

Marzena Zalewska-Ziob¹, Brygida Adamek¹,
Joanna K. Strzelczyk¹, Gizela Trapp¹, Tomasz Wielkoszyński²,
Aleksander Owczarek³, Marek Asman⁴, Ewa Szilman⁴,
Piotr Szilman⁴, Celina Pająk⁴, Krzysztof Solarz⁴,
Klaudia Plinta⁵, Andrzej Wiczowski¹

Received: 22.03.2012

Accepted: 29.03.2012

Published: 30.04.2012

Wykładowniki serologiczne kontaktu z krętkiem *Borrelia burgdorferi* s.l. wśród mieszkańców aglomeracji śląskiej

Serological remarks of *Borrelia burgdorferi* s.l. infection
in Upper Silesia inhabitants

¹ Katedra i Zakład Ogólnej Biologii Lekarskiej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach, ul. Jordana 19, 41-808 Zabrze.
Kierownik: prof. dr hab. n. med. Andrzej Wiczowski

² Katedra i Zakład Chemii Ogólnej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach, ul. Jordana 19, 41-808 Zabrze

³ Zakład Statystyki Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach, ul. Ostrogórska 30, 41-200 Sosnowiec

⁴ Zakład Parazytologii Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach, ul. Jedności 8, 41-218 Sosnowiec

⁵ Studenckie Koło Naukowe przy Katedrze i Zakładzie Ogólnej Biologii Lekarskiej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach, ul. Jordana 19, 41-808 Zabrze

Adres do korespondencji: Dr n. med. Brygida Adamek, Katedra i Zakład Ogólnej Biologii Lekarskiej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach, ul. Jordana 19, 41-808 Zabrze

Badanie przeprowadzono w ramach realizacji projektu: „Ryzyko ekspozycji na kleszcze i przenoszone przez nie patogeny” [PL 0343]

finansowanego przez Norweski Mechanizm Finansowy i Mechanizm Finansowy EOG oraz Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego RP

Streszczenie

Wstęp: *Borrelia burgdorferi* s.l. jest przenoszonym przez kleszcze krętkiem, mogącym powodować ostrą lub przewlekłą infekcję, zarówno objawową, jak i bezobjawową. Wynik zakażenia jest pochodną interakcji genotypu krętka z układem odpornościowym gospodarza. **Materiał i metody:** Badanie przeprowadzono w grupie 1104 mieszkańców Śląska (wiek 3-96 lat, średnia $44,9 \pm 19,2$), którzy pamiętali epizod ukłucia kleszcza w przeszłości i nie mieli rozpoznanej przewlekłej boreliozy. Dane anamnestyczne obejmowały wystąpienie rumienia i potwierdzenie rumienia wędrującego przez lekarza. Przeprowadzono oznaczenie obecności przeciwciał klasy IgM i IgG przeciwko krętkom *Borrelia* metodą ELISA oraz zweryfikowano wyniki pozytywne i wątpliwe testem Western blot. **Wyniki:** Rumień po ekspozycji na ukłucie kleszcza odnotowano u 22,5% badanych. W grupie tej 70% zasięgnęło porady lekarskiej, a rumień wędrujący został potwierdzony w 3/4 przypadków. Dwadzieścia pięć procent bez widocznego rumienia zgłosiło się po pomoc medyczną, a wczesną boreliozę rozpoznano u 4,2% tej grupy. W grupie osób z potwierdzonym w przeszłości rumieniem wędrującym u 55% stwierdzono obecność badanych przeciwciał, natomiast w grupie z wykluczonym – u 40%. Zgodność wyników badań wykonanych testami ELISA i Western blot, wyrażona współczynnikiem τ Kendalla, była niska i wyniosła 0,256. **Wnioski:** U osób z ukłuciem przez kleszcza w wywiadzie i bez rozpoznania przewlekłej boreliozy pozytywne wyniki badań serologicznych wydają się niewystarczające do rozpoznania choroby. Ze względu na niską zgodność wyników testów ELISA i Western blot ostateczne rozpoznanie powinno być oparte na wnikliwej analizie indywidualnego obrazu klinicznego.

Słowa kluczowe: *Borrelia burgdorferi* s.l., rumień wędrujący, przeciwciała anty-*B.b.*, metoda ELISA, test Western blot

Summary

Introduction: *Borrelia burgdorferi* s.l. is a tick-transmitted spirochaete, which can cause acute or chronic infection, either symptomatic or occult. The result depends on spirochaete species' interaction with individual human immunity. **Material and methods:** The survey was conducted in the group of 1104 Silesia inhabitants (age 3-96 years; mean 44.9 ± 19.2) who remembered tick-bite episode in the past and had not had recognized chronic borreliosis. The anamnestic data were focused on erythema episode and confirmation of erythema

migrans by physician. The analysis of anti-*Borrelia* IgM and IgG antibodies in serum with ELISA method, and verification of positive or uncertain results with Western blot analysis were conducted. **Results:** Erythema after tick-bite exposition was noticed in 22.5%; 70% of them realized medical consultation and erythema migrans was confirmed in ¾ of cases. Twenty-five percent of those without erythema asked for medical help and early borreliosis was diagnosed in 4.2% of them. In the group of patients with erythema migrans confirmed in the past 55% had positive ELISA tests results while in the group with exclusion – over 40%. Coincidence of results obtained with ELISA and Western blot methods expressed by Kendall's τ coefficient was low: 0.256. **Conclusions:** In persons with tick-bites in anamnesis and none of chronic borreliosis diagnosed the serological tests positive results seems to be not enough for disease confirmation. Because of low ELISA and Western blot tests results compatibility, the final diagnosis should be based on perceptive analysis of individual clinical picture.

Key words: *Borrelia burgdorferi* s.l., erythema migrans, anti-*B.b.* antibodies, ELISA method, Western blot test

WSTĘP

Borelioza jest przewlekłą chorobą zapalną wywołaną przez krętki *Borrelia burgdorferi* (*B.b.*), przenoszoną na człowieka w wyniku ukłucia przez zarażonego nimi kleszcza z rodzaju *Ixodes*^(1,2). Czynnikiem etiologicznym mogą być trzy chorobotwórcze genogatunki: *Borrelia burgdorferi sensu stricto* (*s.s.*), *Borrelia garinii* i *Borrelia afzelii*, nazywane wspólnie *Borrelia burgdorferi sensu lato* (*s.l.*)⁽³⁻⁵⁾. Żywe komórki *B.b.* posiadają cechy, które wyraźnie wyróżniają je spośród większości bakterii. Ze względu na konieczność adaptacji do zmieniających się warunków bytowania (organizm kleszcza/organizm kregowca/penetracja do tkanek) krętki dokonują zmian antygenów powierzchniowych oraz zmian morfologicznych⁽⁶⁾. Ruchliwe formy spiralne w odpowiedzi na stres środowiskowy – brak niektórych składników odżywczych, mechanizmy immunologiczne gospodarza – mogą przekształcić się w cysty i w ten sposób ukryć materiał genetyczny w oczekiwaniu na powrót sprzyjających warunków. Unikanie odpowiedzi immunologicznej poprzez zmiany antygenów powierzchniowych sprawia, że wytworzone już przeciwciała tracą dostęp do swoistych epitopów, powstaje natomiast konieczność rozpoznania nowych cząstek i wytworzenia przeciwciał o innej swoistości. Taki mechanizm powoduje, że wcześniej wytworzone przeciwciała nie spełniają funkcji ochronnej, a odpowiedź immunologiczna staje się nieadekwatna^(6,7). Krętki, uciekając przed mechanizmami obronnymi gospodarza, ujawniają również zdolność lokalizacji w obszarach, które stanowią azyl przed atakiem przeciwciał – przestrzeniach wewnątrzkomórkowych komórek śródbłonna i fibroblastów, tkance łącznej układu ruchu i ośrodkowym układzie nerwowym. Pozakomórkowo mogą powstawać również formy *blebs* – zbudowane głównie z lipoprotein i lipopeptydów. Formy te, zawierające struktury rozpoznawane przez układ immunologiczny, sprzyjają rozwojowi i podtrzymywaniu reakcji zapalnej w tkankach pomimo braku zdolnych do namnażania się krętków^(4,6).

Zróznicowana symptomatologia boreliozy z Lyme pozostaje w ścisłym związku z biologią krętków i ich interakcją z mechanizmami immunologicznymi. Wprowadzenie do organizmu człowieka krętków wraz z ukłuciem kleszcza prowadzi do ich wstępnego namnażania się w miejscu wnikięcia. W części przypadków towarzyszy temu procesowi lokalna reakcja zapalna w obrębie skóry w postaci rumienia wędrującego (*erythema chronicum migrans*, ECM). Wprowadzeniu patogenu do organizmu mogą też towarzyszyć niecharakterystyczne objawy związane z reakcją ogólnoustrojową. Równoczesne uruchomienie mechanizmów immunologicznych skutkuje stopniowym wytwarzaniem przeciwciał, kolejno w klasie IgM, a następnie IgG. W efekcie zmiany na skórze samoograniczają się i mogą zanikać nawet bez leczenia. U części zakażonych *B.b.* osób w ogóle nie dochodzi do manifestacji zakażenia w postaci zmian skórnych, co nie przesądza o dalszych losach zakażenia. Z miejsca wprowadzenia do organizmu zakażenie szerzy się przez ciągłość, a rozsiew odbywa się drogą limfatyczną i krwionośną⁽⁸⁻¹⁰⁾. W zależności od zajętego w dalszym etapie obszaru lub narządu symptomatologia obejmuje wtórne zmiany o typie rumienia wędrującego, zaburzenia czynności układu mięśniowo-szkieletowego, nerwowego i krążenia (stadium wczesne rozsiane). Późne stadium choroby, po wielu tygodniach/miesiącach od zakażenia, może manifestować się w postaci przewlekłego zapalenia stawów, przewlekłej polineuropatii czy encefalopatii, obwodowych zanikowych zmian skórnych⁽⁸⁾. Rozpoznanie wczesnego stadium boreliozy manifestującego się rumieniem o charakterystycznej morfologii i ewolucji, w powiązaniu z dodatnim wywiadem w kierunku kontaktu z kleszczem, może być ustalone na podstawie obrazu klinicznego. Pozostałe stadia boreliozy, o zróżnicowanej symptomatologii wymagającej wnikliwej diagnostyki różnicowej, rozpoznawane są za pomocą badań laboratoryjnych^(10,11). W diagnostyce boreliozy wykorzystuje się dwie grupy testów: pośrednie i bezpośrednie. Do testów pośrednich, które wykrywają specyficzne przeciwciała w klasach IgM i IgG

w różnych materiałach biologicznych, zaliczamy: testy immunoenzymatyczne ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*), metodę immunofluorescencyjną, hemaglutynację i testy potwierdzenia oparte na technice Western blot. Testy bezpośrednie wykrywają obecność czynnika zakaźnego w materiale biologicznym i należą do nich: amplifikacja bakteryjnego DNA metodą PCR, hodowla krętków *B.b.* z krwi, płynu mózgowo-rdzeniowego i innych materiałów biologicznych oraz testy na obecność kompleksów immunologicznych w płynach ustrojowych^(3,12). Największą popularność zyskały metody serologiczne. Według standardów zalecanych przez EUCALB (European Union Concerted Action on Risk Assessment in Lyme Borreliosis) jedynie rumień wędrujący nie wymaga potwierdzenia serologicznego, natomiast pozostałe postaci boreliozy powinny być potwierdzone dwustopniowym badaniem immunoserologicznym obejmującym test ELISA o mniejszej swoistości i dużej czułości, a następnie test Western blot^(10,11,13).

W testach diagnostycznych wykorzystywane są dwie grupy białek immunogennych *B.b.*: białka pospolite, takie jak: p41, p66, p68, p71, p73 (dające reakcje krzyżowe z innymi krętkami, a nawet niespokrewnionymi bakteriami), oraz białka specyficzne (charakterystyczne dla *B.b.*): OspA, OspB, OspC, BmpA (p39), p93, p83/100, OspE, OspF^(6,14). Wczesna odpowiedź immunologiczna (przeciwciała w klasie IgM) skierowana jest głównie przeciwko białku flagelliny (p41) oraz białku OspC związanemu z błoną zewnętrzną bakterii. W tym stadium infekcji rzadko pojawiają się przeciwciała anty-OspA. Późniejsze etapy choroby charakteryzują się obecnością przeciwciał w klasie IgG skierowanych do wielu różnych białek, która może utrzymywać się przez miesiące, a nawet lata. Należy zwrócić uwagę na fakt, że przeciwciała anty-OspC w klasie IgG są bardzo rzadko obecne w późniejszych stadiach choroby, natomiast przeciwciała anty-OspC w klasie IgM mogą utrzymywać się u niektórych osób przez kilka lat⁽¹⁴⁾.

Przeciwciała nie powinny być wykrywane w czasie, gdy chory ma objawy wczesnej infekcji zlokalizowanej (ECM). Gdy zmiany skórne są nietypowe albo ich nie ma, potwierdzenie rozpoznania wymaga badań serologicznych, ale mogą one być mniej czułe w pierwszym miesiącu od wystąpienia objawów zakażenia. We wczesnej fazie choroby przeciwciała mogą jeszcze nie osiągać poziomu pozwalającego na ich wykrycie we krwi, co przekłada się na uzyskanie wyniku fałszywie ujemnego. Obecność przeciwciał w surowicy krwi należy skorelować z czasem trwania choroby, jak również z obecnością objawów świadczących o wczesnej rozsiaanej infekcji (rumień mnogi, porażenie nerwów czaszkowych). Jeśli u chorych z podejrzeniem wczesnej boreliozy nie wykrywa się swoistych przeciwciał, należy pobrać krew po upływie 2-4 tygodni w celu wykonania powtórnego badania. Cztery tygodnie po ukłuciu przez

zakażonego kleszcza test Western blot wykrywa większość zakażeń *B.b.*, a liczba wyników fałszywie dodatnich jest mniejsza niż w przypadku testu ELISA^(11,15). Przeciwciała w klasie IgM skierowane przeciwko białku OspC mogą utrzymywać się przez wiele lat, nawet po skutecznej antybiotykoterapii, więc obecność przeciwciał IgM nie może być jedynym kryterium diagnostycznym potwierdzającym świeżą infekcję⁽¹⁵⁾. Żadne badanie serologiczne nie ma stuprocentowej czułości ani swoistości, dlatego nie u wszystkich chorych udaje się potwierdzić boreliozy przy pomocy badań laboratoryjnych⁽⁸⁾. Pacjenci z objawami późnego stadium boreliozy mają zwykle wysokie miano przeciwciał, a w teście Western blot liczne paski kompleksów w klasie IgG. Niemniej w późniejszym stadium powstanie cyst wiąże się z zanikiem części specyficznych antygenów, co skutkuje zahamowaniem produkcji przeciwciał. Spadek poziomu przeciwciał jest czynnikiem sprzyjającym przekształceniu cysty w formę krętka. Mechanizm ten wyjaśnia przewlekły lub nawracający charakter infekcji *B.b.*^(6,16) Za przewlekłą manifestację narządową mogą też być odpowiedzialne formy *blebs* krętków, podtrzymujące reakcje zapalne w tkankach. Brak wykrywalnych przeciwciał przeciwko *B.b.* u chorych z podejrzeniem późnej boreliozy praktycznie wyklucza jej rozpoznanie⁽¹⁷⁾.

Heterogenność, zmienność antygenowa *B.b.*, a także zanikanie wielu antygenów w różnych stadiach choroby i w różnych stanach fizjologicznych krętków stanowią o ich zjadliwości i powodują unikanie odpowiedzi immunologicznej, co wpływa na dynamikę procesu chorobowego i utrudnia interpretację testów diagnostycznych^(4,6). Ponadto obecność przeciwciał stwierdzana w późniejszych etapach choroby nie pozwala na odróżnienie aktywnego zakażenia od przebytego w przeszłości, nawet wówczas, gdy wykrywane przeciwciała są całkowicie swoiste^(6,8). Udowodniono, że u części osób przeciwciała przeciwko *B.b.* mogą się utrzymywać w surowicy przez 10-20 lat, będąc jedynie świadectwem odpowiedzi immunologicznej – nie stanowią wskaźnika aktywnego zakażenia⁽¹⁸⁾. Stąd też obecność utrzymujących się przez lata przeciwciał w klasie IgG nie może być wykorzystywana do monitorowania leczenia. Dowiedziono również, że stężenie wykrywanych przeciwciał nie koreluje ze stanem klinicznym pacjenta, dlatego nie należy „leczyć” dodatnich wyników badań serologicznych, którym nie towarzyszą objawy kliniczne^(6,11,15). Niewłaściwe rozpoznanie choroby i/lub wdrożenie niepotrzebnego leczenia może obciążać zdrowego pacjenta, wywołując u niego trwałe poczucie choroby^(6,14).

Badania serologiczne wykonywane są w toku diagnostyki różnicowej u pacjentów z dolegliwościami sugerującymi boreliozy lub w przebiegu leczenia już rozpoznanej choroby. Ponieważ jednak Polska uznana została za teren endemiczny dla boreliozy, jest możliwe, że część osób, które przebyły kontakt z kleszc-

czem w przeszłości – w efekcie ekspozycji zawodowej, w warunkach rekreacyjnych lub w miejscu zamieszkania – uległa również zakażeniu krętkiem. Zaplanowano ocenę przydatności wykonania badań serologicznych w grupie osób, które przebyły incydent ukłucia przez kleszcza w przeszłości, natomiast nie zostało u nich rozpoznane późne stadium choroby do chwili rekrutacji do niniejszego badania.

MATERIAŁ I METODA

Do udziału w badaniu o charakterze epidemiologicznym zaproszono osoby zamieszkałe na terenie województwa śląskiego w pobliżu obszarów leśnych, które przebyły incydent/incydenty ukłucia przez kleszcza i wyraziły pisemną zgodę na udział w badaniu po uzyskaniu informacji o jego celu i charakterze. Badanie obejmowało wypełnienie ankiety gromadzącej dane anamnestyczne dotyczące przebytego kontaktu z kleszczem, faktu wystąpienia zmian rumieniowych na skórze oraz weryfikacji rozpoznania ECM przez lekarza. Odnotowano ponadto wiek i płeć uczestników badania; nie przetwarzano danych osobowych. Od każdego uczestnika badania pobrano 5 ml krwi żyłnej z żyły łokciowej do probówek z EDTA. Pobraną krew przetransportowano w temperaturze 4-8°C do pracowni badań serologicznych Katedry i Zakładu Ogólnej Biologii Lekarskiej Wydziału Lekarskiego z Oddziałem Lekarsko-Dentystycznym w Zabrze Śląskiego Uniwersytetu Lekarskiego w Katowicach w celu wykonania nieodpłatnych dla uczestnika badań serologicznych w kierunku zakażenia *B.b.* Próbkę krwi odwirowywano w celu uzyskania surowicy, zamrażając uzyskany materiał w trzech porcjach o objętości 500 μ l w temperaturze -40°C do chwili wykonania dalszych oznaczeń. Dla każdego pacjenta wykonano oznaczenie miana przeciwciał przeciwko *B.b.* w klasie IgM oraz IgG, wykorzystując zestawy Anty-Borrelia ELISA (IgM) oraz Anty-Borrelia ELISA (IgG) (Euroimmun, Niemcy). W każdym przypadku uzyskania wyniku interpretowanego jako pozytywny lub graniczny/wątpliwy (niezależnie od klasy przeciwciał, dla której uzyskano taki wynik) wykonano test potwierdzenia oparty na technice Western blot dla przeciwciał klasy IgM i IgG, wykorzystując zestawy: recomLine Borrelia IgM (MG-4273) oraz recomLine Borrelia IgG (MG-4272) (Mikrogen, Niemcy). Badanie przeprowadzono w ramach realizacji projektu: „Ryzyko ekspozycji na kleszcze i przenoszone przez nie patogeny” [PL 0343] finansowanego przez Norweski Mechanizm Finansowy i Mechanizm Finansowy EOG oraz Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego RP. Uzyskane wyniki zostały poddane analizie statystycznej i przedstawione jako średnia $\pm$ odchylenie standardowe dla danych o rozkładzie normalnym i udziałów procentowych dla danych w skali nominalnej oraz porządkowej. Zgodność pomiędzy dwoma zmiennymi

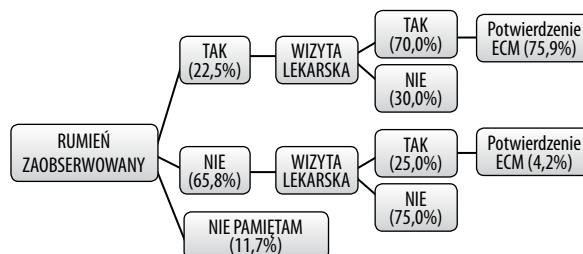
w skali porządkowej oceniono w oparciu o współczynnik τ Kendalla. Porównanie zmiennych w skali nominalnej i porządkowej zrealizowano z wykorzystaniem testu χ^2 , a dwóch proporcji z wykorzystaniem testu z . Za parametry istotne statystycznie uznawano zmienne, dla których poziom istotności p był mniejszy niż 0,05. Obliczenia wykonano z użyciem programów: Statistica 10.0 wersja PL oraz MS Office – Excel.

WYNIKI

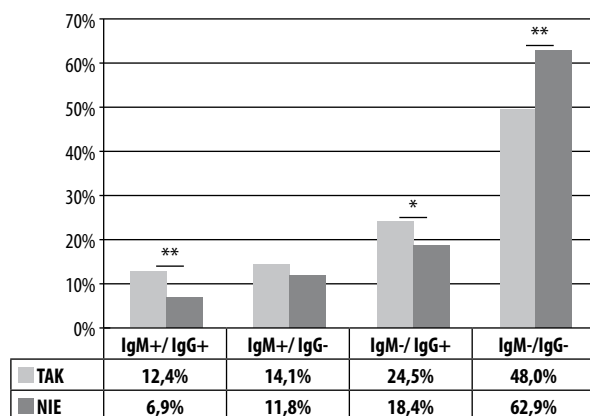
Badaniem objęto 1104 osoby w wieku od 3 do 96 lat (średnia wieku $44,9 \pm 19,2$), w tym 41,9% mężczyzn i 58,1% kobiet. W badanej grupie respondentów 22,5% zaobserwowało u siebie rumień, przy czym 70% tych osób skorzystało z wizyty lekarskiej i w tej grupie rumień został potwierdzony u 75,9% (rys. 1). U pozostałych osób zgłaszających się do lekarza zmiany skórne nie zostały ostatecznie ocenione jako rumień wędrujący. Ponad 10% uczestników badania nie pamiętało, czy pojawił się u nich rumień po kontakcie z kleszczem.

U wszystkich badanych oznaczono obecność przeciwciał przeciwko *B.b.* metodą ELISA, analizując uzyskane wyniki z wyróżnieniem podgrupy, która zaobserwowała wystąpienie rumienia, oraz podgrupy, która nie potwierdziła tego faktu. Wykazano istotne statystycznie różnice w rozkładzie poszczególnych wyników pomiędzy grupą, która zaobserwowała rumień, a grupą, w której rumienia nie zaobserwowano ($\chi^2=16,61$; $p<0,001$). Stwierdzono, że w grupie osób, które zaobserwowały rumień, istotnie statystycznie częściej występowały wyniki IgM+/IgG+ oraz IgM-/IgG+ niż u osób, które nie obserwowały rumienia (rys. 2). Zwraca uwagę również fakt, że u prawie połowy osób, u których stwierdzono rumień po kontakcie z kleszczem, nie wykrywa się obecności przeciwciał w żadnej z oznaczanych klas. Ponadto u ponad $\frac{1}{3}$ osób, u których nie obserwowano rumienia, jak również – zgodnie z kryterium włączenia – nie rozpoznano przewlekłego stadium boreliozy, stwierdzono obecność przeciwciał przeciwko *B.b.* (rys. 2).

Kolejną analizę przeprowadzono, wyróżniając podgrupę osób, u których potwierdzono rozpoznanie ECM,



Rys. 1. Częstość występowania zmian skórnych po kontakcie z kleszczem w grupie badanej wraz z wynikami konsultacji lekarskiej

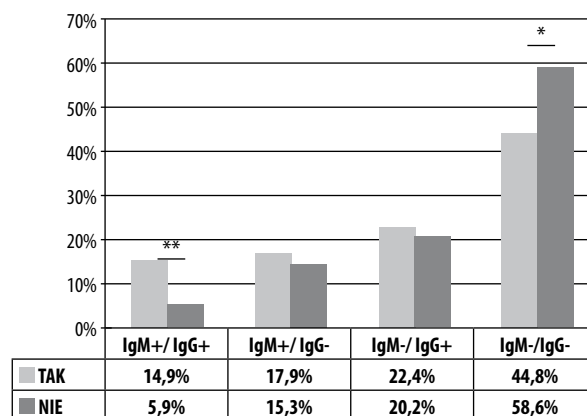


* p<0,05; ** p<0,01.

Rys. 2. Obecność przeciwciał przeciwko *B.b.* oznaczonych testem ELISA w zależności od wystąpienia (TAK) lub braku (NIE) rumienia po kontakcie z kleszczem

i podgrupę, w której takie podejrzenie zostało wykluczone (rys. 3). Wykazano istotne statystycznie różnice w rozkładzie poszczególnych wyników pomiędzy podgrupami – stwierdzono, że w grupie z potwierdzonym w przeszłości rumieniem wędrującym istotnie statystycznie częściej występowały wyniki IgM+/IgG+, natomiast rzadziej IgM-/IgG- ($\chi^2=10,34$; $p<0,05$). Niemniej ponad 40% osób z rozpoznaniem w przeszłości ECM nie wykazywało obecności przeciwciał w żadnej z oznaczanych klas i taki sam odsetek osób z wykluczonym w przeszłości ECM prezentował obecność przeciwciał przeciwko *B.b.* Oczywiście nie można w tej grupie wykluczyć możliwości przebycia innego kontaktu z zakażonym kleszczem, którego te osoby nie zauważyły i nie pamiętały. Jest również prawdopodobne występowanie u części badanych wyników fałszywie dodatnich.

Testy ELISA mogą być stosowane jedynie jako badania wstępne, których wyniki wymagają dodatkowej weryfikacji diagnostycznej i klinicznej. Stosowane w testach antygeny to uzyskiwane ze szczepów laboratoryjnych natywne lizaty oraz antygeny rekombinowane metodami inżynierii genetycznej. Obie te grupy cząstek różnią się od antygenów pojawiających się *in vivo* w różnych fazach zakażenia. Testy ELISA kryją wiele pułapek interpretacyjnych, wśród nich wyniki fałszywie ujemne i fałszywie dodatnie. Wyniki fałszywie dodatnie są efektem reakcji krzyżowych i przyczyniają się do nadrozpoznawalności boreliozy. W populacji osób zdrowych obserwuje się od 5% do 8% wyników fałszywie dodatnich. Problem ten dotyczy zwłaszcza przeciwciał w klasie IgM z uwagi na ich pentameryczną strukturę i zdolność wiązania kilku epitopów. Poważnym problemem są wyniki dodatnie u osób klinicznie zdrowych, u których przeciwciała w klasie IgG mogą utrzymywać się przez wiele miesięcy, a nawet lat, po zakończeniu leczenia i ustąpieniu objawów chorobowych^(15,18).



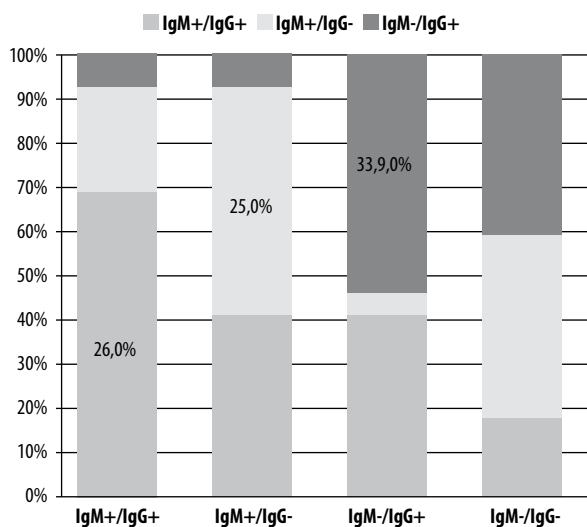
* p<0,05; ** p<0,01.

Rys. 3. Obecność przeciwciał przeciwko *B.b.* oznaczonych testem ELISA w zależności od potwierdzenia ECM przez lekarza (TAK) lub wykluczenia wczesnej fazy boreliozy (NIE)

W przypadku uzyskania w teście ELISA wyniku pozytywnego lub wątpliwego dla dowolnej klasy przeciwciał wykonano testy potwierdzenia (Western blot). Wyniki zamieszczono w tabeli 1 i przedstawiono graficznie na rys. 4.

Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic par zgodnych wyników obu testów pomiędzy grupą, w której zaobserwowano rumień, a grupą, w której rumienia nie zaobserwowano ($\chi^2=1,77$; $p=0,4116$). Zwraca uwagę fakt, że test potwierdzenia wykluczył obecność swoistych przeciwciał u 60% osób, u których w teście ELISA stwierdzono obecność przeciwciał w klasie IgG.

Testy oparte na technice Western blot stosowane w diagnostyce boreliozy mają taką samą czułość jak ELISA, ale wyższą swoistość, dlatego używa się ich w celu wery-



Rys. 4. Ilustracja zgodności wyników testów ELISA i Western blot w grupie badanej

ELISA	Western blot			
	IgM+/IgG+	IgM+/IgG-	IgM-/IgG+	IgM-/IgG-
IgM+/IgG+	26,0%	19,5%	27,3%	27,3%
IgM+/IgG-	8,9%	25,0%	2,7%	63,4%
IgM-/IgG+	2,6%	3,1%	33,9%	60,4%

Tabela 1. Wyniki testów potwierdzenia w zależności od wyników testów ELISA

fikacji wyników dodatnich uzyskanych metodą ELISA. Falszywie dodatnie wyniki dotyczą przede wszystkim przeciwciał w klasie IgM i występują u osób chorujących na inne choroby zakaźne (m.in. zakażenia bakteryjne, mononukleozę zakaźną, cytomegalię) i niezakaźne (np. autoimmunologiczne). Wykazano, iż fałszywie pozytywne wyniki dotyczące obecności przeciwciał klasy IgM występują u około 6% chorych na reumatoidalne zapalenie stawów, mononukleozę zakaźną i toczeń rumieniowaty układowy^(6,15).

Zgodność wyników badań immunoserologicznych przeprowadzonych obydwoma metodami oceniono w oparciu o współczynnik τ Kendalla. Okazał się on niski dla obu testów i wyniósł 0,256.

WNIOSKI

Przeciwciała przeciwko krętkom *Borrelia burgdorferi* stwierdzane są u około połowy badanych osób z terenu aglomeracji śląskiej, które przeżyły kontakt z kleszczem i nie wymagały leczenia z powodu przewlekłej postaci boreliozy. Przeciwciała takie wykrywane są zarówno u osób, u których w przeszłości rozpoznano wczesną postać zakażenia *B.b.*, jak i u tych, u których została ona wykluczona.

Ponieważ testy wykrywające przeciwciała są trudne do interpretacji w odniesieniu do indywidualnego pacjenta, a w grupie osób bez objawów choroby zgodność testów przesiewowych i potwierdzenia okazuje się niska, najdokładniejszym narzędziem pozwalającym podjąć decyzję o leczeniu oraz potwierdzającym jego skuteczność pozostaje ocena kliniczna i wnikliwa diagnostyka różnicowa.

PIŚMIENNICTWO: BIBLIOGRAPHY:

1. Bannister B.A., Begg N.T., Gillespie S.H.: Choroby zakaźne. Wyd. I polskie. Juszczak J. (red.). Wydawnictwo Medyczne Urban & Partner, Wrocław 1998: 420-423.

2. Raczkiewicz A., Tlustochowicz W.: Borelioza (choroba z Lyme). W: Puszczewicz M. (red.): Reumatologia. Medical Tribune Polska, Warszawa 2010: 312-314.
3. Wilske B., Fingerle V., Schulte-Spechtel U.: Microbiological and serological diagnosis of Lyme borreliosis. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 2007; 49: 13-21.
4. Maroszyńska-Dmoch E., Woźniakowska-Kapłon B.: Borelioza z Lyme – niedoceniany problem w praktyce kardiologa. Folia Cardiologica Excerpta 2008; 3: 375-382.
5. Adres: http://species.wikimedia.org/wiki/Borrelia_burgdorferi?uselang=pl.
6. Witecka-Knysz E., Klimczak M., Lakwa K. i wsp.: Borelioza: dlaczego diagnostyka jest tak trudna? Diagnosta Laboratoryjny 2007; 4: 1-4.
7. Radkowski M., Olszewska D.: Odporność przeciwzakaźna. W: Gołąb J., Jakóbskiak M., Lasek W. (red.): Immunologia. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2002: 337-355.
8. Bratton R.L., Whiteside J.W., Hovan M.J.: Diagnostyka i leczenie boreliozy z Lyme. Medycyna po Dyplomie 2008; 7: 65-72.
9. Smith R.P.: Current diagnosis and treatment of Lyme disease. Compr. Ther. 2005; 31: 284-290.
10. Kalicki B., Milart J., Placzyńska M. i wsp.: Borelioza – choroba nie tylko obszarów endemicznych – opis przypadku. Pediatr. Med. Rodz. 2011; 7: 409-414.
11. Flisiak R., Pancewicz S.: Diagnostyka i leczenie boreliozy z Lyme. Rekomendacje Polskiego Towarzystwa Epidemiologów i Lekarzy Chorób Zakaźnych. Przegl. Epidemiol. 2008; 62: 193-199.
12. Grier T.: Laboratory tests. Adres: www.canlyme.com.
13. Adres: <http://meduni09.edis.at/eucalb/cms/>.
14. Gąsiorowski J., Witecka-Knysz E., Knysz B. i wsp.: Diagnostyka boreliozy. Med. Pr. 2007; 58: 439-447.
15. Zajkowska J.M., Pancewicz S.A., Grygorczuk S. i wsp.: Neuroborelioza – wybrane aspekty patogenety, diagnostyki i leczenia. Pol. Merkur. Lekarski 2008; 24: 453-457.
16. Brorson O., Brorson S.H.: Transformation of cystic forms of *Borrelia burgdorferi* to normal, mobile spirochetes. Infection 1997; 25: 240-246.
17. Pancewicz S.A.: Komentarz do: Bratton R.L., Whiteside J.W., Hovan M.J.: Diagnostyka i leczenie boreliozy z Lyme. Medycyna po Dyplomie 2008; 7: 73-74.
18. Kalish R.A., McHugh G., Granquist J. i wsp.: Persistence of immunoglobulin M or immunoglobulin G antibody responses to *Borrelia burgdorferi* 10-20 years after active Lyme disease. Clin. Infect. Dis. 2001; 33: 780-785.