

Występowanie, swoistość i krzyżowa reaktywność przeciwciał antybakteryjnych (*Yersinia* spp., *Salmonella Enteritidis*, *Chlamydia trachomatis*, *Borrelia burgdorferi*) oraz ich znaczenie w diagnostyce niesklasyfikowanych zapaleń stawów

Prevalence, specificity and cross reactivity of anti-bacterial antibodies (Yersinia spp., Salmonella Enteritidis, Chlamydia trachomatis, Borrelia burgdorferi) and their role in the diagnosis of undifferentiated arthritis

Jacek Noworyta, Maria Brasse-Rumin, Maja Budziszewska, Jakub Ząbek

Zakład Mikrobiologii i Serologii Instytutu Reumatologii im. prof. dr hab. med. Eleonory Reicher w Warszawie

Słowa kluczowe: przeciwciała antybakteryjne, krzyżowa reaktywność, swoistość.

Key words: antibacterial antibodies, cross reactivity, specificity.

Streszczenie

Diagnostyka serologiczna niesklasyfikowanych zapaleń stawów o podejrzewanej etiologii infekcyjnej jest często uważana za podstawową z uwagi na opóźnione objawy kliniczne w stosunku do wystąpienia infekcji. W prezentowanej pracy przedstawiono wyniki badań przeprowadzonych na 4830 surowicach pacjentów (w tym ok. 53% dzieci i młodzieży), hospitalizowanych w 2009 r. w 4 oddziałach klinicznych Instytutu Reumatologii w Warszawie.

W badaniach zastosowano metodę immunoenzymatyczną (ELISA), a w przypadku konieczności potwierdzenia obecności przeciwciał dla *Y. enterocolitica* (u dzieci) i *B. burgdorferi* – metodę immunoblotting (*Western-blotting*).

Analizując uzyskane wyniki, stwierdzono podwyższony poziom przeciwciał dla *Yersinia* spp. – w 35,3% surowic, dla *S. Enteritidis* – w 13%, *Ch. trachomatis* – w 10,6%, *B. burgdorferi* – w 14,7% (tab. I). Przeanalizowano występowanie przeciwciał poszczególnych klas w aspekcie ich przydatności diagnostycznej w określaniu infekcji. Szczególną uwagę zwracano na częste współwystępowanie w tej samej surowicy przeciwciał dla kilku drobnoustrojów (w tych samych klasach – w 56,8%, w różnych klasach – 20,7%) (tab. III, IV). Potwierdzono obecność swoistych przeciwciał klasy IgA dla *Yersinia* spp. w 60,8%, a klasy IgG – w 86,7%. Podobne badania nad swoistością przeciwciał dla *B. burgdorferi* wykazały ich potwierdzalność w 82,2% dla klasy IgG oraz w 45,9% dla klasy IgM (tab. II). Dodatkowo dokonano szczegółowej analizy częstości występowania

Summary

This paper presents the results of research conducted on sera of 4830 patients hospitalized in 2009 in 4 clinical departments of the Institute of Rheumatology in Warsaw. The immunoenzymatic method (ELISA) was used and for confirmation of the presence of antibodies to *Yersinia enterocolitica* (only in children) and to *Borrelia burgdorferi*, the Western-blotting method was used.

An increased level of antibodies to *Yersinia* spp. was found in 35.3% of sera and for other microbes, it was: *Salmonella Enteritidis* – in 13%, *Chlamydia trachomatis* – in 10.6% and *B. burgdorferi* – in 14.7% of sera (Table I).

The presence of antibodies of particular classes (IgG, IgA and IgM) was analyzed considering their diagnostic usefulness in identification of infection. Special attention was paid to a very high prevalence (in the same serum) of antibodies directed to plural bacteria species (antibodies in the same class were detected in 56.8% and antibodies in different classes were detected in 20.7% of sera) (Table III, IV).

The presence of specific antibodies against *Y. enterocolitica* was confirmed in 60.8% of sera for IgA class and in 86.7% for IgG class. Analogically, the presence of specific antibodies against *B. burgdorferi* was confirmed in 82.2% for IgG class and in 45.9% for IgM class (Table II). Additionally, a detailed analysis of the prevalence of antibodies to specific antigens of *Y. enterocolitica* and *B. burgdorferi* was done (Fig. 1, 2).

Adres do korespondencji:

dr n. biol. Jacek Noworyta, Zakład Mikrobiologii i Serologii, Instytut Reumatologii, ul. Spartańska 1, 02-637 Warszawa; tel. +48 22 844 42 41 wew. 413, 386; e-mail: jacek.noworyta@ir.ids.pl

Praca wpłynęła: 22.09.2010 r.

nia przeciwciał dla swoistych antygenów *Y. enterocolitica* i *B. burgdorferi* (ryc. 1, 2).

Diagnostyka serologiczna niesklasyfikowanych zapaleń stawów o podejrzewanej etiologii bakteryjnej: *Yersinia* spp., *S. Enteritidis*, *Ch. trachomatis*, *B. burgdorferi*, jest przydatna z racji opóźnionych objawów klinicznych, jednakże obarczona wieloma trudnościami interpretacyjnymi, wynikającymi z:

- częstego wykrywania przeciwciał w jednej klasie, zwłaszcza IgG, które nie mają istotnego znaczenia w diagnostyce chorób infekcyjnych,
- jednoczesnego współwystępowania przeciwciał dla 2–3 drobnoustrojów, świadczącego o krzyżowej reaktywności, nadkażeniu i/lub odległym kontakcie z patogenem,
- konieczności w wielu przypadkach potwierdzenia wyniku metodami swoistymi, co jednak znacznie zwiększa koszty diagnostyki.

Diagnoza odczynowych i reaktywnych zapaleń stawów (ReZS), oprócz typowego obrazu klinicznego, oparta jest na wykrywaniu współistniejącej infekcji. Jednakże wyhodowanie drobnoustroju jest często niemożliwe z uwagi na opóźnione w stosunku do infekcji objawy kliniczne (*Salmonella*, *Yersinia*). Nierzadko powodem jest również skomplikowana diagnostyka mikrobiologiczna (*Chlamydia*, *Borrelia*), często niemożliwa do wykonania w niewyspecjalizowanych laboratoriach [1–3].

Diagnostyka laboratoryjna poinfekcyjnych zapaleń stawów polega głównie na oznaczaniu swoistych przeciwciał w surowicy niezwykle czułymi, ale charakteryzującymi się różną swoistością metodami immunoenzymatycznymi, takimi jak np. ELISA [2].

Metoda ELISA jest szeroko rozpowszechniona w diagnostyce infekcji *Yersinia*, coraz częściej także *Salmonella* [4–8], oraz *Chlamydia* spp. i *Borrelia* spp. [9], które oprócz wywoływania typowych dla siebie objawów klinicznych mogą być także czynnikiem etiologicznym zapaleń stawów. Stąd właśnie wynika tak duże zainteresowanie klinicystów reumatologów diagnostyką serologiczną ww. drobnoustrojów. Jak wskazuje wieloletnie doświadczenie [10], analiza otrzymanych wyników badań serologicznych może sprawiać jednak pewne trudności interpretacyjne. Analizując otrzymany wynik, należy mieć na uwadze dość szeroko rozpowszechnione zjawisko krzyżowej reaktywności przeciwciał antybakteryjnych, wynikające z podobieństwa antygenów stosowanych w testach immunoenzymatycznych (np. ECA – *Enterobacteriaceae common antigen* u *Enterobacteriaceae*, czy MOMP – *major outer membrane proteins* u *Chlamydia* spp.). Należy pamiętać także o możliwości wystąpienia wspólnych epitopów bakteryjnych, obecności w surowicy pacjenta czynnika reumatoidalnego klasy IgM (RF-M), a także o częstym występowaniu przeciwciał w zdrowej populacji danego kraju (np. ok. 10% dla *Salmonella* i nawet do 40% dla *Yersinia* spp.). Najważniejsze przy właściwej interpretacji jest jednak zwracanie uwagi

Serological diagnosis of undifferentiated arthritis of suspected bacterial origin: *Yersinia* spp., *S. Enteritidis*, *Ch. trachomatis*, *B. burgdorferi* is generally helpful, due to delayed onset of clinical symptoms. Unfortunately, there are some troubles with interpretation like:

- very frequent detection of antibodies in one class (especially IgG), which is not significant in the diagnosis of infective diseases,
- simultaneous prevalence of antibodies for 2 or 3 bacteria, what reflects the antibodies cross reactivity, additional infection or a previous contact with a pathogen,
- in many cases, confirmation with the use of specific methods is needed, what however considerably increases diagnostic costs.

na wykrycie wysokich poziomów przeciwciał klasy IgG + IgA/IgM, a nie w pojedynczych klasach, a zwłaszcza w klasie IgG. Taki wynik badania serologicznego ma największą wartość.

Z tych powodów coraz częściej staje się konieczne potwierdzanie swoistości wykrywanych przeciwciał. Obecnie dotyczy to m.in. przeciwciał dla *Borrelia* spp., *Yersinia* spp. oraz *Chlamydia* spp., gdzie stosuje się metody immunoblotting oparte na wykrywaniu przeciwciał dla swoistych antygenów. Sama metoda ELISA – o znaczeniu skринingowym – coraz częściej zyskuje na swoistości. Dzięki zastosowaniu antygenów rekombinowanych lub białek syntetycznych, wykrywane przeciwciała są swoiste gatunkowo, a nie tylko rodzajowo (np. w przypadku *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae*) [8, 11].

Celem pracy była kolejna, aktualna analiza występowania zjawiska krzyżowej reaktywności surowicznych przeciwciał dla *Yersinia* spp., *Salmonella Enteritidis*, *Chlamydia trachomatis* oraz *Borrelia burgdorferi*. Opisywana poniżej analiza została poszerzona o badania swoistości wykrywanych przeciwciał dla *Yersinia enterocolitica* oraz *Borrelia burgdorferi* wśród pacjentów klinik Instytutu Reumatologii. W wielu przypadkach miało to na celu potwierdzenie dodatnich wyników uzyskanych metodą ELISA, co ma podstawowe znaczenie w diagnozowaniu wielu stanów zapalnych.

Materiał i metody

Badaniami metodą ELISA na obecność w surowicy przeciwciał dla *Yersinia* spp., *Salmonella Enteritidis*, *Chlamydia trachomatis*, *Borrelia burgdorferi* objęto pacjentów hospitalizowanych w 4 klinikach/oddziale Instytutu Reumatologii w Warszawie w 2009 r. Dotyczyło to 4830 surowic pochodzących z Kliniki i Polikliniki Reumatologii Wieku Rozwojowego (KPRWR), Kliniki i Polikliniki Reumatologii (KPR), Kliniki i Polikliniki Układowych Chorób Tkanki Łącznej (KPUChtŁ) oraz od lipca 2009 r. także Oddziału Wczesnej Diagnostyki Zapaleń Stawów (OWDZS).

Przeciwciała klasy IgA i IgG dla *Yersinia* spp. oznaczano przy zastosowaniu testu recomWell *Yersinia* (Mikrogen Diagnostik), w którym dołki płytek optaszczone były białkami rekombinowanymi, tzw. Yop (*Yersinia outer membrane proteins*), swoistymi dla rodzaju *Yersinia* (*Y. enterocolitica* i *Y. pseudotuberculosis*).

Przeciwciała klasy IgG i IgM dla *Borrelia* spp. wykrywane były przy użyciu testu *Borrelia* IgG/IgM ELISA (Biomedica), w którym dla poprawy swoistości diagnostycznej dołki mikropłytki optaszczone były antygenami rekombinowanymi: p21 (zewnętrzne białko powierzchniowe C – *B. afzelii*, stem PKo), p21 (zewnętrzne białko powierzchniowe C – *B. garinii*, stem 20047), p41/1 (wewnętrzny fragment flageliny *B. garinii*, stem PBi) oraz VlsE (białko fuzyjne różnych genogatunków).

Przeciwciała klasy IgA i IgG dla *Ch. trachomatis* oznaczano testem firmy DRG z zastosowaniem MOMP jako antygenów optaszczających płytki.

Metoda ELISA do wykrywania przeciwciał klasy IgA, IgG, IgM dla *S. Enteritidis* została uprzednio opisana [12]. Antygenem optaszczającym dołki płytek był lipopolisacharyd (LPS) (Sigma).

Badania nad występowaniem przeciwciał swoistych dla *Y. enterocolitica* dotyczyły jedynie surowic pacjentów z KPRWR. Obecność przeciwciał potwierdzano w klasie

IgA – w 51 surowicach, a w klasie IgG – w 45 surowicach. Zastosowano metodę *Western-blotting* (Euroimmun), wykrywającą przeciwciała dla czynników wirulencji patogennego szczepu *Y. enterocolitica* O3, o określonym ciężarze cząsteczkowym (kDa), tj.: 46 kDa (p46), 44 kDa (p44), 38 kDa (p38), 36 kDa (p36), 34 kDa (p34), 30 kDa (p30), 25 kDa (p25).

Z kolei potwierdzenie swoistości dodatnich wyników uzyskanych metodą ELISA na obecność przeciwciał w klasie IgG dla *Borrelia burgdorferi* wykonano w przypadku 73 surowic, a w klasie IgM w 159. Stosowano metodę *Western-blotting* (recomLine firmy MIKROGEN), która pozwalała na wykrywanie przeciwciał dla 7 swoistych białek (p100, VlsE, p58, p39, OspA, OspC, p18) oraz jednego, mniej swoistego (białko flageliny – p41). Rekombinowane, wysoce oczyszczone białka umieszczone były na paskach nitrocelulozowych.

Wyniki

Dokonano szczegółowej analizy badań wykonanych w oddziałach klinicznych Instytutu Reumatologii, w aspekcie wykrywania przeciwciał (różnych klas) dla *Yersinia* spp., *Salmonella Enteritidis*, *Chlamydia trachomatis*, *Borrelia burgdorferi* (tab. I).

Tabela I. Wyniki dodatnie na obecność przeciwciał dla *Yersinia* spp., *Salmonella Enteritidis*, *Chlamydia trachomatis*, *Borrelia burgdorferi* w surowicach pacjentów hospitalizowanych w wybranych klinikach IR w 2009 r. ($n = 4830$)

Table I. Positive results of prevalence of anti-*Yersinia* spp., *Salmonella Enteritidis*, *Chlamydia trachomatis*, *Borrelia burgdorferi* antibodies in sera of patients from clinical departments of the Institute of Rheumatology in 2009 ($n = 4830$)

Liczba badań na obecność przeciwciał dla:	Liczba (%) wyników dodatnich	Przeciwciała klasy			Liczba (%) wyników dodatnich
<i>Yersinia</i> spp. 1489	526 (35,3)	IgA	IgG		
		–	+		287 (54,5)
		+	+		204 (38,8)
		+	–		35 (6,6)
<i>S. Enteritidis</i> 1136	148 (13)	IgA	IgG	IgM	
		–	+	–	127 (85,6)
		–	–	+	7 (4,8)
		–	+	+	7 (4,8)
		+	+	+	5 (3,4)
		+	+	–	2 (1,3)
<i>B. burgdorferi</i> 1649	243 (14,7)	IgG	IgM		
		–	+		166 (68,3)
		+	–		57 (23,5)
		+	+		20 (8,2)
<i>Ch. trachomatis</i> 556	59 (10,6)	IgA	IgG		
		+	–		35 (59,4)
		+	+		11 (18,6)
		–	+		13 (22)

Oznaczenia przeciwciał dla *Yersinia* spp. dotyczyły klas IgA i IgG, a ich wykrywalność wynosiła 35,3%. Najczęściej wykrywano przeciwciała jedynie klasy IgG (54,5%). Wykrywalność obu klas przeciwciał IgA i IgG sięgnęła 38,8%. Obecność przeciwciał jedynie w klasie IgA zaobserwowano tylko w 6,6% przebadanych surowic.

W przeciwieństwie do *Yersinia* spp. średni odsetek wykrywalności przeciwciał dla *Salmonella Enteritidis* był zdecydowanie niższy i wynosił 13%. Spośród surowic otrzymanych ze wszystkich klinik najczęściej wykrywano przeciwciała jedynie w klasie IgG (średnio ok. 80%). Pozostałe kombinacje wykrywanych przeciwciał obserwowano na poziomie kilku procent (1,3–4,8%).

Nieco wyższy odsetek (14,7%) wyników dodatnich stwierdzono, badając obecność przeciwciał surowiczych dla *Borrelia burgdorferi*. Spośród 243 surowic, aż w ok. 70% wykryto przeciwciała jedynie klasy IgM, a w 23,5% – jedynie klasy IgG. Tylko w 8,2% surowic dodatnich wykryto obecność jednocześnie przeciwciał klasy IgG i IgM.

Obecność przeciwciał klas dla *Chlamydia trachomatis* analizowano wyłącznie w surowicach osób dorosłych. Analiza wykazała, że to właśnie przeciwciała dla *Ch. trachomatis* stanowiły najrzadszą grupę wykrywanych przeciwciał (10,6%). Spośród wyników dodatnich najczęściej stwierdzano przeciwciała jedynie w klasie IgA (59,4%) oraz jedynie w klasie IgG (22%), natomiast wykrywalność obu klas przeciwciał (IgA, IgG) zaobserwowano tylko w 18,6% surowic.

Przy zastosowaniu metody *Western-blotting* potwierdzano wyniki dodatnie uzyskane metodą ELISA. Analiza dotyczyła potwierdzania wybranych surowic dodatnich (51 surowic w klasie IgA i 45 w klasie IgG) na obecność przeciwciał dla *Yersinia* spp. u pacjentów wyłącznie z Kliniki i Polikliniki Reumatologii Wieku Rozwojowego. Uzyskane wyniki wykazały potwierdzalność przeciwciał klasy IgA dla *Yersinia* spp. w 60,8%, natomiast klasy IgG w 86,7%.

Podobne badania potwierdzające obecność przeciwciał klasy IgG i/lub IgM wykonano w przypadku *Borrelia burgdorferi*. Do analizy przeznaczono dodatnie surowice (73 w klasie IgG, 159 w klasie IgM) ze wszystkich 4 oddziałów klinicznych. Zaobserwowano, że potwierdzalność wyników dodatnich zdecydowanie częściej dotyczyła przeciwciał klasy IgG (82,2%), w porównaniu z przeciwciałami klasy IgM (45,9%) i różniła się w zależności od pochodzenia surowicy. I tak, przeciwciała klasy IgG najczęściej (w 95,2%) potwierdzano w surowicach pacjentów pochodzących z KPUCHTŁ, a rzadziej z KPR (68,7%). Z kolei przeciwciała klasy IgM najczęściej potwierdzano u pacjentów z KPR (64,7%), a najrzadziej u pacjentów z KPRWR (41%) i OWDZS (41,2%) (tab. II).

Dodatkowo jakościowo oznaczano *in vitro* surowice przeciwciała dla czynników wirulencji patogennego szcze-

Tabela II. Wyniki dodatnie uzyskane metodą *Western-blotting* na obecność przeciwciał dla *Borrelia burgdorferi*, potwierdzające wyniki uzyskane w badaniu metodą ELISA

Table II. Positive results of anti-*Borrelia burgdorferi* antibodies by *Western-blotting* confirming the positive results by ELISA

Klinika/Oddział	Wyniki dodatnie (%) potwierdzone metodą <i>Western-blotting</i>	
	IgG	IgM
KPRWR	27 (81,5)	95 (41)
KPR	16 (68,7)	17 (64,7)
KPUCHTŁ	21 (95,2)	30 (53,3)
OWDZS	9 (77,8)	17 (41,2)
Razem	73 (82,2)	159 (45,9)

KPRWR – Klinika i Poliklinika Reumatologii Wieku Rozwojowego

KPR – Klinika i Poliklinika Reumatologii

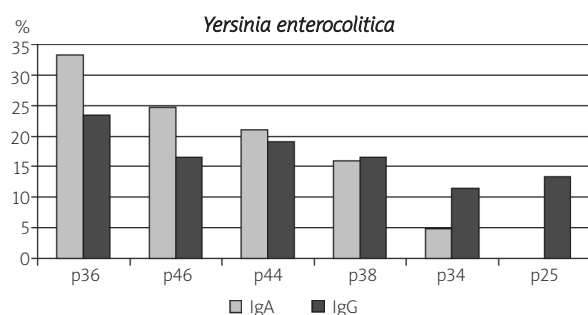
KPUCHTŁ – Klinika i Poliklinika Układowych Chorób Tkanki Łącznej

OWDZS – Oddział Wczesnej Diagnostyki Zapaleń Stawów

pu *Y. enterocolitica* O3. Oceniając odsetki wykrywanych przeciwciał klasy IgA i IgG dla białek zewnętrznej błony ściany komórkowej (*outer membrane proteins* – OMP) *Y. enterocolitica* o danym ciężarze cząsteczkowym (kDa), zaobserwowano, że w klasie IgA wykrywano przeciwciała w odsetkach zmniejszających się, kolejno dla białek: p36 (33,3%), p46 (24,7%), p44 (21%), p38 (16%) oraz p34 (4,9%). Nie wykryto natomiast przeciwciał dla białka p25. W przypadku klasy IgG, kolejność wykrywanych przeciwciał dla analogicznych białek *Y. enterocolitica* przedstawiała się nieco inaczej, a mianowicie: p36 (23,4%), p44 (19%), p46 (16,5%), p25 (13,3%) i p34 (11,4%) (ryc. 1).

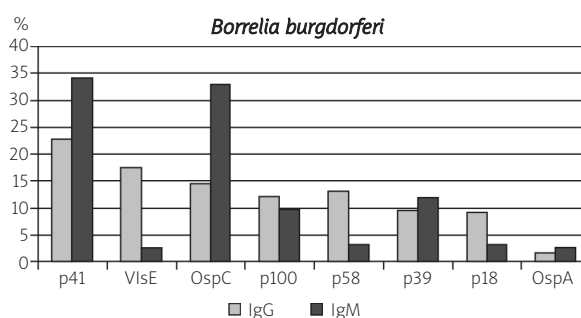
Szczegółowa analiza obecności przeciwciał klasy IgG i IgM dla rekombinowanych antygenów genogatunków *Borrelia* pozwoliła stwierdzić, że w obu klasach IgG i IgM przeciwciała występują najczęściej (IgG – 22,7%, IgM – 34%) dla białka flageliny o ciężarze cząsteczkowym 41 kDa (p41). Poza tym w klasie IgG często wykrywano przeciwciała dla antygenów: VlsE (17,4%), OspC (14,5%), p58 (13%), p100 (12,1%), p39 (9,6%) i p18 (9,2%). Zdecydowanie rzadziej (1,5%) wykrywano przeciwciała dla antygeny OspA. Z kolei odpowiedź w klasie IgM, poza antygenem p41, najczęściej dotyczyła OspC (32,8%), rzadziej p39 (11,8%) i p100 (9,8%), a dla pozostałych białek kształtowała się na bardzo niskim poziomie, tj.: p58 (3,2%), p18 (3,2%), VlsE oraz OspA (2,6%) (ryc. 2).

Kolejnym etapem pracy była analiza współwystępowania przeciwciał dla badanych drobnoustrojów. Zaob-



Ryc. 1. Odsetek przeciwciał dla swoistych antygenów białkowych *Yersinia enterocolitica* wykrytych metodą *Western-blotting*. Badania dotyczyły pacjentów Kliniki i Polikliniki Reumatologii Wzrostu i Rozwoju IR.

Fig. 1. Percentage of antibodies to specific antigens of *Yersinia enterocolitica* by *Western-blotting* test. The research was done in children and teenage patients.



Ryc. 2. Odsetek przeciwciał dla swoistych antygenów białkowych *Borrelia burgdorferi* wykrytych metodą *Western-blotting*. Badania dotyczyły pacjentów 4 oddziałów klinicznych Instytutu Reumatologii.

Fig. 2. Percentage of antibodies to specific antigens of *Borrelia burgdorferi* by *Western-blotting* test. The research was done in patients from 4 clinical departments of the Institute of Rheumatology.

Tabela III. Współwystępowanie przeciwciał (niezależnie od klasy Ig) dla *Yersinia* spp., *Salmonella Enteritidis*, *Borrelia burgdorferi* i *Chlamydia trachomatis* w 772 surowicach pacjentów hospitalizowanych w wybranych klinikach IR w 2009 r.

Table III. Coexisting antibodies (independently of the Ig class) for *Yersinia* spp., *Salmonella Enteritidis*, *Borrelia burgdorferi* and *Chlamydia trachomatis* in 772 sera of patients from clinical departments of the Institute of Rheumatology in 2009

Współwystępowanie przeciwciał dla:	Liczba (%)
<i>Yersinia</i> spp. + <i>S. Enteritidis</i> + <i>B. burgdorferi</i>	8 (1)
<i>Yersinia</i> spp. + <i>B. burgdorferi</i> + <i>Ch. trachomatis</i>	1 (0,1)
<i>Yersinia</i> spp. + <i>S. Enteritidis</i> + <i>Ch. trachomatis</i>	3 (0,4)
<i>B. burgdorferi</i> + <i>S. Enteritidis</i> + <i>Ch. trachomatis</i>	1 (0,1)
<i>Yersinia</i> spp. + <i>B. burgdorferi</i>	65 (8,4)
<i>Yersinia</i> spp. + <i>S. Enteritidis</i>	39 (5,1)
<i>Yersinia</i> spp. + <i>Ch. trachomatis</i>	30 (3,9)
<i>B. burgdorferi</i> + <i>S. Enteritidis</i>	9 (1,2)
<i>B. burgdorferi</i> + <i>Ch. trachomatis</i>	3 (0,4)
<i>S. Enteritidis</i> + <i>Ch. trachomatis</i>	1 (0,1)
Suma (%) reakcji krzyżowych	160 (20,7)

serwowano, że niezależnie od klasy immunoglobulin, w 20,7% surowic dochodziło do współwystępowania przeciwciał dla badanych drobnoustrojów. W 1,6% surowic dodatnich współwystępowały przeciwciała dla trzech badanych drobnoustrojów, w tym najczęściej dla *Yersinia* spp. + *S. Enteritidis* + *B. burgdorferi* (1%). Spośród surowic wykazujących krzyżowe reakcje przeciwciał dla dwóch drobnoustrojów najczęściej obserwowano jednoczesną obecność przeciwciał dla: *Yersinia* spp. + *B. burgdorferi* (8,4%), *Yersinia* spp. + *S. Enteritidis* (5,1%) oraz *Yersinia* spp. + *Ch. trachomatis* (3,9%) (tab. III).

Biorąc pod uwagę reakcje krzyżowe przeciwciał w tych samych klasach immunoglobulin stwierdzono, że zdecydowanie najczęściej dotyczyło to klasy IgG przeciwciał dla *Yersinia* spp. + *S. Enteritidis* (23,1%) oraz *Yersinia* spp. + *B. burgdorferi* (12,5%). Równie często wykazywano współwystępowanie przeciwciał dla *Yersinia* spp. + *Ch. trachomatis* (14,4%), wśród których najwięcej było reakcji krzyżowych w klasie IgA (7,5%), następnie w IgG (5%), a nawet w obu klasach (1,9%). Łącznie spośród 160 surowic, w których stwierdzono obecność przeciwciał dla badanych drobnoustrojów, aż w 56,8% występowały reakcje krzyżowe w tych samych klasach immunoglobulin (tab. IV).

Dyskusja

Celem przedstawionych w pracy badań serologicznych było potwierdzenie przydatności diagnostyki serologicznej niesklasyfikowanych zapaleń stawów o podejrzewanej etiologii bakteryjnej: *Yersinia* spp. *Salmonella Enteritidis*, *Chlamydia trachomatis* oraz *Borrelia burgdorferi* [2–5, 7, 9, 13]. Analiza przedstawionych wyników

Tabela IV. Współwystępowanie przeciwciał w tych samych klasach Ig dla *Yersinia* spp., *Salmonella Enteritidis*, *Borrelia burgdorferi* i *Chlamydia trachomatis* w 160 surowicach pacjentów hospitalizowanych w wybranych klinikach IR w 2009 r.

Table IV. Coexisting antibodies in the same class of Ig for *Yersinia* spp., *Salmonella Enteritidis*, *Borrelia burgdorferi* and *Chlamydia trachomatis* in 160 sera of patients from clinical departments of the Institute of Rheumatology in 2009

Współwystępowanie przeciwciał dla:	Klasa Ig	Liczba surowic dodatnich (%)
<i>Yersinia</i> spp.+ <i>B. burgdorferi</i> + <i>Ch. trachomatis</i>	IgG	1 (0,6)
<i>Yersinia</i> spp. + <i>B. burgdorferi</i> + <i>S. Enteritidis</i>	IgG	3 (1,9)
<i>Yersinia</i> spp. + <i>S. Enteritidis</i> + <i>Ch. trachomatis</i>	IgA	2 (1,2)
<i>Yersinia</i> spp. + <i>B. burgdorferi</i>	IgG	20 (12,5)
<i>Yersinia</i> spp. + <i>S. Enteritidis</i>	IgG IgA	37 (23,1) 1 (0,6)
<i>Yersinia</i> spp. + <i>Ch. trachomatis</i>	IgA	12 (7,5)
	IgG	8 (5)
	IgA + IgG	3 (1,9)
<i>B. burgdorferi</i> + <i>S. Enteritidis</i>	IgG	2 (1,2)
	IgM	1 (0,6)
<i>S. Enteritidis</i> + <i>Ch. trachomatis</i>	IgG	1 (0,6)
Suma (%) reakcji krzyżowych		91 (56,8)

pokazuje klinicytom reumatologom, iż diagnostyka ta jest obarczona wieloma trudnościami. Każdy z wymienionych drobnoustrojów wywołuje różnorakie swoiste objawy chorobowe, ale zapalenie stawów może zarówno towarzyszyć wszystkim tym infekcjom, jak i być przyczyną ReZS.

Podstawową zasadą interpretacji oznaczeń serologicznych przeciwciał surowicznych [3] jest świadomość, że jedynie obecność przeciwciał klasy IgG + IgA/IgM ma znaczenie diagnostyczne w ww. chorobach. Stwierdzenie obecności jedynie przeciwciał klasy IgM ma natomiast bardzo ograniczoną wartość w rozpoznawaniu ReZS. W takim przypadku zalecane jest badanie kontrolne po 4–6 tygodniach, gdyż najczęściej po tym właśnie czasie poziom tych przeciwciał obniża się lub następuje serokonwersja do klasy IgG. Z kolei przeciwciała na wysokim poziomie, jedynie klasy IgG, mogą utrzymywać się przez kilka miesięcy, lat, a nawet przez całe życie, co może świadczyć o dawnej infekcji lub kontakcie z tym drobnoustrojem. Obecność jedynie przeciwciał klasy IgA dotyczy głównie infekcji błon śluzowych i wskazuje na aktywny, niedawny, ale i przewlekły proces infekcji – z uwagi na krótki, kilkudniowy okres półtrwania przeciwciał tej klasy.

Spśród ogólnej liczby wyników dodatnich na obecność przeciwciał dla *Yersinia* spp. w 38,8% można było

podejrzewać istotne, z punktu widzenia klinicysty, znaczenie diagnostyczne, w takim odsetku wykrywano bowiem jednocześnie przeciwciała w klasie IgA i IgG (tab. I). Niewielki odsetek przeciwciał dla *Yersinia* spp. jedynie w klasie IgA (6,6%), dowodził raczej infekcji błon śluzowych, ale mógł wskazywać również na aktywny, niedawny, jak i przewlekły proces infekcyjny. Należy pamiętać, że bardzo wysoki poziom przeciwciał IgA (utrzymujący się nawet latami) może pojawić się, jeśli w przebiegu infekcji występują powikłania ReZS, rumienia guzowatego itp. Co więcej, stwierdzony wysoki odsetek przeciwciał jedynie w klasie IgG ma małe znaczenie diagnostyczne. Jednakże specyfiką przeciwciał dla tego drobnoustroju jest to, że w klasie IgG przeciwciała te mogą utrzymywać się latami i wykrywane są u 30–50% zdrowej populacji. Z kolei przeciwciała klasy IgA wg producenta testu występowały w ok. 25% badanych surowic (badania wykonane u ponad 2 tys. osób).

Dokonując badań metodą ELISA na obecność przeciwciał dla *Yersinia* spp., trzeba mieć świadomość wysokiego stopnia krzyżowej reaktywności czynników wirulencji, dlatego zastosowanie metody potwierdzającej uzyskany wynik dodatni, np. metody *Western-blotting*, jest szczególnie wskazane.

W tym aspekcie analiza wyników badania potwierdzającego *Western-blotting* (ryc. 1) wskazuje, że zarówno

w klasie IgA, jak i IgG najczęściej wykrywano przeciwciała swoiste dla czynnika wirulencji, Yop D (36 kDa). Otrzymane wyniki potwierdzały wyniki badań wykonanych przez producenta testu. Należy pamiętać, że zawsze podczas wykonywanego badania można spodziewać się wielu reakcji nieswoistych, chociażby z uwagi na wspólny antygen ECA i obecność w ich ścianie komórkowej antygenów OMPs zbliżonych budową do YOPs.

Analizując wyniki badań dotyczących wykrywania przeciwciał dla najczęściej występującego w krajowej populacji serotypu *Salmonella Enteritidis*, trzeba mieć na uwadze ich klasę, która, jak podkreślono wcześniej, przydatna jest do interpretacji etapu ewentualnego zakażenia u pacjentów z niesklasyfikowanym i reaktywnym zapaleniem stawów. Najbardziej istotne diagnostycznie kombinacje klas przeciwciał, czyli obecność klasy IgA + IgG + IgM, IgG + IgM lub IgA + IgG, stanowiły tylko 10% wyników dodatnich.

Odmienne wyniki badań serologicznych otrzymano przy wykrywaniu przeciwciał IgA/IgG dla *Chlamydia trachomatis*. Z racji specyfiki infekcji tym drobnoustrojem [14], badano prawie wyłącznie surowice osób dorosłych. Pierwotnym miejscem infekcji jest zwykle błona śluzowa oka lub układu moczowo-płciowego, czym można tłumaczyć wysoki odsetek wyników dodatnich jedynie w klasie IgA (59,4%), która to klasa przeciwciał indukowana jest głównie w infekcjach błon śluzowych. Jednakże *Chlamydia trachomatis* opisywana jest również w chorobach narządu ruchu jako odpowiedzialna za wywoływanie tzw. CT-Arthritis (*Ch. trachomatis-arthritis*) lub SARA (*sexually acquired reactive arthritis*). Z kolei często istnieje możliwość krzyżowych reakcji z *Ch. pneumoniae*, która głównie atakuje błonę śluzową układu oddechowego.

Z uwagi na specyfikę zakażenia krętkami *Borrelia burgdorferi* diagnostyka serologiczna oparta jest na oznaczaniu przeciwciał klasy IgG i IgM. Opisując odpowiedź immunologiczną na zakażenia *B. burgdorferi*, trzeba pamiętać, że jest ona złożona z uwagi na uruchomione liczne reakcje swoiste i nieswoiste [15, 16]. Podobnie jak w większości zakażeń, jako pierwsze pojawiają się przeciwciała klasy IgM, następnie przeciwciała klasy IgG, które stanowią główne immunoglobuliny w walce z patogenami. Jednakże w odróżnieniu od odpowiedzi immunologicznej na większość innych drobnoustrojów, w przypadku zakażenia *B. burgdorferi*, przeciwciała klasy IgM (zwłaszcza anty-OspC), mimo skutecznej terapii, mogą utrzymywać się u niektórych pacjentów przez lata. Nie mogą więc one stanowić jedynego kryterium diagnostycznego potwierdzającego aktualną infekcję. Odpowiedź immunologiczna w klasie IgG może także utrzymywać się długo i dlatego nie służy np. monitorowaniu leczenia, gdyż obecność przeciwciał IgG stwierdza

się niekiedy nawet po 20 latach, nie może być ona zatem wskaźnikiem aktywnego zakażenia.

Diagnostykę boreliozy utrudnia więc interpretacja wyników, tj. niemożność odróżnienia aktywnego zakażenia od zakażenia przebytego w przeszłości, nawet w sytuacji, gdy wykrywane przeciwciała są całkowicie swoiste. Ponadto poziom wykrywanych przeciwciał może nie korelować ze stanem klinicznym pacjenta. Diagnostykę boreliozy utrudnia także występowanie fałszywie dodatnich i fałszywie ujemnych wyników badań serologicznych [15].

Dane dotyczące zwłaszcza wyników dodatnich w teście skriningowym ELISA wskazują na znaczenie wykonywania testów *Western-blotting*, które dzięki zastosowaniu antygenów rekombinowanych zwiększają pewność, że uzyskane wyniki dotyczą wyłącznie swoistych białek, a rozpoznanie boreliozy jest prawidłowe. Co więcej, w wielu przypadkach wykryte białka mogą wskazywać na etap zakażenia oraz w konsekwencji wyeliminować stosowanie niepotrzebnej, długotrwałej (3–4-tygodniowej) antybiotykoterapii.

Analizując surowice pacjentów pobrane na różnych etapach choroby z Lyme, okazało się, że OspC wykazuje szczególnie dobrą reaktywność z surowicami wczesnej fazy infekcji (rumień wędrujący i neuroborelioza) i wspólnie z antygenem p41 jest białkiem immunodominującym w odpowiedzi IgM. Inaczej jest w przypadku antygenów p100 i p18, które są markerami późniejszej odpowiedzi przeciwciał w klasie IgG. Produkcja przeciwciał dla VlsE również dotyczy w głównym stopniu przeciwciał klasy IgG [16].

Niestety negatywny wynik testu *Western-blotting* dla *Borrelia burgdorferi* IgG i/lub IgM nie wyklucza infekcji tym drobnoustrojem. Możemy mieć tutaj do czynienia z nieoznaczalnym poziomem przeciwciał lub zastosowaniem terapii antybiotykowej we wczesnej fazie zakażenia, obniżającej odpowiedź immunologiczną. Dlatego jeśli obraz kliniczny wskazuje na podłoże infekcyjne zapalenia stawów zaleca się powtórzyć badanie po 3–4 tygodniach.

Interpretując wyniki badań serologicznych w kierunku ew. boreliozy, zawsze należy uwzględnić stan kliniczny pacjenta [15, 16]. W przypadku utrzymywania się wyraźnych objawów klinicznych przy stałej seropozytywności istnieje konieczność przeprowadzania narządowej diagnostyki różnicowej w kierunku innych schorzeń o podobnym obrazie klinicznym do stwierdzanego w boreliozie.

W drugiej części pracy analizowano współwystępowanie badanych przeciwciał (tab. III i IV). Celem było przedstawienie skali występowania zjawiska reakcji krzyżowych, świadczących negatywnie o zastosowanych niezwykle czułych metodach ELISA. Nie ulega wątpliwości, że występowanie reakcji krzyżowych stwarza klinicytom wiele kłopotów interpretacyjnych. Często unie-

możliwiają one ustalenie dokładnej diagnozy zapalenia stawów o etiologii infekcyjnej. Tym bardziej potrzebna jest korelacja obrazu klinicznego z uzyskanymi wynikami badań serologicznych.

Wnioski

1. Diagnostyka serologiczna niesklasyfikowanych zapaleń stawów o podejrzewanej etiologii bakteryjnej: *Yersinia* spp., *Salmonella Enteritidis*, *Chlamydia trachomatis*, *Borrelia burgdorferi* jest przydatna z racji opóźnionych objawów klinicznych, ale jednocześnie obarczona wieloma trudnościami interpretacyjnymi. Wynikają one z:
 - częstego wykrywania przeciwciał w jednej klasie, zwłaszcza IgG, które nie mają istotnego znaczenia w diagnostyce chorób infekcyjnych,
 - jednoczesnego współwystępowania przeciwciał dla 2–3 drobnoustrojów, świadczącego o krzyżowej reaktywności, nadkażeniu i/lub odległym kontakcie z patogenem, co m.in. nie upoważnia do zastosowania terapii, np. antybiotykowej,
 - konieczności w licznych przypadkach potwierdzenia wyniku metodami swoistymi, co jednak znacznie zwiększa koszty diagnostyki.
2. Diagnostyka serologiczna niesklasyfikowanych zapaleń stawów wymaga ścisłej korelacji z obrazem klinicznym oraz dokładanie przeprowadzonym wywiadem lekarskim.

Piśmiennictwo

1. Braun J, Kingsley G, Van der Heijde D, et al. On the difficulties of establishing a consensus on the definition of a diagnosis investigations for reactive arthritis. *J Rheumatol* 2000; 27: 2185-2192.
2. Fendler C, Laitko S, Sörensen H, et al. Frequency of triggering bacteria in patients with reactive arthritis and undifferentiated oligoarthritis and the relative importance of the tests used for diagnosis. *Ann Rheum Dis* 2001; 60: 337-343.
3. Sieper J, Rudwaleit M, Braun J, et al. Diagnosing reactive arthritis. Role clinical setting in the value of serologic and microbiologic assays. *Arthritis Rheum* 2002; 46: 319-327.
4. Rihl M, Klos A, Köhler L, et al. Reactive arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2006; 20: 1119-1137.
5. Gaston JS, Lillcrap MS. Arthritis associated with enteric infection. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2003; 17: 219-239.
6. Mäki-Ikola O, Leirisalo-Repo M, Kantele A, et al. Salmonella-specific antibodies in reactive arthritis. *J Infect Dis* 1991; 164: 1141-1148.
7. Toivanen A, Toivanen P. Reactive arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2004; 18: 689-703.
8. Hannu T, Inman R, Granfors K, et al. Reactive arthritis or post-infections arthritis? *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2006; 20: 419-433.
9. Franz JK, Krause A. Lyme disease (Lyme borreliosis). *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2003; 17: 241-264.
10. Sieper J, Braun J. Problems and advances in diagnosis of reactive arthritis. *J Rheumatol* 1999; 26: 1222-1224.
11. Schnarr S, Franz JK, Krause A, et al. Lyme borreliosis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2006; 20: 1099-1118.
12. Isomäki O, Vuento R, Granfors K. Serological diagnosis of salmonella infections by enzyme immunoassay. *Lancet* 1989; 1: 1411-1414.
13. Rudwaleit M, Richter S, Braun J, et al. Low incidence of reactive arthritis following a Salmonella outbreak. *Ann Rheum Dis* 2001; 60: 1055-1057.
14. Kuipers JG, Zeidler H, Köhler L. How does Chlamydia cause arthritis? *Rheum Dis Clin N Am* 2003; 29: 613-629.
15. Witecka-Knysz E, Klimczak M, Lakwa K i wsp. Borelioza: dlaczego diagnostyka jest taka trudna? *Diagn Lab* 2007; 13: 11-13.
16. Chmielewski T, Tylewska-Wierzbanowska S. Borelioza z Lyme, laboratoryjne metody rozpoznawania zakażenia. *Diagn Lab* 2007; 14: 5-7.