

## Diagnostyka laboratoryjna boreliozy w środowisku pracowników leśnych

### The role of laboratory diagnostic of boreliose in the environment of forest workers

Patryk Matuszek<sup>1 (a-e)</sup>, Victor Herbst<sup>4 (a, c, d)</sup>, Mieczysław Woźniak<sup>2, 3 (a, d, e)</sup>

<sup>1</sup> Euroimmun Polska, Wrocław, Polska. Kierownik: Dr M. Klimczak

<sup>2</sup> Katedra Analityki Medycznej, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu. Kierownik: Prof. dr hab. M. Woźniak

<sup>3</sup> Department of Pharmacology, University of Saskatchewan, Saskatoon, Kanada. Kierownik: Prof. dr. V. Gopalakrishnan

<sup>4</sup> EUROIMMUN AG, Lubeka, Niemcy. Kierownik: Prof. W. Stocker

(a) koncepcja pracy

(b) zebranie materiału

(c) wykonanie badań

(d) opracowanie wyników badań

(e) przygotowanie publikacji

#### STRESZCZENIE

**Wstęp:** Laboratoryjna diagnostyka boreliozy opiera się na wykrywaniu przeciwciał klasy IgG i IgM przy pomocy testu ELISA oraz testu potwierdzenia Line-blot. **Materiał i metody:** Badania na obecność specyficznych przeciwciał anty-Borrelia wykonano wśród 568 pracowników leśnych. Testy ELISA wykonano w surowicy, ślinie oraz suchej kropli krwi. Test potwierdzenia – Line-blot wykonano w surowicy a następnie oznaczono prevalencję poszczególnych przeciwciał przeciw-Borrelia. Test ELISA zawierał kompletny ekstrakt z *Borrelia* natomiast test Line-blot w klasie IgG i IgM składał się z antygenów z *B. afzelii*, *B. burgdorferi* oraz *B. garinii*. **Wyniki:** Test ELISA wykazał w wypadku 201 leśników (35%) pozytywny wynik w klasie IgG. Z tej grupy 171 (30%) przypadków występowanie przeciwciał potwierdzono testem Line-blot. Tylko w 40 przypadkach (7%) uzyskano wynik dodatni testem Line-blot przy uprzednio negatywnym wyniku w teście ELISA. Głównym antygenem docelowym w Line-blot był VlsE (77%). Test na obecność przeciwciał w klasie IgM wykazał, że 119 przypadków (21%) miało wynik pozytywny w teście ELISA z których 59 (10%) potwierdzono testem Line-blot. Przeciwciała przeciw antygenowi OspC pokazały najwyższą prevalencję (71%) w klasie IgM. Korelacja wyników w przesięku śluzówkowym wynosiła 0,736 dla IgG i 0,162 dla IgM. **Wnioski:** Częstotliwość występowania przeciwciał przeciw *Borrelia* była wysoka i wynosiła 42% wśród pracowników leśnych. Stwierdzono, że korelacja wyników oznaczeń w ślinie i przesięku śluzówkowym była nieakceptowalna w teście ELISA podczas gdy korelacja wyników uzyskanych w surowicy i suchej kropli krwi była bardzo wysoka i sugeruje przydatność tego materiału do diagnozy boreliozy.

**Słowa kluczowe:** borelioza, prevalencja, pracownicy leśni

#### SUMMARY

**Background:** The laboratory diagnostics of boreliose is based on detection of specific IgG and IgM antibodies by ELISA test followed by confirmation test of Line-blot.

**Material and methods:** Testing of the presence of specific anti-Borrelia antibodies was performed in the group of 568 forest workers. The ELISA tests were performed in serum, saliva, and dry spot of blood. The confirmation tests Line blot were performed in serum then the prevalence of particular antibodies against *Borrelia* was calculated. The ELISA test consists complete extract from *Borrelia* whereas the Line-blot test consists antigens from *B. afzelii*, *B. burgdorferi*, and *B. garinii*. **Results:** The samples from 201 (35%) forest workers have revealed the positive results in ELISA in IgG class and 171 (30) results from this group were confirmed by Line-blot. Only in 40 (7) samples have revealed the positive results in Line-blot but were negative in ELISA tests. The main antigen was VlsE (77%) in IgG class. It has been shown that 119 (21%) samples have revealed positive results in the IgM class in ELISA tests, and from this group 59 (10%) cases were confirmed by Line-blot. Antibody against antigen OspC revealed the highest prevalence (71%) in IgM class. The correlation between samples from sera and mucosal transudate have shown  $r=0.736$  in the case of IgG and  $r=0.162$  in the case of IgM. **Conclusion:** The frequency, of anti-Borrelia antibodies occurrence was very high and appeared in 42% of forest workers. It has revealed that the correlation of results between serum and mucosal transudate was not satisfactory in the case of ELISA test. In contrary, the correlation of results between serum and dry spot of blood was very high and should be consider as alternative material for boreliose diagnosis.

**Key words:** boreliose, prevalence, forest workers

## WSTĘP

Borelioza jest chorobą zakaźną wywoływaną przez krętką *Borrelia burgdorferi sensu lato*. Bakteria ta przenoszona jest na człowieka, poprzez ukłucie zainfekowanego kleszcza (*Ixodes ricinus*). Rezerwuarem *Borrelia burgdorferi* są dziko żyjące w lesie zwierzęta: gryzonie, jelenie, dziki oraz inne ssaki i ptaki. Kleszcz żywiąc się ich krwią zakaża się i sam staje się źródłem zakażenia dla człowieka. W Europie wyróżnia się cztery groźne dla człowieka gatunki kleszczy: *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii*, *B. afzelii* oraz *B. spielmani* (*Borrelia burgdorferi sensu lato*). Każda forma rozwojowa kleszcza począwszy od larwy poprzez stadium nimfy aż po postać dorosłego kleszcza, może przenosić krętkę *Borrelia* na człowieka. Zagnieżdżona w skórze larwa kleszcza jest praktycznie niewidoczna [1].

Borelioza, nazywana inaczej chorobą z Lyme, została po raz pierwszy scharakteryzowana w 1975r. u grupy pacjentów z dolegliwościami reumatoidalnymi. Przyczyna choroby została poznana w 1985 r., kiedy z kleszcza (*I. scapularis*) wyizolowano bakterię z rodziny krętków *Borrelia burgdorferi*. Liczba nowo rejestrowanych przypadków boreliozy sukcesywnie rośnie zarówno na świecie jak i w Polsce [2].

Obraz kliniczny boreliozy jest bardzo zróżnicowany [1, 3, 4]. Charakterystycznym symptomem jest pojawienie się rumienia wędrującego (*erythema migrant* – EM), najczęściej w miejscu ukłucia kleszcza. EM pojawia się w formie małej czerwonej plamki lub grudki na skórze. Stopniowo rozszerza się pozostawiając przejaśnienie wewnątrz. Nie leczony EM może utrzymywać się od kilku do kilku miesięcy. U pacjentów mogą występować objawy miejscowe, zwykle łagodne swędzenie, pieczenie, ból lub objawy ogólne, takie jak zmęczenie i złe samopoczucie, bóle głowy, bóle mięśni czy stawów [5, 6].

Klinicznie borelioza może się manifestować w różny sposób. Jednym z nich jest *Borrelial lymphocytoma*. Jest to samotny niebiesko-czerwony obrzęk o średnicy do kilku centymetrów, składający się z gęstych poliklonalnych nacieków limfocytarnych [7, 8].

W przebiegu boreliozy może wystąpić zanikowe zapalenie skóry (*Acrodermatitis chronica atrophicans* – ACA). ACA jest stosunkowo częstym objawem skórny przewlekłej boreliozy [9]. Początkowo pojawiają się lekko niebieskawo-czerwonawe przebarwienia i obrzęki. Zmiany powiększają się bardzo powoli w ciągu miesięcy, a nawet lat, po których obrzęk powoli znika. Skóra staje się cienka i pomarszczona, a zabarwienie staje się fioletowe. Wi-

doczne stają się żyły, a gojenie uszkodzeń skóry jest spowolnione. Diagnostyka może być poszerzona o izolację *Borrelia* z biopsji skóry przed antybiotykoterapią [10].

Zwykle na początku choroby neuroborelioza manifestuje się aseptycznym zapaleniem opon mózgowych, a także porażeniem nerwów czaszki i nerwów obwodowych [11, 12]. Pacjenci odczuwają silny ból, zwykle w okolicach klatki piersiowej lub brzucha, odczuwalny szczególnie w nocy. Ważnym elementem diagnostyki neuroboreliozy jest ocena wewnątrzoponowej syntezy przeciwciał, której miarą jest wyliczenie tzw. względnego wskaźnika płyn mózgowy/surowica – CSQrel. Wartość CSQrel. od 0,7 do 1,3 odpowiada fizjologicznej normie, natomiast CSQrel. powyżej 1,3 wskazuje na syntezę specyficznych przeciwciał w CUN i miejscowej infekcji [13, 14].

W przebiegu boreliozy może wystąpić zapalenie mięśnia sercowego. Lyme carditis charakteryzuje się blokami przedsionkowo-komorowymi [15]. Zapalenie stawów – *Lyme arthritis* zwykle manifestuje się stanem zapalnym jednego lub kilku stawów. Pojawia się u 70% pacjentów z nieleczonym rumieniem wędrującym [16]. Dolegliwości stawowe są zwykle asymetryczne, ich początek jest zwykle ostry, z wysiękiem i uczuciem ciepła. Przebieg *Lyme arthritis* jest bardzo zróżnicowany, zwykle dolegliwości powtarzają się i mogą trwać do kilka lat.

U niektórych pacjentów z wczesną i późną formą boreliozy zauważa się również niespecyficzne dolegliwości, takie jak złe samopoczucie, zmęczenie, nerwowość, zmiany psychiczne, depresja, bóle głowy, bóle mięśni, bóle stawów. *B. burgdorferi sensu lato* może czasami powodować dolegliwości ze strony układu mięśniowo-szkieletowego, zaburzeniami neuropoznawczymi, lecz pojawienie się takich objawów jest bardzo rzadkie [17].

Zgodnie z rekomendacją Center of Disease Control and Prevention, Atlanta CDC) oraz zaleceniami Polskiego Towarzystwa Epidemiologów i Lekarzy Chorób Zakaźnych (PTEiLChZ), podstawą rozpoznania choroby jest ocena obrazu klinicznego pacjenta poprzez ocenę objawów (np. rumienia wędrującego, porażenia nerwów twarzy lub zapalenia stawów), historii pacjenta i ryzyka kontaktu z zarażonymi kleszczami. Zwalidowane badania laboratoryjne mogą być bardzo pomocne, ale nie są ogólnie zalecane, gdy pacjent ma rumień wędrujący [18].

W ramach wykonania diagnostyki laboratoryjnej boreliozy zalecane są badania krwi, dla oznaczenia przeciwciał w klasach IgM i IgG wytworzonych w efekcie zakażenia. W tym celu rekomendowana

jest dwuetapowa strategia. Pierwszy etap diagnostyki boreliozy wykorzystuje test immunoenzymatyczny ELISA lub immunofluorescencji pośredniej – IIFT. Testy te są wysokoczułe, co oznacza, że prawie każda próbka krwi pobrana od osoby z chorobą z Lyme, a także od niektórych zdrowych ludzi, da wynik pozytywny. W przypadku gdy wynik testu ELISA lub IIFT jest ujemny, prawdopodobieństwo że osoba choruje na boreliozę jest bardzo małe i dalsze badania nie są zalecane. Pozytywny lub graniczny (czasami nazywany „wątpliwym”) wynik testu ELISA/IIFT należy bezwzględnie potwierdzić w drugim etapie.

Na tym etapie stosuje się test Western-blot lub Line-blot który gwarantuje specyficzność diagnostyczną. Wynik dodatni badania występuje jedynie u osób, które zetknęły się z bakterią *Borrelia* natomiast ujemny wynik testu Western-blot świadczy o tym, że pierwszy test był fałszywie dodatni. Dodatni wynik w klasie IgM przy negatywnym wyniku w klasie IgG i jednoczesnych objawach klinicznych sugeruje, że badanie należy powtórzyć po okresie kilku tygodni.

Obecność przeciwciał klasy IgM może być wykrywana już w 2 tygodniu choroby. U chorych we wczesnym stadium, w przypadku dodatniego wyniku testu ELISA i ujemnego Western-blot, należy rozważyć powtórzenie tego ostatniego po upływie 2–4 tygodni. U chorych z EM rozpoznanie należy opierać na obrazie klinicznym bez potwierdzania badaniami serologicznymi, których wyniki są bardzo często ujemne. Przeciwciała klasy IgM mogą przetrwać wiele lat niezależnie od skuteczności eliminacji zakażenia. Późne stadium boreliozy charakteryzuje zwykle obecność przeciwciał w klasie IgG. Przyczyną fałszywie dodatnich wyników badań serologicznych mogą być zakażenia wirusami z rodziny *herpesviridae* (zwłaszcza EBV) lub innymi krętkami, oraz choroby autoimmunologiczne.

W pierwszym etapie diagnostyki boreliozy stosuje się zwykle metodę ELISA z użyciem wszystkich antygenów obecnych na powierzchni bakterii *Borrelia*. Mieszanina może zawierać antygeny nieswoiste. Zastosowany w badaniu test firmy Euroimmun zawierał kompletny ekstrakt komórkowy ze wszystkich czterech patogennych w stosunku do ludzi gatunków *Borrelia*. Ekstrakt uzupełniono dodatkowo o rekombinowany antygen VlsE [19].

Drugi etap diagnostyki boreliozy polega na potwierdzeniu wyników dodatnich lub wątpliwych metodą Western-blot. W teście Western-blot natywne i rekombinowane są naniesione na membranę w określonych pozycjach w postaci równoległych linii. Rekombinowany antygen VlsE posiada najwyż-

szą czułość diagnostyczną i pozwala na wykrycie przeciwciał przeciwko wszystkim gatunkom *Borrelia*, zaś ryzyko fałszywie negatywnych reakcji zależnych od różnic międzygatunkowych jest 10-krotnie niższe. Ponad 85% surowic IgG pozytywnych może być szybko zidentyfikowanych poprzez ocenę pasma VlsE. Technika Western-blot pozwala również różnicować przeciwciała na specyficzne i niespecyficzne.

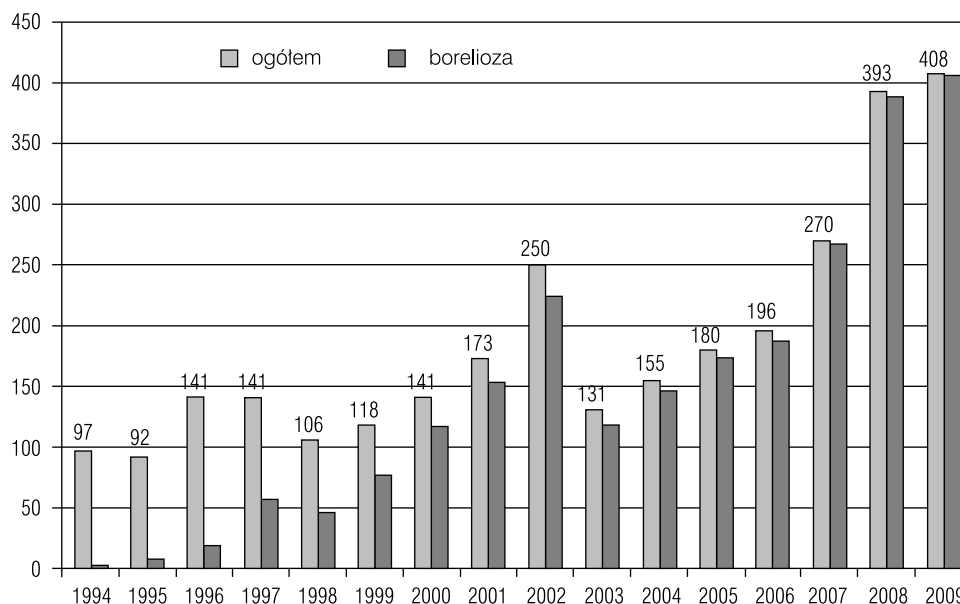
Decyzja o rozpoznaniu i leczeniu boreliozy powinna być podejmowana wyłącznie przez lekarza w oparciu o obraz kliniczny z uwzględnieniem wyników badań dodatkowych. Terapia boreliozy opiera się na antybiotykoterapii. Analiza skuteczności terapii to wyłącznie monitorowanie dynamiki obrazu klinicznego. Profilaktyka poekspozycyjna w formie jednorazowej dawki doksycyliny (p.o. 200 mg), jest uzasadniona tylko w przypadku mnogiego pokłucia przez kleszcze podczas pobytu w rejonie endemicznym.

W Polsce wykonanie prawidłowej diagnostyki boreliozy jest utrudnione w grupie osób przebywających i pracujących w środowisku leśnym. Wielu pracowników lasów rezygnuje z badań w kierunku boreliozy, narażając siebie na niebezpieczne powikłania choroby. W roku 2009, badaniom przesiewowym poddało się tylko 64% pracowników instytucji leśnych. Jednocześnie borelioza jest najczęściej zgłaszaną chorobą zawodową w tej grupie zawodowej (Ryc. 1). W celu stworzenia łatwiejszego dostępu do badań diagnostycznych dokonano oceny diagnostycznej przydatności alternatywnego do krwi pobieranej z żyły łokciowej materiału biologicznego takiego jak sucha kropla krwi oraz śliny, traktowanego jako materiał do oznaczania przeciwciał *anti-Borrelia*. Materiał taki mógłby być pobrany bez konieczności wizyty w laboratorium.

## MATERIAŁY I METODY

Badania przeprowadzono w surowicy krwi, suchej kropli krwi oraz w ślinie. Materiał pobrano od 568 pracowników instytucji leśnych Dolnego Śląska i 10 innych osób nie będących pracownikami lasów. Na wykonanie badań uzyskano zgodę komisji bioetycznej (Nr KB: 371/2008)

Badania wykonano łącznie wśród 578 osób (491 mężczyzn i 87 kobiet) w wieku 20–65 lat. Materiał pobrany od każdej z osób zbadano testem ELISA (Euroimmun) oznaczając przeciwciała *anti-Borrelia* w surowicy w klasach IgM i IgG, a następnie wykonano test potwierdzenia typu Lineblot. (EUROLINE RN-AT, Euroimmun) będący modyfikacją testu We-



Ryc. 1. Choroby zawodowe wśród pracowników instytucji leśnych. Dane z Generalnej Dyrekcji Lasów Państwowych  
 Fig. 1. Occupational diseases among the forest workers. Data from The General Management of State Forest

stern-blot. Oznaczenia dokonano w Diagnostycznym Laboratorium Medycznym, GmbH, Lubeck, Winfried Stoecker Euroimmun. Otrzymane wyniki badań w surowicy krwi traktowane były jako wartości referencyjne w optymalizacji nowych metod diagnostycznych (skrining przeciwciał w ślinie, suchej kropli krwi). Oznaczono następnie poziom przeciwciał w klasach IgG i IgM w ślinie i suchej kropli krwi testem ELISA a otrzymane wyniki porównano z wartościami referencyjnymi w surowicy krwi.

Pełną krew żylną pobrano na EDTA do jednorazowych probówek typu S-Monovette (Nr Kat.: 02.1066.001, Sarstedt, Niemcy) i zamrożono ( $-20^{\circ}\text{C}$ ). W celu uzyskania surowicy, krew pobrano na skrzep do jednorazowych probówek typu S-Monovette (Nr Kat.: 02.1063.001, Sarstedt, Niemcy). Krew wirowano przy 2500 g przez 10 min. Uzyskaną surowicę rozdzielono na dwie porcje, z których jedną przechowywano w zamkniętych probówkach w temperaturze  $+4^{\circ}\text{C}$  do czasu oznaczeń. Drugą porcję przechowywano w temperaturze  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Pobrano dwie równoległe próbki śliny – ślinę pełną i tzw. przesięk śluzówkowy. Pełną ślinę pobrano do probówek typu Salivette® (Nr Kat.: 51.1534). W tym celu trzymano w ustach tamponik przez 5 minut. Po nasiąknięciu śliną tamponik włożono do specjalnej kolumny którą wirowano przez 5 min przy 2500 g. Pobraną ślinę przechowywano w probówce typu Salivette® w  $-20^{\circ}\text{C}$  do czasu oznaczeń. Przesięk śluzówkowy pobrano do probówek typu

OraSure® (Nr Kat. 503-0507). W tym celu specjalny tamponik został umieszczony pomiędzy dżąstem a policzkiem. Po upływie 5 min. tamponik został umieszczony w probówce zawierającej niebieski bufor. Probówkę zamknięto i dokładnie mieszano. Wyekstrahowany do buforu przesięk śluzówkowy wirowano i przechowywano w czystych probówkach w dwóch porcjach  $-20^{\circ}\text{C}$  do czasu oznaczeń.

Suche krople krwi przygotowano z pełnej krwi pobranej na EDTA. Krew nakropiono na membrany typu Whatman 903® i suszono 24 godziny w temperaturze pokojowej. Po wysuszeniu wycięto krążki o średnicy 4,76 mm i umieszczono je w probówkach mikroekstrakcyjnych. Przed wykonaniem oznaczenia do każdej probówki dodano 250  $\mu\text{l}$  buforu do rozcieńczania próbek załączonego do zestawu ELISA i ekstrahowano na wytrząsarce obrotowej przez 1 h przy 500 rpm. Przeciwciała oznaczano za pomocą testu ELISA w klasach IgG i IgM w uzyskanym, nierozcieńczonym ekstrakcie.

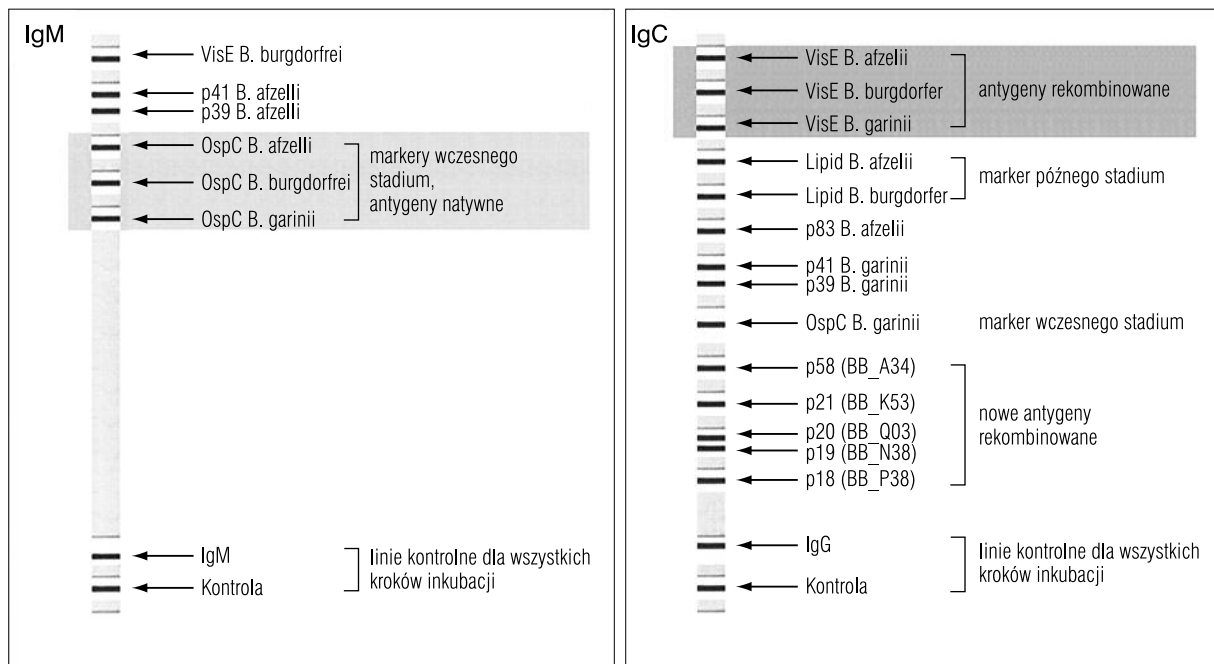
Do badania przesiewowego ELISA na obecność przeciwciał w klasach IgG i IgM przeciw *Borrelia* użyto zestawów testowych firmy EUROIMMUN: Anty-Borrelia plus VIsE ELISA (IgG) oraz Anty-Borrelia ELISA (IgM). Test zawierał pełny ekstrakt antygenów z bakterii *Borrelia* (*Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia afzelii* i *Borrelia garinii*) z dodatkiem rekombinowanego antygeny VIsE (variable major protein-like sequence, variable major protein-like sequence, expressed) *Borrelia burgdorferi*. Oznaczenia wykonano według protokołu producenta testu.

W oznaczeniach przeciwciał przeciw *Borrelia* w klasie IgM, surowice rozcieńczono buforem zawierającym absorbent przeciwciał w klasie IgG i czynnika reumatoidalnego. Zapobiega to ewentualnej reakcji czynnika reumatoidalnego klasy IgM ze swoiście związanymi przeciwciałami klasy IgG oraz wypieraniu z kompleksu antygen–przeciwciało przez swoiste IgG przeciwciał klasy IgM.

W drugim etapie diagnostyki zastosowano test EUROLINE RN-AT (EUROIMMUN) zawierającym zestaw antygenów zarówno dla klasy przeciwciał IgM jak i IgG (Ryc. 2). Test zawierał antygeny takie

jak p83, p39 i OspC, które są najbardziej specyficzne w swojej natywnej postaci [20]. Dodatkowo zastosowano immunoreaktywne lipidy wyekstrahowane z błony komórkowej *Borrelia*. Pozostałe antygeny otrzymano jako białka rekombinowane i naniesiono w postaci równoległych prążków na pasek testowy. Test wykonano według protokołu producenta.

**Metody statystyczne:** Korelację liniową wyników badań wyliczono metodą Pearsona natomiast czułość i specyficzność diagnostyczną wyliczono przy pomocy programu EURO-STAT-software.



Ryc. 2. Natywne i rekombinowane antygeny *Borrelia* zastosowane w Line blotie EUROLINE RN-AT, Euroimmun używanym w drugim etapie diagnostyki boreliozy

Fig. 2. The native and recombinant antigens of *Borrelia* used in Line blot EUROLIN RN-AT, Euroimmun and in the second step of boreliose diagnosis

## WYNIKI

Przebadano łącznie 577 osób, z czego 567 osób było pracownikami instytucji leśnych Dolnego Śląska. Wykonano oznaczenia przeciwciał przeciw *Borrelia* w surowicy krwi w klasach IgG i IgM.

W pierwszym etapie diagnostyki wykonano w surowicy krwi oznaczenia za pomocą testu ELISA. Badając występowanie przeciwciał klasy IgG, w przypadku 202 osób (35%) otrzymano wynik pozytywny, 25 (4,33%) wynik graniczny, a u 350 (60,7%) wynik negatywny. Oznaczając przeciwciała klasy IgM, w przypadku 122 osób (21,14%) uzyskano wynik pozytywny, 44 (7,63%)

wynik graniczny, a u 411 (71,23%) wynik negatywny.

W drugim etapie oznaczono przeciwciała przeciw *Borrelia* za pomocą testu typu potwierdzenia Line-blot. W klasie przeciwciał IgG u 221 (38,30%) osób uzyskano wynik pozytywny, 99 osób (17,16%) wynik graniczny, a u 257 osób (44,54%) wynik negatywny. Oznaczając przeciwciała klasy IgM u 60 osób (10,40%) otrzymano wynik pozytywny, 31 osób (5,37%) wynik graniczny, a u 486 (84,23%) wynik negatywny. Korelację wyników otrzymanych za pomocą testów ELISA i Line-blot przedstawiono w tabeli Ia.

Badanie występowania specyficznych IgG i IgM w surowicy powtórzono używając surowicy mrożonej przez kilka tygodni. Korelację wyników uzyskanych za pomocą testów ELISA i Line-blot przedstawiono w tabeli Ib. W klasie IgG we krwi 39 pacjen-

tów pozytywnych w teście Line-blot, a negatywnych w teście ELISA tylko 6 wykazało ponownie taki sam wynik. Ogólnie, użycie mrożonej zamiast świeżej surowicy nie wpływa w znaczący sposób na wyniki testów diagnostycznych.

**Tabela I.** Korelacja wyników oznaczeń przeciwciał *anti-Borrelia* za pomocą testów ELISA i Line blot. a. Oznaczenia wykonano na świeżej surowicy krwi. b. Oznaczenia wykonano na próbkach mrożonej surowicy krwi. c. Korelacja wyników oznaczeń przeciwciał *anti-Borrelia* pomiędzy próbkami świeżej surowicy krwi i ekstraktu z suchej kropli krwi wykonanymi metodą ELISA. d. Korelacja wyników oznaczeń przeciwciał *anti-Borrelia* pomiędzy próbkami świeżej surowicy krwi i przesięku śluzówkowego wykonanymi metodą ELISA

**Table I.** Correlation of the results of *anti-Borrelia* antibody measurement using ELISA and Line blot tests. a. Determination was performed in fresh serum. b. Determination was performed in frozen serum. c. Correlation of the results of *anti-Borrelia* antibody between the samples of fresh serum and the extracts from a dry spot of blood using ELISA test. d. Correlation of the results of *anti-Borrelia* antibody between the samples of fresh serum and the mucosal transudate using ELISA test

a. Testy wykonane na świeżej surowicy krwi

n = 577		ELISA IgG			n = 577		ELISA IgM		
		Poz.	Gr.	Neg.			Poz.	Gr.	Neg.
Blot IgG	Poz.	172	10	39	Blot IgM	Poz.	52	4	4
	Gr.	13	7	79		Gr.	25	5	1
	Neg.	17	8	232		Neg.	45	35	406

b. Testy wykonane na mrożonej surowicy krwi

n = 577		ELISA IgG			n = 577		ELISA IgM		
		Poz.	Gr.	Neg.			Poz.	Gr.	Neg.
Blot IgG	Poz.	171	6	6	Blot IgM	Poz.	52	5	3
	Gr.	12	10	85		Gr.	24	4	2
	Neg.	17	10	260		Neg.	41	34	412

c. Testy wykonane na suchej kropli krwi

n = 577		ELISA IgG – sucha kropla			n = 577		ELISA IgM – sucha kropla		
		Poz.	Gr.	Neg.			Poz.	Gr.	Neg.
ELISA IgG – surowica	Poz.	199	7	2	ELISA IgM – surowica	Poz.	109	10	3
	Gr.	14	9	2		Gr.	15	17	12
	Neg.	4	27	319		Neg.	2	21	388

d. Testy wykonane na przesięku śluzówkowym

n = 446		ELISA IgG – surowica			n = 485		ELISA IgM – surowica		
		Poz.	–	Neg.			Poz.	–	Neg.
ELISA IgG przesiek	Poz.	138	–	15	ELISA IgM przesiek	Poz.	64	–	66
	Neg.	31	–	262		Neg.	27	–	328

Prewalencję przeciwciał *anti-Borrelia* w klasie IgG określono poprzez porównanie wyników oznaczeń metodą Line-blot z 172 dodatnimi wynikami testu ELISA. W metodzie Line-blot głównym antygenem docelowym okazał się VlsE Bb (89%). Przeciwciała przeciw frakcjom lipidowym wykryto u 17% (Bb) i 9,3% (Ba) pozytywnych przypadków, podczas gdy klasyczne pasma ukazały się u 49% (p83), 56,4%

(p39) i 32,6% (OspC). Nowo zastosowane antygeny zareagowały następująco: 40% (p18), 1,7% (p19), 5% (p20), 5,8% (p21) oraz 14% (p58) IgG pozytywnych przypadków.

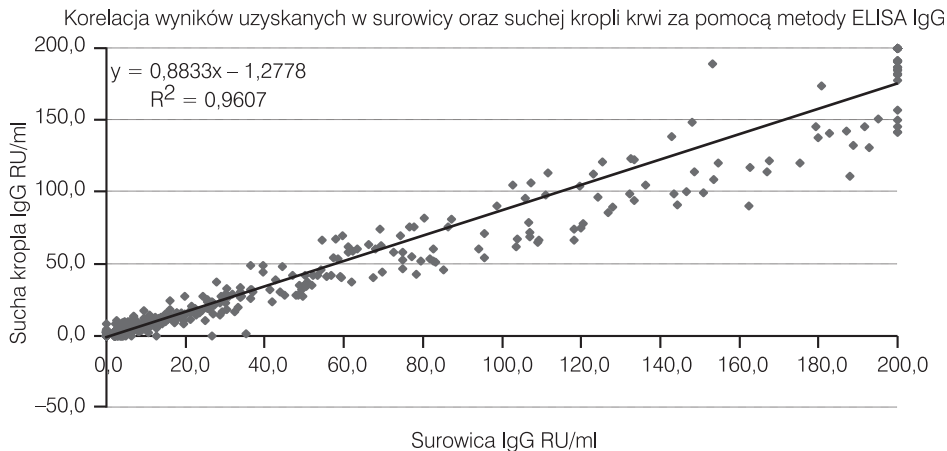
We krwi osób, u których stwierdzono wynik pozytywny w teście ELISA, a negatywny w teście Line-blot, wysoką prewalencję pokazały przeciwciała przeciw niespecyficznemu białku p41 (flagellina) –

76%. Białko to wykazywało często pozytywną reakcję w próbkach które następnie zakwalifikowano jako fałszywie pozytywne.

Analogicznie, określano prevalencję przeciwciał klasy IgM. Przeciwciała przeciw antygenowi OspC z bg pokazały najwyższą prevalencję (82%). Reakcje z antygenami p41 i p39 zaobserwowano odpowiednio u 15,4% i 5,7% przypadków. Wśród IgM pozytywnych przypadków nie zaobserwowano przeciwciał przeciw VlsE.

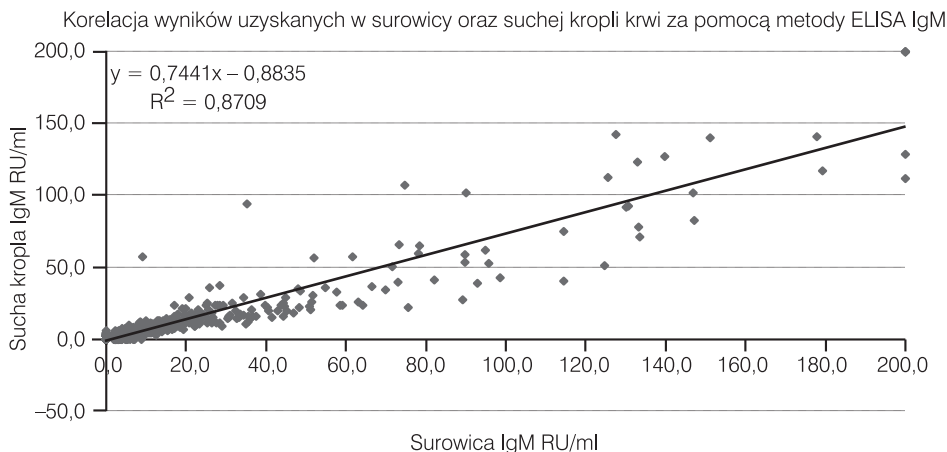
Badania przesiewowe na obecność przeciwciał *anti-Borrelia* w suchej kropli krwi wykonano za pomocą testu ELISA w klasach przeciwciał IgM i IgG. Jako materiału do badania użyto ekstrakt z bibuły zawierającej suchą kroplę krwi. Otrzyma-

ne wyniki porównano z wynikami otrzymanymi w świeżej surowicy. Wykazano wysoką korelację wyników oznaczeń przeciwciał w surowicy i w suchej kropli krwi;  $R^2 = 0,9607$  dla IgG i  $R^2 = 0,8709$  dla przeciwciał w klasie IgM (Ryc. 3). Dokonano analizy ROC jak również policzono czułość i swoistość diagnostyczną względem danych referencyjnych dla równych wartości odcięcia. Czułość diagnostyczna oznaczeń przeciwciał w suchej kropli krwi wynosiła 99% dla IgG oraz 92% dla IgM natomiast specyficzność diagnostyczna wynosiła 99% zarówno dla IgG jak i dla IgM. W teście ROC pole AOU dla przeciwciał w klasie IgG wynosiło 0,997 natomiast dla przeciwciał w klasie IgM wynosiło 0,995.



Ryc. 3a. Korelacja wyników oznaczania przeciwciał *anti-Borrelia* w klasie IgG otrzymanych z surowicy krwi oraz z suchej kropli krwi za pomocą testu ELISA

Fig. 3a. Correlation of the results of *anti-Borrelia* antibody measurements in the class of IgG obtained from fresh serum and a dry spot of blood in ELISA test



Ryc. 3b. Korelacja wyników oznaczania przeciwciał *anti-Borrelia* w klasie IgM otrzymanych z surowicy krwi oraz z suchej kropli krwi za pomocą testu ELISA

Fig. 3b. Correlation of the results of *anti-Borrelia* antibody measurements in the class of IgM obtained from fresh serum and a dry spot of blood in ELISA test

Skryning przeciwciał przeciw *Borrelia* w ślinie wykonano za pomocą testu ELISA w klasach przeciwciał IgM i IgG. Jako materiału do badania użyto pełnej śliny oraz tzw. przesięk śluzówkowy. Wstępna analiza wyników oznaczenia przeciwciał w pełnej ślinie wykazała brak wiarygodnych wyników. Dalsze badania prowadzono w przesięku śluzówkowym. Otrzymane wyniki porównano z wynikami otrzymanymi w surowicy, dokonano analizy ROC jak również policzono czułość i swoistość metody względem danych referencyjnych dla równych wartości odcięcia.

Korelacja wyników oznaczeń przeciwciał *anti-Borrelia* w przesięku śluzówkowym w porównaniu z metodą referencyjną wynosiła  $r=0,7357$  dla przeciwciał w klasie IgG, natomiast dla przeciwciał w klasie IgM korelacja wynosiła  $r=0,1619$ . Czułość diagnostyczna oznaczeń przeciwciał w tym materiale wynosiła 82% dla IgG oraz 70% dla IgM natomiast specyficzność diagnostyczna wynosiła 95% dla IgG i 83% dla IgM. W teście ROC pole AOU dla przeciwciał w klasie IgG wynosiło 0,94 natomiast dla przeciwciał w klasie IgM wynosiło 0,91.

## DYSKUSJA

Metody diagnostyczne boreliozy można podzielić na metody bezpośrednie, takie jak metody hodowlane, mikroskopowe, PCR, w których wykrywana jest bezpośrednio obecność patogenu oraz metody pośrednie, w których wykrywamy przeciwciała świadczące o kontakcie człowieka z patogenem. Czułość diagnostyczna w metodach bezpośrednich zależy między innymi od rodzaju badanego materiału oraz od rodzaju tkanki zaatakowanej przez proces chorobowy. Dystrybucja przeciwciał *anti-Borrelia* we krwi jest niezależna od rodzaju zakażonej tkanki oraz miejsca zarażenia.

Zasadniczym problemem w serologicznej diagnostyce boreliozy jest interpretacja wyników. Obecność przeciwciał we krwi nie zawsze jest dowodem aktywnej infekcji nawet jeśli wykrywane są przeciwciała całkowicie specyficzne. Z kolei, miano przeciwciał *anti-Borrelia* nie musi wcale korelować z aktywnością choroby. Nie stosuje się oznaczeń przeciwciał w celu monitorowania zakażenia, gdyż przeciwciała wyprodukowane w wyniku infekcji mogą być stwierdzane we krwi nawet po 10, a niekiedy po 20 latach od momentu stwierdzenia choroby [1]. W przebiegu boreliozy obecność we krwi przeciwciał w klasie IgM, które uznawane są za marker aktywnej infekcji, mogą

być przetrwałe i również nie wskazują na aktywne zakażenie.

Powodem reakcji krzyżowych (wyników fałszywie negatywnych) są antygeny powszechnie występujące na różnych bakteriach czy wirusach np. p41 (flagellina), p58-60, p66, p68, p71, p73. Przeciwciała wiążące się z takimi antygenami nie są przeciwciałami specyficznymi dla boreliozy i mogą generować wyniki fałszywie dodatnie w teście ELISA. Każdy wynik pozytywny w teście ELISA powinien być bezwzględnie zweryfikowany testem potwierdzenia typu blot (Western-blot lub Dot-blot). W naszych badaniach pokazano, że 8% wyników pozytywnych w klasie IgG oraz 36% w klasie IgM u grupy 577 pracowników lasów była fałszywie dodatnia – spowodowana niespecyficznymi przeciwciałami. Testy potwierdzenia dzięki wysokiej specyficzności eliminują wyniki fałszywie dodatnie. Rezygnacja z wykonania testów potwierdzających może być przyczyną błędnego rozpoznania boreliozy, co skutkować może niepotrzebną i długotrwałą (3–4 tygodnie) antybiotykoterapią.

Stosowane testy mogą generować nie tylko wyniki fałszywie pozytywne, ale również fałszywie negatywne. Powodem generacji takich wyników może być zbyt wczesne wykonanie badania. Oznaczanie przeciwciał w okresie tzw. „okna serologicznego”, czyli okresu pomiędzy momentem zakażenia a wytworzeniem przeciwciał, może skutkować wynikiem fałszywym pomimo aktywnej infekcji. Przeciwciała w klasie IgM wytwarzane są po około 2–4 tygodniach od zakażenia, a IgG jeszcze później. W przypadku otrzymania wyniku negatywnego przy jednoczesnych objawach mogących wskazywać na aktywną boreliozę, powinno się badania powtórzyć po okresie kilku tygodni.

Sugeruje się, że wyniki fałszywie negatywne mogą być również skutkiem występowania tzw. kompleksów immunologicznych niewykrywalnych przy zastosowaniu rutynowych testów serologicznych (np. ELISA czy Western-blot). W takim przypadku istnieje konieczność rozbicia wiązania przeciwciało-antygen przed przystąpieniem do oznaczeń. Metody te nie są jeszcze dostępne jako komercyjne testy laboratoryjne.

Wynik badania laboratoryjnego nie stwierdza jednoznacznie występowania aktywnej boreliozy. Interpretacji wyników może dokonywać jedynie lekarz uwzględniając jednocześnie obraz kliniczny pacjenta. Interpretując wynik należy zwrócić uwagę na rodzaj materiału i sposób jego pobrania oraz zachowanie odpowiednich standardów postępowania. Dodatni wynik badań serologicznych jedynie w połączeniu z objawami klinicznymi może wskazywać



na aktywne zakażenie. W przypadku utrzymywania się wyraźnych objawów klinicznych pomimo przebiecia antybiotykoterapii lub przy stałej seronegatywności, należy przeprowadzić diagnostykę różnicową w kierunku obecności innych schorzeń o podobnym obrazie klinicznym.

Dostęp do prawidłowej diagnostyki boreliozy może być również problemem społecznym, z którym spotykają się przede wszystkim leśnicy, których można uważać za grupę wysokiego ryzyka i dla których borelioza jest szczególnym zagrożeniem. Przyczyną jest przede wszystkim spora odległość miejsca pracy i zamieszkiwania od jednostek wykonujących badania. Rodzi to realną potrzebę uproszczenia diagnostyki boreliozy osób przebywających na co dzień w obecności siedlisk kleszczy. Okresowe badania przesiewowe tej grupy pracowników w kierunku zakażeń *Borrelia* jest elementem procedur w ramach BHP. Uproszczenie sposobu pobierania materiału może zwiększyć dostępność do diagnostyki boreliozy jeżeli materiał mógłby być pobrany bezpośrednio przez osobę zainteresowaną w miejscu pracy lub zamieszkiwania. W przedstawionej pracy oznaczono przeciwciała *anty-Borrelia* w próbkach śliny, przesięku śluzówkowatym i suchej kropli krwi za pomocą komercyjnego testu ELISA.

Ślina znalazła już zastosowanie jako materiał będący alternatywą dla surowicy w oznaczaniu przeciwciał. Poczyniono już próby diagnostyki wirusowego zapalenia wątroby typu A i B oznaczając specyficzne przeciwciała IgM w ślinie. Wykazano również, że stosunek IgM/IgG dobrze korelował z postępem infekcji [21]. Ślinę wykorzystywano również do oznaczeń bardzo niskich mian przeciwciał powstałych np. w efekcie szczepienia. W porównaniu z surowicą czułość i specyficzność diagnostyczna oznaczeń wynosiła odpowiednio 98,7% i 99,6% (5) w klasie IgM i IgG [21].

W powyższej pracy zbadano przydatność śliny do oznaczania przeciwciał w diagnostyce boreliozy. Przeciwciała oznaczano zarówno w pełnej ślinie jak i przesięku śluzówkowatym. Wstępne badania dyskwalifikowały ślinę jako materiał do oznaczeń przeciwciał *anty-Borrelia*. Oznaczenia w przesięku śluzówkowatym dały diagnostycznie lepsze wyniki niż w pełnej ślinie, natomiast korelacja z wynikami otrzymanymi w surowicach była niezadowolająca i wynosiła:  $R^2 = 0,736$  dla IgG natomiast,  $R^2 = 0,162$  dla IgM. Test przesiewowy powinien być testem o wysokiej czułości dlatego 82% czułości diagnostycznej w klasie IgG i 70% w klasie IgM to wielkości zdecydowanie zbyt niskie, aby ślina lub przesiek śluzówkowaty była akceptowalnym materiałem do skryningu przeciwciał przeciw *Borrelia*.

Przyczyną słabej korelacji może być dużo niższe miano przeciwciał w przesięku śluzówkowatym niż w surowicy. Poziom przeciwciał w tym materiale w skrajnych przypadkach był nawet 100-krotnie niższy i oscylował w dolnej granicy wykrywalności.

Jedne z pierwszych doniesień na temat zastosowania metody „blood spots” ukazało się w roku 1992. Suche kropli użyto wówczas jako materiału skryningu przeciwciał i testu potwierdzenia w zakażeniach syfilisem [22]. Wykazano, że sucha kropla krwi jest realną alternatywą dla krwi żyłnej jako materiału do oznaczania przeciwciał [23]. Nasze badania wykazały, że oznaczanie przeciwciał w suchej kropli krwi daje zadowalające rezultaty w diagnostyce laboratoryjnej boreliozy. W przeciwieństwie do śliny i przesięku śluzówkowatego, korelacja wyników uzyskanych w surowicy i suchej kropli krwi jest bardzo wysoka. W klasie IgG otrzymano zaledwie 2 fałszywie negatywne wyniki oraz 1 wynik fałszywie graniczny. W klasie IgM z kolei otrzymano 3 wyniki fałszywie negatywne oraz 10 wyników fałszywie granicznych. Otrzymano niewiele wyników fałszywie dodatnich: 4 i 2 odpowiednio w klasie IgG i IgM. Modyfikując odpowiednio wartość odcięcia można zoptymalizować metodę tak, aby była wysoce czuła i znalazła zastosowanie w rutynowej diagnostyce boreliozy.

## WNIOSKI

- Diagnostyka laboratoryjna boreliozy powinna być prowadzona dwuetapowo, testem ELISA w pierwszym etapie. Pozytywne wyniki testu ELISA powinny być weryfikowane testem Western-blot lub Line-blot.
- Prewalencja boreliozy świadcząca o zarażeniach pracowników leśnych przez *Borrelia* jest bardzo wysoka i wynosi 42%.
- Głównym powodem reakcji fałszywie pozytywnych w teście ELISA są przeciwciała *anty-p41*. Należy usunąć to białko ze składu antygenów, co pozwoli podnieść specyficzność diagnostyczną stosowanych metod.
- Wykonywanie testów ELISA na świeżej surowicy krwi może być wykonywane na seriach mrożonych próbek surowicy lub „suchej kropli krwi”. Metoda „suchej kropli krwi” daje duże nadzieje na ułatwienie dostępu do prawidłowej diagnostyki boreliozy grupom wysokiego ryzyka np. leśnikom.

## LITERATURA

1. Dziubek Z.: Krętkowice. W: Zdzisław Dziubek: Choroby zakaźne i pasożytnicze. Dziubek Z. (red.) Warszawa PZWL 2003, 182-186.
2. Strle F., Videcnik J., Zorman P., et al.: Clinical and epidemiological findings for patients with erythema migrans. Comparison of cohorts from the years 1993 and 2000. Wien Klin Wochenschr 2002; 114: 493-97.
3. Straubinger R.K., Summers B.A., Chang J.F., et al.: Persistence of *Borrelia burgdorferi* in experimentally infected dogs after antibiotic treatment. J Clin Microbiol 1997; 35: 111-16.
4. Steere A.C.: Lyme disease. N Engl J Med 1989; 321: 586-96.
5. Weber K., Neubert U., Buchner S.A.: Erythema migrans and early signs and symptoms. In: Weber K., Burgdorfer W, eds. Aspects of Lyme borreliosis. 1st edn. Berlin; Springer-Verlag, 1993: 105-21.
6. Asbrink E., Hovmark A.: Early and late cutaneous manifestations in Ixodes-borne borreliosis (Erythema migrans borreliosis, Lyme borreliosis). Ann NY Acad Sci 1988; 539: 4-15.
7. Strle F., Maraspin V., Pleterski-Rigler D., et al.: Treatment of borrelial lymphocytoma. Infection 1996; 24: 80-84.
8. Maraspin V., Cimperman J., Lotric-Furlan S., et al.: Solitary borrelial lymphocytoma in adult patients. Wien Klin Wochenschr 2002; 114: 515-23.
9. Asbrink E., Hovmark A., Olsson I.: Clinical manifestations of acrodermatitis chronica atrophicans in 50 Swedish patients. Zbl Bakt Hyg A 1986; 263: 253-61.
10. Picken R.N., Strle F., Picken M.M., et al.: Identification of three species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato (*B burgdorferi* sensu stricto, *B garinii*, and *B afzelii*) among isolates from acrodermatitis chronica atrophicans lesions. J Invest Dermatol 1998; 110: 211-14.
11. Kristoferitsch W., Spiel G., Wessely P.: Meningopolyneuritis (Garin- Bujadoux, Bannwarth). Clinical aspects and laboratory findings. Nervenarzt 1983; 54: 640-46.
12. Pachner A.R., Steere A.C.: The triad of neurologic manifestations of Lyme disease: meningitis, cranial neuritis, and radiculoneuritis. Neurology 1985; 111: 47-53.
13. Rieber H.: Cerebrospinal fluid - physiology, analysis and interpretation of protein patterns for diagnosis of neurological diseases. Mult Scler 1998; 4: 99-107.
14. Rieber H.: External quality assessment In clinical neurochemistry: survey of analysis for cerebrospinal fluid (CSF) proteins based on CSF/serum quotients. Clin Chem 1995; 41:256-63.
15. Sigal L.H.: Early disseminated Lyme disease: cardiac manifestations. Am J Med 1995; 98 (suppl 4A): 25-28.
16. Rees D.H.: Axford J.S. Lyme arthritis. Ann Rheum Dis 1994; 53: 553-56.
17. Steere A.C.: *Borrelia burgdorferi* (Lyme disease, Lyme borreliosis). In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. Principles and practice of infectious diseases. 5th edn, vol 2. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2000: 2504-18.
18. Flisiak R., Pancewicz S.: Diagnostyka i leczenie Boreliozy z Lyme Rekomendacje Polskiego Towarzystwa Epidemiologów i Lekarzy Chorób Zakaźnych.
19. Sillanpaa H.: Immune responses to borrelial VlsE IR6 peptide variants. Int. J. of Medical Microbiology; 2007: 297:45-52.
20. Schluste-Spechtel H.: Improvement of Lyme Borreliosis Serodiagnosis by a Newly Developed Recombinant Immunoglobulin G (IgG) and IgM Line Immunoblot Assay and Addition of VlsE and DbpA Homologues; J.Clin. Microbiology. 2003;41:1299-1303.
21. Parry J.V., Perry K.R., Panday S., Mortimer P.P.: Diagnosis of hepatitis A and B by testing saliva. J Med. Virol 1989; 28:255-260.
22. Stevens R., Pass K., Fuller S.: Blood Spot Screening and Confirmatory Tests for Syphilis Antibody. J.Clin. Microb., Sept. 1992; 2353-2358.
23. Condorelli, F., Scalia G., Stivala A., Gallo R., Marino A., Battaglini C.M., Castro A.: Detection of immunoglobulin G to measles virus, rubella virus, and mumps virus in serum samples and in microquantities of whole blood dried on filter paper. J. Virol Methods 1994; 49: 25-36.

## Adres do korespondencji:

prof. dr hab. Mieczysław Woźniak  
Katedra Analityki Medycznej  
Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu  
ul. Borowska 211A, 50-556 Wrocław  
Tel. 71-784-0629  
e-mail: mieczyslaw.wozniak@umed.wroc.pl