

OCENA POZIOMU PRZECIWCIAŁ PRZECIWKO SPECYFICZNYM BIAŁKOM ANTYGENOWYM BORRELIA BURGDORFERI S.L. U OSÓB ZAWODOWO NARAŻONYCH NA POKŁUCIE PRZEZ KLESZCZE W PÓŁNOCNO-WSCHODNIM REJONIE WOJEWÓDZTWA LUBELSKIEGO

Małgorzata Tokarska-Rodak^{1,2}, Maria Kozioł-Montewka^{1,2},
Dorota Plewik³, Adam Szepełuk³, Justyna Paszkiewicz², Anna Pańczuk²

¹Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

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

³Centrum Badań Nad Innowacjami, Państwowa Szkoła Wyższa im. Papieża Jana Pawła II w Białej Podlaskiej

Tokarska-Rodak M., Kozioł-Montewka M., Plewik D., Szepełuk A., Paszkiewicz J., Pańczuk A. (2013), *Ocena poziomu przeciwciał przeciwko specyficznym białkom antygenowym Borrelia burgdorferi s.l. u osób zawodowo narażonych na pokłucie przez kleszcze w północno-wschodnim rejonie województwa lubelskiego*. Człowiek i Zdrowie, 2 (VII), s. 19-25

Streszczenie:

Cel pracy: celem pracy było oznaczenie przeciwciał IgM/IgG skierowanych przeciwko białkom antygenowym *Borrelia* u leśników i rolników oraz osób nie narażonych zawodowo na pokłucie przez kleszcze w północno-wschodnim rejonie województwa lubelskiego.

Materiał i metody: grupę badaną stanowiły osoby szczególnie narażone na pokłucie przez kleszcze jak leśnicy, rolnicy (275 osób), oraz grupa kontrolna - 45 osób mieszkających w okolicach Białej Podlaskiej. Oznaczono IgM/IgG anty-*Borrelia* (Elisa, Wb) oraz wykonano badania ankietowe.

Wyniki: obecność IgM/IgG anty-*Borrelia* wykazano u 44,73% badanych, zaś brak przeciwciał stwierdzono u 28,10% leśników i 27,01% rolników. U 95,5% osób grupy kontrolnej nie stwierdzono obecności IgM/IgG anty-*Borrelia*, co świadczy o braku zakażenia mimo, że 41,86% z nich informuje o pokłuciu wielokrotnym, a 46,51% o pokłuciu jednokrotnym.

Wnioski: pokłucia przez kleszcze dominują w miesiącach letnich, jednak możliwe są również wczesną wiosną i późną jesienią. Rumień wędrujący występuje częściej u osób wielokrotnie kłutych przez kleszcze niż u osób kłutych jednokrotnie.

Słowa kluczowe: borelioza, *Borrelia burgdorferi*, diagnostyka boreliozy

Wstęp

Borelioza jest chorobą występującą zarówno w Europie, Azji jak i Ameryce Północnej. Na wystąpienie chorób odkleszczowych, w tym boreliozy, w sposób szczególny narażone są osoby przebywające na terenach o dużym stopniu zalesienia z racji wykonywanej pracy zawodowej – leśnicy, osoby pracujące przy wyrębie i nasadzeniach drzew, transporcie drewna oraz rolnicy.

Pierwotną przyczyną boreliozy jest zawsze zakażenie krętkami należącymi do kompleksu *B. burgdorferi* sensu lato, lecz kliniczny przebieg choroby tylko w pewnym stopniu zależny jest od genogatunku bakterii i ich liczby (Sigal 1997, Kisand 2007). Rozprzestrzenianie krętków w organizmie człowieka jest procesem złożonym, zachodzącym dzięki licznym przystosowaniom i mechanizmom umożliwiającym przetrwanie bakterii w tkankach (Krajczyk i in., 2008, Siegel i in., 2012). Odpowiedź immunologiczna skierowana przeciwko białkom antygenowym *Borrelia* zachodzi w organizmie osoby zakażonej w sposób niezwykle dynamiczny i bardzo złożony. Pojawienie się krętków *Borrelia* jest sygnałem do uruchomienia wrodzonych mechanizmów obronnych już w momencie ich wnikięcia do organizmu człowieka w czasie pokłucia przez zakażone kleszcze. Następuje aktywacja układu dopełniacza, lizozymu, działanie komórek fagocytujących, komórek cytotoksycznych (Mączka 2010).

Odpowiedź humoralna rozwija się później. Przeciwciała IgM anty-*Borrelia* wytwarzane są w organizmie człowieka w odpowiedzi na obecność białek antygenowych bakterii w 2-4 tygodniu od zakażenia osiągając szczyt w 4-6 tygodniu. Jako pierwsze wytwarzane są przeciwciała klasy IgM anty-OspC i anty-p41. U większości pacjentów z aktywną boreliozą poziom przeciwciał IgM maleje po około 4 miesiącach. Już około 4 tygodnia od zakażenia w surowicy zaczynają pojawiać się przeciwciała IgG. W klinicznie zaawansowanej boreliozie czy ostrej neuroboreliozie seropozytywność IgM/IgG wzrasta do 70-90%. W okresie tym odpowiedź immunologiczna może być wyrażona w stosunku do kilku antygenów. European Concerted Action on Lyme Borreliosis (EUCALB) oraz Center for Disease Control and Prevention (CDC) zalecają dwustopniową diagnostykę serologiczną boreliozy. Jako normę przyjęto, że rozpo-

Adres do korespondencji: Małgorzata Tokarska-Rodak, Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, Chodźki 1, 20-093 Lublin, e-mail: rodak@vp.pl.

znanie każdej z postaci klinicznych choroby, z wyjątkiem wczesnych zmian skórnych typu rumienia wędrującego (EM), wymaga dwuetapowego postępowania diagnostycznego. W pierwszym etapie należy wykazać obecność swoistych przeciwciał IgM i/lub IgG (w zależności od fazy choroby) metodami immunoenzymatycznymi (IFA lub ELISA). W drugim etapie, należy wykonać oznaczenie techniką Western-blot (Wb) (CDC 2011, EUCALB 2011). Dwuetapowy schemat diagnostyczny pozwala na eliminację nieswoistych wyników fałszywie dodatnich, które zdarzają się z różną częstotliwością przy diagnostyce jednym testem oraz umożliwia jednoznaczną ocenę przy interpretacji wyników granicznych. Według obowiązujących w Europie wytycznych testy serologiczne określające poziom przeciwciał IgM/IgG anty-*Borrelia burgdorferi* nie powinny być wykorzystywane do oceny skuteczności leczenia. Skuteczność antybiotykoterapii wdrożonej w celu eliminacji zakażenia krętkami *Borrelia* należy oceniać wyłącznie na podstawie dynamiki obrazu klinicznego (EUCALB 2011, Flisiak i in., 2011, Chmielewska-Badora i in., 2006).

Celem pracy było oznaczenie przeciwciał IgM i IgG skierowanych przeciwko białkom antygenowym *Borrelia* u leśników i rolników oraz osób nie narażonych zawodowo na pokłucie przez kleszcze w północno-wschodnim rejonie województwa lubelskiego.

Materiał i metody

Grupy badane

Grupa I - 275 osób z czego: 171 osób (62,41%) stanowili leśnicy i pracownicy leśni Nadleśnictw Biała Podlaska, Chotyłów, Międzyrzec Podlaski, Parczew, Radzyń Podlaski zaś 104 osoby (37,59%) to rolnicy i zbieracze runa leśnego mieszkający na terenie w/w nadleśnictw. Badani, to osoby w wieku od 19 do 86 lat, w tym 85 kobiet (20-64 lat) co stanowi 30,91% grupy badanej i 190 mężczyzn (19-86 lat) co stanowi 69,09% grupy badanej.

Grupa II - (grupa kontrolna) - 45 osób w wieku od 20 do 58 lat mieszkających stale lub czasowo na terenie endemicznego występowania boreliozy (okolice Białej Podlaskiej woj. lubelskie). Grupę stanowiło 25 kobiet (20-53 lata) i 20 mężczyzn (20-58 lat).

U wszystkich osób wykonano badania przesiewowe testem Elisa (Euroimmun) w kierunku obecności w surowicy przeciwciał IgM i IgG anty-*Borrelia*. Wszystkie wyniki pozytywne i graniczne uzyskane w badaniu przesiewowym potwierdzono testem Western blot (Euroimmun).

Stosowane testy

Test Elisa

Test Elisa stosowany jest jako test przesiewowy służący do ilościowego oznaczenia poziomu przeciwciał IgM i IgG anty-*Borrelia* w surowicy. W niniejszych badaniach wykorzystano testy Elisa firmy Euroimmun. Studzienki reakcyjne mikropłytki opłaskzczone były ekstraktem antygenów *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii* i białkiem rekombinowanym VlsE *Borrelia burgdorferi*. Test wykonywano zgodnie z rekomendacjami producenta.

Test potwierdzenia Western blot

Stosowano test potwierdzenia Western blot (Wb) firmy Euroimmun do jakościowego oznaczenia ludzkich przeciwciał IgM i IgG przeciwko antygenom *Borrelia*. W teście Wb źródłem antygenów był szczep *Borrelia afzelii*. Białka z ekstraktu *Borrelia* rozdzielone elektroforetycznie na żelu poliakrylamidowym według ciężarów molekularnych i przeniesione na membranę celulozową. Paski testowe zawierały białka antygenowe: p83, p41, p39 (Bmp A), p31 (Osp A), p30, p25 (Osp C), p21, p19, p17. Dodatkowo każdy z pasków zawierał chip membrany z rekombinowanym antygenem VlsE. Test wykonywano zgodnie z rekomendacjami producenta. Interpretacji testu dokonywano za pomocą programu EuroLinescan (Euroimmun).

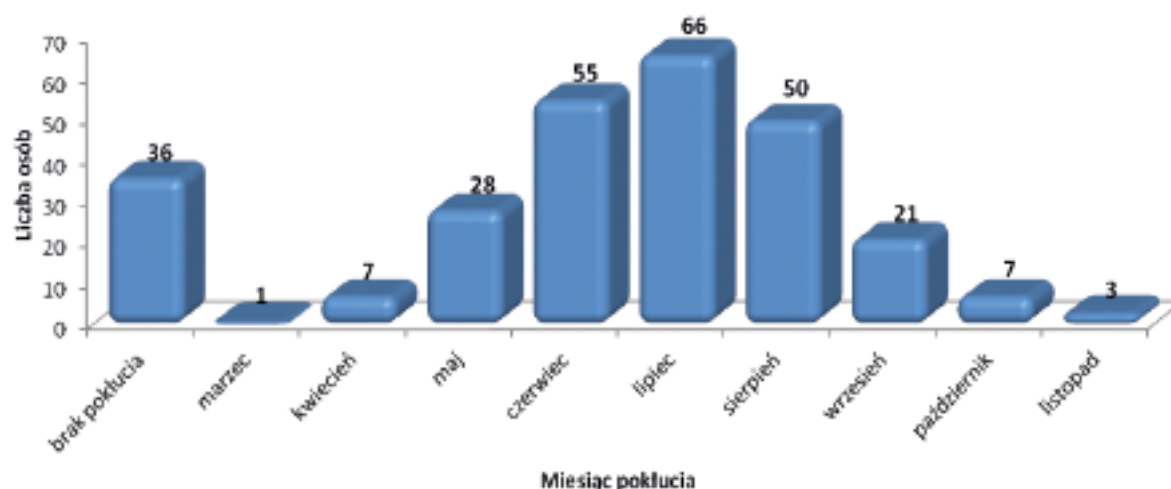
Badania ankietowe

Wśród osób badanych grupy I (leśnicy, rolnicy, zbieracze runa leśnego) i grupy II (grupa kontrolna) przeprowadzono ankietę, która zawierała pytania dotyczące zaobserwowanych przez badanych pokłuć przez kleszcze, krotkości pokłucia, wystąpieniu lub braku obecności rumienia wędrującego, występowania subiektywnych objawów, które badani mogli wiązać z faktem pokłucia przez kleszcze.

Wyniki

Leśnicy i rolnicy

Spośród badanych leśników i rolników 13,1% nie zauważyło faktu pokłucia przez kleszcze. Najwięcej badanych deklaroowało pokłucie w miesiącach letnich - czerwcu, lipcu i sierpniu odpowiednio 20%, 24% i 18%. Dziesięć procent (10%) badanych informuje o pokłuciu w maju zaś 7% we wrześniu. Interesujący wydaje się fakt, iż leśnicy informują o pokłuciu wczesną wiosną, w kwietniu (2,5%) i marcu (0,36%) oraz późną jesienią, w październiku (2,5%) i listopadzie (1,1%). Rycina 1a przedstawia deklarowany przez badanych miesiąc pokłucia przez kleszcze.



Rycina 1a. Deklarowany przez badanych leśników i rolników miesiąc pokłucia przez kleszcze

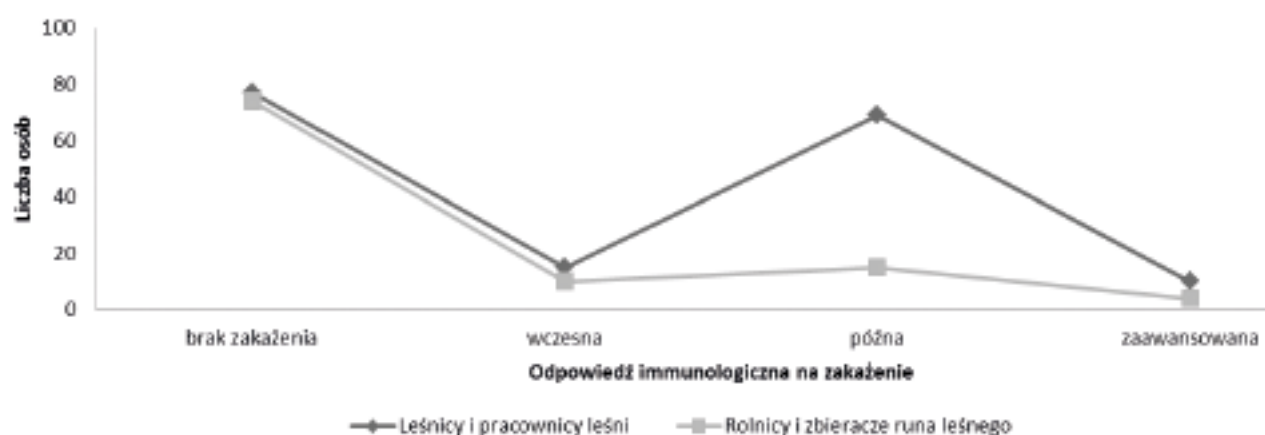
W oparciu o wyniki uzyskane w badaniach wykonanych testem Elisa i testem potwierdzenia Western blot brak przeciwciał IgM/IgG anty-*Borrelia* stwierdzono u 77 leśników (28,10%) i 74 rolników (27,01%) co stanowi łącznie 152 osoby (55,27%). Badani są zawodowo narażeni na pokłucia przez kleszcze i z wymienionych 152 osób - 65 (43,05%) deklaroowało pokłucie jednokrotne zaś 59 (39,07%) pokłucie wielokrotne. Tylko 17,88% badanych, u których nie wykryto przeciwciał anty-*Borrelia* deklaroowało brak pokłucia przez kleszcze. U 23 osób tej grupy (15,13%) w przeszłości wystąpił rumień wędrujący (EM) i z tego powodu u badanych wdrożono antybiotykoterapię.

Obecność przeciwciał IgM i/lub IgG wykazano u 123 osób (44,73%). Przeciwciała dla specyficznych białek *Borrelia* tylko w klasie IgM stwierdzono u 25 osób (9,12%) w tym 15 leśników (5,47%) i 10 rolników (3,65%). Obecność IgM anty-*Borrelia* interpretowano jako wczesną fazę odpowiedzi immunologicznej na zakażenie. Spośród 123 osób tej grupy aż 60% informowało o wielokrotnym pokłuciu przez kleszcze, 24% o pokłuciu jednokrotnym, a 16% nie zauważyło faktu pokłucia przez kleszcza. U 7 osób tej grupy (5,6%) wystąpił rumień wędrujący (EM).

Obecność przeciwciał anty-*Borrelia* zarówno w klasie IgM jak i IgG świadcząca o zaawansowanej odpowiedzi immunologicznej na zakażenie *Borrelia*, co stwierdzono u 14 osób (5,11%) w tym 10 leśników (3,65%) i 4 rolników (1,46%). Połowa badanych tej grupy (50%) informowała o pokłuciu mnogich zaś 35,7% o pokłuciu jednokrotnych. Trzy osoby z tej grupy zgłosiły wystąpienie w przeszłości rumienia wędrującego.

Późną odpowiedź na zakażenie przejawiającą się obecnością przeciwciał dla specyficznych białek antygenowych *Borrelia* tylko w klasie IgG obserwowano u 84 osób (30,66%) w tym u 69 leśników (25,18%) i 15 rolników (5,47%). Zdecydowana większość badanych tej grupy (64,29%, 54 osoby) była wielokrotnie kłuta przez kleszcze, 32,14% (27 osób) informuje o pokłuciu jednokrotnym, a 3 osoby (3,57%) nie pamiętają faktu pokłucia przez kleszcza. Siedemnaście osób tej grupy (20,23%) deklaruje wystąpienie po pokłuciu rumienia wędrującego.

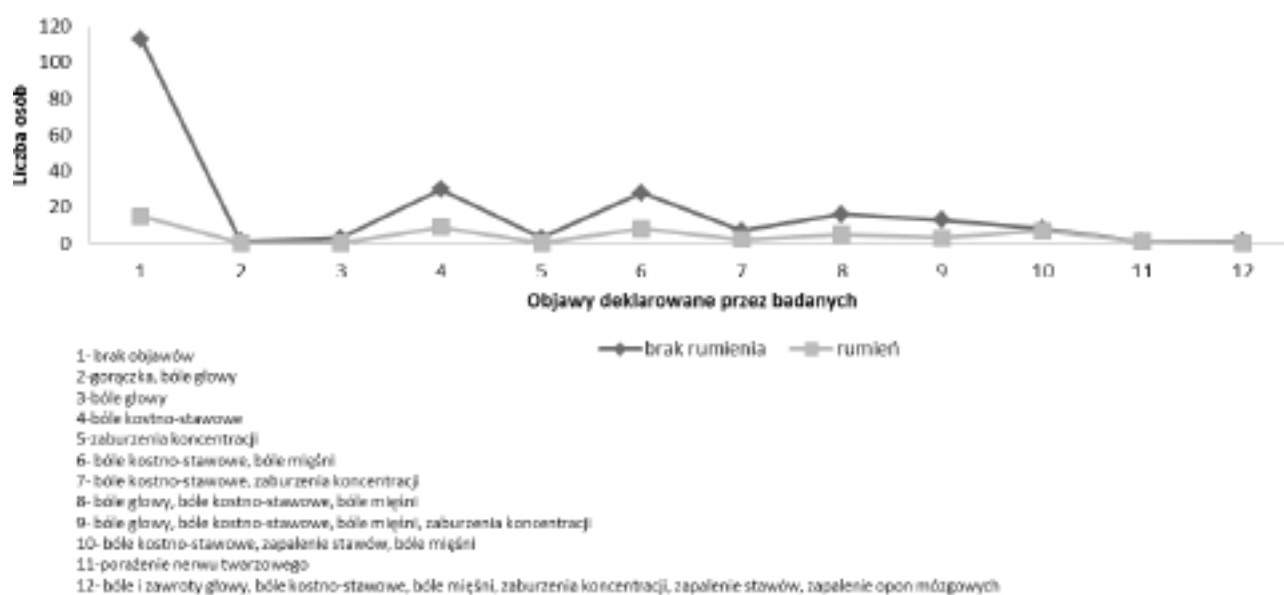
Wczesną i zaawansowaną odpowiedź immunologiczną przejawiającą się obecnością przeciwciał IgM lub IgM i IgG stwierdzano u zbliżonej liczby leśników czy rolników. Wyraźne różnice widoczne są w liczebności osób, u których stwierdzono późną odpowiedź immunologiczną na zakażenie *Borrelia* - 69 leśników (25,18%) i 15 rolników (5,47%). Rycina 2 przedstawia zależność pomiędzy stwierdzanym u badanych stopniem zaawansowania odpowiedzi immunologicznej na zakażenie *Borrelia* w zależności od grupy zawodowej.



Rycina 2. Zależność pomiędzy stwierdzanym u badanych stopniem zaawansowania odpowiedzi immunologicznej na zakażenie *Borrelia* w zależności od grupy zawodowej.

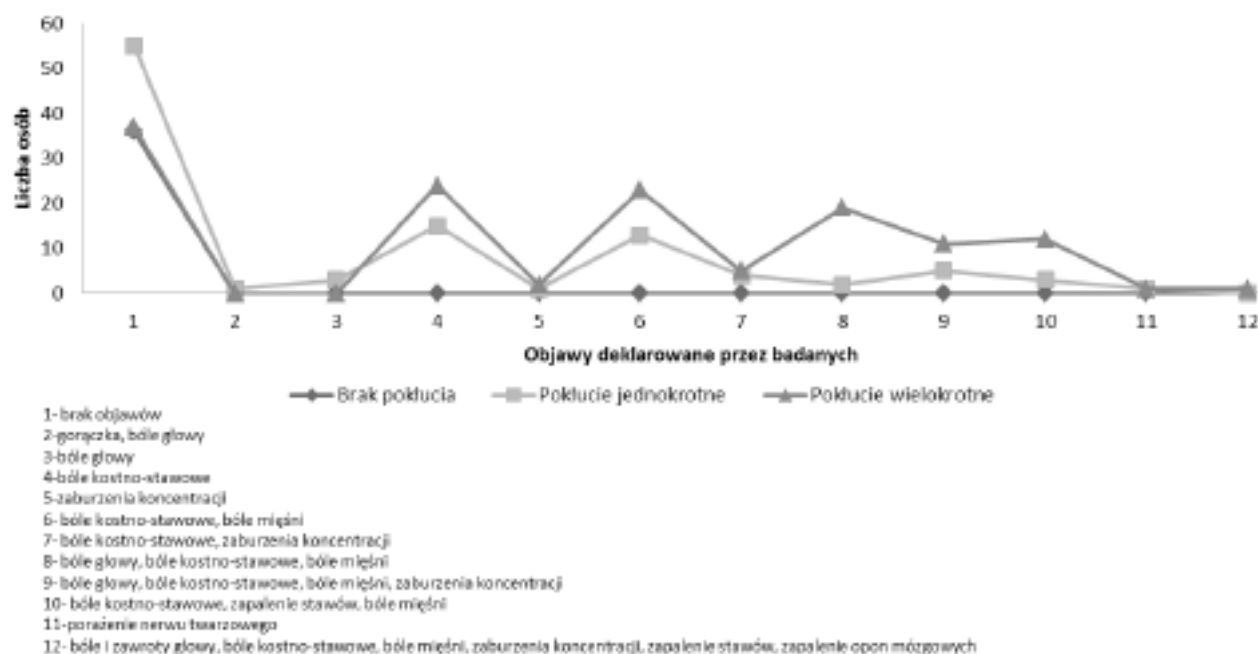
Przeanalizowano częstość występowania objawów deklarowanych przez badanych leśników i rolników w aspekcie wystąpienia rumienia wędrującego i w aspekcie krotności pokłucia przez kleszcze. Rumień wędrujący wystąpił po pokłuciu przez kleszcze u 50 osób (18,25%), przy czym u 15 (5,47%) był to jedyny deklarowany objaw zakażenia krętkami *Borrelia*. U pozostałych 35 osób (12,72%) wystąpiły z różną częstością inne objawy. Z grupy osób zawodowo narażonych na pokłucie przez kleszcze wystąpienie rumienia wędrującego (EM) deklarowało 5,84% jednokrotnie kłutych przez kleszcze i 12,41% kłutych wielokrotnie.

Szczegóły przedstawiono na rycinie 3.



Rycina 3. Objawy deklarowane przez badanych w aspekcie obecności rumienia wędrującego (EM)

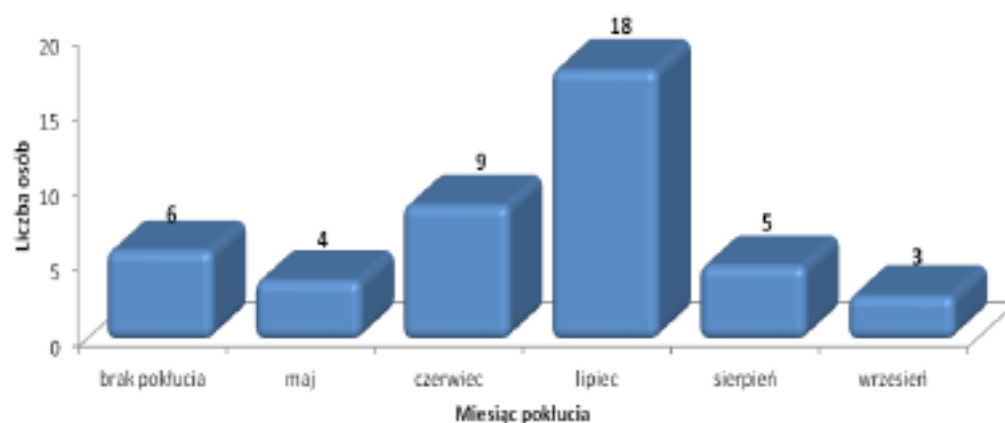
Osoby wielokrotnie kłute przez kleszcze częściej zgłaszały istnienie różnorodnych dolegliwości bólowych niż osoby kłute jednokrotnie czy deklarujące brak pokłuć. Dokładny rozkład uzyskanych wyników prezentuje rycina 4.



Rycina 4. Objawy deklarowane przez badanych w aspekcie krotności pokłucia przez kleszcze.

Grupa kontrolna

Osoby z grupy kontrolnej, podobnie jak leśnicy, deklarowały pokłucia głównie w miesiącach letnich - czerwiec (20%), lipiec (40%), sierpień (11%). Zdecydowanie mniej pokłuć deklarowało w maju (8,8%) i wrześniu (6,6%). W grupie kontrolnej pokłucie przez kleszcze deklarowało 86,6%, zaś brak pokłucia 13,3% osób. Rycina 1b przedstawia deklarowany przez badanych miesiąc pokłucia przez kleszcze.



Rycina 1b. Deklarowany przez badanych z grupy kontrolnej miesiąc pokłucia przez kleszcze

W grupie kontrolnej liczącej 45 osób u 43 (95,5%) nie stwierdzono obecności przeciwciał IgM i/lub IgG dla białek antygenowych *Borrelia*, co świadczy o braku zakażenia mimo, że 41,86% z nich informuje o pokłuciu wielokrotnym, a 46,51% o pokłuciu jednokrotnym. Zdecydowany brak kontaktu z kleszczem deklarowało 11,63% osób tej grupy. U 1 osoby (2,2%) w teście Western blot uzyskano wynik graniczny w klasie IgM, co może świadczyć o początkowej fazie odpowiedzi immunologicznej na zakażenie lecz wymaga potwierdzenia klinicznego i ponownych badań serologicznych. U 1 osoby (2,2%), która deklarowała wielokrotne pokłucie przez kleszcze i obecność w przeszłości rumienia wędrującego, uzyskano wynik pozytywny w klasie IgG. O wystąpieniu rumienia wędrującego informowało 7 osób (15,5%) zaś kolejnych 12 osób (26,6%) informowało o wystąpieniu dolegliwości bólowych ze strony układu kostno-stawowego i mięśni lecz ankietowanym trudno było określić czy mają one związek z faktem pokłucia przez kleszcze.

Dyskusja

Kleszcze mogą stanowić dla człowieka źródło zakażenia krętkami *Borrelia burgdorferi*, wirusem odkleszczowego zapalenia opon mózgowych czy czynnikiem ludzkiej erlichiozy. W związku z tym osoby pracujące w środowisku występowania kleszczy są szczególnie narażone na choroby transmisyjne. Dane literaturowe informują, że największe zagrożenie ze strony kleszczy istnieje w lipcu, sierpniu i czerwcu, gdyż w tych miesiącach notowano najwięcej pokłuć odpowiednio 43%, 31%, i 16%. Rzadziej notowano pokłucia we wrześniu (9%) i maju (1%) (Bartosik i in., 2004). W badaniach własnych uzyskano potwierdzenie tych informacji, gdyż najwięcej badanych deklaroowało pokłucie w miesiącach letnich - czerwcu, lipcu i sierpniu odpowiednio 20%, 24% i 18%. Dziesięć procent (10%) badanych informuje o pokłuciu w maju zaś 7% we wrześniu. Interesujący wydaje się fakt, iż do ataków kleszczy może dochodzić również wczesną wiosną w kwietniu (2,5%) i marcu (0,36%) oraz późną jesienią, w październiku (2,5%), a nawet listopadzie (1,1%).

Zarówno pracownicy leśni jak i rolnicy z racji na charakter wykonywanej pracy należą do grup zawodowych narażonych na stosunkowo częste pokłucia przez kleszcze. Obecność przeciwciał IgM i/lub IgG anty-*Borrelia* wykazano u 44,73% badanych z tych grup zawodowych i jak wynika z analizy uzyskanych wyników wczesną i zaawansowaną odpowiedź immunologiczną przejawiającą się obecnością przeciwciał IgM lub IgG stwierdzano u zbliżonej liczby leśników czy rolników. Wyraźne różnice widoczne są w liczebności osób, u których stwierdzono późną odpowiedź immunologiczną na zakażenie *Borrelia* - 25,18% leśników i 5,47% rolników.

Wczesnym objawem zakażenia krętkiem *Borrelia burgdorferi* sensu lato jest rumień wędrujący, którego pojawienie nie wymaga potwierdzenia badaniami serologicznymi i kwalifikuje do podjęcia terapii antybiotykowej. Testy serologiczne na etapie rumienia nie powinny być wykonywane. Zbyt wczesnie wykonany test serologiczny może wykazywać fałszywie ujemne wyniki w zakresie obecności IgM ze względu na niskie wartości znamienne (CDC 2011, EUCALB 2011). W grupie badanej rumień wędrujący wystąpił u 18,25% rolników i leśników biorących udział w badaniu, przy czym u 5,47% był to jedyny deklarowany objaw związany z zakażeniem krętkami *Borrelia*. Dane literaturowe informują, że oprócz rumienia w miejscu pokłucia przez kleszcza może wystąpić świąd (34%), ból (13%), mrowienie (9%) i pieczenie (7%) (Bartosik i in., 2004).

Badania ankietowe przeprowadzone wśród osób zawodowo narażonych na pokłucie przez kleszcze wykazały, że badani deklarują jednoczesne występowanie wielu objawów chorobowych wśród których dominują bóle kostno-stawowe (14,23%), bóle kostno-stawowe i bóle mięśni (13,14%), bóle głowy, bóle kostno-stawowe i bóle mięśni (7,66%), bóle głowy, bóle kostno-stawowe, bóle mięśni i zaburzenia koncentracji (5,84%).

Około 10-20% pacjentów ze zdiagnozowaną boreliozą kilka miesięcy do roku po zastosowanej odpowiedniej antybiotykoterapii odczuwa dolegliwości kliniczne o charakterze ciągłym czy nawracającym. Stan taki określa się jako post-treatment Lyme disease syndrom (PTLDS) jeśli charakteryzuje się obecnością zespołu uporczywych dolegliwości i trwa dłużej niż 6 miesięcy po leczeniu. PTLDS nie może być określane jako „chronic” Lyme disease i nie kwalifikuje do wprowadzenia antybiotykoterapii, która jest w tych przypadkach nieskuteczna i potencjalnie szkodliwa dla pacjenta z PTLDS. Dla pacjentów z PTLDS rekomendowane jest zastosowanie leczenia objawowego (CDC 2011, Stanek i in., 2011, Kisand i in., 2007, Singh i in. 2004). Przyczyna występowania PTLDS nie jest do końca wyjaśniona. Przypuszcza się, że powodem jest uszkodzenie tkanek powstałe w wyniku zakażenia i możliwość inicjowania odpowiedzi autoimmunologicznej (CDC 2011, Stanek i in., 2011, Kisand i in., 2007).

Wnioski

1. Pokłucia przez kleszcze dominują w miesiącach letnich, jednak możliwe są również wczesną wiosną i późną jesienią dlatego bez względu na porę roku należy stosować odzież ochronną i repelenty by zminimalizować możliwość pokłucia i tym samym zmniejszyć ryzyko zakażenia krętkiem *Borrelia*.
2. Osoby pracujące w terenie zalesionym, leśnicy, drwale, osoby zajmujące się transportem drewna, ale także zbieracze runa leśnego należą do grupy osób szczególnie narażonych na wielokrotne pokłucia przez kleszcze i występowanie różnorodnych objawów, które mogą zaistnieć w konsekwencji zakażenia krętkami *Borrelia*.
3. Rumień wędrujący występuje częściej u osób wielokrotnie kłutych przez kleszcze niż u osób kłutych jednokrotnie.
4. U osób wielokrotnie kłutych przez kleszcze częściej występują łącznie różne rodzaje dolegliwości bólowych niż u osób kłutych jednokrotnie.

Literatura:

1. Bartosik K., Kubrak T., Sitarz M., Świącicka M., Buczek A. (2004), *Stopień zagrożenia mieszkańców południowo-wschodniej Polski kleszczami i chorobami odkleszczowymi*. Wiadomości Parazytologiczne, 50, 2, s. 249-252.
2. Center for Disease Control and Prevention (April, 2011), Two-step Laboratory Testing Process, In: *Lyme Disease*, www.cdc.gov/lyme/diagnosistreatment/LabTest/TwoStep/20.07.2011,
3. Chmielewska-Badora J., Cisak E., Wójcik-Fatla A., Zwoliński J., Buczek A., Dutkiewicz J. (2006), *Correlation of tests detection of Borrelia burgdorferi sensu lato infection in patients with diagnosed borreliosis*. AAEM, 13, s. 307-311.
4. European Concerted Action on Lyme Borreliosis (March, 2008). Test in use, In: *Diagnosis serology*, http://meduni09.edis.at/eucalb/cms/index.php?option=com_content&task=view&id=38&Itemid=102, (20.07.2011).
5. Flisiak, S. Pancewicz, S. (2011), Diagnostyka i leczenie boreliozy z Lyme, W: *Zalecenia Polskiego Towarzystwa Epidemiologów i Lekarzy Chorób Zakaźnych*: <http://www.pteilchz.org.pl/standardy.htm>, (19.07.2011).
6. Kisand K.E., Prück T., Kisand K.V. (2007), *Propensity to excessive proinflammatory response in chronic Lyme borreliosis*. APMIS, 115, s. 134-41.
7. Krajczy P., Schreiber J., Skerka Ch., Haupt K., Brade V., Weallich R., Zipfel P.F. (2008), *Assessment of the regions within complement regulator-acquiring surface protein (CRASP)-2 of Borrelia burgdorferi required for interaction with host immune regulators FHL-1 and factor H*. Int J Med Microbiol 298, suppl 1, s. 268-271.
8. Mączka I., Tylewska-Wierzbowska S. (2010), *Cykl krążenia krętków Borrelia burgdorferi w środowisku*. Post Mikrob 49, s. 25-32.
9. Siegel C., Hallstrom T., Skerka C., Eberhardt H., Uzonyi B., Beckhaus T., Karas M. (2010), *Complement factorH-related proteins CFHR2 and CFHR5 represent novel ligands for the infection-associated CRASP protein of Borrelia burgdorferi*. PLoS ONE 5,10,13519, www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0013519, (08.02.2012).
10. Sigal L.H. (1997), *Lyme disease: a review of aspects its immunology and immunopathogenesis*. Annu Rev Immunol 15, s. 63-91.
11. Singh S. K., Girschick H. J. (2004), *Lyme boreliosis: from infection to autoimmunity*. CMI, 10, s. 598-614.
12. Stanek G., Fingerle V., Hunfeld K.P., Jaulhac B., Kaiser R., Krause A., Kristoferitsch W., O'Connell S., Ornstein K., Strle F., Gray J. (2011), *Lyme borreliosis: Clinical case definitions for diagnosis and management in Europe*. Clin Microbiol Infect, 17, 1, s. 69-79.

THE ASSESSMENT OF THE LEVEL OF ANTIBODIES AGAINST SPECIFIC ANTIGENIC PROTEINS BORRELIA BURGDORFERI S.L. IN THE GROUP OF PERSONS OCCUPATIONALLY EXPOSED TO TICK STINGS IN THE NORTH-EASTERN REGION OF LUBELSKIE VOIVODESHIP

**Małgorzata Tokarska-Rodak^{1,2}, Maria Koziół-Montewka^{1,2}, Dorota Plewik³,
Adam Szepeluk³, Justyna Paszkiewicz², Anna Pańczuk²**

¹Institute and Department of Medical Microbiology, Medical University in Lublin

²Health Institute, Pope John Paul II State School of Higher Education in Biała Podlaska

³Innovation Research Centre, Pope John Paul II State School of Higher Education in Biała Podlaska

Tokarska-Rodak M., Koziół-Montewka M., Plewik D., Szepeluk A., Paszkiewicz J., Pańczuk A. (2013), *The assessment of the level of antibodies against specific antigenic Proteins Borrelia burgdorferi s.l. in the group of persons occupationally exposed to tick stings in the North-Eastern region of Lubelskie Voivodeship*. Human and Health, 2 (VII), p. 26-32

Summary:

Objective of the study: The aim of this study was to determine the IgM / IgG antibodies against Borrelia antigen proteins within the group of foresters and farmers, and people not occupationally exposed to tick stings in the north eastern part of the Lublin province.

Material and Methods: The study group consisted of people particularly vulnerable to stings by ticks, such as foresters, farmers (275 people), and a control group - 45 people, living in the vicinity of Biała Podlaska. IgM / IgG anti-Borrelia (Elisa, Wb) were marked and a survey was carried out.

Results: The presence of IgM / IgG anti-Borrelia was found in case of 44.73% of patients, while no antibodies were found in case of 28.10% foresters and 27.01% farmers. In 95.5% of cases within the control group IgM / IgG anti-Borrelia was not identified, which suggests the absence of infection despite the fact that 41.86% of them repeatedly reported being stung, and 46.51% of at least one sting.

Conclusions: tick stings dominated during the summer months, but occurred also in early spring and late autumn. Erythema migrans is more common for people repeatedly stung by ticks than those who have been stung once.

Key words:

Lyme disease, Borrelia burgdorferi, Lyme disease diagnosis

Introduction

Lyme disease is a disease that occurs in Europe, Asia and North America. The occurrence of tick-borne diseases, including Lyme disease, in particular affects the occupants of the areas with a high degree of forestation by reason of their work - foresters, who works at clearing and plantings of trees, timber transport, as well as farmers.

The primary cause of Lyme disease is always the infection of spirochetes belonging to type *B. burgdorferi* sensu lato, but the clinical course of the disease depends only to some extent on genotype of bacteria and their number (Sigal 1997, Kisand 2007). The spread of spirochetes in the human body is a complex process that occurs through a number of mechanisms that allow for the readjustments and survival of bacteria in the tissues (Krajczyk i in., 2008, Siegel et al., 2012). The immune system response directed against the antigen of Borrelia proteins occurs in the body of an infected person in a very dynamic and very complex way. The emergence of Borrelia is a signal to trigger innate defense mechanisms at the time of their entry into the human body during the sting by infected ticks. The activation of complement, lysozyme, activity of phagocytic cells, cytotoxic cells take place (Mączka 2010). The antibody response develops later. Anti-Borrelia IgM antibodies are produced in the human body in response to the presence of the antigenic proteins of bacteria in 2-4th week after infection reaching a peak on 4-6 week. As first, antibodies IgM anti-OspC and anti-p41 are created. For the majority of patients with active Lyme IgM antibody level decreases after about 4 months. Already about 4 weeks after infection IgG antibodies begin to appear in the serum. In clinically advanced Lyme disease or acute neuroborreliosis seropositivity IgM / IgG increases to 70-90%. During this time the immune response may be expressed in relation to several antigens. European Concerted Action on Lyme Borreliosis (EUCALB) and the Center for Disease Control and Prevention (CDC) recommend a two-step serological diagnosis of Lyme disease. As a rule it has been assumed that the identification of each of the

Adress for correspondence: Małgorzata Tokarska-Rodak, Institute and Department of Medical Microbiology, Medical University in Lublin, Chodźki 1, 20-093 Lublin, e-mail: rodak@vp.pl.

clinical forms of the disease, with the exception of early-type lesions of erythema migrans (EM), requires a two-step diagnostic procedure. In the first stage the presence of specific IgM and / or IgG (depending on the stage of the disease) must be demonstrated through immunoenzymatic methods (ELISA or IFA). In the second step, one should make a determination by Western blot (Wb) (CDC 2011, EUALB 2011).

A two-stage diagnostic scheme allows for the elimination of non-specific false positives that occur with varying frequency in the diagnosis of one test and allow a clear assessment of the interpretation of the border results. According to current guidelines in Europe serological tests indicate levels of IgM / IgG anti-Borrelia burgdorferi should not be used to evaluate the effectiveness of treatment. Effectiveness of antibiotic implemented in order to eliminate the spirochete Borrelia infection must be assessed solely on the basis of the dynamics of the clinical picture (EUALB 2011, Flisiak et al., 2011, Chmielewska-Badora et al., 2006).

The objective of this study was to determine IgM and IgG antibodies against Borrelia antigen proteins among foresters and farmers, and people not occupationally exposed to stinging by ticks in the north eastern part of the Lublin province.

Material and methods

Researched groups

Group I - 275 people, of whom 171 persons (62.41%) were foresters and forestry workers Forest division of Biała Podlaska, Chotyłów, Międzyrzecz, Parczew, Radzyń Podlaski and 104 people (37.59%) were farmers and gatherers living in the area of the above mentioned forest divisions. Respondents are aged between 19 and 86 years, including 85 women (20-64 years), which constitutes 30.91% of the test group and 190 men (19-86 years), which constitutes 69.09% of the studied group.

Group II - (control group) - 45 people aged between 20 and 58 years living permanently or temporarily in Lyme-endemic area (near Biała Podlaska, Lubelskie province). Group consisted of 25 women (20-53 years) and 20 men (20-58 years).

ELISA screening (Euroimmun) test was performed for all the researched persons, for the presence of serum IgM and IgG anti-Borrelia. All positive results and the border results obtained in the screening test were confirmed by Western blot (Euroimmun).

Applied tests

Elisa Test

ELISA test is applied as a screening test used to quantify the levels of IgM and IgG anti-Borrelia serum. The present study used the company Euroimmun Elisa test. The reaction microplate wells were coated with extract antigens of Borrelia burgdorferi sensu stricto, Borrelia afzelii, Borrelia garinii and a recombinant protein of Borrelia burgdorferi VlsE. The test was performed in accordance with the recommendations of the manufacturer.

Western blot confirmatory test

Test which was used to confirm was called Western blot (Wb) of Euroimmun, applied for the qualitative determination of human IgM and IgG antibodies against antigens of Borrelia. In this test, the source of antigen was Wb strain of Borrelia afzelii. Borrelia protein extract separated electrophoretically on a polyacrylamide gel according to molecular weight and transferred to the cellulose membrane. The test strips contained antigenic proteins: p83, p41, p39 (bmp A), p31 (Osp A), p30, p25 (Osp C), p21, p19, p17. In addition, each strip contained a membrane chip with the recombinant antigen VlsE. The test was performed in accordance with the recommendations of the manufacturer. The interpretation of the test was performed using the EUROLineScan (Euroimmun).

Survey tests

The survey was carried out among the subjects of group I (foresters, farmers, collectors of undergrowth) and group II (control group), which included questions about the respondents observations of tick stings, the occurrence or absence of erythema migrans, the prevalence of subjective symptoms which the respondents could associate with the fact of being stung by ticks.

Results

Foresters and farmers

13.1% of the examined farmers and foresters did not notice that they were bitten by a tick. Most of the respondents declared that they were bitten by a tick in the summer months, i.e. in June, July and August (20%, 24% and 18% respectively). 10% of the respondents were bitten in May and 7% in September. It seems interesting that foresters inform about being bitten in the early spring – in April (2.5%) and March (0.36%) – and in the late autumn, in October (2.5%) and November (1.1%). Figure 1a shows in which months the respondents were bitten by a tick.

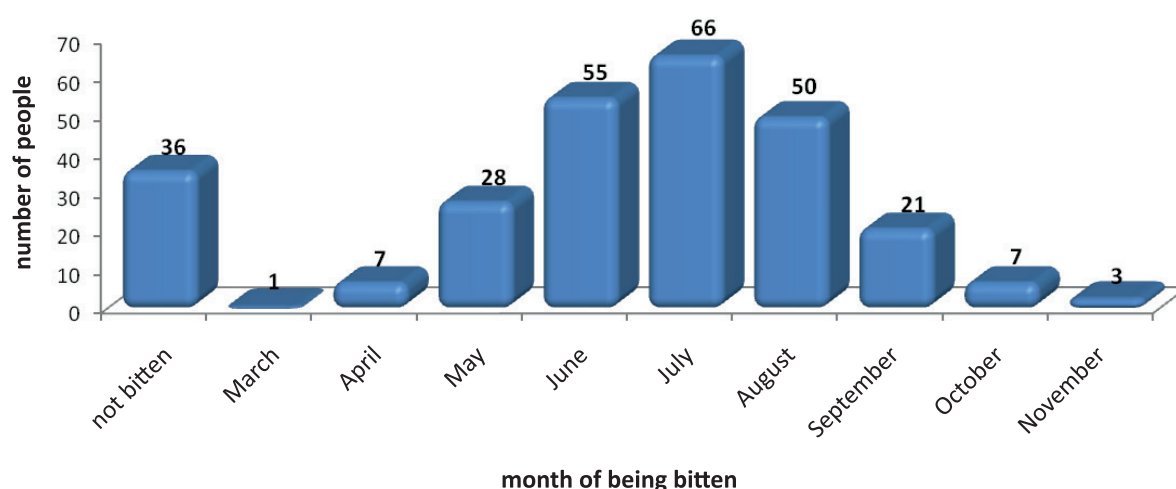


Figure 1a. Declared month of being bitten by ticks according to foresters and farmers subject to examination

On the basis of the results obtained in the study, which involved the ELISA test and the Western blot test, absence of IgM antibodies / IgG anti-*Borrelia* was found in 77 foresters (28.10%) and 74 farmers (27.01%), which represents a total of 152 people (55.27%). The respondents are occupationally exposed to tick bites. 65 of them (43.05%) declared to have been bitten once and 59 (39.07%) were bitten multiple times. Only 17.88% of the respondents in which no anti-*Borrelia* antibodies were found declared no tick bites. 23 of them (15.13%) experienced Erythema chronicum migrans and for this reason antibiotic therapy was implemented. The presence of IgM antibodies and/or IgG was found in 123 patients (44.73%). Antibodies to specific *Borrelia* proteins, only IgM, were found in 25 persons (9.12%), including 15 foresters (5.47%) and 10 farmers (3.65%). The presence of anti-*Borrelia* IgM was interpreted as an early phase of the immune response to an infection. Among 123 patients from this group, as much as 60% informed about multiple tick bites, 24% declared having been bitten once and 16% did not notice any bites. 7 persons from this group (5.6%) suffered from Erythema chronicum migrans.

The presence of anti-*Borrelia* IgM antibodies, both IgM and IgG, indicated advanced immune response to the *Borrelia* infection, which has been observed in 14 patients (5.11%), among them 10 foresters (3.65%) and 4 farmers (1.46%). Half of the respondents from this group (50%) informed about multiple bites, and 35.7% about a single bite. Three persons from this group declared having experienced Erythema chronicum migrans in the past.

Late response to infection manifested by the presence of antibodies to specific antigenic protein of *Borrelia*, only IgG, was observed in 84 patients (30.66%), including 69 foresters (25.18%) and 15 farmers (5.47%). The vast majority of respondents in this group (64.29%, 54 people) was repeatedly bitten by ticks, 32.14% (27 people) reported on having been bitten once, and 3 people (3.57%) did not remember having been bitten by ticks. Seventeen persons from this group (20.23%) said that they experienced Erythema chronicum migrans after they had been bitten.

Early and advanced immune response manifested by the presence of IgM and/or IgG antibodies was observed in a similar number of foresters and farmers. Significant differences can be seen in the number of people diagnosed with late immune response to infection with *Borrelia* - 69 foresters (25.18%) and 15 farmers (5.47%). Figure 2 shows the relationship between the severity of the immune response to infection with *Borrelia* and the professional group.

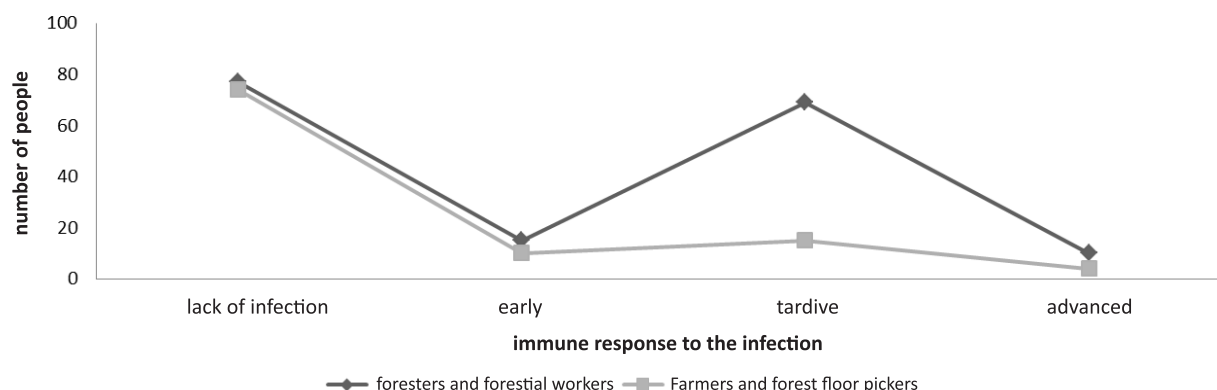


Figure 2. Relation between advancement level of immune response to *Borellia* infection recognized among subjects depending on occupational group

The incidence of symptoms declared by foresters and farmers in terms of Erythema chronicum migrans and in terms of the number of tick bites has been analysed. Erythema chronicum migrans occurred after a tick bite in 50 patients (18.25%), in 15 of them (5.47%) it was the only declared sign of infection with *Borrelia* spirochetes. In the remaining 35 persons (12.72%) other signs appeared with various frequency. 5.84 % of persons bitten only once and 12.41% persons bitten multiple times within the group of people professionally exposed to tick bites declared that they underwent Erythema chronicum migrans. Details are shown in figure 3.

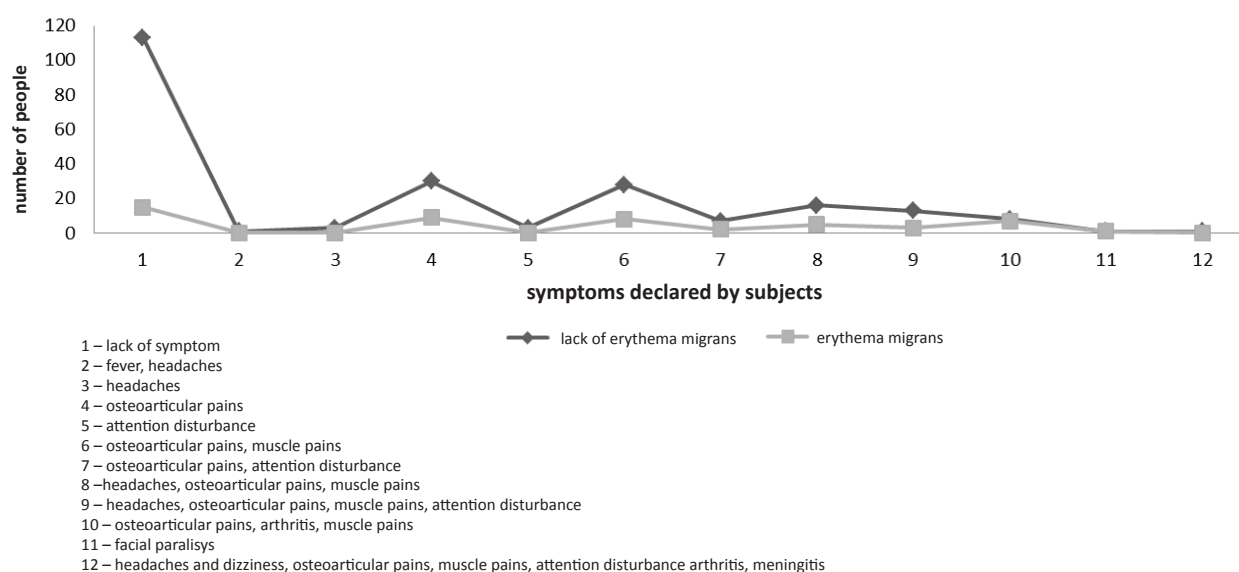


Figure 3. Symptoms declared by subjects regarding the presence of erythema migrans

Persons who were bitten by a tick several times were more likely to report the existence of various painful symptoms than those who were bitten only once or not bitten at all. The exact distribution of the results is presented in Figure 4.

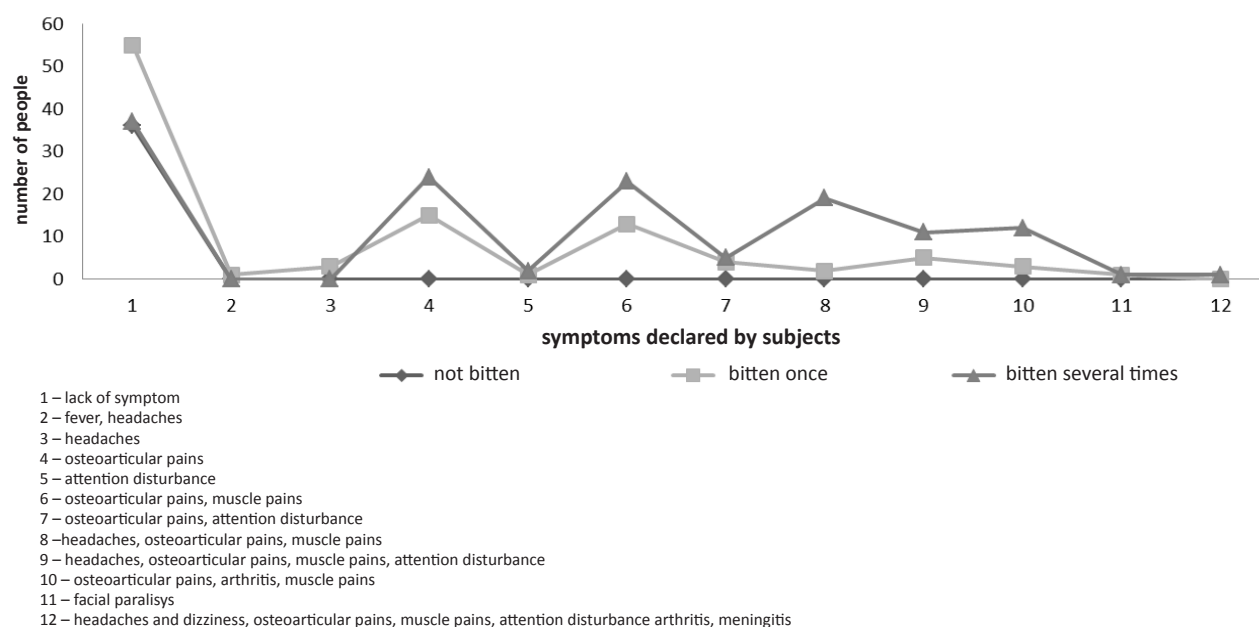


Figure 4. Symptoms declared by subjects regarding the number of ticks' bites

Control group

Persons from the control group, similarly to the foresters, declared bites mostly in the summer months – June (20%), July (40%), August (11%). Significantly fewer bites were declared in May (8,8%) and in September (6.6%). In the control group, 88.6% were bitten by a tick, and 13.3% were not bitten. Figure 1b shows in which months the respondents were bitten by a tick.

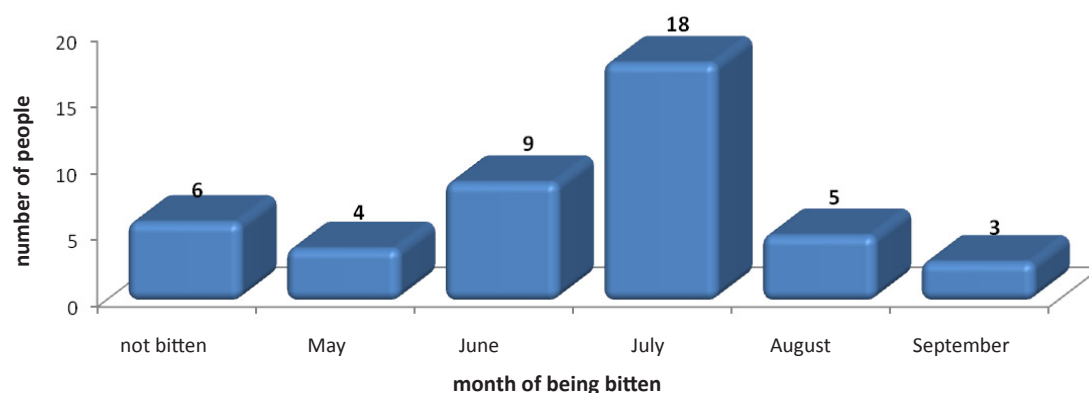


Figure 1b. Declared month of being bitten by ticks according to subjects in the control group

In the control group of 45 persons, no IgM antibodies and/or IgG antibodies to *Borrelia* antigen proteins were found in 43 persons (95.5%), suggesting the absence of infection, although 41.86% of them were repeatedly bitten and 46.51% were bitten once. The lack of contact with ticks was declared by 11.63% of this group. In one person (2.2%) a borderline result in IgM was obtained in the Western blot test, which may indicate an early stage of the immune response to infection but requires re-confirmation of the clinical and serological testing. In one person (2.2%), which declared a history of multiple tick bites and Erythema chronicum migrans, a positive result in IgG was obtained. 7 persons (15.5%) informed about having Erythema chronicum migrans and 12 persons reported the occurrence of painful symptoms on the part of the osteoarticular system and muscles, but the respondents found it difficult to indicate whether the pain was caused by a tick bite or not.

Discussion

Ticks can be a source of infection with spirochetes *Borrelia burgdorferi*, tick-borne viral meningitis and the factor of human ehrlichiosis. Therefore, people working in the environment of tick occurrence are particularly vulnerable to transmissible diseases. Literature data indicate that the threat posed by ticks is greatest in July, August and June, because in these months most of the bites were noted – 43%, 31%, and 16% respectively. Bites were reported less frequently in September (9%) and May (1%) (Bartosik et al., 2004). In the own study the confirmation of this information has been achieved, as most of the respondents declared tick bites in the summer months - June, July and August, respectively 20%, 24% and 18%. Ten per cent of the respondents informed about being bitten in May and 7% in September. It is worth noting that ticks can also bite in the early spring – in April (2.5%) and in March (0.36%), as well as in the late autumn, in October (2.5%) and even in November (1.1%).

Both foresters and farmers are professional groups exposed to a relatively high risk of tick bites because of the nature of their job. The presence of IgM and/or IgG anti-*Borrelia* antibodies has been demonstrated in 44.73% of the respondents in these professional groups and, as the analysis of the obtained results demonstrates, a similar number of foresters or farmers showed an early and advanced immune response manifested in the presence of IgM and/or IgG antibodies. Significant differences have been noted in the number of persons diagnosed with a late immune response to the *Borrelia* infection: 25.18% of foresters and 5.47% of farmers.

Erythema chronicum migrans is an early symptom of *Borrelia burgdorferi*. Its occurrence does not require confirmation with serological tests and qualifies to take the antibiotic therapy. Serologic tests should not be done at the erythema stage. A serological test carried out too early may show false negative results for the presence of IgM because of the low characteristic values (CDC 2011, EUCALB 2011). In the study group Erythema chronicum migrans occurred in 18.25% of the farmers and foresters, and for 5.47% of them it was the only declared symptom associated with the infection with *Borrelia* spirochetes. Literature data inform that apart from Erythema chronicum migrans, one may also experience itching (34%), pain (13%), tingling (9%) and burning sensation (7%) (Bartosik et al., 2004).

Questionnaire surveys conducted among persons occupationally exposed to tick bites have showed that respondents declare simultaneous occurrence of several symptoms, among which dominate bone and joint pain (14.23%), bone and joint pain and muscle pain (13.14%), headaches, bone and joint pain and muscle pain (7.66%), headaches, bone and joint pain, muscle pain and impaired concentration (5.84%).

Approximately 10-20% of patients diagnosed with Lyme disease a few months to a year after undergoing an appropriate antibiotic therapy have continuing or recurring clinical symptoms. This condition is referred to as post-treatment Lyme disease syndrome (PTLDS) if it is characterized by the presence of any persistent symptoms and lasts longer than 6 months after the treatment. PTLDS cannot be described as a “chronic” Lyme disease, and is not eligible for the introduction of antibiotics, which in such cases are ineffective and potentially harmful to the patient with PTLDS.

For patients with PTLDS, the symptomatic treatment is recommended (CDC 2011, Stanek et al., 2011, Kisand et al., 2007, Sigh et al. 2004). The cause of PTLDS is not entirely clear. It is believed that the reason for it is tissue damage, resulting from an infection and the ability to initiate the autoimmune response (CDC 2011, Stanek et al., 2011, Kisand et al., 2007).

Conclusions

1. Ticks bite most often in the summer months, however they also bite in the early spring and in the late autumn, so it is necessary to wear protective clothes and use repellents in all seasons in order to reduce the risk of getting bitten and thereby minimize the risk of getting infected with *Borrelia* spirochete.
2. People working in wooded areas, foresters, lumberjacks, people involved in the transport of timber but also collectors of undergrowth are among the people who are particularly vulnerable to multiple bites by ticks and to the occurrence of a variety of symptoms that can occur as a consequence of infection with *Borrelia* spirochetes.
3. Erythema chronicum migrans is more common in people repeatedly bitten by ticks than in those bitten only once.
4. In people bitten by ticks multiple times, various kinds of pain co-occur more often than in people bitten only once.

References:

1. Bartosik K., Kubrak T., Sitarz M., Świącicka M., Buczek A. (2004), *Stopień zagrożenia mieszkańców południowo-wschodniej Polski kleszczami i chorobami odkleszczowymi*. Wiadomości Parazytologiczne, 50, 2, s. 249-252.
2. Center for Disease Control and Prevention (April, 2011), Two-step Laboratory Testing Process, In: *Lyme Disease*, www.cdc.gov/lyme/diagnosis/treatment/LabTest/TwoStep/20.07.2011,

3. Chmielewska- Badora J., Cisak E., Wójcik-Fatla A., Zwoliński J., Buczek A., Dutkiewicz J. (2006), *Correlation of tests detection of Borrelia burgdorferi sensu lato infection in patients with diagnosed borreliosis*. AAEM, 13, s. 307-311.
4. European Concerted Action on Lyme Borreliosis (March, 2008). Test in use, In: *Diagnosis serology*, http://meduni09.edis.at/eucalb/cms/index.php?option=com_content&task=view&id=38&Itemid=102, (20.07.2011).
5. Flisiak, S. Pancewicz, S. (2011), Diagnostyka i leczenie boreliozy z Lyme, W: *Zalecenia Polskiego Towarzystwa Epidemiologów i Lekarzy Chorób Zakaźnych*, <http://www.pteilchz.org.pl/standardy.htm>, (19.07.2011).
6. Kisand K.E., Prück T., Kisand K.V. (2007), *Propensity to excessive proinflammatory response in chronic Lyme borreliosis*. APMIS, 115, s. 134-41.
7. Krajczy P., Schreiber J., Skerka Ch., Haupt K., Brade V., Weallich R., Zipfel P.F. (2008), *Assessment of the regions within complement regulator-acquiring surface protein (CRASP)-2 of Borrelia burgdorferi required for interaction with host immune regulators FHL-1 and factor H*. Int J Med Microbiol 298, suppl 1, s. 268-271.
8. Mączka I., Tylewska-Wierzbowska S. (2010), *Cykl krążenia krętków Borrelia burgdorferi w środowisku*. Post Mikrob 49, s. 25-32.
9. Siegel C., Hallstrom T., Skerka C., Eberhardt H., Uzonyi B., Beckhaus T., Karas M. (2010), *Complement factorH-related proteins CFHR2 and CFHR5 represent novel ligands for the infection-associated CRASP protein of Borrelia burgdorferi*. PLoS ONE 5,10,13519, www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0013519, (08.02.2012).
10. Sigal LH. (1997), *Lyme disease: a review of aspects its immunology and immunopathogenesis*. Annu Rev Immunol 15, s. 63-91.
11. Singh S. K., Girschick H. J. (2004), *Lyme boreliosis: from infection to autoimmunity*. CMI, 10, s. 598-614.
12. Stanek G., Fingerle V., Hunfeld K.P., Jaulhac B., Kaiser R., Krause A., Kristoferitsch W., O'Connell S., Ornstein K., Strle F., Gray J. (2011), *Lyme borreliosis: Clinical case definitions for diagnosis and management in Europe*. Clin Microbiol Infect, 17, 1, s. 69-79.