

*Robert Flisiak, Alicja Wiercińska-Drapalo, Danuta Prokopowicz, \*Iwona Flisiak*

## SEZONOWOŚĆ WYSTĘPOWANIA PRZECIWCIAŁ PRZECIW *BORRELIA BURGdorFERI* WŚRÓD MIESZKAŃCÓW BIAŁOWIEŻY

Klinika Obserwacyjno-Zakaźna Akademii Medycznej w Białymstoku

Kierownik: prof. zw. dr hab. *Danuta Prokopowicz*

\*Klinika Dermatologii Akademii Medycznej w Białymstoku

Kierownik: dr hab. *Bożena Chodynicka*

*Celem pracy była ocena zmienności sezonowej występowania przeciwciał przeciw *Borrelia burgdorferi* w populacji mieszkańców Białowieży jako terenu endemicznego boreliozy z Lyme. Specyficzne przeciwciała klasy IgM wykrywano najczęściej we wrześniu, a z najrzadziej w kwietniu. Z kolei dynamika występowania przeciwciał klasy IgG wykazywała przeciwną tendencję.*

Dotychczasowe badania własne potwierdziły duże zagrożenie zakażenia boreliozą z Lyme mieszkańców Białowieży i terenu Puszczy Białowieskiej. Na tym obszarze częstość występowania przeciwciał przeciw *Borrelia burgdorferi* sięgała blisko 50% badanych [12, 13]. Tak wysoki odsetek osób posiadających przeciwciała odnotowano w Europie – w Chorwacji (43%), a w Polsce – w województwie jeleniogórskim (71%) (7, 10). Sezonowa aktywność kleszczy w sposób oczywisty powoduje zmienność w ekspozycji populacji na czynniki zakaźne przez nie przenoszone. Należą do nich odpowiedzialne za boreliozę z Lyme krętki *Borrelia burgdorferi*, a w Europie również *Borrelia garini* i *Borelia afzelii* (3, 8). Jednak większość prac serologiczno-epidemiologicznych nie uwzględnia wpływu pory roku w której przeprowadzano badania, na uzyskane wyniki.

Kontynuując nasze badania, przeprowadziliśmy ocenę sezonowej zmienności występowania specyficznych przeciwciał klasy IgM i IgG w populacji mieszkańców Białowieży, jako terenu endemicznego boreliozy z Lyme.

### MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono u 300 mieszkańców Białowieży, u których jednorazowo oceniano występowanie w surowicy przeciwciał klasy IgM i IgG przeciw *Borrelia burgdorferi* w różnych miesiącach na przełomie roku 1993 i 1994: we wrześniu 1993 – 143 osoby, w lutym 1994 – 34 osoby, w kwietniu 1994 – 51 osób, w maju 1994 – 72 osoby.

U 40 osób pierwotnie seropozytywnych (we wrześniu 1993) powtórzono badania po 7 miesiącach (w kwietniu 1994). Osoby te pomimo obecności przeciwciał przeciw *Borrelia burgdorferi* nie wykazywały objawów choroby podczas pierwszego badania i w związku z tym nie zostały poddane leczeniu.

W celu uzyskania wielopłaszczyznowego potwierdzenia wyników, przeprowadzono oprócz analizy częstości występowania przeciwciał, również ocenę ilościową ich stężenia (wyrażoną skorygowanymi wartościami gęstości optycznej) zarówno u wszystkich badanych osób, jak również ograniczając się do osób, których wyniki zostały jakościowo zinterpretowane jako dodatnie.

Badania serologiczne pozwalające na wykrywanie przeciwciał, przeciw antygenowi 41-kDa (flagellar antigen), szczepu B-31 *Borrelia burgdorferi*, wykonywano metodą immunoenzymatyczną (ELISA), (DAKO/Dania). Zastosowanie króliczej surowicy antyglobulinowej, specyficznej dla łańcucha  $\mu$  lub łańcucha  $\gamma$ , pozwoliło na wykrywanie przeciwciał odpowiednio: klasy IgM lub IgG. Wartość OD (optical density) odczytywano przy długości fali 490 nm za pomocą czynnika płytkowego SLT-963PR (SLT-Labinstruments/Austria). Wartości OD były następnie korygowane (zgodnie z zaleceniami producenta) za pomocą współczynnika przypisanego danej serii odczynnika. Uzyskane w ten sposób wartości mogły być wykorzystane do ilościowej interpretacji wyników. Interpretację jakościową, polegającą na uznaniu wyniku za dodatni, oparto o wartości OD standardów zawartych w zestawie. Wartości *cut off* wynosiły zwykle: dla przeciwciał w klasie IgM około 0,45, a w klasie IgG – 0,35.

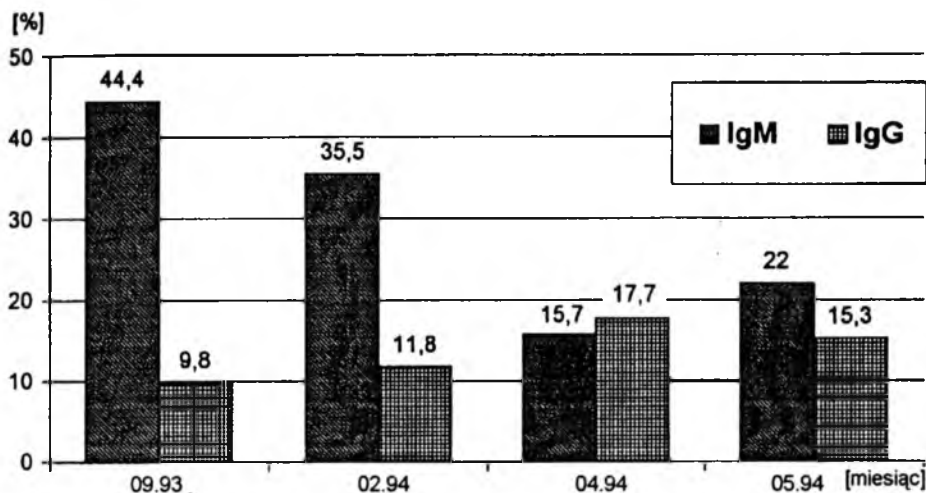
Analizę statystyczną częstości występowania przeciwciał przeprowadzono stosując test  $\chi^2$  – niezależności. Porównując wartości OD uzyskane w miesiącach o najwyższym i najniższym poziomie przeciwciał stosowano test *t* Studenta, a oceniając ich dynamikę – test analizy wariancji (ANOVA). W opracowaniu statystycznym wykorzystano oprogramowanie Microsoft Excel 4.0 (Microsoft Corporation/USA) zastosowane na komputerze 486DX2/66.

Wartości ilościowych oznaczeń podano jako średnie i odchylenie standardowe ( $\pm$ SD).

## WYNIKI

Przeciwciała klasy IgM wykryto w najwyższym odsetku – 44,4%, we wrześniu 1993 roku. Następnie ich częstość ulegała znamiennej obniżeniu ( $p < 0,01$ ) do 15,7% w kwietniu 1994 roku, wykazując tendencję wzrostową w maju (ryc. 1). Ocena ilościowa poziomu przeciwciał klasy IgM (ryc. 2) wykazała istotne statystycznie różnicowanie dynamiki ich zachowania się w teście ANOVA ( $p = 0,013$ ). Najwyższe wartości, odnotowane we wrześniu 1993 ( $0,64 \pm 0,54$ ) uległy znamiennej obniżeniu w lutym 1994 roku ( $p = 0,034$ ) i w kwietniu 1994 roku ( $p = 0,005$ ). Następnie obserwowano ponownie tendencję wzrostową w maju 1994. Wyniki interpretowane jakościowo jako dodatnie wykazywały podobną zmienność. Wartości skorygowanego OD z września 1993 roku ( $1,03 \pm 0,61$ ) ulegały znamiennej obniżeniu w lutym 1994 ( $p = 0,041$ ), a następnie wzrastały istotnie statystycznie ( $p = 0,014$ ) w maju 1994 roku (ryc. 2).

Najniższą częstość występowania przeciwciał klasy IgG – 9,8%, obserwowano we wrześniu 1993 roku. Odsetek ten uległ wzrostowi do 17,7% w kwietniu 1994 roku,



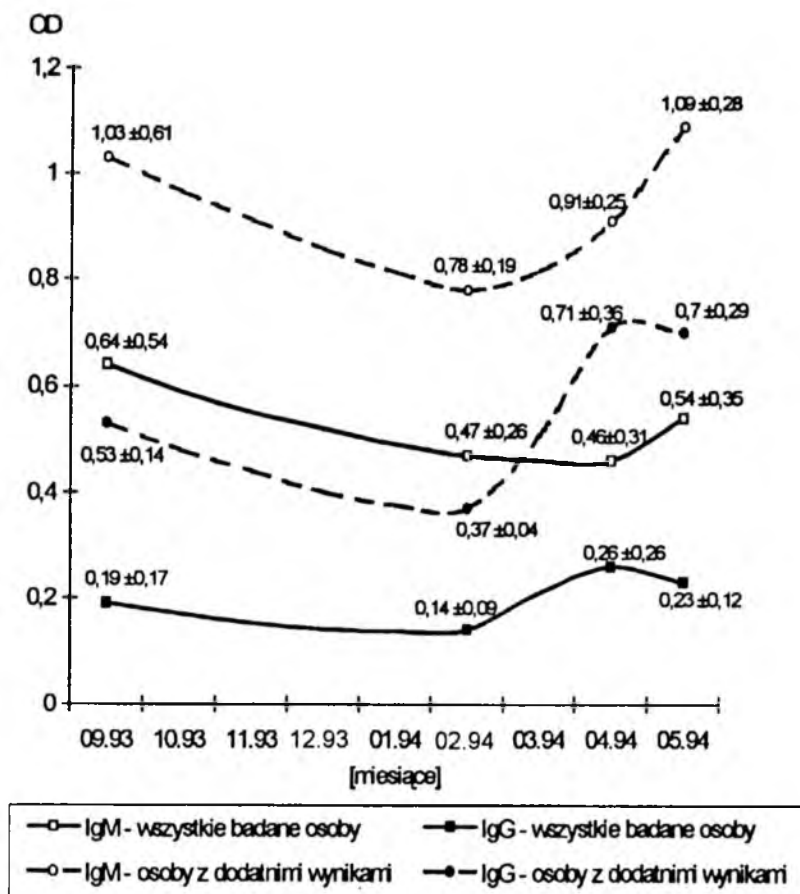
Ryc. 1. Występowanie przeciwciał klasy IgM i IgG przeciw *Borrelia burgdorferi* w populacji mieszkańców Białowieży w poszczególnych miesiącach

przekraczając częstość występowania przeciwciał klasy IgM (ryc. 1). Ocena ilościowa wykazała najniższe wartości skorygowanego OD przeciwciał klasy IgG, w lutym 1994 roku ( $0,14 \pm 0,09$ ). Ulegały one znamiennej ( $p = 0,009$ ) wzrostowi w kwietniu (ryc. 2). Podobnie zmieniały się wartości uzyskane od osób z wynikami interpretowanymi jakościowo jako dodatnie (ryc. 2). Wartości z września 1993 roku, obniżyły się znamienne ( $p = 0,021$ ), do najniższych w lutym 1994 ( $0,37 \pm 0,04$ ). W kwietniu obserwowano blisko dwukrotny wzrost ( $0,71 \pm 0,36$ ), a różnica była istotna statystycznie ( $p = 0,026$ ).

Spośród 33 osób które we wrześniu 1993 wykazywały obecność przeciwciał w klasie IgM, 3 osoby (9%) posiadały je nadal, zaś 4 czyli 12% wylimitowało je z wytworzeniem przeciwciał w klasie IgG. U pozostałych 26 (79%) nie stwierdzano żadnych przeciwciał. Ocena ilościowa poziomu przeciwciał klasy IgM wykazała jego znamienne ( $p = 0,00012$ ) obniżenie z  $0,91 (\pm 0,59)$  we wrześniu 1993, do  $0,46 (\pm 0,31)$  w kwietniu 1994. Przeciwciała w klasie IgG stwierdzane u 7 osób we wrześniu, były obecne nadal u 4 osób w kwietniu. Ocena ilościowa nie wykazała różnicy istotnej statystycznie pomiędzy badaniem pierwszym ( $0,22 \pm 0,18$ ) i drugim ( $0,29 \pm 0,29$ ).

## OMÓWIENIE WYNIKÓW

Uzyskane wyniki wskazują na dużą zmienność sezonową występowania przeciwciał przeciw *Borrelia burgdorferi* w populacji mieszkańców Białowieży. Obserwowano wyraźne odrębności dynamiki, zależne od klasy przeciwciał. Najwcześniej pojawiają się przeciwciała klasy IgM skierowane przeciw antygenom 25 i 41 kDa, zwykle w kilka tygodni po zakażeniu. Przeciwciała klasy IgM zanikają w większości przypadków po 4–6 miesiącach (1, 22). Wynikają z tego wysokie odsetki występowania przeciwciał tej klasy we wrześniu, zależne od aktywności kleszczy w lecie i związanym



Ryc. 2. Sezonowa zmienność poziomu przeciwciał IgM i IgG przeciw *Borrelia burgdorferi*, wyrażonego skorygowaną gęstością optyczną (OD) w populacji mieszkańców Białowieży. Przedstawiono dane dotyczące ogółu badanych surowic (linia ciągła) i tylko surowic uznanych za dodatnie (linia przerywana).

z tym ryzykiem zakażenia. Przejawem ich zanikania jest obserwowane w lutym i kwietniu obniżenie zarówno częstości występowania wyników dodatnich, jak i skorygowanych wartości OD, stanowiących ilościowe odzwierciedlenie poziomu przeciwciał. Przeciwciała klasy G pojawiają się później niż M, co tłumaczy odnotowane wiosną (kwiecień) najwyższe wartości zarówno odsetkowe, jak i ilościowe określające występowanie tych przeciwciał.

W Europie, gdzie występowanie boreliozy z Lyme wykryto w prawie wszystkich krajach, rejestruje się każdego roku kilka tysięcy zachorowań. Dotyczy to nie tylko Europy środkowej i zachodniej, ale również krajów skandynawskich i byłych republik radzieckich (7, 9, 11, 14, 15, 18, 19, 20). Wydaje się, że dane te są zaniżone ze względu na niedostateczne upowszechnienie wiedzy o tej chorobie wśród lekarzy i potencjalnych chorych, a także niewielką dostępność badań diagnostycznych.

Obserwacje własne wskazują na znacznie częstsze występowanie tej choroby w Polsce, aniżeli wskazywałyby na to opublikowane dotychczas prace kazuistyczne (6, 12, 13, 17, 25). Przeprowadzone w Europie badania serologiczne wykazały szczególnie dużą częstość występowania przeciwciał przeciw *Borrelia burgdorferi* w populacjach o dużym ryzyku ekspozycji na kleszcze, głównie pracowników leśnych i rolników. Wartości odsetkowe wahały się w tych grupach od 8% w Alpach włoskich, do 43% w Chorwacji i były znacznie wyższe od obserwowanych w populacjach ogólnych (ryc. 1), (4, 5, 7, 11, 14, 18, 20, 21, 24). W USA analogiczne badania wykazały najwyższą częstość tej serokonwersji wśród mieszkańców stanu New Jersey (22–42%), a najniższą w Arizonie (0–8%) (16, 23). Analizowana w niektórych z tych opracowań tzw. roczna serokonwersja wynosiła w Europie 3,2–8,1% (11, 14, 18).

Dotychczas opublikowane dane dotyczące Polski wskazują na częstość występowania przeciwciał *B. burgdorferi* na poziomie 12,2–16,7% w grupach ryzyka (pracowników leśnych) w wybranych regionach Polski (2). Jednak badania własne wykazały ich obecność u blisko połowy mieszkańców Białowieży, przy czym najwyższe wartości odnotowano w grupie pracowników leśnych (60–70,6%), (12). Również badania ośrodka wrocławskiego wykazały obecność przeciwciał u przeszło 70% pracowników leśnych w Karkonoszach (10).

Przedstawione wyniki wskazują, że na tak duże różnice w piśmiennictwie dotyczące występowania dodatnich wyników badań serologicznych, mogą mieć wpływ nie tylko różnice metodyczne (technika lub rodzaj zastosowanego szczepu/antygeny), geograficzne (strefa klimatyczna, tereny endemiczne), ale również pora roku, w której pobierano materiał do badań. Niestety zdecydowana większość opracowań seroepidemiologicznych ogranicza się do jednorazowej oceny występowania przeciwciał nie uwzględniającej sezonowego zróżnicowania. Jak widać ma to istotny wpływ na uzyskiwane wyniki. W niektórych opracowaniach brak jest tak istotnej informacji jak miesiąc, w którym pobierano krew [7, 10]. Ogranicza to możliwość porównywania wyników badań serologiczno-epidemiologicznych pochodzących z różnych terenów, tylko do wykonanych w określonej porze roku. Wykazana częstość występowania przeciwciał klasy IgM w regionie Białowieży wiosną, była wyższa od obserwowanej w Holandii (9%) (18), a w maju przekraczała znacznie odsetki odnotowane wczesnym latem na obszarach endemicznych w stanie Wisconsin/USA (12%) [16]. Z kolei występowanie przeciwciał klasy IgG w badanej przez nas populacji było niższe aniżeli w grupach ryzyka w Holandii (25%) (18), Szwajcarii (26%) (11) i Szwecji (26–29%) (14).

## WNIOSKI

1. U osób z grup ryzyka boreliozy z Lyme, mieszkańców rejonu Białowieży występowanie przeciwciał przeciw *Borrelia burgdorferi* wykazywało sezonową zmienność wahać się w odniesieniu do klasy IgM od 44% we wrześniu do 16% w kwietniu, a klasy IgG odpowiednio 10% i 18%.

2. Duże różnice przeciwciał przeciw *Borrelia burgdorferi*, zależne od pory roku ograniczają możliwość porównywania wyników badań serologiczno-epidemiologicznych pochodzących z różnych części świata.

R. Flisiak, A. Wiercińska-Drapalo, D. Prokopowicz, I. Flisiak

SEASONAL DYNAMICS OF ANTIBODIES PREVALENCE AGAINST  
*BORRELIA BURGDORFERI* IN BIAŁOWIEŻA INHABITANTS

SUMMARY

The aim of study was evaluation of seasonal prevalence of antibodies against *Borrelia burgdorferi* in Białowieża area, that is Lyme borreliosis endemic region. IgM and IgG antibodies against 41-kDa antigen of *Borrelia burgdorferi* B31 strain were investigated with ELISA in sera of 300 Białowieża inhabitants between September 1993 and May 1994. Moreover in 40 asymptomatic persons, that were seropositive in September 1993, additional control was performed in May 1994. The highest prevalence of IgM antibodies was observed in September 1993 (43,4%), with decrease during winter and spring (down to 15,7% in April) and accompanying the highest prevalence of IgG antibodies (17,7%) in April 1994). From 33 persons, that revealed IgM antibodies in September 1993, 3 (9%) were still seropositive, 4 (12%) cleared IgM antibodies and became IgG – seropositive, and remained 26 (79%) had no antibodies. Specific IgG antibodies found in 7 persons in September, were still present in 4.

Obtained results indicate necessity of taking into consideration seasonal dynamics, when results of seroconversion against *Borrelia burgdorferi* between different areas and different populations are compared.

PIŚMIENNICTWO

1. *Aguero-Rosenfeld* i wsp.: J. Clin. Microbiol. 1993, 31, 3090. – 2. *Anusz Z.* i wsp.: Materiały Naukowe XII Zjazdu PTEiLChZ, 1991, 42. – 3. *Baranton G.* i wsp.: Int. J. Syst. Bacteriol., 1992, 42, 378. – 4. *Berglund J. Eitrem R.*: Scand. J. Infect. Dis., 1993, 25, 67. – 5. *Bohme M.* i wsp.: Beitr. Infusionther., 1992, 30, 96. – 6. *Bowszyc J.* i wsp.: Przeg. Derm., 1992, 79, 149. – 7. *Burek V., Mišić-Mayerus L., Maretić T.*: Scand. J. Infect. Dis., 1992, 24, 685. – 8. *Canica M.M.* i wsp.: Scand. J. Infect. Dis., 1993, 25, 441. – 9. *Dekonenko E.J.* i wsp.: J. Infect. Dis., 1988, 158, 748. – 10. *Dobracki W.* i wsp.: Materiały Naukowe XIII Zjazdu PTEiLChZ, Poznań, 1994, 425.
11. *Fahrer H.* i wsp.: J. Infect. Dis., 1991, 163, 305. – 12. *Flisiak R.* i wsp.: Przeg. Epid., 1994, 48, 211. – 13. *Flisiak R., Prokopowicz D.*: Pol. Tyg. Lek., w druku. – 14. *Gustafson R.* i wsp.: Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 1992, 11, 894. – 15. *Gustafson R.*: Scand. J. Infect. Dis., 1994, suppl. 92, 8. – 16. *Huycke M.M., D'Alessio D.D., Marx J.J.*: J. Infect. Dis., 1992, 165, 1133. – 17. *Januszkiewicz J., Kieda A.*: Przeg. Epid., 1987, 41, 324. – 18. *Kuiper H.* i wsp.: Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 1993, 12, 413. – 19. *Motiejunas L.* i wsp.: Scand. J. Infect. Dis., 1994, 26, 149. – 20. *Neubert U., Munchohoff P., Volker B.*: Ann. N.Y. Acad. Sci., 1988, 588, 476.
21. *Nuti M.*: Am. J. Trop. Med. Hyg., 1993, 48, 20. – 22. *Rahn D.W., Malawista S.E.*: Ann. Intern. Med., 1991, 114, 472. – 23. *Schwartz B.S.* i wsp.: JAMA, 1989, 262, 3431. – 24. *Weiland T.* i wsp.: Beitr. Infusionther., 1992, 30, 92. – 25. *Zawadzka-Tolloczko W.* i wsp.: Neurol. Neurochir. Pol., 1993, 27, 331.

Adres: Klinika Obserwacyjno-Zakaźna AM  
15-540 Białystok, ul. Żurawia 14