



## Diagnostyka laboratoryjna boreliozy z Lyme

*Laboratory tests in the diagnostics of borreliosis (the Lyme disease)*

STANISŁAWA TYLEWSKA-WIERZBANOWSKA, TOMASZ CHMIELEWSKI

Z Zakładu Bakteriologii Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie

**STRESZCZENIE.** Podstawową metodą laboratoryjnej diagnostyki boreliozy z Lyme jest badanie serologiczne wykazujące obecność przeciwciał dla *Borrelia burgdorferi*. Wartość wyniku tego badania zależy od swoistości i czułości stosowanej metody, jak również od indywidualnych właściwości badanego i poziomu wytwarzanych przez niego przeciwciał. Aby uniknąć fałszywie dodatnich i fałszywie ujemnych wyników badań serologicznych, zalecane jest badanie wykonane przy pomocy wysoce swoistego i czułego testu ELISA z odpowiednio dobranymi frakcjami białek *B. burgdorferi* jako antygenem diagnostycznym, bądź postępowaniem dwustopniowe, w którym wyniki dodatnie i wątpliwe dodatnie w badaniu przesiewowym potwierdzane są metodą Western-blot. Ze względu na ograniczoną w niektórych przypadkach czułość badania serologicznego, test PCR może być badaniem wspomagającym rozpoznanie choroby. Wartość diagnostyczna wyniku testu serologicznego, jak i PCR, zależy od właściwego doboru materiału klinicznego przeznaczonego do badań.

**SUMMARY.** The essential method in the laboratory diagnostics of borreliosis (the Lyme disease) is serologic tests indicating the presence of antibodies for *Borrelia burgdorferi*. The value of test results depends not only on specificity and sensitivity of the method used, but also on the patient's individual characteristics and on his/her antibodies level. In order to avoid false positive and false negative serologic tests results, either a highly specific and sensitive ELISA test with appropriately matched *B. burgdorferi* protein fractions as the diagnostic antigen should be used, or a two-stage examination is recommended, i.e. positive and doubtful positive screening test results should be confirmed by means of the Western-blot technique. Due to a limited sensitivity of serologic tests in some cases, the PCR test may serve as an auxiliary diagnostic technique. The diagnostic value of both serologic test and PCR results depends on appropriate selection of clinical material for test purposes.

---

**Słowa kluczowe:** *Borrelia burgdorferi* / swoiste antygeny / borelioza z Lyme / diagnostyka serologiczna / PCR

**Key words:** *Borrelia burgdorferi* / specific antigens / borreliosis / Lyme disease / serologic diagnostics / PCR

---

Czynnikiem etiologicznym boreliozy z Lyme są drobnoustroje z gatunku *Borrelia burgdorferi sensu lato* należące do rzędu *Spirochaetales*, do którego zaliczane są również inne chorobotwórcze krętki, jak np. *Treponema pallidum* i *Leptospira sp.* Są to szybko poruszające się, długie (20–30  $\mu\text{m}$ ), spiralnie skręcone bakterie (o średnicy 0,2–0,3  $\mu\text{m}$ ), widoczne w mikroskopie świetlnym, w ciemnym polu widzenia. Krętki te nie wytwarzają

form przetrwalnikowych, ale w zależności od warunków środowiska mogą zmieniać swój kształt, poprzez formy krętkopodobne z pęcherzykowatymi strukturami powstającymi w różnych częściach komórki, aż do komórek sferoidalnych.

Gatunek *B. burgdorferi* jest bardzo zróżnicowany. Na podstawie badań genetycznych, opartych na sekwencjonowaniu, restrykcji genów, hybrydyzacji wyodrębniono

jako niższe taksony genogatunki: *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *B. afzeli*, *B. garini*, o poznanej chorobotwórczości dla człowieka oraz izolowane, jak dotychczas tylko z kleszczy, *B. andersoni*, *B. japonica*, *B. miyamotoi*, *B. lonestari* i szczepy Poti B2, VS116, DN127 o nieustalonej jeszcze przynależności [3]. Obecnie, identyfikując szczep, podaje się albo nazwę genogatunku albo, jeżeli nie został on określony, nazwę *B. burgdorferi sensu lato*.

Wywoływana przez nie borelioza z Lyme jest chorobą odzwierzęcą. Zakażenie zwierząt, jak i człowieka, następuje przy udziale wektora, którym są różne gatunki kleszczy z rodzaju *Ixodes*. W Europie dominuje *I. ricinus*, w Ameryce Płn. *I. pacificus* i *I. scapularis*, w Azji – *I. persulcatus*. Obok tego rodzaju kleszczy, najczęściej wymienianego jako wektor, istnieją doniesienia dotyczące obecności krętków *B. burgdorferi* w kleszczach *Hyalomma punctata*, *Amblyoma americanum*, *Dermacentor marginatus*. Ponadto coraz częściej zwraca się uwagę na możliwy udział w przenoszeniu boreliozy z Lyme innych stowonogów, w szczególności owadów.

Żywicielami kleszczy rodzaju *Ixodes* są przede wszystkim drobne gryzonie, jelenie i sarny, a także dziki, lisy, psy oraz wiele innych zwierząt dzikich i domowych, które stanowią rezerwuuar *B. burgdorferi*. Człowiek jest żywicielem przypadkowym.

Podstawą rozpoznania boreliozy z Lyme jest stwierdzenie określonych objawów klinicznych oraz dodatni wynik badania labora-

toryjnego. Wg zaleceń Światowej Organizacji Zdrowia badania laboratoryjne są tylko potwierdzeniem rozpoznania klinicznego. Dodatni wynik badania bez towarzyszących objawów klinicznych nie może stanowić o rozpoznaniu boreliozy z Lyme.

Diagnostyka zakażeń wywoływanych przez krętki *Borrelia burgdorferi* stwarza wiele trudności. Dotychczas nie została przeprowadzona standaryzacja stosowanych metod, brak jest określonej metody referencyjnej i w związku z tym wyniki badań przeprowadzonych z zastosowaniem różnych technik są w wielu przypadkach nieporównywalne.

Obecnie, w celu wykrycia zakażenia *B. burgdorferi sensu lato* poszukuje się w materiale pobranym od chorego przede wszystkim swoistych przeciwciał, a także żywych krętków, ich materiału genetycznego lub antygenów. Techniki stosowane w diagnostyce laboratoryjnej mają cały szereg ograniczeń, z których najważniejsze to brak swoistości i czułości większości z nich. Dodatkowo, wynik zależy od właściwego wyboru materiału pobieranego od chorego w różnych stadiach choroby (tabl. 1).

Klasyczne postępowanie w diagnostyce bakteriologicznej, tj. posiew pobranej próbki i izolacja czynnika etiologicznego, w przypadku boreliozy z Lyme są mało przydatne. Krętki *B. burgdorferi* są bakteriami bardzo trudno i długo rosnącymi na podłożach sztucznych, dlatego wynik hodowli możemy uzyskać nie wcześniej niż po upływie 14 dni

Tablica 1. Materiał kliniczny do badań laboratoryjnych w kierunku boreliozy z Lyme

Stadium choroby	Poziom przeciwciał		Wykrycie <i>B. burgdorferi</i>		
	materiał	czas badania	PB	hodowla	PCR
EM	surowica	po 2 i 4–6 tyg.	krew	skóra	skóra, mocz
<i>Neuroborreliosis</i>	surowica, CSF	po 2 i 4–6 tyg. przez wiele tyg.	krew, CSF	krew, CSF	CSF, mocz
<i>Carditis</i>	surowica	po 2 i 4–6 tyg.	krew	krew	mocz
<i>Lyme arthritis</i>	surowica, SF	przez wiele tygodni	SF	SF, chrząstka stawowa	SF, chrząstka stawowa, mocz

EM: rumień wędrujący, PB: preparat bezpośredni, CSF: płyn mózgowo-rdzeniowy, SF: płyn stawowy

inkubacji, przy czym zalecana jest hodowla posianej próbki nie krócej niż 3 miesiące. Dopiero po tym czasie brak wzrostu można uznać za wynik ujemny.

Do hodowli *B. burgdorferi* stosowane jest podłoże BSK (Barboura, Stoennera, Kelly'ego) i jego modyfikacje. Obecnie, najczęściej używane jest podłoże BSK-H. W jego skład wchodzi ponad 60 składników, takich jak aminokwasy, witaminy, elektrolity. W celu uzyskania szybszego wzrostu krętków jest ono dodatkowo wzbogacone surowicą króliczą (6%). Prawdopodobieństwo uzyskania dodatniego posiewu zależy od wielkości inokulum, które nie może być mniejsze niż 10 komórek bakteryjnych [21].

Mimo zastosowania do hodowli tak bogatego podłoża, czas między podziałami komórek *B. burgdorferi* wynosi ok. 12 godzin (np. komórki *E. coli* w optymalnych warunkach dzielą się co 20–30 min.). Na podłożach stałych krętki rozmnażają się jeszcze trudniej.

Ponieważ wykazano, że krętki *B. burgdorferi* w pewnych okresach zakażenia bytują wewnątrz komórek gospodarza, ostatnio zaproponowano hodowlę i izolację tych krętków z krwi, płynu mózgowo-rdzeniowego i płynu stawowego w liniach komórkowych. Pozwala to na postawienie diagnozy w ciągu około 5–7 dni. Wstępne badania wskazują, że jest to metoda szybka i bardzo czuła [9, 26].

Krętki *Borrelia burgdorferi* można izolować ze zmian skórnych (bioptaty), płynu mózgowo-rdzeniowego, płynu stawowego i krwi. Najwięcej dodatnich posiewów na podłożu BSK uzyskuje się z bioptatów skóry (ok. 50–85%), znacznie mniej z płynu mózgowo-rdzeniowego (ok. 10–25%) i z chrząstki stawowej (poniżej 20%); rzadko izoluje się z płynu stawowego i krwi.

Preparat bezpośredni z pobranego materiału (krwi, płynu mózgowo-rdzeniowego lub stawowego i tkanek) jest metodą mało czułą ze względu na niewielką zwykle liczbę krętków w badanym materiale. Najczęściej, jeżeli to możliwe, stosuje się preparaty przyżyciowe, oglądane w mikroskopie świetlnym, w ciemnym polu widzenia. W prepa-

ratach barwionych metodą Giemzy lub srebrzenia bardzo rzadko można zaobserwować krętki, ponieważ nie tylko słabo wybarwiają się, ale także podczas samego procesu utrwalania i barwienia łatwo tracą swój morfologiczny kształt. Uzyskany obraz jest mało czytelny, bardzo trudny do interpretacji, ze względu na obecność licznych artefaktów.

Ostatnio coraz częściej w diagnostyce boreliozy z Lyme wykorzystywana jest reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR). Reakcja ta umożliwia wielokrotne powielanie określonych, charakterystycznych dla *Borrelia burgdorferi* sekwencji DNA. Dolna granica wykrywalności w tej metodzie wynosi ok. 10 komórek w badanej próbce. Pomimo swych niewątpliwych zalet posiada jednak liczne ograniczenia. Do najważniejszych należy wybór materiału do badania zależny od stadium choroby. Materiał genetyczny krętków można częściej wykryć w ostrej fazie choroby niż w okresie przewlekłym. Ważne jest także, aby zastosowane do reakcji startery amplifikowały wszystkie genogatunki *Borrelia burgdorferi sensu lato* z tą samą czułością. Do najczęściej wykorzystywanych należą powielające fragment sekwencji genów kodujących flagelinę, białka błony zewnętrznej, 16S-RNA lub 23S-RNA. Na wynik badania ma znaczący wpływ obecne w badanym materiale DNA gospodarza oraz inne składniki tkanek, jak np. hemoglobina, heparyna, porfiryny. Obecność tych substancji może być przyczyną zarówno wyników fałszywie dodatnich, jak i ujemnych [17, 22].

Częstość wykrycia DNA *Borrelia burgdorferi* w krwi, płynie stawowym i mózgowo-rdzeniowym jest podobna jak w przypadku posiewów na podłożu BSK. Obecnie coraz częściej poszukuje się DNA krętków w moczu chorego. Z licznych badań wynika, że podczas zakażenia można wykryć wydalane w moczu bakteryjne DNA znacznie częściej niż w płynach ustrojowych i tkankach. Ocenia się, że czułość tego testu wynosi ok. 93% [14].

Diagnostyka laboratoryjna nadal opiera się na ocenie swoistej odpowiedzi humoralnej gospodarza na zakażenie krętkami *B. burgdorferi*. Podstawową metodą rozpoznania boreliozy z Lyme jest wykrycie swoistych przeciwciał w surowicy, płynie mózgowo-rdzeniowym lub płynie stawowym.

Początkowo w diagnostyce serologicznej znalazł zastosowanie odczyn immunofluorescencji pośredniej. Obecnie jest on coraz rzadziej stosowany, a w to miejsce stosuje się metody immunoenzymatyczne: ELISA oraz *Western-blot*.

Test immunofluorescencji pośredniej wykorzystujący jako antygen całą komórkę bakteryjną, jest metodą mało czułą, a także mało swoistą ze względu na liczne reakcje krzyżowe.

Poprzez analogię do serologicznej diagnostyki kiły wprowadzony został także odczyn hemaglutynacji biernej wykorzystujący jako antygen taniowane krwinki barana opłaszczony sonikatem z całej komórki. Jest to test czuły, lecz również mało swoisty, który zaleca się wyłącznie do badań przesiewowych.

Obecnie w diagnostyce boreliozy z Lyme powszechnie stosowany jest test ELISA. Spektrofotometryczny odczyt wyników pozwala na obiektywną ocenę poziomu przeciwciał. Jednak swoistość i czułość tej metody zależy od stosowanego w niej antygeny diagnostycznego [16]. Pierwsze testy wykorzystywały jako antygen sonikat całych komórek bakteryjnych jednego szczepu. Podstawowym problemem w tych testach były reakcje krzyżowe.

Budowa antygenowa komórki *B. burgdorferi* jest dobrze poznana. Przeprowadzając elektroforezę sonikatu komórek *B. burgdorferi* w żelu poliakrylamidowym (SDS-PAGE) uzyskuje się ponad 30 frakcji białkowych. Najbardziej immunogennym, ale jednocześnie najbardziej nieswoistym białkiem, jest białko p60, tzw. antygen wspólny. Antygen ten występuje u większości bakterii Gram-ujemnych i Gram-dodatnich i ma podobne właściwości antygenowe. Charakteryzuje się ono wysokim stopniem konserwatywności ewo-

lucyjnego. Odpornościowe surowice uzyskane w wyniku immunizacji zwierząt sonikatami komórek szczepów *Treponema pallidum*, *Leptospira grippityphosa*, *Borrelia hermsi*, a także *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis* reagują krzyżowo z antygenem wspólnym *Borrelia burgdorferi*. Innymi białkami reagującymi krzyżowo są tzw. białka szoku cieplnego (p50, p70, p75) [2, 7].

Flagelina, białko wici o masie cząsteczkowej 41 kDa wywołuje silną wczesną odpowiedź immunologiczną. W swej budowie, szczególnie w początkowym i końcowym odcinku łańcucha wykazuje wysoki stopień homologii z flageliną *Bacillus subtilis* (ok. 55%) i *Salmonella typhimurium* (ok. 52%). Duże różnice w sekwencji aminokwasowej występują natomiast w środkowej części tego białka. Drugorzędowa struktura flageliny *B. burgdorferi*, powoduje że trzon filamentu wici tworzą końcowe i początkowe odcinki monomerów tego białka, zaś środkowe części między 129 a 251 aminokwasem, zawierające epitopy charakterystyczne tylko dla gatunku *B. burgdorferi* zlokalizowane są na zewnątrz wici [8].

Białka błony zewnętrznej wykazują w reakcjach serologicznych największą swoistość. Białka powierzchniowe (*outer surface proteins* – Osp) OspA (31–32 kDa), OspB (34–36 kDa), OspC (21–22 kDa), OspD (28 kDa), OspE (19 kDa), OspF (26 kDa) są lipoproteinami często o zmiennej masie cząsteczkowej. Różnica mas białek OspA (31 do 34 kDa) w różnych szczepach stwarza trudności w prawidłowej interpretacji wyników badań przeprowadzonych metodą *Western-blot*. OspA i OspB, chociaż wysoce immunogenne w zakażeniach doświadczalnych, rzadko wywołują odpowiedź w przypadku naturalnych zakażeń człowieka.

Białko OspA wykazuje różną reaktywność z przeciwciałami monoklonalnymi, wynikającą z różnic w sekwencji pomiędzy 30 i 101 aminokwasem tego polipeptydu. Jest to część, na podstawie której wyróżnio-

no 7 serotypów wśród chorobotwórczych dla człowieka genogatunków *B. burgdorferi*, występujących na terenie Europy i Ameryki Płn. Odpowiadają one podziałowi na genogatunki: *Borrelia burgdorferi sensu stricto* – serotyp 1, *Borrelia afzeli* – serotyp 2, *Borrelia garini* – serotypy od 3 do 7. Białko to jest wykrywane u około 10–20% szczepów europejskich [27].

Białko OspC jest białkiem występującym u około 40–50% szczepów europejskich. Podobnie jak OspA, białko OspC wykazuje w kilku regionach znaczne różnice w sekwencjach aminokwasowych. Na tej podstawie wyodrębniono dotychczas 4 serotypy OspC [25]. Jest to białko wysoce immunogenne i wywołuje wczesną odpowiedź immunologiczną [5].

OspD występuje jedynie w szczepach izolowanych od żywiciela oraz we wczesnych pasażach na podłożach sztucznych. Po kolejnych pasażach komórki tracą plazmid kodujący to białko, a szczep traci zjadliwość [1].

Wszystkie szczepy *B. burgdorferi* posiadają białko o masie 100 kDa (p100). Jego funkcje nie są znane. W zakażeniach u ludzi wywołuje ono późną odpowiedź układu odpornościowego. Charakteryzuje się ono dużą swoistością gatunkową.

Białka błony zewnętrznej kodowane są przez koliste plazmidy występujące w różnych kombinacjach. Występowanie poszczególnych plazmidów lub ich brak wpływa na obecność lub nieobecność tych białek [4].

Ze względu na stwierdzoną na podstawie tych badań fenotypową i antygenową heterogenność szczepów *Borrelia burgdorferi sensu lato*, stosowany w testach diagnostycznych antygen pochodzący z jednego szczepu zastąpiono mieszaniną różnych szczepów [24]. Mimo to metody, w których stosuje się sonikaty całych komórek charakteryzują się bardzo niską swoistością wynoszącą ok. 8%. W celu jej zwiększenia antygeny diagnostyczne wzbogacano izolowanymi białkami flageliny p41, a następnie zastosowano tylko tę frakcję. Uzyskano w ten sposób swoistość testu na poziomie ok. 96% przy niskiej jednak jego czułości (ok. 50%) [19].

W celu zwiększenia swoistości zaproponowano również preabsorbcję badanych surowic zawiesiną krętków *Treponema phagedenis* lub *Borrelia hermsi* oraz substancjami hamującymi aktywność czynnika reumatoidalnego. Okazały się one mało przydatne, ponieważ jednocześnie obniżają poziom swoistych przeciwciał i spadek czułości testu. Wraz ze wzrostem swoistości testu we wszystkich tych modyfikacjach następuje spadek jego czułości.

Liczne badania wykazały, że najmniejsze prawdopodobieństwo wystąpienia reakcji krzyżowych, a tym samym największe znaczenie w diagnostyce boreliozy z Lyme mają przeciwciała dla białek p100, p41, OspA, OspC. Najbardziej swoistym białkiem jest OspA [23]. Mając jednak na uwadze rzadkie występowanie przeciwciał przeciwko OspA u chorych z terenu Europy, najbardziej użyteczne w diagnostyce są pozostałe trzy białka. Wśród nich najwyższą swoistość wykazuje białko p100. Jako jedyne nie reaguje z przeciwciałami przeciw innym bakteriom (w tym również z surowicami od chorych na kile). Mogą wystąpić jedynie słabe reakcje z przeciwciałami dla *Borrelia hermsi*. Obserwowano pojedyncze przypadki reakcji białka OspC z przeciwciałami dla *Helicobacter pylori* i surowicami chorych na mononukleozę zakaźną. Natomiast flagelina daje szereg reakcji krzyżowych w przypadku innych zakażeń. Z białkiem tym reagują surowice odpornościowe dla wielu bakterii. Ze względu jednak na wysoką jego immunogenność nadal jest wykorzystywany w diagnostyce. Białko OspC i flagelina wywołują silną wczesną odpowiedź układu odpornościowego podczas gdy przeciwciała dla białka p100 pojawiają się wiele tygodni później.

Badania genetyczne *B. burgdorferi* doprowadziły do uzyskania znacznie skróconych łańcuchów polipeptydowych flageliny zawierających tylko charakterystyczne dla tego gatunku epitopy. Otrzymano w ten sposób rekombinowaną genetycznie wewnętrzną część flageliny (fragment między 129 a 251 aminokwasem), swoistą tylko dla

gatunku *B. burgdorferi sensu lato*. W podobny sposób uzyskano białka p100 i OspC. Białka pochodzące z rekombinantów genetycznych charakteryzują się dużą czystością chemiczną, ponieważ produkowane są przez komórki szczepów *Escherichia coli* jako białka zewnątrzkomórkowe. Znalazły one zastosowanie w najnowszej generacji testów ELISA. Ich czułość wynosi blisko 96%, a swoistość 100%.

W celu wykluczenia reakcji nieswoistych w serodiagnostyce boreliozy z Lyme niektóre laboratoria stosują postępowanie dwustopniowe, polegające na wykonaniu badań przesiewowych testem czułym, lecz mało swoistym, jak np. odczyn hemaglutynacji lub test ELISA z sonikatem komórek jako antygenem, a następnie wyniki dodatnie i wątpliwe dodatnie potwierdzane są testem bardzo swoistym (np. *Western-blot*) [15].

Metodę *Western-blot* wprowadzono do diagnostyki ze względu na częstość występowania wyników fałszywie dodatnich. Ta jakościowa metoda pozwala na weryfikację dodatnich wyników uzyskanych z zastosowaniem mało swoistego testu. O rozpoznaniu boreliozy z Lyme przesądza wykrycie tylko niektórych przeciwciał [6, 11]. W przypadku klasy IgM są to przeciwciała przeciw antygenom OspC, p39, p41 (flagelina), 83 kDa. Dla klasy IgG są to przeciwciała przeciw białkom p18, OspC, p28, p30, OspA, p38, p41 (flagelina), p45, p58, p66, p100. Wg zaleceń WHO, dla stwierdzenia boreliozy z Lyme konieczne jest wykrycie przeciwciał przeciw 3 antygenom spośród w.w. w klasie IgM i 6 w klasie IgG. Ponieważ na terenie Europy występują różne genogatunki *B. burgdorferi sensu lato*, a tym samym odpowiedź immunologiczna na zakażenie może być bardziej zróżnicowana, opracowano kryteria interpretacji wyników *Western-blot* dla tego kontynentu [12, 18]. W przypadku zastosowania jako antygeny diagnostycznego szczepu *Borrelia burgdorferi sensu stricto* powinny być obecne przeciwciała klasy IgG dla jednego z następujących białek: p93, p58, p56, OspC, p21, p17,

szczepu *Borrelia afzeli* – dla dwóch białek spośród: p93, p58, p43, p39, p30, OspC, p21, p17, p14 i szczepu *Borrelia garini* dla jednego białka z: p93, p39, OspC, p21, p17. W przypadku oznaczenia przeciwciał klasy IgM powinna wystąpić reakcja z co najmniej jednym z następujących białek: p39, OspC, p17 szczepów *Borrelia burgdorferi sensu stricto* i *Borrelia afzeli* i co najmniej z jednym, p39 lub OspC szczepu *Borrelia garini*. O dodatnim wyniku w klasie IgM może świadczyć również silna reakcja z antygenem p41 (flagelina), jednak ostatnie badania wykazują, że reakcja z pełnym białkiem flageliny nie może być podstawą rozpoznania zakażenia.

Alternatywę stanowi postępowanie jedno-stopniowe, czyli wykorzystanie testu czulego, a jednocześnie swoistego (np. testy z odpowiednim zestawem rekombinowanych antygenów).

Ponieważ, jak wspomniano wyżej, diagnostyka serologiczna boreliozy z Lyme nie jest wystandaryzowana, przy wyborze toku postępowania diagnostycznego laboratoria kierują się zwykle rachunkiem ekonomicznym, przy czym musi on gwarantować czułość i swoistość metody na poziomie 95%.

Obok reakcji krzyżowych związanych podobieństwem budowy antygenowej różnych gatunków bakterii, trudności w prawidłowej interpretacji wyników badań serologicznych może też stwarzać obecność w surowicy krwi czynnika reumatoidalnego (RF). Kompleks IgM-RF może łączyć się ze swoistymi przeciwciałami klasy IgG przyłączonymi do antygeny. Koniugat dla łańcuchów  $\mu$  stosowany dla wykrycia swoistych dla *B. burgdorferi* przeciwciał klasy IgM może łączyć się z kompleksem IgG-IgM-RF dając wyniki fałszywie dodatnie. Wyniki fałszywie ujemne mogą występować w przypadku nadmiaru IgG. Dochodzi wówczas do współzawodnicstwa IgG z IgM [18, 22].

W boreliozie późnej występuje zwykle silna odpowiedź immunologiczna i czułość stosowanych testów serologicznych jest wystarczająca do jej rozpoznania. Problem jed-

nak w postawieniu diagnozy stanowią choroby serologicznie ujemni (zwłaszcza w przypadkach neuroboreliozy), a także chorzy z podwyższonym mianem przeciwciał wiele miesięcy po leczeniu. Przyczyną fałszywie ujemnych wyników w tych przypadkach jest m.in. tworzenie się krążących kompleksów immunologicznych, które nie pozwalają na wykrycie zablokowanych przez antygen swoistych przeciwciał. W przypadkach tych, zwykle przebiegających z ostrymi objawami, wynik badania serologicznego w kierunku boreliozy z Lyme jest zazwyczaj ujemny.

Również stosowanie antybiotyków może powodować zahamowanie produkcji przeciwciał. W zależności od okresu choroby, w którym zostały one podane, dotyczyć to może klasy IgM i IgG. Często u leczonych chorych stwierdzić można utrzymywanie się przez dłuższy czas przeciwciał IgM i brak odpowiedzi w klasie IgG [13].

W tych przypadkach dodatni wynik PCR stanowi cenną, dodatkową, a w niektórych rozstrzygającą o rozpoznaniu informację. W przebiegu neuroboreliozy, np. DNA krętków, wykrywa się w 25% do 38% próbek płynów mózgowo-rdzeniowych [20].

Nie istnieje żadna korelacja pomiędzy wynikiem badania serologicznego, posiewu (na podłożu BSK) i PCR. U chorych z objawami boreliozy z Lyme wykrywano DNA *B. burgdorferi* lub izolowano krętki przy braku obecności swoistych przeciwciał.

W związku z tym, coraz częściej przyjmuje się, że mimo braku wykrycia swoistych przeciwciał, obecność objawów klinicznych sugerujących boreliozę z Lyme i stwierdzenie DNA krętków *B. burgdorferi* w materiale klinicznym pozwala na rozpoznanie zakażenia.

W związku z przedstawionymi powyżej problemami w laboratoryjnym rozpoznaniu boreliozy z Lyme należy u chorych z objawami klinicznymi zakażenia przede wszystkim wykonać badanie serologiczne w celu wykrycia swoistych przeciwciał należących zarówno do klasy IgM jak i IgG.

Wykrycie swoistych przeciwciał klasy IgM wskazuje na ostre, bieżące zakażenie.

Wynik taki ma niewątpliwą wartość diagnostyczną i jest wskazaniem do leczenia. Brak przeciwciał tej klasy nie wyklucza jednak rozpoznania, ponieważ we wczesnym stadium choroby poziomy przeciwciał są na tyle niewysokie, że dostępnymi testami możemy ich nie wykryć. W takiej sytuacji należy powtórzyć badanie po ok. 2 tygodniach. Z drugiej strony obserwowano, że niektórzy chorzy wytwarzają jedynie wykrywalne ilości przeciwciał klasy IgG, które mogą utrzymywać się jednocześnie na wysokim poziomie nawet przez kilka lat po leczeniu. W tej sytuacji, obecność swoistych przeciwciał IgG wymaga w oparciu o obserwacje kliniczne różnicowania pomiędzy ostrą i przewlekłą boreliozą oraz wykluczenia ewentualności wcześniejszej ekspozycji na krętki. W podejrzeniu neuroboreliozy bardzo duże znaczenie ma badanie płynu mózgowo-rdzeniowego (CSF). Wykrycie w nim przeciwciał i podwyższony indeks CSF x surowica są najlepszym wskaźnikami neuroboreliozy. Ujemny wynik badania CSF nie wyklucza jednak rozpoznania, ponieważ opisano liczne przypadki, w których nie występuje miejscowa produkcja przeciwciał.

Jeżeli uzyskano wynik dodatni, ważne jest wykluczenie możliwości wystąpienia reakcji nieswoistej (wynik fałszywie dodatni). Aby taką możliwość wyeliminować, laboratorium powinno wykonać badanie, albo stosując test o wysokiej swoistości i czułości, np. ELISA, z odpowiednim zestawem antygenów rekombinowanych (diagnostyka 1-stopniowa), albo po badaniu wstępnym testem o wysokiej czułości, np. stosując odczyn hemaglutynacji biernej lub ELISA z sonikatem całej komórki, wynik dodatni potwierdzić metodą *Western-blot* (diagnostyka 2-stopniowa). W diagnostyce 2-stopniowej błędem jest w pierwszym etapie zastosowanie testu selektywnego, w którym antygen stanowią tylko wybrane frakcje białkowe *B. burgdorferi*.

Jeżeli przy zachowaniu tych zasad postępowania uzyskuje się wynik ujemny badania przy objawach klinicznych i wywiadzie

epidemiologicznym wskazujących na możliwość zakażenia, w kolejnym etapie należy wykonać test PCR z próbki moczu, płynu mózgowo-rdzeniowego lub stawowego, a także podjąć próbę izolacji krętków z krwi lub wybranych płynów ustrojowych. Stwierdzono, że leczenie chorego w tym czasie antybiotykami ma nieznaczny wpływ na wynik hodowli. Dodatkowo można również oznaczyć poziom krążących kompleksów immunologicznych w surowicy krwi.

## PIŚMIENNICTWO

1. Barbour A.G.: Plasmid analysis of *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease agent. *J. Clin. Microbiol.* 1988, 26, 475.
2. Bruckbauer H.R., Preac-Mursic V., Fuchs R., Wilske B.: Cross-reactive proteins of *Borrelia burgdorferi*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 1992, 11, 224.
3. Busch U., Teufel C.H., Boehmer R., Wilske B., Preac-Mursic V.: Molecular characterization of *Borrelia burgdorferi sensu lato* strains by pulsed-field gel electrophoresis. *Electrophoresis* 1995, 16, 744.
4. Busch U., Will G., Hizo-Teufel C., Wilske B., Preac-Mursic V.: Long-term in vitro cultivation of *Borrelia burgdorferi sensu lato* strains: influence on plasmid patterns, genome stability and expression of proteins. *Res. Microbiol.* 1997, 148, 109.
5. Carter C.J., Bergstrom S., Norris S.J., Barbour A.G.: A family of surface-exposed proteins of 20 kilodaltons in the genus *Borrelia*. *Infect. Immun.* 1994, 62, 2792.
6. Cinco M., Murgia R., Ruscio M., Andriolo B.: IgM and IgG significant reactivity to *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia garinii* and *Borrelia afzelii* among Italian patients affected by Lyme arthritis or neuroborreliosis. *FEMS Immun. Med. Microbiol.* 1996, 14, 159.
7. Coleman J.L., Benach J.L.: Characterization of antigenic determinants of *Borrelia burgdorferi* shared by other bacteria. *J. Infect. Dis.* 1992, 165, 658.
8. Coleman J.L., Benach J.L.: Identification and characterization of an endoflagellar antigen of *Borrelia burgdorferi*. *J. Clin. Invest.* 1989, 84, 322.
9. Comstock L.E., Thomas D.D.: Penetration of endothelial cell monolayers by *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Immun.* 1989, 57, 1626.
10. Coyle P.K., Schutzer S.E., Deng Z., Krupp L.B., Belman A.L., Benach J.L., Luft B.J.: Detection of *Borrelia burgdorferi* – specific antigen in antibody – negative cerebrospinal fluid in neurologic Lyme disease. *Neurology* 1995, 45, 2010.
11. Dressler F., Whalen J.A., Reinhardt B.N., Steere A.C.: Western blotting in the serodiagnosis of Lyme disease. *J. Infect. Dis.* 1993, 167, 392.
12. Hauser U., Lehnert G., Lobentanzer R., Wilske B.: Interpretation criteria for standardized Western blots for three European species of *Borrelia burgdorferi sensu lato*. *J. Clin. Microbiol.* 1997, 35, 1433.
13. Hilton E., Tramontano A., de Voti J., Sood S.K.: Temporal study of immunoglobulin M seroreactivity to *Borrelia burgdorferi* in patients treated for Lyme borreliosis. *J. Clin. Microbiol.* 1997, 35, 774.
14. Lebech A.-M., Hansen K.: Detection of *Borrelia burgdorferi* DNA in urine samples and cerebrospinal fluid samples from patients with early and late Lyme neuroborreliosis by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 1992, 30, 1646.
15. Ledue T.B., Collins M.F., Craig W.Y.: New laboratory guidelines for serologic diagnosis of Lyme Disease: evaluation of the two-test protocol. *J. Clin. Microbiol.* 1996, 34, 2343.
16. Magnarelli L.A., Anderson J.F., Johnson R.C., Nadelman R.B., Wormser G.P.: Comparison of different strains of *Borrelia burgdorferi sensu lato* used as antigens in enzyme-linked immunosorbent assays. *J. Clin. Microbiol.* 1994, 32, 1154.
17. Nadelman R.B., Schwartz G., Wormser P.: Detecting *Borrelia burgdorferi* in blood from patients with Lyme disease. *J. Infect. Dis.* 1994, 169, 1410.
18. Norman G.L., Antig J.M., Bigaignon G., Hogrefe W.R.: Serodiagnosis of Lyme borreliosis by *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii*, and *B. afzelii* Western blots (Immunoblots). *J. Clin. Microbiol.* 1996, 34, 1732.
19. Oksi J., Uksila J., Marjamaki M., Nikoskelainen J., Viljanen M.K.: Antibodies against whole sonicated *Borrelia burgdorferi* spirochetes, 41-kilodalton flagelin, and p39 protein in patients with PCR or culture-proven



- late Lyme borreliosis. *J. Clin. Microbiol.* 1995, 33, 2260.
20. Picken M.M., Picken R.N., Han D., Cheng Y., Ruzic-Sabljic E., Cimperman J., Maraspin V., Lotric-Furlan S., Strle F.: A two year prospective study to compare culture and polymerase chain reaction amplification for the detection and diagnosis of Lyme borreliosis. *Mol. Pathol.* 1997, 50, 186.
  21. Pollack R.J., Teleford III S.R., Spielman A.: Standardization of medium for culturing Lyme disease spirochetes. *J. Clin. Microbiol.* 1993, 31, 1251.
  22. Schmidt B.L.: PCR in laboratory diagnosis of human *Borrelia burgdorferi* infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 1997, 10, 185.
  23. Schutzer S.E., Coyle P.K., Dunn J.J., Luft B.J., Brunner M.: Early and specific antibody response to OspA in Lyme disease. *J. Clin. Invest.* 1994, 94, 454.
  24. Stanek G., Jurkowitsch B., Kochl C., Burger I., Khanakha G.: Reactivity of European and American isolates of *Borrelia burgdorferi* with different monoclonal antibodies by means of a microimmunoblot technique. *Zbl. Bakt.* 1990, 272, 426.
  25. Theisen M., Frederiksen B., Lebech A.-M., Vuust J., Hansen K.: Polymorphism in OspC gene of *Borrelia burgdorferi* and immunoreactivity of OspC protein: implications for taxonomy and for use of OspC protein as a diagnostic antigen. *J. Clin. Microbiol.* 1993, 31, 2570.
  26. Tylewska-Wierzbanowska S., Chmielewski T.: The isolation of *Borrelia burgdorferi* spirochetes from clinical material in cell line cultures. *Zbl. Bakt.* 1997, 286, 363.
  27. Wilske B., Preac-Mursic V., Gobel U.B., Graf B., Jauris S., Soutschek E., Schwab E., Zumstein G.: An OspA serotyping system for *Borrelia burgdorferi* based on reactivity with monoclonal antibodies and OspA sequence analysis. *J. Clin. Microbiol.* 1993, 31, 340.

*Adres: Dr Stanisława Tylewska-Wierzbanowska, Zakład Bakteriologii PZH,  
ul. Chocimska 24, 00-791 Warszawa*