

## Ocena wartości serodiagnostyki bakteriologicznej u chorych na niesklasyfikowane zapalenie stawów

Część III. Metoda immunoenzymatyczna (ELISA) jako test skriningowy w diagnostyce serologicznej zapaleń stawów o podejrzewaną etiologię *B. burgdorferi*; krzyżowa reaktywność przeciwciał dla *B. burgdorferi* z *S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *Y. enterocolitica* O3 i *Ch. trachomatis*

*Evaluation of bacteriological serodiagnostics in patients with undifferentiated arthritis*

Part III. *Immunoenzymatic method (ELISA) as a screening test in serodiagnosis of joint inflammation of suspected B. burgdorferi aetiology: cross-reactivity of antibodies to B. burgdorferi with S. enteritidis, S. typhimurium, Y. enterocolitica O3 and Ch. trachomatis*

Jacek Noworyta, Maria Brasse-Rumin, Jakub Ząbek

Zakład Mikrobiologii i Serologii Instytutu Reumatologii im. prof. dr hab. med. Eleonory Reicher w Warszawie, kierownik Zakładu dr hab. biol. Jakub Ząbek, dyrektor Instytutu prof. dr hab. med. Sławomir Maśliński

**Słowa kluczowe:** krzyżowa reaktywność, przeciwciała, test skriningowy.

**Key words:** cross reactivity, antibodies, screening test.

### Streszczenie

Dokonano analizy 1915 wyników badania surowic na obecność przeciwciał dla *Borrelia burgdorferi* uzyskanych od chorych hospitalizowanych w Instytucie Reumatologii, konsultowanych w Poliklinikach oraz zleczanych przez inne placówki medyczne i osoby prywatne. Badania były prowadzone w latach 2004–2006.

Zastosowano metodę ELISA zalecaną jako skriningową w wykrywaniu przeciwciał klasy IgG i IgM dla *B. burgdorferi*, których obecność mogłaby sugerować etiologię infekcyjną niesklasyfikowanego zapalenia stawów.

Stwierdzono zdecydowanie najczęstsze zlecenie badań u dzieci i młodzieży hospitalizowanych w Instytucie Reumatologii (ponad 60%), które nie korelowało proporcjonalnie z wykrywalnością tych przeciwciał (ok. 15%). Najczęściej (u ponad 30% pacjentów) przeciwciała były stwierdzane (niezależnie od klasy Ig) u pacjentów obu wówczas funkcjonujących Poliklinik (Dzieci i Dorosłych) oraz u pacjentów cierpiących na kardiomiopatię rozstrzeniową. W kardiomiopatiach stwierdza się w preparatach wycinków serca chorych pewien rodzaj krętków, które objęto badaniami diagnostycznymi w ramach współpracy naukowej z Zakładem Anatomii Patologicznej Instytutu Reumatologii.

### Summary

Serum antibodies to *Borrelia burgdorferi* in 1850 cases of patients hospitalized in the Institute of Rheumatology, consulted by physicians in Outpatient Clinics and also ordered by other medical units, were done in the years 2004–2006.

As a screening test, the ELISA method was applied for indication of antibodies IgG and IgM class against *B. burgdorferi*, and presence of these antibodies may suggest the infectious aetiology of analyzed unclassified joint inflammation.

The majority of the ordered tests (over 60% of all orders) in cases of children and teenagers (hospitalized in the Institute of Rheumatology) originated from the Paediatric Clinic and Paediatric Outpatient Clinic, and there was no correlation (relation) between ordered amount of assays and number of positive results (about 15%) of all ordered (requested) tests. Most frequently (in about 30% of tested samples) these antibodies are confirmed (independently of Ig-s class) in the sera of patients originating from Adult and Children Outpatient Clinics and also in the sera of patients suffering cardiomyopathy, in which (in cardiomyobiopsics) some kinds of spirochetes were discovered (done as part of scientific cooperation with the Department of Pathological Anatomy).

### Adres do korespondencji:

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

Praca wpłynęła: 3.08.2009 r.

Wykrywane przeciwciała stwierdzano najczęściej jedynie w klasie IgM (66,2%), rzadziej jedynie w klasie IgG (25%) i zaledwie w ok. 9% w obu klasach jednocześnie. Dowodzić to mogło ewentualnie wczesnego etapu infekcji z powikłaniami stawowymi u większości pacjentów ze stwierdzonymi przeciwciałami.

Znaczny odsetek surowic (ok. 25%) wykazywał krzyżową reaktywność z innymi badanymi drobnoustrojami, tj. *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Yersinia enterocolitica* O3 i *Chlamydia trachomatis*, wskazując na częstą nieprzydatność metody skriningowej, ponieważ dodatnie wyniki bezwzględnie powinny być potwierdzone bardzo swoistą metodą Western-blot. Jednocześnie współwystępowanie przeciwciał dla innych drobnoustrojów sugeruje nadkażenie lub uprzednią infekcję, zwłaszcza w przypadku odmiennych klas Ig, stwierdzanych dla różnych drobnoustrojów.

Uzyskane wyniki dowodzą, że w każdym przypadku należy interpretować seropozytywność, zawsze uwzględniając stan kliniczny pacjenta, i przeprowadzać diagnostykę różnicową w kierunku innych schorzeń o obrazie klinicznym stwierdzanym w boreliozie.

Mimo że borelioza jest układową infekcyjną chorobą z różnorodnymi objawami klinicznymi [1], dla reumatologów jej rozpoznanie ma kluczową wartość z uwagi na skuteczność jej leczenia, w tym w większości przypadków przy zastosowaniu odpowiedniej antybiotykoterapii [2–4].

Czynnikami etiologicznymi są krętki *Borrelia burgdorferi sensu lato*, w skład którego wchodzi m.in. genogatunki patogenne: *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. afzelii*, *B. garinii*. Uważa się, że te genogatunki są odpowiedzialne za 3 etapy boreliozy (choroby z Lyme):

- 1) etap wczesny z *erythema chronicum migrans* (EM), wywołany głównie przez *B. afzelii*, występujący średnio po 4–6 tyg. od ukąszenia przez kleszcza,
- 2) etap drugi z klinicznymi objawami (po 1–12 mies. od ukąszenia) *lymphocytic meningoradiculitis*, *neuroboreliosis* (odpowiedzialny *B. garinii*),
- 3) etap trzeci głównie z objawami: *chronic progressive encephalomyelitis*, *acrodermatitis chronica atrophicans* (ACA) i *chronic arthritis*, występującymi po kilku miesiącach do kilku lat (odpowiedzialny zwłaszcza *B. burgdorferi sensu stricto*).

Wczesna diagnostyka [5–7] tej choroby ma więc ogromne znaczenie i jest oparta głównie na:

- objawach klinicznych,
- wywiadzie epidemiologicznym,
- wynikach testów laboratoryjnych.

Metody stosowane w diagnostyce laboratoryjnej boreliozy dzielą się na bezpośrednie, wykonywane w wyspecjalizowanych placówkach, które mogą hodować krętki *B. burgdorferi* z tkanek i płynów ustrojowych [8, 9], stosować mikroskopie w ciemnym polu widzenia (cpw) i/lub metodą reakcji łańcuchowej polimerazy (*polymerase chain reaction* – PCR) [10, 11]. Metodami pośrednimi moż-

Assessed antibodies were most frequently IgM class (66.2%), only rarely IgG class (around 25%), and only in 9% both classes. These results may be considered as an early stage of infection with joint involvement in the majority of patients seropositive for *anti-Borrelia burgdorferi* antibodies.

We also observed a high cross-reactivity (around 25%) with antigens of other bacteria such as: *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Yersinia enterocolitica* O3 and *Chlamydia trachomatis* and this phenomenon of cross-reactivity indicates very limited value of the screening method, because all positive results should be confirmed by a specific Western blot method.

At the same time, co-appearance of antibodies to other bacteria suggests co-infection or possibly former infection, especially in cases with presence of antibodies to two different classes directed at different microbes (bacteria).

The obtained results may be considered as proof that in any case seropositivity should be necessarily interpreted with regard to the clinical studies of particular patients and also differential diagnosis, taking into consideration other diseases giving a similar clinical picture, as in borreliosis.

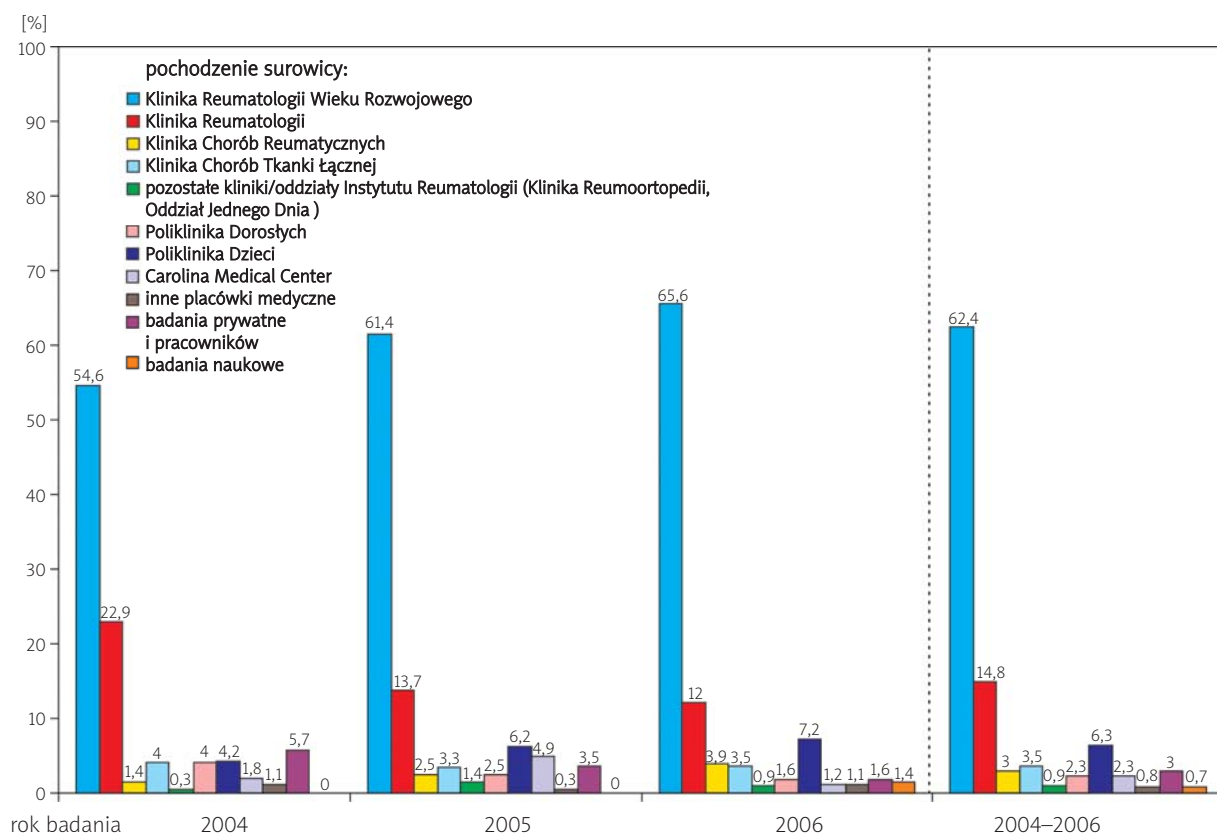
na wykrywać swoiste przeciwciała klasy IgG i IgM w surowicy i płynie mózgowo-rdzeniowym, najlepiej dwustopniowo, tj. testem skriningowym ilościowym (ELISA, IFT) [12–17], zawierającym antygeny rekombinowane, oraz jakościowym – potwierdzającym, tj. Western-blot z poszczególnymi frakcjami antygenów rekombinowanych [18, 19].

Celem pracy była ocena testu skriningowego ELISA w wykrywaniu przeciwciał surowicznych dla *B. burgdorferi* oraz analiza retrospektywna dotycząca krzyżowej reaktywności przeciwciał z innymi badanymi antygenami drobnoustrojów ewentualnie odpowiedzialnych za nieklasyfikowane zapalenia stawów. Dotyczyło to *Yersinia enterocolitica* O3, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium* oraz *Chlamydia trachomatis*, drobnoustrojów, którymi najczęściej krajowi reumatolodzy są zainteresowani w różnicowaniu odczynowych zapaleń stawów.

## Materiał i metody

Materiał do badań na obecność przeciwciał dla *B. burgdorferi* stanowiło 1918 surowic uzyskanych od 1850 osób. Pochodziły one od pacjentów zarówno hospitalizowanych w Instytucie Reumatologii, konsultowanych w Poliklinikach Instytutu Reumatologii i konsultowanych w innych placówkach medycznych (głównie Carolina Medical Center) oraz od osób prywatnych i – częściowo – pracowników Instytutu Reumatologii. Szczegółowe dane przedstawiono na rycinie 1. Okres retrospektywnych analiz dotyczył lat 2004–2006.

Obecność przeciwciał oznaczano metodą ELISA, przy użyciu testu firmy Biomedica. W zasadzie przeciwciała dotyczyły *B. burgdorferi sensu lato*, dołki mikroplastyki opłaszczane były bowiem następującymi antygenami rekombinowanymi, w przypadku oznaczania przeciwciał klasy IgM: OspC (p 21) – zewnętrzne białka powierzch-



Ryc. 1. Odsetek badań na obecność przeciwciał w surowicy dla *B. burgdorferi*, zleczanych przez poszczególne kliniki, oddziały Instytutu Reumatologii, placówki medyczne oraz osoby prywatne w latach 2004–2006.

Fig. 1. Percentages of tests for presence of antibodies against *B. burgdorferi* commissioned by particular Clinics, Divisions and medical centers Institute of Rheumatology and individual persons in years 2004–2006.

niowe genogatunków – *B. afzelii* oraz *B. garinii*, VLSE – białko fuzyjne różnych genogatunków, p 41 – wewnętrzny fragment flagelliny *B. garinii*.

W przypadku oznaczania przeciwciał klasy IgG antygenami rekombinowanymi opłaszczającymi dołki mikroptyki były: OspC – j.w., p 18 (*B. afzelii*), p 100 (*B. afzelii*) oraz VLSE j.w.

Przeciwciała oznaczano w dwóch klasach ilościowo, gdzie absorbcja standardu *cut off* odzwierciedla wartość 10 BBU/ml (*Biomedica Borrelia Units*), co jest podstawą obliczenia wyników: OD próbki badanej/OD kontroli *cut off* × 10 = BBU/ml.

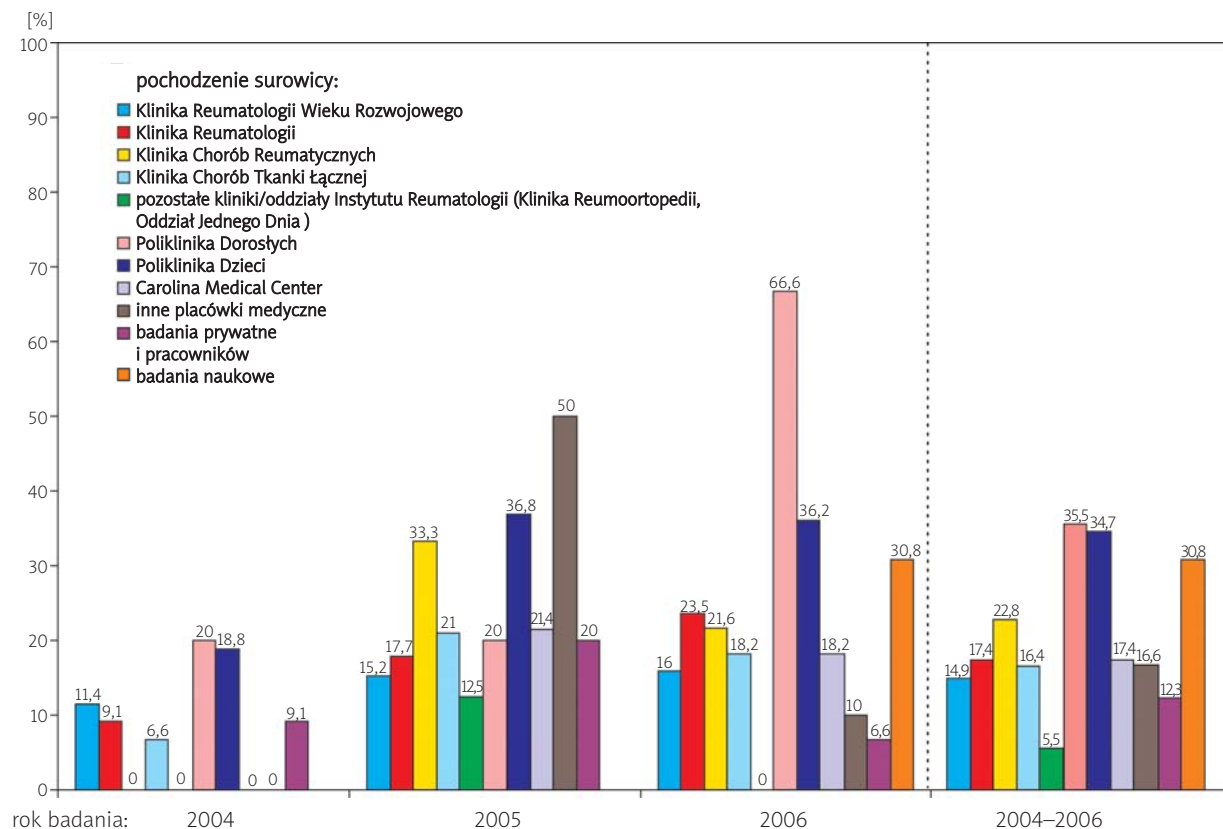
Za wynik mało dodatni uważa się próbki surowicy o wartościach 11–20 BBU/ml, wysoko dodatni 21–30 BBU/ml, a bardzo wysoko dodatni > 30 BBU/ml. Próbkę o wartości 9–11 BBU/ml uważano za wynik wątpliwy, sugerujący powtórzenie badania z nowo pobraną próbką surowicy.

## Wyniki

Na rycinie 1 przedstawiono szczegółowo liczbę (odsetki) badań zleczanych przez poszczególne Kliniki i Poli-

kliniki Instytutu Reumatologii, inne placówki medyczne oraz osoby prywatne i próby diagnostyczne wykorzystane do celów naukowych. Z danych tych wynika, że zdecydowanie najczęściej, zarówno w poszczególnych latach, jak i w całym analizowanym okresie (2004–2006), zlecenia badań dotyczyły Kliniki Reumatologii Wieku Rozwojowego (ponad 60%), a następnie Kliniki Reumatologii (ok. 15%, a nawet 23% w 2004 r.). Pozostałe zlecenia świadczyły o marginalności zainteresowania badaniami poszczególnych placówek medycznych w kierunku obecności przeciwciał dla *B. burgdorferi*.

W kontekście liczby zleczanych badań interesujące wyniki (ryc. 2) dała analiza odsetka rezultatów dodatnich na obecność surowicznych przeciwciał zarówno w poszczególnych latach, jak i średnio w całym okresie badawczym. O ile średni procent wyniósł 16,5, o tyle zdecydowanie najwyższy, powyżej 30%, był stwierdzony u pacjentów Polikliniki Dorosłych, Polikliniki Dziecięcej oraz u osób objętych badaniami doświadczalnymi (Zakład Anatomii Patologicznej). Zdecydowanie najmniej wyników dodatnich (5,5%) stwierdzono u 18 pacjentów Kliniki Reumortopedii i Oddziału Jednego Dnia. Podkreślić należy, że



**Ryc. 2.** Odsetek wyników dodatnich w surowicy na obecność przeciwciał (niezależnie od klasy Ig) dla *B. burgdorferi* spośród badań zleczanych przez poszczególne kliniki, oddziały Instytutu Reumatologii, placówki medyczne oraz osoby prywatne w latach 2004–2006

**Fig. 2.** Percentages of positive results for presence of serum antibodies (independently of antibody class) against *B. burgdorferi*, between test commissioned by particular Clinics, Divisions and medical centers Institute of Rheumatology and individual persons in years 2004–2006

na najwyższy procent (35,5%) wyników dodatnich, wykazany wśród pacjentów Polikliniki Dorosłych, wpłynął ostatni rok analizy (2006 r.), w którym stwierdzono aż 66,6% wyników dodatnich. Z analizy wynika, że zdecy-

dowana przewaga zleceń badań z Kliniki Reumatologii Wiekowej nie korespondowała z liczebnością wykrytych przeciwciał (niezależnie od klasy Ig).

Określenie obecności przeciwciał obu klas (IgG i IgM) dla *B. burgdorferi*, istotnie diagnostycznie, wykazało zdecydowaną przewagę przeciwciał wyłącznie klasy IgM, sięgającą średnio 66% wyników dodatnich (tab. I), a klasy wyłącznie IgG – 25%. Obie klasy przeciwciał stwierdzano w ok. 9% analizowanych surowic.

Z uwagi na liczne nieswoiste reakcje krzyżowe i fałszywie dodatnie wyniki w skriningowej metodzie ELISA, mimo wprowadzania antygenów rekombinowanych, dokonano szczegółowej analizy obecności współwystępujących przeciwciał obu ww. klas dla *B. burgdorferi* oraz często jednocześnie badanych: *S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *Y. enterocolitica* O3 i *Ch. trachomatis*. Punktem odniesienia było 191 surowic, w których wykryto przeciwciała dla *B. burgdorferi*, a które jednocześnie zgodnie ze zleceniami były badane na obecność wszystkich i/lub niektórych przeciwciał dla ww. drobnoustrojów.

**Tabela I.** Współwystępowanie przeciwciał klas IgG i IgM dla *B. burgdorferi* w surowicach pacjentów badanych w latach 2004–2006

**Table I.** Co-appearance of antibodies IgG and IgM class against *B. burgdorferi* in the sera of patients hospitalized or analyzed in years 2004–2006

Obecność przeciwciał	Procent surowic z odpowiednią klasą przeciwciał w badaniu z danego roku			
	2004	2005	2006	2004–2006
IgG– IgM+	63,2	61,9	69,6	66,3
IgG+ IgM–	34,2	29,5	20,1	24,9
IgG+ IgM+	2,6	8,6	10,3	8,8

**Tabela II.** Obecność współwystępujących przeciwciał (różnych klas) dla *B. burgdorferi* oraz *S. enteritidis* i *S. typhimurium*, *Y. enterocolitica* O3 i *Ch. trachomatis* w grupach surowic zleczanych do badań serologicznych w latach 2004–2006 (n = 191, liczba surowic z obecnością przeciwciał dla *B. burgdorferi*)

**Table II.** Co-appearance of serum antibodies (of different class) against *S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *Y. enterocolitica* O3 and *Ch. trachomatis* in the group of patients directed to serological testing in the years 2004-2006

Surowice zlecane do badań serologicznych w kierunku obecności przeciwciał dla:	Liczba surowic	Liczba surowic ze stwierdzonym współwystępowaniem przeciwciał (klas)
<i>B. burgdorferi</i> + + <i>S. enteritidis</i> / <i>S. typhimurium</i> + <i>Y. enterocolitica</i> O3	99	<i>Borrelia</i> /M+/ <i>Yersinia</i> M+ – 3 surowice <i>Borrelia</i> /M+/ <i>S. typhimurium</i> M+ – 3 surowice <i>Borrelia</i> /G+/ <i>Yersinia</i> G+ – 1 surowica <i>Borrelia</i> /M+/ <i>S. enteritidis</i> M+ <i>S. typhimurium</i> M+ – 3 surowice <i>Borrelia</i> /G+/M+/ <i>S. enteritidis</i> G+ M+ – 1 surowica <i>Borrelia</i> /M+/ <i>S. enteritidis</i> M+ <i>S. typhimurium</i> M+ <i>Yersinia</i> M+ – 1 surowica <i>Borrelia</i> /G+/ <i>S. enteritidis</i> G+ – 1 surowica <i>Borrelia</i> /G+/ <i>S. enteritidis</i> G+ <i>S. typhimurium</i> G+ – 1 surowica <i>Borrelia</i> /G+/ <i>S. typhimurium</i> A+ – 1 surowica <i>Borrelia</i> /M+/ <i>Yersinia</i> G+ – 1 surowica <i>Borrelia</i> /M+/ <i>S. enteritidis</i> G+ – 5 surowic <i>Borrelia</i> /G+/ <i>S. enteritidis</i> M+ <i>S. typhimurium</i> A+ – 1 surowica <i>Borrelia</i> /M+/ <i>S. enteritidis</i> G+ <i>S. typhimurium</i> G+ – 1 surowica <i>Borrelia</i> /G+/ <i>S. typhimurium</i> M+ – 1 surowica
<i>B. burgdorferi</i> + + <i>S. enteritidis</i> / <i>S. typhimurium</i> + <i>Y. enterocolitica</i> O3 + <i>Ch. trachomatis</i>	50	<i>Borrelia</i> /G+/ <i>S. enteritidis</i> G+ – 3 surowice <i>Borrelia</i> /M+/ <i>S. enteritidis</i> M+ – 2 surowice <i>Borrelia</i> /G+ <i>Chlamydia</i> G+ – 1 surowica <i>Borrelia</i> /G+ M+ <i>S. typhimurium</i> M+ <i>Ch. G+</i> – 1 surowica <i>Borrelia</i> /M+ <i>S. enteritidis</i> M+ <i>S. typhimurium</i> M+ – 1 surowica <i>Borrelia</i> /G+ <i>S. typhimurium</i> M+ <i>Yersinia</i> M+ – 1 surowica <i>Borrelia</i> /M+ <i>Chlamydia</i> G+ – 3 surowice <i>Borrelia</i> /M+ <i>Yersinia</i> G+ <i>Chlamydia</i> G+ – 1 surowica <i>Borrelia</i> /M+ <i>S. enteritidis</i> G+ – 3 surowice <i>Borrelia</i> /M+ <i>Yersinia</i> G+ – 1 surowica <i>Borrelia</i> /M+ <i>Chlamydia</i> A+ G+ – 1 surowica
<i>B. burgdorferi</i> + <i>Y. enterocolitica</i> O3	25	<i>Borrelia</i> /M+ <i>Yersinia</i> M+ – 1 surowica
<i>B. burgdorferi</i> + <i>S. enteritidis</i> / <i>S. typhimurium</i> + <i>Ch. trachomatis</i>	7	<i>Borrelia</i> /M+ <i>S. typhimurium</i> M+ – 1 surowica <i>Borrelia</i> /M+ <i>Chlamydia</i> A+ – 1 surowica
<i>B. burgdorferi</i> + <i>Ch. trachomatis</i>	4	<i>B. burgdorferi</i> M+/ <i>Ch. trachomatis</i> G+ – 1 surowica
<i>B. burgdorferi</i> + <i>Y. enterocolitica</i> O3 + <i>Ch. trachomatis</i>	3	<i>B. burgdorferi</i> M+/ <i>Ch. trachomatis</i> G+ – 1 surowica
<i>B. burgdorferi</i> + <i>S. enteritidis</i> / <i>S. typhimurium</i>	3	brak współwystępujących przeciwciał

I tak, najczęściej zlecano badania serologiczne surowic w kierunku *B. burgdorferi* + obu gatunków *Salmonella* i *Y. enterocolitica* O3. W tej grupie 99 surowic (tab. II) stwierdzono wyniki dodatnie na obecność przeciwciał (różnych klas) dla *B. burgdorferi*, ale równocześnie, w tych samych klasach co *B. burgdorferi*, wykazano przeciwciała dla pozostałych ww. drobnoustrojów, w tym dla jednego gatunku – w 8 surowicach, dla dwóch w 5 surowicach, a dla trzech w 1 surowicy. W sumie w tej grupie

surowic jednoczesne współwystępowanie w tych samych klasach stwierdzono w 14 surowicach, co stanowiło 14,1%.

Analiza przeciwciał o odmiennych klasach wykazała obecność 10 surowic ze współwystępującymi przeciwciałami dla *Salmonella* i/lub *Y. enterocolitica* O3 w tej grupie 99 surowic, co stanowiło 10,1%. W sumie zatem podejrzaną krzyżową reaktywność przeciwciał wykazano w 24,2% surowic jednocześnie badanych w kierunku *B. burgdorferi*, *Salmonella* i *Y. enterocolitica* O3.

**Tabela III.** Liczba (%) surowic dodatnich na obecność przeciwciał dla *B. burgdorferi* ( $n = 191$ ) oraz dla poszczególnych pozostałych badanych drobnoustrojów

**Table III.** Number (and percentages) of sera positive for *B. burgdorferi* antigens ( $n = 191$ ) and for other particular tested bacteria

	Przeciwiata tych samych klas		Przeciwiata różnych klas	
	Przeciwiata dla <i>B. burgdorferi</i>			
	liczba surowic	%	liczba surowic	%
+ <i>S. enteritidis</i>	13	6,8	10	5,2
+ <i>S. typhimurium</i>	11	5,8	5	2,6
+ <i>Y. enterocolitica</i> O3	6	3,1	4	2,1
+ <i>Ch. trachomatis</i>	2	1,1	8	4,2
razem	32	16,8	27	14,1

O ile w tych samych klasach przeciwciał występowały najczęściej jednocześnie przeciwiata dla *B. burgdorferi* + *S. typhimurium* (8 surowic), o tyle w różnych klasach dla *B. burgdorferi* + *S. enteritidis* (7 surowic).

Drugą stosunkowo liczną grupą surowic (50) były surowice dodatnie na obecność przeciwciał dla *B. burgdorferi*, badane również w kierunku wszystkich 4 pozostałych przeciwciał. Analiza (tab. II) wykazała, że spośród tych 50 surowic – 8 wykazywało jednoczesną obecność przeciwciał dla innych niż *B. burgdorferi* drobnoustrojów w tych samych klasach, co stanowiło 16%. W różnych klasach przeciwciał stwierdzono jednoczesną obecność innych przeciwciał niż dla *B. burgdorferi* w 10 surowicach, tj. w 20%. W sumie krzyżową reaktywność przeciwciał w tej grupie zleconych do badań surowic wykazano w 26%. W tych samych klasach przeciwciał dominowały przeciwiata dla *B. burgdorferi* + *S. enteritidis* – 6 surowic, a w różnych klasach przeciwciał dla *B. burgdorferi* + *Ch. trachomatis* – 5 surowic.

Wyniki zbiorcze dotyczące krzyżowej reaktywności przeciwciał dla *B. burgdorferi* z przeciwiatami dla pozostałych analizowanych drobnoustrojów przedstawiono w tabeli III.

## Dyskusja

Mimo że okres analizy badań w kierunku obecności przeciwciał dla *B. burgdorferi* dotyczył lat 2004–2006, to liczba ich z roku na rok systematycznie rosła, osiągając 626 w 2006 r. W 2008 r. (dane nieopublikowane) była ona ok. 2,5 razy wyższa. Wynika to – jak podejrzewają autorzy pracy – nie tylko z sytuacji epidemiologicznej w Polsce, zwłaszcza centralnej, ale głównie z coraz większego zainteresowania klinicystów diagnozowa-

niem niesklasyfikowanych zapaleń stawów w aspekcie ich ewentualnego czynnika etiologicznego, którym mogłyby być genogatunki krętków *B. burgdorferi sensu lato* przenoszone przez kleszcze z rodzaju *Ixodes*.

Borelioza jest schorzeniem wielonarządowym, trudnym do zdiagnozowania, zwłaszcza w przypadkach braku w wywiadzie lekarskim wyraźnego stwierdzenia faktu ukąszenia przez kleszcza. Jej objawy w postaci choroby reumatycznej, w tym choroby z Lyme, występują stosunkowo rzadko i przeważnie dotyczą okresu późniejszego. Chodzi głównie o dzieci, u których występuje mało charakterystyczny przebieg choroby w wieku rozwojowym oraz trudności w zebraniu wywiadu, w tym przeoczenie momentu ukąszenia przez kleszcza; pojawiające się objawy chorobowe, w tym stawowe, mogą być mylnie wiązane z innym czynnikiem sprawczym. Dlatego prawdopodobnie pediatrzy reumatolodzy Instytutu Reumatologii (zob. ryc. 1) zdecydowanie częściej w porównaniu z innymi zlecają badania w kierunku serodiagnostyki boreliozy, mimo że w piśmiennictwie [20] podkreśla się u dzieci w porównaniu z dorosłymi mniejszą częstość występowania zmian narządowych, zwłaszcza stawowych.

Zapalenia stawów, szczególnie pojedynczych, są opisywane bardzo często u dorosłych, zarówno we wczesnej, jak i późnej fazie choroby. Dlatego nieco zaskakujące dla autorów pracy było zlecenie przez Klinikę Reumatologii Wieku Rozwojowego w analizowanym okresie (2004–2006) badań serologicznych w kierunku boreliozy o charakterze stawowym w odsetkach przekraczających 60% ogółu zleceń pozostałych klinik, oddziałów i innych placówek (ryc. 1). Jedną z głównych przesłanek tego faktu prawdopodobnie było poszuki-

wanie przez pediatrów odczynowych zapaleń stawów o ewentualnym podłożu infekcyjnym, czego dowodem były najczęściej zlecane badania jednocześnie w kierunku serodiagnostyki jersiniozy i salmoneloz [21, 22]. W grę wchodziła też obawa przed prawdopodobnymi konsekwencjami nierozpoznania boreliozy o cięższych skutkach, np. objawów neurologicznych.

Analizując wyniki badań na obecność przeciwciał w surowicy dla *B. burgdorferi* (niezależnie od klasy Ig) (ryc. 2), zauważono dużą rozbieżność. Większość wyników dodatnich była wykrywana w 10–20%, w zależności od pochodzenia, ale zauważono zdecydowanie częstszą wykrywalność (> 30%) w surowicach pochodzących od pacjentów obu poliklinik (dorostych i dzieci) oraz dostarczanych do badań naukowych. Nasuwa się pytanie o przyczynę tak znacznych różnic w wykrywalności przeciwciał dla *B. burgdorferi*. Czyżby w grę wchodziła częściowo wnikliwość i trafność wywiadu lekarskiego, a nie zbyt rutynowe zlecenie badań? Serologiczna diagnostyka boreliozy, zwłaszcza przy zastosowaniu jedynie przesiewowej metody ELISA, jest obarczona wieloma zastrzeżeniami doprowadzającymi do fałszywie dodatnich i ujemnych wyników [6]. Fałszywie dodatnie wyniki mogą osiągać kilkanaście procent w przypadku przeciwciał klasy IgG, a nawet 40% w przypadku przeciwciał klasy IgM. Ich czynnikiem sprawczym mogą być reakcje krzyżowe w przypadku infekcji, np. krętkiem *Treponema pallidum*, wirusami *Herpes* (zwłaszcza Epsteina-Barr) i innych mikroorganizmów, w tym pałeczkami *Enterobacteriaceae*. Donosi się również o znaczeniu hipergammaglobulinemii w przypadku chorób autoimmunologicznych, chorób tkanki łącznej, w których stwierdza się wysoki poziom przeciwciał dla *B. burgdorferi*, a jednocześnie objawy kliniczne przypominające boreliozę (zapalenie stawów, objawy neurologiczne) [6].

Fałszywie ujemne wyniki w serodiagnostyce boreliozy mogą natomiast wynikać z:

- zbyt wcześnie wykonanego badania (przed upływem 4 tyg. po zakażeniu),
- obecności niewykrywalnych metodą ELISA swoistych kompleksów immunologicznych,
- jedynie lokalnej (w płynie stawowym i PMR) produkcji przeciwciał,
- wpływu antybiotykoterapii w początkowym etapie choroby,
- wewnątrzkomórkowego przebywania krętka *B. burgdorferi*, z którym układ immunologiczny nie ma kontaktu.

Istotnym problemem staje się ocena występowania poszczególnych klas przeciwciał dla *B. burgdorferi*. W niniejszych badaniach, zarówno w poszczególnych latach, jak i ogółem, dominowały w ponad 60% przeciwciała

wyłącznie klasy IgM (tab. I), a następnie jedynie klasy IgG (ok. 20–30%). Wiadomo, że rozwój odpowiedzi immunologicznej w zakażeniu *B. burgdorferi* przebiega w kilku etapach. Produkcja przeciwciał IgM rozpoczyna się 2–4 tyg. od zakażenia, osiągając najwyższy poziom po 6–8 tyg., a po tym czasie stopniowo ulega serokonwersji do klasy IgG. Niemniej jednak obie klasy przeciwciał, mimo spodziewanego obniżenia poziomu IgM, mogą być wykrywane latami, nawet po okresie skutecznej terapii. Wszelkie zaburzenia reakcji immunologicznych (swoistych i nieswoistych) we wczesnym okresie zakażenia mogą unicestwić skuteczną eradykację patogenu w dalszych etapach odpowiedzi, a zarazem doprowadzić do rozwoju stanu przewlekłego choroby. O ile przeciwciała klasy IgM charakteryzują się małym powinowactwem do antygeny, silnie aktywują dopełniacz, o tyle przeciwciała w klasie IgG stanowią główne immunoglobuliny w walce z patogenem.

Metoda ELISA, wysoce czuły, lecz jedynie przesiewowy test, bezwzględnie powinna być potwierdzana zdecydowanie bardziej swoistym testem immunoblot (Western-blot). Niezależnie od tego, czy w metodzie immunoenzymatycznej stosuje się: preparaty antygenowe całych komórek, białek rekombinowanych, syntetycznych peptydów mających selektywne immunoreaktywne epitopy oraz ich różne kombinacje – to nawet wysokie poziomy przeciwciał często wydają się kontrowersyjne. Również z powodu różnorodności antygenowej poszczególnych gatunków *Borrelia*, preparaty zastosowane w metodzie ELISA powinny obejmować genogatunki występujące na danym obszarze, np. *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. afzelii* i *B. garinii* w Europie [1].

Uważa się, że nie ma potrzeby kontrolnych badań poziomu przeciwciał po zastosowanej antybiotykoterapii z uwagi na długi okres półtrwania immunoglobulin i zatem potencjalnie wydłużoną odpowiedź przeciwciałową [6].

Według Schnarr i wsp. [1] racjonalna diagnostyka przy różnych objawach klinicznych boreliozy z Lyme nawet nie wymaga badań serologicznych w przypadku wystąpienia rumienia wędrującego. W tym okresie autorzy ci zalecają jedynie wykonanie hodowli lub PCR bioptatów skórnych. W przypadku neuroboreliozy badanie serologiczne surowicy i płynu mózgowo-rdzeniowego jest podstawowym testem, a uzupełnić je można hodowlą i PCR płynu mózgowo-rdzeniowego. Zapalenie stawów – to diagnostyka serologiczna surowicy i ewentualnie PCR płynu stawowego lub tkanki synowialnej, a w przypadku *acrodermatitis chronica atrophicans* oprócz badań serologicznych surowicy zaleca się uzupełniającą hodowlę krętków i PCR bioptatów skórnych.

Bardzo niepokojącym zjawiskiem z punktu widzenia zastosowanej diagnostyki serologicznej *B. burgdor-*

feri była – jak stwierdzono również w poprzednich pracach [21, 22] – krzyżowa reaktywność z pozostałymi, badanymi również metodą ELISA, przeciwciałami dla *S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *Y. enterocolitica* O3 i *Ch. trachomatis*. Obniżało to wartość diagnostyczną i stwarzało klinicytom – reumatologom ogromny kłopot w doborze leczenia i określeniu celowości antybiotykoterapii w aspekcie jej skuteczności, wywoływania objawów niepożądanych, ponoszonych kosztów leczenia i wydłużenia czasu pobytu pacjenta w szpitalu (Instytucie). Taka krzyżowa reaktywność miała swoje uzasadnienie w budowie antygenowej ściany komórkowej poszczególnych drobnoustrojów, a zwłaszcza w podstawowych składnikach, tj. LPS, OMP czy LPS-like *B. burgdorferi*. W przypadku *B. burgdorferi* trzeba brać pod uwagę niespotykaną u innych bakterii heterogenność i polimorfizm antygenów [23]. Ogromna liczba (> 100) polipeptydów, antygen białkowy główny – CA, o masie cząsteczkowej 60 kDa, kodowany przez gen homologiczny zarówno dla tego drobnoustroju, jak i innych gatunków bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych, składniki peptydoglikanu, duża liczba lipoprotein, jak również białko p 41 – podjednostka flageliny (wskaźująca na homologię aminokwasów z flagelinami innych krętków) – to tylko część składników odpowiedzialnych za reakcje krzyżowe z przeciwciałami powstałymi po kontakcie z innymi patogenami, w tym krętkami, np. *T. pallidum* czy *Borrelia recurrentis*, wywołującymi dur powrotny.

## Wnioski

1. Zdecydowana przewaga wykrywanych przeciwciał klasy IgM (ok. 66%) nad przeciwciałami IgG (ok. 25%) mogła sugerować wczesny etap ewentualnego zakażenia *B. burgdorferi* w większości przypadków.
2. Wysoka czułość i stosunkowo niska swoistość immunoenzymatycznego testu ELISA w wykrywaniu przeciwciał dla *B. burgdorferi* wyrażała się w ok. 25% krzyżową reaktywnością przeciwciał z innymi drobnoustrojami często badanymi w odczynowych, niesklasyfikowanych zapaleniach stawów. Sprawia to, że metoda ta ma znaczenie wstępne w diagnostyce takich stanów chorobowych i wskazuje, jak bardzo istotne jest wykonywanie testów Western-blot, które dzięki wysokiej swoistości eliminują wyniki fałszywie dodatnie.

## Piśmiennictwo

1. Schnarr S, Franz JK, Krause A, et al. Lyme borreliosis. Best Pract Res Clin Rheum 2006; 20: 1099-1118.
2. Klimczak M, Gładysz M, Ząbek J. Diagnostyka różnicowa Lyme-arthritis z reumatoidalnym zapaleniem stawów. Przegl Epidemiol 2006; 60: 58-59.
3. Przytuła L, Gińdzieńska-Sieskiewicz E, Sierakowski S. Diagnostyka i leczenie boreliozowego zapalenia stawów. Przegl Epidemiol 2006; 60: 125-130.
4. Massarotti E. Lyme arthritis. Med Clin North Am 2002; 86: 297-309.
5. Aguero-Rosenfeld ME, Wang G, Schwartz I, et al. Diagnosis of Lyme borreliosis. Clin Microb Rev 2005; 18: 484-509.
6. Witecka-Knysz E, Klimczak M, Lakwa K i wsp. Borelioza: dlaczego diagnostyka jest tak trudna? Diagnosta Lab 2007; 13: 11-13.
7. Ząbek J. Diagnostyka boreliozy – wytyczne dla ośrodków reumatologicznych. Reumatologia 1999; 39: 25-32.
8. Vormiser 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.
9. Karlsson M, Hovind-Hougen K, Svenungsson B, et al. Cultivation and characterization of spirochetes from cerebro-spinal fluid of patients with Lyme borreliosis. J Clin Microb 1990; 28: 473-479.
10. Karch H, Huppertz HJ, Bohme M, et al. Demonstration of *Borrelia burgdorferi* DNA in urine samples from healthy humans whose sera contain *B. burgdorferi* – specific antibodies. J Clin Microb 1994; 32: 2312-2314.
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. Wilske B, Fingerle V, Herzer P, et al. Recombinant immunoblot in the serodiagnosis of Lyme borreliosis. Comparison with indirect immunofluorescens and enzyme-linked immunosorbent assay. Med Microb Immun 1993; 182: 255-270.
13. Liang FT, Steere AC, Marques AR, et al. Sensitive and specific serodiagnosis of Lyme disease by enzyme-linked immunosorbent assay with a peptide based on an immunodominant conserved region of *Borrelia burgdorferi* VLS. J Clin Microb 1999; 37: 3990-3996.
14. Zajkowska J, Kondrusik M, Grygorczuk S i wsp. Porównanie testów wykrywających przeciwciała przeciw antygenom *Borrelia burgdorferi* opartych na jednym genogatunku (EIA) i antygenach rekombinowanych (ELISA). Przegl Epidemiol 2006; 60: 171-176.
15. Flisiak R, Prokopowicz D. Antibodies against *B. garinii* in diagnosis of Lyme disease. Przegl Lek 2000; 57: 147-149.
16. Flisiak R, Chodyncka B. Antibodies against *Borrelia afzelii* in patients with an early stage of Lyme disease. Wiad Lek 2001; 54: 19-25.
17. Pancewicz SA, Zajkowska JM, Kondrusik M i wsp. Obecność przeciwciał przeciwko *Borrelia burgdorferi* wśród pracowników leśnych w północno-wschodniej Polsce. Med Prakt 1998; 49: 253-259.
18. Zajkowska J, Kondrusik M, Pancewicz S i wsp. Test Western blot z białkiem VLS oraz antygenami „in vivo” w diagnostyce boreliozy z Lyme. Przegl Epidemiol 2006; 60: 177-185.
19. Chmielewska-Badora J, Cisak E, Fatla A. Zastosowanie testu immunoblot w diagnostyce laboratoryjnej boreliozy. Przegl Epidemiol 2006; 60: 192.
20. Andrzejewski A, Woźniakowska-Gęsicka T, Wiśniewska-Ligier M. Odrębności przebiegu zakażenia krętkiem *Borrelia burgdorferi* u dzieci. Przegl Epidemiol 2006; 60: 16-22.



21. Noworyta J, Brasse-Rumin M, Ząbek J. Ocena wartości serodiagnostyki bakteriologicznej u chorych na niesklasyfikowane zapalenie stawów. *Reumatologia* 2008; 46: 115-124.
22. 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.
23. Zaremba ML, Borowski J. *Mikrobiologia lekarska*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 1997; 330.