

Received: 25.03.2018
Accepted: 26.11.2018
Published: 31.12.2018

Identyfikacja czynników etiologicznych wybranych zakażeń bakteryjnych i wirusowych na podstawie testów serologicznych

Identification of etiological agents of selected bacterial and viral infections based on serological tests

Aleksandra Lewandowicz-Uszyńska¹, Piotr Naporowski², Gerard Pasternak¹,
Danuta Witkowska²

¹III Katedra i Klinika Pediatrii, Immunologii i Reumatologii Wieków Rozwojowych, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu, Oddział Immunologii Klinicznej i Pediatrii, WSS im. J. Gromkowskiego we Wrocławiu

²Laboratorium Mikrobiologii Lekarskiej, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. L. Hirsfelda we Wrocławiu

Streszczenie

Podczas zakażenia odpowiedź układu odpornościowego jest związana z rodzajem patogenu atakującego organizm. We wstępnej odpowiedzi immunologicznej jest wzbudzana szybka, nieskończona metabolicznie i nieswoista odporność wrodzona, a następnie swoista odporność nabyta. W infekcji bakteryjnej wywołanej patogenami wewnątrzkomórkowymi, główną rolę odgrywa odpowiedź komórkowa. W zakażeniach wywołanych przez bakterie należące do patogenów zewnątrzkomórkowych, kluczową rolę odgrywają przeciwciała. Objawy kliniczne zakażeń bakteryjnych i wirusowych są często podobne, dlatego diagnozowanie ich w oparciu o wywiad lekarski i badanie fizykalne, jest niewystarczające. Do identyfikacji czynników etiologicznych zakażeń stosuje się podłoża różnicujące, testy biochemiczne, metody molekularne i diagnostykę serologiczną. Badania polegające na wykrywaniu drobnoustroju lub jego materiału genetycznego można wykonywać już niedługo po wystąpieniu zakażenia. Przy wykrywaniu przeciwciał należy brać pod uwagę określony czas, zwany okienkiem serologicznym, w którym należy pobierać próbki do badań. W diagnostyce serologicznej zakażeń problemem są występujące trudności interpretacyjne wyników. W zakażeniach wywołanych przez *Chlamydia pneumoniae*, wyniki fałszywie dodatnie często spowodowane są występującymi reakcjami krzyżowymi. Natomiast w zakażeniach *Borrelia burgdorferi*, mogą one wynikać z infekcji innymi krętkami, w tym krętkiem błędym, EBV czy HIV. Wyniki fałszywie ujemne w diagnostyce infekcji bakteryjnych, mogą być skutkiem podania antybiotyków przed pobraniem próbki surowicy czy z powodu braku lub słabej odpowiedzi humoralnej. W przypadku diagnozowania infekcji wirusowych, wyniki fałszywie dodatnie występują przy towarzyszących zakażeniach innymi wirusami, zwłaszcza z tej samej rodziny. Powodem błędnych wyników są także koinfekcje bakteryjne czy pierwotniakowe oraz schorzenia autoimmunizacyjne. W zakażeniach wirusowych wyniki fałszywie ujemne są spowodowane wczesną fazą rozwoju infekcji. Celem prawidłowego zdiagnozowania zakażenia, konieczny jest dobór właściwej metody, precyzja jej wykonania i odpowiedni czas pobrania materiału do badań.

Słowa kluczowe: testy serologiczne • immunoglobuliny • zakażenie • bakterie • wirusy

Summary

The human immune system's response to infection is closely related with the type of pathogen. First, a rapid, metabolically inexpensive and non-specific innate immunity is induced, then a specific acquired immunity is activated. In bacterial infections caused by intracellular pathogens, the main role is played by cellular response. In infections caused by bacterial extracellular pathogens, a crucial role is played by antibodies. The clinical symptoms of bacterial and viral infections very often are similar, which is why diagnosing them based only on medical history and physical examination is insufficient. To identify the etiological factors of infections differentiating media, biochemical tests, molecular methods and serological tests are used. The detection of microorganisms or their genetic material can be performed within a short time after the occurrence of an infection. The detection of antibodies is possible only in the appropriate time called the serological window. In a serological diagnostic of infections there are problems with an appropriate interpretation of obtained results. Cross-reactivity can give false positive results for the diagnosis of *Chlamydomydia pneumonia* infection. The problem with the detection of *Borrelia burgdorferi* infection can be caused by a simultaneous coinfection with different spirochetes, syphilis, mononucleosis or HIV. In serological diagnostics of bacterial infections, the administration of antibiotics to patients before taking serum samples can be responsible for false negative results. Another reason for such results can be a weak humoral response in infected patients. In viral infections, false positive results can be caused by a coinfection of different viruses, especially from the same family or by bacterial or protozoal coinfections or by autoimmune diseases. False-negative results in viral infections often are caused by the early phase of an infection. To properly recognize an etiological factor of infection it is necessary to use an appropriate method, precision of test and collect samples at the appropriate time.

Keywords: serological tests • immunoglobulins • infections • bacteria • viruses

GICID 01.3001.0012.8266
DOI: 10.5604/01.3001.0012.8266
Word count: 7762
Tables: 2
Figures: –
References: 97

Adres autorki: dr hab. Danuta Witkowska, Laboratorium Mikrobiologii Lekarskiej, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. L. Hirszfelda we Wrocławiu, ul. R. Weigla 12, 53-114 Wrocław; e-mail: witkows@iitd.pan.wroc.pl

WSTĘP

W zakażeniach pochodzenia bakteryjnego odpowiedź układu immunologicznego przebiega w odmienny sposób niż w infekcjach wirusowych. Bakterie, zależnie od tego czy są to patogeny wewnątrzkomórkowe czy zewnątrzkomórkowe, wzbudzają u człowieka inny typ odpowiedzi odpornościowej. W przypadku patogenów wewnątrzkomórkowych główną rolę odgrywa odpowiedź komórkowa, czyli komórki NK (NK – natural killer), makrofagi i limfocyty cytotoksyczne Tc (Tc – cytotoxic T cells). Natomiast w zakażeniach bakteriami zewnątrzkomórkowymi istotną rolę odgrywają przeciwciała. W zakażeniach zarówno bakteryjnych jak i wirusowych wzbudzone są najpierw mechanizmy odpowiedzi nieswoistej inaczej wrodzonej. Jest to najszybszy i najmniej kosztowny metabolicznie rodzaj wzbudzonej odpowiedzi [26, 81].

W odpowiedzi układu odpornościowego gospodarza na zakażenie wirusowe, główną rolę pełnią limfocyty pomocnicze Th (Th – T helper cells) oraz limfocyty cytotoksyczne Tc. Natomiast za pobudzenie swojej odpowiedzi odpornościowej nabytej odpowiadają komórki dendrytyczne, prezentujące antygen limfocytom T. Ponadto wytwarzane przez organizm interferony- α i - β , poprzez degradację wirusowego materiału genetycznego i hamowanie syntezy białek wirusowych, także zwalczają zakażenia wirusowe [37, 45, 83].

Objawy zakażeń bakteryjnych oraz wirusowych często mają podobny lub taki sam obraz kliniczny, dlatego też diagnozowanie pacjenta w oparciu tylko o wywiad lekarski i badanie fizykalne jest niewystarczające. Należy jednak zawsze uwzględniać to, że długi czas upływający od przyjęcia pacjenta do postawienia diagnozy, może pogorszyć stan zdrowia, a nawet może zagrażać życiu.

Diagnostykę zakażeń bakteryjnych i wirusowych prowadzi się w oparciu o hodowle patogenów, reakcje PCR (PCR – polymerase chain reaction) czy testy immunofluorescencyjne [15, 33, 89, 93]. Celem identyfikacji patogenów, które mogą być czynnikiem etiologicznym zakażeń, stosuje się także podłoża różnicujące, testy biochemiczne, metody molekularne i diagnostykę serologiczną.

Diagnostyka serologiczna zakażeń, opiera się na właściwym scharakteryzowaniu odpowiedzi układu odpornościowego człowieka na infekcję. Jest to możliwe przez oznaczenie w surowicy swoistych przeciwciał w ostrej, przetrwałej lub ozdrowieńczej fazie infekcji i pozwala także na zdefiniowanie stopnia prawidłowości funkcjonowania układu immunologicznego pacjenta. Należy jednak podkreślić, że w każdym przypadku stopień użyteczności metod serologicznych zależy przede wszystkim od klinicznego przebiegu zakażenia. W przypadkach, w których objawy kliniczne zakażenia pojawiają się w tym samym czasie co przeciwciała, wykrycie ich jest bardzo przydatne diagnostycznie i jest potwierdzeniem. Ta metoda badawcza sprawdza się również w przypadku zakażeń, których objawy kliniczne pojawiają się po dłuższym czasie (miesiące, lata) od serokonwersji.

Niemniej jednak, chociaż diagnostyka serologiczna jest powszechnie dostępna, a wyniki oznaczeń uzyskuje się w dość krótkim czasie, mogą występować diagnostyczne trudności interpretacyjne, wynikające z potrzeby zbyt długiego czasu koniecznego do porównania wyników uzyskanych dla próbek surowicy pacjenta z fazy ostrej i ozdrowieńczej zakażenia. Należy również pamiętać, że niektóre zlokalizowane zakażenia mogą wywoływać odpowiedź humoralną organizmu na poziomie niewykrywalnym w stosowanych i aktualnie dostępnych testach. Ponadto, należy także brać pod uwagę i to, że wyniki fałszywie dodatnie mogą występować w silnych reakcjach krzyżowych między antygenami niektórych patogenów oraz u pacjentów z chorobami autoimmunologicznymi. Problem dotyczy również pacjentów po transfuzji lub podaniu preparatów krwiopochodnych. Pacjenci z zaburzeniami układu odpornościowego, pomimo występowania u nich czynnego zakażenia, mogą w surowicy mieć obniżone lub niewykrywalne miano przeciwciał (tab. 1).

Prawidłowa ocena poszczególnych wyników badań, może więc niekiedy sprawiać pewne trudności interpretacyjne. W ocenie wyników badań należy także brać pod uwagę dość szeroko rozpowszechnione zjawisko reaktywności krzyżowej przeciwciał. Zjawisko to wynika zarówno z podobieństwa antygenów stosowanych w testach immunoenzymatycznych, jak i z możliwości występowania wspólnych epitopów dla różnych patogenów [47, 95], a także jest zależne od częstości występowania określonych przeciwciał w zdrowej populacji danego kraju. Wiadomo również, że mimo dostępności do różnorodnych metod diagnostycznych, takich jak: posiewy, wykrywanie obecności antygenów, przeciwciał czy materiału genetycznego drobnoustroju, we

wszystkich zakażeniach np. układu oddechowego czynnik etiologiczny udaje się wykrywać jedynie w 20-60% przypadków [51].

Mimo postępu w diagnostyce laboratoryjnej, jak dotąd brak jest techniki idealnej o uniwersalnym charakterze. Każda ze znanych metod w diagnostyce serologicznej czynników infekcyjnych ma zarówno zalety, jak i wady. Z tego względu zawsze bardzo ważna jest umiejętność wyboru odpowiedniej metody do postaci klinicznej zakażenia i stanu odporności badanej osoby.

ZAKAŻENIA BAKTERYJNE WYWOŁANE PRZEZ: *MYCOPLASMA PNEUMONIAE*, *CHLAMYDOPHILA PNEUMONIAE*, *BORRELIA BURGDORFERI* CZY SZCZEPY Z RODZAJU *YERSINIA*

Często, ze względu na czasochłonność metod diagnostycznych, ustalenie czynnika chorobotwórczego następuje dopiero po wdrożeniu leczenia. Dlatego też identyfikacja czynnika etiologicznego zakażenia i związany z tym wybór celowanej terapii może być dużym wyzwaniem dla klinicysty.

Mikoplazmy, to pozbawione sztywnej ściany komórkowej najmniejsze samoreplikujące się organizmy, zdolne do samodzielnego życia. Brak ściany komórkowej powoduje, że bakterii tych nie można sklasyfikować w sposób konwencjonalny przez barwienie metodą Grama. Mały genom drobnoustroju, zawierający około 687 genów kodujących białko i jego ograniczone zdolności biosyntezy, odpowiadają za jego właściwości biologiczne [89]. Spośród prawie 200 gatunków mikoplazm, gatunkiem najlepiej poznanym jest *Mycoplasma pneumoniae*. Patogen ten może czasowo bytować wewnątrz komórek gospodarza, lecz w przeciwieństwie do *Chlamydomphila pneumoniae*, nie jest drobnoustrojem bezwzględnie wewnątrzkomórkowym. Jest przyczyną zakażeń górnych dróg oddechowych u dzieci i dorosłych, a najczęściej atakuje komórki nabłonka rzęskowego układu oddechowego. Ze względu na bardzo długi czas replikacji (~6 godz.) oraz trudności w uzyskaniu hodowli tych bakterii, przez lata postęp w zrozumieniu właściwości biologicznych *M. pneumoniae* i prawdziwej roli jaką patogen ten odgrywa u ludzi, był znacznie utrudniony. Nie bez wpływu na taki stan rzeczy był wydłużony czas konieczny do przygotowania hodowli drobnoustroju w warunkach laboratoryjnych, zawierający się w przedziale 3-6 tygodni, jak i stosunkowo niewielka czułość i swoistość pierwszych testów serologicznych opartych na reakcji wiązania dopełniacza, które o wiele lepiej nadawały się do mniej złożonych antygenowo patogenów. Ze względu na czas trwania, koszty i ograniczoną dostępność, hodowla była rzadko stosowana jako jedyna metoda w rutynowej diagnostyce zakażeń *M. pneumoniae*. Jeszcze do niedawna, zanim bardziej zaawansowane techniki laboratoryjne stały się dostępne, nie starano się o laboratoryjne potwierdzenie zakażenia tym drobnoustrojem. W związku z brakiem możliwości odróżnienia mikoplazmatycznej infekcji dróg oddechowych od podobnych zakażeń wywołanych przez inne bakterie, np. *Chlamydomphila pneumoniae* czy

Tabela 1. Fałszywie dodatnie i ujemne wyniki badań w przebiegu zakażeń bakteryjnych

Drobnoustroj	Wyniki fałszywie dodatnie	Wyniki fałszywie ujemne
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	w autoimmunizacyjnych zespołach neurologicznych bakteryjnych zapaleniach opon mózgowych zapaleniu trzustki u małych dzieci w przebiegu zakażenia <i>Legionella pneumophila</i>	próbki surowicy zostają pobrane po podaniu antybiotyków w przypadku zakażeń <i>Coxiella burnetii</i>
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	wskutek reakcji krzyżowych (np. <i>Bartonella</i> sp.)	u dzieci poniżej 10 r.ż.
<i>Borrelia burgdorferi</i>	u pacjentów: z kiłą (<i>Treponema pallidum</i>) w zakażeniach innymi krętkami w przebiegu bakteryjnego zapalenia wsierdza, reumatoidalnego zapalenia stawów w mononukleozie zakaźnej w zakażeniach z udziałem riketsji, ehrlichii z zakażeniem <i>Helicobacter pylori</i> z zakażeniem HIV-1 z chorobami autoimmunologicznymi	w przebiegu erythema migrans brak odpowiedzi immunologicznej ze względu na wczesny etap zakażenia (4-6 tydzień od zakażenia)
<i>Yersinia</i> spp.	wskutek reakcji krzyżowych (np. z innymi bakteriami z rodziny <i>Enterobacteriaceae</i> i rodzaju <i>Rickettsia</i>)	zakażenie zlokalizowane z brakiem nasilonej odpowiedzi humoralnej

różne wirusy powodujące zakażenia w obrębie dróg oddechowych, przez lata nie było też możliwości oszacowania częstości występowania zakażeń o etiologii *M. pneumoniae*.

Wiedza uzyskana w ciągu ostatnich kilkunastu lat pozwala na stwierdzenie, że *M. pneumoniae* jest znaczącym patogenem układu oddechowego osób w każdym wieku, który czasami powoduje poważne choroby tego układu, a objawy kliniczne towarzyszące zakażeniu są wynikiem uszkodzenia nabłonka oddechowego gospodarza. Przyleganie bakterii do komórek nabłonka dróg oddechowych indukuje wytwarzanie cytokin i rekrutację do miejsca zakażenia limfocytów oraz różnorodnych komórek zapalnych [89]. Poprzez bezpośrednią migrację bakterii i/lub na skutek odpowiedzi układu odpornościowego, patogen ten może również wywołać istotne klinicznie objawy pozapłucne, takie jak zapalenie zatok, ucha środkowego, ropnie mózgu, zespół Stevensa-Johnsona czy rumień guzowaty [7]. Różnorodność pozapłucnych powikłań zakażenia może być nie tylko wynikiem bezpośredniego rozprzestrzeniania się bakterii do innych narządów, lecz także wynikiem reakcji autoimmunologicznej spowodowanej zjawiskiem mimikry cząsteczkowej [47]. Wynikać to może z podobieństwa antygenowego między glikolipidami bakterii, a lipidami antygenów narządowych oraz inicjowania apoptozy i zmiany antygenowości w wyniku wbudowywania fragmentów błony komórkowej gospodarza do własnej [21, 41]. Mimo coraz

większej dostępności do nowoczesnych metod diagnostycznych, zapalenia płuc wywołane przez atypowe bakterie mogą sprawiać trudności związane z ustaleniem czynnika etiologicznego.

W diagnostyce zakażenia *M. pneumoniae* są stosowane metody serologiczne, które pozwalają na rozróżnienie zakażenia ostrego od przetrwałego [97]. Podczas interpretacji wyników badań serologicznych bardzo ważne jest przede wszystkim określenie stężenia przeciwciał, który należy uznać za diagnostycznie znamienny. Wyznaczenie takiego poziomu utrudnia zwykle obecność przeciwciał u osób w danej populacji, związany zarówno z występowaniem nieswoistych reakcji krzyżowych oraz przeciwciał po przebytych bezobjawowym zakażeniu, czy też przeciwciał poszczepiennych. W diagnostyce serologicznej zakażeń za kryterium występowania aktualnego zakażenia przyjmuje się wykazanie diagnostycznie znamiennej kinetyki przeciwciał, za którą uważa się czterokrotny wzrost lub spadek ich miana w dwóch próbkach surowicy uzyskanych w różnych okresach choroby [72].

Badania serologiczne, wykorzystywane do wykrywania ostrej infekcji wywołanej przez *M. pneumoniae*, obejmują testy immunofluorescencyjne, jak również testy bezpośredniej i pośredniej hemaglutynacji z wychwytywaniem przeciwciał klasy IgM oraz testy aglutynacji cząsteczek przeciwciał i enzymatyczne testy immunologiczne (EIA – enzymatic immunoassay). Najpowszechniej stosowane są testy ELISA (ELISA – enzyme-linked immunosorbent

assay), pozwalające na oznaczanie poziomu poszczególnych klas przeciwciał, a czułość testu może być porównywalna z czułością metody PCR. Dodatkowymi zaletami testów immunoenzymatycznych jest możliwość uzyskania zarówno wyników jakościowych jak i ilościowych, a także możliwość wykonywania badania z wykorzystaniem bardzo niewielkich objętości surowicy.

Opracowane metody EIA pozwalają na oznaczanie zarówno przeciwciał klasy IgM i IgG lub samych IgM. Przeciwciała klasy IgA syntetyzowane są zazwyczaj we wczesnym okresie zakażenia tym patogenem, ale obecnie bardzo niewiele testów dostępnych komercyjnie ma odczynniki do ich wykrywania [90]. Swoiste przeciwciała można wykryć po tygodniu od zachorowania, gdy dochodzi do wzrostu stężenia przeciwciał klasy IgM.

Celem prawidłowego rozpoznania *M. pneumoniae* jako czynnika etiologicznego zakażenia, konieczne jest w odstępie 2-4 tygodni oznaczenie w surowicy pacjentów stężenia przeciwciał w klasie IgG i dopiero wynik świadczący o czterokrotnym wzroście stężenia IgG świadczy o zakażeniu. U dzieci do trzeciego roku życia często obserwuje się niskie miana (najwyższe rozcieńczenie surowicy, które daje nadal wynik dodatni) przeciwciał, a u młodych dorosłych w pierwszej kolejności wzrastają miana IgM, a następnie IgG. U osób dorosłych najczęściej dochodzi do reinfekcji, co przekłada się na znaczący wzrost miana IgG i IgA przy nieznacznym wzroście lub bez zmiany miana IgM. Należy pamiętać, iż przeciwciała IgG mogą być obecne w surowicy pacjentów jeszcze przez długo po wyleczeniu i u tych osób nie mogą być wyznacznikiem ostrej fazy choroby [46, 65, 86, 88].

Ze względu na to, iż u wielu dorosłych pacjentów może nie występować odpowiedź humoralna z przeciwciałami klasy IgM, prawdopodobnie na skutek reinfekcji, nie należy ograniczać diagnostyki tylko do testów jakościowych jednego typu. Ponadto, w czasie trwania reinfekcji przeciwciała IgM mogą się utrzymywać przez dłuższy czas. Ograniczenia dotyczące stosowania wyłącznie diagnostyki serologicznej w ostrych zakażeniach *M. pneumoniae* mogą wynikać z tego, iż w niektórych przypadkach wytwarzanie przeciwciał może być opóźnione [41]. Przeciwciała mogą nie pojawiać się też w ogóle, wskutek upośledzenia odpowiedzi humoralnej wynikającej ze stosowania immunosupresji lub u pacjentów z deficytem odporności dotyczącym syntezy przeciwciał [44]. Wyniki fałszywie ujemne mogą wystąpić jeśli próbki surowicy do badań zostają pobrane po podaniu antybiotyków. Należy także pamiętać, że *M. pneumoniae* może reagować krzyżowo z przeciwciałami przeciwko *Coxiella burnetii* [44].

Metody serologiczne w diagnostyce zakażeń *M. pneumoniae* są użytecznym narzędziem diagnostycznym, gdy prawdopodobieństwo zakażenia mikoplazmami jest bardzo wysokie. Natomiast w pozostałych przypadkach ich przydatność jest mniejsza, chyba że są stosowane jedno-

cznie z innymi metodami diagnostycznymi, takimi jak metody biologii molekularnej.

Zakażenia wywołane przez *Chlamydomphila pneumoniae* występują powszechnie i charakteryzują się sezonowością. Ten zaliczany do bakterii atypowych drobnoustroj, wykazujący swoisty tropizm i aktywność cytotoksyczną w stosunku do nabłonka dróg oddechowych, wywołuje zapalenie oskrzeli, płuc, a także przyczynia się do powstawania i zaostrzenia astmy oskrzelowej. Wyłącznym rezerwuarem drobnoustroju jest człowiek, a źródłem zakażenia są zarówno chorzy jak i bezobjawowi nosiciele. Zakażenia głównie ujawniają się infekcjami dróg oddechowych, często określanymi mianem atypowych. W większości przypadków wywołane chlamydiami zapalenie płuc ma przebieg łagodny, jednak u około 10% pacjentów może przebiegać ciężko, zwłaszcza jeśli zakażenie dotyczy osób w podeszłym wieku ze współistniejącymi chorobami przewlekłymi [38].

Chl. pneumoniae, jako patogen bezwzględnie wewnątrzkomórkowy, może się rozwijać i namnażać w makrofagach, komórkach mięśni gładkich, śródbłonku naczyń krwionośnych i komórkach układu nerwowego. Wywołuje dużą liczbę zakażeń bezobjawowych, o czym świadczy narastanie z wiekiem odsetka osób posiadających swoiste przeciwciała, które występują u 10% dzieci do 5 roku życia i u 50-70% dorosłych [55, 69]. Ferrari i wsp. [18] wykazali, że w grupie młodych dorosłych w wieku 20-44 lata, cechy przebytej infekcji stwierdzono u 58,8% mężczyzn oraz u 39,6% kobiet, a u 10,6% badanych stwierdzono cechy obecnego lub niedawno przebytego zakażenia. Okres wylegania choroby jest długi i trwa około kilka tygodni, a jej początek jest zwykle podostry, infekcja przebiega dwufazowo i w ciągu życia człowieka możliwe są wielokrotne zakażenia [38, 97]. Przebieg kolejnych infekcji jest różny i zależy głównie od stanu immunologicznego pacjenta. W przypadku nosicielstwa, któremu najczęściej towarzyszy infekcja bezobjawowa, chociaż organizm chorego nie wytwarza w tym czasie żadnych przeciwciał, to obecność drobnoustroju można wykryć w materiale biologicznym. Ponadto sugeruje się też związek między zakażeniem wywołanym tą bakterią a chorobami nieinfekcyjnymi, takimi jak: choroba wieńcowa, nadciśnienie tętnicze, zapalenie wsierdza, miażdżyca naczyń krwionośnych, choroba Alzheimera czy stwardnienie rozsiane, a nawet astma [3, 27, 80]. Ze względu na specyficzną diagnostykę, rzeczywista liczba tych zakażeń w Polsce jest niedoszacowana, a dane epidemiologiczne dotyczące liczby zakażeń *Chl. pneumoniae* są zróżnicowane w zależności od stosowanych metod diagnostycznych [14, 38].

W praktyce laboratoryjnej stosowanych jest wiele metod wykrywania *Chl. pneumoniae* i należy do nich zarówno hodowla drobnoustroju w warunkach laboratoryjnych, jak i techniki molekularne, badania serologiczne oraz metody wykrywania antygenów drobnoustroju. Niestety wszystkie te metody cechują się niewielką czułością. Do bardziej czułych, ale zarazem trudniejszych do wyko-

kania, należy hodowla drobnoustroju z użyciem linii komórkowych i w tym celu najczęściej wykorzystywane są linie He-La 229 i Hep-2 HL, BHK-21 [80].

Chl. pneumoniae jest patogenem wewnątrzkomórkowym i dlatego do wzrostu wymaga tryptofanu [38], metoda ta jednak może sprawiać problemy. Metody hodowlane znajdują zastosowanie w diagnostyce ostrych zakażeń, jednak ze względu na ich czasochłonność są rzadko stosowane w praktyce klinicznej [27].

W nowoczesnej diagnostyce zakażeń stosuje się metody genetyczne i to zarówno w zakażeniach ostrych, jak i przewlekłych. W diagnostyce zakażenia *Chl. pneumoniae* z zastosowaniem PCR wykorzystuje się startery wiązane przez gen *ompA* i możliwe jest wykrywanie obecności zarówno żywych, jak i martwych patogenów, co istotnie zmniejsza ograniczenia dotyczące transportu materiału. Natomiast technika reakcji odwrotnej transkrypcji PCR (rtPCR – reverse transcription PCR) wykrywająca mRNA pozwala zidentyfikować jedynie drobnoustroje aktywne metabolicznie [80]. Ma to szczególne znaczenie ze względu na oporność bakterii atypowych na stosowane często antybiotyki beta-laktamowe [27, 38, 78].

W standardowej praktyce do oznaczania miana swoistych przeciwciał w surowicy krwi, najczęściej stosuje się test mikroimmunofluorescencji (MIF) lub metodę ELISA, a także wykonuje się odczyn wiązania dopełniacza (OWD). Metodę MIF, za pomocą której wykrywa się antygeny głównych białek błony patogenu, cechuje wysoka swoistość, ale nie jest jednak łatwa do wykonania. Jednak z powodu podobieństw antygenowych między białkami powierzchniowymi różnych gatunków *Chlamydia* i bakterii Gram-ujemnych, uzyskiwane w teście wyniki mogą też być rezultatem wystąpienia reakcji krzyżowych między przeciwciałami a homologicznymi antygenami i dlatego mogą być obarczone błędem interpretacyjnym [50, 54]. W literaturze znajdują się doniesienia dotyczące występowania krzyżowych reakcji między *Chlamydia pneumoniae* a gatunkami Gram-ujemnych bakterii o dużym polimorfizmie z rodzaju *Bartonella* sp. [50]. Ponadto, testy MIF jako „złoty standard” badań serologicznych, których wyniki referencyjne w przeszłości mogły zostać zawyżone, wciąż pozostają bez standaryzacji i często obserwowane różnice w uzyskiwanych wynikach testów wykonywanych przez różne laboratoria, są skutkiem różnic dotyczących warunków wykonywania testu [48].

W związku z dylematami wynikającymi ze stosowania różnych kryteriów standaryzacji oraz problemami z interpretacją wyników, wiele laboratoriów częściej jednak korzysta z metody ELISA. Należy zauważyć, że test ELISA, w przeciwieństwie do testu mikroimmunofluorescencji MIF, jest stosunkowo prostszy do wykonania, mniej czasochłonny i bardziej obiektywny, a ponieważ jest oparty na odczytach fotometrycznych łatwiej jest zapewnić standaryzację. Nie można jednak zapominać, że w wykrywaniu swoistych przeciwciał metoda ta

w porównaniu z MIF, jest jednak bardziej zawodna [61]. W testach serologicznych największą swoistość uzyskuje się dzięki zastosowaniu jako antygenów ciałek elementarnych pozbawionych lipopolisacharydu. Pozwala to uniknąć wystąpienia krzyżowych reakcji z lipopolisacharydami bakterii jelitowych, które zawierają epitopy wspólne z antygenami chlamydii [41]. Ponadto, dzięki zastosowaniu jako antygenów w teście ELISA białek błony zewnętrznej (MOMP – major outer membrane protein), mających epitopy swoiste jedynie dla *Chl. pneumoniae*, które nie wchodzi w krzyżowe reakcje z innymi gatunkami rodzaju *Chlamydia*, uzyskane wyniki mają znaczną wartość diagnostyczną. Białka swoiste dla *Chl. pneumoniae* obecne w surowicy krwi osób zakażonych mają masę cząsteczkową 42, 43, 46, 50, 52, 53 i 60 kDa. Spośród nich to białka o masie 43, 46, 53 i 76 kDa są zaliczane do immunostymulujących i wykazują swoistość gatunkową w reakcjach z surowicami pacjentów w ostrej fazie zakażenia. Dla tych białek są wytwarzane przeciwciała monoklonalne, które wykorzystuje się w diagnostyce zakażeń *Chl. pneumoniae* [38].

Badania serologiczne znajdują zastosowanie w diagnostyce zakażeń ostrych, przewlekłych oraz są pomocne w rozpoznawaniu przebiegu zakażenia. Istotne znaczenie w ocenie uzyskanych wyników badań ma kinetyka przeciwciał. W fazie ostrej infekcji, przeciwciała w klasie IgM pojawiają się po 2-4 tygodniach a zanikają po 2-6 miesiącach. Przeciwciała w klasie IgG pojawiają się później, najczęściej po 6-8 tygodniach od wystąpienia pierwszych objawów zakażenia [80]. Powszechnie stosowanym kryterium rozpoznania ostrego zakażenia, jest stwierdzenie miana przeciwciał w klasie IgM równego lub większego niż 1:16, natomiast w klasie IgG >1:512 lub stwierdzenie czterokrotnego wzrostu przeciwciał w tej klasie. Wskazane jest powtórzenie badań serologicznych po 2-4 tygodniach [41, 80]. Podczas procesu diagnostycznego należy pamiętać, że w reinfekcji można nie stwierdzić w surowicy pacjenta ponownego występowania przeciwciał w klasie IgM, co wynika z tego, iż zakażenie *Chl. pneumoniae* nie wywołuje trwałej odporności. Należy pamiętać także, że u dużej grupy osób zdrowej populacji, można oznaczyć pewien poziom IgG w surowicy nawet 3-5 lat od przebiecia zakażenia.

W ocenie przebiegu przewlekłego zakażenia tym drobnoustrojem stosuje się oznaczenia przeciwciał w klasie IgA, których miano ulega szybkiemu obniżeniu w prawidłowo prowadzonym leczeniu, natomiast w fazie przewlekłej zakażenia pozostaje stabilnie podwyższone [80]. Hipoteza, iż obecność przeciwciał w klasie IgA świadczy o przewlekłym, przetrwałym zakażeniu, dotychczas pozostaje kwestią sporną. Wiąże się to z tym, iż okres półtrwania przeciwciał w tej klasie wynosi kilka dni, ponadto na oznaczenia poziomu przeciwciał IgA mogą wpływać reakcje krzyżowe ze swoistymi dla *Chl. pneumoniae* przeciwciałami IgG oraz czynnikiem reumatoidalnym lub z przeciwciałami przeciwko innym gatunkom chlamydii, a potencjalnie nawet przeciwko innym mikroorganizmom [3, 13, 34]. Ważne jest też i to, że krzy-

zowe reakcje przeciwciał mogą się pojawić na początku odpowiedzi humoralnej podczas pierwotnego zakażenia chlamydiami lub w trakcie narażenia na zakażenie więcej niż jednym gatunkiem *Chlamydia* [69].

Współcześnie, w związku z wprowadzanymi modyfikacjami metod serologicznych zwiększającymi ich czułość i swoistość, trudności diagnostyczne wynikają raczej ze stosunkowo późnego pojawiania się przeciwciał w surowicy. Istotne problemy diagnostyczne występują u dzieci, gdyż ponad połowa pacjentów w wieku poniżej 10. roku życia nie syntetyzuje swoistych immunoglobulin przeciwko *Chl. pneumoniae* w żadnej z klas [27].

Do zwiększenia wykrywalności zakażeń i prawidłowości oznaczenia czynnika etiologicznego infekcji *Chl. pneumoniae*, często stosuje się jednocześnie kilka metod diagnostycznych, zarówno badania serologiczne jak i metodę PCR. Antygeny lub kwasy nukleinowe *Chl. pneumoniae* mogą być wykrywane w materiałach tkankowych także dzięki zastosowaniu badań immunocytochemicznych lub technik hybrydyzacji *in situ*. Te badania są prowadzone w wyspecjalizowanych laboratoriach i największą ich zaletą jest możliwość wykrywania małych fragmentów *Chl. pneumoniae* w chorych tkankach.

Borrelia burgdorferi sensu lato to kompleks 18 genotypów krętków, które występują u dziko żyjących zwierząt i przenoszone są przez kleszcze. W Europie występują: *B. garinii*, *B. afzelii*, rzadko *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. valaisiana*, *B. lusitanae* i *B. spielmanii*, z czego udowodniono patogenne działanie na człowieka krętków: *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii* i *B. afzelii*. Borelioza klinicznie, zależnie od fazy choroby (wczesna miejscowa - ograniczona, wczesna rozsiana i późna), ujawnia się m.in. przez zmiany skórne we wczesnej fazie choroby (rumień wędrujący, naciek limfocytarny). W późnej fazie mogą wystąpić objawy zapalenia stawów, objawy neurologiczne, zaburzenia kardiologiczne czy stany zapalne oka (keratitis, conjunctivitis) [43, 56, 57, 58]. Odpowiedź immunologiczna na poszczególne antygeny krętka zależy od zaawansowania klinicznego choroby.

Badania serologiczne są odpowiednim rozwiązaniem w rutynowych badaniach laboratoryjnych. Wynik badania zależy od stadium choroby, czasu występowania objawów i ewentualnych wcześniejszych terapii antybiotykowych. W przypadku podejrzenia objawów neurologicznych oznaczenie stężenia przeciwciał IgM i IgG wytwarzanych wewnątrzoponowo jest ważnym kryterium diagnostycznym neuroboreliozy [56]. Diagnostyka serologiczna zakażeń tym drobnoustrojem, obejmuje tzw. „dwuetapowy protokół diagnostyczny” składający się z testów pośrednich, pozwalających na oznaczenie swoistych przeciwciał metodami immunoenzymatycznymi jak ELISA, metoda immunofluorescencyjna (IFT) oraz hemaglutynacja (IHA). Natomiast zalecanym testem potwierdzającym jest immunobloting (Western-blot, Dot-blot) [56, 57, 58].

We wstępnej diagnostyce pacjentów z podejrzeniem boreliozy, w pierwszej kolejności należy wykonać testy przesiewowe. Do tych badań najczęściej używanym testem pośrednim jest ELISA. Uważa się, że zarówno ELISA jak i Western-blot charakteryzują się podobną czułością metody, jednak metoda Western-blot odznacza się lepszą swoistością. Test ELISA natomiast, ze względu na możliwość uzyskania wyników fałszywie dodatnich, charakteryzuje mała swoistość [2, 58]. Wyniki testu przesiewowego zawsze powinny być zweryfikowane w immunoblotingu, a u wszystkich pacjentów z dodatnimi wynikami testów przesiewowych, należy wykonać test potwierdzający metodą Western-blot lub Dot-blot. Dzięki temu możliwe jest postawienie prawidłowego rozpoznania i wykluczenie spośród wszystkich badanych, osób z fałszywie dodatnimi wynikami. Stosowany w diagnostyce boreliozy przesiewowy test ELISA jest zatem badaniem wstępnym, a uzyskanie w tym teście wyników dodatnich nie upoważnia jeszcze do rozpoznania zakażenia i wdrożenia leczenia.

Najczęściej stwierdza się wyniki fałszywie dodatnie dotyczące przeciwciał klasy IgM i jest to związane z obecnością przeciwciał przeciwko antygenowi o masie cząsteczkowej 41 kDa i OspC. Przeciwciała skierowane przeciwko tym antygenom występują także w innych chorobach zakaźnych i niezakaźnych. Dotyczy to m.in. pacjentów z kiłą (*Treponema pallidum*), zakażeń innymi krętkami (*Treponema denticola*, *Leptospira*), w przebiegu bakteryjnego zapalenia wsierdza, czy zakażenia EBV. Są obecne również u pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów oraz w zakażeniach wywołanych przez riketsje, ehrlichie a także w zakażeniu *Helicobacter pylori* czy HIV-1. Występują także u pacjentów z chorobami autoimmunologicznymi (tab. 1) [2, 19, 58].

W zakażeniach drobnoustrojami należącymi do gatunków *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii* czy *B. afzelii*, przeciwciała klasy IgM pojawiają się po 3-4 tygodniach od zakażenia, osiągając najwyższy poziom w 6-8 tygodniu. Przeciwciała w klasie IgG pojawiają się po 4-6 tygodniach od zakażenia, osiągając szczyt w 4-6 miesiącu. Znamienym jest, iż przeciwciała w klasie IgM mogą się utrzymywać do 10 lat po zakończeniu leczenia, natomiast przeciwciała w klasie IgG stwierdza się przez wiele lat z powolną tendencją spadkową.

Metody serologiczne nie stanowią istotnego narzędzia do różnicowania ostrej fazy zakażenia od stanu po przebytej borelioze. Decydujące znaczenie ma obraz kliniczny. Mygland i wsp. [57] w badaniach przeprowadzonych u zdrowej populacji stwierdzili, że uzyskane w teście ELISA wyniki dodatnie świadczące o obecności przeciwciał, zawierają się w przedziale od 5 do ponad 20%.

Na wytworzenie odpowiedzi w zakresie odporności humoralnej układ odpornościowy potrzebuje czasu, dlatego we wczesnej fazie choroby, szczególnie zlokalizowanej, jak chociażby neuroborelioza, wyniki badań dotyczące oznaczenia swoistych przeciwciał mogą być ujemne. Celem postawienia prawidłowego rozpoznania

zawsze jest wskazane powtórzenie badań serologicznych. Ponadto, u pacjentów z masynym zakażeniem, układ odpornościowy może zareagować w nasilony sposób, co prowadzi do powstawania licznych kompleksów immunologicznych, które może nie wykryć test ELISA. Należy też pamiętać, że wczesne zastosowanie antybiotykoterapii może zaburzać odpowiedź humoralną.

Zakażenie *B. burgdorferi sensu lato* nie prowadzi do wytworzenia trwałej odporności. Opisano przypadki ponownego wystąpienia boreliozy i najczęściej dotyczyło to pacjentów na obszarach endemicznych. W celu rozpoznania reinfekcji, oprócz charakterystycznego obrazu klinicznego, istotnym jest wykazanie serokonwersji między fazą ostrą a fazą rekonwalescencji. Do serokonwersji dochodzi najczęściej po 2 tygodniach od zakażenia, niezależnie od tego, czy zastosowano antybiotykoterapię, czy też nie [2, 43, 58].

Jeśli jednak w diagnozowaniu zakażenia wyniki badań serologicznych budzą wątpliwości, zalecane jest powtórzenie testu w czasie rozwoju choroby. Ujemne wyniki testów przesiewowych w stu procentach nie wykluczają istnienia zakażenia *B. burgdorferi*, w początkowej fazie zakażenia (objawy trwające poniżej 30 dni). Test ELISA jest testem bardzo czułym i rzadko daje wyniki fałszywie ujemne.

Spośród 11 gatunków rodzaju *Yersinia* patogenne dla człowieka są: *Yersinia pestis*, *Yersinia pseudotuberculosis* i *Yersinia enterocolitica* [68]. Pałeczki *Y. pseudotuberculosis* i *Y. enterocolitica* różnią się między sobą właściwościami biochemicznymi, co jest podstawą podziału gatunków na poszczególne biotypy (1A, 1B, 2, 3, 4, 5, 6). Na podstawie różnic w budowie antygeny somatycznego O wyróżniono w obrębie gatunku *Y. pseudotuberculosis* 6 grup i 4 podgrupy, podczas gdy w obrębie gatunku *Y. enterocolitica* jest ponad 70 grup serologicznych. Pałeczki *Y. pseudotuberculosis*, bez względu na przynależność do grupy serologicznej, są chorobotwórcze dla człowieka, a chorobotwórczość ich jest związana z inwazyjnością drobnoustrojów, zdolnością do namnażania się w organizmie gospodarza oraz z wytwarzaniem ciepłostajnej toksyny. Patogenne dla człowieka szczepy *Y. enterocolitica* należą głównie do biotypu 2, 3 i 4 oraz grup serologicznych O:3, O:5,27, O:8, O:9, a *Y. enterocolitica* do serogrup I i III [36, 52]. Za proces przylegania i wnikania bakterii do komórek gospodarza oraz oporności patogenu na mechanizmy obronne odpowiadają białka powierzchniowe: adhezyna (białko Yad A), wydzielnicze białka Yop (Yop – *Yersinia* outer proteins) i białka tworzące aparat wydzielniczy Ysc (Yop secretion) [74]. Jersinioza to ostra lub przewlekła, odzwierzęca choroba zakaźna wywoływana przez pałeczki z gatunku *Y. enterocolitica* i rodencjoza albo gruźlica rzekoma w przypadku zakażenia szczepem *Y. pseudotuberculosis*. Coraz częściej obie jednostki chorobowe są opisywane pod wspólną nazwą jersiniozy [36]. Kliniczne jej objawy są bardzo zróżnicowane i najczęściej występującymi postaciami u dzieci są postacie jelitowe, a u dorosłych rzekomowyrastkowe [36, 52]. Z powodu

wielopostaciowości jersiniozy, w celu prawidłowego rozpoznania choroby, badania diagnostyczne obejmują zarówno badania bakteriologiczne, serologiczne, jak i badania z zakresu biologii molekularnej [79].

W łagodnej postaci choroby, odpowiedź humoralna często występuje na niskim lub wręcz niewykrywalnym poziomie obecnie stosowanymi metodami. Jednak w przebiegu jersiniozy, gdy ma postać przewlekłą lub gdy dochodzi do zmian narządowych, pojawiają się we krwi przeciwciała przeciw pałeczkom *Yersinia*, a ich poziom może być zróżnicowany. Wyższy poziom przeciwciał stwierdza się w cięższych zakażeniach, szczególnie o pozajelitowym umiejscowieniu. Najpierw pojawiają się przeciwciała klasy IgM, następnie IgG, a w przypadku nawracających zakażeń lub jersiniozy umiejscowionej pozajelitowo, mogą się pojawiać przeciwciała dla antygenów pałeczek *Yersinia* wyłącznie w klasie IgA, lub IgA i IgG [36].

W diagnostyce serologicznej zakażeń wywołanych przez szczepy *Y. enterocolitica* i *Y. pseudotuberculosis* najczęściej wykorzystywany jest test immunoenzymatyczny ELISA. Oznacza się nim stężenie przeciwciał klasy IgM, IgA i IgG dla wydzielniczych białek Yop (testy komercyjne) lub dla oczyszczonych antygenów O (antygenów lipopolisacharydowych), uzyskanych z tych drobnoustrojów należących do różnych grup serologicznych [4, 11, 28, 71].

W ostrej fazie zakażenia stwierdza się obecność przeciwciał w klasie IgM, a następnie pojawiają się przeciwciała w klasie IgG i IgA. Porównawcze zestawienie wyników oznaczeń swoitych przeciwciał w klasach IgG, IgA i IgM uzyskanych testem ELISA z wykorzystaniem białek Yop, jako antygeny w teście, wykazało większą zgodność i czułość (odpowiednio 89 i 95%), ale mniejszą swoistość (82%) w porównaniu z wynikami uzyskanymi metodą Western-blot dla przeciwciał w tych samych klasach. Analizując także poszczególne oznaczenia stwierdzono, że porównanie ich z wynikami uzyskanymi dla przeciwciał w klasie IgG (79%) i IgA (86%) metodą Western-blot, wskazywało na niewielką swoistość. Natomiast swoistość oznaczenia przeciwciał w klasie IgM w teście ELISA określono na 100% [73]. Potwierdzało to analogicznie rezultaty wcześniejszych badań, które wskazywały na zwiększoną czułość oraz brak swoistości testów ELISA, stosowanych do wykrywania przeciwciał przeciwko *Yersinia*, które interpretowano jako przyczynę oznaczania większej liczby wyników fałszywie dodatnich [4, 73].

Podobnie jak we wcześniej omawianych zakażeniach bakterijnych, diagnostyka serologiczna jersiniozy może być w niektórych przypadkach trudna, zarówno ze względu na pokrewieństwo antygenowe między szczepami *Yersinia*, należącymi do różnych grup serologicznych, jak również z powodu podobieństwa antygenowego między bakteriami należącymi do różnych gatunków. Problemy z właściwą interpretacją wyników badań serologicznych sprawia także podobieństwo do antygenów drobnoustrojów

ustrojów należących do innych przedstawicieli rodziny *Enterobacteriaceae* jak chociażby *Morganella morganii*. Występowanie krzyżowych reakcji wśród drobnoustrojów z rodziny *Enterobacteriaceae* może wynikać m.in. z podobieństwa w budowie ich lipopolisacharydów [4].

W badaniach serologicznych zakażeń zaobserwowano reakcje krzyżowe wynikające z podobieństwa antygenowego między *Y. enterocolitica* O:9 a *Brucella abortus*, *Salmonella* sp., czy też *E. coli* oraz przecinkowcami z rodzaju *Vibrio*, jak również między *Y. enterocolitica* O:3 a patogenami z rodzaju *Rickettsia* [71].

Opisywani są także pacjenci z chorobami tarczycy, u których w surowicy występują przeciwciała nieswoiście reagujące z antygenami pałeczek *Y. enterocolitica* O:3 [4, 5].

Na podstawie analizy wyników badań serologicznych przeprowadzonych wśród dużej grupy pacjentów z niesklasyfikowanym zapaleniem stawów o podejrzanym etiologii bakteryjnej, Noworyta i wsp. [62] wykazali częste występowanie zjawiska krzyżowej reaktywności surowicznych przeciwciał z antygenami *Yersinia* spp., *Salmonella* Enteritidis, *Chlamydia trachomatis* oraz *Borrelia burgdorferi*. Niezależnie od klasy immunoglobulin, w 20,7% surowic pacjentów dochodziło do współwystępowania przeciwciał swoistych względem badanych drobnoustrojów. Najczęstsze reakcje krzyżowe przeciwciał w badanej grupie dotyczyły przeciwciał klasy IgG rozpoznających epitopy antygenów *Yersinia* spp. + *S. Enteritidis*, stwierdzone u ponad 23% badanych oraz *Yersinia* spp. + *B. burgdorferi* u 12,5% [62]. Opisywane są także krzyżowe reakcje ze swoistymi przeciwciałami dla *Brucella*, *Chlamydia pneumoniae*, *Bartonella henselae*, *Rickettsia rickettsii* oraz *Francisella tularensis*. U pacjentów chorych na ReZS (odczynowe zapalenie stawów) z obecnością w surowicy czynnika RF oznaczenie swoistych przeciwciał przeciwko *Yersinii* w klasie IgM może dawać fałszywie dodatnie wyniki. Każdy więc z wymienionych drobnoustrojów wywołuje różnorakie objawy chorobowe, ale zapalenie stawów może zarówno towarzyszyć wszystkim tym infekcjom, jak i być przyczyną ReZS.

Podstawową zasadą interpretacji oznaczeń serologicznych przeciwciał surowicznych jest to, że jedynie obecność przeciwciał klasy IgG + IgA/IgM ma znaczenie diagnostyczne. Niewielki odsetek przeciwciał dla *Yersinia* spp. jedynie w klasie IgA, dowodzi raczej infekcji błon śluzowych, ale może wskazywać również na aktywny, niedawny, jak i przewlekły proces infekcyjny [62]. Dysponując wiedzą dotyczącą wysokiego stopnia krzyżowej reaktywności przeciwciał dla *Yersinia* spp., zawsze wskazane jest zastosowanie metody potwierdzającej uzyskany wynik dodatni metodą Western-blot. Ponadto, diagnostyka serologiczna zakażeń wymaga również ścisłej korelacji z obrazem klinicznym oraz dokładnie przeprowadzonym wywiadem lekarskim.

Wykazano także, iż błona zewnętrzna ściany komórkowej pałeczek *Yersinia* ma specyficzne miejsca wiązania dla tyreotropiny TSH [23]. Na skutek zakażenia dochodzi do

wytwarzania przeciwciał skierowanych nie tylko przeciw bakteriom, lecz także przeciwko tym miejscom wiązania TSH, które rozpoznają i stymulują receptory TSH na błonach komórkowych tarczycy [49]. Wolf i wsp. [96] wykazali, że immunoglobuliny klasy IgG pacjentów po przebytej infekcji *Yersinia enterocolitica* reagują z TSHR (receptorami TSH).

W chorobie Gravesa-Basedowa przeciwciała w klasie IgG przylaczają się do błon komórkowych *Yersinia* [31]. W ten sposób zakażenie *Yersinia*, pod wpływem istnienia zjawiska mimikry molekularnej czyli podobieństwa/homologii z antygenami własnymi, może wywoływać krzyżową reakcję z przeciwciałami przeciwko receptorowi TSH, co w połączeniu z reagującymi krzyżowo komórkami T prowadzi do wystąpienia autoimmunologicznego zapalenia tarczycy [82]. Występowanie przeciwciał swoistych względem pałeczek *Yersinia* obserwowane u osób z nadczynnością tarczycy, jest prawdopodobnie spowodowane reakcjami krzyżowymi między przeciwciałami przeciw pałeczkom *Y. enterocolitica* i epitelialnymi komórkami tarczycy. Wykazano również, że w błonie zewnętrznej ściany komórkowej pałeczek *Y. enterocolitica* znajdują się dwa małe białka o masie cząsteczkowej 5,5 i 8 kDa, zawierające epitopy identyczne do tych znajdujących się w receptorach TSHR tkanki tarczycowej tyreotropiny, które reagowały z immunoglobulinami osób chorych. Należy jednak wspomnieć, że opublikowane są również dane, które nie potwierdzają tezy o udziale zakażeń pałeczkami *Yersinia* w wywołaniu autoimmunologicznej choroby tarczycy.

ZAKAŻENIA WIRUSOWE, W KTÓRYCH CZYNNIKAMI ETIOLOGICZNYMI SĄ WIRUSY: EPSTEINA-BARR (EBV), CYTOMEGALII (CMV), HIV I HEPATOTROPOWE

Wirus Epsteina-Barr (EBV), inaczej ludzki herpeswirus 4 (HHV-4 – *Human Herpes Virus 4*) należy do rodziny *Herpesviridae*. Występuje powszechnie, u około 90% osób dorosłych na całym świecie stwierdza się występowanie przeciwciał przeciwko temu wirusowi. U dzieci z prawidłową funkcją układu odpornościowego ostra infekcja przebiega zazwyczaj bezobjawowo, natomiast u 30-50% immunokompetentnych dorosłych i młodzieży objawia się jako mononukleozą zakaźną [32, 60]. Natomiast u pacjentów z obniżoną odpornością, zakażenia wirusem Epsteina-Barr są związane z różnymi zaburzeniami o charakterze limfoproliferacyjnym oraz niektórymi chorobami nowotworowymi, jak chłoniak Burkitta oraz rak jamy nosowo-gardłowej [12].

W diagnostyce serologicznej zakażeń EBV, stosuje się wiele różnych testów obejmujących metody nieswoiste, do których należy od dawna stosowany test do wykrywania antygenów heterofilnych. Ponadto, stosuje się również testy do oznaczania swoistych przeciwciał, do wykonania których używa się różnych metod, różnych podłoży, różnych antygenów oraz różnych kryteriów interpretacyjnych, co niestety wiąże się z tym, że swoiste testy nie są standaryzowane. W diagnostyce zakażeń EBV wykorzystuje się również metody molekularne i immunohistochemiczne.

Zastosowanie odpowiedniej strategii diagnostycznej różni się między pacjentami immunokompetentnymi i osobami z niedoborami odporności. Jak wiadomo, czas potrzebny do zastosowania skutecznego leczenia, jest głównym czynnikiem w przypadku pacjentów z obniżoną odpornością. Zastosowana metoda diagnostyczna musi zatem spełniać kryteria, takie jak wczesne wykrycie replikacji EBV i wysoką dodatnią wartość predykcyjną dla danej choroby, umożliwiając terapię profilaktyczną [32]. Wspominane przeciwciała heterofilne nie są przeciwciałami specyficznymi dla EBV i mogą ulegać aglutynacji z komórkami innych gatunków zwierzęcych. Dawniej, wykorzystywano je głównie w diagnostyce mononukleozy, obecnie wiadomo, że chociaż rzadko, to jednak wykrywane są one również w innych chorobach [42]. Mimo tych ograniczeń, wykrywanie przeciwciał heterofilnych może być pomocne w infekcji pierwotnej, przede wszystkim ze względu na prostotę używanych w tym celu testów [12]. Antygenami wirusa, pomocnymi w odróżnieniu aktualnego zakażenia od seronegatywności lub przebytej infekcji są: antygen kapsydowy VCA (VCA – viral capsid antigen), antygen jądrowy EBNA (EBNA – Epstein-Barr nuclear antigen), antygen wczesny EA (EA – early antigen) oraz antygen osłonki MA (MA – membrane antigen). Zaledwie trzy parametry serologiczne konieczne są do wykrycia swoistych przeciwciał przeciw EBV u osób immunokompetentnych na podstawie jakościowego oznaczenia VCA w klasie IgG i IgM i EBNA-1 w klasie IgG.

Do rutynowych badań przesiewowych w kierunku obecności antygenów wczesnego EA w klasie IgG, VCA w klasie IgG i IgM powszechnie stosuje się testy immunofluorescencyjne IFA (IFA – immunofluorescence assay) lub testy immunoenzymatyczne z enzymatycznym odczytem immunoadsorpcyjnym (ELISA) i immunologiczny test chemiluminescencji CLIA (CLIA – chemiluminescent immunoassay) lub nowsze testy MFI (MFI – multiplex flow immunoassay). Wspominane testy wykazują różnice w czułości oraz swoistości, co prawdopodobnie wynika z różnic w typach samych testów oraz rodzajach antygenów do nich przygotowywanych. Dzięki nowszym testom typu CLIA wykorzystującym syntetyczne peptydy o różnych wartościach granicznych stężeń dla VCA IgM i EBNA-1 IgG możliwe jest lepsze różnicowanie stadium zakażenia. Ponadto w przypadku jednoczesnego uzyskania dodatnich wyników na obecność przeciwciał EBNA-1 IgG, VCA IgG i IgM, testy CLIA mogą być pomocne w różnicowaniu niedawnego (faza przejściowa) od przebytego zakażenia czy reaktywacji [30].

W trakcie procesu diagnostycznego zakażenia ważne jest potwierdzenie swoistości przeciwciał VCA IgM, ze względu na możliwość uzyskania wyników fałszywie dodatnich [24, 91], w przebiegu zakażenia innymi patogenami, takimi jak: CMV, parwovirus B19, *Toxoplasma gondii*, wirus zapalenia wątroby typu A lub HIV [20, 25, 33, 39, 63, 64]. Wykazano, że pierwotne zakażenie CMV często powoduje wystąpienie odpowiedzi układu odpornościowego w postaci syntezy przeciwciał anty-IgM

EBV [35] oraz krzyżowej reaktywności przeciwciał przeciwko epitopom konserwatywnym, takim jak wspólne dla EBV i CMV epitopy glicyna-alanina, powszechne dla herpeswirusów [12]. W niektórych badaniach wykazano występowanie do około 50% VCA IgM u pacjentów z zakażeniem w przeszłości, co może być spowodowane reaktywacją nieswoistą [76]. W takim przypadku wynik pozytywny należy potwierdzić np. metodą immunoblottingu dla EBV IgM [39]. W niektórych sytuacjach pomocnym może być wykonanie testów w kierunku reaktywności krzyżowej lub występowania poliklonalnych przeciwciał w klasie IgM. Dzieje się tak zwłaszcza w czasie infekcji CMV i parwovirusem B19, dlatego też w poszczególnych przypadkach pomocnym staje się wykonanie badania na obecność DNA wirusa CMV lub parwovirusa B19 [Health Protection Agency]. Reakcje fałszywie dodatnie mogą wynikać z obecności auto-przeciwciał lub czynnika reumatoidalnego, dlatego przydatnym może być poszukiwanie takich czynników zakłócających (tab. 2).

Należy jednak podkreślić, że zimne aglutyniny, czynnik reumatoidalny i autoprzeciwciała można wykrywać przez krótki okres w trakcie przebiegu mononukleozy o etiologii EBV. Wynika to z poliklonalnej aktywacji komórek B [9], dlatego obecność czynnika reumatoidalnego nie oznacza automatycznie fałszywie dodatniego wyniku VCA IgM. Wreszcie, obecność dodatnich EBNA-1 w klasie IgG u pacjentów z pierwotnym zakażeniem, może również wynikać z nieswoistej reaktywności, co można potwierdzić metodą immunoblottingu [39]. Ponadto, opracowane w ostatnim czasie testy enzymatyczne (EIA) na obecność przeciwciał EBNA-1 IgG, oparte na rekombinowanych lub syntetycznych peptydach, mogą być bardziej czułe niż testy dotychczasowe i mogą umożliwić wczesną identyfikację tych przeciwciał już na początku pierwotnego zakażenia wirusem EBV [39].

Ludzki wirus cytomegalii CMV należy do rodziny *Herpesviridae* (HHV-5 – *Human Herpes Virus 5*) i podobnie jak inne wirusy z tej rodziny, charakteryzuje się zdolnością do rozwinięcia latencji, tym samym z możliwością do reaktywacji w przyszłości. Człowiek stanowi rezeruar dla ludzkiego wirusa cytomegalii, przez co wirus ten występuje powszechnie. Transmisja zachodzi w wyniku bliskiego kontaktu z osobą zakażoną lub z jej wydzielinami, ponadto zakażenie może się szerzyć drogą krwiopochodną, jatrogeną, a także horyzontalną. Okres wylegania wynosi 20-60 dni, u około 90% zakażonych nie występują objawy kliniczne lub stwierdza się niecharakterystyczne objawy, tzw. grypopodobne. W rzadkich przypadkach obserwuje się objawy zespołu mononukleozopodobnego. Ciężki przebieg kliniczny mogą mieć zakażenia drogą parenteralną (przetoczenie krwi, przeszczepienie narządów – zwłaszcza u chorych w immunosupresji), rzadziej stwierdza się zapalenie mięśnia sercowego, stawów lub mózgu [1].

Powszechnie w diagnostyce zakażeń wirusem CMV stosowane są testy serologiczne, najczęściej wykorzystujące metodę ELISA do oznaczania swoistych dla CMV przeciw-

Tabela 2. Fałszywie dodatnie i ujemne wyniki w przypadku wykrywania zakażeń wirusami EBV, CMV, HIV, HAV i HCV

Wyniki fałszywie dodatnie	Wyniki fałszywie ujemne	Zalecane testy w sytuacjach trudnych
Wirus Epsteina-Barr (EBV)		
w przebiegu zakażeń wirusowych: CMV parwowirusem B19 WZW typu A HIV w przebiegu zakażeń bakteryjnych: krętkami <i>Helicobacter pylori</i> , w bakteryjnym zapaleniu wsierdza w przebiegu zakażeń pierwotniakiem <i>Toxoplasma gondii</i> w schorzeniach autoimmunizacyjnych (obecności autoprzeciwciał lub czynnika RF)	wczesna faza zakażenia neuroborelioza uogólnione ciężkie zakażenia u dzieci poniżej 5 r.ż. u pacjentów z pierwotnymi niedoborami odporności	hybrydyzacja <i>in situ</i> PCR oraz real-time PCR
Wirus cytomegalii (CMV)		
obecność przeciwciał przeciwko innym wirusom np. z rodziny <i>Herpesviridae</i> (wirus opryszczki typu 6)	pierwotne niedobory odporności z deficytem przeciwciał	real-time PCR
Wirus ludzkiego niedoboru odporności (HIV)		
choroby autoimmunologiczne choroba Sjögrena, TRU limfoproliferacyjne - białaczki, chłoniaki infekcyjne - kiła choroby społeczne - alkoholizm u dzieci - do 12-15 miesięcy	wczesny etap inkubacji wirusa końcowe stadium AIDS	ELISA czwartej generacji Western-blot badania RNA PCR
Wirusy hepatotropowe		
Wirus zapalenia wątroby typu A (HAV)		
po szczepieniu przeciwko HAV		przeciwciała anty-HAV IgG – przydatne w ocenie epidemiologicznej HAV-Ag i real time PCR wirusa HAV – wykonywane bardzo rzadko
Wirus zapalenia wątroby typu C (HCV)		
u pacjentów z zaburzoną odpornością (np. w przewlekłej niewydolności nerek) w krioglobulinemii w szpiczaku mnogim w koinfekcji HIV, HBV w przewlekłej białaczce limfatycznej w innych chorobach nowotworowych w reumatoidalnym zapaleniu stawów w autoimmunologicznym zapaleniu wątroby w innych chorobach autoimmunologicznych (np. lupus erythematosus systemicus) w innych schorzeniach wątroby (hemosyderoza, hemochromatoza) w następstwie szczepienia przeciwko grypie w przewlekłej steroidoterapii u ciężarnych	mimo potwierdzenia obecności wirusa w organizmie nie dochodzi do wytworzenia przeciwciał wykrywanych testami przesiewowymi u pacjentów z immunosupresją, dializowanych, z agammaglobulinemią (brak syntezy przeciwciał anty-HCV)	HCV metodą PCR jakościowo i ilościowo

ciał w klasach IgM i IgG. Wysokie miano przeciwciał IgM z dużym prawdopodobieństwem wskazuje na pierwotną infekcję, przeciwciała te są obecne w krążeniu w najwyższym stężeniu od pierwszego do 3 miesiąca od zakażenia, później stopniowo zanikają. W niektórych przypadkach stwierdza się obecność tych przeciwciał po 12 miesiącach od zakażenia, przez co trudniejszym u tych pacjentów staje się rozpoznanie tzw. „ostrej fazy” infekcji. Słaby dodatni wynik oznaczenia IgM może świadczyć o wystąpieniu ostrej infekcji wtórnej, dlatego stwierdzenie obecności samych przeciwciał w tej klasie nie świadczy o tym, czy jest to pierwotne zakażenie, czy reaktywacja endogenego zakażenia utajonego. Niewielki odsetek zakażonych noworodków czy chorych w immunosupresji, może nie wytwarzać anty-CMV IgM, natomiast wykrywa się je u około 10% pacjentów z nawracającymi zakażeniami [53, 59].

W badaniach przesiewowych pomocnych informacji dostarcza badanie w kierunku obecności wczesnego antygenu CMV, a czas konieczny do wykonania oznaczania to 5-6 godzin i jest znacznie krótszy niż trwająca 6-10 dni hodowla wirusa [85]. Miano przeciwciał w klasie IgG narasta wolniej, a po osiągnięciu maksimum obniża się, utrzymując się przez całe życie [91, 92]. Wyróżnia się wiele różnych testów do wykrywania przeciwciał przeciwko CMV w klasie IgG, wśród nich są odczyn wiązania dopełniacza, enzymatyczny test immunosorpcyjny ELISA, test ACIF (ACIF – anti-complement immunofluorescence), testy radioimmunologiczne i hemaglutynacji pośredniej [60, 77].

Ze względu na trudności diagnostyczne dotyczące dostępności testów do oznaczania przeciwciał klasy IgM, w niektórych populacjach do różnicowania infekcji pierwotnych od niepierwotnych, wykorzystywany jest test zachłanności (awidności) IgG. Test ten pozwala na ustalenie fazy zakażenia na podstawie oznaczenia siły wiązania przeciwciał IgG z antygenami wirusa. Termin ten oznacza wypadkową sił oddziałujących między całymi cząsteczkami przeciwciał i antygenem wirusa, uwzględniając przede wszystkim ich wartościowość oraz inne czynniki. Testy są oparte na spostrzeżeniu, że przeciwciała IgG o niskiej awidności występują w ciągu kilku pierwszych miesięcy po zakażeniu, a ich zachłanność wzrasta w czasie odzwierciedlając dojrzewanie odpowiedzi immunologicznej. Zatem wysoka awidność anty-CMV IgG oznacza długotrwałe zakażenie u diagnozowanego pacjenta [75]. Wyniki fałszywie dodatnie oraz reakcje krzyżowe z antygenami CMV, mogą wynikać z obecności przeciwciał przeciwko innym wirusom z rodziny *Herpesviridae*, takim jak wirus opryszczki typu 6 i wirus Epsteina-Barr (tab. 2).

Diagnostyka zakażeń wirusem HIV jest oparta na wykrywaniu białka p24 wirusa i wykrywaniu przeciwciał anty-HIV, co roku uaktualniana w postaci rekomendacji Polskiego Towarzystwa Naukowego AIDS.

Zgodnie z zaleceniami unijnymi i biorąc pod uwagę potencjalne możliwości zakażenia HIV drogą płciową czy

poprzez krew, należy zawsze przeprowadzać szczegółowy wywiad lekarski z każdym pacjentem, który ukończył 15 lat i zwrócić uwagę na prawdopodobne sposoby zakażenia oraz poinformować o możliwości wykonania anonimowego badania diagnostycznego na obecność zakażenia [17]. Diagnostykę należy podjąć również w wielu innych przypadkach, takich jak nietypowy przebieg chorób czy nawracające lub nie-poddające się leczeniu zakażenia innymi patogenami. Jako pierwszy test diagnostyczny zakażenia HIV zaleca się tzw. test IV generacji polegający na wykryciu antygenu p24 HIV (po nie mniej niż 2 tygodniach od potencjalnego zakażenia) oraz przeciwciał anty-HIV 1/2 (po 4-12 tygodniach) [10]. Antygen p24 w stanie wolnym występuje w surowicy osób zakażonych jeszcze przed serokonwersją. Wykrycie tego białka jest możliwe dzięki wprowadzeniu do fazy stałej przeciwciała monoklonalnego anty-p24, tym samym można wykryć zakażenie jeszcze przed pojawieniem się swoistych przeciwciał dla wirusa [66]. Obecnie nie zaleca się wykonywania testów III generacji, gdyż nie umożliwiają wykrycia zakażenia we wczesnym stadium (nie umożliwiają wykrycia antygenu p24 przy braku przeciwciał anty-HIV). Ujemny wynik, po upływie 12 tyg. od ekspozycji pozwala wykluczyć zakażenie HIV. Dodatnia wartość predykcyjna pojedynczego testu przesiewowego wymaga testu potwierdzenia. Taki test powinien umożliwiać wykrycie przeciwciał anty-HIV 1/2 oraz ich rozróżnienie. Test potwierdzenia nie może być pierwszym i jedynym testem zlecanym w przypadku podejrzenia zakażenia HIV [84].

Na wyniki badań diagnostycznych mogą wpływać różne czynniki interferujące. Celem uniknięcia wyników fałszywych należy pamiętać o podstawowych zasadach, tj. obchodzenie się z materiałem pobranym od pacjenta we właściwy sposób (nie podgrzewać, nie rozmrażać wielokrotnie) oraz nie pomylić próbek krwi. Jeśli w próbce pobranej od pacjenta występuje zbyt niskie stężenie przeciwciał anty-HIV, ze względu na niewytworzenie ich przez organizm lub test nie został wykonany poprawnie, można otrzymać wynik fałszywie ujemny. Wyniki takie otrzymuje się również w przypadku zbyt krótkiego czasu inkubacji wirusa czy końcowej fazy AIDS [70]. Zakażenie wirusami hepatotropowymi, herpeswirusami, pierwotniakiem *Toxoplasma gondii*, czy bakteriami *Treponema pallidum* zwiększają możliwość wystąpienia wyniku fałszywie dodatniego. Wyniki takie można również otrzymać u kobiet w ciąży, u osób po przeszczepie narządów, przetaczaniu krwi i immunoglobulin. Inne możliwe przyczyny dające fałszywe wyniki testów diagnostycznych w kierunku zakażeń HIV podano w tabeli 2 [33]. W diagnostyce rutynowej zakażeń HIV testy molekularne (HIV-1 RNA) nie są zalecane. Niekiedy jednak, np. w podejrzeniu pierwotnego zakażenia HIV, w tym ostrej choroby retrowirusowej, ze względu na potrzebę ustalenia pilnie rozpoznania, można je postawić w oparciu o wynik badania molekularnego [33].

Mimo wprowadzenia szczepień profilaktycznych przeciwko wirusowemu zapaleniu wątroby (WZW typu A i B)

oraz poprawy warunków sanitarnych i większej świadomości konieczności przestrzegania warunków aseptyki, zakażenia wirusami hepatotropowymi, nadal stanowią istotny problem na świecie. Dlatego też wiele uwagi należy poświęcać na precyzyjną diagnostykę tych zakażeń. Niektóre z tych zakażeń bardzo długo mogą występować pod postacią infekcji bezobjawowych (HBV, HCV, HDV, HEV).

Diagnostyka ostrego zakażenia HAV opiera się wyłącznie na testach przeprowadzanych metodą immunochemiczną, które pozwalają wykryć przeciwciała anty-HAV. Swoiste przeciwciała anty-HAV w klasie Ig-M pojawiają się we krwi w 14 dniu zakażenia i osiągają maksymalne miano w ostrej fazie choroby, utrzymując się jeszcze przez 3-6 miesięcy, po czym zanikają. Dodatni wynik na obecność przeciwciał anty HAV klasy IgM jest swoisty i w pełni diagnostyczny dla wirusowego zapalenia wątroby typu A (WZW A). Jednocześnie wytwarzane są przeciwciała klasy IgG, które w ustroju pozostają do końca życia, świadcząc o przebytym zakażeniu. Możliwe jest wystąpienie przeciwciał klasy IgM przeciwko wirusowi HAV po szczepieniu przeciwko temu zakażeniu (wynik fałszywie dodatni).

Rutynowa diagnostyka zakażenia HBV polega na oznaczaniu we krwi następujących antygenów i przeciwciał, których profil świadczy o aktywnej lub przebytej infekcji. Są to antygen HBs (HBsAg), HBe (HBeAg) oraz przeciwciała anty-HBc, anty-HBe, anty-HBs. Nie ma możliwości wykrycia we krwi antygeny rdzeniowego HBc, jest on obecny w hepatocytach. Dalszym etapem diagnostyki zakażenia HBV jest badanie molekularne metodą real-time PCR, które umożliwia wykrycie HBV DNA we krwi. Określenie poziomu HBV DNA pozwala na ustalenie wskazań do włączenia leczenia przeciwwirusowego u pacjentów z przewlekłym zakażeniem. Trwają badania nad nowymi markerami serologicznymi HBV, co może mieć znaczenie w monitorowaniu zakażenia HBV u osób leczonych przeciwwirusowo. Takim nowym markerem serologicznym może być HBcrAg, który jest złożony z HBcAg, HBeAg i białka prekursorowego prek22. HBcrAg wykazuje dobrą korelację z wewnątrz-wątrobowym cccDNA, z całkowitym DNA HBV, DNA HBV w surowicy i w mniejszym stopniu z antygenem powierzchniowym HBV (HBsAg). W przypadku, gdy poziom DNA HBV lub HBsAg w surowicy staje się niewykrywalny, HBcrAg nadal utrzymuje się na poziomie umożliwiającym jego wykrycie [15].

Ostre bądź niedawno nabyte zakażenie można odróżnić od przewlekłego na podstawie obecności przeciwciał anty-HBc klasy IgM. Są wykrywane na początku ostrego zapalenia wątroby typu B i utrzymują się do 6 miesięcy od ustąpienia zapalenia [40]. U pacjentów z przewlekłym zapaleniem wątroby przeciwciała IgM anty-HBc utrzymują się na niskim poziomie i mogą nie zostać wykryte testami serologicznymi, jednak przy zastrzeżonym przebiegu zapalenia mogą dawać wynik dodatni. Pozytywna wartość predykcyjna tego testu u osób bez objawów jest

mała, dlatego powinien być przeznaczony dla osób ze zdiagnozowanym ostrym zapaleniem wątroby lub osób powiązanych z ludźmi zakażonymi HBV. U niektórych osób jedynym markerem, który jest wykrywany to anty-HBc. Dodatni wynik tego testu może świadczyć o:

- wyzdrowieniu i spadającym poziomie przeciwciał anty-HBs, najczęściej w populacjach o bardzo częstym występowaniu zakażenia,
- zakażeniu przewlekłym, w którym HBsAg nie jest wykrywany przez komercyjne testy serologiczne, najczęściej w populacjach o bardzo częstym występowaniu oraz u osób zakażonych HIV lub HCV,
- wyniku fałszywie pozytywnym [29]. W populacjach o niskiej zachorowalności na zapalenie wątroby typu B, przeciwciała anty-HBV można znaleźć u 10-20% osób, z których większość wykazuje pierwotną odpowiedź po szczepieniu przeciw wirusowemu zapaleniu wątroby typu B (anty-HBs). HBeAg można wykryć u pacjentów z ostrym lub przewlekłym zakażeniem HBV. Obecność antygeny HBe lub przeciwciał anty HBe stała się podstawą nowej klasyfikacji zakażenia HBV i markery te są ściśle związane z wielkością replikacji HBV [15].

Zakażenia HCV u ludzi diagnozuje się przez badanie przeciwciał anty-HCV w surowicy pacjentów za pomocą testu immunoenzymatycznego (EIA). Wyniki testu mogą być negatywne w przypadku braku zakażenia, wczesnej fazy zakażenia lub u pacjentów z głęboką immunosupresją. Po eliminacji HCV samoistnej lub w wyniku leczenia przeciwwirusowego przeciwciała anty-HCV zazwyczaj utrzymują się latami, czasami spadają do bardzo niskiego poziomu bądź zanikają całkowicie [8]. Badania molekularne metodą PCR pozwalają na określenie aktywnej replikacji HCV przez wykrycie wirusowego RNA, jakościowo lub ilościowo. Ilościowe badanie HCV RNA jest jednym z niezbędnych badań u pacjentów kwalifikowanych do leczenia przeciwwirusowego oraz monitorowania skuteczności tego leczenia [87]. Markerem replikacji HCV jest również antygen rdzeniowy występujący w surowicy i w osoczu (HCVAg). Podobnie jak HCV RNA może służyć monitorowaniu skuteczności leczenia przeciwwirusowego, jednak charakteryzuje się mniejszą czułością. Jest rekomendowany gdy nie ma możliwości badania HCV RNA [16, 22]. U części pacjentów z ostrym zapaleniem wątroby typu C można uzyskać początkowo ujemny wynik badania serologicznego, m.in. z powodu okna serologicznego [6, 16].

Fałszywie dodatnie wyniki testów przesiewowych w kierunku HCV mogą wystąpić u pacjentów z zaburzoną odpornością np.: u pacjentów z przewlekłą niewydolnością nerek, krieglobulinemią, w przebiegu szpiczaka mnogiego a także w przypadku koinfekcji HIV, HBV, przewlekłej białaczkowej limfatycznej i innych chorobach nowotworowych, reumatoidalnym zapaleniu stawów czy autoimmunologicznym zapaleniem wątroby (AIH) oraz innych chorobach autoimmunologicznych (np.

lupus erythematosus systemicus). Takie wyniki fałszywie dodatnie w kierunku HCV, mogą występować również w innych schorzeniach wątroby (hemosyderoza, hemochromatoza), w następstwie szczepienia przeciwko grypie, a także w przewlekłej steroidoterapii czy u ciężarnych. Obserwuje się ponadto wiele reakcji krzyżowych z innymi antygenami (tab. 2) [94].

Część pacjentów posiada przeciwciała przeciw HCV jeszcze kilka lat po wyleczeniu/samowyleczeniu i ustąpieniu objawów, czasem mogą się utrzymywać przez całe życie. U niektórych pacjentów, mimo potwierdzenia obecności wirusa w organizmie, nie dochodzi do wytworzenia przeciwciał, co skutkuje fałszywie ujemnymi wynikami serologicznych testów przesiewowych.

Powodem może być pozostawanie pacjenta w okienku serologicznym, trwa ono zazwyczaj kilka miesięcy, a poszczególni pacjenci wykazują istotne różnice w czasie jego trwania. U niektórych chorych dochodzi również do zjawiska serokonwersji, gdy stężenie przeciwciał spada poniżej progu wykrywalności. U pacjentów z immunosupresją, pacjentów dializowanych, z agamaglobulinemią, może w ogóle nie dochodzić do syntezy przeciwciał anty-HCV. W badaniach prowadzonych wśród dzieci zakażonych jednocześnie wirusami zakaźnego zapalenia wątroby typu B i C wykazano, że częstość serokonwersji w układzie HBeAg/anty-Hbe (utrata anty-

genu HBe i pojawienie się we krwi przeciwciał anty-HBe) występowała statystycznie częściej po nadkażeniu HCV, niż u nieleczonych dzieci z WZW B. Można przypuszczać, że nadkażenie HCV mobilizuje układ immunologiczny pod wpływem uruchomienia kaskady cytokin [67].

PODSUMOWANIE

Stałe doskonalenie diagnostyki zakażeń, przez podnoszenie czułości i swoistości nowych testów serologicznych, w istotny sposób przyczynia się do eliminacji znacznej części wyników wątpliwych. Ponadto, stosowanie odpowiednich algorytmów i metod postępowania, umożliwia rozwiązywanie większości problemów, jakie mogą się pojawiać w trakcie rutynowej praktyki laboratoryjnej. Przekłada się to na precyzję rozpoznawania niektórych chorób oraz na skuteczność wdrożonej terapii i poniesionych na nie nakładów finansowych.

Należy jednak w sytuacjach wątpliwych, pamiętać zawsze o możliwościach przeprowadzenia testów potwierdzających zakażenie, a także w sytuacjach niejednoznacznych o kierowaniu badań do pracowni referencyjnych. Jeśli stwierdza się niedobory przeciwciał, bez względu na przyczynę, należy sięgać po diagnostykę opartą na PCR, pozwalającą precyzyjnie określić rodzaj patogenu.

PIŚMIENICTWO

- [1] Adler S.P., Marshall B.: Cytomegalovirus infections. *Pediatr. Rev.*, 2007; 28: 92-100
- [2] Aguero-Rosenfeld M.E., Wang G., Schwartz I., Wormser G.P.: Diagnosis of lyme borreliosis. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2005; 18: 484-509
- [3] Boman J., Hammerschlag M.R.: *Chlamydia pneumoniae* and atherosclerosis: Critical assessment of diagnostic methods and relevance to treatment studies. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2002; 15: 1-20
- [4] Bottone E.J.: *Yersinia enterocolitica*: the charisma continues. *Clin. Microbiol. Rev.*, 1997; 10: 257-276
- [5] Bozcal E., Dagdeviren M., Uzel A., Skurnik M.: LuxCDE-luxAB-based promoter reporter system to monitor the *Yersinia enterocolitica* O: 3 gene expression in vivo. *PLoS One*, 2017; 12: e0172877
- [6] Bulteel N., Partha Sarathy P., Forrest E., Stanley A.J., Innes H., Mills P.R., Valerio H., Gunson R.N., Aitken C., Morris J., Fox R., Barclay S.T.: Factors associated with spontaneous clearance of chronic hepatitis C virus infection. *J. Hepatol.*, 2016; 65: 266-272
- [7] Canavan T.N., Mathes E.F., Frieden I., Shinkai K.: *Mycoplasma pneumoniae*-induced rash and mucositis as a syndrome distinct from Stevens-Johnson syndrome and erythema multiforme: a systematic review. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 2015; 72: 239-245
- [8] Chevaliez S., Pawlotsky J.M.: Diagnosis and management of chronic viral hepatitis: antigens, antibodies and viral genomes. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.*, 2008; 22: 1031-1048
- [9] Chijioke O., Müller A., Feederle R., Barros M.H., Krieg C., Emmel V., Marcenaro E., Leung C.S., Antsiferova O., Landtwing V., Bossart W., Moretta A., Hassan R., Boyman O., Niedobitek G. i wsp.: Human natural killer cells prevent infectious mononucleosis features by targeting lytic Epstein-Barr virus infection. *Cell Rep.*, 2013; 5: 1489-1498
- [10] Cornett J.K., Kirn T.J.: Laboratory diagnosis of HIV in adults: a review of current methods. *Clin. Infect. Dis.*, 2013; 57: 712-718
- [11] Dalby T., Rasmussen E., Schiellerup P., Krogfelt K.A.: Development of an LPS-based ELISA for diagnosis of *Yersinia enterocolitica* O:3 infections in Danish patients: a follow-up study. *BMC Microbiol.*, 2017; 17: 125
- [12] De Paschale M., Clerici P.: Serological diagnosis of Epstein-Barr virus infection: Problems and solutions. *World J. Virol.*, 2012; 1: 31-43
- [13] Dowell S.F., Peeling R.W., Boman J., Carlone G.M., Fields B.S., Guarner J., Hammerschlag M.R., Jackson L.A., Kuo C.C., Maass M., Messmer T.O., Talkington D.F., Tondella M.L., Zaki S.R.: *C. pneumoniae* Workshop Participants: Standardizing *Chlamydia pneumoniae* assays: recommendations from the Centers for Disease Control and Prevention (USA) and the Laboratory Centre for Disease Control (Canada). *Clin. Infect. Dis.* 2001; 33: 492-503
- [14] Dzierżanowska D.: Makrolidy w terapii zakażeń dróg oddechowych. *Stand. Med.*, 2001; 3: 6-16
- [15] European Association for the Study of the Liver: EASL 2017 Clinical practice guidelines on the management of hepatitis B virus infection. *J. Hepatol.*, 2017; 67: 370-398
- [16] European Association for the Study of the Liver: EASL recommendations on treatment of hepatitis C 2018. *J. Hepatol.*, 2018; 69: 461-511
- [17] European Centre for Disease Prevention and Control Guidance: HIV testing: increasing uptake and effectiveness in the European Union. 2010: 1-27

- [18] Ferrari M., Poli A., Olivieri M., Tardivo S., Biasin C., Balestreri F., Dal Molin G., Lo Cascio V., Campello C., European Community Respiratory Health Survey (ECRHS) Verona: Seroprevalence of *Chlamydia pneumoniae* antibodies in a young adult population sample living in Verona. *Infection*, 2000; 28: 38-41
- [19] Flisiak R., Pancewicz S.: Diagnostyka i leczenie borelioz z Lyme. Zalecenia Polskiego Towarzystwa Epidemiologów i Lekarzy Chorób Zakaźnych. *Prz. Epidemiol.*, 2008; 62: 193-199
- [20] Fogeda M., De Ory F., Avellón A., Echevarria J.M.: Differential diagnosis of hepatitis E virus, cytomegalovirus and Epstein-Barr virus infection in patients with suspected hepatitis E. *J. Clin. Virol.*, 2009; 45: 259-261
- [21] Franz A., Webster A.D., Furr P.M., Taylor-Robinson D.: Mycoplasma arthritis in patients with primary immunoglobulin deficiency: clinical features and outcome in 18 patients. *Br. J. Rheumatol.*, 1997; 36: 661-668
- [22] Freiman J.M., Tran T.M., Schumacher S.G., White L.F., Ongarello S., Cohn J., Easterbrook P.J., Linas B.P., Denking C.M.: Hepatitis C core antigen testing for diagnosis of hepatitis C virus infection: a systematic review and meta-analysis. *Ann. Intern. Med.*, 2016; 165: 345-355
- [23] Gangi E., Kapatral V., El-Azami El-Idrissi M., Martinez O., Prabhakar B.S.: Characterization of a recombinant *Yersinia enterocolitica* lipoprotein; implications for its role in autoimmune response against thyrotropin receptor. *Autoimmunity*, 2004; 37: 515-520
- [24] Gärtner B.C., Hess R.D., Bandt D., Kruse A., Rethwilm A., Roemer K., Mueller-Lantzsch N.: Evaluation of four commercially available Epstein-Barr virus enzyme immunoassays with an immunofluorescence assay as the reference method. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 2003; 10: 78-82
- [25] Ghinoui M., Naveau S., Barri-Ova N., Thaury J., Grangeot-Keros L., Perlemuter G.: Acute hepatitis E infection associated with a false-positive serology against Epstein-Barr virus. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.*, 2009; 21: 1433-1435
- [26] Giamarellos-Bourboulis E.J., Raftogiannis M.: The immune response to severe bacterial infections: consequences for therapy. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.*, 2012; 10: 369-380
- [27] Górska E.B., Galoch E., Jankiewicz U., Kowalczyk P.: *Chlamydia pneumoniae* jako przyczyna chorób układu oddechowego. *Med. Rodz.*, 2013; 3: 99-105
- [28] Grahek-Ogden D., Schimmer B., Cudjoe K.S., Nygård K., Kapperud G.: Outbreak of *Yersinia enterocolitica* serogroup O:9 infection and processed pork, Norway. *Emerg. Infect. Dis.*, 2007; 13: 754-756
- [29] Grob P., Jilg W., Bornhak H., Gerken G., Gerlich W., Günther S., Hess G., Hüdig H., Kitchen A., Margolis H., Michel G., Trepo C., Will H., Zanetti A., Mushahwar I.: Serological pattern "anti-HBc alone": report on a workshop. *J. Med. Virol.*, 2000; 62: 450-455
- [30] Guerrero-Ramos A., Patel M., Kadakia K., Haque T.: Performance of the architect EBV antibody panel for determination of Epstein-Barr virus infection stage in immunocompetent adolescents and young adults with clinical suspicion of infectious mononucleosis. *Clin. Vaccine Immunol.*, 2014; 21: 817-823
- [31] Hargreaves C.E., Grasso M., Hampe C.S., Stenkova A., Atkinson S., Joshua G.W., Wren B.W., Buckle A.M., Dunn-Walters D., Banga J.P.: *Yersinia enterocolitica* provides the link between thyroid-stimulating antibodies and their germline counterparts in Graves' disease. *J. Immunol.*, 2013; 190: 5373-5381
- [32] Hess R.D.: Routine Epstein-Barr virus diagnostics from the laboratory perspective: still challenging after 35 years. *J. Clin. Microbiol.*, 2004; 42: 3381-3387
- [33] Horban A., Podlasin R., Cholewińska G., Wiercińska-Drapała A., Knys B., Inglot M., Szymczak A., Bociąga-Jasik M., Jabłonowska E., Parczewski M., Witak-Jędra M.: Zasady opieki nad osobami zakażonymi HIV. Zalecenia Polskiego Towarzystwa Naukowego AIDS. Polskie Towarzystwo Naukowe AIDS, Warszawa-Szczecin 2018
- [34] Ieven M.M., Hoymans V.Y.: Involvement of *Chlamydia pneumoniae* in atherosclerosis: more evidence for lack of evidence. *J. Clin. Microbiol.*, 2005; 43: 19-24
- [35] Irving W.L., Ratnamohan V.M., Hueston L.C., Chapman J.R., Cunningham A.L.: Dual antibody rises to cytomegalovirus and human herpesvirus type 6: frequency of occurrence in CMV infections and evidence for genuine reactivity to both viruses. *J. Infect. Dis.*, 1990; 161: 910-916
- [36] Jagielski M., Rastawicki W., Kałużewski S., Gierczyński R.: Jersinioza - niedoceniana choroba zakaźna. *Prz. Epidemiol.*, 2002; 56: 57-64
- [37] Jaks E., Gavutis M., Użé G., Martal J., Piehler J.: Differential receptor subunit affinities of type I interferons govern differential signal activation. *J. Mol. Biol.*, 2007; 366: 525-539
- [38] Jama-Kmiecik A., Frej-Mądrzak M., Sarowska J., Choroszy-Król I.: Wybrane aspekty zakażeń *Chlamydia pneumoniae*. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2015; 69: 612-623
- [39] Jensen I.P., Vestergaard B.F.: Assessment of the specificity of a commercial human parvovirus B19 IgM assay. *Clin. Diagn. Virol.*, 1997; 7: 133-137
- [40] Kao J.H., Chen P.J., Lai M.Y., Chen D.S.: Acute exacerbations of chronic hepatitis B are rarely associated with superinfection of hepatitis B virus. *Hepatology*, 2001; 34: 817-823
- [41] Karyński M.: Diagnostyka zakażeń wywołanych przez drobnoustroje atypowe-*Mycoplasma pneumoniae* i *Chlamydia pneumoniae* u dzieci. *Kl. Ped.*, 2002; 12: 318-321
- [42] Koester T.M., Meece J.K., Fritsche T.R., Frost H.M.: Infectious mononucleosis and lyme disease as confounding diagnoses: A report of 2 cases. *Clin. Med. Res.*, 2018 (w druku)
- [43] Krause P.J., Foley D.T., Burke G.S., Christianson D., Closter L., Spielman A., Tick-Borne Disease Study Group: Reinfection and relapse in early lyme disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2006; 75: 1090-1094
- [44] Lai C.H., Chang L.L., Lin J.N., Chen W.F., Kuo L.L., Lin H.H., Chen Y.H.: High seroprevalence of *Mycoplasma pneumoniae* IgM in acute Q fever by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *PLoS One*, 2013; 8: e77640
- [45] Lavoie T.B., Kalie E., Crisafulli-Cabatu S., Abramovich R., DiGiovanna G., Moolchan K., Pestka S., Schreiber G.: Binding and activity of all human alpha interferon subtypes. *Cytokine*, 2011; 56: 282-289
- [46] Lieberman D., Lieberman D., Ben-Yaakov M., Shmarkov O., Gelfer Y., Varshavsky R., Ohana B., Lazarovich Z., Boldur I.: Serological evidence of *Mycoplasma pneumoniae* infection in acute exacerbation of COPD. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 2002; 44: 1-6
- [47] Lis J., Jarząb A., Witkowska D.: Rola mimikry molekularnej w etiologii schorzeń o charakterze autoimmunizacyjnym. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2012; 66: 475-491
- [48] Littman A.J., Jackson L.A., White E., Thornquist M.D., Gaydos C.A., Vaughan T.L.: Interlaboratory reliability of microimmunofluorescence test for measurement of *Chlamydia pneumoniae*-specific immunoglobulin A and G antibody titers. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 2004; 11: 615-617
- [49] Luo G., Fan J.L., Seetharamaiah G.S., Desai R.K., Dallas J.S., Wagle N., Doan R., Niesel D.W., Klimpel G.R., Prabhakar B.S.: Immunization of mice with *Yersinia enterocolitica* leads to the induction of anti-thyrotropin receptor antibodies. *J. Immunol.*, 1993; 151: 922-928
- [50] Maurin M., Eb F., Etienne J., Raoult D.: Serological cross-reactions between *Bartonella* and *Chlamydia* species: implications for diagnosis. *J. Clin. Microbiol.*, 1997; 35: 2283-2287
- [51] McCracken G.H.Jr.: Diagnosis and management of pneumonia in children. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 2000; 19: 924-928
- [52] Mielczarek P., Bałaj M.: Jersinioza - rzadko rozpoznawana choroba układu pokarmowego. *Gastroenterol. Pol.*, 2004; 11: 69-74
- [53] Milewska-Bobula B., Lipka B.: Cytomegalia wrodzona-postę-

py w rozpoznawaniu i leczeniu. Prz. Epidemiol., 2009; 63: 79-83

[54] Mitov I., Haralambieva I., Petrov D., Ivanova R., Kamarinchev B., Iankov I.: Cross-reactive monoclonal antibodies raised against the lipopolysaccharide antigen of *Salmonella minnesota* Re chemotype: diagnostic relevance. Diagn. Microbiol. Infect. Dis., 2003; 45: 225-231

[55] Miyashita N., Fukano H., Okimoto N., Hara H., Yoshida K., Niki Y., Matsushima T.: Clinical presentation of community-acquired *Chlamydia pneumoniae* pneumonia in adults. Chest, 2002; 121: 1776-1781

[56] Mygland A., Ljøstad U., Fingerle V., Rupprecht T., Schmutzhard E., Steiner I., European Federation of Neurological Societies: EFNS guidelines on the diagnosis and management of European Lyme neuroborreliosis. Eur. J. Neurol., 2010; 17: 8-16

[57] Mygland A., Skarpaas T., Ljøstad U.: Chronic polyneuropathy and Lyme disease. Eur. J. Neurol., 2006; 13: 1213-1215

[58] Nau R., Christen H.J., Eifert H.: Lyme disease - current state of knowledge. Dtsch. Arztebl. Int., 2009; 106: 72-82

[59] Nelson C.T., Demmler G.J.: Cytomegalovirus infection in the pregnant mother, fetus, and newborn infant. Clin. Perinatol., 1997; 24: 151-160

[60] Niller H.H., Bauer G.: Epstein-Barr virus: clinical diagnostics. W: Epstein Barr Virus. Methods and Protocols, red.: J. Minarovits, H.H. Niller. Springer Nature, New York 2017, 33-55

[61] Nishimura M., Hashimoto T., Kobayashi H., Fukuda T., Okino K., Yamamoto N., Mashida C., Kawagoe K., Fujita H., Inoue N., Takahashi H., Ono T.: Close association of *Chlamydia pneumoniae* IgA seropositivity by ELISA with the presence of coronary artery stenosis in haemodialysis patients. Nephrol. Dial. Transplant., 2005; 20: 1944-1950

[62] Noworyta J., Brasse-Rumin M., Budziszewska M., Ząbek J.: Występowanie, swoistość i krzyżowa reaktywność przeciwciał antybakteryjnych (*Yersinia* spp., *Salmonella* Enteritidis, *Chlamydia trachomatis*, *Borrelia burgdorferi*) oraz ich znaczenie w diagnostyce niesklasyfikowanych zapaleń stawów. Reumatologia, 2011; 49: 32-39

[63] Nystad T.W., Myrmel H.: Prevalence of primary versus reactivated Epstein-Barr virus infection in patients with VCA IgG-, VCA IgM- and EBNA-1-antibodies and suspected infectious mononucleosis. J. Clin. Virol., 2007; 38: 292-297

[64] Olson D., Huntington M.K.: Co-infection with cytomegalovirus and Epstein-Barr virus in mononucleosis: case report and review of literature. SD Med., 2009; 62: 349-353

[65] Othman N., Isaacs D., Daley A.J., Kesson A.M.: *Mycoplasma pneumoniae* infection in a clinical setting. Pediatr. Int., 2008; 50: 662-666

[66] Pavie J., Rachline A., Loze B., Niedbalski L., Delaugerre C., Laforgerie E., Plantier J.C., Rozenbaum W., Chevrete S., Molina J.M., Simon F.: Sensitivity of five rapid HIV tests on oral fluid or finger-stick whole blood: a real-time comparison in a healthcare setting. PLoS One, 2010; 5: e11581

[67] Pawłowska M., Halota W.: Zakażenia mieszane HBV i HCV u dzieci z uwzględnieniem badań własnych. Prz. Epidemiol., 2003; 57: 459-464

[68] Pechous R.D., Sivaraman V., Stasulli N.M., Goldman W.E.: Pneumonic plague: The darker side of *Yersinia pestis*. Trends Microbiol., 2016; 24: 190-197

[69] Phoon M.C., Yee G.W., Koh W.P., Chow V.T.: Comparative sero-epidemiologic analysis of *Chlamydia pneumoniae* infection using microimmunofluorescence, enzyme immunoassay and neutralization test: implications for serodiagnosis. Indian J. Microbiol., 2011; 51: 223-229

[70] Plantier J.C., Djemai M., Lemée V., Reggiani A., Leoz M., Burc L., Vessière A., Rousset D., Poveda J.D., Henquell C., Gautheret-Dejean A., Barin F.: Census and analysis of persistent false-negative results in serological diagnosis of human immunodeficiency virus type 1

group O infections. J. Clin. Microbiol., 2009; 47: 2906-2911

[71] Rastawicki W.: Humoralna odpowiedź na wybrane antygeny pałeczek *Yersinia enterocolitica* i *Yersinia pseudotuberculosis* w przebiegu jersiniozy u ludzi. II. Występowanie przeciwciał dla wydzielniczych białek Yop wykrytych odczynem western-immunoblotting. Med. Dośw. Mikrobiol., 2006; 58: 321-328

[72] Rastawicki W.: Serologiczna diagnostyka bakteryjnych zakażeń człowieka – błędy popełniane w wyborze i wykonaniu badań laboratoryjnych oraz w interpretacji ich wyników. Med. Dośw. Mikrobiol., 2017; 69: 289-299

[73] Rawlins M.L., Gerstner C., Hill H.R., Litwin C.M.: Evaluation of a western blot method for the detection of *Yersinia* antibodies: evidence of serological cross-reactivity between *Yersinia* outer membrane proteins and *Borrelia burgdorferi*. Clin. Diagn. Lab. Immunol., 2005; 12: 1269-1274

[74] Revell P.A., Miller V.L.: *Yersinia* virulence: more than a plasmid. FEMS Microbiol. Lett., 2001; 205: 159-164

[75] Revello M.G., Gerna G.: Diagnosis and management of human cytomegalovirus infection in the mother, fetus, and newborn infant. Clin. Microbiol. Rev., 2002; 15: 680-715

[76] Robertson P., Beynon S., Whybin R., Brennan C., Vollmer-Conna U., Hickie I., Lloyd A.: Measurement of EBV-IgG anti-VCA avidity aids the early and reliable diagnosis of primary EBV infection. J. Med. Virol., 2003; 70: 617-623

[77] Ross S.A., Novak Z., Pati S., Boppana S.B.: Overview of the diagnosis of cytomegalovirus infection. Infect. Disord. Drug Targets, 2011; 11: 466-474

[78] Sandoz K.M., Rockey D.D.: Antibiotic resistance in *Chlamydiae*. Future Microbiol., 2010; 5: 1427-1442

[79] Sirghani K., Zeinali T., Jamshidi A.: Detection of *Yersinia enterocolitica* in retail chicken meat, Mashhad, Iran. J. Pathog., 2018; 2018: 1286216

[80] Specjalski K.: Role of *Chlamydia pneumoniae* and *Mycoplasma pneumoniae* infections in the course of asthma. Pneumonol. Alergol. Pol., 2010; 78: 284-298

[81] Stocks C.J., Schembri M.A., Sweet M.J., Kapetanovic R.: For when bacterial infections persist: Toll-like receptor-inducible direct antimicrobial pathways in macrophages. J. Leukoc. Biol., 2018; 103: 35-51

[82] Strieder T.G., Wenzel B.E., Prummel M.F., Tijssen J.G., Wiersinga W.M.: Increased prevalence of antibodies to enteropathogenic *Yersinia enterocolitica* virulence proteins in relatives of patients with autoimmune thyroid disease. Clin. Exp. Immunol., 2003; 132: 278-282

[83] Sutter K., Dickow J., Dittmer U.: Interferon α subtypes in HIV infection. Cytokine Growth Factor Rev., 2018; 40: 13-18

[84] Szetela B., Łapiński Ł., Zalewska M.: Zasady testowania w kierunku zakażenia HIV – zalecenia. W: Zasady opieki nad osobami zakażonymi HIV. Zalecenia Polskiego Towarzystwa Naukowego AIDS 2018. Red.: A. Horban, R. Podlasin, G. Cholewińska, A. Wiercińska-Drapało, B. Knysz, M. Ingłot, A. Szymczak, M. Bociąga-Jasik, E. Jabłonowska, M. Parczewski, M. Witak-Jędra. Polskie Towarzystwo Naukowe AIDS, Warszawa-Szczecin 2018; 10-21

[85] Świątek K.: Zespoły mononukleozowe. Przew. Lek., 2001; 4: 90-92

[86] Talkington D.F., Shott S., Fallon M.T., Schwartz S.B., Thacker W.L.: Analysis of eight commercial enzyme immunoassay tests for detection of antibodies to *Mycoplasma pneumoniae* in human serum. Clin. Diagn. Lab. Immunol., 2004; 11: 862-867

[87] Terrault N.A., Pawlotsky J.M., McHutchison J., Anderson F., Krajden M., Gordon S., Zitron I., Perrillo R., Gish R., Holodniy M., Friesenhahn M.: Clinical utility of viral load measurements in individuals with chronic hepatitis C infection on antiviral therapy. J. Viral Hepat., 2005; 12: 465-472

- [88] Thurman K.A., Walter N.D., Schwartz S.B., Mitchell S.L., Dillon M.T., Baughman A.L., Deutscher M., Fulton J.P., Tongren J.E., Hicks L.A., Winchell J.M.: Comparison of laboratory diagnostic procedures for detection of *Mycoplasma pneumoniae* in community outbreaks. Clin. Infect. Dis., 2009; 48: 1244-1249
- [89] Waites K.B., Atkinson T.P.: The role of *Mycoplasma* in upper respiratory infections. Curr. Infect. Dis. Rep., 2009; 11: 198-206
- [90] Waites K.B., Balish M.F., Atkinson T.P.: New insights into the pathogenesis and detection of *Mycoplasma pneumoniae* infections. Future Microbiol., 2008; 3: 635-648
- [91] Weber B., Berger A., Rabenau H.: Human cytomegalovirus infection: diagnostic potential of recombinant antigens for cytomegalovirus antibody detection. J. Virol. Methods, 2001; 96: 157-170
- [92] Weber B., Brunner M., Preiser W., Doerr H.W.: Evaluation of 11 enzyme immunoassays for the detection of immunoglobulin M antibodies to Epstein-Barr virus. J. Virol. Methods, 1996; 57: 87-93
- [93] Weinbaum C.M., Williams I., Mast E.E., Wang S.A., Finelli L., Wasley A., Neitzel S.M., Ward J.W., Centers for Disease Control and Prevention (CDC): Recommendations for identification and public health management of persons with chronic hepatitis B virus infection. MMWR Recomm. Rep., 2008; 57: 1-20
- [94] Wierzbicka A.: Korelacja pomiędzy badaniem anty-HCV a HCV-RNA. Problemy interpretacyjne wynikające z występowania wyników fałszywie dodatnich bądź fałszywie ujemnych w teście przesiewowym. Diagn. Lab., 2010; 46: 371-378
- [95] Witkowska D., Bartyś A., Gamian A.: Białka osłony komórkowej pałeczek jelitowych i ich udział w patogenności oraz odporności przeciwbakteryjnej. Postępy Hig. Med. Dośw., 2009; 63: 176-199
- [96] Wolf M.W., Misaki T., Bech K., Tvede M., Silva J.E., Ingbar S.H.: Immunoglobulins of patients recovering from *Yersinia enterocolitica* infections exhibit Graves' disease-like activity in human thyroid membranes. Thyroid, 1991; 1: 315-320
- [97] Załęska-Ponganis J., Jackowska T.: Atypowe bakteryjne zapalenia płuc u dzieci. Postępy Nauk Med., 2008; 9: 582-588

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.