

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

*Appreciation of value of bacteriological serodiagnostic in patients with undifferentiated arthritis*

Jacek Noworyta, Maria Brasse-Rumin, Jakub Ząbek

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

**Słowa kluczowe:** przeciwciała dla *Yersinia enterocolitica* O3, reakcje krzyżowe.

**Key words:** antibodies to *Yersinia enterocolitica* O3, cross-reactivity.

### Streszczenie

Metody serologiczne, mimo niewątpliwych wad, są podstawowymi i rozpowszechnionymi metodami w diagnozowaniu chorób narządu ruchu o podejrzanym etiologii bakteryjnej.

W pracy dokonano retrospektywnej analizy wyników badań przeprowadzonych w latach 2004–2006 wykrywających przeciwciała przeciwko *Yersinia enterocolitica* O3 w surowicach pacjentów hospitalizowanych i konsultowanych w Instytucie Reumatologii w Warszawie. Zastosowano metodę immunoenzymatyczną (ELISA), materiał stanowiło prawie 3000 surowic. Oceniono również przydatność serodiagnostyczną tych badań w aspekcie reakcji krzyżowych z innymi drobnoustrojami (*Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Borrelia burgdorferi* i *Chlamydia trachomatis*).

Uzyskane rezultaty wskazują na stosunkowo małą wartość diagnostyczną przeprowadzonych badań, ponieważ wykrywana liczba (%) wyników dodatnich na obecność przeciwciał dla chorobotwórczego serotypu O3 *Y. enterocolitica* nie odbiegała ilościowo (średnio 5,5%) od stwierdzanych w zdrowej populacji.

Znaczenie diagnostyczne dodatkowo obniżało jednoczesne występowanie przeciwciał dla ww. drobnoustrojów, różniących się taksonomicznie, formami klinicznymi i wektorami transmisji. W 1/4 dodatnich surowic na obecność przeciwciał dla *Y. enterocolitica* O3 wykazano przeciwciała dla przynajmniej jednego z pozostałych drobnoustrojów.

Analiza badań sugeruje klinicytom reumatologom potrzebę wnikliwego analizowania każdego przypadku chorobowego z dodatnim wynikiem serologicznym (w tym klasy Ig) w zestawieniu z ob-

### Summary

Serological methods, despite their undoubted weakness, are still basic and widely used methods in diagnosis of connective tissue diseases with suspected infectious aetiology.

We present a retrospective analysis of the results, done in years 2004–2006, of a search for the presence of anti-*Yersinia enterocolitica* serotype O3 autoantibodies in the sera of patients hospitalized and/or diagnosed in the Institute of Rheumatology. In the anti-*Yersinia* antibody assessment an immunoenzymatic method (ELISA) was applied in a group of about 3000 patients. Also the usefulness of these serological tests in the case of existing cross-reactivity between microorganisms such as (*Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Borrelia burgdorferi* and *Chlamydia trachomatis*) was studied.

The results demonstrated the relatively low diagnostic value of performed tests, because the difference in percentages of seropositivity of anti-*Yersinia enterocolitica* O3 (considered as pathogenic) in the group of tested patients and in the healthy population (average 5.5%) was insignificant.

Diagnostic value of these tests was additionally lowered by the co-appearance of antibodies directed at the above-mentioned microorganisms – belonging to separate taxa, possessing different transmission vectors and generating different clinical syndromes. In about 25% of sera seropositive for anti-*Yersinia enterocolitica* O3 antibodies also antibodies against at least one of the above-mentioned species was found. An in-depth analysis should be done by clinicians/rheumatologists of each seropositive case in relation to the clinical picture.

---

### Adres do korespondencji:

dr biol. Jacek Noworyta, Zakład Mikrobiologii i Serologii Instytutu Reumatologii im. prof. dr hab. med. Eleonory Reicher, ul. Spartańska 1, 02-637 Warszawa

Praca wpłynęła: 12.06.2008 r.

razem klinicznym i retrospektywne podejście do wywiadu. Pozwoliłoby to na ograniczenie nadmiernego długotrwałego stosowania antybiotyków, które u wielu pacjentów nie będą skuteczne, a wręcz mogą implikować objawy niepożądane.

Also an anamnestic interview seems necessary to the authors. It allows us to avoid excessively prolonged antibiotic therapy, which in many cases is unsuccessful and may be a cause of many side effects.

## **Analiza badań na obecność przeciwciał dla *Yersinia enterocolitica* O3 w surowicach pacjentów diagnozowanych w Instytucie Reumatologii w latach 2004–2006; ich przydatność serodiagnostyczna w aspekcie reakcji krzyżowych z innymi drobnoustrojami istotnymi w wywoływaniu procesów zapalnych w chorobach narządu ruchu**

Diagnostyka chorób narządu ruchu o etiologii bakteryjnej wymaga udowodnienia trwającej lub niedawno przebytej infekcji przy użyciu metod mikrobiologicznych, genetycznych bądź serologicznych.

Mimo dynamicznego rozwoju metod umożliwiających wykrycie żywych bakterii lub ich antygenów, w tym kwasów nukleinowych [1–6], metody serologiczne [4, 7, 8] nadal są powszechnie stosowane [7, 9]. Stanowią one jednak pośredni dowód niedawno przebytej lub aktualnie trwającej infekcji; często może być tak, że z chwilą zniknięcia objawów zakażenia, a także negatywnych wyników posiewów, przeciwciała, zwłaszcza klasy IgG, mogą utrzymywać się latami w surowicach, utrudniając precyzyjne określenie czasu uprzednio zaistniałej infekcji.

Pomijając zalety wykrywania poszczególnych etapów zakażenia przez stwierdzenie przeciwciał odpowiednich klas immunoglobulin osobno i/lub razem, należy nadmienić, iż przeciwciała klasy IgM często są niewykrywalne, np. u pacjentów z reaktywnym zapaleniem stawów (ReZS), którego objawy pojawiają się z opóźnieniem (zwykle trwającym kilka tygodni), w momencie zaistniałej serokonwersji klasy IgM do IgG.

Istotną wadą metod serologicznych jest także bardzo częste zjawisko krzyżowych reakcji i to czasami między drobnoustrojami odległymi taksonomicznie, np. między *Chlamydia trachomatis* a *Salmonella enteritidis* [9–14]. Jednak ze względu na to, że objawy stawowe są również często opóźnione w stosunku do możliwości wyhodowania drobnoustroju, metody serologiczne nadal są traktowane jako podstawowe (po wyeliminowaniu wymienionych wątpliwości) w diagnozowaniu np. spondyloartropatii o ewentualnym podłożu infekcyjnym.

W Zakładzie Mikrobiologii i Serologii Instytutu Reumatologii od ponad 20 lat stosuje się diagnostykę serologiczną, sukcesywnie ją rozszerzając, począwszy od pierwszego drobnoustroju, którym była pałeczka Gram-ujemna z rodziny *Enterobacteriaceae* – *Yersinia enterocolitica*. Bak-

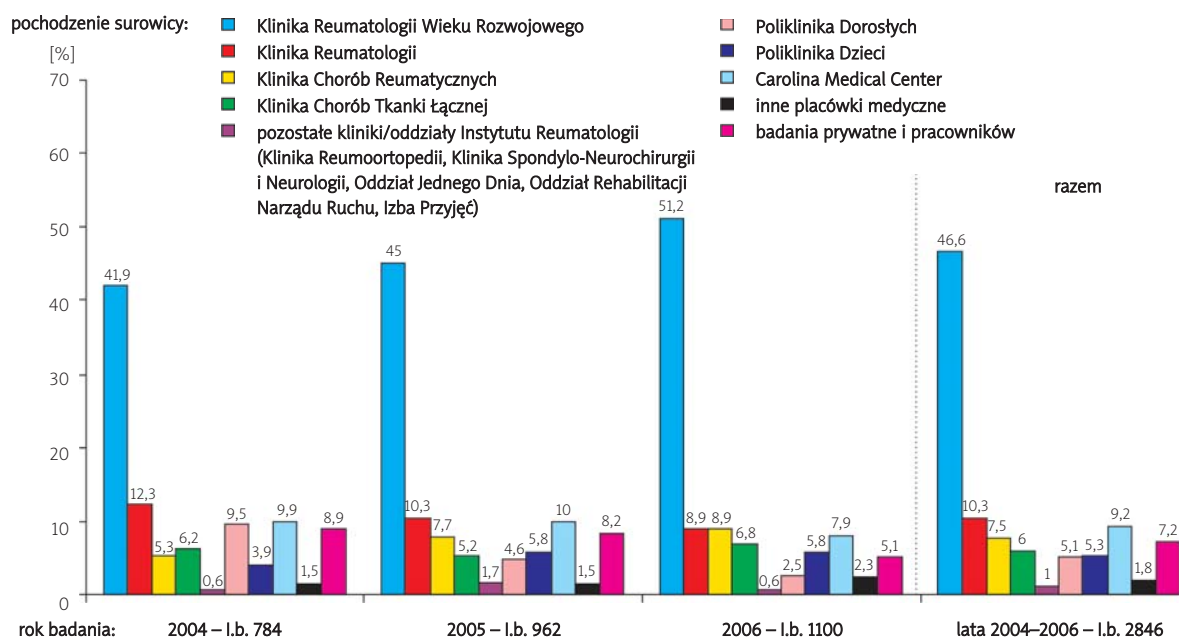
teria ta, zwłaszcza serotyp O3 najczęściej (oprócz O9 i O5) występujący w krajowej populacji (jeden z ok. 60 serotypów), jest opisywana w piśmiennictwie światowym jako patogen bytujący w przewodzie pokarmowym, przenoszony przez zakażoną wodę lub żywność. Typowymi objawami ostrej infekcji *Yersinia* są: biegunka, ból brzucha i gorączka. Powikłaniami zakażenia tym drobnoustrojem są najczęściej: reaktywne zapalenie stawów, rumień guzowaty i inne choroby reumatyczne, często u osób z obecnością antygeny HLA-B27.

Spośród wielu drobnoustrojów, cytowanych w piśmiennictwie [7, 15, 16], potencjalnie związanych z etiologią niektórych chorób reumatycznych, w Zakładzie Mikrobiologii i Serologii Instytutu Reumatologii w kolejnych latach wprowadzono stopniowo diagnostykę serologiczną: pałeczek *Salmonella enteritidis* i *Salmonella typhimurium* oraz odległych taksonomicznie – *Chlamydia trachomatis* i *Borrelia burgdorferi*. O ile ww. dwa gatunki *Salmonella* dominują w krajowej populacji, o tyle pozostałe dwa drobnoustroje są opisywane jako odpowiedzialne za zespół SARA (*sexually acquired reactive arthritis*) oraz chorobę z Lyme.

Celem pracy była analiza badań serologicznych wykonywanych u pacjentów diagnozowanych w Instytucie Reumatologii (nie tylko hospitalizowanych) w kierunku obecności w surowicy przeciwciał przeciw *Y. enterocolitica* O3 oraz – co wydaje się niezwykle istotne diagnostycznie – określenie stopnia reakcji krzyżowych z pozostałymi ww. drobnoustrojami. Stanowi to podstawowy problem w postawieniu właściwej diagnozy i w następstwie – zastosowaniu odpowiedniej terapii. Okres tej analizy dotyczył lat 2004–2006.

## **Materiał i metody**

Materiał do badań stanowiło 2846 surowic uzyskanych od 2833 pacjentów hospitalizowanych w IR, konsultowanych w Przychodni Przyklinicznej Instytutu Reumatologii, kierowanych przez lekarzy prywatnych i skierowanych z innych placówek medycznych – głównie Carolina Medical Center. Poszczególne liczby badanych surowic, pochodzących z różnych klinik/oddziałów IR oraz z innych źródeł, są przedstawione na rycinie 1. Jest to interesujące w kontekście liczby (%) uzyskanych wyników dodatnich, w porównaniu z liczbą zleceń, jak również np. hospitalizowanych osób w poszczególnych klinikach IR.



**Ryc. 1.** Liczba (%) badań na obecność przeciwciał w surowicy dla *Y. enterocolitica* O3, zlecanych przez poszczególne kliniki, oddziały IR, placówki medyczne oraz osoby prywatne w latach 2004–2006.

**Fig. 1.** Number (%) of sera tested for the presence of antibodies to *Y. enterocolitica* O3 ordered by particular clinic, divisions and medical center and private orders in years 2004–2006.

Poziom przeciwciał surowicznych dla *Y. enterocolitica* O3 był oznaczany metodą immunoenzymatyczną (ELISA), rutynowo stosowaną w Zakładzie Mikrobiologii i Serologii [17] z użyciem komórek całych bakterii (proszek acetonowy) jako antygeny opłaszczającego płaskodenne dołki płytek polistyrenowych firmy Kartell S.p.A. (dystrybutor MEDLAB).

Stosowane w badaniach koniugaty: peroksydaza chrzanowa – immunoglobulina królicza skierowana przeciwko immunoglobulinie ludzkiej odpowiedniej klasy (A, G, M) pochodziły z firmy DAKO (Dania); były one rozcieńczane zgodnie z zaleceniami producenta. Substratem dla enzymu była o-fenyleno-dwuamina (firmy Sigma). W celu ustalenia norm dla poszczególnych klas Ig w ten sam sposób przebadano 80 surowic pochodzących od zdrowych dawców krwi i arbitralnie określano wyniki „+” jako  $x + 2 SD$ , „++” –  $x + 3 SD$  i „+++” –  $x + 4 SD$ , gdzie  $x$  oznaczał średnią wartość gęstości optycznej (O.D.) uzyskaną w badaniach surowic dawców, a SD odchylenie standardowe.

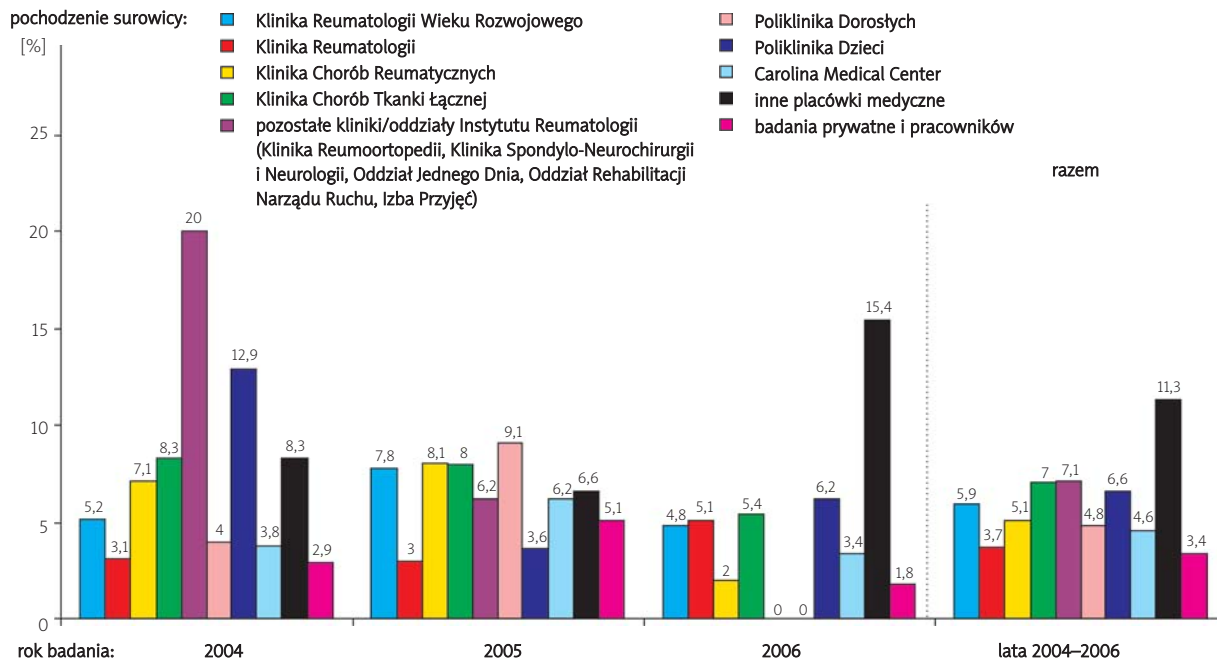
## Wyniki

Analiza ryciny 1. wyraźnie wskazuje, że zwiększa się zarówno ogólna liczba badań w kierunku wykrywania przeciwciał przeciw *Y. enterocolitica* O3, jak i w poszcze-

gólnych latach. Zdecydowanie najczęściej dotyczyło to Kliniki Reumatologii Wieku Rozwojowego (KRWR), skąd pochodziła prawie połowa zleceń tych badań, a biorąc pod uwagę wyłącznie kliniki (oddziały) IR – odsetek badań wynosił prawie 60%. Zwraca uwagę fakt, że odsetek tzw. badań pozainstytutowych wynosił ok. 20% ogólnej liczby, z czego połowa dotyczyła zleceń Carolina Medical Center.

Biorąc pod uwagę te dane, świadczące o bardzo dużym zainteresowaniu klinicystów wykrywaniem przeciwciał przeciw *Y. enterocolitica* O3, niezwykle interesujące było przesłanie odsetka wyników dodatnich (ryc. 2.).

Dane przedstawione na rycinie 2. wskazują na ogólnie małą wykrywalność przeciwciał przeciw *Y. enterocolitica* O3, niezależnie od badanej klasy immunoglobulin bądź źródła pochodzenia surowic. Zarówno w poszczególnych latach, jak i w całym okresie badawczym, poza nielicznymi wyjątkami, odsetek wykrytych wyników dodatnich kształtował się na poziomie poniżej 10%. I tak, w 2004 r. najrzadziej wykrywano dodatnie wyniki w surowicach pochodzących z grupy badań prywatnych i pracowników IR (2,9%) oraz pacjentów Kliniki Reumatologii (KR – 3,1%), najczęściej zaś w surowicach pacjentów konsultowanych w Poliklinice Dziecięcej (12,9%) i hospitalizowanych w Klinice Chorób Tkanki Łącznej (8,3%),



**Ryc. 2.** Odsetek wyników dodatnich w surowicy na obecność przeciwciał (niezależnie od klasy Ig) dla *Y. enterocolitica* O3, spośród badań zleczanych przez poszczególne kliniki, oddziały IR i placówki medyczne oraz osoby prywatne w latach 2004–2006.

**Fig. 2.** Percentage of positive result in the sera tested for the presence of antibodies (IgG class) to *Y. enterocolitica* O3, between tested ordered by particular clinics, divisions, medical centers and private persons in years 2004–2006.

a także skierowywanych z pozainstytutowych placówek medycznych (8,3%). W kolejnym – 2005 r. – ponownie mała wykrywalność (3%) dotyczyła KR, natomiast większa – KChR i KChTŁ (8%) oraz pacjentów konsultowanych w Poliklinice Przyklinicznej (Dorosłych) (9,1%).

Inną wykrywalność przeciwciał uzyskano w 2006 r.; w surowicach pacjentów Polikliniki Dorosłych oraz innych niż 4 reprezentatywne Kliniki IR (ryc. 2.) nie stwierdzono żadnego wyniku dodatniego, natomiast rekordowo największy odsetek (15,4%) pozytywnych rezultatów dotyczył surowic pacjentów innych placówek medycznych. W tej właśnie grupie pacjentów najczęściej w surowicach wykryto wyniki dodatnie (11,3%) w całym okresie badawczym, najrzadziej zaś w surowicach pacjentów Kliniki Reumatologii (3,7%) i w badaniach osób kierowanych prywatnie (3,4%).

Dane dotyczące obecności i poziomu przeciwciał przeciw *Y. enterocolitica* O3 odpowiednich klas immunoglobulin (IgA, IgG, IgM) są także interesujące (tab. I) – daje to obraz etapu spodziewanego zakażenia jersiniowego spowodowanego serotypem *Y. enterocolitica*. W minionym okresie badań, zgodnie z przypuszczeniem, zdecydowanie najczęściej wykrywano przeciwciała klasy IgG (59,9%), następnie klasy IgM (26,1%), a najrzadziej klasy

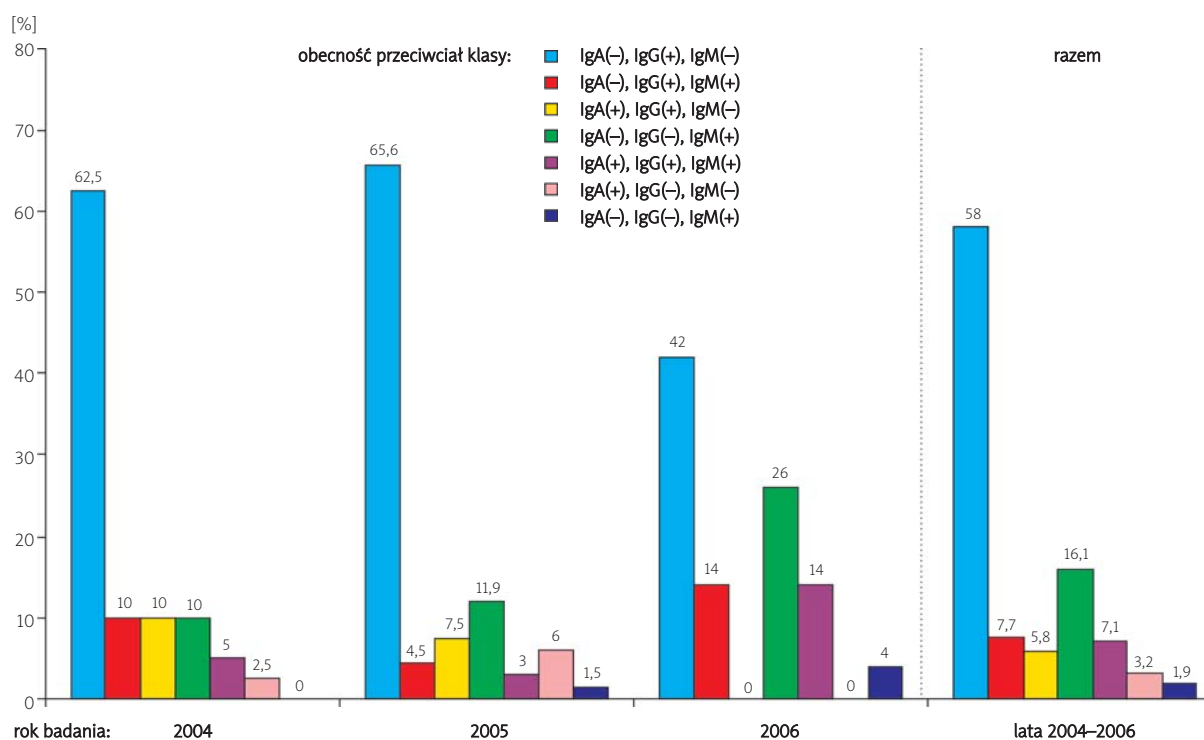
IgA (14%). Wskazywało to najczęściej na prawdopodobieństwo odległej infekcji, ewentualnie na serokonwersję klasy IgM → IgG, a zaledwie w ok. 1/4 przypadków można było brać pod uwagę niedawne zakażenie. Zgodnie z przypuszczeniami ponad 2-krotnie dominowały niewielkie poziomy badanych klas przeciwciał, co zawsze stanowi trudność diagnostyczną i sugeruje potrzebę dokonania po pewnym czasie kolejnych badań. Szczegółowe dane dotyczące poszczególnych lat przedstawiono w tabeli I. Skłonili one autorów do analizy wyników dodatnich pod kątem współwystępowania przeciwciał trzech badanych klas immunoglobulin, co bardziej uwiarygodniłoby etap infekcji. Wyniki zbiorcze przedstawiono na rycinie 3.

Zarówno w poszczególnych latach, jak i w całym okresie badawczym zdecydowanie najczęściej (ok. 60%) w surowicach stwierdzano wyłącznie przeciwciała klasy IgG. Świadczyłyby to o infekcji *Y. enterocolitica* O3 przebytej co najmniej 6 mies. wcześniej, a być może nawet wiele lat wcześniej, ewentualnie o serokonwersji IgM → IgG. Z kolei średni odsetek (16,1%) surowic z wynikami dodatnimi, tzn. przeciwciałami wyłącznie klasy IgM, sugerował wybitnie świeże (niedawne) zakażenie sprzed kilku tygodni (miesiący). Inne warianty współwystępowania prze-

**Tabela I.** Obecność przeciwciał dla *Y. enterocolitica* O3 odpowiedniej klasy immunoglobuliny oraz ich poziomu wyrażony jako: „+” ( $x + 2$  SD), „++” ( $x + 3$  SD) i „+++” ( $x + 4$  SD)

**Table I.** Presence of antibodies anti *Y. enterocolitica* O3 respective Ig class and their level – expressed as: positive results “x” ( $x + 2$  SD), medium positive “++” ( $x + 3$  SD) and strong positive “+++” ( $x + 4$  SD)

Poziom przeciwciał	Rok badania											
	2004			2005			2006			2004–2006		
	klasa Ig (%)			klasa Ig (%)			klasa Ig (%)			klasa Ig (%)		
	A	G	M	A	G	M	A	G	M	A	G	M
+	25	58,8	63,6	83,3	77,4	33,3	22,2	48,6	28,6	48,3	63,7	37
++	25	26,5	0	0	20,7	20	22,2	29,7	28,6	13,8	25	20,4
≥+++	50	14,7	36,4	16,7	1,9	46,6	55,6	21,7	42,8	37,9	11,3	42,6
razem	15,1	64,1	20,8	15	66,3	18,7	12,2	50	37,8	14	59,9	26,1



**Ryc. 3.** Współwystępowanie przeciwciał klas IgA, IgG, IgM dla *Y. enterocolitica* O3 w surowicach pacjentów badanych w latach 2004–2006.

**Fig. 3.** Co-appearance of antibodies IgA, IgG and IgM class anti *Y. enterocolitica* O3 in the sera of patients tested in years 2004–2006.

ciwciał różnych klas były stwierdzane stosunkowo rzadko, a spośród nich najbardziej charakterystyczna dla reaktywnego zapalenia stawów jednoczesna obecność przeciwciał klas: IgG + IgA wykazana w ok. 6% surowic. Pozostałe warianty współwystępowania przeciwciał różnych klas były wykrywane w następujących odsetkach:

- IgA (-), IgG (+), IgM (+): średnio 7,7% – prawdopodobnie świeża infekcja,
- IgA (+), IgG (+), IgM (+): średnio 7,1% – prawdopodobnie świeża infekcja,
- IgA (+), IgG (-), IgM (-): średnio 3,2% – świeża infekcja lub indukcja przeciwciał przez stałe przebywający drobnoustroj/strukturę antygenową.

Kolejnym, retrospektywnym etapem pracy było prześledzenie jednoczesnej obecności przeciwciał, różnych klas, dla *Y. enterocolitica* O3 oraz przeciwciał dla innych drobnoustrojów bakteryjnych w surowicy zlecanej do badań pochodzącej od tego samego pacjenta. Dotyczyło to drobnoustrojów odgrywających często kluczową rolę w wywoływaniu stanów zapalnych narządu ruchu, tj. dwóch gatunków *Salmonella* (*S. enteritidis* i *S. typhimurium*), *Chlamydia trachomatis* oraz *Borrelia burgdorferi*. Uczyniono to na podstawie obserwacji i danych z piśmiennictwa świadczących o częstych reakcjach krzyżowych, nawet między tak odległymi taksonomicznie bakteriami. Wyniki

zgrupowano zgodnie ze zleceniami badań dokonywanych przez klinicystów, co czasami może świadczyć o niesprecyzowanym wywiadzie i prognozowaniu diagnostycznym (tab. II).

Szczegółowa analiza wyników przedstawionych w tabeli II zwraca uwagę na duży odsetek (ok. 25%) surowic dodatnich na obecność przeciwciał przeciw *Y. enterocolitica* O3, w których wykrywano jednocześnie przeciwciała dla innych drobnoustrojów – zarówno zbliżonych taksonomicznie (*S. enteritidis*, *S. typhimurium*), jak i odległych (*Ch. trachomatis* i *B. burgdorferi*). Ogółem na analizowane 102 surowice ze stwierdzonymi przeciwciałami dla serotypu *Y. enterocolitica* O3

**Tabela II.** Obecność współwystępujących przeciwciał (różnych klas) dla *Y. enterocolitica* O3 oraz innych drobnoustrojów w grupach surowic zleczanych do badań serologicznych w latach 2004–2006

**Table II.** Presence of co-appearing autoantibodies (different class) anti *Y. enterocolitica* O3 and anti other bacteria in the sera ordered to be tested in years 2004–2006

Zlecony kierunek badań serologicznych	Liczba surowic	Rodzaj wykrytych przeciwciał (klasa)	Liczba surowic
<i>Y. enterocolitica</i> O3	12	<i>Y. enterocolitica</i> G (+), <i>S. enteritidis</i> M (+), <i>S. typhimurium</i> A (+)	1
+ <i>S. enteritidis</i> / <i>S. typhimurium</i>		<i>Y. enterocolitica</i> G (+), <i>Ch. trachomatis</i> G (+)	4
+ <i>Ch. trachomatis</i>		<i>Y. enterocolitica</i> A (+), M (+) <i>B. burgdorferi</i> M (+)	2
+ <i>B. burgdorferi</i>			
<i>Y. enterocolitica</i> O3	22	<i>Y. enterocolitica</i> G (+), <i>S. enteritidis</i> G (+), <i>Ch. trachomatis</i> G (+)	1
+ <i>S. enteritidis</i> / <i>S. typhimurium</i>		<i>Y. enterocolitica</i> G (+), <i>S. enteritidis</i> G (+)	1
+ <i>Ch. trachomatis</i>		<i>Y. enterocolitica</i> M (+), <i>S. enteritidis</i> M (+)	1
		<i>Y. enterocolitica</i> M (+), <i>S. enteritidis</i> G (+)	1
		<i>Y. enterocolitica</i> A (+), <i>S. enteritidis</i> G (+)	1
		<i>Y. enterocolitica</i> G (+), <i>S. typhimurium</i> A (+)	1
		<i>Y. enterocolitica</i> G (+), <i>Ch. trachomatis</i> G (+)	3
<i>Y. enterocolitica</i> O3	27	<i>Y. enterocolitica</i> G (+), <i>S. enteritidis</i> G (+)	1
+ <i>S. enteritidis</i> / <i>S. typhimurium</i>		<i>Y. enterocolitica</i> A (+), <i>S. enteritidis</i> G (+)	1
		<i>Y. enterocolitica</i> A (+) G (+) M (+), <i>S. typhimurium</i> M (+)	1
<i>Y. enterocolitica</i> O3	27	<i>Y. enterocolitica</i> G (+), <i>B. burgdorferi</i> G (+)	1
+ <i>S. enteritidis</i> / <i>S. typhimurium</i>			
+ <i>B. burgdorferi</i>			
<i>Y. enterocolitica</i> O3	1	<i>Y. enterocolitica</i> G (+), <i>B. burgdorferi</i> M (+)	1
+ <i>Ch. trachomatis</i>			
+ <i>B. burgdorferi</i>			
<i>Y. enterocolitica</i> O3	7	<i>Y. enterocolitica</i> G (+) M (+), <i>B. burgdorferi</i> M (+)	1
+ <i>B. burgdorferi</i>		<i>Y. enterocolitica</i> G (+), <i>B. burgdorferi</i> M (+)	2
		<i>Y. enterocolitica</i> M (+), <i>B. burgdorferi</i> M (+)	1
<i>Y. enterocolitica</i> O3	6	–	0
+ <i>Ch. trachomatis</i>			

aż 25 (24,5%) wykazywało dodatkowo obecność przeciwciał dla co najmniej 1 spośród 4 pozostałych gatunków drobnoustrojów. Ponieważ analiza dotyczyła surowicy tego samego pacjenta, badane surowice celowo pogrupowano wg zleceń lekarzy, stwierdzając niepokojące zjawisko częstego współwystępowania przeciwciał (różnych klas), co ogółem w 1/4 przypadków obniżało wartość diagnostyczną uzyskanych wyników.

Analizując poszczególne grupy zleceń badań (tab. II) i wyniki współwystępowania przeciwciał przeciw *Y. enterocolitica* O3 wraz z przeciwciałami dla pozostałych badanych drobnoustrojów, trudno w wielu przypadkach znaleźć logiczne wytłumaczenie. Na przykład w 12 surowicach badanych na obecność przeciwciał dla wszystkich 5 drobnoustrojów, wykazano obecność 7 surowic (58,3%) z reakcjami krzyżowymi, w tym „wariant”: *Y. enterocolitica* O3 + *Ch. trachomatis* stwierdzono aż w 4 surowicach. W 22 surowicach, w których zlecano badania przeciwciał dla 4 drobnoustrojów, wykazano duży (40,9%) odsetek reakcji krzyżowych (z przewagą *Y. enterocolitica* O3 + *Ch. trachomatis* i *Y. enterocolitica* O3 + *S. enteritidis*). Chociaż tylko w 7 surowicach badano występowanie przeciwciał jedynie przeciw *Y. enterocolitica* O3 + *B. burgdorferi*, to aż w 4 przypadkach (57,1%) stwierdzono współwystępowanie przeciwciał dla obu bakterii.

Ogólnie obecność przeciwciał dla *Y. enterocolitica* O3 wiązała się kolejno z obecnością jednocześnie przeciwciał dla: *Ch. trachomatis* – 19,5%, surowic, *B. burgdorferi* – 10,6%, *S. enteritidis* – 5,7% a *S. typhimurium* – 1,1%. Odsetki te dotyczyły surowic (25%) z co najmniej jedną stwierdzoną reakcją krzyżową.

Nie stwierdzono różnic między klasami wykrywanych przeciwciał dla współwystępujących drobnoustrojów. Najczęściej były to – po równo – klasa IgG i IgM (tab. II). W niektórych przypadkach można podejrzewać serokonwersję IgM → IgG, co mogłoby sugerować podejrzenie zakażenia odpowiednim drobnoustrojem na etapie wcześniejszym (odpowiedź w klasie IgM).

## Omówienie wyników

Zlecenie badań serologicznych *Y. enterocolitica* O3 przez klinicystów zarówno Instytutu Reumatologii w Warszawie, jak i innych warszawskich i pozawarszawskich placówek medycznych było bardzo zróżnicowane w omawianym okresie. Przedstawiono to na rycinie 1, na podstawie której można wysnuć zastanawiający wniosek, że populacja dzieci (KRWR) stanowiła ok. 50% wszystkich badanych pacjentów. Nasuwa się pytanie, czy chore dzieci powinny tak często być badane w kierunku obecności przeciwciał przeciw *Y. enterocolitica* O3, czy objawy chorobowe i wywiad lekarski dobitnie wskazy-

wały na taką konieczność, ponieważ w badaniach autorów [18] w grupie zdrowych dawców krwi wykryto obecność tych przeciwciał w odsetkach 3–5%, w zależności od stosowanego antygeny w metodzie ELISA (całe bakterie, LPS, OMP). W poszczególnych grupach chorych z różnych miejsc (ryc. 2.) wykazano zaś obecność przeciwciał w surowicy średnio poniżej 10%, a w KRWR, na którą szczególnie zwracano uwagę, odsetek ten wyniósł 5,9%. Interesujące, że wśród pacjentów pozainstytutowych odsetek ten był najwyższy, tzn. 11,3%, a w grupie badań prywatnych – najniższy – 3,4%. Czy na taki obraz (szczegóły na ryc. 2.) wykrywalności przeciwciał nie wpływały czynniki subiektywne, m.in. wnikliwość wywiadu, doświadczenie zlecającego itp.?

Prezentowane w niniejszej pracy badania dotyczyły obecności przeciwciał tylko dla jednego spośród ok. 60 serotypów *Y. enterocolitica* O3, a więc siłą rzeczy można było spodziewać się tak małej częstotliwości wykrywanych przeciwciał. Osoba zlecająca takie badania powinna mieć świadomość, iż w piśmiennictwie światowym i krajowym [9, 13] podkreślany jest udział w indukowaniu stanów zapalnych narządu ruchu innych serotypów, spośród których *Y. enterocolitica* O9 i O8 są najczęściej wymieniane. Być może w przyszłości dołączą do nich inne serotypy o cechach „artritogennych”, ale obecnie siłą rzeczy badania światowe dotyczące chorób reumatycznych skupiają się na tych kilku serotypach. Nie można wykluczyć w niedalekiej przyszłości również częstszych badań nad znaczeniem innego gatunku – *Y. pseudotuberculosis*. Tego typu eksperymenty rozpoczęto również w 2007 r. w Zakładzie Mikrobiologii i Serologii IR, ale wymagają one potwierdzenia swoistości przeciwciał metodą Western-Blot, a przede wszystkim korelacji z obrazem klinicznym.

Autorzy pracy obawiają się, że w wielu przypadkach klinicznych lekarze nie biorą pod uwagę, iż ukierunkowują badanie na wykrycie bardzo konkretnych przeciwciał dla jednego serotypu, który w populacji krajowej występuje stosunkowo rzadko, stąd wypływa potencjalnie mała diagnostycznie przydatność otrzymanego wyniku, sięgająca w naszych badaniach (wszystkich zleconych w ciągu 3 lat) średnio 5,5%; na 2846 badań stwierdzono 156 wyników dodatnich, niezależnie od wykrywanej klasy immunoglobulin.

Hasło na zleceniu „*Yersinia*” ma zatem bardzo ograniczoną wartość, nie mówiąc o ekonomicznej stronie badań i ewentualnej terapii antybiotykami, przeważnie krytycznie ocenianej w piśmiennictwie światowym [19–21].

Z leczeniem antybiotykami wiąże się potrzeba identyfikacji zakażenia wywołanego m.in. przez *Yersinia* sp., prawdopodobnie indukującego reaktywne zapalenie stawów. Według Fendlera i wsp. [13] oprócz obecności asymetrycznego zapalenia stawów i/lub dodatniego

posiewu z kału wymagane są pewne serologiczne kryteria, takie jak:

- poziom przeciwciał dla *Yersinia* w klasie IgG  $\geq 3$  SD + obecne przeciwciała IgA lub IgM,
- poziom przeciwciał IgG  $\geq 2$  SD + obecne przeciwciała IgA lub IgM + objawy *enterocoli*.

Komentarzem do tych kryteriów mogą być wnioski wysunięte z obecnych badań nad występowaniem poziomów przeciwciał poszczególnych klas i ich współwystępowanie (ryc. 3., tab. I). Biorąc pod uwagę najczęstsze występowanie przeciwciał przeciwko *Yersinia* jedynie klasy IgG, aż w ok. 60% przypadków można było wg sugestii przedstawionych w pracy Rihl i wsp. [4] domniemywać o dość odległej infekcji, czyli o ograniczonej diagnostycznej wartości. Łączy się z tym zjawiskiem zastosowanie terapii antybiotykami, które jest sugerowane na etapie aktywnej lub niedawnej infekcji [8], a któremu towarzyszy jednocześnie występowanie przeciwciał klas IgG + IgM (w badaniach przedstawionych w niniejszej pracy stwierdzone zaledwie średnio w 7,7%) oraz IgG + IgA (zaledwie średnio w 5,8%). Zwłaszcza wariant IgG + IgA jest opisywany jako najbardziej charakterystyczny u chorych, u których rozpoczyna się zapalenie stawów, z możliwością występowania żywych drobnoustrojów *Yersinia* lub ich struktur antygenowych, głównie na błonach śluzowych i w węzłach chłonnych krezki. Dlatego w wysoko wyspecjalizowanych ośrodkach badawczych [22, 23] oznacza się podklasy IgA<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> dla *Y. enterocolitica* i komponent wydzielniczy s-IgA, w przypadkach podejrzenia zakażenia tą bakterią z towarzyszącymi objawami stawowymi. W warunkach instytutowych, ze względów ekonomicznych oraz z powodu niezbyt do końca pewnej wartości diagnostycznej, takie drogie badania nie mogą być brane pod uwagę poza aspektem naukowym. Trzeba nadmienić, że przeciwciała klasy IgA mają kilkudniowy okres półtrwania, a więc ich obecność może świadczyć zarówno o niedawnej infekcji, jak i o stanie przewlekłym z ciągłą indukcją tych przeciwciał przez zasiedlający drobnoustrój.

Z kolei występowanie wyłącznie przeciwciał klasy IgM, choć dość częste (16,1%), z jednej strony świadczy o niedawnej infekcji (sprzed kilku tygodni), z drugiej strony zgodnie z obserwacjami ich poziom obniża się najczęściej w okresie 3–6 tyg. (serokonwersja do klasy IgG), kiedy często jeszcze nie w pełni rozwijają się objawy kliniczne zapalenia stawów. Trzeba też brać pod uwagę ewentualne fałszywie dodatnie wyniki spowodowane obecnością RF.

Wielce niepokojącym zjawiskiem, z punktu widzenia wiarygodności diagnostyki serologicznej w kierunku *Y. enterocolitica* O3, okazały się w 1/4 surowic tzw. dodatnich reakcje krzyżowe z innymi drobnoustrojami, istotnymi w wywoływaniu reaktywnych zapaleń

stawów: *S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *Ch. trachomatis* i *B. burgdorferi*.

Bardzo dokładne wyniki uzyskane po analizie 102 surowic pobranych od pojedynczych pacjentów przedstawiono w tabeli II, grupując je wg zleceń lekarskich. Podstawą grupowania był dodatni wynik badania na obecność przeciwciał przeciw *Y. enterocolitica*, a w dalszej kolejności uzyskany wynik serologicznego badania dla innych ww. drobnoustrojów. Wnikliwa analiza rezultatów poszczególnych grup zleconych badań w 24,5% wykazała reakcje krzyżowe i na tym etapie nie pozwalała klinicyście na jednoznaczne sprecyzowanie, z jakim faktycznie drobnoustrojem można wiązać podejrzewane zakażenie bakteryjne z jego powikłaniami stawowymi. Nie można było wykluczyć również bardzo odległych infekcji bądź świeżych nadkażeń, do czego służyła analiza współwystępujących przeciwciał różnych klas immunoglobulin.

Mimo że praca ma charakter praktyczny, to należy odnieść się również do danych z piśmiennictwa i powodów występowania tak powszechnego zjawiska reakcji krzyżowych. Wynikają one z budowy antygenowej ściany komórkowej poszczególnych drobnoustrojów, które w różnym stopniu zostały ocenione w metodzie ELISA. Nie były zaskoczeniem krzyżowe reakcje serologiczne między *Y. enterocolitica* O3 a *S. enteritidis* i *S. typhimurium*. Już w 1988 r. Paerregard i wsp. [11] przy użyciu metody ilościowej immunoelektroforezy udowodnili obecność antygenów tego serotypu w znacznym stopniu krzyżowo reagujących z innymi Gram-ujemnymi pałeczkami z rodziny *Enterobacteriaceae*, do których zalicza się *Salmonella*. Wykazano też w niewielkim stopniu krzyżową reaktywność także z *Pseudomonas*, *Neisseria meningitidis*.

W LPS *Y. enterocolitica* O3 stwierdzano obecność antygenu (nr 71), który stanowi znaczną jego część, odpowiadającą za krzyżowe reakcje z innymi Gram-ujemnymi bakteriami. Badania innych autorów skupiały się na poszukiwaniu składników antygenowych ściany komórkowej *Y. enterocolitica*, które odpowiadałyby za krzyżową reaktywność. Stwierdzono je m.in. w białkach OMP [24], ciepłostajnej enterotoksynie [25], antygenie ECA [26] oraz pewnych antygenach krzyżowo reagujących z antygenem HLA-B27 [27]. Już dawno zatem wykazano potencjalną możliwość występowania częstego zjawiska krzyżowych reakcji między *Yersinia* a pałeczkami Gram-ujemnymi. Wydaje się, że głównym antygenem za to odpowiedzialnym jest wysoce immunogeny LPS, z jego O-polisacharydowym łańcuchem. Wyżej wymienione badane składniki antygenowe są integralną częścią ściany komórkowej pałeczek Gram-ujemnych, w tym *Enterobacteriaceae*. Nie dziwi więc fakt, że użyty w metodzie ELISA antygen całych bakterii *Y. enterocolitica* O3 mógł wykrywać przeciwciała dla innych



drobnoustrojów, w tym *S. enteritidis* i *S. typhimurium*, dla tych których przeciwciała stwierdzano przy zastosowaniu swoistego antygeny LPS. Antygen LPS mógł jednakże zawierać składniki O-polisacharydu krzyżowo reagujące z przeciwciałami dla *Y. enterocolitica* O3. Reaktywność ta była jednak nieznaczna, tj. w przypadku *S. enteritidis* wyniosła 5,7%, a *S. typhimurium* – zaledwie 1,1%.

Zdecydowanie częściej (10,6%) wykazywano jednoczesne występowanie przeciwciał przeciw *Y. enterocolitica* O3 i *B. burgdorferi*, tak odległych taksonomicznie i zupełnie niezwiązanych ani formami klinicznymi, ani wektorami transmisji. W obu drobnoustrojach występuje w ścianie komórkowej błona zewnętrzna (OMP) o wybitnie białkowym charakterze (u *B. burgdorferi* >100 polipeptydów) i LPS (lub LPS-like u *Borrelia*). Wydaje się, że zwłaszcza immunogenne białka OMP obu drobnoustrojów mogą być główną przyczyną reakcji krzyżowych objawiających się produkcją przeciwciał klasy IgM i/lub IgG (tab. II). Skłaniają do takiego przypuszczenia użyte w metodzie ELISA wykrywającej przeciwciała przeciw *B. burgdorferi* rekombinowane białkowe antygeny, głównie pochodzenia OMP. Na fazie stałej opłaszczony były następujące białka: OspC (powierzchniowe białko, wysoce swoiste, dające odpowiedź humoralną wczesną, zwłaszcza w klasie IgM), p100 i p18 (wysoce swoiste dla fazy III zakażenia, szczególnie związane z indukowaniem przeciwciał IgG) i p41 (białko strukturalne endoflagelliny, nieswoiste, charakterystyczne dla I fazy zakażenia) [28]. Bogata „mozaika” antygenowa użytych całych bakterii *Y. enterocolitica* O3, a więc mająca zarówno LPS, jak i OMP ściany komórkowej, mogła zawierać bardzo zbliżone epitopy, wobec których stwierdzono obecność przeciwciał.

Oczywiście w przypadku serologicznych reakcji krzyżowych ww. drobnoustrojów nie można wykluczyć nadkażenia jednym z nich, ale tym bardziej wymaga to skrupulatnej analizy klinicznej i potwierdzenia dodatniego serologicznego wyniku swoistą metodą Western-Blot. Czyni się to obecnie w odniesieniu do *B. burgdorferi*, a planuje dla *Y. enterocolitica* i *Ch. trachomatis*, co jednak wyraźnie podraża diagnostykę, lecz w wielu ujemnych serologicznie przypadkach powinno eliminować terapię antybiotykami.

Zdecydowanie najczęściej w analizowanym materiale występowały jednocześnie przeciwciała przeciw *Y. enterocolitica* O3 i *Ch. trachomatis*. Dotyczyło to aż 19,5% surowic (tab. II), w których wykryto te przeciwciała i to wyłącznie w klasie IgG. Wskazuje to na uprzednio zaistniałą infekcję, ma zatem dodatkowo ograniczoną wartość diagnostyczną.

Być może pacjenci ze stwierdzoną taką krzyżową odpowiedzią humoralną przeszli zakażenie tymi gatun-

kami drobnoustrojów, które w tamtym momencie mogły indukować stany zapalne narządu ruchu.

Wykrywana krzyżowa reaktywność może wynikać z budowy antygenowej zastosowanych w metodzie ELISA, opłaszczających fazę stałą, ciałek elementarnych (EB) *Ch. trachomatis*. Zawierają one grupowo swoiste (dla wszystkich *Chlamydia*) ciepłostate kompleksy lipoproteinowo-węglowodanowe z kwasem 2-keto-3-deoksyktonowym (KDO) jako dominującym komponentem immunogennym. Są one składnikiem LPS. Niektóre antygeny swoiste gatunkowo i immunotypowo (*Ch. trachomatis* ma 15 immunotypów) mają charakter białkowy, tworząc zewnętrzną część ściany komórkowej MOMP (*major outer membrane proteins*) [29]. *Ch. trachomatis*, tak jak *Y. enterocolitica*, ma 2 podstawowe składniki ściany komórkowej, tj. LPS osadzony wewnątrz OMP. Oba zatem drobnoustroje mogą mieć zbliżone epitopy antygenowe, wobec których produkowane są przeciwciała.

## Wnioski

Wszystkie badania, ich rezultaty oraz dane z piśmiennictwa pozwalają na wysunięcie kilku wniosków o charakterze ogólnym. Powinny one zwrócić uwagę klinicystów reumatologów na praktyczny aspekt zlecanych badań w kierunku występowania przeciwciał dla *Y. enterocolitica* O3 i/lub innych drobnoustrojów, które mogą mieć związek z chorobami narządu ruchu:

- wykrywana liczba (%) wyników dodatnich na obecność przeciwciał dla jednego z nielicznych serotypów chorobotwórczych *Yersinia* O3 nie odbiegała ilościowo od stwierdzanych w zdrowej populacji i w znacznym stopniu obniżała wartość diagnostyczną zbadanych w latach 2004–2006 ok. 3000 surowic uzyskanych od chorych, z których ok. 50% stanowiły dzieci i młodzież; wykrywalność przeciwciał średnio w 5,5% (3–11% w zależności od analizowanej grupy) każe zastanowić się nad aspektem ekonomicznym badań,
- wartość diagnostyczną uzyskanych wyników dodatnich na obecność przeciwciał przeciw *Y. enterocolitica* O3 dodatkowo zdecydowanie obniżało jednoczesne występowanie przeciwciał dla innych drobnoustrojów *S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *B. burgdorferi*, a zwłaszcza *Ch. trachomatis*, tak odległych taksonomicznie, różniących się formami klinicznymi i wektorami transmisji; w 1/4 dodatnich surowic badanych na obecność przeciwciał dla *Y. enterocolitica* O3 wykazano przeciwciała przeciwko przynajmniej jednemu z ww. drobnoustrojów,
- uzyskane wyniki sugerują klinicystom reumatologom niezwykle wnikliwe analizowanie każdego przypadku chorobowego z dodatnim wynikiem sero-

logicznym (również w aspekcie stwierdzanych klas przeciwciał) i retrospektywne podejście do wywiadu; „odważna” diagnoza na podstawie wymienionych zastrzeżeń może implikować niewłaściwą terapię, w tym antybiotykami, zwłaszcza zdecydowana dominacja przeciwciał klasy IgG dla *Y. enterocolitica* O3 bez wyraźnych korelacji z aktualnym i uprzednim obrazem klinicznym w wielu przypadkach może wynikać jedynie z kontaktu pacjenta z tym drobnoustrojem.

### Piśmiennictwo

- Granfors K, Merilakti-Palo R, Luukkainen R, et al. Persistence of yersinia antigens in peripheral blood cells from patients with *Yersinia enterocolitica* O3 infection with or without reactive arthritis. *Arthritis Rheum* 1998; 41: 855-862.
- Nanogora R, Li F, Beutler A, et al. Alteration of *Chlamydia trachomatis* biologic behavior in synovial membranes. Suppression of surface antigen production in reactive arthritis and Reiter's syndrome. *Arthritis Rheum* 1995; 38: 1410-1417.
- Gerard HC, Branigan PJ, Schumacher HR, Hudson AP. Synovial *Chlamydia trachomatis* in patients with reactive arthritis (Reiter's syndrome are viable but show aberrant gene expression). *J Rheumatol* 1998; 25: 734-742.
- Rihl M, Klos A, Köhler L, Kuipers JG. Reactive arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2006; 20: 1119-1137.
- Gerard HC, Wang Z, Wang GF, et al. Chromosomal DNA from a variety of bacterial species is present in synovial tissue from patients with various forms of arthritis. *Arthritis Rheum* 2001; 44: 1689-1697.
- Jalova J, Skurnik M, Toivanen A, et al. Bacterial PCR in the diagnosis of joint infection. *Ann Rheum Dis* 2001; 60: 287-289.
- Flores D, Marquez J, Garza M, Espinoza LR. Reactive arthritis: newer developments. *Rheum Dis Clin Am* 2003; 29: 37-59.
- Gaston JSH, Lillcrap MS. Zapalenia stawów związane z zakażeniami jelitowymi. *Best Prac Res Clin Rheumatol (Clin Rheumatol – wydanie polskie)* 2004; 1: 4-14.
- Rastawicki W, Jagielski M, Gierczyński R i wsp. Udział pałeczek z rodzaju *Salmonella* i *Yersinia* w patogenezie zapalenia stawów ze szczególnym uwzględnieniem spondyloartropatii i reumatoidalnego zapalenia stawów. II. Występowanie przeciwciał dla pałeczek *Salmonella* i *Yersinia* w surowicy i płynie stawowym osób z zapaleniem stawów. *Med Dośw Mikrobiol* 2005; 57: 143-151.
- Brasse-Rumin M, Noworyta J, Ząbek J. Nieswoiste reakcje serologiczne w diagnostyce chorób narządu ruchu podejrzewanych o etiologię infekcyjną. *Reumatologia* 2004; 42: 31-37.
- Paerregaard A, Eespersen F, Høiby N. Cross-reactions between *Yersinia enterocolitica* serogroup O3 and other serogroups of the same species, as well as thirty – four other bacterial species. *APMIS* 1988; 96: 315-324.
- Nurminen M, Leinonen M, Saikku P, Makela PM. The genus – specific antigen of *Chlamydia*; resemblance to the lipopolysaccharide of enteric bacteria. *Science* 1983; 220: 1279-1281.
- Fendler C, Laitko S, Sørensen H, et al. Frequency of triggering bacteria in patients with reactive arthritis and undifferentiated oligoarthritis and the relative importance of the tests used for diagnosis. *Ann Rheum Dis* 2001; 60: 337-343.
- Lahesmaa-Rantala R, Stahlberg TH, Granfors K, et al. Serological cross-reactions against *Yersinia enterocolitica* in patients infected with other arthritis – associated microbes. *Clin Exp Rheumatol* 1990; 8: 5-9.
- Sobieszkańska BM. Rola artrytogennych pałeczek z rodziny *Enterobacteriaceae* oraz *Borrelia burgdorferi* w patomechanizmie reaktywnego zapalenia stawów (REA). *Post Mikrobiol* 1997; 36: 101-121.
- Noworyta J. Zakażenia bakteryjne i ich rola w indukcji i przebiegu chorób reumatycznych. *Reumatologia* 1996; 34: 800-811.
- Noworyta J, Ząbek J, Brasse-Rumin M, Gago J. Odpowiedź humoralna na wybrane złożone antygeny bakterii Gram-ujemnych i Gram-dodatnich oraz ich subkomponenty badana w surowicy i płynie stawowym pacjentów z chorobami narządu ruchu. *Reumatologia* 2003; 41: 259-268.
- Noworyta J, Ząbek J, Brasse-Rumin M, Brzezicki J. Odpowiedź humoralna na wybrane antygeny pałeczek Gram-ujemnych w chorobach narządu ruchu. *Reumatologia* 2001; 39: 29-41.
- Smieja M, MacPherson DW, Kean W, et al. Randomised, blinded, placebo controlled trial of doxycycline for chronic seronegative arthritis. *Ann Rheum Dis* 2001; 60: 1088-1094.
- Sieper J, Fendler C, Laitko S, et al. No benefit of long-term ciprofloxacin treatment in patients with reactive arthritis and undifferentiated oligoarthritis. *Arthritis Rheum* 1999; 42: 1386-1396.
- Kvien TK, Gaston JS, Bardin T, et al. Three-month treatment of reactive arthritis with azithromycin: a EULAR double blind, placebo controlled study. *Ann Rheum Dis* 2004; 63: 1113-1119.
- Delacroix DL, Dive C, Rambaud IC, Vaerman IP. IgA subclasses in various secretions and in serum. *Immunology* 1982; 47: 383-385.
- de Koning J, Heesemann J, Hoogkamp-Korstanje JA, et al. *Yersinia* in intestinal biopsy specimens from patients with seronegative spondyloarthropathy: correlation with specific serum IgA antibodies. *J Infect Dis* 1989; 159: 109-112.
- Hofstra H, Dankert J. Antigenic cross-reactivity of major outer membrane proteins in *Enterobacteriaceae* species. *J Gen Microbiol* 1979; 111: 293-302.
- Okumoto K, Miyama A, Takeda Y, et al. Cross-neutralization of heat-stable enterotoxin activity of enterotoxigenic *Escherichia coli* and of *Yersinia enterocolitica*. *FEMS Microbiology Letters* 1983; 16: 85-87.
- Maeland IA, Digranes A. Common enterobacterial antigen in *Yersinia enterocolitica*. *Acta Pathol Microbiol Scand Sect B* 1975; 83: 382-386.
- Van Bohemen CG, Grumet FC, Zanem HC. Identification of HLA-B27M1 and –M2 cross-reactive antigens in *Klebsiella*, *Shigella* and *Yersinia*. *Immunology* 1984; 52: 607-610.
- Zaremba ML, Borowski J. *Mikrobiologia Lekarska*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 1997; 331.
- Jawetz E, Melnick IL, Adalberg EA. *Przegląd Mikrobiologii Lekarskiej*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 1991; 444.