

Iwona Wojciechowska-Koszek¹, Magdalena Mnichowska-Polanowska^{1*}

¹Zakład Mikrobiologii i Diagnostyki Immunologicznej, Pomorski Uniwersytet Medyczny, Szczecin

Wpłynęło w lipcu 2015 r.

1. Etiologia boreliozy. 2. Swoista, humoralna odpowiedź immunologiczna w przebiegu boreliozy. 3. Materiał i metody stosowane w diagnostyce boreliozy. 4. Testy serologiczne w diagnostyce boreliozy. 4.1. ELISA. 4.2. Western-blot czy Immunoblot 5. Interpretacja wyników. 5.1. Wyniki fałszywie ujemne. 5.2. Wyniki fałszywie dodatnie. 6. Podsumowanie

Serological testing for Lyme disease in laboratory practice

Abstract: Lyme disease (LD) is a tick-borne multisystem disease caused by *B. burgdorferi sensu lato* genospecies. The disease requires mandatory reporting and registration since 2014. The laboratory testing for LD is desirable because the diversity and non-specificity of symptoms can complicate the diagnosis. Laboratory data can support or cast doubt on a clinical suspicion of LD. A laboratory method of choice for LD diagnosis is two-tier serological testing recommended by European and Polish guidelines. The choice of target antigens for LD serodiagnostics is still a great challenge due to borrelial antigen heterogeneity in European countries. Commercial tests are still being modified to improve sensitivity and/or specificity of LD serodiagnostics by means of emerging technology advances. The use of species-specific borrelial antigens can be promising for determination of LD etiology, but does not eliminate the cross-reactivity completely. The uniform standardized interpretation criteria are still unrealistic because of different methodologies used in laboratory practice. The serodiagnostics of Lyme disease should be carried out in a laboratory by specialists who understand the limitations of commercial kits [1.13], and cooperate with clinicians regarding laboratory reporting and diagnostic doubts.

1. Etiology. 2. Specific humoral immunoresponse in the course of Lyme disease. 3. Material and methods used in Lyme disease diagnostics. 4. Serodiagnostics of Lyme disease. 4.1. ELISA. 4.2. Western-blot or Immunoblot 5. Criteria for interpretation. 5.1. False-negative results. 5.2. False-positive results. 6. Summary

Słowa kluczowe: borelioza z Lyme, ELISA, OspC, VlsE, Western-blot

Key words: ELISA, Lyme borreliosis, OspC, VlsE, Western-blot

1. Etiologia boreliozy

Borelioza z Lyme jest wieloukładową chorobą zakaźną przenoszoną przez kleszcze z gatunku *Ixodes ricinus* w obszarze europejskim. W Polsce od 2014 roku borelioza podlega obowiązkowemu zgłaszaniu i rejestracji a zachorowanie w każdym przypadku musi być związane z wcześniejszym narażeniem na kontakt z kleszczem. Po raz pierwszy została opisana pod nazwą „choroby z Lyme” (LD) w 1977 roku w miejscowości Old Lyme w USA [5, 18]. W 1982 Willy Burgdorfer wyizolował z kleszczy krętki – czynnik etiologiczny, który nazwano *Borrelia burgdorferi*. Z punktu widzenia systematyki krętki należą do Gram-ujemnych bakterii wewnątrzkomórkowych, rzędu *Spirochetales*, rodziny *Spirochaetaceae*, rodzaju *Borrelia* [29, 46, 53]. Od pierwszej izolacji i identyfikacji odkryto kilka genogatunków krętków z rodzaju *Borrelia* tworzących kompleks *B. burgdorferi sensu lato*. W Europie zakażenie wywołują głównie trzy genogatunki przenoszone transstadialnie i transowarialnie w cyklu rozwojowym kleszcza. Należą do nich: *B. garinii*, *B. afzelii* i *B. burgdorferi sensu stricto*. Obecnie w obszarze europejskim

rejestruje się zachorowania wywołane przez inne genogatunki: *B. spielmanii*, *B. bissettii* i *B. valaisiana* [6, 29, 38, 39, 42, 48, 53].

2. Swoista, humoralna odpowiedź immunologiczna w przebiegu boreliozy

Krętki uruchamiają w organizmie żywiciela szereg nieswoistych jak i swoistych reakcji immunologicznych, a złożone zdolności do unikania mechanizmów obronnych gospodarza utrudniają ich eliminację. W 2–3 tygodniu od zakażenia pojawiają się przeciwciała IgM (przeciwciała wczesne) jako wynik aktywacji swoistej humoralnej odpowiedzi immunologicznej [22]. Swoiste IgM osiągają szczyt produkcji w 2 miesiącu od zakażenia, a następnie w większości przypadków ich ilość stopniowo spada i rozpoczyna się produkcja IgG (przeciwciała późne). Choć IgM silniej aktywują dopełniacz i procesy fagocytozy, IgG są lepszym „narzędziem” w walce z patogenem ponieważ charakteryzują się wyższą swoistością i powinowactwem do antygenów *Borrelia*, a ich wysokie miana utrzymują się przez wiele lat [20, 22, 23].

* Autor korespondencyjny: Zakład Mikrobiologii i Diagnostyki Immunologicznej, Pomorski Uniwersytet Medyczny, ul. Powstańców Wlkp. 72; 70-111 Szczecin; tel. 091 466 16 54; e-mail: rumianek1978@wp.pl

Wraz z rozwojem procesu chorobowego obserwuje się ewolucję produkcji obu klas przeciwciał. Silna odpowiedź humoralna, z wysokim stężeniem przeciwciał może utrzymywać się u niektórych zakażonych przez miesiące a nawet lata po skutecznym leczeniu [4, 5, 18]. Zmniejszenie stężenia swoistych przeciwciał może wskazywać na wyleczenie. Przeciwciała wczesnej odpowiedzi immunologicznej IgM skierowane są głównie przeciwko białku flageliny (p41) i gatunkowo-swoistemu powierzchniowemu białku OspC (Osp – outer surface protein) [5, 21, 28, 52]. Dla późnych stadiów choroby (zapalenie stawów, zanikowe zapalenie skóry, neuroborelioza czy neuropatia obwodowa) charakterystyczne są swoiste przeciwciała IgG produkowane głównie przeciwko gatunkowo-swoistemu antygenowi VlsE oraz białkom p39 i p58, a następnie p83/100, p53, p43, p30, p21, p14 i Osp17 [6, 7, 10, 14, 21]. Białko powierzchniowe VlsE jest wcześniej rozpoznawane przez przeciwciała IgG i silnie stymuluje produkcję przeciwciał, co może obniżyć produkcję przeciwciał wobec innych antygenów [23]. Przeciwciała swoiste przeciwko wymienionym białkom *Borrelia* mają znaczenie diagnostyczne, jednak mogą reagować krzyżowo z białkami kilku genogatunków [41, 54]. Homologię białek w obrębie genogatunków związaną z wytworzeniem przeciwciał krzyżowo reagujących należy uwzględnić przy projektowaniu i konstruowaniu testów do serologicznej diagnostyki boreliozy [11, 24, 54].

3. Materiał i metody stosowane w diagnostyce boreliozy

Prawidłowe postawienie rozpoznania zależy od odpowiednio dobranej metody diagnostycznej oraz interpretacji wyników w powiązaniu z obrazem klinicznym zakażenia [4, 5, 13, 18, 20]. W diagnostyce boreliozy można zastosować testy serologiczne, hodowlę komórkową oraz metody genetyczne z wykorzystaniem PCR [4, 5, 20]. Każda z metod posiada zarówno swoje zalety, jak i ograniczenia.

Diagnostyka serologiczna jest diagnostyką z wyboru, a wyniki testów serologicznych potwierdzają bądź podają w wątpliwość podejrzenie kliniczne. Uzyskanie wiarygodnego wyniku zależy od okresu pobrania materiału na badanie (krew, płyn mózgowo-rdzeniowy) jak i od interpretacji wyników [5, 18, 19, 20]. Zgodnie z wytycznymi Polskiego Towarzystwa Epidemiologów i Lekarzy Chorób Zakaźnych (PTEiLChZ) zaleca się wykonanie pierwszego badania u pacjenta z podejrzeniem boreliozy po upływie 3–4 tygodni od ekspozycji na kleszcza w celu uniknięcia wyniku fałszywie ujemnego. Wytworzenie minimalnej ilości przeciwciał wczesnych wykrywanych przez test serologiczny

zajmuje organizmowi od 2 do 4 tygodni. Przeciwciała IgM utrzymują się w krwioobieg pacjenta zakażonego maksymalnie do 6 miesięcy, niekiedy mogą utrzymywać się przez cały okres choroby, z kolei wysoki poziom IgG może być wykrywany po wielu latach od remisji choroby [18, 20].

Hodowla krętków na podłożu Barbour-Stoener-Kelly (BSK) trwa kilka miesięcy i jej czułość jest najwyższa (30–70%) dla biopłatów pobranych ze zmian skórnych u pacjentów z przewlekłym zanikowym zapaleniem skóry kończyn (*ACA-acrodermatitis chronica atrophicans*) [33, 48]. Do innych materiałów z których można prowadzić hodowlę należą: płyn mózgowo-rdzeniowy w przypadku neuroboreliozy, płyn stawowy czy biopłat maziówki w przypadku boreliozowego zapalenia stawów (LA – *Lyme arthritis*) [35, 50]. Czułość hodowli w przypadku płynu mózgowo-rdzeniowego wynosi jedynie 5% [50]. Pomimo, iż hodowla jest złotym standardem mikrobiologicznym, w odniesieniu do krętków nie ma zastosowania w rutynowym postępowaniu diagnostycznym. Hodowlę prowadzi się jedynie w pracowniach badawczo-naukowych [49].

Metody genetyczne z wykorzystaniem reakcji PCR powinny wykrywać sekwencje genogatunków występujących w Europie [38]. Klasyczny jakościowy PCR wykrywa jedynie materiał genetyczny krętków a więc zarówno przy żywych jak i martwych krętkach wynik może być dodatni, informując jedynie o potencjalnej etiologii zakażenia, nie o jego aktywności [44]. W sferze badań naukowych pozostaje również zastosowanie ilościowej techniki real-time PCR, pomimo prób podejmowanych przez badaczy zajmujących się tą tematyką [3, 15]. Odsetek wyników dodatnich uzyskanych jakościowym i ilościowym testem genetycznym zależy od użytego materiału klinicznego (zmiany skórne, krew, płyn mózgowo-rdzeniowy, płyn stawowy, tkanki), typu techniki PCR oraz metod izolacji DNA [3, 37, 44]. Najniższy odsetek wyników PCR-dodatnich w porównaniu z testem serologicznym obserwowano dla krwi i płynu mózgowo-rdzeniowego (10–30%), czyli najczęściej pobieranych materiałów klinicznych do diagnostyki boreliozy [3]. Najwyższy odsetek wyników PCR-dodatnich wykazano natomiast dla płynu stawowego i fragmentów tkanek (50–70%), które z kolei stanowią niewielki procent materiałów badanych rutynowo. Stosując PCR uzyskano również ujemne wyniki z krwi i z płynu mózgowo-rdzeniowego w przypadku pacjentów z rozpoznaną boreliozą [1, 3, 44]. Zaletą ilościowego PCR, przy jego standaryzacji, byłaby możliwość określenia specyfiki zakażenia oraz jego aktywności na podstawie ilości wykrywanego DNA, ocena progresji choroby oraz odpowiedzi na leczenie [15, 44]. W chwili obecnej dodatnie wyniki PCR z krwi obwodowej w przypadku ujemnych wyników badań serologicznych powinny być

interpretowane krytycznie, natomiast dodatnie wyniki z płynu stawowego powinny być rozpatrywane w kontekście dodatniej serologii [4, 15]. Ograniczeniem PCR, pomimo dostępności gotowych zestawów do izolacji krętków pozostaje brak standaryzacji w diagnozowaniu boreliozy występującej w Polsce [15, 19].

Zastosowanie testów „drugiego wyboru” czyli hodowli lub techniki PCR powinno ograniczyć się do sytuacji, w których mamy do czynienia z klinicznie i serologicznie niejednoznaczными wynikami [1, 18]. Dotyczy to zarówno pacjentów z zakażeniami, w przebiegu których pojawiają się przeciwciała w kompleksach immunologicznych, jak również pacjentów z niedoborami immunologicznymi, w szczególności niedoborami odpowiedzi swoistej humoralnej [18, 19].

Przy opracowywaniu nowych testów typu PCR jak również przy wyborze antygenów do badań serologicznych należy uwzględnić zróżnicowanie szczepów wywołujących zakażenia. Ze względu na zróżnicowanie genogatunków testy do diagnostyki boreliozy stosowane na kontynencie amerykańskim, nie nadają się do diagnostyki boreliozy nabywanej w Europie [28]. Wyniki badań surowic europejskich testowanych przez komercyjne zestawy wykorzystujące syntetyczny peptyd C6 z białka VlsE, dostępne na rynku amerykańskim korelują z wynikami uzyskanymi w testach europejskich, mimo to powinny być traktowane z ostrożnością [8].

4. Testy serologiczne w diagnostyce boreliozy

Rozpoznanie boreliozy ze względu na zróżnicowany obraz kliniczny i niespecyficzność objawów wymaga potwierdzenia badaniem laboratoryjnym. Wszystkie postaci kliniczne powinny być weryfikowane za pomocą metod immunologicznych i genetycznych według zaleceń europejskich DGHM (German Society for Hygiene and Microbiology) i polskich PTEiLChZ [18, 20]. Wyjątkiem jest jedynie postać kliniczna z obecnością rumienia wędrującego (EM – *erythema migrans*). Rozpoznanie EM opiera się wyłącznie na obrazie klinicznym [33]. Jednak w postaciach nietypowych potwierdzenie laboratoryjne może być pomocne, ale dopiero po upływie co najmniej 2 tygodni od wystąpienia zmian [18, 20, 33, 34, 50].

Prawidłowa serodiagnostyka wymaga poznania i zrozumienia zastosowań oraz ograniczeń poszczególnych testów komercyjnych dostępnych na rynku [1, 4, 13, 19, 20]. Przy wyborze istotny jest dobór odpowiednich antygenów diagnostycznych oraz kryteriów interpretacyjnych [19, 20, 27, 49, 50, 52].

Serologiczna diagnostyka boreliozy z Lyme, najczęściej występującej choroby odkleszczowej w Polsce i w Europie wymaga oznaczenia dwóch klas przeciw-

ciał: IgM i IgG oraz wdrożenia schematu diagnostyki dwuetapowej; niestety nadal w wielu przypadkach nie jest to uwzględniane [1, 11, 18–20, 40, 50]. W Europie zgodnie z rekomendacją DGHM w pierwszym etapie są stosowane przesiewowe testy immunoenzymatyczne ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) lub immunofluorescencji pośredniej IIFA (Indirect Immunofluorescence Assay) [1, 18, 49, 50]. Wytyczne PTEiLChZ zalecają stosowanie testów ELISA. Wyniki badań Wojciechowska-Koszko i wsp. [52] wykazały wyższy odsetek wyników dodatnich w teście potwierdzenia, w przypadku zastosowania w diagnostyce przesiewowej immunofluorescencji pośredniej niż badań immunoenzymatycznych. W opinii autorów [2, 27, 52] przydatne byłyby kolejne wielośrodkowe badania porównawcze na szerszym panelu surowic.

Test przesiewowy wykonany techniką ELISA pozwala jedynie na wstępną detekcję przeciwciał przeciwko *Borrelia*, nie służy do potwierdzenia choroby i na jego podstawie nie można stawiać ostatecznej diagnozy [50, 52].

Wszystkie wyniki dodatnie lub graniczne (wątpliwe) uzyskane przy pomocy screeningu są weryfikowane w drugim etapie za pomocą testu Western-blot (WB) [1, 18, 50]. Zarówno test przesiewowy ELISA jak i test potwierdzenia WB powinny być zawsze wykonywane z dodatnią i ujemną próbą kontrolną. Jedynie takie testy, w których kontrole dają oczekiwany wynik mogą być interpretowane i mają wartość diagnostyczną [20].

Według zaleceń DGHM stosowane w diagnostyce boreliozy testy screeningowe powinny być na poziomie czułości $\geq 90\%$ [24, 25]. Pomimo wprowadzania antygenów rekombinowanych testy przesiewowe ELISA niekoniecznie zyskały na swoistości, która wynosi 29–71% w zależności od zastosowanego antygeny. W związku z wysoką czułością ale niską swoistością testów ELISA, istnieje ryzyko pojawiania się wyników fałszywie dodatnich i w konsekwencji błędnych rozpoznań [50].

Test potwierdzenia WB ma na celu odrzucenie wyników fałszywie dodatnich zatem powinien posiadać jak najwyższą swoistość – przynajmniej 95% [18, 50]. Niska swoistość WB obniża wartość WB jako testu potwierdzenia [2]. Obecnie w diagnostyce serologicznej częściej stosuje się testy Immunoblot (IB) z antygenami rekombinowanymi niż klasyczne WB oparte wyłącznie na antygenach natywnych. Stosowanie antygenów rekombinowanych zmniejsza ryzyko wystąpienia reakcji krzyżowych, które pojawiają się często w trakcie stosowania antygenów natywnych. Badania naukowe porównujące WB i IB [9, 16, 21] wykazały, że oczyszczone i rekombinowane antygeny włączone w IB prowadziły do znaczącego wzrostu swoistości IB – 95% w porównaniu z WB – 76%. Testy nie różniły się istotnie statystycznie czułością, zaledwie 4% wyższą czułość notowano dla IB [16].

4.1. ELISA

Test immunoenzymatyczny ELISA może być wykonywany metodą ilościową jak i półilościową o wysokiej czułości. Antygenami stosowanymi w tradycyjnych testach przesiewowych były całe komórki bakteryjne, jednak ostatnio stosowane testy zawierają oczyszczone antygeny bakteryjne, białka rekombinowane czy syntetyczne peptydy [2]. Zaleca się używanie testów ELISA II generacji (oczyszczone antygeny na drodze izolacji chemicznej) lub III generacji (antygeny rekombinowane). Testy II i III generacji i zmniejszają ryzyko nieswoistych reakcji krzyżowych, podnosząc jednocześnie czułość i swoistość oznaczenia [5, 48, 50]. Istnieje wysokie ryzyko reakcji krzyżowych przy zastosowaniu całych komórek bakteryjnych w formie lizatu, zatem nie jest zalecane stosowanie testów I generacji [2]. Nieswoiste reakcje krzyżowe mogą pojawiać się w przypadku diagnostyki boreliozy z Lyme prowadzonej u pacjentów z rozpoznaną chorobą autoimmunologiczną czy z zakażeniem wirusowym [9, 17, 36, 51].

Zaproponowano monitorowanie skuteczności wdrożonej antybiotykoterapii z użyciem testu ELISA, uzasadniając, że w przypadku skutecznie prowadzonej terapii poziom przeciwciał zmiennie spada po 10–20 dniach od rozpoczęcia leczenia [4]. Według aktualnych zaleceń PTEiLChZ badania serologiczne nie mogą ostatecznie służyć do oceny skuteczności leczenia z powodu długiego utrzymywania się przeciwciał. Ocena powinna być oparta przede wszystkim o dynamikę obrazu klinicznego, gdyż nie występuje korelacja poziomu przeciwciał i obrazu klinicznego [9, 18].

4.2. Western-Blot czy Immunoblot

Test WB stosowany w drugim etapie diagnostyki jest testem wyłącznie jakościowym. W przeciwieństwie do immunoenzymatycznego testu przesiewowego ELISA, WB ma niższą czułość, ale posiada wysoką swoistość [20, 36]. Należy pamiętać że zarówno testy typu WB jak również typu IB stosowane w końcowym etapie diagnostyki posiadają swoje zalety jak i wady. W przypadku testów WB, w których stosuje się lizat komórkowy czułość i swoistość zależy od genogatunku szczepu użytego jako antygen diagnostyczny. Zaletą użycia lizatu jest wykrycie większej ilości przeciwciał skierowanych przeciwko szerszemu spektrum białek, jednak wiąże się to z ryzykiem pojawienia się reakcji krzyżowych. Wadą lizatu jest trudność rozróżnienia frakcji swoistej od frakcji krzyżowo-reagującej [16, 17, 24, 47]. Dostępne testy IB cechują się podobną lub wyższą swoistością niż WB, ale niekoniecznie wyższą czułością [16, 26, 35, 43]. IB zawiera w swym składzie wyselekcjonowane, specyficzne białka rekombinowane należące do jednego

lub kilku genogatunków *Borrelia*. Możliwość detekcji swoistych przeciwciał skierowanych przeciw jednemu lub kilku genogatom *Borrelia* charakterystycznym dla danego regionu geograficznego wydaje się obiecująca. Mniejsze jest również ryzyko reakcji krzyżowych dzięki zastosowaniu gatunkowo-swoistych białek bądź ich fragmentów, które nie występują u innych drobnoustrojów. W praktyce ustalenie specyfiki zakażenia jest trudne pomimo zastosowania gatunkowo-specyficznych antygenów dla klasy IgM: OspC lub OspC advanced (30% bardziej specyficzne od rekombinowanego antygeny OspC) jak również antygenów rekombinowanych dla klasy IgG: VlsE. Wykorzystując antygeny rekombinowane w diagnostyce serologicznej boreliozy z Lyme nie można jednoznacznie wykluczyć zjawiska homologii antygenów różnych genogatunków jak również możliwości zakażenia z udziałem kilku genogatunków (dane własne, niepublikowane). W tabeli I zestawiono antygeny *Borrelia* służące do wykrywania swoistych przeciwciał w przebiegu boreliozy z Lyme, stosowane w testach WB/IB [48].

5. Interpretacja wyników

Zgodnie z zalecaną interpretacją wyników, końcowy raport laboratoryjny nie powinien generować wyników granicznych w zakresie diagnostyki serologicznej boreliozy z Lyme; wynik w ujęciu laboratoryjnym powinien być dodatni lub ujemny [36]. Interpretując wyniki badań serologicznych musimy zdawać sobie sprawę, że wykonanie testu potwierdzenia nie rozwiązuje wszystkich problemów związanych z diagnostyką choroby z Lyme, testy wymagają ciągłych udoskonaleń i ujednolicenia kryteriów interpretacji wyników [35, 49, 54].

Wybór dowolnej kombinacji ELISA – IB dostarczanych przez różnych producentów wpływa na odsetek wyników dodatnich, interpretację i uniemożliwia porównywanie wyników między laboratoriami stosującymi różne metodologie. Problemy dotyczą standaryzacji w zakresie rodzaju reagujących antygenów, jak również ich ilości, która pozwoliłaby na uznanie wyniku za dodatni [19, 31]. Stosując diagnostykę z wyboru niemożliwe jest również odróżnienie od siebie zakażenia aktywnego i przebytego w przeszłości [4, 49].

Zwykle oznaczenie wykonuje się w dwóch klasach, ale w interpretacji niezwykle ważne jest rozpoznanie lub podejrzenie kliniczne, znajomość postaci klinicznej lub co najmniej fazy choroby (wczesna, późna). W późnym okresie choroby znaczenie przeciwciał IgM jest kontrowersyjne [23], natomiast powinny być obecne przeciwciała klasy IgG, w późnej neuroboreliozie zawsze w płynie mózgowo-rdzeniowym [25]. We wczesnych postaciach brak wykrywalnych poziomów swoistych IgM jest możliwe oraz zwykle brak IgG [25].

Tabela I
Zestawienie antygenów *Borrelia* sp. stosowanych w testach WB/IB do wykrywania swoistych przeciwciał anti-*Borrelia* w diagnostyce serologicznej boreliozy z Lyme

| Antygen | Opis antygeny | Znaczenie diagnostyczne |
|---------------------------------------|---|--|
| VlsE peptyd C6 | Variable major protein (VMP) – zmienne białko błonowe | Wysoce czułe i specyficzne ; kluczowe w wykrywaniu IgG |
| OspC / p25 | Białko powierzchniowe | Wysoce specyficzne ; kluczowe w wykrywaniu IgM |
| OspA / p31 | Białko powierzchniowe | Wysoce specyficzne , wykrywane u ludzi po szczepieniu (USA) |
| p58 (<i>B. garinii</i> PBi) / OppA-2 | Białko wiążące oligonukleotydy | Wysoce specyficzne i czułe |
| p39 / BmpA | <i>Borrelia</i> membrane protein A (BMPA) – białko błonowe | Wysoce specyficzne i czułe |
| p83 / p100 | Białko błonowe | Specyficzne |
| p41 / Fla | Składnik flageliny | Niespecyficzne |
| BBK32 | Białko wiążące fibronektynę | Specyficzne |
| p20 / BBQ03 | Brak doniesień w literaturze | Brak doniesień w literaturze |
| BBA36 | Białko powierzchniowe | Niska czułość |
| BBO323 | Białko związane z błoną | Niska czułość |
| pG / OspF | Białko powierzchniowe | Niska czułość |
| p58 (<i>B. afzelii</i> PKo) | Niescharakteryzowane | Specyficzne |
| p43 | Niescharakteryzowane | Specyficzne |
| p30 | Niescharakteryzowane | Specyficzne |
| p14 | Niescharakteryzowane | Brak doniesień w literaturze |
| <i>Borrelia</i> lipidy | Składniki błony | Specyficzne |
| p18 / DbpA / Osp17 / p17 | DbpA (Decorinbinding protein A) – białko wiążące dekorynę | Kluczowe w wykrywaniu IgG |
| p21 / BBK53 | Białko zewnątrz błonowe | Brak doniesień w literaturze |
| p19 / BBN38 / Crasp3 / ErpP | Białko wiążące czynnik H | Niska czułość |
| p18 / BBP38 / OspE | Białko powierzchniowe wiążące czynnik G | Czułe |

Sposób interpretacji zwykle podaje producent testu. Wielu producentów zaleca interpretację opracowaną przez Center for Disease Control and Prevention (CDC) w USA. Jednak stosowanie tych kryteriów może być przyczyną błędnych interpretacji, gdyż ocena wyników badań na terenie Europy musi uwzględniać genogatunki chorobotwórcze z terenu Europy [19, 31]. W roku 2000 EUCALB (European Union Concerted Action on Lyme Borreliosis) przeprowadził wielośrodkowe badania mające na celu ocenę najbardziej charakterystycznych pasm dla zakażenia *Borrelia burgdorferi*. Na tej podstawie podjęto próbę skonstruowania zasad interpretacji wyników przeprowadzonych testem WB, jednak nie wyodrębniono jednoznacznych kryteriów, które dałyby wysoki poziom czułości i swoistości we wszystkich sześciu laboratoriach [20, 43, 45].

5.1. Wyniki fałszywie dodatnie

Przyczyną wyników fałszywie dodatnich mogą być reakcje krzyżowe przeciwciał anti-*Borrelia* z takimi samymi lub podobnymi antygenami występującymi u innych gatunków [32]. Podobieństwo dotyczy nastę-

pujących antygenów: p41, p58-60, p66, p68, p71, p73, które mogą występować m.in. u krętków *Treponema pallidum* czy *Ehrlichia* [9, 17, 51]. Reakcje fałszywie dodatnie mogą być również wynikiem podobieństwa antygenowego białek *Borrelia* z antygenami wirusów z rodziny *Herpesviridae* (EBV, CMV) [17, 51]. W przypadku pacjentów z chorobami autoimmunologicznymi występuje zwiększona produkcja przeciwciał, zwłaszcza w klasie IgG, zatem może dochodzić do nieswoistego wiązania z białkami *Borrelia* [36, 47]. Wykonywanie testów serologicznych u pacjentów z niecharakterystycznymi objawami ogólnymi jak również u osób zdrowych wiąże się również z ryzykiem uzyskania wyników fałszywie dodatnich [12]. Eliminacja wyników fałszywie dodatnich jest konieczna, aby uniknąć niepotrzebnej antybiotykoterapii [23, 51].

5.2. Wyniki fałszywie ujemne

Lokalna produkcja przeciwciał, np.: w płynie mózgowo-rdzeniowym lub płynie stawowym oraz tendencja patogenu do maskowania swojej obecności poprzez wewnątrzkomórkowe bytowanie może być przyczyną

falszywie ujemnych wyników [49]. Antybiotykoterapia wdrożona w początkowych stadiach choroby może osłabiać odpowiedź humoralną i generować wyniki fałszywie ujemne, pomimo jednoznacznych objawów klinicznych choroby [4]. Ryzyko uzyskania wyników fałszywie ujemnych istnieje również u pacjentów z chorobami autoimmunologicznymi oraz w przypadku ostrej infekcji krętkami *Borrelia*. W obu wymienionych przypadkach może dojść do powstania kompleksów pomiędzy krążącymi przeciwciałami a antygenami bakteryjnymi. Powstałe kompleksy immunologiczne nie mogą być wykrywane przez powszechnie stosowane techniki serologiczne [36, 51].

W rutynowym postępowaniu diagnostycznym surowice niereaktywne w teście ELISA nie są poddawane dalszemu testowaniu [18]. Jednak badania Ang i wsp. [2] jak również badania własne (dane niepublikowane) potwierdzają iż ta sama próbka niereaktywna w teście ELISA może być immunoreaktywna w teście IB. Z powyższych danych wynika iż technika ELISA może „przepuszczać” wyniki dodatnie. Dobrą praktyką byłoby potwierdzanie nie tylko wątpliwych i dodatnich ale również ujemnych wyników testu przesiewowego w uzasadnionych przypadkach, np.: w odniesieniu do pacjentów z klinicznym podejrzeniem boreliozy z Lyme [2, 52]. Pozostaje jednak pytanie o czułość testu przesiewowego, czas w jakim pobrano próbkę do badań oraz o refundację i tak już wysokich kosztów badań serologicznych z zakresu diagnostyki boreliozy z Lyme. We wczesnych stadiach boreliozy, kiedy miano przeciwciał jest niskie testy serologiczne mogą być fałszywie ujemne z powodu niskiej czułości. Odpowiedni czas pobrania materiału do badań serologicznych (3–4 tygodnie od momentu zakażenia) może ograniczyć generowanie wyników fałszywie ujemnych [18, 20, 33, 34, 50].

6. Podsumowanie

Złożona budowa krętków oraz ich zmienność antygenowa wpływa na konieczność konstruowania i standaryzacji odpowiednio czułych i swoistych testów laboratoryjnych, które wciąż ulegają technologicznym modyfikacjom [11, 25, 27, 30]. Stosowanie dowolnej kombinacji testów ELISA – WB/IB dostarczanych przez różnych producentów oraz brak ujednoliconych kryteriów interpretacji stwarza trudności diagnostyczne i niemożność porównywania wyników między laboratoriami [19, 31]. Wykorzystując gatunkowo-swoiste antygeny istnieją wciąż ograniczone możliwości w określaniu specyfiki zakażenia. Diagnostyka z wyboru prowadzona w oparciu o najnowsze testy nie eliminuje całkowicie reakcji krzyżowych. Nadal nie można jednoznacznie wykluczyć zjawiska homologii

antygenów różnych genogatunków jak również nie można rozstrzygnąć problemu jedno/wielogenogatunkowej etiologii boreliozy z Lyme [11, 24]. Serologiczna diagnostyka boreliozy w praktyce laboratoryjnej nie jest łatwa, wymaga wiedzy specjalistycznej, wyboru i stosowania wiarygodnych testów, umiejętności interpretacji oraz badań porównawczych nad immunoreaktywnością surowic w oparciu o najnowsze testy dostępne na rynku. Bardzo ważna jest wiedza dotycząca pobrania materiału na badanie oraz prowadzenie diagnostyki zgodnie z wytycznymi PTEiLChZ [18–20, 50]. W polskich laboratoriach praktykuje się jeszcze jednostopniowy schemat badania, co potwierdzają dane NIZP-PZH [40]. Diagnostyka boreliozy powinna być prowadzona w laboratoriach, gdzie specjaliści rozumieją ograniczenia poszczególnych testów komercyjnych dostępnych na rynku [1, 13], jak również współpracują z klinicystą w zakresie omówienia wyników i wyjaśniania wątpliwości.

Piśmiennictwo

1. Agüero-Rosenfeld M.E., Wang G., Schwartz I., Wormser G.P.: Diagnosis of Lyme borreliosis. *Clin. Microbiol. Rev.* **18**, 484–509 (2005)
2. Ang C.W., Notermans D.W., Hommes M., Simoons-Smit A.M., Herremans T.: Large differences between test strategies for the detection of anti-*Borrelia* antibodies are revealed by comparing eight ELISAs and five immunoblots. *Eur. J. Clin. Microbiol.* **30**, 1027–1032 (2011)
3. Babady N.E., Sloan L.M., Vetter E.A., Patel R., Binnicker M.J.: Percent positive rate of Lyme real-time polymerase chain reaction in blood, cerebrospinal fluid, synovial fluid and tissue. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **62**, 464–466 (2008)
4. Bielecki M., Kowal K.: Borelioza – diagnostyka, leczenie, powikłania. *Terapia*, **257**, 50–57 (2011)
5. Biesiada G., Czepiel J., Leśniak M., Garlicki A., Mach T.: Analiza czynników epidemiologicznych, objawów klinicznych i markerów serologicznych w przebiegu boreliozy. *Przegl. Epidemiol.* **67**, 181–183 (2010)
6. Biesiada G., Czepiel J., Salamon D., Garlicki A., Dziubek A., Maziarz B., Mach T.: Analiza genotypów krętków *Borrelia burgdorferi* w grupie chorych na boreliozę. *Przegl. Lek.* **66**, 511–512 (2009)
7. Branda J.A., Linskey K., Kim Y.A., Steere A.C., Farraro M.J.: Two-tiered antibody testing for Lyme disease with use of 2 enzyme immunoassays, a whole-cell sonicate enzyme immunoassay followed by a VlsE C6 peptide enzyme immunoassay. *Clin. Infect. Dis.* **53**, 541–547 (2011)
8. Branda J.A., Strle F., Strle K., Sikand N., Ferraro M.J., Steere A.C.: Performance of United States serologic assays in the diagnosis of Lyme borreliosis acquired in Europe. *Clin. Infect. Dis.* **57**, 333–340 (2013)
9. Bruckbauer H.R., Preac-Mursic V., Fuchs R., Wilske B.: Cross-reactive proteins of *Borrelia burgdorferi*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **11**, 224–232 (1992)
10. Bryksin A.V., Godfrey H.P., Carbonaro C.A., Wormser G.P., Agüero-Rosenfeld M.E., Cabello F.C.: *Borrelia burgdorferi* BmpA, BmpB, and BmpD proteins are expressed in human infection and contribute to P39 immunoblot reactivity in

- patients with Lyme disease. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **12**, 935–940 (2005)
11. Chandra A., Latov N., Wormser G.P., Marques A.R., Alaedini A.: Epitope mapping of antibodies to VlsE protein of *Borrelia burgdorferi* in post-Lyme disease syndrome. *Clin. Immunol.* **141**, 103–110 (2011)
 12. Chmielewski T., Tylewska-Wierzbanowska S.: Występowanie przeciwciał swoistych dla *B. burgdorferi* u ludzi zdrowych na terenie Polski. *Przegl. Epidemiol.* **56**, 33–38 (2002)
 13. DeBiasi R.L.: A concise critical analysis of serologic testing for the diagnosis of Lyme disease. *Curr. Infect. Dis. Rep.* **16**, 450 (2014)
 14. Embers M.E., Jacobs M.B., Johnson B.J., Philipp M.T.: Dominant epitopes of the C6 diagnostic peptide of *Borrelia burgdorferi* are largely inaccessible to antibody on the parent VlsE molecule. *Clin. Vaccine Immunol.* **14**, 931–936 (2007)
 15. Exner M.M., Lewinski M.A.: Isolation and detection of *Borrelia burgdorferi* DNA from cerebral spinal fluid, synovial fluid, blood, urine, and ticks using Roche MagNA Pure system and real-time PCR. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **46**, 235–240 (2003)
 16. Fawcett P.T., Rosé C.D., Gibney K.M., Doughty R.A.: Comparison of immunodot and western blot assays for diagnosing Lyme borreliosis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **5**, 503–506 (1998)
 17. Fawcett P.T., Gibney K.M., Rose C.D., Dubbs S.B., Doughty R.A.: Frequency and specificity of antibodies that crossreact with *Borrelia burgdorferi* antigens. *J. Rheumatol.* **19**, 582–587 (1992)
 18. Flisiak R., Pancewicz S.: Diagnostyka i leczenie boreliozy z Lyme – zalecenia Polskiego Towarzystwa Epidemiologów i Lekarzy Chorób Zakaźnych – 2011. <http://pteilchz.org.pl/standardy.htm>, data wejścia 14.07.2015.
 19. Gałęzowska E.: Borelioza – problemy z diagnostyką laboratoryjną. *Alma Mater*, **4**, 140–145 (2010)
 20. Gąsiorowski J., Witecka-Knysz E., Knysz B., Gerber H., Gładysz A.: Diagnostyka boreliozy. *Med. Pr.* **58**, 439–447 (2007)
 21. Goettner G., Schulte-Spechtel U., Hillermann R., Liegl G., Wilske B., Fingerle V.: 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. Microbiol.* **43**, 3602–3609 (2005)
 22. Gołąb J., Jakóbsiak M., Lasek W., Stokłosa T.: Odporność przeciw bakteriom wewnątrzkomórkowym (w) Immunologia. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2008, s. 317–319
 23. Grzeszczuk A.: Borelioza w praktyce klinicznej. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, 2010
 24. Hauser U., Lehnert G., Wilske B.: Validity of interpretation criteria for standardized Western blots (immunoblots) for serodiagnosis of Lyme borreliosis based on sera collected throughout Europe. *J. Clin. Microbiol.* **37**, 2241–2247 (1999)
 25. Heikkilä T., Seppälä I., Saxen H., Panelius J., Yrjänäinen H., Lahdenne P.: Species specific serodiagnosis of Lyme arthritis and Neuroborreliosis due to *Borrelia burgdorferi stricto*, *B. afzelii*, *B. garinii* by using Decorin binding protein. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 453–460 (2002)
 26. Hernández-Nova B., Rodríguez-Torres A. i wsp.: Utility of a commercial immunoblot kit (BAG-*Borrelia* blot) in the diagnosis of the preliminary stages of Lyme disease. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **47**, 321–329 (2003)
 27. Hunfeld K.P., Ernst M., Zachary P., Jaulhac B., Sonneborn H.H., Brade V.: Development and laboratory evaluation of a new recombinant ELISA for the serodiagnosis of Lyme disease. *Wien. Klin. Wochenschr.* **114**, 580–585 (2002)
 28. Ivanova L., Christova I., Neves V., Aroso M., Meirelles L., Brisson D., Gomes-Solecki M.: Comprehensive seroprofiling of sixteen *B. burgdorferi* OspC: implications for Lyme disease diagnostics design. *Clin. Immunol.* **132**, 393–400 (2009)
 29. Kondrusik M.: Biologia i morfologia krętka *Borrelia burgdorferi* (w) Borelioza z Lyme, red. T. Hermanowska-Szpakowicz. AM, Białystok, 1999, s. 3–6
 30. Krupka I., Knauer J., Lorentzen L., O'Connor T.P., Saucier J., Straubinger R.K.: *Borrelia burgdorferi* sensu lato species in Europe induce diverse immune responses against C6 peptides in infected mice. *Clin. Vaccine Immunol.* **16**, 1546–1562 (2009)
 31. Kubiak K., Dzika E., Równiak J., Dziedziech M., Dzisko J.: Seroprevalence of Lyme disease and genospecies of *Borrelia burgdorferi sensu lato* in patients diagnosed with borreliosis in the Province of Warmia-Masuria in north-eastern Poland. *Ann. Agric. Environ. Med.* **19**, 203–207 (2012)
 32. Liang F.T., Aberer E., Cinco M., Gern L., Hu C.M., Lobet Y.N., Ruscio M., Voet P.E. Jr, Weynants V.E., Philipp M.T.: Antigenic conservation of an immunodominant invariable region of the VlsE lipoprotein among European pathogenic genospecies of *B. burgdorferi* SL. *J. Infect. Dis.* **182**, 1455–1462 (2000)
 33. Lipsker D.: Dermatological aspects of Lyme borreliosis. *Méd. Mal. Infect.* **37**, 540–547 (2007)
 34. Jovićić V.Lj., Grego E.M., Lako B.L., Ristović B.M., Lepšanić Z.A., Stajković N.T.: Improved serodiagnosis of early Lyme borreliosis: immunoblot with local *Borrelia afzelii* strain. *APMIS*, **111**, 1053–1059 (2003)
 35. Marangoni A., Sparacino M., Mondardini V., Cavrini F., Storni E., Donati M., Cevenini R., Sambri V.: Comparative evaluation of two enzyme linked immunosorbent assay methods and three Western Blot methods for the diagnosis of culture-confirmed early Lyme borreliosis in Italy. *New Microbiol.* **28**, 37–43 (2005)
 36. Miąskiewicz K., Walczak E., Roguska K., Noworyta J., Brasse-Rumin M., Biernacka E., Legatowicz-Koprowska M., Palacz A., Lewandowski P., Ząbek J.: Propozycja nowego podejścia metodowego i interpretacji wyników oznaczeń przeciwciał przeciwko *Borrelia burgdorferi* – analiza składu przeciwciał krążących kompleksów immunologicznych. *Reumatologia*, **49**, 328–334 (2011)
 37. Moniuszko A., Dunaj J., Zajkowska J., Czupryna P., Świerzbńska R., Guziejko K., Aleksiejczuk P., Barry G., Kondrusik M., Pancewicz S.: Comparison of detection of *Borrelia burgdorferi* DNA and anti-*Borrelia burgdorferi* antibodies in patients with erythema migrans in north-eastern Poland. *Post. Dermatol Alergol.* **32**, 11–14 (2015)
 38. Mukhacheva T.A., Kovalev S.Y.: *Borrelia* spirochetes in Russia: genospecies differentiation by real-time PCR. *Ticks Tick-Borne Dis.* **5**, 722–726 (2014)
 39. Pancewicz S.A.: Borelioza z Lyme – zasady rozpoznawania i leczenia. *Pediatr. Med. Rodz.* **10**, 163–173 (2014)
 40. Paradowska-Stankiewicz I., Chrzęścijańska I.: Lyme disease in Poland in 2012. *Przegl. Epidemiol.* **68**, 275–277, 375–377 (2014)
 41. Rasiah C., Schiltz E., Reichert J., Vogt A.: Purification and characterization of a tryptic peptide of *Borrelia burgdorferi* flagellin, which reduces cross-reactivity in immunoblots and ELISA. *J. Gen. Microbiol.* **138**, 147–154 (1992)
 42. Rauter C., Hartung T.: Prevalence of *Borrelia burgdorferi sensu lato* genospecies in *Ixodes ricinus* ticks in Europe: a metaanalysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 7203–7216 (2005)
 43. Robertson J., Gray J. i wsp.: A European multicenter study of immunoblotting in serodiagnosis of Lyme borreliosis. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 2097–2102 (2000)
 44. Schwaiger M., Péter O., Cassinotti P.: Routine diagnosis of *Borrelia burgdorferi sensu lato* infections using a real-time PCR assay. *Clin. Microbiol. Infect.* **7**, 461–469 (2001)
 45. Serology: tests in use. Immunoblot. <http://www.eucalb.com/> data wejścia: 14.07.2015

46. Stanek G., Wormser G.P., Gray J., Strle F.: Lyme borreliosis. *Lancet*, **379**, 461–473 (2012)
47. Tokarska-Rodak M., Koziol-Montewka M., Fota-Markowska H., Bielec D., Modrzewska R., Pańczuk A.: Frequency and specificity of the antibodies against *Borrelia burgdorferi* tested by Western blot method in patients with symptoms of arthritis. *Cent. Eur. J. Immunol.* **33**, 220–223 (2008)
48. Tylewska-Wierzbanowska S., Chmielewski T.: Borelioza z Lyme – rozpoznanie kliniczne i laboratoryjne. *Med. Zak.* **15**, 565–570 (2008)
49. Tylewska-Wierzbanowska S., Chmielewski T.: Diagnostyka serologiczna boreliozy z Lyme – wytyczne europejskie. *Post. Mikrobiol.* **44**, 289–293 (2005)
50. Wilske B., Fingerle V., Schulte-Spechtel U.: Microbiological and serological diagnosis of Lyme borreliosis. *Immunol. Med. Microbiol.* **49**, 13–21 (2007)
51. Witecka-Knysz E., Klimczak M., Lakwa K., Zajkowska J., Pancewicz S., Kondrusik M., Grzegorzczuk S., Świerzbńska R., Hermanowska-Szpakowicz T.: Borelioza: dlaczego diagnostyka jest taka trudna? *Diagn. Lab.* **1**, 11–13 (2007)
52. Wojciechowska-Koszko I., Mączyńska I., Szych Z., Giedrys-Kalemba S.: Serodiagnosis of borreliosis: indirect immunofluorescence assay, enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblotting. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* **59**, 69–77 (2011)
53. Woś H.: Borelioza, choroba przenoszona przez kleszcze. *Pediatr Pol.* **85**, 371–374 (2010)
54. Zajkowska J.M., Kondrusik M., Pancewicz S.A., Grygorczuk S., Jamiołkowski J., Stalewska J.: Porównanie wyników testu z antygenem VlsE (C6) oraz testów z zastosowaniem antygenów rekombinowanych u osób chorych na boreliozę z Lyme. *Pol. Merkuriusz Lek.* **23**, 95–99 (2007)