

# Behçet Hastalıklı Olgularda *Borrelia Burgdorferi* Seroprevalansı

SEROPREVALENCE OF BORRELIA BURGDORFERI IN PATIENTS WITH BEHÇET'S DISEASE

Fatoş ÖNEN<sup>1</sup>, Dilek TUNCER<sup>2</sup>, Servet AKAR<sup>1</sup>, Merih BİRLİK<sup>1</sup>, Nurullah AKKOÇ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Romatoloji-İmmünoloji Bilim Dalı

<sup>2</sup>SSK Antalya Hastanesi Mikrobiyoloji Bölümü

## ÖZET

**Amaç:** Behçet hastalıklı olgularda *B. burgdorferi* antijenlerine karşı seroreaktivitenin araştırılması.

**Gereç ve Yöntem:** Araştırma, yurdumuzun batısında yer alan İzmir'de yapılmıştır. Behçet hastalıklı (n=30), romatoid artrit (RA)'li olan hasta kontrol (n=31) ve sağlıklı kontrol (n=31) gruplarının serumlarında *B. burgdorferi* IgM ve IgG antikorları, enzim immünoassay yöntemiyle ölçülmüştür. Pozitif sonuçlar Western blot ile doğrulanmıştır.

**Bulgular:** *B. burgdorferi* seropozitifliği yönünden, gruplar arasında, her 2 yöntemle de anlamlı fark bulunmamıştır. *B. burgdorferi* antijenlerine karşı seroreaktivite enzim immünoassay yöntemiyle, Behçet hastalıklı olguların %26,7'sinde, RA'lilerin %35,5'inde ve sağlıklı kontrollerin %19,4'ünde saptanmıştır. Immunoblot sonuçlarının ise Behçet hastalıklıların %13,3'ünde, RA'lilerin %22,6'sında ve sağlıklı kontrollerin %13,3'ünde pozitif olduğu görülmüştür.

**Sonuç:** Bu sonuçlar, *B. burgdorferi* ile Behçet hastalığı arasında bir ilişki olmadığını düşündürmektedir. Ancak hem hasta, hem de kontrol gruplarındaki yüksek *B. burgdorferi* antikor sıklığı, Türkiye'nin bu bölgesinde, hastalık ile uyumlu klinik bulguları olan hastalarda, Lyme hastalığının akla getirilmesi gerektiğini göstermektedir.

**Anahtar sözcükler:** Behçet hastalığı, seroprevalans, *Borrelia burgdorferi*, Lyme hastalığı

## SUMMARY

**Objective:** To investigate the seroreactivity to *B. burgdorferi* antigens in patients with Behçet's disease.

**Materials and method:** The study was conducted in İzmir located in the western part of Turkey. *B. burgdorferi* IgM and IgG antibodies were tested by enzyme immunoassay in the sera of patients with Behçet's disease (n=30), rheumatoid arthritis (RA) patients as disease controls (n=31) and healthy controls (n=31). Positive results were confirmed by Western blotting.

**Results:** The difference in *B. burgdorferi* seropositivity between the groups was not significant by any method. Seroreactivity to *B. burgdorferi* antigens by the microELISA system was detected in 26.7 % of patients with Behçet's disease, 35.5 % of patients with RA and 19.4 % of healthy controls. Immunoblots were positive in 13.3 % of Behçet's disease patients, 22.6 % of RA patients, and 13.3 % of healthy controls.

**Conclusion:** These results suggest no association between Behçet's disease and *B. burgdorferi* seropositivity. However high prevalence of *B. burgdorferi* antibodies in both patient and control groups suggests that Lyme disease should be considered in patients with appropriate clinical findings in this area of Turkey.

**Key words:** Behçet's disease, seroprevalence, *Borrelia burgdorferi*, Lyme disease

Fatoş ÖNEN

Dokuz Eylül Üniversitesi

Tıp Fakültesi

İç Hastalıkları Anabilim Dalı

Romatoloji-İmmünoloji Bilim Dalı

İnciraltı-İZMİR

Tel: 0 232 4123781

Fax: 0 232 2792739

e-mail: fatos.onen@deu.edu.tr

<sup>1</sup>VIII. Ulusal Behçet Hastalığı Kongre'sinde sözlü bildiri ve Avrupa Romatoloji Kongresi (EULAR) 2002'de poster olarak sunulmuştur.

Türkiye, Behçet hastalığının en sık görüldüğü ülkelerden biridir. Behçet hastalığının patogenezini tam olarak aydınlatılmamış olmakla birlikte, etiyolojide infeksiyöz ajanların rolünün olduğu düşünülmektedir. Üçüncü, Behçet hastalığının sık görülen bir bulgusudur (1,2).

Behçet hastalıklı olguların da yer aldığı, üveitli bir grup hastada yapılan bir araştırmada, ELISA yöntemiyle *Borrelia burgdorferi* (*B. burgdorferi*) antikor sıklığında artış gözlenmiştir (3). *B. burgdorferi*'nin neden olduğu Lyme hastalığı ile Türkiye'de çok fazla karşılaşılmasına rağmen, bazı kırsal bölgelerde %36'ya varan sıklıkta *B. burgdorferi* seroprevalansı bildirilmektedir (4).

Elimizdeki bu veriler, Behçet hastalığı ile *B. burgdorferi* arasında bir ilişki olup olmadığını araştırma konusunda yönlendirici olmuş ve Behçet hastalıklı olgulardaki antikor sıklığı enzim immünoassay ve Western blot yöntemleriyle araştırılarak, sonuçlar, hasta ve sağlıklı kontrol gruplarının sonuçlarıyla karşılaştırılmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

### Hasta ve Kontrol Grupları

Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi İmmünoloji-Romatoloji polikliniğinde izlenen ve Uluslararası Behçet Çalışma Grubu kriterlerine (5) göre tanı almış 30 Behçet hastalıklı olguda (16 kadın, 14 erkek) anti-*B. burgdorferi* IgM ve IgG antikorları araştırıldı. Çalışmaya alınan Behçet hastalarının ortalama yaşları, 36,8±11,3 (20-59), ortalama hastalık süreleri 7,6±6,5 (0,5-25) yıl idi. Aynı dönemde, aynı poliklinikte izlenen ve ACR kriterlerine göre (6) tanı almış, ortalama yaşları 57,5±9,2 (40-72) ve ortalama hastalık süreleri 8,9±7,3 (1-30) yıl olan 31 RA'li olgu (25 kadın, 6 erkek), hasta kontrol grubunu oluşturdu. Sağlıklı kontrol grubunda ise, ortalama yaşları 45,8±14,8 (23-74) olan 31 birey (18 kadın, 13 erkek) yer aldı.

### Serolojik İncelemeler

Her 3 gruptan elde edilen serumlar ikiye bölünerek çalışılan güne kadar -20°C'de saklandı. Daha sonra, bu serumlarda, *B. burgdorferi sensu stricto* ve *B. afzelii* suslarından seçilmiş çoklu antijenlerin karışımından hazırlanmış *Borrelia* IgG, IgM (Gull, Germany)

kiti kullanılarak, enzim immünoassay yöntemiyle antikor varlığı araştırıldı. Cut off değeri +/- %5 arası borderline, üstü pozitif, altı ise negatif sonuç olarak değerlendirildi.

Enzim immünoassay yöntemiyle pozitif bulunan serumlar, sonuçların doğrulanması amacıyla *Borrelia* Western blot IgM ve IgG kiti (Gull, Germany) ile çalışıldı. Sonuçlar, kit içeriğinde yer alan pozitiflik kriterlerine (7) uyularak, serumların hangi çalışma grubuna ait olduğunu bilmeyen araştırmacı tarafından değerlendirildi. IgM için, 23 (Osp C) ve 39 kDa bantlarından bir ya da ikisinin olması pozitif, ikisinin de olmaması negatif olarak yorumlandı. 36, 37, 45 ve 93 kDa bantları özgül bantlar olduğu halde duyarlılığı arttırmadığı için kesin kriter bantı sayılmadı. IgG için ise; 21, 23 (Osp C), 37, 39, 41, 45 ve 93 kDa bantlarından dört ya da daha fazlasının varlığı pozitif, dörtten daha az olması ise negatif olarak değerlendirildi. Onsekiz, 36, 58 ve 66 kDa bantları özgül bantlar olmalarına karşın duyarlılığı arttırmadığı için kesin kriter bantı olarak kabul edilmedi.

### İstatistik

Enzim immünoassay ve Western blot yöntemleriyle saptanan antikor pozitiflikleri yönünden, çalışma ve kontrol grupları arasında fark olup olmadığı  $\chi^2$  testi ile araştırıldı. Western blot sonuçlarının istatistiksel değerlendirmesi yapılırken, enzim immünoassay ile negatif bulunan sonuçların bu yöntem ile de negatif olduğu kabul edildi (8,9). Her bir grupta, Western blot ile pozitif bulunan ortalama bant sayılarının karşılaştırılmasında ANOVA testi kullanıldı.

### BULGULAR

Enzim immünoassay yöntemiyle araştırıldığında; Behçet hastalığı olanların 8'inde (%26,7), RA'li hastaların 11'inde (%35,5) ve sağlıklı olguların 6'sunda (%19,4) seropozitiflik bulundu (Tablo I).

Enzim immünoassay yöntemiyle elde edilen pozitif sonuçların doğrulanması, Western blot yöntemiyle yapıldı. Behçet hastalıklı olguların 4'ünde (%13,3), RA'li hastaların 7'sinde (%22,6) ve sağlıklı olguların 4'ünde (%13,3) *B. burgdorferi* antikor pozitifliği saptandı. Her 2 yöntemle de bulunan antikor pozitiflikleri

yönünden gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmedi (Tablo I).

**Tablo I.** Pozitif serolojik test saptanan Behçet hastalığı, hasta kontrol (romatoid artrit) ve sağlıklı kontrol olguları

Serolojik Test	Behçet hastalığı (%) (n=30)	Romatoid artrit (%) (n=31)	Sağlıklı kontrol (%) (n=31)
<b>Mikro ELISA</b>			
IgM	7 (23,3)	6 (19,4)	3 (9,7)
IgG	3 (10,0)	6 (19,4)	3 (9,7)
Total pozitif	8 (26,7)	11 (35,5)	6 (19,4)
<b>Western blot</b>			
IgM	2 (6,7)	3 (9,7)	2 (6,5)
IgG	3 (10,0)	4 (12,9)	2 (6,5)
Total pozitif	4 (13,3)	7 (22,6)	4 (13,3)

$p > 0,05$

Behçet, RA ve sağlıklı kontrol olgularındaki ortalama seroreaktif IgM bant sayıları, sırasıyla, 2,2; 1,8 ve 2,5; ortalama IgG bant sayıları ise 6,7; 8,2 ve 6,0 olarak bulundu. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ( $p > 0,05$ ).

## TARTIŞMA

Behçet hastalığının nedeni bilinmemekte, genetik yatkınlığı olan kişilerde, infeksiyöz bir ajanla tetiklenen immün yanıtın hastalığı ortaya çıkarabileceği düşünülmektedir (2). Çeşitli çalışmalarda, self antijenlerle çapraz reaksiyon veren mikobakteriyel ısı şoku proteinleri (10,11) ve streptokokların (12,13) hastalığın patogenezinde yeri olduğunu düşündüren sonuçlar elde edilmiştir. Değişik nedenlere bağlı üveiti olan hastalarda yapılan bir başka çalışmada ise, sarkoidoz ve Vogt-Koyanagi-Harada sendromlu hastalarla birlikte, Behçet hastalıklı olgularda, ELISA ve IFA yöntemleriyle incelenen *B. burgdorferi* antikor sıklığında artış saptanmış, sağlıklı kontrol grubunda antikor pozitifliğine rastlanmamıştır. Bu sonuç, bu hastalıklardaki immün anormallikler sonucu ortaya çıkan çapraz reaksiyonlar ile açıklanmaya çalışılmıştır (3). Literatür incelendiğinde, bu çalışma dışında, Behçet hastalığı ile *B. burgdorferi* ilişkisini araştıran başka bir araştırmaya rastlanmamıştır. Bizim çalışmamızda ise, Behçet hastalıklı olgularda enzim immünoassay ve Western blot yön-

temleriyle saptanan artmış *B. burgdorferi* antikor sıklığının, RA'lı hasta ve sağlıklı kontrol gruplarındakinden farklı olmadığı görülmüştür.

Western blot yöntemiyle *B. burgdorferi* seropozitifliği saptanan olgular yeniden değerlendirilmiş; hiçbirinde Lyme hastalığı düşünülmemiştir. Seropozitif Behçet hastalarından sadece biri yıllar önce olan bir kene ısırığı ve şüpheli bir eritema migrans (EM) öyküsü vermiştir. Eski kene ısırığı ve EM öyküsü, IgM antikor pozitifliğini açıklayamamaktadır (14). Kene ısırığı olup olmadığını hatırlayamayan diğer seropozitif Behçet hastasında, hem IgM, hem de IgG antikorlar pozitifdir. İntermittant artrit ve bilateral ön üveit, Lyme hastalığı ile açıklanabilen bulgular olmasına karşın, birlikte tekrarlayan oral ve genital ülserlerin, gezici yüzeysel tromboflebit ve püstüler lezyonların olması nedeniyle, tüm bulguların Behçet hastalığı ile ilişkili olduğu düşünülmüştür. Lyme hastalığı tanısında, hastalığa özgü öykü ve objektif klinik bulguların varlığı esastır. Serolojik incelemelerin pozitifliği yalnızca tanıyı destekler. Tek başına EM saptanması Lyme hastalığı tanısını koydurabilir; ancak tek başına seropozitiflik tanı için yeterli değildir (14).

ELISA ve IFA ile yapılan çalışmalarda, RA'da *B. burgdorferi* seropozitifliğinde artış saptanmış ve bakterinin RA'nın etiolojisinde rol oynayabileceği görüşü ortaya atılmıştır (15,16). Daha sonra Western blot yöntemiyle yapılan RA araştırmaları (17-19) ise bizim çalışmamızda da olduğu gibi bu görüşü desteklememiştir.

Western blot ile antikor pozitifliği saptanan RA'lı hastalardan ikisinde kene ısırığı ve iki hastadan birinde EM öyküsü alınmıştır. Kene ısırığı ve EM öyküleri geçmiş yıllarla ilgilidir. Oysa her 2 hastada da pozitif saptanan antikorlar IgM tipindedir. Seropozitif 7 hastanın da klinik bulguları tamamen RA ile uyumludur.

Çalışma ve kontrol gruplarında saptanan yüksek sıklıktaki ELISA *B. burgdorferi* seropozitifliğinin en azından, bir bölümünden çapraz reaksiyon veren diğer antikorlar sorumlu olabilir. Diğer *Borrelia* ve spiroket hastalıkları ve otoimmün hastalıklar dışında, çeşitli virüs ve parazit infeksiyonlarının, hatta normal floraya

karşı gelişen immün yanıtın, bu yolla yalancı ELISA *B. burgdorferi* pozitifliğine neden olabileceği bilinmektedir (20,21). Western blotting ise, *B. burgdorferi* antikor yanıtını saptamada spesifik bir yöntem olarak kabul edilmektedir (14). Hiçbir olguda Lyme hastalığı düşünülmemesine karşın, bu yöntemle de seroprevalansın oldukça yüksek düzeylerde gözlenmesi, olgulardaki subklinik enfeksiyon varlığı ile açıklanabilir. ABD'de yapılan araştırmalarda, asemptomatik/semptomatik Lyme enfeksiyonu oranı 1/1 olarak bildirilmiştir (22, 23). İsviçre'de yapılan bir çalışmada ise, bu oran çok daha yüksek olarak bulunmuş, *B. burgdorferi* ile infekte kişilerin çoğunda semptom gelişmediği görülmüştür (24). Bu durumdan *Borrelia* antijenleri arasındaki varyasyonların ve konağın genetik yapısı arasındaki farklılıkların hastalığın ortaya çıkış şeklini değiştirmesi sorumlu olabilir (25-27).

Western blot yöntemi, *B. burgdorferi*'ye karşı antikor yanıtını saptamada güvenilir bir yöntemdir; ancak antijenik proteinlerin molekül ağırlıklarının türler arasında varyasyonlar göstermesi nedeniyle bu proteinlerin tanımlanmasında karışıklıklar yaşanmakta ve sonuçta testin yorumlanması güçleşmektedir (18,28,29). Bu çalışmada kullanılan kitteki sonuçların değerlendirilmesi, Avrupa'daki çeşitli bölgelerin serumlarının kullanıldığı çalışmalar sonucunda geliştirilen kriterlere (7) göre yapılmıştır. ABD'de *Centres for Disease Control* (CDC) tarafından önerilen kriterlerin (30) yüksek özgüllük göstermesine karşın, dünyanın diğer bölgelerinde rutin kullanım söz konusu olduğunda, duyarlılığın düşebileceği bilinmektedir (31). Avrupa'da Lyme hastalıklı olgularda gözlenen antikor yanıtının daha sınırlı, ama daha değişken olması (29), seropozitiflik için hem özgül, hem de duyarlı kriterlerin tanımlanmasını zorlaştırmaktadır (28,29). Aslında serolojik kriterlerin coğrafi bölge nüfuslarının seroepidemiyolojik taraması temelinde, o bölgeye özgü olarak geliştirilmesi en uygun olanıdır (32,33).

Sonuç olarak; *B. burgdorferi* ile Behçet hastalığı arasında nedensel bir ilişki olmadığı düşünülmüştür. Ancak hem hasta, hem de kontrol gruplarındaki yüksek *B. burgdorferi* antikor sıklığı, Türkiye'nin bu bölgesinde, hastalık ile uyumlu klinik bulguları olan hastalarda,

ayırıcı tanıda Lyme hastalığının da akla getirilmesi gerektiğini göstermektedir.

#### KAYNAKLAR

1. Yazıcı H, Yurdakul S, Hamuryudan V. Behçet's syndrome. In: Maddison PJ, Isenberg DA, Woo P, Glass DN, editors. Oxford Textbook of Rheumatology 2nd ed. Oxford/New York/Tokyo: Oxford University Press; 1998. p.1394-1402.
2. Yurdakul S, Gunaydin I, Tuzun Y et al. The prevalence of Behçet's syndrome in a rural area in northern Turkey. J Rheumatol 1988;15:820-822.
3. Isogai E, Isogai H, Kotake S et al. Detection of antibodies against *Borrelia burgdorferi* in patients with uveitis. Am J Ophthalmol 1991;112:23-30.
4. Mutlu G, Gültekin M, Ergin Ç et al. Investigation of *Borrelia burgdorferi* antibodies in Antalya region. Mikrobiyoloji Bülteni 1995;29:1-6.
5. International Study Group for Behçet's disease: Criteria for the diagnosis of Behçet's disease. Lancet 1990;335:1078-1080.
6. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 1988;31:315-324.
7. Norman GL, Hogrefe WR, Markley J et al. Reactivity of European and US specimens to *Borrelia burgdorferi* strains by IFA, ELISA, and Western blot. Abstract. VI. International Conference on Lyme Borreliosis, 1994.
8. Ledue TB, Collins MF, Craig WY. New laboratory guidelines for serologic diagnosis of Lyme disease: evaluation of the two-test protocol. J Clin Microbiol 1996;34:2343-2350.
9. Cutler SJ, Wright DJ. Predictive value of serology in diagnosing Lyme borreliosis. J Clin Pathol 1994;47:344-349.
10. Direskeneli H, Hasan A, Shinnick T et al. Recognition of B-cell epitopes of the 65 kDa heat shock protein in Behçet's disease. Scand J Immunol 1996;43:464-471.
11. Stanford MR, Kasp E, Whiston R et al. Heat shock protein peptides reactive in patients with Behçet's disease are uveitogenic in Lewis rats. Clin Experiment Immunol 1994;97:226-231.
12. Yokota K, Hayashi S, Fujii N et al. Antibody response to oral streptococci in Behçet's disease. Microbiol

- Immunol 1992;36:815-822.
13. Isogai F, Ohno S, Kotake S et al. Chemiluminescence of neutrophils from patients with Behçet's disease and its correlation with an increased proportion of uncommon serotypes of *Streptococcus sanguis* in the oral flora. Arch Oral Biol 1990;35:43-48.
  14. Sigal LH. Laboratory confirmation of the diagnosis of Lyme disease. UpToDate Vol 9 No 1, 2001.
  15. Magnarelli LA, Anderson JF. Enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of class-specific immunoglobulins to *Borrelia burgdorferi*. Am J Epidemiol 1998;127:818-825.
  16. Lavoie PE, Burgdorfer W. Serologic reactivity to *Borrelia burgdorferi* in rheumatoid arthritis patients. Ann NY Acad Sci 1988;539:460-466.
  17. Weiss N, Sadock VA, Sigal LH et al. False positive seroreactivity to *Borrelia burgdorferi* in systemic lupus erythematosus: the value of immunoblot analysis. Lupus 1995;4:131-137.
  18. Engström S, Shoop E, Johnson RC. Immunoblot interpretation criteria for serodiagnosis of early Lyme disease. J Clin Microbiol 1995;33:419-427.
  19. Charu-Valckemere I, Guillemin F, Poure J et al. Seroreactivity to *Borrelia burgdorferi* antigens in early rheumatoid arthritis: a case-control study. Br J Rheumatol 1997;36:945-949.
  20. Magnarelli LA, Miller JN, Anderson JF et al. Cross-reactivity of nonspecific treponemal antibody in serologic tests for Lyme disease. J Clin Microbiol 1990;28:1276-1279.
  21. Magnarelli LA, Anderson JF. Enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of class specific immunoglobulins to *Borrelia burgdorferi*. Am J Epidemiol 1988;127:818-825.
  22. Steere AC, Taylor E, Wilson ML et al. Longitudinal assessment of the clinical and epidemiological features of Lyme disease in a defined population. J Infect Dis 1986;154:295-300.
  23. Haurahan JP, Benach JL, Coleman JL et al. Incidence and cumulative frequency of endemic Lyme disease in a community. J Infect Dis 1984;150:489-496.
  24. Fahrer H, van der Linden SM, Sauvain MJ et al. The prevalence and incidence of clinical and asymptomatic Lyme borreliosis in a population at risk. J Infect Dis 1991;163:305-310.
  25. Anthonissen FM, Kesel MD, Hoet PP et al. Evidence for the involvement of different genospecies of *Borrelia* in the clinical outcome of Lyme disease in Belgium. Res Microbiol 1994;145:327-331.
  26. Bunikis J, Olsen B, Westman G et al. Variable serum immunoglobulin responses against different *Borrelia burgdorferi* sensu lato species in a population at risk for patients and with Lyme disease. J Clin Microbiol 1995;33:1473-1478.
  27. Steere AC. *Borrelia burgdorferi* (Lyme disease, Lyme borreliosis). In: Mandel GL, Douglas RG, Bennett JE, editors. Principles and Practice of Infectious Diseases. 3<sup>rd</sup> ed. Churchill Livingstone Inc; 1990;1819-1827.
  28. Zoller L, Burkard S, Schafer H. Validity of Western immunoblot band pattern in the serodiagnosis of Lyme borreliosis. J Clin Microbiol 1991;29:174-182.
  29. Dressler F, Ackermann R, Steere AC. Antibody responses to the three genomic groups of *Borrelia burgdorferi* in European Lyme borreliosis. J Infect Dis 1994;169:313-318.
  30. Recommendations for test performance and interpretation from the Second National Conference on serologic diagnosis of Lyme disease. MMWR 1995; 44:590-591.
  31. Fawcett PT, Gibney KM, Rose Cd et al. Evaluation of proposed Western blot interpretation criteria for pediatric Lyme borreliosis. Arthritis Rheum 1995; 38:362 (Abstract).
  32. Hauser U, Krahl H, Peters H et al. Impact of strain heterogeneity on Lyme disease serology in Europe: Comparison of enzyme-linked immunosorbent assays using different species of *Borrelia burgdorferi sensu lato*. J Clin Microbiol 1998;36:427-436.
  33. Hauser U, Lehnert G, Lobentanzer R et al. Interpretation criteria for standardized Western blots for three European species of *Borrelia burgdorferi sensu lato*. J Clin Microbiol 1997;35:1433-1444.