

DWUSTOPNIOWA DIAGNOSTYKA SEROLOGICZNA BORELIOZY – WERYFIKACJA METOD

Słowa kluczowe: Borelioza z Lyme, *Borrelia burgdorferi*, Western blot

Wstęp

Liczba przypadków zachorowań na boreliozę w ostatnich latach (2001-2005) wyraźnie wzrosła. W Polsce w 2001 roku zapadalność na tę chorobę wynosiła 6,40 (na 100 tys.), zaś w 2005 roku wzrosła do 11,5 (na 100 tys.) (Wojewódzka Stacja Sanitarno-Epidemiologiczna w Lublinie). Najwięcej przypadków boreliozy stwierdza się latem i jesienią w okresie wzmożonej aktywności kleszczy będących głównym wektorem krętka. Na terenie Europy są to kleszcze z rodzaju *Ixodes ricinus* i *Ixodes persulcatus*, zaś na terenie Ameryki Północnej *Ixodes dammini* (Adamek, 2006, s. 11-12, Chmielewska-Badora 1997, s. 359-400).

Zachorowania powodowane przez krętki *B. burgdorferi* rejestrowane są w Polsce od wielu lat w różnych rejonach kraju. Są to przede wszystkim tereny Podlasia, Bieszczad, Karkonoszy, rejon Białowieży, rejony Białego stoku i Roztocza.

Badania prowadzone zarówno w Polsce jak i w wielu krajach Europy, wskazują na dużą częstość występowania przeciwciał anti-*Borrelia burgdorferi* w grupach o dużym ryzyku, szczególnie wśród leśników i rolników (Adamek, 2006 s. 11-12, Chmielewska-Badora 1997 s. 359-400, Flisak 2004 s. 445-450, Pancewicz 2006 s. 102-108).

W oparciu o badania molekularne wyróżniono co najmniej trzy chorobotwórcze dla człowieka genogatunki *B. burgdorferi sensu lato*: *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. afzelii* i *B. garini*. W Europie stwierdzono także obecność genogatunków, których chorobotwórczość nie została wykluczona (*B. valesiana*) i szczepy należące do nienazwanego jeszcze genogatunku A14S (Hermanowska-Szpakowicz 2003 s. 29-38, Tylewska-Wierzbanowska 2005 s. 289-293). Przebieg boreliozy z Lyme jest uwarunkowany nie tylko genotypem patogenu, lecz także odpowiedzią immunologiczną zakażonego organizmu. Na przebieg choroby wpływają między innymi zróżnicowana wrażliwość organizmu na zakażenie, różna zdolność do eliminacji bakterii przez mechanizmy obronne gospodarza, jak również wpływ odpowiedzi

immunologicznej na rozwój procesów patologicznych (Iżycka 2000 s. 165-171, Pancewicz 2006 s. 102-108).

W przebiegu zakażenia wyróżnia się postać wczesną zlokalizowaną (faza I), postać wczesną rozsianą (faza II) oraz postać późną (faza III). Choroba w zależności od fazy manifestuje się zmianami skórными o typie erythema migrans (EM), dolegliwościami grypopodobnymi, chłoniakiem limfocytarnym skóry, dysfunkcjami w obrębie stawów i układu nerwowego. Postać późna boreliozy może wystąpić nawet w kilka lat od zakażenia i objawia się przewlekłym zanikowym zapaleniem skóry, przewlekłym zapaleniem stawów, a także przewlekłymi zespołami neurologicznymi i psychiatrycznymi. Borelioza może również przebiegać w sposób nietypowy, a wywiad nie zawsze pomaga w ustaleniu rozpoznania, szczególnie, jeśli pacjent nie jest w stanie połączyć faktu wystąpienia dolegliwości z ukąszeniem przez kleszcza i ewentualnym wystąpieniem rumienia wędrującego (EM), który jest charakterystycznym, wczesnym objawem zakażenia krętkiem *B. burgdorferi*, lecz występuje jedynie u 30-40% zakażonych (Andrzejewski 2004 s. 423-430, 2006 s. 16-22, Hermanowska-Szpakowicz 2005 s. 3452-3455).

B. burgdorferi lokalizuje się pozakomórkowo, szczególnie we wczesnej postaci choroby możliwe jest przetrwanie bakterii w miejscach immunologicznie uprzywilejowanych np. w mózgu i oku. Wewnątrzkomórkowa lokalizacja możliwa jest w przypadku przetrwałej boreliozy oraz w późnej fazie choroby. W patogenezie boreliozy istotną rolę odgrywają różne formy atypowe krętka – pozbawione ściany komórkowej sferoplastyczne formy L, formy nieaktywne przybierające postać cyst oraz formy „blebs” powstające w niesprzyjających warunkach.

W komórce *B. burgdorferi* zidentyfikowano białka powierzchniowe Osp (Outer surface protein) A, B, C, D, E, F, G, białka o masie cząsteczkowej 22kDa, 39kDa, 41kDa, 55kDa, 58kDa, 66kDa, 73 kDa, HSP-białka szoku termicznego. Ta różnorodność białek sprawia, że diagnostyka boreliozy jest trudna, często niejednoznaczna i w związku tym wymaga opracowania wiarygodnych standardów postępowania (Hermanowska-Szpakowicz 2003 s. 29-38).

Prawidłowe rozpoznanie boreliozy uwarunkowane jest odpowiednim doborem metod serologicznych i poprawną interpretacją uzyskanych wyników. Obecnie zalecana jest dwuetapowa diagnostyka boreliozy. Pierwszy etap obejmuje badania z zastosowaniem testów serologicznych o wysokiej czułości (immunofluorescencyjny IIFT lub ELISA). Ze względów ekonomicznych często stosowana jest także technika jakościowa (ELFA, analizator Vidas). Wyniki dodatnie i wątpliwe uzyskane tymi metodami wymagają potwierdzenia metodą Western blot (Wb), która charakteryzuje się wysoką swoistością. W praktyce w większości przypadków stosuje się jedynie metody pierwszego etapu diagnostyki.

Diagnostyka dwuetapowa jest postępowaniem rekomendowanym i zalecanym, zarówno przez europejskie, jak i amerykańskie Laboratoria Referencyjne oraz Center for Disease Control and Prevention i German Society for Hygiene and Microbiology (Tylewska-Wierzbanowska 2005 s. 289-293).

Celem niniejszej pracy była analiza wyników uzyskanych metodą ELFA (z analizatorem Vidas) i metodą IIFT jako testów przesiewowych stosowanych w diagnostyce zakażeń krętkiem *B. burgdorferi* dla określenia stopnia błędu popełnianego przy jednoetapowej diagnostyce.

Materiał i metody

W pierwszym etapie badań określano obecność przeciwciał klasy IgM i IgG skierowanych przeciwko antygenom *B. burgdorferi* metodami ELFA (grupa I) i IIFT (grupa II) u osób z podejrzeniem boreliozy.

W drugim etapie badań zastosowano test Western blot jako test ostatecznego potwierdzenia lub wykluczenia zakażenia krętkiem *B. burgdorferi*. Test Wb wykonywano dla surowic, dla których metodami przesiewowymi otrzymano wynik dodatni lub wątpliwy.

Grupę badaną stanowiło 123 pacjentów z podejrzeniem boreliozy.

Grupa I (46 osób) – wykonano test przesiewowy do jakościowego wykrywania przeciwciał (IgM/IgG) metoda ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay) analizator mini VIDAS, bio Merieux.

Grupa II (77 osób) – przeciwciała klasy IgM i IgG oznaczano metodą immunofluorescencji pośredniej (IIFT; Euroimmun).

W teście IIFT w klasie IgM miano $\geq 1:10$ interpretowano jako infekcję pierwotną.

W klasie IgG miano 1:10 uważano za wynik ujemny, miano 1:100 interpretowano jako dawną lub ostrą infekcję, miano powyżej 1:320 oznaczało infekcję ostatnio przebytą lub przewlekłą.

U pacjentów, u których w pierwszym etapie badań uzyskano wyniki dodatnie i wątpliwe wykonano test Western blot (Euroimmun) jako test ostatecznego potwierdzenia lub wykluczenia zakażenia krętkiem *B. burgdorferi*.

W teście WB wynik uznawano jako pozytywny jeśli stwierdzono obecność wysoce specyficznego pasma OspC (w klasie IgM) i VIsE (w klasie IgG). W przypadku braku pasm charakterystycznych dla IgM i IgG ocenie poddawano pasma towarzyszące. Obecność przynajmniej jednego z pasm p83, p39, p31, p30, p19, p17, mimo braku pasma OspC, interpretowano jako wynik dodatni w klasie IgM. Obecność 2 lub więcej pasm p83, p39, p31, p30, OspC(p25), p21, p19, p17, mimo braku pasma VIsE, interpretowano jako wynik dodatni w klasie IgG.

Wyniki

U 46 osób obecność przeciwciał IgM/IgG określano metodą przesiewową ELFA na analizatorze mini VIDAS (bio Merieux). U 21 osób uzyskano wyniki dodatnie – stwierdzono jakościowo obecność przeciwciał IgM/IgG anty-Borrelia. W badanej grupie otrzymano 5 wyników wątpliwych i 20 ujemnych.

U pacjentów, u których otrzymano wyniki dodatnie i wątpliwe wykonano test potwierdzenia metodą Western blot.

Wszystkie wyniki dodatnie (21) uzyskane w pierwszym etapie badań zostały potwierdzone jako dodatnie metodą Wb.

U 7 osób otrzymano wyniki dodatnie zarówno w klasie IgM jak i IgG. W każdym przypadku stwierdzono obecność pasm charakterystycznych: OspC w klasie IgM i Vlse w klasie IgG. Ponadto stwierdzono również obecność innych pasm towarzyszących.

U 6 osób otrzymano wyniki dodatnie jedynie w klasie IgM (pasma OspC i/lub pasma towarzyszące), u 8 osób wyniki dodatnie jedynie w klasie IgG (pasma towarzyszące inne niż VlsE).

Spośród 5 wyników wątpliwych po wykonaniu testu Wb 4 uznano jako dodatnie – stwierdzono obecność pasm charakterystycznych dla antygenów Borrelia innych niż OspC i Vlse. Jeden uznano jako ujemny – nie stwierdzono obecności pasm charakterystycznych.

Szczegółowe dane zamieszczono w Tab. 1.

Tab. 1. Wyniki uzyskane metodą ELFA na analizatorze Mini Vidas oraz metodą Western blot (Wb)

46 osób - I grupa	
VIDAS IgM/IgG	Wb IgM i IgG
21 +	7 + (IgM i IgG) 6 + (IgM) 8 + (IgG)
5 +/-	4 + (IgM i IgG) 1 - (IgM i IgG)
20 -	testu Wb nie wykonywano

+ wynik dodatni

+/- wynik wątpliwy

- wynik ujemny

Obecność przeciwciał IgM i IgG metodą immunofluorescencji pośredniej (IIFT) określano u 77 osób.

U 32 osób otrzymano wyniki dodatnie: dla IgM miano wyższe niż 1:10, dla IgG miano od 1:100.

U 10 osób uzyskano wyniki wątpliwe: dla IgM miano 1:10, dla IgG miano niższe niż 1:100.

W 35 przypadkach otrzymano wyniki ujemne w obu klasach przeciwciał.

Uzyskane wyniki dodatnie i wątpliwe weryfikowano testem Wb.

Wszystkie wyniki dodatnie uzyskane metodą IIFT potwierdzono jako dodatnie testem Wb. Dziesięć określono jako dodatnie w obu klasach przeciwciał – w klasie IgM stwierdzono obecność pasma OspC, w klasie IgG pasma VlsE. W obu klasach stwierdzono także obecność pasm dodatkowych. U 2 osób uzyskano wynik dodatni jedynie w klasie IgM (obecne pasmo OspC), u 20 dodatni tylko w klasie IgG (obecne pasmo VlsE i/lub pasma towarzyszące).

Spośród 10 wyników wątpliwych po wykonaniu testu Wb 3 uznano jako dodatnie w klasie IgM, 1 dodatni w klasie IgG. Oceny dokonano na podstawie obecności pasm towarzyszących innych niż OspC i VlsE. Pozostałe 6 uznano jako ujemne.

Tab. 2 Wyniki uzyskane metodą IIFT oraz metodą Western blot(Wb)

77 osób – II grupa	
IIFT IgM i IgG	Wb IgM i IgG
32 +	10 + (IgM i IgG) 2 + (IgM) 20 + (IgG)
10 +/-	3 + IgM 1 + IgG 6 -
35-	testu Wb nie wykonywano

+ wynik dodatni

+/- wynik wątpliwy

- wynik ujemny

Dyskusja

Borelioza jest chorobą o złożonej etiopatogenezie, charakteryzuje się fazowym przebiegiem, różnorodnością objawów skórnych, stawowych, kardiologicznych, neurologicznych. W diagnostyce boreliozy ważną kwestię stanowi fakt przebywania osób, u których podejrzewa się boreliozę na terenach występowania kleszczy zakażonych krętkiem *B. burgdorferi*, ewentualną obecność rumienia wędrującego, występujące dolegliwości oraz wyniki badań serologicznych [6].

Diagnostyka serologiczna boreliozy polega na stwierdzeniu obecności w surowicy pacjenta przeciwciał skierowanym przeciwko charakterystycznym białkom krętka *B. burgdorferi* [10]. Do testów najczęściej wykonywanych w serologicznej diagnostyce boreliozy należą: test immunoenzymatyczny (ELISA), immunofluorescencji pośredniej (IIFT), metoda ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay), zaś do weryfikacji uzyskanych wyników test Western blot.

Diagnostyka boreliozy poza uwzględnieniem heterogenności szczepów *Borrelia burgdorferi* stwarza trudności interpretacyjne zarówno we wczesnych jak i późnych okresach choroby. We wczesnym okresie choroby wynik badania serologicznego często bywa ujemny lub też przeciwciała klasy IgM pojawiają się w ilości nie wykrywalnej testem. Fałszywie dodatnie wyniki testów mogą pojawić się w niektórych zakażeniach wirusowych np. wirus EBV, w chorobach autoimmunologicznych, chorobach wątroby.

Poprawa diagnostyki dotyczy wczesnych kresów chorobowych, gdy EM ma charakter nietypowy lub nie występuje [13].

W pracy analizowano wyniki uzyskane dwoma metodami przesiewowymi – ELFA (analizator Vidas) i IIFT. Metody te wykorzystywane są często w pierwszym etapie diagnostyki zakażeń *B. burgdorferi* ze względów ekonomicznych i krótki czas oczekiwania na wynik testu. Uzyskane wyniki badań wskazują, że wszystkie wyniki dodatnie uzyskane wspomnianymi metodami przesiewowymi potwierdzone są jako dodatnie testem Western blot. Część wyników wątpliwych po weryfikacji testem Wb okazuje się ujemna.

Na podstawie przeprowadzonej analizy można wnioskować, że testy przesiewowe do jakościowego wykrywania przeciwciał (metoda ELFA analizator mini VIDAS, bio Merieux), oraz metoda ilościowa immunofluorescencyjna (IIFT, Euroimmun) mogą być stosowane w pierwszym etapie diagnostyki. Nie można jednak pominąć drugiego etapu diagnostyki – testu potwierdzającego Western blot, któremu można zidentyfikować białka wysoce specyficzne dla *Borrelia burgdorferi* jak VIsE, p83, p39, p31 (OspA), p30, p25 (OspC), p21, p19, p17.

Taki schemat diagnostyczny pozwala na eliminację nieswoistych wyników fałszywie dodatnich, które zdarzają się z różną częstotliwością przy

diagnostyce jednym testem oraz pozwala na jednoznaczną ocenę przy wynikach wątpliwych.

Wnioski

1. Oznaczenia wykonywane z użyciem analizatora VIDAS oraz metoda immunofluorescencyjna IIFT mogą być z powodzeniem stosowane do wstępnej detekcji przeciwciał anti-*Borrelia burgdorferi*.

2. Ze względu na możliwość uzyskania wyników fałszywie dodatnich wskazane jest wykonanie testu WB, który ostatecznie potwierdza lub wyklucza zakażenie *B. burgdorferi*.

Streszczenie

Serologiczna diagnostyka boreliozy mimo opracowania i wprowadzenia różnych metod wciąż wymaga weryfikacji. Metody przesiewowe najczęściej stosowane do oceny przeciwciał anti-*Borrelia* to metoda jakościowa ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay, analizator Vidas), metoda immunofluorescencji pośredniej (IIFT) oraz metoda immunoenzymatyczna ELISA. Wszystkie wymienione metody charakteryzują się wysoką czułością. Ze względu na możliwość wystąpienia nieswoistych reakcji krzyżowych i wyników fałszywie dodatnich wskazana jest weryfikacja wyników wątpliwych i dodatnich uzyskanych metodami przesiewowymi. Weryfikacji dokonuje się testem Western blot (Wb) o wysokiej swoistości. Technika Wb pozwala na identyfikację przeciwciał dla białek wysoce specyficznych dla *Borrelia burgdorferi*: VI sE, p83, p39, p31 (OspA), p30, p25 (OspC), p21, p19, p17, wśród których białko VI sE jest najbardziej swoiste dla odpowiedzi w klasie IgG oraz białko OspC, którego obecność związana jest z produkcją przeciwciał IgM.

Celem niniejszej pracy była analiza wyników uzyskanych metodą ELFA (z analizatorem Vidas) i metodą IIFT jako testów przesiewowych stosowanych w diagnostyce zakażeń krętkiem *B. burgdorferi*.

THE TWO-STAGE SEROLOGIC DIAGNOSIS OF LYME BORRELIOSIS - VERIFICATION OF METHODS

Key words: Lyme boreliosis, *Borrelia burgdorferi*, Western blot

Summary

The Lyme borreliosis has become a serious diagnostic problem in Europe and in Poland. The selection of the most specific serologic methods for the diagnosis of *Borrelia burgdorferi* infections requires some re-evaluation. Screening tests used most frequently for the qualitative detection of anti-*Borrelia* antibodies include the ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay; analysis device mini VIDAS) assay whereas the quantitative methods are represented by the indirect immunofluorescence test (IIFT) and ELISA. All the above mentioned methods are characterized by a high sensitivity. Nevertheless, due to a risk of non-specific cross-reactions and false-positive results, verification of doubtful and positive results obtained by screening methods is recommended. The verification can be accomplished by the application of the Western Blot test characterized by a high specificity. The major advantage of the WB technique is identification of proteins, which demonstrate a high specificity for *B. burgdorferi*: VIsE, p83, p39, p31 (OspA), p30, p25 (OspC), p21, p19, and p17. Among them, the VIsE protein is the most specific protein for IgG antibody production whereas the OspC protein is connected with the presence of IgM antibodies. The aim of the study was the analysis of results obtained by the ELFA (along with the Vidas analyser) and the IIFT methods as screening tests used in the diagnosis of *B. burgdorferi* infections.

Literatura

1. Adamek B. i wsp. (2006), Narażenie pracowników leśnych na choroby odkleszczowe a stosowane metody prewencji. Przegląd Epidemiologiczny, 60, s. 11-15.
2. Andrzejewski A. i wsp. (2004), Zakażenie krętkiem *Borrelia burgdorferi*- aspekty kliniczno terapeutyczne. Klin. Pediat. 12, 4, s. 423-430.
3. Andrzejewski A. i wsp. (2006), Odrębność przebiegu zakażenia krętkiem *Borrelia burgdorferi* u dzieci. Przegląd Epidemiologiczny 60, s. 16-22.
4. Chmielewska-Badora i wsp. (1997), Badania seroepidemiologiczne w kierunku boreliozy na terenie makroregionu lubelskiego u różnych grup ludności (1994-1996). Medycyna Ogólna. 3, 4, s. 395-400.

5. Flisak R. i wsp. (2004), Analiza przebiegu boreliozy z Lyme w zależności od pierwotnej postaci klinicznej choroby u mieszkańców Białowieży. *Przegląd Epidemiologiczny* 3, s. 445-450.
6. Hermanowska-Szpakowicz T. (2005), Borelioza z Lyme. *Służba Zdrowia*. 51-54, s. 3452-3455.
7. Hermanowska-Szpakowicz T. i wsp. (2003), Problemy patogenetyczno-kliniczne boreliozy z Lyme. *Neurol. Neurochir. Pol.* 37, 2, s. 29-38.
8. Iżycka A. i wsp. (2000), Bakteriobójcze właściwości granulocytów obojętnochłonnych (PMN) krwi obwodowej u chorych z boreliozą z Lyme. *Med. Dośw. Mikrobiol.* 52, s. 165-171.
9. Pancewicz A. S. i wsp. (2006), Parametry obrony antyoksydacyjnej w surowicy krwi a wiek pracowników leśnictwa zakażonych krętkiem *Borrelia burgdorferi* – bezobjawowych nosicieli przeciwciał – doniesienie wstępne. *Przegląd Epidemiologiczny*. 60, 102-108.
10. Przytuła L. i wsp. (2006), Diagnostyka i leczenie boreliozowego zapalenia stawów. *Przegląd Epidemiologiczny*. 60, s. 125-130.
11. Tylewska-Wierzbanowska S. i wsp. (2005), Diagnostyka serologiczna boreliozy z Lyme – wytyczne europejskie. *Post. Mikrob.* 44, 3, s. 289-293.
12. Wojewódzka Stacja Sanitarно-Epidemiologiczna w Lublinie. www.wsse.lublin.pl.
13. Zajkowska J. i wsp. (2006), Test Western blot z białkiem IIsE oraz antygenami „in vivo” w diagnostyce boreliozy z Lyme. *Przegląd Epidemiologiczny* 2006, 60, s. 177-185.

