

Borelioza

problemy z diagnostyką laboratoryjną

DR N. MED. EDYTA GAŁĘZIOWSKA
FUNDACJA „BARTEK” NA RZECZ OSÓB Z BORELIOZĄ
I INNYMI CHOROZAMI ODKLESZCZOWYMI

WWW.FUNDACJA-BARTEK.PL

Strategia życiowa *Borrelia burgdorferi*

Bakteria wywołująca boreliozę jest patogenem wewnątrzkomórkowym. Z uwagi na różne środowiska życia (kleszcz i stałocieplny ssak), krętki, aby przeżyć, muszą się adaptować do odmiennych warunków bytowania. *Borrelia burgdorferi* (*Bb*) to jeden z największych krętków, a jego grubość porównać można do ludzkiego włosa. Ze względu na posiadanie własnego napędu, który tworzą połączone ze sobą wici, biegnące wzdłuż ciała, jest wyjątkowo ruchliwa; zarówno we krwi jak i w innych tkankach potrafi poruszać się doskonale. Utrzymanie spiralnego kształtu możliwe jest dzięki posiadaniu przez nią potrójnej ściany komórkowej. W porównaniu do innych bakterii, które potrzebują kilku-, kilkunastu- czy kilkudziesięciu minut, podział krętka boreliozy następuje bardzo powoli - szacuje się, że jest to 12-24 godz. Jest to o tyle ważne, że antybiotyki, działające na ścianę komórkową, mogą zniszczyć bakterię tylko podczas takiego podziału.

Bakteria, wywołująca boreliozę, jest najprawdopodobniej jedną z najstarszych filogenetycznie bakterii. Oznacza to, że w toku swego rozwoju tak udoskonaliła mechanizmy przetrwania, że eliminacja jej z organizmu może być utrudniona lub wręcz niemożliwa. Te mechanizmy to wywoływanie immunosupresji, tolerancji immunologicznej, zmienność antygenowa, ukrywanie się wewnątrzkomórkowo oraz przebywanie w miejscach uprzywilejowanych immunologicznie.

Krętki *B. burgdorferi* charakteryzują się złożoną strukturą genetyczną - opisano u nich ponad 1500 sekwencji genowych i ponad 132 geny. Umożliwia to skuteczną adaptację *Bb* do organizmu ludzkiego i unikanie odpowiedzi immunologicznej poprzez strategię „skrytej patologii”, obejmującą, m.in. działanie immunosupresyjne, rozwój w różnych tkankach i zmienność antygenową. Atakując komórkę układu odpornościowego, powoduje zniszczenie jej ściany komórkowej, otacza się jej błoną komórkową, co sprawia, że *Borrelia* nie jest rozpoznawalna przez układ immunologiczny; ponadto posiada zdolność wykorzystywania płaszcza antygenowego ludzkich limfocytów B.

Strategia życiowa polegająca na omijaniu odpowiedzi immunologicznej organizmu przedkłada się

także na możliwości wykrycia jej metodami diagnostycznymi, opartymi o serologię. Odpowiedź immunologiczna jest odmienna od tej, którą obserwuje się w innych chorobach, a przede wszystkim powoduje, że testy, które ją oceniają, mogą okazać się zawodne w diagnostyce laboratoryjnej *Borrelia burgdorferi*.

Podstawową postacią bakterii jest ruchliwa forma spiralna, zwana krętkiem. W niesprzyjających warunkach krętki te przekształcają się w formy L, czyli formę sferyczną bez ściany komórkowej, które z kolei mogą się skupiać, tworząc tzw. cystę, która nie jest aktywna metabolicznie. Proces ten jest odwracalny, gdyż wszystkie formy zachowują możliwość transformacji. Formy L, pozbawione ściany komórkowej, a tym samym i antygenów, stają się niewidoczne dla układu odpornościowego, co powoduje spadek produkcji przeciwciał. Zarówno brak przeciwciał, jak i antybiotyków w tkankach sprzyja przekształceniu się form nieaktywnych, ukrytych w cystach, w formę krętka, a to prowadzi do rozprzestrzeniania się zakażenia w całym organizmie. Bakteria może także wytwarzać formy pęcherzykowate, zwane blebs, których znaczenie dla rozsiewania zakażenia nie jest do końca jasne.

Oprócz zmienności morfologicznej, bakteria wykształciła też

inny, niespotykany u pozostałych bakterii mechanizm obronny, tj. heterogenność i polimorfizm antygenów. Ma to bezpośredni wpływ na wytwarzane przez organizm przeciwciała. Ściana komórkowa bakterii posiada białka powierzchniowe Osp (OspA, OspB, OspC, VlsE). Ekspresja białek antygenowych ma miejsce już w momencie przechodzenia bakterii z kleszcza do ciała człowieka- ekspresja białek OspA i OspB jest bardziej wyrażona w czasie pobytu krętka w kleszczu, a OspC i VlsE - w organizmie ssaka.

Unikanie odpowiedzi immunologicznej organizmu człowieka poprzez zmiany antygenów powierzchniowych powoduje, że pojawiają się nowe antygeny, przeciwko którym nie zdażyły się jeszcze wytworzyć przeciwciała. Dodatkowo wcześniej wytworzone przeciwciała nie spełniają już swej funkcji ochronnej. Nowe antygeny pojawiają się i zanikają stale, co wynika z obranej strategii życiowej patogenu, pozwalającej przetrwać jej wiele lat w organizmie ssaka.

Początkowo układ immunologiczny rozpoznaje niewiele antygenów (m.in. p39, p58), jednakże wraz z upływem czasu odpowiedź się rozszerza i w późniejszych stadiach choroby produkowane są przeciwciała, skierowane przeciwko wielu antygenom (np. p83/100, p53, p43, p39, p30, p21, Osp17, pl4).

Antygenowość cyst różni się od antygenowości form wegetatywnych - cysty nie reagują z przeciwciałami przeciwko flagelinie. Jest prawdopodobne, że krętki w formie nieaktywnej, ale immunokoinpetentnej, są odpowiedzialne za stymulację antygenową, powodując objawy przewlekłej boreliozy; mogą być też przyczyną długich okresów latencji w przebiegu boreliozy.

Kolejny mechanizm, umożliwiający bakterii przetrwanie, to przebywanie w miejscach uprzywilejowanych immunologicznie. *Borrelia burgdorferi* bardzo szybko, w ciągu kilku dni od momentu wtargnięcia, rozprzestrzenia się w całym organizmie człowieka. Wynika to przede wszystkim z tego, iż zawiodą miejscowe mechanizmy obronne, a przeciwciała wytwarzają się z opóźnieniem. Bez większych trudności bakteria może więc dotrzeć tam, gdzie późniejsze przebywanie jest dla niej bezpieczne, bo odpowiedź immunologiczna jest znacznie utrudniona, a tym samym organizm nie jest w stanie jej rozpoznać i próbować zwalczyć. Takimi miejscami są, m.in. przestrzenie wewnątrzkomórkowe śródbłonna, fibroblasty, układ kostno-stawowy czy ośrodkowy układ nerwowy. Do tych miejsc trudniej docierają również antybiotyki, wobec czego istnieje ryzyko wznowy choroby, jeśli bakterie wydostaną się ze swego ukrycia; w takiej sytuacji mogą być wtedy produkowane przeciwciała, charakterystyczne dla wczesnego okresu choroby.

Metody pośrednie, czyli jak ocenić odpowiedź immunologiczną organizmu

Nowoczesna diagnostyka serologiczna boreliozy powinna być procesem dwustopniowym. I etap to badanie skryningowe, które powinno być wykonywane testem serologicznym ilościowym, z antygenami II lub III generacji, o wysokiej czułości; nie są zalecane testy z antygenami I generacji. Antygeny II generacji są to izolowane, oczyszczone frakcje antygenowe, o większej swoistości, niż cała komórka bakteryjna lub jej sonikat, wykorzystywane jako antygeny I generacji. Z kolei antygeny III generacji to białka rekombinowane, otrzymywane drogą inżynierii genetycznej. W badaniu przesiewowym oznaczony zostaje poziom przeciwciał w klasie IgM i IgG. W założeniach test ten powinien charakteryzować się wysoką czułością i mniejszą swoistością, stąd wszystkie wyniki dodatnie lub wątpliwe powinny być zweryfikowane testem jakościowym Western blot, który z kolei powinien się odznaczać wysoką swoistością. Zgodnie z obowiązującymi polskimi wytycznymi (lecz w opozycji do standardów europejskich), po uzyskaniu negatywnego wyniku badania przesiewowego można zakończyć dalszą diagnostykę w kierunku boreliozy.

TECHNOLOGY UPDATE

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

LON V. KENBALL, DVM and LISA K. RILEY, PhD

Purpose: ELISAs are used primarily to detect specific protein antigens using antibodies. In laboratory animal medicine, ELISAs are commonly used to screen serum samples from animals to detect antibodies to a specific pathogen. In the research environment, ELISAs can be modified (capture ELIA) to detect a protein of interest.

Method:

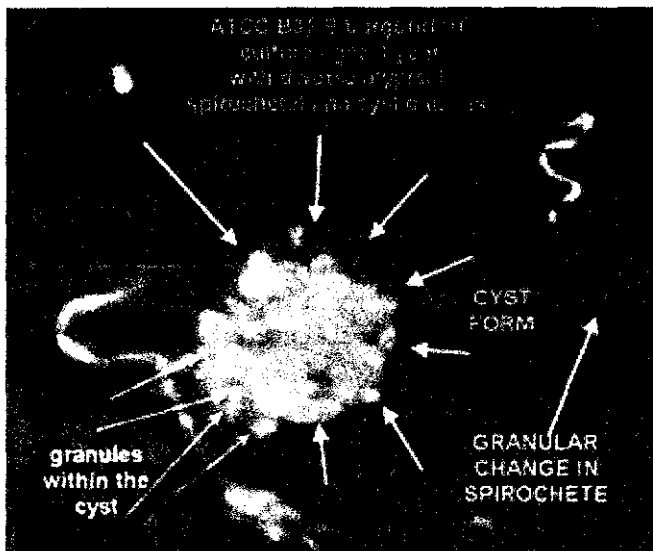
FIG. 1. Solid phase membrane assay (e.g. a 96 well plate) are coated with antigens using a coating buffer. The antibodies binding, when unoccupied by the antigen are blocked with a blocking buffer to prevent non-specific binding of sample.

FIG. 2. Washing step. The antibodies that do not bind to the antigen are washed away.

FIG. 3. An enzyme labeled (e.g. alkaline phosphatase or horseradish peroxidase) secondary antibody is introduced with the sample and binds tightly to the sample antibody.

Source: Animal Diagnostic and Investigation Laboratory, Department of Veterinary Pathobiology, University of Missouri, Columbia.

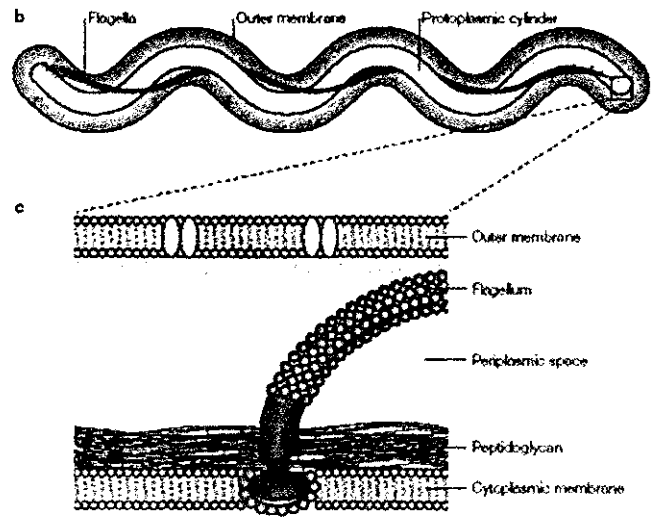
Elisa - zasada testu



Różne formy bakterii Bb

Konieczność potwierdzenia ELISY wynika z możliwych reakcji krzyżowych, które dają wynik fałszywie dodatni. Taka reakcja może wynikać z innej infekcji, np. *Treponema pallidum*, Ehrlichia, zakażenia wirusami Herpes (szczególnie Epstein-Barr) i dotyczy zwłaszcza przeciwciał klasy IgM. Wymienione drobnoustroje posiadają antygeny, które występują także w krętku boreliozy, np.: p41, p58-60, p66, p68, p71, p73. Test Western biot eliminuje wyniki fałszywie dodatnie, gdyż poszukiwane nim antygeny są swoiste dla *Borrelia burgdorferi* - za wyjątkiem antygeny p41, tj. flageliny. Inną przyczyną wyniku fałszywie dodatniego mogą być hipergammaglobulinemie, tj. wysokie miana przeciwciał u chorych z chorobami autoimmunologicznymi.

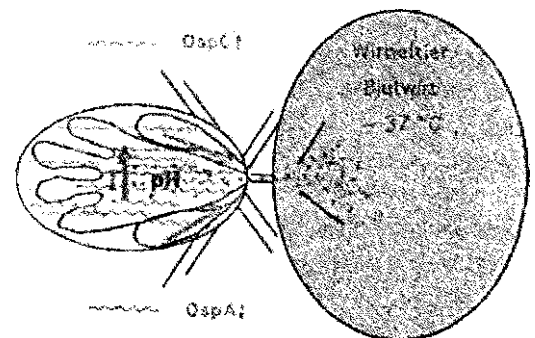
Oprócz wyników fałszywie dodatnich, o wiele częściej mogą się zdarzać wyniki fałszywie ujemne, tj. brak miana przeciwciał, wskazującego na zakażenie. Sytuacje takie są przede wszystkim efektem opisanej strategii życiowej bakterii. Opóźniony moment pojawienia się przeciwciał powoduje, że zbyt wczesne wykonanie badania da wynik fałszywie ujemny. Ponadto w teście mogą być oznaczane przeciwciała przeciw antygenom, które nie są jeszcze albo już prezentowane przez bakterię (zmiennosc antygenowa). Inną przyczyną seronegatywnej boreliozy jest przebywanie bakterii tam, gdzie trudno ją dostrzec systemowi immunologicznemu (miejsca immunologicznie uprzywilejowane), obecność bakterii w formie L, które nie posiadają ścian komórkowej z antygenami, a także defekt immunologiczny u chorego czy lokalna produkcja przeciwciał, które nie dostają się do krwi (np. tylko w płynie mózgowo-rdzeniowym czy stawowym). Kolejną bardzo ważną przyczyną boreliozy seronegatywnej, jest brak wolnych przeciwciał w badanej surowicy, gdyż badaniem można oznaczyć tylko wolne, tj. niezwiązane z antygenem



Bb - schemat budowy

przeciwciała. Taka sytuacja ma miejsce wtedy, gdy produkcja przeciwciał jest zbyt mała lub we krwi krąży bardzo duża ilość antygenów. Przeciwciało po połączeniu się z antygenem stanowi kompleks immunologiczny, który nie może być wykryty testem ELISA. Badania wykazują ponadto, że osłabienie odpowiedzi humoralnej przez zastosowanie antybiotyku w początkowym stadium choroby, też może skutkować otrzymaniem negatywnego, wyniku mimo trwającej infekcji.

Niestety, stosowanie testu ELISA nie daje zadowalających rezultatów także z innego powodu. Jak wykazały badania włoskie, prowadzone w oparciu o testy trzech wiodących marek europejskich, wyniki znacznie mogą się różnić w zależności od producenta; każdy z tych testów różnił się czułością, która wynosiła od 20,9% do 97,7%. Natomiast badania lubelskie dowiodły, że oceniane testy Western biot różnych producentów, stosowane w Polsce, nie wykazują między sobą dostatecznie wysokiej zgodności wyników badań. Należy przy tym podkreślić, że testy Elisa, a także test potwierdzenia, tj.



Ekspresja białek Bb w trakcie przemieszczania się z kleszcza do organizmu ssaka

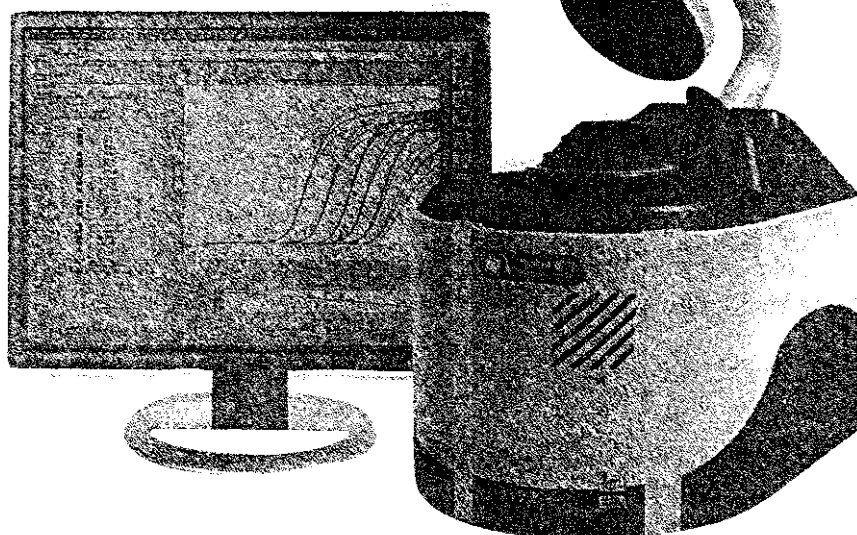
Borelioza

Western biot, nie są metodami wystandardyzowanymi, co oznacza, że każdy producent testu sam decyduje, m.in. o tym, jakie antygeny będą użyte do badania.

Zalecenia polskie zamykają możliwość prowadzenia dalszej diagnostyki w kierunku boreliozy po otrzymaniu wyniku negatywnego testu przesiewowego, jakim jest ELISA. Jednakże z badań Instytutu Medycyny Wsi w Lublinie wynika, że test Western biot należy wykonać także u osób z wynikiem negatywnym, gdyż u niektórych chorych jest ono czulsze niż ELISA. Naukowcy ci podkreślają także, że Western biot cechuje się wysoką swoistością, a jedynym antygenem nieswoistym dla krętka boreliozy ocenianym w tym badaniu jest flagelina, czyli p41. W teście tym oznacza się nie przeciwciała, ale obecność antygenów, dlatego wynik nie określa miana przeciwciał, a antygeny („paski”), które wykryto badaniem (np. p39, p100, VlsE). W technice tej białka rozdzielane są metodą elektroforetyczną i przenoszone z żelu na nitrocelulozę, czyli blotting. Nitroceluloza z zaadsorbowanymi białkami jest cięta na cienkie paski i w takiej postaci jest używana do wykonania testu serologicznego. W wyniku rozdziłu elektroforetycznego lizatu całych komórek bakterii udało się zidentyfikować 30 różnych pasm białkowych (antygenów). Wykazano, że czułość i swoistość metody zależy od genogatunku szczepu użytego jako antygeny diagnostycznego (w Europie dominuje *B. garinii* i *B. afzelii*; znacznie mniej zakażeń jest wywołanych *B. burgdorferi sensu stricto*).

Należy pamiętać o tym, że boreliozę diagnozuje się klinicznie; badania laboratoryjne mogą jedynie dodatkowo przemawiać za rozpoznaniem. W związku z tym pozytywny wynik badania laboratoryjnego przy braku objawów nie upoważnia do rozpoznania choroby,

Sprzęt do wykonywania badań metodą real time PCR



a wynik negatywny z towarzyszącymi choremu objawami chorobowymi nie musi oznaczać jej braku. Ponadto należy pamiętać o tym, że dodatni wynik testu ELISA w klasie IgG może się utrzymywać nawet wiele lat po skutecznym wyeliminowaniu bakterii z organizmu.

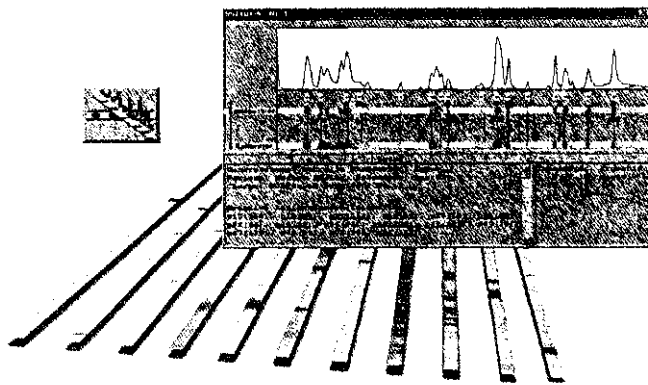
W przeciwieństwie do polskich zaleceń, standardy europejskie, biorąc pod uwagę przedstawione wyżej przyczyny seronegatywności, wskazują na możliwość prowadzenia dalszej diagnostyki - tj. wykorzystanie metody PCR lub hodowle.

PCR (Polymerase Chain Reaction) i real time PCR

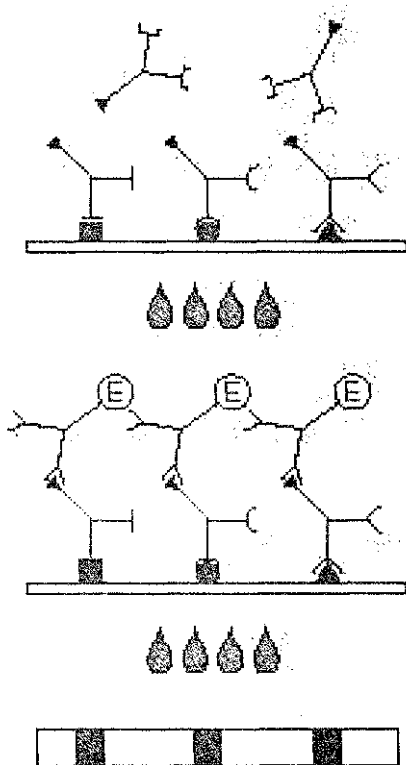
Jest to metoda, która umożliwia powielanie wybranych sekwencji DNA, występujących tylko u poszukiwanego organizmu. Stosuje się ją z powodzeniem w diagnostyce drobnoustrojów, np. HBV czy HCV, a także modyfikacji genetycznych czy genów lub mutacji w genach sprzyjających procesom nowotworowym. Amplifikacja fragmentu DNA metodą PCR zaczyna się od denaturacji DNA; następnie dochodzi do przyłączenia primera i syntezy komplementarnej nici DNA przy pomocy enzymu polimerazy. Etapy te są powtarzane cyklicznie, a na-

stępnie wykonuje się rozdziel uzyskanego produktu na żelu podczas elektroforezy i wizualizacji za pomocą barwników wiążących DNA. Jest to badanie jakościowe.

Najnowszym osiągnięciem biologii molekularnej jest metoda analizy DNA - real-time PCR (reakcja PCR w czasie rzeczywistym). Oprócz wszystkich zalet klasycznej reakcji PCR, test DNA oparty na metodzie real-time PCR stwarza nowe możliwości. Dzięki zastosowaniu barwników i sond fluorescencyjnych, real-time PCR umożliwia jednoczesne powielanie i wykrywanie charakterystycznych sekwencji DNA, co znacznie skraca czas uzyskania wyniku analizy. Ścisła zależność intensywności iluorescencji, wzrastającej w miarę zachodzenia reakcji PCR, jest skorelowana z ilością powstającego produktu. Umożliwia to przeprowadzenie pomiarów ilościowych i określenie przybliżonej liczby mikroorganizmów w badanych próbkach. Real time PCR zwiększa specyficzność badania do 98-100% poprzez wprowadzenie komplementarnych do badanego genu sond oraz analizę poziomu fluorescencji w specjalnych programach komputerowych, co czyni go także metodą ilościową. Ponadto zwiększona jest



Ocena komputerowa WB



WB – zasada testu

Wg różnych badań czułość metody PGR jest uzależniona od materiału, w którym poszukuje się sekwencji genu. W bioptatach ze skóry w Erythema Migrans (EM) wynosić może 60-70%, w AGA - ok. 60%, we krwi u osób z EM 18%, w płynie mózgowo-rdzeniowym w neuroboreliozie - 10-30%. Czułość testów, opartych o real time PGR jest 20-200 razy wyższa niż tradycyjnego PGR, jednakże dostęp do tego badania jest znacznie ograniczony - w Europie badanie w kierunku boreliozy jest dostępne jedynie w jednym ośrodku - jest to Centrum Badań DNA w Poznaniu. Najprawdopodobniej czułość metody PCR powoduje, że to badanie stosunkowo rzadko daje wynik pozytywny; bakteria żyje wewnątrztkankowo, więc we krwi przebywa w stosunkowo niewielkiej ilości, czego nie udaje się potwierdzić tradycyjnym PCRem.

także czułość badania i nie ma możliwości kontaminacji produktem PGR (brak wyników fałszywie dodatnich), gdyż nie ma potrzeby rozdzielania produktu reakcji na żelu - przyłączenie się sondy fluorescencyjnej do poszukiwanego fragmentu DNA daje efekt świetlny, który jest analizowany w sposób obiektywny, przez program komputerowy, bez interwencji człowieka.

Metoda złotego środka, czyli hodowle krętków

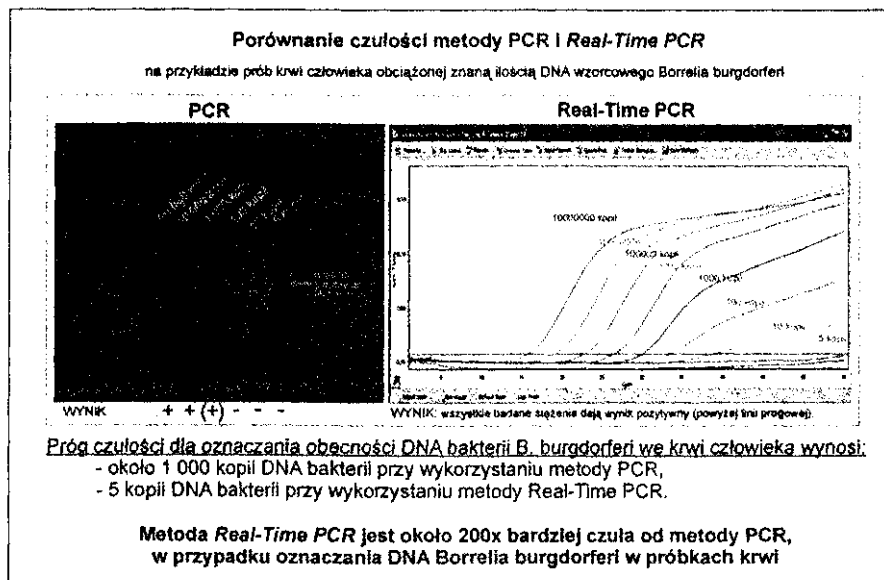
Jest to metoda, która w diagnostyce mikrobiologicznej nazwana jest złotym środkiem. Pozytywny wynik hodowli daje 100% pewność, że w organizmie są żywe bakterie. Niestety, jest to metoda bardzo czasochłonna, gdyż krętki rosną bardzo wolno (> 12 tygodni) i są to bakterie bardzo wymagające. W stałych warunkach hodowli „pracuje” około 10% materiału genetycznego. Do wykrywania krętków w hodowli stosuje się mikroskop z ciemnym polem widzenia lub fluorescencyjny; stosując PCR skraca się czas prowadzenia hodowli do 7 dni. Pozytywny wynik hodowli udaje się uzyskać u 70% chorych z EM (hodowla ze skóry), a z płynu mózgowo-rdzeniowego przy neuroboreliozie - zaledwie u 10-30%.

Nowości w diagnostyce boreliozy

Test LTT boreliozą - jest to test, opracowany przez niemieckich naukowców, przydatny zwłaszcza w rozpoznawaniu późnej czy wczesnej rozsianej boreliozy, jeśli wynik badania serologicznego i PCR jest negatywny. W teście tym poszukiwane są pobudzone limfocyty T, więc osoba stosująca sterydy, może otrzymać wynik fałszywy, tj. sugerujący brak aktywnego zakażenia. Test może być przydatny do monitorowania efektów leczenia, ale nie samego leczenia. Badanie wykonywane jest w Niemczech; w Polsce można oddać krew do badania w laboratorium, które współpracuje z ośrodkiem, wykonującym ten test.

Antygeny krętkowe w moczu (LUAT - Lyme Urine Antigens) - jest to badanie pozwalające na wykrycie antygenów krętka boreliozy (*Borrelia burgdorferi*) w moczu. Są one wydalane z moczem i mogą być w tym materiale wykryte. Badanie musi być wykonane w czasie podawania antybiotyków bakteriobójczych (np. pochodnych penicyliny lub cefalosporyn) oraz leków powodujących rozpad „cyst” bakteryjnych (tynidazol/metronidazol). Wykonanie badania bez podania antybiotyków zazwyczaj daje wynik ujemny (wydalanie antygenów krętkowych jest zbyt niskie i nie można ich wykryć w moczu). Mocz pobierany jest zazwyczaj w 2, 4 i 6 dniu prowokacji (pierwsza, poranna próbka moczu) lub, jeśli badanie jest przeprowadzane jako kontrola, pod koniec leczenia - w dowolnym momencie antybiotykoterapii. Badanie jest polecane zwłaszcza osobom, które mają defekt immunologiczny lub przyjmują sterydy (utrudniają powstawanie przeciwciał). Test może być przydatny także w podejmowaniu decyzji o zakończeniu leczenia, gdyż ujemny wynik wraz z ustąpieniem objawów klinicznych u chorego może świadczyć o wyeliminowaniu bakterii z organizmu.

Borelioza



rtPCR a zwykły PCR

Test C6 LYME firmy Immunitics Inc. (USA) - to nowe badanie w kierunku boreliozy oparte na opatentowanej w USA metodzie wykorzystującej syntetyczny peptyd (tzw. peptyd C6 lub IR6), który reprezentuje najważniejsze, odpowiedzialne za produkcję przeciwciał, fragmenty białka krętkowego o nazwie VlsE. Sekwencja peptydu jest wspólna dla wszystkich najważniejszych genogatunków krętków (*B. sensu stricto*, *B. afzelii* i *B. garinii*, w tym szczepów europejskich tych genogatunków). Ponieważ do kon-

strukcji testu wykorzystano wysoce specyficzne dla Borelii fragmenty białek krętkowych, minimalizuje to ryzyko wystąpienia reakcji krzyżowych z innymi krętkami i uzyskania wyników fałszywie dodatnich (jak w klasycznych odczynach serologicznych opartych o lizaty krętków hodowanych *In vitro*).

Badania kliniczne wykazały znaczną czułość i swoistość diagnostyczną testu C6 Lyme. U chorych z zapaleniem stawów w przebiegu boreliozy wykazano czułość na poziomie 97% (dla porównania, do-

datnie wyniki WB uzyskano tylko u 87,9% pacjentów w tej fazie choroby); u pacjentów z porażeniem nerwu twarzonego w przebiegu boreliozy - 87,5%, (dodatnie wyniki WB uzyskano u 81,3% pacjentów w tej fazie choroby), a u chorych z wszystkimi postaciami neurologicznymi boreliozy - 82,8% (dodatnie wyniki WB uzyskano tylko u 72,4% pacjentów w tej fazie choroby).

Opisane strategie życiowe bakterii tłumaczą trudności w stosowaniu testów opartych o badanie odpowiedzi immunologicznej organizmu, a typowe miejsca bytowania bakterii, gdzie znajduje się ona poza zasięgiem możliwości układu immunologicznego, utrudniają uzyskanie potwierdzenia laboratoryjnego choroby innymi testami. Podstawowym narzędziem diagnostycznym pozostaje nadal ocena kliniczna; pojawianie się nowych testów może znacząco pomóc w podjęciu decyzji terapeutycznej, a także rodzi nadzieję, że w niedługim czasie będzie jednak dostępny nowoczesny test, który z niemal stuprocentową pewnością wskaże osoby z problemami zdrowotnymi, wynikającymi z zakażenia krętkiem *Borrelia burgdorferi*.

Piśmiennictwo

Cisak E., *Problemy w diagnostyce laboratoryjnej boreliozy, Profilaktyka chorób przenoszonych przez kleszcze, ze szczególnym uwzględnieniem boreliozy*, Materiały pokonferencyjne, Lublin 2010, s. 223-254.

Embers E.M., Ramamoorthy R., Philipp M.T., *Survival strategies of Borrelia burgdorferi, the etiologic agent of Lyme disease*, *Microbes and Infection* Vol. 6, 3, 2004, s. 312-318.

Grier T.M., *The Complexities of Lyme Disease*, Lyme Disease Survival Manual 2000, Duluth, MN, USA.

Liang, FT et al. *Sensitive and specific serodiagnosis of Lyme disease by enzyme-linked immunosorbent assay with a peptide based on an immunodominant conserved region of Borrelia burgdorferi VlsE*. *J. Clin. Microbiol.* 1999; 37, 3990-3996.

Łacna K., Schmidt K., Wojciechowski J., *Zastosowanie metody real*

time PCR w diagnostyce zakażeń bakterią Borrelia burgdorferi s.L., *Przegl. Epid.*- 2008, s. 62,184.

Łacna K., *Zastosowanie metody real time PCR w diagnostyce chorób odkleszczowych*, *Akademia Chorób Odkleszczowych*, Cemed, Warszawa 2009, s. 75-82.

Marangoni A., Sparacino M., Cavrini F., Storni E., Mondardini V., Sambri V., Cevenini R., *Comparative evaluation of three different ELISA methods for the diagnosis of early culture-confirmed Lyme disease in Italy*, *J Med Microbiol* 54 (2005), s. 361-367.

Mogiyansky E et al. *Comparison of western immunoblots and the C6 Lyme antibody test for the laboratory detection of Lyme disease*. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2004; 11(5), s. 924-929.

Murgia R, Piazzetta C, Cinco M., *Cystic forms of Borrelia burgdorferi sensu lato: induction, development, and the role of RpoS*, 114(13-14), 574-9 (2002).

Niścigorska J., *Trudności diagnostyczne boreliozy w praktyce lekarskiej*, *Biologia molekularna patogenów przenoszonych przez kleszcze*, Skotarczak B. (red.), PZWL, Warszawa 2006, s. 151-156.

Perron Ch., *The predictive value of clinical and biological markers in the diagnosis of Lyme borreliosis, Introductory course in treating Lyme disease*, ILADS, London 2010, s. 30-37.

Stricker RB, Winger EE, *Decreased CD57 lymphocyte subset in patients with chronic Lyme disease*, *Immunol Lett.* 2001 Feb 1, 76(1), 43-8.

Tylewska-Wierzbanowska St., *Diagnostyka boreliozy*, *Akademia Cho-*

rób Odkleszczowych, Cemed, Warszawa 2009, s. 516-1.

Witecka-Knysz E., Klimczak M., Łacna K., Zajkowska J., Paniewicz S., Kondrusik M., Grzegorzczuk S., Świerżbińska R., Hermanowska-Szapakowicz T., *Borelioza: dlaczego diagnostyka jest tak trudna?*, *Diagnosta Lab.*, 2007, s. 4.

Wodecka B., *Metody diagnostyczne polecane w boreliozy z Lyme*, *Biologia molekularna patogenów przenoszonych przez kleszcze*, Skotarczak B. (red.), PZWL, Warszawa 2006, s. 142-151.

Zajkowska J., Świerżbińska R., Paniewicz S., Kondrusik M., Grygorczuk S., Moniuszko A., *Badanie odpowiedzi immunologicznej wewnątrzoponowej na antygeny Borrelia burgdorferi u chorych z podejrzeniem neuroboreliozy - doniesienie wstępne*, *Przegl. Epid.*, 2008, s. 62,152-157.