

Falszywie ujemne wyniki testów serologicznych w kierunku *Borrelia burgdorferi* jako efekt kompleksemii w przebiegu choroby z Lyme

False-negative results of the serological tests to *Borrelia burgdorferi* as an effect of coplexemia in the course of Lyme disease

STRESZCZENIE

Problem seronegatywności, jeśli chodzi o obecność swoistych przeciwciał dla *Borrelia burgdorferi* (*B. bg.*), dotyczy od około 40% surowic pacjentów z podejrzeniem boreliozy z Lyme — włączając w to pacjentów z potwierdzonymi w wywiadzie incydentami pokąsania przez kleszcza i wystąpieniem objawu patognomonicznego, jakim jest rumień wędrujący (*Erythema migrans*).

Pomimo że dysponujemy szerokim wachlarzem testów bakteriologicznych, serologicznych czy molekularnych (PCR), diagnostyka boreliozy nastręcza wielu trudności i może prowadzić do uzyskiwania wyników zarówno fałszywie ujemnych, jak i fałszywie dodatnich. Przyczyn jest dużo i zostaną uwzględnione w niniejszej pracy.

Praca dotyczy surowic seronegatywnych pod względem przeciwciał anty-*B. bg.* pacjentów, u których wolne przeciwciała anty-*B. bg.*, prawdopodobnie związane przez antygeny bakteryjne, utworzyły krążące kompleksy immunologiczne (CIC).

Celem pracy była analiza CIC pod kątem obecności przeciwciał przeciwko *B. bg.* w surowicach pacjentów trudnych diagnostycznie, u których obraz kliniczny wskazywał na zakażenie krętkiem z rodzaju *B. bg.*

Badania przeprowadzono na surowicach od 107-osobowej grupy pacjentów z podejrzeniem boreliozy. Zastosowano nową metodycznie analizę obecności swoistych przeciwciał dla *B. bg.* Polega ona na wytrącaniu i dysocjacji CIC, a następnie oznaczeniu w uzyskanej frakcji γ przeciwciał swoistych dla *B. bg.*

Karolina Miąskiewicz¹,
Ewa Walczak²,
Katarzyna Roguska³,
Jakub Ząbek³

¹Oddział Chorób Wewnętrznych i Kardiologii

WSzChU św. Anny w Warszawie

²Zakład Anatomii Patologicznej

Instytutu Reumatologii w Warszawie

³Zakład Mikrobiologii i Serologii

Instytutu Reumatologii w Warszawie

Adres do korespondencji:

dr hab. n. med. Jakub Ząbek
Zakład Mikrobiologii i Serologii,
Instytut Reumatologii
im. prof. dr hab. med. Eleonory Reicher
ul. Spartańska 1, 02-637 Warszawa
tel.: (022) 844-30-67

W 74 surowicach (ze 107 badanych), ujemnych w teście ELISA, wykryto metodą *Western-blotting* we frakcji γ aż w 82% obecność przeciwciał swoistych dla *B. bg.* Najczęściej wykrywano przeciwciała dla antygenów: VisE, p100, p41, p39, OspC i p18, co oznacza, że wyniki uzyskane powszechnie stosowaną metodą ELISA należy uważać za fałszywie ujemne i dlatego konieczne jest oznaczanie przeciwciał dla *B. bg.* także we frakcji CIC. Autorzy mają nadzieję, że opracowane przez nich nowe podejście, po niezbędnych dla celów rutynowej diagnostyki uproszczeniach, znajdzie zastosowanie w serodiagnostyce boreliozy i w sposób znaczący zmniejszy liczbę wyników fałszywie ujemnych.

Forum Medycyny Rodzinnej 2011, tom 5, nr 3, 201–209

słowa kluczowe: borelioza z Lyme, krążące kompleksy immunologiczne (CIC), fałszywie-ujemne wyniki testów serologicznych, związanie swoistych dla *Borrelia burgdorferi* przeciwciał w CIC

ABSTRACT

The question of seronegativity, if consider the presence of specific to *B. bg* antibodies, concerns about 40% sera of the patients with suspected borreliosis of Lyme — including patients with confirmed by anamnesis incidents of the thick bite and appearance of the pathognomonic manifestation migrating erythema (*erythema migrans*).

Beside, that we have got a plenty methods to dispose — the bacteriological, serological or molecular (PCR) tests, diagnostic of Lyme borreliosis is still the source of many problems and may lead to even false-negative results, and also false-positive results. There is a plenty of reason for that and they will be taken under consideration in the introduction part.

Presented paper raise the problem of seronegative sera regarding antibodies to *B. bg*, where free antibodies have been probably bound to bacterial antigens, forming circulating immune complexes (CIC).

The goal of the researches was analysis composition of CIC, regarding the presence of antibodies to *B. bg* in sera of patients difficult to diagnosis, where the clinical syndroms strongly suggested the infection with *B. bg. spirochaetae*.

The researches cover group of 107 patients sera with suspected borreliosis. The new methodological approach to analysis of the specific to *B. bg* antibodies was applied. This method based on precipitation and dissociation of CIC, and next an estimation in so prepared g fraction specific for *B. bg.* antibodies.

In 74 sera (from 107 tested), negative in the ELISA test, in 82% of the g fraction specific antibodies to *B. bg.* was estimated with using a Western-blot tests. The most frequently assessed antibodies were directed to antigens: VisE, p100, p41, p39, OspC and p18, what lead to consideration, that results we have got, with using ELISA method, should be considered as a false-negative and because of that is necessary to estimate antibodies to *B. bg.* also in CIC fraction.

Authors can hope, that worked out a new methodological approach, after necessary for routine diagnostic simplification, will be usefull in sero-diagnostics of borreliosis and in a significant way diminishes the amount of false-negative results.

Forum Medycyny Rodzinnej 2011, vol 5, no 3, 201–209

key words: borreliosis of Lyme, circulating immune complexes (CIC), false-negative results of the tests, sequestration of specific *anti-Borrelia* antibodies in CIC

WSTĘP

Borelioza z Lyme jest przenoszona przez kleszcze, przewleklą, wieloukładową chorobą odzwierzęcą, wywoływaną przez krętką *Borrelia burgdorferi* (*B. bg.*). Głównym wektorem *B. bg.* są kleszcze z rodzaju *Ixodes* [1].

Na podstawie objawów klinicznych wyróżniono trzy fazy boreliozy w zależności od czasu trwania zakażenia. W stadium pierwszym choroba zaczyna się po około dwutygodniowym okresie utajenia. **Pierwszym objawem jest rumień wędrujący (*Erythema migrans*) pojawiający się w miejscu ukąszenia przez kleszcza** [2]. Ponadto większość pacjentów skarży się w tym czasie na objawy grypopodobne z bólami stawowo-mięśniowymi.

Druga faza choroby rozpoczyna się po około 2–10 tygodniach od zakażenia. Po spon-tanicznym ustąpieniu rumienia pojawiają się wielorakie manifestacje narządowe [2].

Faza trzecia boreliozy charakteryzuje się przebiegiem przewlekłym (nawet kilkudziesięcioletnim).

Symptomatologia boreliozy jest bardzo bogata, a obraz kliniczny (zwłaszcza początkowo) sugeruje inną przyczynę schorzenia. Nieleczona infekcja krętkiem może doprowadzić do ciężkiego uszkodzenia zajętych narządów, a nawet do śmierci. **Najbardziej typowe jest zajęcie układu nerwowego i serca, zapalenie stawów oraz manifestacje skórne** (pseudochłoniak boreliozowy, przewlekle zanikowe zapalenie skóry).

Obecnie rozpoznanie boreliozy opiera się na danych z wywiadu dotyczących ukąszenia przez kleszcza, wystąpieniu objawów pod postacią rumienia lub grypopodobnych, a także dodatnich wynikach badań serologicznych. Pomimo powszechnie funkcjonującego schematu rozpoznawania boreliozy na podstawie badań serologicznych autorzy spotkali się w swojej praktyce klinicznej z przypadkami seronegatywnej boreliozy potwierdzonej między innymi badaniami histopatologicznymi. Świadczy to o potrzebie pogłębionej diagnostyki serologicznej w za-

sadnionych stanem klinicznym przypadkach podejrzeń infekcji krętkiem *B. bg.*

Dysponujemy szerokim wachlarzem narzędzi diagnostycznych do wykrywania boreliozy. Najszerze zastosowanie jako badanie przesiewowe ma metoda immunoenzymatyczna (ELISA, *enzyme-linked immunosorbent assay*), która niemalże wyparła starszą i mniej swoistą metodę immunofluorescencji pośredniej (IFA, *indirect fluorescent antibody*). ELISA jest metodą wydajną, powtarzalną, ale niepozbawioną wad — obserwuje się dosyć częste reakcje krzyżowe z innymi drobnoustrojami, między innymi krętkami kłły, wirusem Epsteina-Barr czy Ehrlichia [3].

Jako test weryfikacji dodatnich wyników ELISA i IFA stosuje się metodę *Western-blott*. Metoda ta pozwala rozpoznać obecność przeciwciał klas IgM i IgG dla wybranego zestawu antygenów o wysokiej swoistości dla *B. bg.* Jest to metoda kosztowna i trudna w wykonaniu, ale za to cechująca się dużą czułością i swoistością. Jej wadą są różnice w interpretacji wyników przez poszczególne laboratoria oraz niedostateczna ich powtarzalność [4].

Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR, *polymerase chain reaction*) jest metodą cechującą się bardzo dużą czułością i to stanowi zarazem jej największą wadę. W przypadku zanieczyszczenia próbki badanego materiału otrzymujemy wyniki fałszywie dodatnie. Zaletą tej metody jest możliwość stosowania różnorodnego materiału, między innymi biopunktatów skóry, płynu stawowego i płynu mózgowo-rdzeniowego, co pozwala określić miejsce zakażenia w przypadku, gdy występuje tylko lokalna produkcja przeciwciał. Obecnie wprowadzono dwa warianty metody — *Real time PCR* i *Immuno PCR* [5].

Z innych, rzadziej stosowanych metod wypada wymienić badanie bezpośrednie, hodowlę *B. bg.* oraz badanie histopatologiczne (metoda *Warthin Starry*).

Na oddzielne omówienie zasługuje serodiagnostyka neuroboreliozy. Zajęcie układu



Jako test weryfikacji dodatnich wyników ELISA i IFA stosuje się metodę *Western-blott*



Najszerze zastosowanie jako badanie przesiewowe ma metoda immunoenzymatyczna



W praktyce klinicznej należy brać pod uwagę możliwość uzyskania wyników fałszywie dodatnich bądź fałszywie ujemnych

nerwowego manifestuje się zwykle klinicznie po około 2 tygodniach od zakażenia. Śródotponową produkcję przeciwciał zwykle ocenia się w odniesieniu do stężenia tychże przeciwciał w surowicy (R IgG). Ważne jest również określenie stopnia przepuszczalności bariery krew–mózg na podstawie różnicy stężeń albumin w płynie mózgowo-rdzeniowym i surowicy (R Alb). Indeks R Alb/R IgG jest przydatnym narzędziem w interpretacji wyników uzyskanych od pacjentów z podejrzeniem neuroboreliozy.

Dlaczego diagnostyka boreliozy jest zatem tak trudna, skoro dysponujemy bogatym arsenałem badań? Złożoność budowy bakterii oraz jej duża zmienność antygenowa, o której decydują liczne plazmidy, powoduje szereg trudności interpretacyjnych z powodu między innymi indukcji krzyżowo reagujących przeciwciał. W praktyce klinicznej należy brać pod uwagę możliwość uzyskania wyników fałszywie dodatnich bądź fałszywie ujemnych [6]. Najczęstszymi przyczynami wyników fałszywie dodatnich są reakcje krzyżowe, hipergammaglobulinemie — zwłaszcza w przebiegu chorób autoimmunologicznych oraz ograniczenie diagnostyki do testów przesiewowych.

Fałszywie ujemne wyniki mogą być spowodowane zbyt wczesnie przeprowadzoną diagnostyką (podczas gdy pacjent znajduje się jeszcze w tzw. okienku serologicznym), a także mogą występować w przypadku stwierdzonej u chorego dysfunkcji układu immunologicznego, ograniczonej lokalnie produkcji przeciwciał (np. w płynie mózgowo-rdzeniowym) oraz wewnątrzkomórkowego przebywania *B. bg.* Również szeroko rozpowszechnione stosowanie antybiotykoterapii w początkowym stadium choroby może wywołać osłabienie odpowiedzi humoralnej i w rezultacie zafałszowanie wyników badań serologicznych [6].

W niniejszej pracy autorzy skupili się na przypadkach seronegatywnych pacjentów, u których krążące przeciwciała zostały zwią-

zane przez antygeny (prawdopodobnie bakteryjne) i utworzyły krążące kompleksy immunologiczne (CIC, *circulating immune complexes*). Obraz kliniczny najczęściej silnie wskazywał na infekcję krętkiem, pomimo braku jednoznacznego potwierdzenia w wynikach badań.

Analiza krążących CIC pod kątem obecności przeciwciał przeciwko *B. bg.* w trudnych diagnostycznie surowicach (u pacjentów z obrazem klinicznym wskazującym na obecność zakażenia krętkiem) była celem pracy.

MATERIAŁ I METODY

Badania obecności przeciwciał dla antygenów *B. bg.* przeprowadzono na 107 surowicach od pacjentów z podejrzeniem boreliozy skierowanych do Zakładu Mikrobiologii i Serologii Instytutu Reumatologii w latach 2008–2010.

W surowicach oznaczano następujące parametry:

- poziomy przeciwciał przeciwko antygenom *B. bg.* oznaczano metodą ELISA (testem *Borrelia IgG/IgM recombinant*), firmy Biomedica;
- jako test potwierdzenia stosowano test Western-blotting (test *recomLine Borrelia IgG/IgM*), firmy Biomedica, ocenę wyników testu *Western-blotting* wykonywano w oparciu o załączoną do testu sumaryczną skalę oceny (punktową) dla poszczególnych przeciwciał;
- poziom CIC oznaczano metodą ELISA (C1q–CIC kit) firmy Quidel (Stany Zjednoczone);
- frakcję wzbogaconą w CIC uzyskiwano metodą wytrącania glikolem polietylenowym o ciężarze cząsteczkowym 6000 (PEG-6000) według Świerczyńskiej i wsp. [7];
- frakcję γ z osadów PEG-6000 uzyskiwano przez wytrącenie nasyconym roztworem siarczanu amonu w pH 3,5 (stosowanym do dysocjacji CIC) według metody własnej [8], schemat metody przedstawia rycina 1;

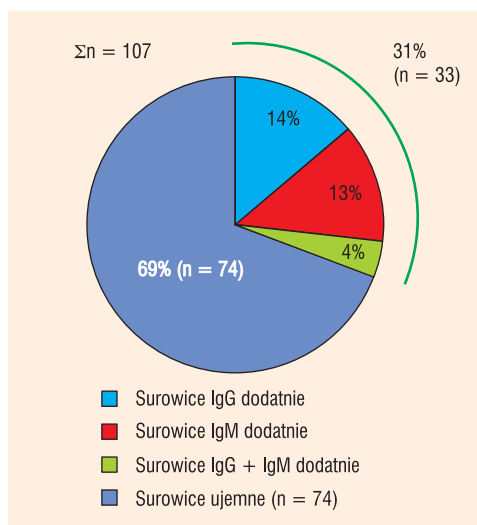
— białko we frakcji γ i osadach PEG-6000 oznaczano spektrofotometrycznie metodą według Kalckara [9].

WYNIKI

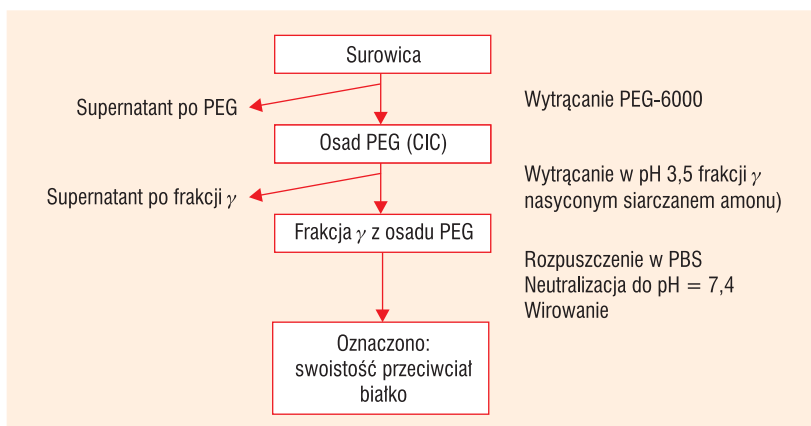
W wyżej opisanych 107 surowicach przysłanych do Zakładu Mikrobiologii i Serologii w latach (2008–2010) w celu oznaczenia przeciwciał dla *B. bg.* z powodu podejrzenia choroby z Lyme (boreliozy) wykonano test ELISA (traktowany jako test przesiewowy), a następnie wykonano w przypadku wyniku pozytywnego (dla którejkolwiek z klas IgM czy IgG) test potwierdzenia metodą *Western-blotting*, w zależności od uzyskanego poziomu przeciwciał dla antygenów *B. bg.* Wynik oznaczeń przedstawia rycina 2.

W 107 badanych surowicach bezpośrednio wynik pozytywny (metodą ELISA) uzyskano dla 31%, w tym w klasie IgG 14%, w klasie IgM 13%, oraz 4% dla klas IgG i IgM. Zgodnie z przyjętą procedurą analityczną dla tych seropozytywnych surowic wykonano test potwierdzenia metodą *Western-blotting*, uzyskując potwierdzenie tylko w odniesieniu do 6 z nich (20%).

W pozostałych 74 surowicach (seronegatywnych w teście ELISA) zastosowano pro-



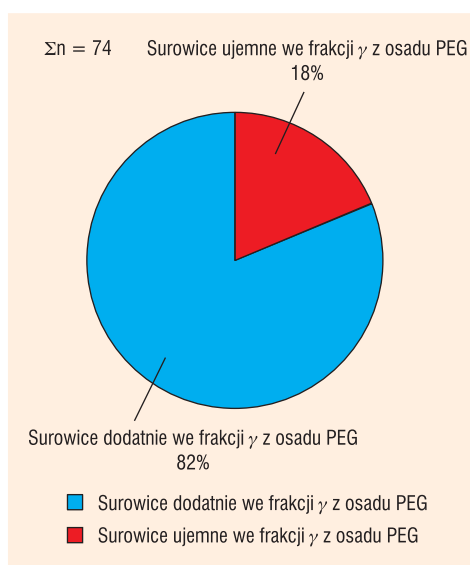
Rycina 2. Częstość występowania przeciwciał dla antygenów *B. bg.* oznaczonych metodą ELISA w grupie 107 surowic dla klasy IgG i IgM



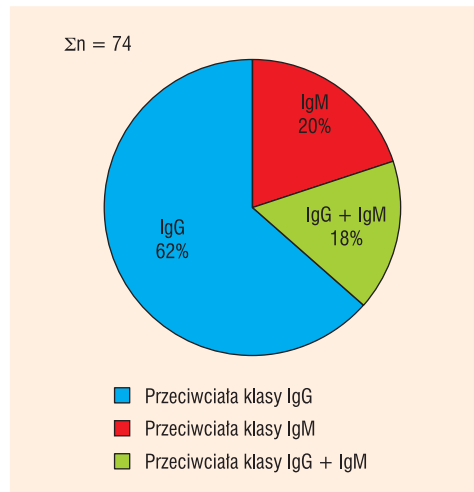
Rycina 1. Metoda wytrącania i dysocjacji surowicznych CIC

cedurę wytrącania frakcji γ z CIC [8]. W tak uzyskanej frakcji oznaczono powtórnie metodą *Western-blotting* obecność przeciwciał dla swoistych antygenów *B. bg.*, zgodnie z obowiązującą metodyką. Obecności swoistych dla *B. bg.* przeciwciał wykonanych metodą ELISA i *Western-blotting* przedstawiają ryciny 3 i 4.

W przypadku 82% frakcji γ z seronegatywnych surowic wykryto obecność swoistych przeciwciał dla *B. bg.*, których ilość i poziomy pozwalały zakwalifikować je jako dodatnie



Rycina 3. Częstość występowania przeciwciał dla antygenów *B. bg.* oznaczonych metodą *Western-blot* w frakcji γ z osadu PEG w grupie 74 surowic seronegatywnych w teście ELISA



Rycina 4. Częstość występowania przeciwciał dla antygenów *B. bg.* różnych klas oznaczanych metodą Western-bloft we frakcji γ w osadzie z osadu PEG w grupie 74 surowic seronegatywnych

(ewentualnie wątpliwe). Pozostałe 18% frakcji γ z osadu PEG było ujemnych bądź wykazywały pojedyncze linie swoiste i nieswoiste, co nie pozwoliło zakwalifikować ich, zgodnie z przyjętymi kryteriami, jako dodatnich.

W grupie dodatnich dla *B. bg.* frakcji γ dominowały przeciwciała w klasie IgG (62%), przeciwciała w klasie IgM występo-

wały w 20%, zaś przeciwciała dla klas IgG + IgM występowały w 18%.

Częstość występowania przeciwciał dla poszczególnych antygenów *B. bg.* klasy IgG i IgM przedstawiono na rycinach 5A i B.

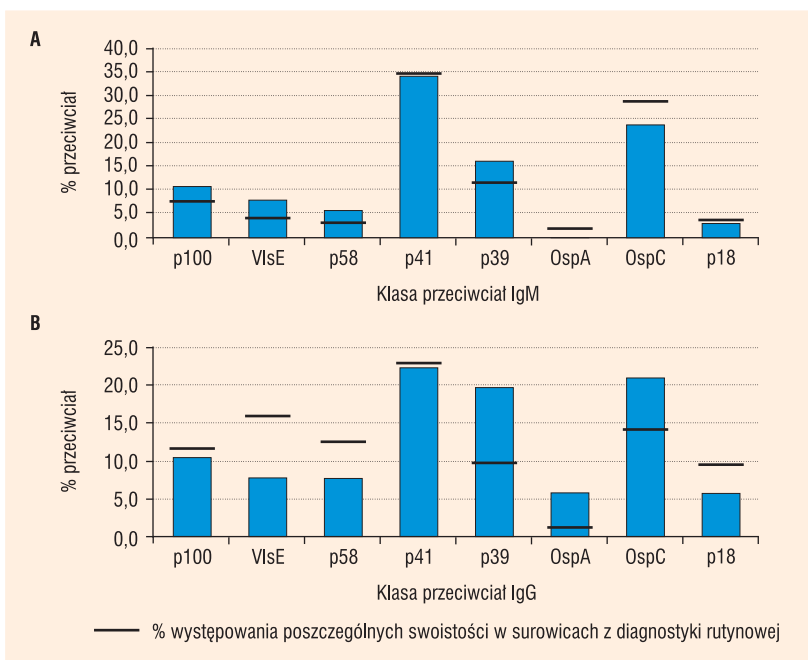
W klasie IgM najczęściej występowały przeciwciała dla antygenów: p41 (34,2%), OspC (23,7%), p39 (15,8%), p100 (10,5%). Częstości występowania pozostałych przeciwciał (VisE, p58, OspA i p18) wahały się w granicach od 2,5% do 7%.

W klasie IgG dominowały, podobnie jak w klasie IgM, przeciwciała dla antygenów: p41 (22,4%), OspC (21%), p39 (19,7%), p100 (10,5%), a częstości przeciwciał dla pozostałych czterech antygenów wahały się od ~5% do 7,5%. Częstości występowania przeciwciał we frakcji γ z osadu PEG dla poszczególnych antygenów *B. bg.* (dla klasy IgM) nie różniły się istotnie od częstości występowania surowiczych przeciwciał, zaś dla klasy IgG istotne różnice (nawet rzędu 30–50%) zaznaczyły się w przypadku przeciwciał dla antygenów VisE, p58, p39 i OspC. Porównano także zależność liczby wyników dodatnich (%) we frakcji γ z osadu PEG-6000 w zależności od ilości białka w tym osadzie, wyniki przedstawiono na rycinie 6.

Uzyskana zależność ma raczej charakter tendencji, a nie silnej korelacji, gdyż odsetek wyników dodatnich w grupie frakcji γ o zawartości białka do ≤ 2 mg/ml wynosił około 60%, a w grupie o najwyższej zawartości białka — powyżej 20 mg/ml wynosił około 100%. Wskazuje to na istotną z punktu widzenia analitycznego zależność odsetka wyników pozytywnych od rzeczywistego stężenia swoistych przeciwciał dla *B. bg.* w CIC, a nie od całkowitego stężenia białka we frakcji γ z osadu PEG, które może być efektem przegęszczenia tejże frakcji w trakcie preparatyki i wytrącania CIC.

DYSKUSJA

Kompleksiemia występująca w surowicach pacjentów towarzysząca wielu schorzeniom,

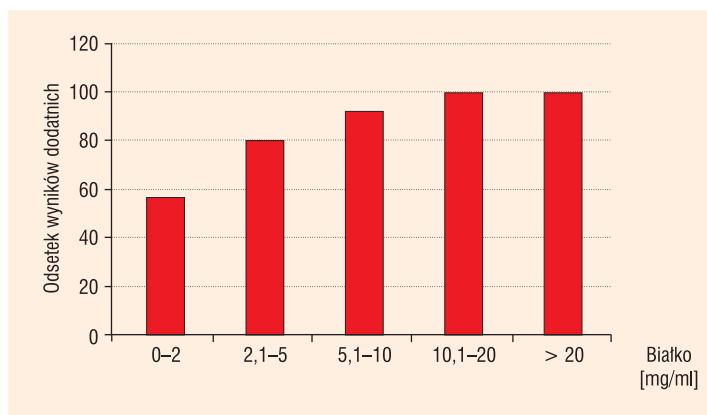


Rycina 5 A, B. Częstość występowania przeciwciał dla poszczególnych antygenów *B. bg.* oznaczanych testem Western-bloft we frakcji γ z osadu PEG (dla klasy IgG i IgM)

między innymi układowym chorobom tkanki łącznej, jest zwykle kojarzona z fazami zaostrzenia procesu podstawowego, jak ma to miejsce na przykład w toczeniu rumieniowatym układowym. Z tym zjawiskiem idzie w parze hipokomplementemia, podwyższenie wskaźników ostrej fazy i wskaźników aktywności choroby oraz zmiana poziomów i awidności autoprzeciwciał [10]. Zbyt mało uwagi zwraca się na fakt, że procesowi zaostrzenia choroby zwykle towarzyszą dwa zjawiska: pierwsze — to wyrzut z zajętych organów/tkanek do krążenia autoantygenów, a drugie — to związanie autoprzeciwciał w krążących kompleksach immunologicznych. Pierwszy fenomen jest niedocenianym na ogół wskaźnikiem aktywnego procesu uszkodzenia tkanek, drugi natomiast prowadzi do neutralizacji krążących autoprzeciwciał, spadku ich mian w surowicach i w konsekwencji do seronegatywności, a właściwie do fałszywie ujemnych wyników testów.

W chorobach o etiologii infekcyjnej (a zwłaszcza w jednostkach, gdzie wykrywalność czynników infekcyjnych metodą klasycznej mikrobiologii, a nawet metodą PCR jest niezadowalająca ze względu na szybkie wnikanie bakterii do różnego typu komórek) seronegatywność jest problemem o znaczeniu podstawowym. Przykład tego typu problemu stanowi diagnostyka boreliozy z Lyme. Krętki *B. bg.* znikają z krążenia po stosunkowo krótkim czasie, zaś wykrywalność surowicznych przeciwciał anti-*B. bg.* w naszym materiale jest rzędu około 17% (przy użyciu standardowej metody ELISA), a odsetek potwierdzeń metodą *Western-blotting* dla klasy IgG wynosi 80%, zaś dla klasy IgM 46% [11].

Analizując możliwe przyczyny seronegatywności pod względem obecności przeciwciał anti-*B. bg.*, uznano, że jednym z powodów może być kompleksemia zaobserwowana w pojedynczych surowicach pochodzących od chorych z boreliozą [12]. Częściowym wyjaśnieniem przyczyn problemów w interpretacji wyników badań serologicz-



Rycina 6. Porównanie częstości wyników dodatnich uzyskanych metodą *Western-blott* w poszczególnych przedziałach stężeń białka we frakcji γ z osadu PEG-6000

nych może być, u niektórych chorych, znaczne opóźnienie serokonwersji lub wiązanie przeciwciał w krążących kompleksach immunologicznych. Taką koncepcję przedstawia wielu autorów [6, 13–15].

Wykonane oznaczenia CIC (metodą C1q — fazy stałej metodą ELISA) na dużej grupie pacjentów (praca przygotowana do druku) nie potwierdziły założenia, iż kompleksemia jest zjawiskiem częstym w boreliozie, gdyż odsetek surowic dodatnich w metodzie ELISA–C1q — fazy stałej wyniósł tylko 19%. Równoczesne wykonywane oznaczenia CIC (metodą wytrącania glikolem polietylenowym o masie cząsteczkowej 6000 Daltonów [8]) wskazywały na obecność kompleksów w większości analizowanych surowic, a analiza składu tego precypitatu potwierdza, iż zawiera on już związane składowe dopełniacza (C1q, C3 i C4). Tłumaczy to niski odsetek wyników w metodzie ELISA z C1q zastosowanej do wykrywania CIC wiążących dopełniacz.

Wyniki oznaczania swoistości wykonane testami *Western-blotting* we frakcji γ w pełni potwierdziły słuszność naszych oczekiwań opartych na doświadczeniach z seronegatywnymi surowicami z przypadków układowych chorób tkanki łącznej [10].

Uzyskane metodą *Western-blotting* potwierdzenia obecności przeciwciał dla *B. bg.*

”
W chorobach o etiologii infekcyjnej seronegatywność jest problemem o znaczeniu podstawowym. Przykład tego typu problemu stanowi diagnostyka boreliozy z Lyme

w 82% surowic ujemnych to wynik bardzo obiecujący, gdyż w sposób radykalny zmniejszamy liczbę surowic, w których uzyskujemy wyniki fałszywie ujemne.

Dodatkowym potwierdzeniem faktu, że przeciwciała anti-*B. bg.* (występujące w CIC) są efektem związania wolnych przeciwciał w krążące kompleksy immunologiczne jest homologia swoistości dla poszczególnych antygenów *B. bg.* w surowicach i we frakcjach γ z tych samych surowic (patrz ryc. 5). Ten zaskakująco dobry wynik jednak niewiele wnosi do naszej wiedzy o strukturze i składzie samych kompleksów, ponieważ ową metodą wytrącamy z surowic nie tylko CIC, ale także agregaty immunoglobulin oraz niektóre makroglobuliny surowicze i stąd należy ona do tak zwanych „nieswoistych — antygenowo” metod wykrywania CIC. Jeśli zatem wykrywamy swoiste przeciwciała dla *B. bg.* we frakcji γ z CIC, należy wnioskować, że przynajmniej część osadu po PEG-6000 stanowią CIC, w których swoiste przeciwciała dla antygenów *B. bg.* związane są bezpośrednio z antygenem *B. bg.* lub z białkami gospodarza, z którymi krzyżowo reagują [15].

Wszystkie wyżej opisane doświadczenia mające na celu wyjaśnienie przyczyn seronegatywności powinny być uzupełnione o analizę składu antygenowego metodami „antygenowo — swoistymi”, to jest takimi, które pozwalają ustalić rzeczywisty skład antygenów występujących w CIC.

Takie postępowanie potwierdziłoby w sposób oczywisty wiarygodność zaproponowanych metod i ze względu na prostotę

metodyczną tego podejścia do analizy składu CIC umożliwiłoby wprowadzenie owej metodyki do diagnozowania surowic „trudnych” z punktu widzenia analitycznego. Będzie to przedmiotem dalszych prac prowadzonych przez nasz Zespół. Gdyby znaleźć w wyżej wymienionych CIC, obok przeciwciał anti-*B. bg.*, także swoiste antygeny tego krętka, pozwoliłoby to określić, czy zakażenie jest w fazie aktywnej. Na razie bowiem nie możemy ustalić fazy zakażenia na podstawie samej obecności przeciwciał (także ich klasy), co jak podkreślają słusznie niektórzy autorzy [6], jest podstawową niedoskonałością najczęściej stosowanych metod serologicznych.

Proponujemy zatem, przyjmując wyżej wymienione założenia, zmianę podejścia do serodiagnostyki boreliozy z Lyme:

- serodiagnostyka boreliozy rozpoczyna się testem przesiewowym (immunofluorescencja pośrednia lub ELISA), a wyniki dodatnie należy potwierdzić testem *Western-blotting*;
- **wynik negatywny testu ELISA nie rozstrzyga o nieobecności choroby z Lyme;**
- możliwa jest sekwestracja przeciwciał w CIC i dlatego wytrącamy je glikolem polietylenowym (PEG-6000) i w osadzie lub we frakcji γ po PEG wykonujemy test *Western-blotting*.

Jeśli zastosujemy wyżej wymienione procedury w 50–80% wyników ujemnych w teście ELISA (jeśli obecne są CIC), uzyskujemy potwierdzenie obecności przeciwciał dla antygenów *B. bg.* we frakcji γ z osadu PEG-6000.

PIŚMIENNICTWO

1. Steere A.C. Lyme disease. *N. Engl. J. Med.* 2001; 345: 115–125.
2. Depietropaolo D.L., Powers J.H., Gill J. i wsp. Diagnosis of Lyme Disease. *Am. Fam. Physician.* 2005; 2: 297–304.
3. Chmielewska-Badora J., Cisak E., Wójcik-Fatla A., Zwoliński J., Buczek A., Dutkiewicz J. Correlation of tests for detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato infection in patients with diagnosed borreliosis. *Ann. Agric. Environ. Med.* 2006; 13: 307–311.

4. Hauser U., Lehnert G., Lobentanzer R., Wilske B. Interpretation criteria for standardized Western blots for three European species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. 1997; 35(6): 1433–1444.
5. Skotarczak B., Wodecka B., Hermanowska-Szpakowicz T. Czulość techniki PCR w wykrywaniu *Borrelia burgdorferi* sensu lato w różnych izolatach. Przegl. Epidemiol. 2002; 56: 73–79.
6. Witecka-Knysz E., Klimczak M., Lakwa K. i wsp. Borelioza: dlaczego diagnostyka jest tak trudna? Diagnosta laboratoryjny. 2007; kwiecień:1–4.
7. Świerczyńska Z., Rdułtowska H., Woźniczko-Ostrowska G. A new method for detection of circulating immune complexes by immunoelectrophoretic analysis. Reumatologia. 1979; 3: 269–277.
8. Gazda A., Ząbek J., Romicka A.M., Wojciechowska B., Pyka J. Występowanie przeciwciał antykardiolipinowych w krążących kompleksach immunologicznych u dzieci z młodzieńczym toczniem rumieniowatym układowym i młodzieńczym idiopatycznym zapaleniem stawów. Pol. Arch. Med. Wewn. 2008; 118 (Suppl): 14–19.
9. Lisowski J. Metody fizykochemiczne stosowane w immunologii. W: Immunologia praktyczna. Słopek S. (red.) PZWL, Warszawa 1970.
10. Palacz A., Ząbek J., Horbacz I., Pyka J. Próba wyjaśnienia przyczyny niepowodzeń w ustaleniu swoistości autoprzeciwciał przeciwjądrowych w surowicach ANA-dodatnich na podstawie analizy poszczególnych swoistości przeciwciał obecnych w krążących kompleksach immunologicznych. Reumatologia. 2011; 49 (1): 16–22.
11. Noworyta J., Brasse-Rumin M., Budziszewska M., Ząbek J. Występowanie, swoistość i krzyżowa reaktywność przeciwciał antybakteryjnych (*Yersinia spp.*, *Salmonella enteritidis*, *Chlamydia trachomatis*, *Borrelia burgdorferi*) oraz ich znaczenie w diagnostyce niesklasyfikowanych zapaleń stawów. Reumatologia. 2011; 49 (1): 32–39.
12. Koprowska-Legatowicz M., Gziut A.I., Jezierski J. i wsp. Borelioza serca — gorzka lekcja, czy spóźniony sukces diagnostyczny? Opis przypadku. Kardiol. Pol. 2007; 65: 1228–1230.
13. Hermanowska-Szpakowicz T., Świerzyńska R., Zajkowska J., Iżycka-Herman A., Pancewicz S., Kondrusik M. Aktualne możliwości diagnostyki boreliozy z Lyme. Pol. Merk. Lek. 2000; 8,43: 69–71.
14. Grzesik P., Oczko-Grzesik B., Kępa L. Objawy kardiologiczne w przebiegu boreliozy z Lyme. Przegl. Epidemiol. 2004; 58: 589–596.
15. Schutzer S.E., Coyle P.K., Belman A.L., Golightly M.G., Drulle J. Sequestration of antibody to *Borrelia burgdorferi* in immune complexes in seronegative Lyme disease. Lancet. 1990; 335: 312–315.