

ANALIZA PRZECIWCIAŁ PRZECIWKO ANTYPENOM „IN VIVO” *BORRELIA BURGDOFFERI* U PACJENTÓW Z BORELIOZĄ STAWOWĄ

Człowiek i Zdrowie Nr I (IV) 2010, 20-27

Małgorzata Koziół¹, Małgorzata Tokarska-Rodak², Maria Koziół-Montewka²

1. Uniwersytet Medyczny w Lublinie

2. Państwowa Szkoła Wyższa im. Papieża Jana Pawła II w Białej Podlaskiej

Streszczenie: Borelioza jest powszechnie występującą na świecie wielonarządową chorobą zakaźną przenoszoną przez kleszcze. Czynnikiem etiologicznym są krętki *Borrelia burgdorferi*. Obraz kliniczny późnej fazy choroby bywa zróżnicowany, a wyniki badań serologicznych niekiedy trudne w interpretacji. Dwuetapowa diagnostyka boreliozy obejmuje test ELISA oraz test potwierdzenia Western-blot. Antypenami powszechnie wprowadzonymi do diagnostyki zakażeń *Borrelia burgdorferi* sensu lato są wysoce specyficzne białka, głównie OspC, OspA p83, p39, p17, a także VlsE wysoce immunogenne białko pojawiające się „in vivo” po transmisji krętka do organizmu człowieka. O ile antypen VlsE występuje w większości testów serologicznych, to pozostałe markery BBA36, BBO323, Crasp3, pG nie są włączone do rutynowej diagnostyki. Antypeny „in vivo” są ważnymi oznacznikami w serologii IgG dla zaawansowanego stadium boreliozy, w związku z czym testy diagnostyczne uwzględniające owe antypeny pozwalają w większym stopniu ocenić reakcję odpornościową, w stosunku do stanu klinicznego pacjenta. Celem niniejszej pracy była ocena występowania w surowicy pacjentów przeciwciał IgM i IgG przeciwko specyficznym antypenom *B.burgdorferi* i antypenom z grupy „in vivo”, zawartych w teście Wester-Blot.

Słowa kluczowe: Borelioza z Lyme, *Borrelia burgdorferi*, Western-blot, antypeny in vivo, VlsE, BBO323

Wstęp

Borelioza z Lyme (Lyme borreliosis), zwana też krętkowicą kleszczową, jest często występującą na świecie przewlekłą, wielonarządową i naśladującą inne schorzenia chorobą zakaźną wywołaną przez krętki *Borrelia burgdorferi*, należące do rodziny *Spirochetaceae* (Talarek 2007).

Ostatnio obserwuje się stałą wzrostową tendencję zachorowań na boreliozę. Jak podaje *Centrum Zwalczenia i Zapobiegania Chorób* (ang. Centers for Disease Control and Prevention- CDC), w Stanach Zjednoczonych, w samym tylko roku 1999 odnotowano 7943 przypadki podczas, gdy rok później 17730 (Depietropaolo 2005). Również w Polsce, według danych *Państwowego Zakładu Higieny*, zapadalność na boreliozę zwiększa się z każdym rokiem i obecnie choroba ta dotyka około 21-22 osób na 100 000 mieszkańców (PZH 2008). Tak szybki wzrost zapadalności na boreliozę prawdopodobnie wynika z rozwoju rekreacji i turystyki, a także częstszej obecności ludzi w miejscach bytowania kleszczy *Ixodes*, które to są przenosicielami zakażenia (Hermanowska-Szpakowicz 2005).

Na terenie Europy kleszcze przenoszą 3 chorobotwórcze dla człowieka genogatunki *Borrelia*: *B.burgdorferi* sensu stricto, *B. afzelii*, *B. garinii*, które określa się wspólnie jako *Borrelia burgdorferi* sensu lato (s.l). Istnieją pewne różnice geograficzne w ich występowaniu i nieco odmienny przebieg kliniczny wywołanego przez nie zakażenia. Ale nie tylko genotyp bakterii decyduje o kierunku rozwoju choroby z Lyme. Ogromny wpływ ma odpowiedź immunologiczna zainfekowanego organizmu, co warunkuje jego zdolność do usunięcia drobnoustroju (Sokalska-Jurkiewicz 2007).

Klasycznie w przebiegu boreliozy wyróżnia się trzy stadia. W pierwszym okresie dominują objawy skórne. Związane są z miejscowym rozprzestrzenianiem krętków i dotyczą pojawienia się obrączkowatej zmiany, zaczerwienienia z przejaśnieniem w środku – rumienia wędrującego (*erythema migrans* – EM), w miejscu lub w pobliżu miejsca ukłucia przez kleszcza. Wywołują go wszystkie genogatunki *B. burgdorferi* s. l. Nie zawsze rumień występuje, ale jeśli się tylko pojawi to świadczy o migracji krętków w skórze i jest wyraźnym wskazaniem do zastosowania kuracji antybiotykowej. U około 1% zakażonych pacjentów pojawia się dolegliwość skórna w postaci niewielkiego, sinoczerwonego guzka – chłoniaka limfocytarnego skóry (*lymphadenosis enigma curtis* – LBC).

W przypadku nie podjęcia leczenia przeciwbakteryjnego, dochodzi do drugiego rozsianego stadium choroby. Bakteria niesiona wraz z krwią, bądź drogą limfocytarną, dostaje się do różnych tkanek, wielu narządów. Może prowadzić do zajęcia układu kostno-stawowego, nerwowego, serca, a niekiedy też oka. Powinowactwo *B.burgdorferi* do komórek nerwowych pociąga za sobą możliwość dalszego rozwoju boreliozy zwanej neuroboreliozą. Nadmienić należy, iż borelioza może przebiegać w sposób nietypowy, a przeprowadzenie wywiadu chorobowego z pacjentem nie zawsze pomaga w rozpoznaniu schorzenia, szczególnie gdy u osób nie wystąpił rumień wędrujący i nie pamiętali oni o kontakcie z kleszczem (Figlarowicz 2006, Garlicki 2007, Hermanowska-Szpakowicz 2005).

Analiza rozprzestrzeniania się bakterii w organizmie dostarczyła informacji o pozakomórkowym przebywaniu krętka we wczesnej fazie choroby. Jego przetrwanie staje się możliwe w miejscach immunologicznie uprzywilejowanych takich jak oko, mózg. Dopiero w późnym i przetrwałym okresie wykazano wewnątrzkomórkowe umiejscowienie patogenu. Potrafi on przeżyć w fibroblastach, komórkach maziówki, śródbłónka i skórze. Będąc w ukryciu jest niedostępny dla komórek układu immunologicznego, stosowanych w leczeniu antybiotyków i łatwo może dojść do przetrwania zakażenia. W określonych warunkach możliwe jest wznowienie choroby, a wykonywane w tym okresie testy serologiczne mogą wykazać wzrost miana immunoglobulin w klasie IgM (Zajkowska 2007).

Zdarza się, że borelioza stanowi poważny problem kliniczny nie tylko ze względu na mało swoiste objawy, ale też trudności diagnostyczne i dużą zmienność samej bakterii. Polimorfizm *Borrelia burgdorferi* wynika z możliwości zmiany białek powierzchniowych i budowy biochemicznej. Wiele antygenów pojawia się i zanika w różnych stadiach choroby, przez co bakteria staje się trudnym przeciwnikiem dla ludzkiego układu immunologicznego (Hermanowska-Szpakowicz 2005, Witecka-Knysz 2007).

Zewnętrzna błona *B. burgdorferi* zawiera wiele różnych białek, co jest przyczyną częstych zmian w budowie płaszcza antygenowego krętka, w zależności od środowiska w jakim bytuje (Tylewska-Wierzbianańska 2005).

W komórce *B. burgdorferi* zidentyfikowano białka, które powszechnie występują w przyrodzie. Możemy zaliczyć tu białka szoku termicznego o masie 60 kDa—HSP 60 (ang. Heat shock proteins), proteiny p66, p68, p71, p73 i wiele innych (Nowalk 2006, Witecka-Knysz 2007, Zajkowska 2007).

Stałym komponentem białkowym krętków jest też flagellina tworząca pochwę osłaniającą rzęskę. Silnymi induktorami reakcji zapalnych są powierzchniowe lipoproteiny Osp (Outer Surface Proteins). Określane są jako czynnik zjadliwości bakterii, bo wykazują zmienną ekspresję. Mają zdolność oddziaływania z komórkami tkanek żywiciela. Spośród tej grupy antygenów główną rolę w zakażeniu odgrywa powierzchniowa lipoproteina C i A. W Europie mamy do czynienia z szesnastoma różnymi serotypami OspC i ośmioma OspA. Możemy zatem mówić o warunkowanej genetycznie antygenowości Outer Surface Proteins wśród poszczególnych gatunków *Borrelia burgdorferi* (Aberer 2007, Tylewska-Wierzbianańska 2005).

U *Borrelia burgdorferi* dochodzi także do ekspresji białek kluczowych dla rozpoznania boreliozy. To tzw. grupa białek „in vivo”, które to ujawniają się dopiero gdy bakteria zmieni środowisko i znajdzie się w organizmie człowieka (Zajkowska 2007).

Wyróżniamy wśród nich białka CRASPs (complement regulator-acquiring surface proteins) odpowiedzialne za inaktywację kaskady układu dopełniacza znajdującego się w surowicy kręgowców. Dzięki czemu, eliminacja *B. burgdorferi* z organizmu gospodarza, poprzez fagocytozę, jest utrudniona (Bykowski 2008).

Borrelia przebywając w zakażonym organizmie człowieka dokonuje ciągłej zmiany swoich antygenów i tak na liniowym plazmidzie lp28-1 dokonuje ekspresji genów odpowiedzialnych za produkcję zmiennej głównej proteiny VlsE (ang. variable major protein-like sequence, expressed). Białko VlsE jest heterogennym polipeptydem o wysokiej immunogenności, ma zdolność modyfikacji sekwencji DNA w wyniku czego organizm, który atakuje bakteria nie jest w stanie wyeliminować czynnika chorobotwórczego. Ponadto VlsE posiada wspólne determinanty antygenowe dla różnych genogatunków *B. burgdorferi* (Liang 2000, Steere 2004).

Białkiem ujawniającym się w trakcie zakażenia *B.burgdorferi* jest też antygen BBO323. Wykazuje konserwowane wysoce immunogenne epitopy i stanowi ważny oznacznik dla zaawansowanych stadiów boreliozy.

W komórce *B. burgdorferi* zidentyfikowano jeszcze wiele białek o różnej masie cząsteczkowej, chociażby BBA66 (~43 kDa), BBI36/38 (~33 kDa). Tak duża ich różnorodność sprawia, że diagnostyka boreliozy nie należy do najłatwiejszych i wymaga wypracowania wiarygodnych standardów postępowania (Nowalk 2006).

Prawidłowe rozpoznanie boreliozy w pierwszej kolejności opiera się o zróżnicowanie podobieństw jej objawów z objawami innych chorób. Koniecznym jest wzięcie pod uwagę pełnego obrazu klinicznego schorzenia i zebranie danych epidemiologicznych poprzez przeprowadzenie wywiadu z pacjentem, a następnie dokonanie oceny parametrów testów laboratoryjnych. Najnowsze zalecenia europejskich i amerykańskich Laboratoriów Referencyjnych, Center for Disease Control and Prevention (CDC) oraz Association of State and Territorial Public Health Laboratory Directors (ASTPHLD) zalecają dwuetapową diagnostykę serologiczną boreliozy, by uzyskać jak najbardziej wiarygodny wynik. Dwustopniowa metoda związana jest z przeprowadzeniem testu skryningowego o mniejszej swoistości i dużej czułości ELISA, po czym wątpliwe i dodatnie wyniki zweryfikować wykonując test metodą immunoblotingu- test Western-blot. Obecnie jednak nie dysponujemy jednoznacznym testem diagnostycznym. W przypadku badań serologicznych ciągle dąży się do skonstruowania testu o optymalnym składzie antygenowym. Dlatego, aby podnieść jakość testów, zwiększając ich czułość i swoistość, dodatkowo wykorzystuje się grupę wysoce immunogennych antygenów „in vivo”. Antygeny te znacznie podnoszą wartość testów serologicznych (Chmielewski 2007, Tylewska-Wierzbowska 2005, Witecka-Knysz 2007).

Cel pracy

Celem pracy była ocena diagnostycznej przydatności testów Western-blot wzbogaconych o antygeny „in vivo” w diagnostyce boreliozy.

Materiały i metody

Do badań wytypowano grupę 50 osób ze stwierdzoną boreliozą. Mieli oni w przeszłości przeprowadzoną dwustopniową diagnostykę serologiczną: test ELISA i test Western-Blot o standardowym panelu antygenowym. Grupa badana obejmowała 22 kobiety (w wieku 24-60 lat) i 28 mężczyzn (w wieku 21-65 lat) leczonych w placówkach służby zdrowia na terenie województwa lubelskiego.

Pacjenci przed wykonaniem badań proszeni byli o wypełnienie ankiety dotyczącej pokłucia przez kleszcze i wystąpienia objawów chorobowych. Pytano o datę pokłucia przez kleszcza, częstość pokłucia i jego związek z wykonywaną pracą zawodową. Badani określali objawy kliniczne (wczesne i późne) i ewentualną antybiotykoterapię.

U wszystkich badanych w surowicy określono poziom przeciwciał IgM i IgG anty *Borrelia burgdorferi*.

Do identyfikacji zakażenia *Borrelia* w badaniu wykorzystano następujący test serologiczny: *Borrelia LINE*, *Linia Immunoblot IgG/IgM*, tylko do diagnostyki *in vitro*, firmy Genzyme Virotech GmbH, którego skład antygenowy poszerzony był o dodatkowe antygeny „in vivo” w klasie IgG: BBA36, BBO323, Crasp3, pG i o antygen EBV w klasie IgM.

Wyniki

ANALIZA DANYCH ANKIETOWYCH UZYSKANYCH OD PACJENTÓW ZE STWIERDZONĄ BORELIOZĄ

Analiza pod względem częstości pokłucia

Jednokrotne pokłucie przez kleszcza deklarowało 16 osób (32%), zaś pozostałe 34 było pokłutych wielokrotnie (68%). Szesnaście osób (32%) z tej grupy wiąże możliwość pokłucia przez kleszcze z wykonywaną pracą zawodową (leśnicy, rolnicy). Badani byli kluci w latach 1980-2008.

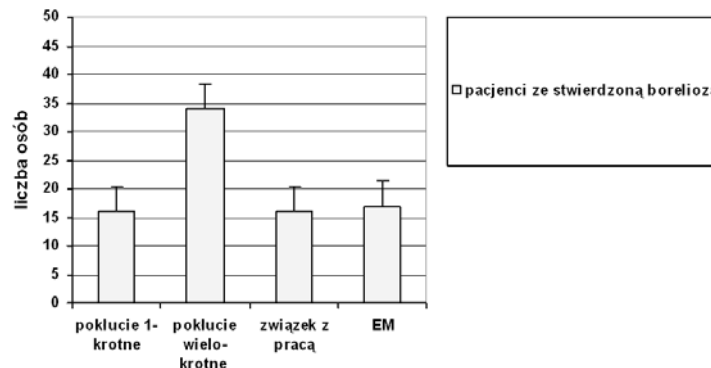
Analiza pod względem występowania rumienia wędrującego (EM)

O wystąpieniu rumienia wędrującego poinformowało 17 osób (34%): 11 (64,7%) klutych jednokrotnie i 6 (35,3%) klutych wielokrotnie. U pozostałych 33 osób (66%) EM nie wystąpił: 5 (15,2%) klutych jednokrotnie, 28 (84,8%) klutych wielokrotnie.

Analiza pod względem obserwowanych dolegliwości i leczenia

Zdecydowana większość pacjentów, bo aż 41 osób (82%), nie zaobserwowała w okresie pierwszych 30 dni od pokłucia objawów chorobowych innych niż EM. Pozostałych 9 badanych odczuwało bóle głowy, bóle kostno-stawowe, bóle mięśni i ogólne osłabienie.

W okresie od 30 dni po pokłuciu 46 (92%) osób informowało o występowaniu z różną częstością bólu głowy, bólów mięśniowych, osłabienia i zaburzeń koncentracji, zapalenia stawów. U niektórych wystąpiły bóle kręgosłupa, sztywność karku, czy utrata równowagi. Wszyscy spośród nich skarżyli się na bóle kostno stawowe, najczęściej stawów barkowych, łokciowych, kolanowych i nadgarstków.



Ryc. 1. Analiza danych ankietowych badanych pacjentów: krotności pokłucia, związku pokłucia z wykonywaną pracą zawodową i wystąpieniem rumienia wędrującego (EM).

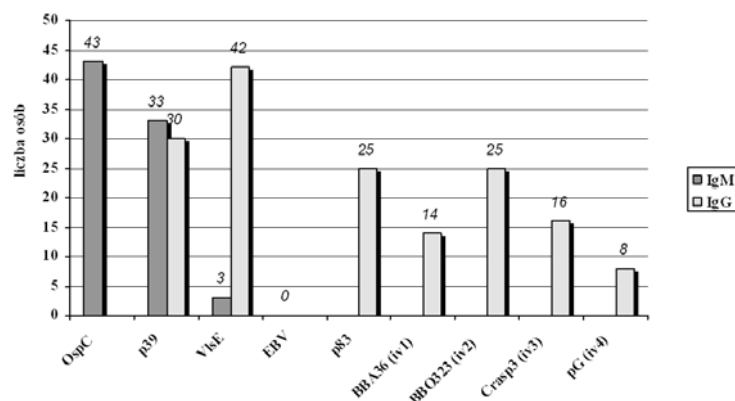
ANALIZA WYNIKÓW BADANIA SEROLOGICZNEGO

Pomimo długotrwałego zakażenia u chorych stwierdzano obecność przeciwciał w klasie IgM skierowanych przeciwko antygenowi OspC (86% badanych), p39 (66% badanych) i VlsE (6% badanych).

Dodatnie wyniki w klasie IgG ze zróżnicowaniem w stosunku do poszczególnych antygenów stwierdzono u 90% pacjentów. Pozostałych 10% stanowiły wyniki ujemne w tej klasie. Najczęściej wykrywano przeciwciała IgG: anti-VlsE u 84%, anti-p39 u 60%, anti-p83 u 50% i BBO323 (iv2) również u 50%.

U pacjentów z różną częstotliwością stwierdzono przeciwciała IgG skierowane przeciwko antygenom BBA36 (iv1), BBO323 (iv2), Crasp3 (iv3), pG (iv4):

- u 5 osób (10%) stwierdzono obecność przeciwciał IgG przeciwko stosowanemu w badaniach pełnemu panelowi antygenowemu: VlsE, p39, p83, BBA36(iv1), BBO323(iv2), Crasp3(iv3), pG(iv4);
- u 16 osób (32%) obok przeciwciał IgG anti VlsE, p39, p83 stwierdzono z różną częstotliwością przeciwciała przeciwko antygenom BBA36, BBO323, Crasp3 i pG;
- u 6 osób (12%) wynik dodatni w klasie IgG stwierdzono na podstawie obecności pasm dla antygeny VlsE lub VlsE / p39 obok jednego lub dwóch białek „in vivo”;
- u 6 osób (10%) pojawiły się tylko przeciwciała przeciwko antygenom VlsE, p39, p83 w kombinacji: VlsE/p39 (u 4 osób), p39/p83 (u 1 osoby), VlsE/p39/p83 (u 1 osoby);
- u 10 osób (20%) w klasie IgG pojawiły się tylko i wyłącznie przeciwciała przeciwko białku VlsE.



Ryc.2. Występowanie przeciwciał klas IgM i IgG przeciwko antygenom *B. burgdorferi* z uwzględnieniem antygenów z grupy „in vivo” u pacjentów z objawami boreliozy stawowej.

Dyskusja

Z roku na rok wzrasta liczba zachorowań na boreliozę z Lyme, chorobę, którą nie bez powodu nazywano Wielkim Naśladowcą (ang. Great Imitator). W swoim fazowym przebiegu, różnorodnej lokalizacji układowej i charakterze objawów klinicznych często sugeruje inne schorzenia, dlatego też borelioza stanowi poważny problem diagnostyczny. Aby mu sprostać, chorobę powinno definiować się w oparciu o 3 aspekty: wywiad chorobowy, obraz kliniczny pacjenta i wyniki badań serologicznych (Depietropaolo 2005, Hermanowska-Szpakowicz 2005).

Istotnym elementem jest staranne przeprowadzenie wywiadu chorobowego wśród pacjentów, co w znacznym stopniu poszerza możliwość prawidłowej diagnozy. Określenie, w dochodzeniu epidemiologicznym, ekspozycji na zakażenie jest współmierne wobec innych kryteriów w rozpoznaniu boreliozy. W przedstawionych badaniach wszyscy pamiętali kontakt z kleszczem, zanim wystąpiły objawy chorobowe. Również pacjenci z rozpoznaną boreliozą, z Oddziału Chorób Zakaźnych Ś. A. M. w Bytomiu i Poradni Chorób Zakaźnych Szpitala Miejskiego Nr 1 Rudzie Śląskiej, w 88% zadeklarowali ukłucie przez kleszcza. Leczeni w Poradni Chorób Zakaźnych Wojewódzkiego Szpitala Specjalistycznego we Wrocławiu zaobserwowali ten fakt w 81,8%, a nieco mniej badanych 74,2%, pochodzących z północno-wschodnich Włoch (Kiewra 2004, Marangoni 2008).

Stwierdzenie ekspozycji na ukłucie kleszczy, które są wektorami *Borrelia burgdorferi*, jest o tyle ważne, iż nie zawsze na skórze pojawia się dermatologiczna zmiana-rumień wędrujący, w związku z czym choroba może niezauważona przejść w kolejne stadium. Jeśli jednak pojawi się EM, wówczas jest on najbardziej wiarygodnym wyznacznikiem rozwijającego się zakażenia (Depietropaolo 2005).

Istnieje pewna zależność pomiędzy pojawieniem się EM, a krotnością pokłucia przez kleszcze. Według W. Zależnego i współpracowników wielokrotność narażenia na kontakt z krętkami *Borrelia burgdorferii* ma wpływ na przebieg kliniczny boreliozy, nie tylko w początkowym stadium (okres, gdy może pojawić się EM). Badając mieszkańców Białowieży, wykazali oni, iż u osób pokłutych jednokrotnie, EM pojawił się u 72%. Natomiast pacjenci pokłuci wielokrotnie deklarowali obecność rumienia w 59% (Zależny 2002). O ile częstość kontaktów z kleszczami nie miała tu aż tak istotnego statystycznie wpływu na częstość pojawienia się EM, o tyle większa zależność zarysowała się w badaniach Kiewry i wsp. Jedynie 27% badanych osób deklarowało wystąpienie EM po wielokrotnym pokłuciu, w stosunku do 73,3% z EM ukłutych jednorazowo przez zakażonego kleszcza (Kiewra 2004).

Borelioza z Lyme to ważna jednostka chorobowa wśród ludzi, których środowiskiem pracy jest miejsce występowania kleszczy będących głównym roznosicielem czynnika chorobotwórczego (leśnicy, rolnicy). Ludzie przebywający w naturalnym środowisku, na obszarach leśnych, łatwiej nabywają infekcje *Borrelia burgdorferi*. Ogromne znacznie odgrywa tu indywidualna wrażliwość gospodarza na zakażenie krętkiem, co w konsekwencji warunkuje dalszy przebieg choroby. Od tego jak wygląda pierwotna postać kliniczna boreliozy, można niejako przewidzieć późniejszy jej rozwój. Flisiak i wsp. wykazują, że zależność ta jest istotna zwłaszcza w odniesieniu do objawów zajęcia narządu ruchu. W swoich badaniach informują o mniejszej liczbie chorych z bólami stawów, jeśli podczas pierwotnej postaci boreliozy z Lyme zauważono obecność EM. U pacjentów bez rumienia, w większości klutych wielokrotnie, objawy stawowe były znacznie bardziej nasilone (Flisiak 2004). Badania te są swoistym potwierdzeniem tych wykonanych dwa lata wcześniej wśród pacjentów z tego samego terenu Polski (Zależny 2002). Podobnie, w prezentowanej pracy, pacjenci ze zdiagnozowaną boreliozą w kwestionariuszach częściej informowali o bólach kostno-stawowych (stawy barkowe, łokciowe, kolanowe).

Zdarza się, że wobec tak wielu zróżnicowanych objawów klinicznych rozpoznanie boreliozy z Lyme nastręcza pewne trudności. Najbardziej wiarygodnym postępowaniem, w identyfikacji zakażeń wywołanych przez *Borrelia burgdorferi*, jest przeprowadzenie rutynowych laboratoryjnych badań serologicznych. Zgodnie z powszechnie przyjętymi standardami wykonuje się dwustopniową diagnostykę boreliozy, czyli test ELISA i kolejno uzyskane, wyniki dodatnie i wątpliwe, weryfikuje się testem Western-blot, aby wyeliminować osoby z wynikiem fałszywie pozytywnym (Chmielewski 2007, Tylewska-Wierzbanowska 2005).

W powszechnie stosowanych testach diagnostycznych wykorzystuje się białka antygenowe, takie jak: OspC (p25), OspA (p31), p39, p83, p21, p17, p41 i zmienną główną lipoproteinę VlsE.

Piśmiennictwo podaje, że we wczesnej boreliozie najważniejsze znaczenie ma odpowiedź organizmu przeciwko zewnętrznemu antygenowi OspC. Jest on uznawany za immunodominujący marker dla wczesnej odpowiedzi immunologicznej (Chmielewski 2007). Analiza wyników pacjentów leczonych w trybie ambulatoryjnym lub szpitalnym w Klinice Chorób Zakaźnych i Neuroinfekcji UM w Białymstoku, ukazała, że osoby z wczesną postacią boreliozy miały w surowicy jedynie w 65% przeciwciała IgM anty-OspC.

Z kolei w grupie ludzi z rozpoznaną rozsianą postacią choroby (boreliozowe zapalenie stawów *Lyme arthritis*) immunoglobuliny te pojawiły się u 75%, a w 90% u pacjentów w zaawansowanym stadium-neuroboreliozie (Zajkowska 2006). W badaniach własnych przeciwciał IgM anty-OspC, u chorych z boreliozą stawową, wystąpiły aż u 86%. W miarę rozwoju choroby, w zaawansowanej fazie, obecność IgM anty-OspC może świadczyć o nasilonej indukcji wczesnej odpowiedzi immunologicznej. Sam Nowalk i wsp. podaje, że u ludzi humoralna odpowiedź wobec OspC wzrasta się w zakażeniu rozsianym i w późnym okresie (Nowalk 2006).

Jak podaje literatura, swoiste przeciwciała IgG anty-p83/100 w surowicy chorego są szczególnie dobrymi markerami w późnym stadium infekcji [26]. W grupie pacjentów z rozpoznaną boreliozą, w badaniach własnych, ich obecność w klasie IgG stwierdzono w 39%. U Glatza M. i wsp. stwierdzili obecność IgG anty-p83/100 średnio dla 29,7% pacjentów (Glatz 2008). Inne doniesienia informują o wystąpieniu IgG anty-p83/100 u 67,5% leśników i 76,6% osób z neuroboreliozą (Zajkowska 2006, Zajkowska 2008).

Do grupy białek pojawiających się, gdy bakteria znajduje się w organizmie – białek „in vivo” należą białka: VlsE, BBA36, BBO323, Crasp3 i pG. Antygeny „in vivo” coraz częściej są uważane za ważne oznaczniki w serologii IgG, szczególnie dla zaawansowanych stadiów boreliozy. Dlatego też test, uwzględniający te antygeny daje znacznie większą możliwość oceny reakcji odpornościowej w stosunku do stanu zdrowia pacjenta.

Zmienna główna proteina VlsE w opinii wielu autorów jest miarodajnym wskaźnikiem serologicznym zakażenia krętkiem *Borrelia burgdorferi*. Przeciwciała anty-VlsE dla IgM i IgG mogą współistnieć zarówno we wczesnych i późnych stadiach boreliozy. Detekcja przeciwciał dla tego białka możliwa jest dla wszystkich patogennych genogatunków *B.burgdorferi* s.l., a uzyskanie wyników fałszywie dodatnich jest 10-krotnie niższe, a niżeli w stosunku do innych antygenów bakterii (Chmielewska-Badora 2006, Liang, Aberer 2000, Zajkowska 2006, Zajkowska 2008).

Wyniki badań własnych obrazują, że przeciwciała IgM anty-VlsE pojawiły się u 3 na 50 osób. Z kolei przeciwciała IgG anty-VlsE były obecne u 42 badanych (84%). U pacjentów ze wschodniej Słowacji przeciwciała klasy IgG dla tego białka wykryto na podobnym poziomie (Lenčáková 2008).

Jak podaje Liang i wsp. u pacjentów z kontynentu europejskiego, u których pojawił się rumień wędrujący (EM), odpowiedzi w klasie IgM przeciwko VlsE, w ogóle nie wykryto, a ta w klasie IgG pojawiła się u 87% osób (Liang, Aberer 2000). Również w pracach innych autorów zwraca się uwagę na to, że antygen VlsE wydaje się być najważniejszym antygenem w klasie przeciwciał IgG zaawansowanego stadium boreliozy (Goettner 2005, Zajkowska 2008).

Aktualnie antygen VlsE jest powszechnie wykorzystywany w konstruowaniu testów serologicznych, natomiast inne białka „in vivo” nie są włączone do rutynowej diagnostyki. Rezultaty badań własnych, w oparciu o testy zawierające panel białek rekombinowanych, pokazują, że wśród immunogennych antygenów najistotniejsze wydaje się białko BBO323. Przeciwciała przeciwko niemu wykryto u 50% osób z rozpoznaną boreliozą stawową. Według innych danych w grupie badanej z *Lyme arthritis* wykryto immunoglobuliny IgG anty-BBO323 u 41,6% osób, a u 56,6% pacjentów z neuroboreliozą i u 72,5% leśników (Zajkowska 2006, Zajkowska 2008).

W świetle tych doniesień można uznać, że antygen BBO323 jest istotny diagnostycznie.

Równie ważnym jest białko Crasp3. Chociaż we własnej pracy przeciwciała anty-Crasp3 wystąpiły tylko u 32% pacjentów cierpiących na dolegliwości stawowe, to jednak w innych grupach badanych pacjentów, wynik diagnostyczny był wyższy: 36,6%, 50% lub 55,5%. Prawdopodobnie seropozytywność w stosunku do tego białka, jest silniejsza w miarę rozwoju choroby, po czym następuje jej spadek na skutek wyciszenia ekspresji Crasp3 na powierzchni *B.burgdorferi*.

U niektórych chorych obserwuje się pojawienie przeciwciał, skierowanych wobec innych antygenów „in vivo”: BBA36, pG. Zarówno badania własne i innych wskazują na niewielki udział tych antygenów w rozwoju choroby. Aczkolwiek miano przeciwciał wobec BBA36 odnotowywane jest częściej w porównaniu do pG. Nie powinno to jednak świadczyć o nieprzydatności tych antygenów, bowiem umieszczenie ich w teście serologicznym, pozwala na monitorowanie przebiegu zakażenia *B.burgdorferi* (Zajkowska 2006, Zajkowska 2008).

Wnioski

1. W odpowiedzi na zakażenie *Borrelia burgdorferi* przeciwciała anty-VlsE są najczęściej produkowanymi przeciwciałami w klasie IgG.
2. W zaawansowanej boreliozie, u chorych może istnieć ciągła indukcja wczesnej odpowiedzi immunologicznej IgM wobec powierzchniowego białka OspC (p25).

3. W testach serologicznych obecność przeciwciał anty-p39, p83 jest uzupełniające w stosunku do ujemnych wyników w grupie antygenów głównych.
4. Wśród antygenów z grupy „in vivo” największe znaczenie diagnostyczne, obok białka VlsE, wykazuje białko BBO323 i Crasp3, będąc wyznacznikiem dla zaawansowanego stadium boreliozy.
5. Antygeny „in vivo” w mniejszym stopniu służą do potwierdzenia diagnostycznego boreliozy, ale mogą wskazywać na aktywny proces zakażenia i mieć związek z występowaniem późnej fazy choroby.

Literatura:

1. Aberer E. (2007), *Lyme borreliosis – an update*. JDDG; 5, 5: 406 – 414.
2. Bykowski T., Woodman M.E., Anne E. Cooley A.E., Brissette C.A., Wallach R., Brade V., Kraiczy P., Stevenson B. (2008), *Borrelia burgdorferi complement regulator-acquiring surface proteins (BbCRASPs): Expression patterns during the mammal-tick infection cycle*. International Journal of Medical Microbiology; 298, 1: 249-256 .
3. Chmielewska-Badora J., Cisak E., Wójcik-Fatla A., Zwoliński J., Buczek A., Dutkiewicz J. (2006), *Correlation of tests for detection of Borrelia burgdorferi sensu lato infection in patients with diagnosed borreliosis*. Annals of Agricultural and Environmental Medicine; 13: 307-311.
4. Chmielewski T., Tylewska-Wierzbanowska S. (2007), *Borelioza z Lyme, laboratoryjne metody rozpoznania zakażenia*. Diagnosta Laboratoryjny; 5, 2 (14): 5-7.
5. Depietropaolo D.L., Powers J. H., Gill J.M., Foy A.J. (2005), *Diagnosis of Lyme Disease*. American Family Physician; 72,2: 297-304.
6. Figlarowicz M. (2006), *Borelioza- pamiątka z wakacji*. Przew. Lek.; 8,(90),56-59.
7. Flisiak R., Zależny W., Prokopowicz D. (2004), *Analiza przebiegu boreliozy w zależności od pierwotnej postaci klinicznej choroby u mieszkańców Białowieży*. Przegl. Epidemiol.; 58: 445-50.
8. Garlicki A. (2007), *Współczesne leczenie boreliozy z Lyme*, Przegląd Epidemiologiczny; 61: 449-456.
9. Glatz M., Fingerle V., Wilske B., Ambros-Rudolph C., Kerl H., Müllegger R.R. (2008), *Immunoblot Analysis of the Seroreactivity to Recombinant Borrelia burgdorferi sensu lato Antigens, Including VlsE, in the Long-Term Course of Treated Patients with Erythema Migrans*. Dermatology; 216: 93-103.
10. Goettner G., Schulte-Spechtel U., Hillermann R., Liegl G., Wilske B., Fingerle V. (2005), *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, 8: 3602–3609.
11. Hermanowska-Szpakowicz T. (2005), *Borelioza z Lyme*. Służba Zdrowia; 51-54, 3452-3455.
12. Kiewra D., Dobracki W., Lonc E., Dobracka B. (2004), *Ekspozycja na ukłucia przez kleszcze a występowanie rumienia wędrującego u pacjentów z boreliozą z Lyme na terenie Dolnego Śląska*. Przegl. Epidemiol.; 58: 281-8.
13. Lenčáková D., Fingerle V., Štefančíková A., Schulte-Spechtel U., Peťko B., Schréter I., Wilske B. (2008), *Evaluation of Recombinant Line Immunoblot for Detection of Lyme Disease in Slovakia: Comparison with Two Other Immunoassays*. Vector-Borne and Zoonotic Diseases; 8, 3: 381-390.
14. 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. (2000): *Antigenic conservation of an immunodominant invariable region of the VlsE lipoprotein among European pathogenic genospecies of B. burgdorferi*. Journal of Infect. Dis.; 182: 1455–1462.
15. Liang F. T., Nowling J.M., Philipp M.T. (2000), *Cryptic and Exposed Invariable Regions of VlsE, the Variable Surface Antigen of Borrelia burgdorferi s.l.* Journal of Bacteriology; 182,12: 3597-3601.
16. Marangoni A., Moroni A., Accardo S., Cevenini R (2008), *Borrelia burgdorferi VlsE antigen for the serological diagnosis of Lyme borreliosis*. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases; 27: 349-354.
17. Nowalk A. J., Gilmore R.D., Jr., Carroll J.A. (2006), *Serologic Proteome Analysis of Borrelia burgdorferi Membrane-Associated Proteins*. Infection and Immunity; 74, 7: 3864–3873.
18. Sokalska-Jurkiewicz M. (2007), *Borelioza*. Służba Zdrowia; 80-83 (3681-3684): 41-44.
19. Steere A.C., Coburg J., Glickstein L. (2004), *The emergence of Lyme disease*. Journal of Clinical Investigation; 113, 8: 1093-1101.
20. Talarek E., Duszczek E. (2007), *Borelioza*. Medycyna Rodzinna; 1: 13-16.
21. Tylewska-Wierzbanowska S., Chmielewski T. (2005), *Diagnostyka serologiczna boreliozy z Lyme- wytyczne europejskie*. Post. Mikrobiol.; 44, 3: 289-293.

22. Witecka-Knysz E., Klimczak M., Lakwa K., Zajkowska J., Pancewicz S., Kondrusik M., Grzegorzczuk S., Świerzbńska R., Hermanowska-Szpakowicz T. (2007), *Borelioza: dlaczego diagnostyka jest taka trudna?* Diagnosta Laboratoryjny; 5, 1 (13): 11-13.
23. Zajkowska J., Kondrusik M., Pancewicz S., Grygorczuk S., Świerzbńska R., Hermanowska-Szpakowicz T., Czeczuga A., Sienkiewicz I. (2006), *Test Western Blot z białkiem VlsE oraz antygenami „in vivo” w diagnostyce boreliozy z Lyme.* Przegl. Epidemiol.; 60:177-185.
24. Zajkowska J., Kondrusik M., Grygorczuk S., Pancewicz S., Iżycka A. (2008), *The usefulness of ‘in vivo’ antigens in the diagnosis of human Lyme borreliosis.* International Journal of Medical Microbiology 298; S1: 361-364.
25. Zajkowska J.M., Pancewicz S.A. (2007), *Wybrane aspekty patogenezy i diagnostyki neuroboreliozy.* Polski Przegląd Neurologiczny; 3, 2: 116-122.
26. Zaleźny W., Flisiak R., Prokopowicz D. (2002), *Ekspozycja na kleszcze a przebieg kliniczny boreliozy z Lyme u mieszkańców Białowieży.* Przegl. Epidemiol.; 56: 419-24.

Strony internetowe:

1. http://www.pzh.gov.pl/oldpage/epimeld/2008/M_08_12B.pdf
Państwowy Zakład Higieny. Meldunki o zachorowaniach na choroby zakaźne i zatruciach w Polsce w 2008 roku.

ANALYSIS OF ANTIBODIES AGAINST “IN VIVO” ANTIGENS OF *BORRELIA BURGDOFFERI* IN PATIENTS WITH LYME ARTHRITIS**Człowiek i Zdrowie Nr I (IV) 2010, 28-35****Małgorzata Koziół¹, Małgorzata Tokarska-Rodak², Maria Koziół-Montewka²**

1. Medical University of Lublin

2. Pope John Paul II University in Biała Podlaska

Abstract: Borreliosis is a common multi-organ tick-borne chronic infectious disease whose incidence has been reported world-wide. An etiological factor of this disease are spirochaetes of *Borrelia burgdorferi*. The clinical picture of its late stage happens to be diversified, whereas results of serodiagnostics – sometimes difficult to interpret. Two-stage diagnostics of borreliosis includes ELISA test and Western-blot confirmation test. Antigens commonly introduced in the diagnostics of *Borrelia burgdorferi* sensu lato infections are highly specific proteins, including mainly OspC, OspA p83, p39, and p17, as well as VlsE – a highly immunogenic protein appearing “in vivo” after spirochete transmission into a host’s body. As far as the VlsE antigen occurs in most of the serological tests, the other markers, e.g. BBA36, BBO323, Crasp3, and pG, are not commonly applied in routine diagnostics. The “in vivo” antigens are important markers in IgG serology of the advanced stage of borreliosis, owing to which diagnostic tests with these antigens enable more explicit evaluation of the immune response in respect of the clinical condition of a patient. The study reported in this manuscript was aimed at evaluating patients sera for the occurrence of IgM and IgG antibodies against specific antigens of *B. burgdorferi* and “in vivo” group antigens contained in the Western blot test.

Key words: Lyme borreliosis, *Borrelia burgdorferi*, Western-blot, “in vivo” antigens, VlsE, BBO323

Introduction

Borreliosis of Lyme (Lyme borreliosis), also referred to as Lyme disease, is a frequently occurring worldwide, chronic, multi-organ, mimicking other ailments, disease induced by spirochaetes of *Borrelia burgdorferi*, belonging to the family *Spirochetaceae* (Talarek 2007).

A steadily increasing tendency of borreliosis incidence has been observed recently. As reported by the Centers for Disease Control and Prevention (CDC), in the United States of America in the year 1999 alone the number of borreliosis cases accounted for 7943, whereas a year later the number of cases increased drastically to 17,730 (Depietropaolo 2005). In Poland – as stated by the National Institute of Hygiene (PZH) – the incidence of borreliosis has been observed to increase year by year and currently to affect ca. 21 – 22 persons per 100,000 inhabitants (PZH 2008). Such a rapid growth in borreliosis incidence is likely to be due to development of recreation and tourism as well as due to increasing presence of men in habitats of *Ixodes* ticks that are transmitters of infection (Hermanowska-Szpakowicz 2005).

On the area of Europe, ticks are transmitting 3 genospecies of *Borrelia* being pathogenic to man, i.e.: *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. afzelii*, and *B. garinii*, which are collectively referred to as *Borrelia burgdorferi* sensu lato (s.l.). They differ slightly in geographical occurrence and in the clinical course of infection they induce. But not only the genotype of bacteria is determining the direction of Lyme disease development. Of key impact is also the immunological response of an infected organism, which determines its capability for removing the pathogen (Sokalska-Jurkiewicz 2007).

Classically, three stages are distinguished in the course of borreliosis. The first stage is predominated by skin symptoms which are linked with the local expansion of the spirochaetes and refer to the appearance of a circular lesion in the form of a reddening with clearing in the centre – the so-called migratory erythema

(*erythema migrans* - EM), at the site or near the site of tick bite. It is induced by all genospecies of *B. burgdorferi* s.l. The EM does not develop in each case, but when it does it indicates the migration of the spirochaetes in the skin and thus the need for applying antibiotic therapy. Ca. 1% of patients suffer from skin ailment in the form of a small blue-red tuberculum – lymphocytic dermal lymphoma (*lymphadenosis enigma curtis* - LBC).

Once the antibacterial therapy is not undertaken, there occurs the second stage of disseminated infection. The bacteria being transferred either with bloodstream or with the lymphocytic route, reach different tissues and a number of organs. This may lead to the infection of the osteoarticular system, nervous system, cardiac muscle, and sometimes even an eye. The affinity of *B. burgdorferi* to neurones affords the possibility of further development of borreliosis referred to as neuroborreliosis. Worthy of notice is that the course of borreliosis may be atypical, and that an interview with a patient does not always help in reaching diagnosis, especially when there was no migratory erythema and when the patient did not remember having contact with a tick (Figlarowicz 2006, Garlicki 2007, Hermanowska-Szpakowicz 2005).

An analysis of bacteria dissemination in the body has provided information on the extracellular presence of the spirochaete at the early stage of disease. Its survival is becoming feasible at immunologically-privileged sites, including an eye or brain. The intracellular location of the pathogen was possible already at the late stage and persistent stage of the disease. It is capable of surviving in fibroblasts, cells of the synovial membrane, endothelium and skin. When cryptic it is unavailable to cells of the immune system and antibiotics used in therapy, and thus the infection may easily become persistent. Under specified conditions, the disease is likely to recur, and serological tests conducted in that period may indicate an increased titre of IgM class immunoglobulins (Zajkowska 2007).

Borreliosis happens to pose a severe clinical problem not only due to its little specific symptoms, but also to diagnostic difficulties and great variability of the bacteria itself. The polymorphism of *Borrelia burgdorferi* results from the possibility of changing surface proteins and biochemical structure. A number of antigens are appearing and vanishing at different stages of the disease, thus the bacteria is becoming a strong opponent to the human immune system (Hermanowska-Szpakowicz 2005, Witecka-Knysz 2007).

The outer membrane of *B. burgdorferi* is constituted by a variety of proteins, which is the reason of frequent changes in the structure of an antigen capsid of the spirochaete depending on the environment it colonizes (Tylewska-Wierzbanowska 2005).

A cell of *B. burgdorferi* has been identified to contain proteins that commonly occur in nature, including: heat shock proteins with molecular weight of 60 kDa (HSP 60), p66, p68, p71, p73 proteins and many others (Nowalk 2006, Witecka-Knysz 2007, Zajkowska 2007).

A permanent protein component of the spirochaetes is also flagellin which forms a sheath covering a cilium. Strong inducers of inflammatory reactions are outer surface proteins (Osp). They are claimed to be indicators of bacteria virulence, for they exhibit variable expression. They are capable of interacting with cells of host tissues. Out of this group of antigens, the key role in infection is ascribed to surface proteins C and A. Interestingly, sixteen different serotypes of OspC and eight serotypes of OspA have been identified to occur in Europe. Hence, we may say about genetically-determined antigenicity of Outer Surface Proteins amongst individual species of *Borrelia burgdorferi* (Aberer 2007, Tylewska-Wierzbanowska 2005).

Another group of bacteria expressed in *Borrelia burgdorferi* are these being of key significance to the diagnosis of borreliosis. They are the so-called "in vivo" group proteins that reveal themselves only when the pathogen changes the environment and reaches host body (Zajkowska 2007).

They include CRASPs (complement regulator-acquiring surface proteins) which are responsible for the inactivation of complement system cascade in the serum of vertebrates. This hinders elimination of *B. burgdorferi* from a host body through phagocytosis (Bykowski 2008).

Whilst inhabiting an infected human body, the *Borrelia* constantly changes its antigens, and thus on the linear plasmide lp28-1 it expresses genes responsible for the production of variable major protein-like sequences, expressed VlsE. The VlsE protein is a heterogenous polypeptide of high immunogenicity able to modify the DNA sequence, as a result of which the organism invaded by the bacteria is incapable of eliminating the pathogenic factor. In addition, VlsE possesses common antigen determinants for different genospecies of *B. burgdorferi* (Liang 2000, Steere 2004).

A protein exposing itself during *B. burgdorferi* infection is also BBO323 antigen which exhibits preserved highly immunogenic epitopes and constitutes a significant marker of advanced stages of borreliosis.

The cell of *B. burgdorferi* has been identified to contain a variety of other proteins with different molecular weight, just to mention BBA66 (~43 kDa), or BBI36/38 (~33 kDa). Such a great variety of proteins makes the diagnostics of borreliosis an uneasy task requiring reliable standards of procedures (Nowalk 2006).

The proper diagnosis of Lyme disease is firstly based on diversifying the similarities of its symptoms with those of other diseases. To this end, the full clinical picture of the disease should be considered and epidemiological data should be collected through an interview with a patient, and finally parameters of laboratory tests should be evaluated. The up-to-date guidelines of the European and American Reference Laboratories, Center for Disease Control and Prevention (CDC) as well as Association of State and Territorial Public Health Laboratory Directors (ASTPHLD) recommend a two-stage serological diagnostics of borreliosis in order to achieve the most reliable result. The two-stage method involves a screening test with lower specificity and high sensitivity – ELISA, followed by the immunoblot confirmation test for doubtful and positive results – Western-blot test. Today, however, there is no single, explicit diagnostic test. In the case of serodiagnostics, scientists are still striving to construct a test with the optimal antigen composition. Therefore, in order to increase the quality of tests, i.e. their sensitivity and specificity, use is additionally made of the group of highly immunogenic “in vivo” antigens. These antigens have been reported to significantly increase the value of serological tests (Chmielewski 2007, Tylewska-Wierzbowska 2005, Witecka-Knysz 2007).

Study objective

The objective of this study was to evaluate diagnostic usability of Western-blot tests enriched with “in vivo” antigens in diagnostics of borreliosis.

Material and methods

A group of 50 patients with diagnosed borreliosis was selected for the study. They have in the past undergone the two-stage serological diagnosis: ELISA test and Western-blot test with a standard antigen panel. The group examined included 22 women (at the age of 24- 60 years) and 28 men (at the age of 21-65 years) treated in health care facilities at the area of the Lubelskie Province.

Prior to examinations, the patients were asked to complete a questionnaire referring to the history of tick bites and the occurrence of disease symptoms. Questions were asked about the date and number of tick bites and any connection between being bitten and profession performed. In addition, the patients described clinical symptoms (early and late) and antibiotic therapy, if any.

Sera of all patients were determined for the level of IgM and IgG antibodies against *Borrelia burgdorferi*.

Borrelia infection was identified with the following serological test: *Borrelia LINE, Linia Immunoblot IgG/IgM, tylko do diagnostyki in vitro*, by Genzyme Virotech GmbH, whose antigen composition was extended with additional “in vivo” antigens in the IgG class: BBA36, BBO323, Crasp3, pG, and with EBV antigen in the IgM class.

Results

ANALYSIS OF QUESTIONNAIRE DATA COLLECTED FROM PATIENTS WITH DIAGNOSED BORRELIOSIS (figure 1)

Analysis in terms of the number of bites

A single bite by a tick was declared by 16 patients (32%), whereas the other 34 patients (68%) were bitten several times. Sixteen persons (32%) from that group were linking the possibility of being bitten by ticks with their profession (foresters, farmers). The patients were bitten by ticks in the years 1980-2008.

Analysis in terms of the incidence of migratory erythema (EM)

The incidence of migratory erythema was confirmed by 17 patients (34%): including 11 (64.7%) who have been bitten once, and 6 (35.3%) who have been bitten several times. The EM did not develop in the other 33 patients (66%), including 5 (15.2%) declaring a single bite, and 28 (84.8%) declaring multiple bites.

Analysis in terms of observed ailments and therapy

The majority of patients, i.e. as many as 41 persons (82%), did not observe disease symptoms other than EM within the first 30 days after bite. The other 9 patients were suffering from headaches, osteoarticular pains, muscular pains and general weakness.

After that period (i.e. more than 30 days after bite), 46 patients (92%) were informing on the occurrence (with various frequency) of headaches, muscular pains, weakness and concentration disorders, as well as arthritis. Other patients declared the occurrence of spinalgia, neck stiffness or loss of balance. All of them were complaining about osteoarticular pains, usually of the shoulder, elbow, knee and wrist joints.

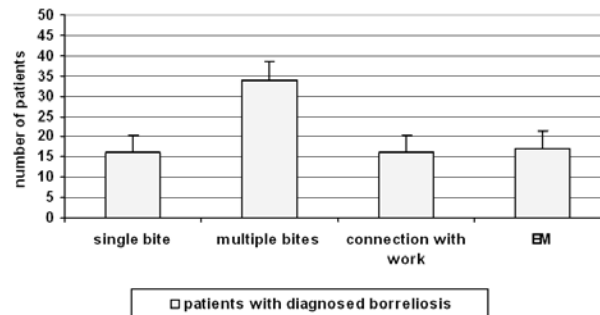


Fig. 1. Analysis of questionnaire data collected from patients for: number of bites, connection of being bitten with profession performed and incidence of migratory erythema

ANALYSIS OF THE RESULTS OF SEROLOGICAL TESTS (figure 2)

Despite long-lasting infections, the presence of IgM class antibodies against OspC (86% of patients), p39 (66% of patients) and VlsE (6% of patients) was confirmed in patients' sera.

Positive results in the IgG class, with differences noted for particular antigens, were confirmed in 90% cases. The other 10% were negative results in this class. The IgG antibodies were detected the most frequently, i.e.: anti-VlsE in 84%, anti-p39 in 60%, anti-p83 in 50% and BBO323 (iv2) also in 50% of the patients.

- In addition, the analyses demonstrated – with a various frequency – the presence of IgG antibodies against antigens BBA36 (iv1), BBO323 (iv2), Crasp3 (iv3), and pG (iv4):
- in 5 patients (10%) the analyses enabled detecting the presence of IgG antibodies against the total antigen panel used in the study: VlsE, p39, p83, BBA36(iv1), BBO323(iv2), Crasp3(iv3), and pG(iv4);
- in 16 patients (32%), apart from IgG antibodies against anti-VlsE, p39, p83, the analyses confirmed the presence (with various frequency) of an antibody against: BBA36, BBO323, Crasp3 and pG antigens;
- in 6 patients (12%) the positive result in the IgG class was noted based on the presence of bands for VlsE or VlsE / p39 antigen next to one or two “in vivo” proteins;
- in 6 patients (12%) the analyses detected only antibodies against VlsE, p39, p83 antigens in the following combinations: VlsE/p39 (in 4 patients), p39/p83 (in 1 patient), and VlsE/p39/p83 (in 1 patient);
- in 10 patients (20%), in the IgG class the analyses demonstrated only and exclusively the presence of antibodies against VlsE protein.

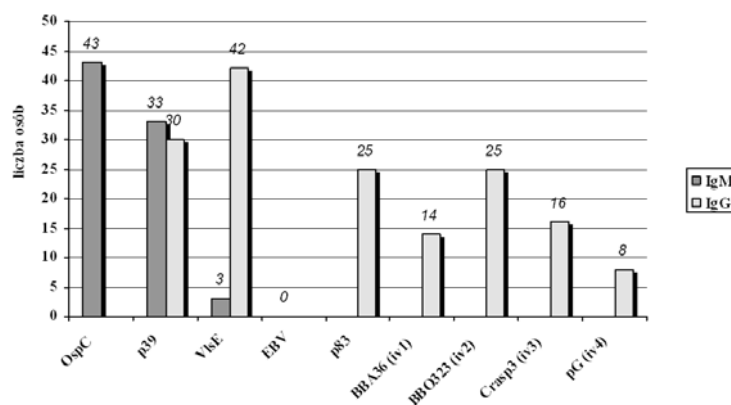


Fig. 2. The occurrence of IgM and IgG class antibodies against antigens of *B. burgdorferi*, including “in vivo” group antigens, in patients with symptoms of Lyme arthritis

Discussion

The incidence of Lyme borreliosis – a disease not without reason called a Great Imitator, has been observed to increase with each year. With its stage-like course, various systemic localization and character of clinical symptoms, it often mimics other diseases, therefore borreliosis poses a severe diagnostic problem. In order to cope this problem, the disease should be defined based on 3 aspects: medical history of the disease, clinical picture of patient and results of serological tests (Depietropaolo 2005, Hermanowska-Szpakowicz 2005).

A crucial element extending the possibility of correct diagnosis is also careful medical interview with a patient. In the epidemiological inquiry, the identification of exposure to infection is commensurate to other criteria taken into account in Lyme disease diagnostics. In the reported study, all patients remembered having contact with a tick before the disease symptoms appeared. Also 88% of the patients with diagnosed borreliosis, treated at the Ward of Infectious Diseases, the Silesian Medical Academy in Bytom, and at the Outpatient Clinic of Infectious Diseases, Municipal Hospital No. 1 in Ruda Śląska, declared to have been bitten by a tick. The fact of being bitten by a tick was additionally confirmed by 81.8% of the patients treated at the Outpatient Clinic of Infectious Diseases, Provincial Specialist Hospital in Wrocław, and by a slightly lower number, i.e. 74.2% of patients from the north-eastern Italy (Kiewra 2004, Marangoni 2008).

The determination of exposure to bites of ticks, which are vectors of *Borrelia burgdorferi*, is important inasmuch as the dermatological lesion in the form of a migratory erythema does not always develop in patients, thus the disease may unspotted progress into a successive stage. If, however, the EM does appear, then it is the most reliable indicator of a developing infection (Depietropaolo 2005).

Some dependency between EM development and the number of bites has been reported as well. According to W. Zaleźny and co-workers, the multiplicity of exposure to contacts with spirochaetes of *Borrelia burgdorferi* affects the clinical course of borreliosis not only in the early stage (i.e. when EM is likely to emerge). When investigating inhabitants of Białowieża, these authors demonstrated that the EM developed in 72% of the patients who had been bitten one time, and in 59% of the patients who declared to have been bitten a few times (Zaleźny et al. 2002). As far as the frequency of having contact with tick had no statistically significant effect on the frequency of EM appearance, yet a higher correlation was observed in a study by Kiewra et al. Only 27% of patients declared EM development after multiple bites, in contrast to 73.3% of patients – after a single bite by an infected tick (Kiewra 2004).

Lyme borreliosis is an important disease entity amongst men whose work place is simultaneously a habitat of ticks, being the major transmitters of the pathogenic factor (foresters, farmers). People working in the natural environment, afforested areas in particular, are more exposed to *Borrelia burgdorferi* infections. Of great significance in this case is the individual susceptibility of a host to infection with a spirochaete, which consequently determines further course of the disease. The primary clinical form of borreliosis enables predicting its successive development. Flisiak et al. emphasize that this dependency is especially important when symptoms affect the motion apparatus. They additionally report on a lower number of patients with arthralgia, if EM was observed in the primary form of Lyme borreliosis. In turn, in the patients without EM, the majority of whom suffered from multiple bites, the articular symptoms were considerably more severe (Flisiak 2004). Results of this study are a specific confirmation of these achieved two years earlier amongst patients from the same area of Poland (Zaleźny 2002). Likewise in the reported study, when completing questionnaires the patients with diagnosed borreliosis were informing more frequently about osteoarticular pains (referring to shoulder, elbow and knee joints).

In view of so diversified clinical symptoms of Lyme borreliosis, its diagnosis happens to pose some difficulties. The most reliable procedure in the identification of *Borrelia burgdorferi*-induced infections is the application of routine laboratory serological analyses. Following the commonly adopted standards, two-stage diagnosis of borreliosis involves ELISA followed by Western-blot test in the case of positive and doubtful results in order to eliminate patients with a negative result (Chmielewski 2007, Tylewska-Wierzbanowska 2005).

The commonly applied diagnostic tests are based on antigen proteins, including: OspC (p25), OspA (p31), p39, p83, p21, p17, p41 and changeable major lipoprotein VlsE.

Reference data indicate that in the early stage of borreliosis of key significance is organism response to the outer antigen OspC. It is acknowledged to be an immunodominant marker of the early immune response (Chmielewski 2007). An analysis of results of patients subjected to either first-aid or hospital treatment at the Clinic of Infectious Diseases and Neuroinfections of the Medical University in Białystok, demonstrated that IgM anti-OspC antibodies occurred in blood sera of only 65% of the patients. In turn, in patients with diagnosed disseminated form of the disease (Lyme arthritis) these immunoglobulins appeared

in 75% cases, whereas in these with the advanced stage of the disease – neuroborreliosis – in 90% cases (Zajkowska 2006). In our study, the IgM anti-OspC antibodies were detected in as many as 86% of the patients with Lyme arthritis. With disease progressing, the presence of IgM anti-OspC antibodies at its advanced stage may indicate enhanced induction of the early immune response. Even Nowalk et al. report that in men, the humoral response to OspC is observed to enhance in the disseminated infection and in the later stages (Nowalk 2006).

According to literature data, IgG anti-p83/100 specific antibodies in blood serum of a patient are especially good markers of the late stage of infection (Zalężny et al. 2002). In the reported study, these antibodies were detected in 39% of the patients with diagnosed borreliosis. In turn, Glatz et al. demonstrated the presence of IgG anti-p83/100 in 29.7% of patients, on average (Glatz 2008). Other reference data report on the occurrence of IgG anti-p83/100 in 67.5% of foresters and 76.6% of patients with neuroborreliosis (Zajkowska 2006, Zajkowska 2008).

The group of proteins appearing when the pathogen colonizes the body, the so-called “in vivo” proteins, includes: VlsE, BBA36, BBO323, Crasp3 and pG proteins. The “in vivo” antigens are increasingly often acknowledged as important markers in IgG serology, especially in the advanced stages of borreliosis. Hence, a test including these antigens affords a considerably greater possibility of evaluating the immune response in respect of the health status of a patient.

In the opinion of numerous authors, the changeable major protein VlsE is a reliable serological marker of infection with *Borrelia burgdorferi* spirochaete. The IgM and IgG anti-VlsE antibodies may co-exist both in the early and in the late stages of borreliosis. Detection of antibodies against that protein is feasible for all pathogenic genospecies of *B. burgdorferi* s.l., and the number of falsely positive results achieved is 10 times lower than in the case of other antigens of this bacteria (Chmielewska-Badora 2006, Liang, Aberer 2000, Zajkowska 2006, Zajkowska 2008).

Results obtained in our study show that IgM anti-VlsE antibodies appeared in 3 out of 50 patients examined. In turn, IgG anti-VlsE antibodies were detected in 42 patients (84%). In patients from eastern Slovakia, the IgG class antibodies against that protein were at a similar level (Lenčáková 2008).

As reported by Liang et al., in patients from the European continent who developed the migratory erythema (EM), no response against VlsE in was detected in the IgM class, whereas in the IgG class the immune response against VlsE was reported in 87% of cases (Liang, Aberer 2000). Also other authors emphasize that the VlsE antigen seems to be the key antigen in the class of IgG antibodies in the advanced stage of borreliosis (Goettner 2005, Zajkowska 2008).

Currently, the VlsE antigen has been commonly applied in the construction of serological tests, whereas other “in vivo” proteins are not included into the routine diagnostics. Results of our study, achieved based on tests containing the panel of recombinant proteins, indicate that amongst the immunogenic antigens of key significance seems to be the BBO323 protein. Antibodies against that protein were detected in 50% of the patients with diagnosed Lyme arthritis. According to other data, in a group of patients with Lyme arthritis immunoglobulins IgG anti-BBO323 were detected in 41.6% cases, whereas in patients with neuroborreliosis – in 56.6% cases, and in foresters – in 72.5% cases (Zajkowska 2006, Zajkowska 2008).

In view of these data, the BBO323 antigen may be found significant for diagnostic purposes.

Of great importance is also Crasp3 protein. Though in our study anti-Crasp3 antibodies occurred in as few as 32% of the patients suffering from articular ailments, in the other groups of patients the diagnostic result was higher, i.e. 36.6%, 50% or 55.5%. It is likely that seropositivity to this protein is enhancing along with disease progression, and afterwards diminishes as a result of suppressed Crasp3 expression on the surface of *B. burgdorferi*.

In some patients analyses demonstrated that appearance of antibodies against other “in vivo” antigens: BBA36, and pG. Both our study and these of other authors indicate, however, a small contribution of these antigens in disease development. Yet the titre of antibodies against BBA36 is reported more frequently than in the case of pG. This shall, however, not be indicative of lesser usability of these antigens, for their inclusion into the serological test enables monitoring the course of *B. burgdorferi* infection (Zajkowska 2006, Zajkowska 2008).

Conclusions

1. In response to *Borrelia burgdorferi* infection, the anti-VlsE antibodies are the most frequently produced antibodies in the IgG class.

2. In the advanced stage of borreliosis, continuous induction of the early immune response of IgM against surface protein OspC (p25) may be observed in patients.
3. In serological tests the presence of anti-p39, p83 antibodies is complementary in respect of the negative effects in the group of major antigens.
4. In the "in vivo" group antigens, apart from the VlsE protein, the greatest diagnostic significance is attributed to BBO323 and Crasp3 proteins being markers of the advanced stage of borreliosis.
5. The "in vivo" antigens are less useful for the diagnostic confirmation of borreliosis, but they may indicate the active process of infection and be linked with the incidence of the late stage of the disease.

References:

1. Aberer E. (2007), *Lyme borreliosis – an update*. JDDG; 5, 5: 406 – 414.
2. Bykowski T., Woodman M.E., Anne E. Cooley A.E., Brisette C.A., Wallach R., Brade V., Kraiczy P., Stevenson B. (2008), *Borrelia burgdorferi complement regulator-acquiring surface proteins (BbCRASPs): Expression patterns during the mammal-tick infection cycle*. International Journal of Medical Microbiology; 298, 1: 249-256 .
3. Chmielewska-Badora J., Cisak E., Wójcik-Fatla A., Zwoliński J., Buczek A., Dutkiewicz J. (2006), *Correlation of tests for detection of Borrelia burgdorferi sensu lato infection in patients with diagnosed borreliosis*. Annals of Agricultural and Environmental Medicine; 13: 307-311.
4. Chmielewski T., Tylewska-Wierzbanowska S. (2007), *Borelioza z Lyme, laboratoryjne metody rozpoznania zakażenia*. Diagnosta Laboratoryjny; 5, 2 (14): 5-7.
5. Depietropaolo D.L., Powers J. H., Gill J.M., Foy A.J. (2005), *Diagnosis of Lyme Disease*. American Family Physician; 72,2: 297-304.
6. Figlarowicz M. (2006), *Borelioza- pamiątka z wakacji*. Przew. Lek.; 8,(90),56-59.
7. Flisiak R., Zależny W., Prokopowicz D. (2004), *Analiza przebiegu boreliozy w zależności od pierwotnej postaci klinicznej choroby u mieszkańców Białowieży*. Przegl. Epidemiol.; 58: 445-50.
8. Garlicki A. (2007), *Współczesne leczenie boreliozy z Lyme*, Przegląd Epidemiologiczny; 61: 449-456.
9. Glatz M., Fingerle V., Wilske B., Ambros-Rudolph C., Kerl H., Müllegger R.R. (2008), *Immunoblot Analysis of the Seroreactivity to Recombinant Borrelia burgdorferi sensu lato Antigens, Including VlsE, in the Long-Term Course of Treated Patients with Erythema Migrans*. Dermatology; 216: 93-103.
10. Goettner G., Schulte-Spechtel U., Hillermann R., Liegl G., Wilske B., Fingerle V. (2005), *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, 8: 3602–3609.
11. Hermanowska-Szpakowicz T. (2005), *Borelioza z Lyme*. Służba Zdrowia; 51-54, 3452-3455.
12. Kiewra D., Dobracki W., Lonc E., Dobracka B. (2004), *Ekspozycja na ukłucia przez kleszcze a występowanie rumienia wędrującego u pacjentów z boreliozą z Lyme na terenie Dolnego Śląska*. Przegl. Epidemiol.; 58: 281-8.
13. Lenčáková D., Fingerle V., Štefančíková A., Schulte-Spechtel U., Peňko B., Schréter I., Wilske B. (2008), *Evaluation of Recombinant Line Immunoblot for Detection of Lyme Disease in Slovakia: Comparison with Two Other Immunoassays*. Vector-Borne and Zoonotic Diseases; 8, 3: 381-390.
14. 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. (2000): *Antigenic conservation of an immunodominant invariable region of the VlsE lipoprotein among European pathogenic genospecies of B. burgdorferi*. Journal of Infect. Dis.; 182: 1455–1462.
15. Liang F. T., Nowling J.M., Philipp M.T. (2000), *Cryptic and Exposed Invariable Regions of VlsE, the Variable Surface Antigen of Borrelia burgdorferi s.l.* Journal of Bacteriology; 182,12: 3597-3601.
16. Marangoni A., Moroni A., Accardo S., Cevenini R (2008), *Borrelia burgdorferi VlsE antigen for the serological diagnosis of Lyme borreliosis*. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases; 27: 349-354.
17. Nowalk A. J., Gilmore R.D., Jr., Carroll J.A. (2006), *Serologic Proteome Analysis of Borrelia burgdorferi Membrane-Associated Proteins*. Infection and Immunity; 74, 7: 3864–3873.
18. Sokalska-Jurkiewicz M. (2007), *Borelioza*. Służba Zdrowia; 80-83 (3681-3684): 41-44.
19. Steere A.C., Coburg J., Glickstein L. (2004), *The emergence of Lyme disease*. Journal of Clinical Investigation; 113, 8: 1093-1101.
20. Talarek E., Duszczek E. (2007), *Borelioza*. Medycyna Rodzinna; 1: 13-16.

21. Tylewska-Wierzbanowska S., Chmielewski T. (2005), *Diagnostyka serologiczna boreliozy z Lyme-wytyczne europejskie*. Post. Mikrobiol.; 44, 3: 289-293.
22. Witecka-Knysz E., Klimczak M., Lakwa K., Zajkowska J., Pancewicz S., Kondrusik M., Grzegorzczuk S., Świerzbńska R., Hermanowska-Szpakowicz T. (2007), *Borelioza: dlaczego diagnostyka jest taka trudna?* Diagnosta Laboratoryjny; 5, 1 (13): 11-13.
23. Zajkowska J., Kondrusik M., Pancewicz S., Grygorczuk S., Świerzbńska R., Hermanowska-Szpakowicz T., Czeczuga A., Sienkiewicz I. (2006), *Test Western Blot z białkiem VlsE oraz antygenami „in vivo” w diagnostyce boreliozy z Lyme*. Przegl. Epidemiol.; 60:177-185.
24. Zajkowska J., Kondrusik M., Grygorczuk S., Pancewicz S., Iżycka A. (2008), *The usefulness of ‘in vivo’ antigens in the diagnosis of human Lyme borreliosis*. International Journal of Medical Microbiology 298; S1: 361-364.
25. Zajkowska J.M., Pancewicz S.A. (2007), *Wybrane aspekty patogenezy i diagnostyki neuroboreliozy*. Polski Przegląd Neurologiczny; 3, 2: 116-122.
26. Zaleźny W., Flisiak R., Prokopowicz D. (2002), *Ekspozycja na kleszcze a przebieg kliniczny boreliozy z Lyme u mieszkańców Białowieży*. Przegl. Epidemiol.; 56: 419-24.

Web pages:

1. http://www.pzh.gov.pl/oldpage/epimeld/2008/M_08_12B.pdf
Państwowy Zakład Higieny. Meldunki o zachorowaniach na choroby zakaźne i zatruciach w Polsce w 2008 roku.