia po wizycie u lekarza POZ do reumatologa. Reumatolog może zlecić badania autoprzeciwciał „markerowych” oraz na obecność przeciwciał bakteryjnych (przeciwko *Borrelia burgdorferi*). Odsetek wyników dodatnich w kierunku *B. burgdorferi* jest znikomy (14,7%), istnieje zatem problem wiarygodności tych wyników.

Seronegatywność pod względem obecności swoistych przeciwciał dla *B. burgdorferi* dotyczy ok. 30–40% surowic pacjentów z podejrzeniem boreliozy, łącznie z pacjentami z potwierdzonymi w wywiadzie ukąszeniami przez kleszcza i wystąpieniem objawu patognomicznego (rumienia wędrującego). Mimo że dysponujemy licznymi testami bakteriologicznymi, serologicznymi czy molekularnymi (PCR), diagnostyka boreliozy nastęrcza trudności i może prowadzić

### Summary

Lyme borreliosis is characterized by rich symptomatology which in a very high percentage resembles early stages of connective tissue diseases. Some patients after having contacted a physician are referred to a rheumatologist. The rheumatologist may order a test for “marker” antibody and a test for presence of anti-bacterial antibodies (anti-*Borrelia burgdorferi*). Frequency of positive results of anti-*B. burgdorferi* is rather low (14.7%), and because of that, there is a problem of credibility of the above-mentioned test.

Seronegativity, as to the presence of specific antibodies to *B. burgdorferi*, concerns about 40% of sera of the patients with borreliosis, including patients with confirmed incidents of the tick bite and appearance of the pathognomonic manifestation (migrating erythema). Despite many bacteriological, serological or molecular (PCR) tests available, diagnosis of borreliosis causes difficulties and may lead to false negative or positive results. Authors of this work focused on cases

### Adres do korespondencji:

dr hab. biol., prof. nadzw. Jakub Ząbek, Zakład Mikrobiologii i Serologii, Instytut Reumatologii im. prof. dr hab. med. Eleonory Reicher, ul. Spartańska 1, 02-637 Warszawa, tel. +48 22 844 30 67

Praca wpłynęła: 1.08.2011 r.

do uzyskiwania wyników fałszywie ujemnych lub fałszywie dodatnich. Autorzy pracy skupili się na surowicach pacjentów seronegatywnych pod względem przeciwciał dla *B. burgdorferi*, w których wolne przeciwciała przeciwko *B. burgdorferi* zostały związane przez antygeny krętka i utworzyły krążące kompleksy immunologiczne (KKI). Celem pracy była analiza KKI pod kątem obecności przeciwciał przeciwko *B. burgdorferi* w trudnych diagnostycznie surowicach pacjentów, u których obraz kliniczny wskazywał na obecność zakażenia krętkiem z rodzaju *B. burgdorferi* (ryc. 1–7). Badania przeprowadzono na surowicach 54 chorych z wywiadem wskazującym na boreliozę. Zastosowano nowe metodyczne podejście do analizy obecności swoistych przeciwciał dla *B. burgdorferi* – wytrącanie i dysocjację KKI, a następnie oznaczanie w uzyskanej frakcji  $\gamma$  z osadu PEG przeciwciał swoistych dla *B. burgdorferi*. W 41 surowicach ujemnych w teście ELISA wytrącono frakcję  $\gamma$  z osadu PEG i powtórnie oznaczono przeciwciała dla *B. burgdorferi*. W 82% surowic wykryto obecność przeciwciał dla *B. burgdorferi*, głównie w klasie IgG. Wykonano test potwierdzenia metodą Western-blotting i w ponad 50% frakcji  $\gamma$  uzyskano potwierdzenie obecności tych przeciwciał, w 22% surowic uzyskano wyniki wątpliwe, w pozostałych 28% frakcji  $\gamma$  występowały co najmniej przeciwciała dla antygeny p41. Autorzy mają nadzieję, że opracowane przez nich nowe podejście, po niezbędnych dla celów rutynowej diagnostyki uproszczeniach, znajdzie zastosowanie w serodiagnostyce boreliozy. Jest to cel przyszłych badań, jakie będą prowadzone w Zakładzie Mikrobiologii i Serologii IR przy współpracy z innymi zakładami.

## Wstęp

Borelioza z Lyme charakteryzuje się bardzo bogatą symptomatologią i w znacznym odsetku przypadków może przypominać wczesne stadia układowej choroby tkanki łącznej. Typowe objawy (np. „wędrujące” bóle stawowe) występują w grupie chorych z boreliozą w określonym odsetku i dlatego część pacjentów trafia po wizycie u lekarza pierwszego kontaktu do reumatologa. Reumatolog zgodnie ze standardem diagnostyczno-terapeutycznym [1], po zebraniu wywiadu i dokonaniu badania podmiotowego, zaleca badania dodatkowe: określenie parametrów stanu zapalnego (OB, białko C-reaktywne, leukocytoza), a także badania serologiczne w celu wykazania obecności przeciwciał charakterystycznych dla chorób reumatycznych [2, 3]. Objawy obserwowane u chorych przypominają seronegatywne zapalenia stawów bądź atypowe reumatoidalne zapalenie stawów (gościec palindromiczny), co przy braku przeciwciał „markerowych” prowadzi do zdiagnozowania niezróżnicowanej choroby tkanki łącznej. U tych chorych w celu różnicowania chorób tkanki łącznej, np. w odczynowym zapaleniu stawów, powinno się oznaczyć przeciwciała przeciw antygenom bakteryjnym (*Salmonella*, *Yersinia*, *Chlamydia*, a także *Borrelia burgdorferi*) [4].

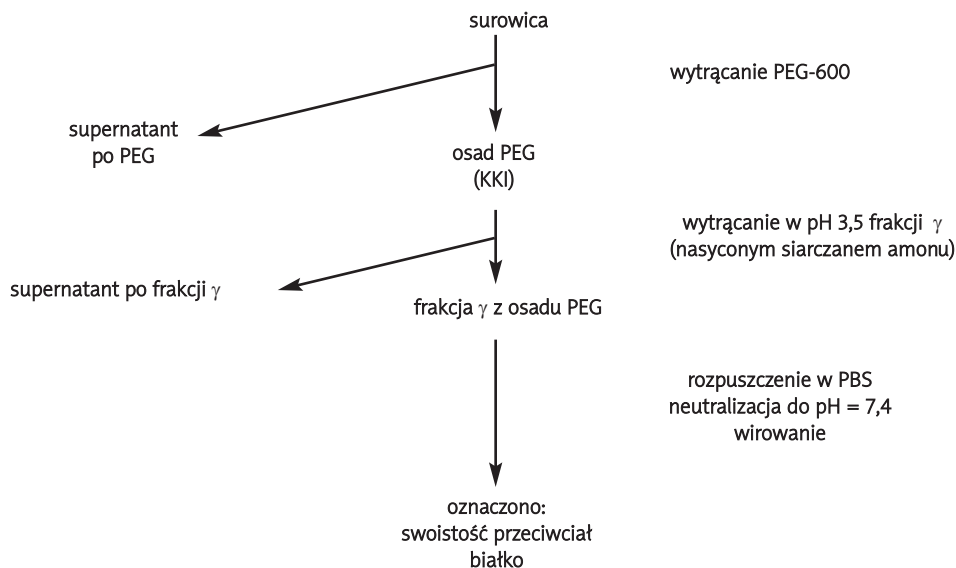
Z przeprowadzonych i opublikowanych w Zakładzie Mikrobiologii i Serologii IR badań wynika, że przeciwciała dla *B. burgdorferi* wykrywane są w 14,7% surowic badanych w celu wykluczenia choroby z Lyme i potwierdzane w > 80% dla klasy IgG i w ok. 50% dla klasy IgM [5].

U znacznej większości chorych z podejrzeniem boreliozy (z wyjątkiem tych przypadków, w których pacjent sam zgła-

of patients with sera seronegative for antibodies to *B. burgdorferi*, where free antibodies have been probably bound to bacterial antigens, forming circulating immune complexes (CIC). The goal of the researches was to analyse composition of CIC for the presence of antibodies to *B. burgdorferi* in sera of patients difficult to diagnose, where the clinical syndromes suggested the infection with *B. burgdorferi* (Fig. 1-7). The researches covered sera of a group of 54 patients with suspected borreliosis. A new methodological approach to analysis of the antibodies specific to *B. burgdorferi* was applied. This method is based on precipitation and dissociation of CIC, and estimation in prepared fraction of antibodies specific to *B. burgdorferi*. In 41 sera negative in the ELISA test, a  $\gamma$  fraction from PEG sediment was obtained and in prepared  $\gamma$  fraction antibodies against *B. burgdorferi* antigens were estimated. In 82% of sera, such antibodies were found, mainly in the IgG class. The confirmatory Western-blot test was applied and in 50% of tested fraction, the presence of specific anti-*B. burgdorferi* antibodies was confirmed, in 22% – equivocal results were obtained and in the remaining 28% – antibodies to antigen p41 were found. Authors conclude that this new methodological approach that they developed, after simplification necessary for routine diagnosis, may be useful in sero-diagnosis of borreliosis and will diminish the percentage of false negative results in a significant way.

sza fakt ukąszenia przez kleszcza lub gdy chory należy do grupy zwiększonego ryzyka boreliozy, np. pracownicy leśni) serodiagnostyka choroby z Lyme kończy się na ujemnym wyniku badania skринingowego metodą ELISA lub na braku potwierdzenia dodatniego wyniku testu ELISA testem Western-blotting. Test Western-blotting wykonywany jest w celu potwierdzenia występowania swoistych przeciwciał dla *B. burgdorferi* [6]. Technika ta pozwala na wykrycie przeciwciał klas IgM i IgG dla wybranego zestawu antygenów o wysokiej swoistości dla *B. burgdorferi*. Jest to metoda kosztowna i trudna w wykonaniu, ale charakteryzuje się dużą czułością i swoistością. Jej wadą są różnice w interpretacji wyników w poszczególnych laboratoriach oraz niedostateczna ich powtarzalność.

W praktyce diagnostycznej należy brać pod uwagę możliwość uzyskania wyników fałszywie dodatnich bądź fałszywie ujemnych. Do częstych przyczyn wyników fałszywie dodatnich należą reakcje krzyżowe, hipergammaglobulinemia w przebiegu chorób autoimmunologicznych oraz ograniczenie diagnostyki do testów skринingowych, czyli bez przeprowadzania testów potwierdzenia. U podłoża wyników fałszywie ujemnych może leżeć zbyt wcześnie przeprowadzona diagnostyka (kiedy pacjent znajduje się jeszcze w tzw. okienku serologicznym), a także defekt immunologiczny u pacjenta, lokalna produkcja przeciwciał, np. w płynie mózgowo-rdzeniowym. Również szeroko rozpowszechnione stosowanie antybiotykoaterapii w początkowym stadium choroby może spowodować osłabienie odpowiedzi humoralnej i w rezultacie zafalszowanie wyników badań serologicznych.



**Ryc. 1.** Metoda wytrącania i dysocjacji surowicznych krążących kompleksów immunologicznych (KKI).

**Fig. 1.** The method of precipitation and dissociation of circulating immune complexes (CIC) from patients' sera.

Jedną z możliwych przyczyn seronegatywności może być sekwestracja przeciwciał w krążące kompleksy immunologiczne (KKI) [7]. W niniejszej pracy autorzy skupili się na chorych seronegatywnych pod względem przeciwciał dla *B. burgdorferi*, u których wolne przeciwciała przeciwko *B. burgdorferi* prawdopodobnie zostały związane przez antygeny krętki i utworzyły KKI.

Analogiczna sytuacja występuje w 10–15% surowic pacjentów z podejrzeniem układowej choroby tkanki łącznej, gdzie przy dodatnich mianach ANA (czasem nawet bardzo wysoko dodatnich  $> 1/1280$ ) wynik testu potwierdzenia metodą Western-blotting był ujemny (ewentualnie nieproporcjonalnie niski w stosunku do miana ANA) przy równocześnie obserwowanej kompleksemii [8]. W pracy Palacz i wsp. wykazano, że w ponad 80% surowic ANA-dodatnich, w których test potwierdzenia metodą Western-blotting wypada negatywnie, obecne są auto-przeciwciała „markerowe” we frakcji  $\gamma$  z osadu PEG-6000, tj. we frakcji, w której obok makroglobulin surowicznych występują także KKI [9].

Celem pracy była analiza krążących kompleksów immunologicznych pod kątem obecności przeciwciał przeciwko *B. burgdorferi* w trudnych diagnostycznie surowicach pacjentów, u których wywiad i obraz kliniczny wskazywał na obecność zakażenia krętkiem z rodzaju *Borrelia* sp.

## Materiał i metody

Badania na obecność przeciwciał dla antygenów *B. burgdorferi* przeprowadzono na 54 surowicach pobranych od pacjentów z podejrzeniem boreliozy, skierowanych do Zakła-

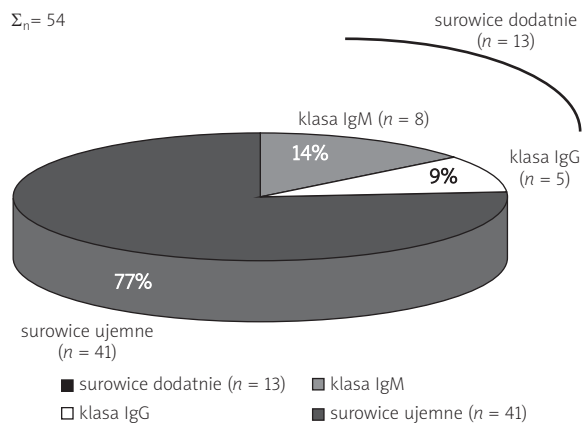
du Mikrobiologii i Serologii IR w celu oznaczenia poziomów przeciwciał dla *B. burgdorferi*.

W surowicach oznaczano następujące parametry:

- 1) poziom przeciwciał przeciwko antygenom *B. burgdorferi* oznaczano metodą ELISA (testem *Borrelia* IgG/IgM recombinant), firmy Biomedica,
- 2) jako test potwierdzenia stosowano test Western-blotting (test recomLine *Borrelia* IgG/IgM), firmy Biomedica, ocenę wyników testu Western-blotting wykonywano na podstawie załączonej do testu sumarycznej skali oceny (punktowa) dla poszczególnych przeciwciał,
- 3) poziom KKI oznaczano metodą ELISA (C1q – CIC kit) firmy Quidel (USA),
- 4) frakcję wzbogaconą w KKI uzyskiwano metodą wytrącania glikolem polietylenowym o ciężarze cząsteczkowym 6000 Da (PEG-6000) wg Świerczyńskiej i wsp. [9],
- 5) frakcję z osadów PEG-6000 uzyskiwano przez wytrącenie nasyconym roztworem siarczanu amonu w pH 3,5 (stosowanym do dysocjacji KKI) wg metody własnej [10], schemat metody przedstawiono na rycinie 1,
- 6) białko we frakcji i osadach PEG-6000 oznaczano spektrofotometrycznie metodą wg Kalckara [11].

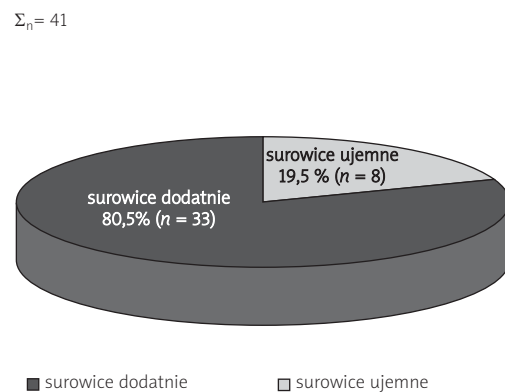
## Wyniki

W 54 surowicach przystanych do Zakładu Mikrobiologii i Serologii w celu oznaczenia przeciwciał dla *Borrelia burgdorferi* z powodu podejrzenia choroby z Lyme (boreliozy) wykonano test ELISA (traktowany jako test skryningowy), a następnie w przypadku wyniku pozytywnego dla którejkolwiek z klas IgM lub IgG w zależności od uzyskanego



**Ryc. 2.** Częstość występowania przeciwciał przeciwko antygenom *Borrelia burgdorferi* oznaczone w surowicach metodą ELISA w grupie 54 surowic.

**Fig. 2.** Percentage of anti-*Borrelia burgdorferi* antibodies in sera of 54 patients determined by the ELISA method.



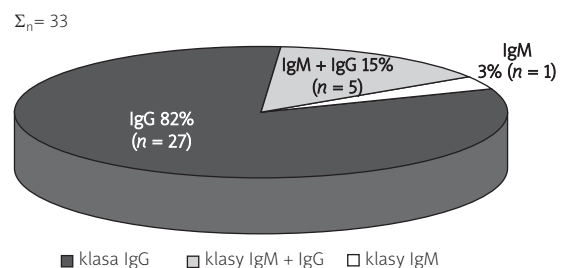
**Ryc. 3.** Częstość występowania przeciwciał przeciwko antygenom *Borrelia burgdorferi* we frakcji  $\gamma$  z osadu PEG oznaczone metodą ELISA z grupy 41 surowic (seronegatywnych w teście ELISA).

**Fig. 3.** Percentage of anti-*Borrelia burgdorferi* antibodies in  $\gamma$  fraction from PEG sediment indicated in a group of 41 sera determined by the ELISA method (seronegative in the ELISA test).

poziomu przeciwciał przeciwko *B. burgdorferi* wykonano test potwierdzenia metodą Western-blotting. Wyniki przedstawiono na rycinie 2. Dla pierwszych 54 surowic bezpośrednio wynik pozytywny (metodą ELISA) uzyskano dla 13 badanych surowic, w klasie IgG-5 i w klasie IgM-8. Zgodnie z przyjętą procedurą analityczną dla surowic seropozytywnych pod względem przeciwciał dla antygenów *B. burgdorferi* wykonano test potwierdzenia metodą Western-blotting i w przypadku 6 surowic (co stanowi 46%) uzyskano potwierdzenie.

W odniesieniu do pozostałych 41 seronegatywnych surowic zastosowano procedurę opisaną w metodyce (patrz ryc. 1), polegającą na wytrąceniu z surowic glikolem polietylenowym o ciężarze cząsteczkowym 6000 Da frakcji wysokocząsteczkowej, w której zlokalizowana jest (oprócz innych makroagregatów) także frakcja krążących kompleksów immunologicznych, zdysocjowana w osadzie PEG-6000 i następnie poddana wytrąceniu frakcja  $\gamma$ . W tak uzyskanej frakcji  $\gamma$  z KKI powtórnie oznaczono metodą ELISA obecność przeciwciał dla antygenów *B. burgdorferi*. Wyniki oznaczania obecności przeciwciał dla *B. burgdorferi* przedstawiono na rycinie 3.

We frakcji  $\gamma$  z osadu PEG z 8 surowic (co stanowi ok. 20%) nie stwierdzono obecności przeciwciał dla *B. burgdorferi* (wartości graniczne 11 BBU – *Borrelia burgdorferi* Units). W pozostałych 33 osadach (80,5%) uzyskano wyniki powyżej wartości *cut off* (średnia dla grupy dodatniej wynosiła 16,5 BBU). Stwierdzono, że w 82% (27 surowic) osadów obecne były przeciwciała w klasie IgG, w 15% (5 surowic) obecne były przeciwciała dla klasy IgG i IgM i tylko w 3%

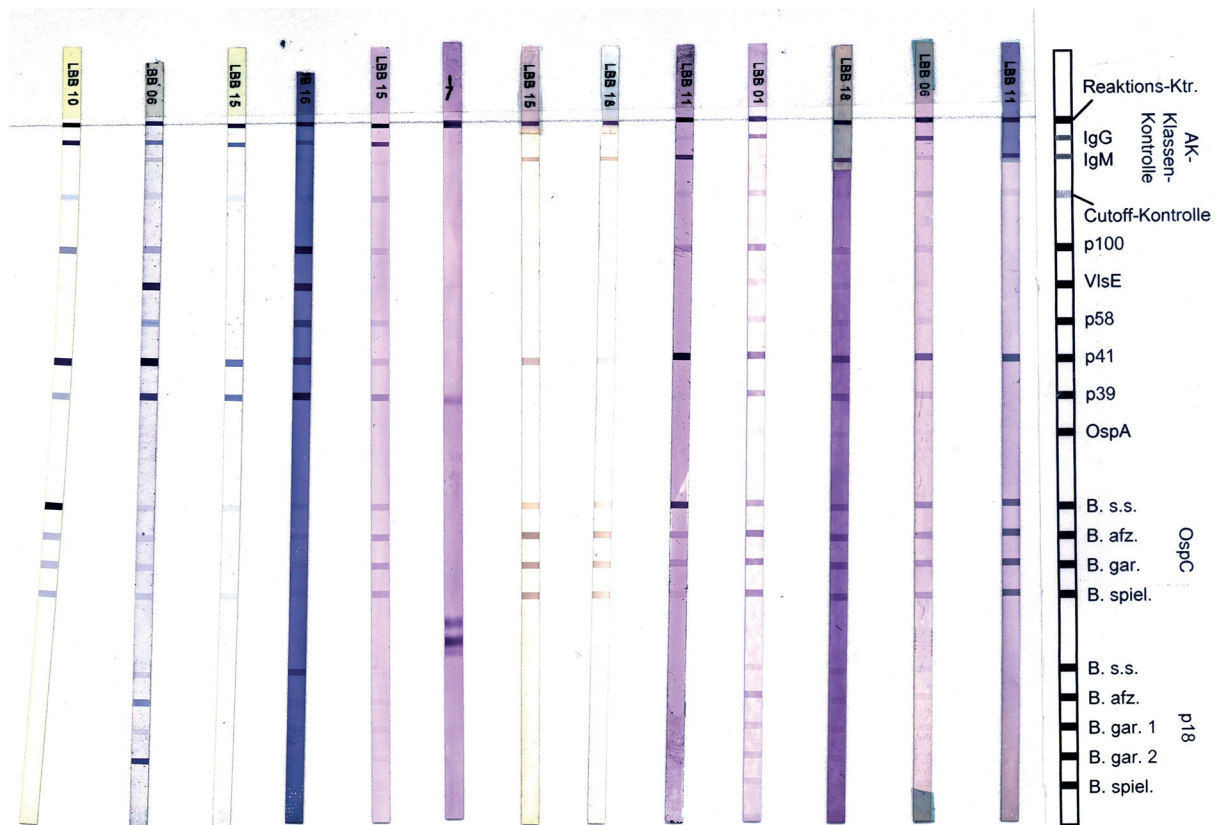


**Ryc. 4.** Częstość występowania przeciwciał (klasa IgG i IgM) dla antygenów *Borrelia burgdorferi* wykrywanych we frakcji  $\gamma$  z osadu PEG-6000 metodą ELISA w grupie 33 seronegatywnych surowic.

**Fig. 4.** Percentage of anti-*Borrelia burgdorferi* antibodies (IgG and IgM class) determined in  $\gamma$  fraction from PEG sediment done by the ELISA method in a group of 33 seronegative sera (by the ELISA method).

(1 surowica) osadów przeciwciała w klasie IgM. Częstość występowania przeciwciał dla antygenów *B. burgdorferi* dla klasy IgG, IgM oraz IgG i IgM przedstawiono na rycinie 4.

W tej grupie, tj. w grupie frakcji  $\gamma$  z osadu PEG, gdzie stwierdzono poziomy przeciwciał od podprogowego (+/-) do wysokiego (tj. > 20 BBU), wykonano test potwierdzenia metodą Western-blotting. Wybrane przykłady Western-blotów, dla których uzyskano potwierdzenie obecności swoistych przeciwciał dla *B. burgdorferi*, przedstawiono na ryci-



**Ryc. 5.** Wybrane przykłady Western-blotów wykonane jako test potwierdzenia obecności przeciwciał przeciwko antygenom *Borrelia burgdorferi* we frakcji  $\gamma$  z osadu PEG.

**Fig. 5.** Selected examples of Western-blot results done as a confirmatory test for the presence of anti-*Borrelia burgdorferi* antibodies in fraction  $\gamma$  from PEG sediment.

nie 5, a częstość występowania przeciwciał dla poszczególnych antygenów *B. burgdorferi* klasy IgG i IgM na rycinie 6.

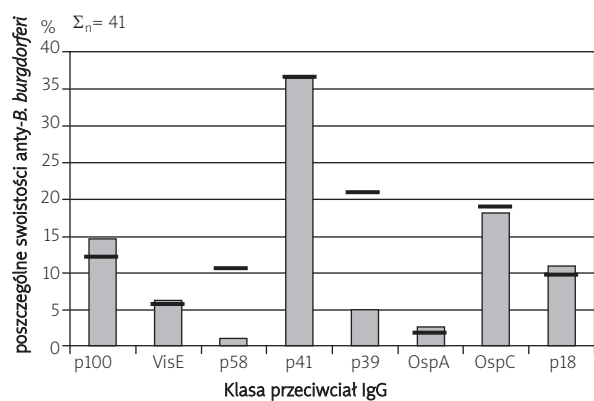
W klasie IgG dominowały przeciwciała dla antygenów: p41 (36,6%), OspC (18,3%), p18 (11%), p100 (14,6%), a częstość obecności przeciwciał dla pozostałych czterech antygenów waha się od 1% do 6%. Częstość występowania przeciwciał we frakcji  $\gamma$  z osadu PEG dla poszczególnych antygenów *B. burgdorferi* (dla klasy IgM) nie różniła się istotnie od częstości występowania surowiczych przeciwciał dla klasy IgG, ale z uwagi na małą liczbę (5 przypadków) frakcji  $\gamma$  dodatnich w klasie IgM, danych nie umieszczono w tabeli. Porównano także zależność liczby wyników dodatnich (%) we frakcji  $\gamma$  z osadu PEG-6000 w zależności od ilości białka w tym osadzie (ryc. 7). W grupie frakcji  $\gamma$  z osadu PEG, gdzie uzyskano wartości przeciwciał dla *B. burgdorferi* wyższe od 15 BBU, uzyskano 50% potwierdzeń, natomiast w pozostałych obu grupach (słabo dodatnie i +/-) uzyskano odpowiednio 47,8%. Odsetek wyników dodatnich dla przeciwciał przeciwko *B. burgdorferi* we frakcji  $\gamma$  z osadu PEG nie korelował z poziomami krążących kom-

pleksów immunologicznych, tj. ze stężeniem białka we frakcji  $\gamma$  z osadu PEG.

## Dyskusja

O tym, że serodiagnostyka boreliozy jest trudnym problemem, nie trzeba już właściwie nikogo przekonywać; wiedzą o tym zarówno lekarze, jak i pacjenci, a w szczególności diagnosty laboratoryjni zajmujący się serodiagnostyką chorób zakaźnych. Pośrednio świadczą o tym liczne publikacje badań eksperymentalnych oraz przeglądowych dotyczących tego zagadnienia, także w piśmiennictwie polskim [12, 13].

Prawidłowo prowadzona serodiagnostyka choroby z Lyme powinna brać pod uwagę bardzo wiele czynników, których nieuwzględnienie powoduje pojawienie się błędnych wyników badań serologicznych (zarówno fałszywie dodatnich, jak i fałszywie ujemnych). Prowadzi to w konsekwencji do niepotrzebnej, nieobojętnej dla organizmu pacjenta antybiotykoterapii w przypadku wyników fałszywie dodatnich lub, co gorsza, w przypadku wyników fałszywie ujemnych do zaniechania terapii lub ewentualnie tylko



— odsetek przeciwciał anti-B. burgdorferi we frakcji  $\gamma$  z osadów PEG  
 — odsetek przeciwciał anti-B. burgdorferi w surowicach z diagnostyki rutynowej

**Ryc. 6.** Częstość występowania przeciwciał dla poszczególnych swoistości *Borrelia burgdorferi* oznaczone metodą Western-blot w frakcji  $\gamma$  z osadu PEG.

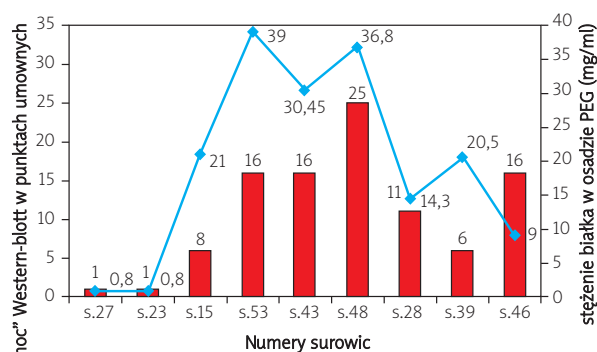
**Fig. 6.** Percentage of antibodies to particular specific antibodies to *Borrelia burgdorferi* determined by the Western-blot method in  $\gamma$  fraction from PEG sediment.

leczenia objawowego pacjenta z pominięciem eradykacji czynnika etiologicznego, jakim jest krętek *Borrelia burgdorferi sensu lato* [dane nieopublikowane, 14].

Serodiagnostyka chorób reumatycznych i zakaźnych opiera się na potwierdzeniu obecności tzw. przeciwciała „markerowego” (ewentualnie grupy przeciwciał) o wysokiej swoistości w stosunku do antygeny potencjalnego czynnika etiologicznego. Ponadto wartość diagnostyczną przeciwciała „markerowego” zwiększa korelacja jego poziomów ze stanem klinicznym (nasileniem objawów), duża zaś dynamika miana pozwala wnioskować o skuteczności zastosowanej terapii [15].

W chorobach zakaźnych izotyp (klasa IgM czy IgG) swoistego przeciwciała jest wskaźnikiem fazy bądź aktywności zakażenia, ale już nie jest wskaźnikiem pozwalającym rozróżnić fazy aktywnego zakażenia od zakażenia przebytego w przeszłości, zwłaszcza w przypadku zakażenia *B. burgdorferi* [6].

Wyniki fałszywie dodatnie są często efektem „mimikry antygenowej”, czyli podobieństwa antygenowego, która jest zjawiskiem dość powszechnym wśród czynników zakaźnych i prowadzi do występowania w krążeniu przeciwciał reagujących krzyżowo. Zjawisko to jest szczególnie nasilone w przypadku *B. burgdorferi*, gdyż przeciwciała reagujące krzyżowo z niektórymi antygenami *B. burgdorferi* występują także w przypadku zakażenia *Treponema pallidum*, *Ehrlichia* czy wirusami *Herpes* [6]. Z innych przyczyn



**Ryc. 7.** Porównanie stężenia białka we frakcji  $\gamma$  z osadu PEG (kolor niebieski) z „mocą” blotu (wyrażoną w punktach umownych – kolor czerwony).  
**Fig. 7.** Comparison of the protein concentration in the  $\gamma$  fraction from PEG sediment (blue colour) with results received by the Western-blot (expressed in relative points – red colour).

należy wymienić hipergammaglobulinemię w przebiegu choroby z autoimmunizacją.

Szczególnie częstą przyczyną wyników fałszywie dodatnich dotyczących testów skriningowych jest brak standaryzacji metody oznaczania przeciwciał *B. burgdorferi*, co prowadzi przy porównaniu dużych grup surowic do > 30% rozbieżności w ocenie seropozytywności analizowanych surowic badanych różnymi testami [13, 16].

Przyczyn występowania wyników fałszywie ujemnych jest więcej i są one zróżnicowane. Pierwszą i podstawową przyczyną jest zbyt pospieszne wykonywanie badań przed serokonwersją (w tzw. okienku serologicznym). Innymi możliwymi przyczynami mogą być: nieuwzględnienie stanu układu odpornościowego pacjenta (nadreaktywność jako wynik defektu układu odpornościowego), zdolności do wewnątrzkomórkowego przeżycia krętków (czy ich form przetrwalnych) lub lokalnej syntezy przeciwciał (płyn mózgowo-rdzeniowy, płyn stawowy) [6]. Zwykle szybkie zastosowanie antybiotykoterapii także może znacznie osłabić powstawanie swoistej odpowiedzi immunologicznej, a tym samym przyczynić się do wzrostu seronegatywności pomimo obecności objawów klinicznych choroby. Wyniki oznaczania swoistości przeciwciał wykonane testami Western-blotting we frakcji  $\gamma$  w pełni potwierdziły słuszność oczekiwań autorów bazujących na doświadczeniach z seronegatywnymi surowicami u chorych z układowymi chorobami tkanki łącznej [8].

Uzyskane metodą Western-blotting potwierdzenie obecności przeciwciał dla *B. burgdorferi* w 50% ujemnych surowic jest wynikiem bardzo obiecującym, gdyż w sposób radykalny zmniejsza liczbę surowic, w których uzyskujemy wyniki fałszywie ujemne.

Dodatkowym potwierdzeniem faktu, że przeciwciała przeciwko *B. burgdorferi* (występujące w KKI) są efektem

związania wolnych przeciwciał w KKI, jest homologia swoistości dla poszczególnych antygenów *B. burgdorferi* w surowicach i we frakcjach  $\gamma$  z tych samych surowic. Ten zaskakująco dobry wynik jednak niewiele wnosi do naszej wiedzy o strukturze i składzie samych kompleksów, ponieważ tą metodą wytrącone są z surowic nie tylko KKI, ale także agregaty immunoglobulin oraz niektóre makroglobuliny surowicze. Stąd metoda ta należy do tzw. nieswoistych antygenowo metod wykrywania KKI.

Opisane doświadczenia, mające na celu wyjaśnienie przyczyn seronegatywności, powinny być uzupełnione analizą składu antygenowego metodami antygenowo swoistymi, to jest takimi, które pozwalają ustalić rzeczywisty skład antygenów występujących w KKI.

Takie postępowanie potwierdziłoby w sposób jednoznaczny wiarygodność zaproponowanych metod i z uwagi na prostotę metodyczną tego podejścia do analizy składu KKI umożliwiłoby wprowadzenie tej techniki do diagnozowania surowic „trudnych” z punktu widzenia analitycznego. Będzie to przedmiotem dalszych badań prowadzonych przez zespół autorów.

## Wnioski

Można zatem zaproponować, przyjmując przedstawione założenia, zmianę podejścia do serodiagnostyki boreliozy z Lyme:

- 1) serodiagnostyka boreliozy rozpoczyna się testem skринingowym (immunofluorescencja pośrednia lub ELISA), a wyniki dodatnie należy potwierdzić testem Western-blotting;
- 2) wynik negatywny testu ELISA nie rozstrzyga o braku choroby z Lyme;
- 3) możliwa jest sekwestracja przeciwciał w KKI i dlatego należy wytrącić je glikolem polietylenowym (PEG-6000) i w osadzie lub we frakcji  $\gamma$  po PEG powtórnie wykonać test Western-blotting.

Zastosowanie ww. procedury w 50–80% wyników ujemnych w teście ELISA (jeśli obecne są KKI) potwierdza obecności przeciwciał dla antygenów *B. burgdorferi* we frakcji  $\gamma$  z osadu PEG-6000.

## Piśmiennictwo

1. Kwiatkowska B. Wczesne zapalenie stawów – diagnostyka. 30. Konferencja Ordynatorów i Kierowników Poradni Reumatologicznych. Rekomendacje postępowania w reumatologii. Materiały konferencyjne, IR, Warszawa 2011; 85-89.
2. Filipowicz-Sosnowska A, Stanisławska-Biernat E, Zubrzycka-Sienkiewicz A. Reumatoidalne zapalenie stawów. Medycyna po Dyplomie 2000, wydanie specjalne; 8-14.
3. von Mühlen CA, Tan EM. Autoantibodies in the diagnosis of systemic rheumatic diseases. Semin Arthritis Rheum 1995; 24: 323-358.
4. Puszczewicz M. Rekomendacje postępowania w odczynowym zapaleniu stawów. 30. Konferencja Ordynatorów i Kierowników Poradni Reumatologicznych. Rekomendacje postępowania w reumatologii. Materiały konferencyjne, IR, Warszawa 2011; 112-115.
5. Noworyta J, Brasse-Rumin M, Budziszewska M, Ząbek J. Występowanie, swoistość i krzyżowa reaktywność przeciwciał antybakteryjnych (*Yersinia* spp., *Salmonella enteritidis*, *Chlamydia trachomatis*, *Borrelia burgdorferi*) oraz ich znaczenie w diagnostyce niesklasyfikowanych zapaleń stawów. Reumatologia 2011; 49: 32-39.
6. Witecka-Knysz E, Klimczak M, Lakwa K i wsp. Borelioza: dlaczego diagnostyka jest tak trudna? Diagnosta Laboratoryjny 2007; kwiecień: 1-4.
7. 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.
8. Palacz A, Ząbek J, Horbacz I, Pyka J. Próba wyjaśnienia przyczyny niepowodzeń w ustaleniu swoistości autoprzeciwciał przeciwdziałowych w surowicach ANA-dodatnich na podstawie analizy poszczególnych swoistości przeciwciał obecnych w krążących kompleksach immunologicznych. Reumatologia 2011; 49: 16-22.
9. Świerczyńska Z, Rduftowska H, Woźniczko-Ostrowska G, Ząbek J. A new method for detection of circulating immune complexes by immunoelectrophoretic analysis. Reumatologia 1979; 17: 269-277.
10. Gazda A, Ząbek J, Romicka AM i wsp. Występowanie przeciwciał antykardiolipinowych w krążących kompleksach immunologicznych u dzieci z młodzieńczym toczniem rumieniowatym układowym i młodzieńczym idiopatycznym zapaleniem stawów. Pol Arch Med Wewn 2008; 118 (Supl.): 14-19.
11. Lisowski J. Metody fizykochemiczne stosowane w immunologii. W: Immunologia praktyczna. Ślopek S (red.). PZWL, Warszawa 1970.
12. Stanisławska-Biernat E. Współczesne podejście do diagnostyki i leczenia boreliozy. Reumatologia 2006; 44: 57-60.
13. Hermanowska-Szpakowicz T, Świerzyńska R i wsp. Aktualne możliwości diagnostyki boreliozy z Lyme. Pol Merk Lek 2000; 43: 69-71.
14. Koprowska-Legatowicz M, Gziut A, Jezierski J i wsp. Borelioza serca – gorzka lekcja czy spóźniony sukces diagnostyczny? Opis przypadku. Kardiologia Pol 2007; 65: 1228-1230.
15. Ząbek J. Nowoczesne metody diagnostyki autoprzeciwciał. Reumatologia 2003; 41:12-24.
16. Chmielewska-Badora J, Cisak E, Wójcik-Fatla A, et al. Correlation of tests for detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato infection in patients with diagnosed borreliosis. Ann Agric Environ Med 2006; 13: 307-311.