

### **Borelioza z Lyme, laboratoryjne metody rozpoznania zakażenia**

Tomasz Chmielewski, Stanisława Tylewska-Wierzbanowska,  
Samodzielna Pracownia Riketsji, Chlamydii i Krętków Odzwierzęcych  
Państwowy Zakład Higieny, Warszawa

Borelioza z Lyme jest najczęściej występującą na świecie chorobą zakaźną, przenoszoną przez kleszcze. Zakażenie to ma charakter wieloukładowy, w którym można wyodrębnić kolejne stadia. W początkowym okresie, we wczesnej fazie (I stadium), po kilku dniach lub tygodniach od chwili zakażenia, pojawia się rumień wędrujący, któremu mogą towarzyszyć objawy grypopodobne.

Następnie dochodzi do zakażenia wielu narządów i układów (II stadium); pojawiają się dolegliwości ze strony ośrodkowego lub obwodowego układu nerwowego, układu kostno-stawowego lub układu krążenia. Późna borelioza z Lyme charakteryzuje się nieodwracalnymi zmianami stawowymi, uszkodzeniem układu nerwowego w postaci encefalopatii lub uszkodzeniem nerwów czaszkowych, obwodowych, a także przewlekłym zanikowym zapaleniem skóry. Wielopostaciowość choroby wymaga diagnostyki różnicowej i często sprawia trudności w prawidłowym rozpoznaniu.

Dla ułatwienia identyfikacji zakażeń jak i dla celów epidemiologicznych wprowadzono definicję przypadku boreliozy z Lyme. Pierwszą definicję sformułowano w 1991 roku w USA. Obejmowała ona chorych z rumieniem wędrującym oraz chorych z co najmniej jednym objawem boreliozy późnej i potwierdzeniem rozpoznania klinicznego badaniem laboratoryjnym [1]. Europejska definicja wprowadzona w 1996 roku jest szersza niż amerykańska ze względu na występowanie w Europie, co najmniej trzech chorobotwórczych dla człowieka genogatunków *B. burgdorferi sensu lato*, tj. *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. garini* oraz *B. afzeli* i związane z tym większe zróżnicowanie objawów choroby [18].

W Europie najczęściej występują *B. garini* i *B. afzeli*, podczas gdy *B. burgdorferi sensu stricto* znacznie rzadziej i zwykle w Europie wschodniej. Zróżnicowanie szczepów wywołujących zakażenia na naszym kontynencie muszą być brane pod uwagę przy opracowywaniu nowych testów diagnostycznych, jak PCR oraz antygenów diagnostycznych do badań serologicznych. Jest to bardzo ważne ponieważ w ostatnim czasie wykryto w Europie kolejne, nowe chorobotwórcze genogatunki, *B. valaisiana* i *B. spielmanii*.

#### **Antygeny *Borrelia burgdorferi sensu lato* w diagnostyce zakażenia**

Swoiste dla *B. burgdorferi* białka, które mogą być wykorzystane jako antygeny diagnostyczne charakteryzują się znaczną heterogennością. Występujące w Europie trzy chorobotwórcze dla człowieka genogatunki i jeden w Ameryce Płn można podzielić na przynajmniej siedem serotypów, biorąc pod uwagę jedynie zróżnicowanie występujących na powierzchni komórki swoistych białek OspA. Odpowiadają one podziałowi na genogatunki: *B. burgdorferi sensu stricto* - serotyp 1, *B. afzeli* - serotyp 2, *B. garini* - serotypy od 3 do 7 [23].

W przypadku białka OspC, na podstawie różnic w sekwencji aminokwasów, wyodrębniono dotychczas 4 serotypy krętków [24]. Jest to białko wysoce immunogenne, odpowiedzialne przede wszystkim za wczesną odpowiedź humoralną.

Jednym z najbardziej immunogennych białek w komórce *B. burgdorferi* jest flagelina, białko wchodzące w skład wici. Wywołuje ono silną i wczesną odpowiedź humoralną. Białko to w początkowym i końcowym odcinku łańcucha, wykazuje wysoki stopień homologii z sekwencją aminokwasów flageliny *Bacillus subtilis* (65%) i *Salmonella Typhimurium* (56%) [20]. Epitopy charakterystyczne dla gatunku *B. burgdorferi* zlokalizowane są tylko między 129 a 251 aminokwasem. Końcowa sekwencja tego polipeptydu wykazuje aż 80% homologii z białkiem flageliny *T. pallidum* [5].

Obecnie w diagnostyce wykorzystywane są także wysoce konserwatywne, a jednocześnie immunogenne epitopy w heterogennych białkach wytwarzanych *in vivo*, jak np. peptyd C6 w białku VlsE czy analog białka DbpA (p17).

Podstawą rozpoznania boreliozy z Lyme jest obecność określonych objawów klinicznych, potwierdzonych badaniem laboratoryjnym, wykrywającym swoiste przeciwciała klasy IgM i/lub IgG dla antygenów *B. burgdorferi*.

#### **Metody diagnostyczne**

Prawidłowe rozpoznanie boreliozy z Lyme zależy od odpowiednio dobranych metod i antygenów diagnostycznych, następnie od prawidłowej interpretacji wyników.

Powszechnie stosowane testy ELISA są czułe, proste w wykonaniu, gwarantują szybkie uzyskanie wyniku nie podlegającego subiektywnym ocenom badacza. Niestety ich niska swoistość, wynosząca 29-71% w zależności od zastosowanego antygeny [11], może prowadzić do błędnych rozpoznań.

Stosowane testy diagnostyczne do wykrywania boreliozy z Lyme różnią się między sobą antygenem diagnostycznym. W testach pierwszej generacji była to cała komórka bakteryjna, stosowana w metodach immunoenzymatycznych w formie sonikatu lub cała, nienaruszona komórka w odczynie immunofluorescencji. Ze względu na bardzo małą swoistość, praktycznie testy tej grupy nie są już stosowane.

Zestawy diagnostyczne ELISA stosowane w badaniach przesiewowych powinny należeć przynajmniej do drugiej generacji, ponieważ w grupie tej została udoskonalona swoistość i w dużym stopniu zostały ograniczone krzyżowe reakcje. Do tej grupy należą testy, w których albo antygenem diagnostycznym są izolowane frakcje białek albo stosowana jest wstępna absorbcja krętkami Reitera. Szczepy używane do produkcji antygeny muszą wytwarzać białko OspC umożliwiające wykrycie swoistej odpowiedzi w klasie IgM oraz DbpA (decorin binding protein A, dawniej p17), będące dominującym antygenem w odpowiedzi IgG.

W najnowszej, trzeciej generacji testów, jako antygeny diagnostyczne stosowane są rekombinowane białka. Dotychczas otrzymano i sprawdzono pod względem przydatności w diagnostyce boreliozy z Lyme, białka p83/100 (wskaźnik późnej fazy choroby), p41 (flagelina, p41int (wewnętrzna część cząsteczki flageliny o masie 14 000, nie reagująca krzyżowo z flageliną innych gatunków bakteryjnych), białka błony zewnętrznej OspA i OspC i p39. Ostatnie badania wskazują, że dzięki uzupełnieniu antygeny diagnostycznego o rekombinowane białka DbpA (p17) i p58, a także p14, p30, p43 można uzyskać większą czułość testu. Ostatnio z powodzeniem w Stanach Zjednoczonych wprowadzono rekombinowany swoisty antygen VlsE i pochodzący z niego syntetyczny peptyd C6. Przydatność tych antygenów zdają się potwierdzać badania surowic pochodzących od europejskich chorych z rumieniem wędrującym, ACA i zapaleniem stawów. Jednocześnie jednak zwraca się uwagę na konieczność ostrożnego przenoszenia wyników badań z USA do Europy ze względu na występujące tu zróżnicowanie genogatunków i heterogenność immunodominujących epitopów antygeny VlsE [6].

**W każdym przypadku, powinny być oznaczone przeciwciała obu klas.** Uzyskanie ujemnego wyniku badania serologicznego we wczesnej fazie zakażenia nie przesądza o rozpoznaniu. Zalecane jest powtórzenie badania z nową próbką surowicy po upływie 4 tygodni od wystąpienia pierwszych objawów choroby.

Należy także pamiętać, że swoiste przeciwciała wykrywane są także u osób zdrowych, co może świadczyć o bezobjawowym przebiegu choroby. W zależności od stopnia narażenia na kontakt z kleszczami odsetek osób z przeciwciałami wynosi od 12% w normalnej populacji (krwiodawcy) do około 40% w grupach ryzyka np. wśród leśników [3,4]. Obecność samych przeciwciał, bez objawów zakażenia, nie może być wskazaniem do leczenia.

W 2000 roku opublikowano, opracowane przez międzynarodową grupę ekspertów, zalecenia dotyczące prawidłowej diagnostyki laboratoryjnej boreliozy z Lyme (angielska wersja „MiQ 12 Lyme Borreliose” dostępna w internecie na stronie: <http://www.dghm.org/red/index>).

Ze względu na liczne nieswoiste reakcje krzyżowe i fałszywie dodatnie wyniki, których nie można było wyeliminować w powszechnie stosowanych testach ELISA, mimo wprowadzania różnych antygenów diagnostycznych (sonikat całej komórki, izolowane białka, antygeny rekombinowane), zalecana jest obecnie dwustopniowa diagnostyka serologiczna.

. Polega ona na oznaczeniu w pierwszym etapie poziomu przeciwciał pólilościowymi testami ELISA o wysokiej czułości. Następnie, próbki surowic, z którymi uzyskano wynik dodatni lub wątpliwie dodatni są badane jakościową metodą Western-blot o wysokiej swoistości, w celu weryfikacji wcześniejszych rezultatów. Interpretacja wyników badań ELISA i Western-blot odbywa się według ściśle ustalonych kryteriów.

#### Western-blot

Jako test potwierdzający Western blot powinien charakteryzować się wysoką, nie mniejszą niż 95% swoistością.

Pierwsze kryteria oceny wyniku badania metodą Western-blot ustalone zostały przez Center for Disease Control and Prevention (CDC) w Atlancie, USA. Interpretacja uzyskanych wyników zgodnie z tymi kryteriami jest często zalecana przez producentów testów i nie rzadko automatycznie stosowana na kontynencie europejskim. Może to prowadzić do błędów w rozpoznaniu.

Opracowanie kryteriów oceny wyników badań metodą Western-blot przeprowadzonych u chorych z terenu Europy jest bardziej złożone ze względu na występowanie kilku genogatunków chorobotwórczych na obszarze tego kontynentu.

Analiza występowania przeciwciał przeprowadzona w ramach programu EUCALB, wykazała przydatność następujących 8 antygenów w diagnostyce zakażeń *B. burgdorferi* sensu lato: OspC i p41 dla IgM oraz p83/100, p58, p41, p39, OspC, DbpA (p17) dla IgG, jakkolwiek wykazano zróżnicowane ich znaczenie. Stwierdzono, bowiem że czułość i swoistość metody zależna jest od genogatunku szczepu użytego jako antygen diagnostyczny. Ważnym elementem jest zastosowanie kryteriów uwzględniających odpowiedź immunologiczną na antygeny szczepów najczęściej występujących na danym terenie. Ponadto, przyjęta interpretacja wyników powinna być również powiązana z charakterystyką objawów klinicznych stwierdzanych na danym terenie [13].

Aby poprawnie zinterpretować wynik badania, potrzebna jest informacja na temat czasu trwania choroby, z którym ściśle związane jest pojawienie się przeciwciał dla określonych antygenów. We wcześniejszej boreliozie znaczenie ma intensywność przynajmniej dwóch frakcji białkowych (p41 i OspC) i w związku z tym konieczne jest stosowanie odpowiednich kontroli wewnętrznych, aby ocenić badanie pólilościowo.

Dostępne są testy, w których rozdziałowi poddano albo lizat całej komórki albo wyselekcjonowane białka *B. burgdorferi* produkowane przez komórki *E. coli* w wyniku manipulacji genetycznych.

Zaletą lizatu całej komórki jest możliwość wykrycia większej liczby immunogennych frakcji. Wadą natomiast to, że w niektórych przypadkach trudno jest rozróżnić frakcje swoiste od krzyżowo reagujących. Zastosowanie jako antygen diagnostyczny w metodzie immunoblot, szczepu, który wytwarza swoiste, immunogenne białka wymaga dokładnej standaryzacji i bardzo precyzyjnej identyfikacji frakcji białkowych przy pomocy przeciwciał monoklonalnych.

Na terenie Europy zalecany jest w diagnostyce Western-blot z antygenami *B. afzelii* (szczep PKo) ponieważ charakteryzuje się największą czułością.

Przyjmuje się, że jeżeli antygenem jest szczep *B. afzelii* to wynik immunoblot jest dodatni jeżeli przeciwciała IgM reagują przynajmniej z jedną frakcją z osród: p41 (silna reakcja), p39, OspC, DbpA (Osp17). Wraz ze zmianą antygeny diagnostycznego zmieniają się również kryteria interpretacji (patrz Tabela I).

Zastosowanie antygenów rekombinowanych ma wiele zalet. Użycie ich daje pewność, że uzyskane reakcje dotyczą wyłącznie swoistych białek. Ponadto, możliwe jest zastosowanie w jednym teście swoistych białek pochodzących z różnych genogatunków, np. DbpA OspC i BmpA, a także swoistych peptydów będących fragmentami białek, które w całości wywołują reakcje krzyżowe, jak np. białko p41 i peptyd p41 int., a także antygenów wytwarzanych przez bakterie tylko w warunkach in vivo, jak DbpA i VlsE. Ponadto, testy z antygenami rekombinowanymi są obecnie lepiej wystandaryzowane niż z lizatem komórkowym [15].

*Dodanie do zestawu antygenów białek DbpA i VlsE znacznie zwiększa czułość testu. We wcześniejszym stadium choroby, często przeciwciała IgG dla VlsE pojawiają się przed przeciwciałami IgM dla innych antygenów[21,22].*

#### Inne badania

Podstawą rozpoznania laboratoryjnego boreliozy z Lyme są badania serologiczne. Opisywane są jednak serologicznie ujemne przypadki choroby. Przyczyna tego zjawiska nie jest wyjaśniona, między innymi tłumaczy się to możliwością powstawania kompleksów immunologicznych [16]. W związku z tym, jeżeli mimo ujemnego wyniku nadal klinicznie podejrzewane jest zaawansowane stadium boreliozy, można zastosować inne dodatkowe metody diagnostyczne, jak np. PCR lub hodowlę itp. Mają one także zastosowanie u chorych z nietypowym rumieniem wędrującym, przy podejrzeniu wczesnej neuroboreliozy, w której nie zostały jeszcze wytworzone przeciwciała oraz u chorych z obniżoną odpornością.

#### PCR

Łańcuchowa reakcja polimerazy umożliwia wielokrotne powielanie określonych, charakterystycznych dla danego drobnoustroju fragmentów genomu. W przypadku *B. burgdorferi* sensu lato, najczęściej wykrywane są sekwencje genów kodujących flagelinę, białka błony zewnętrznej (Osp), 16S-RNA i 5S-23S-RNA [14]. PCR jest metodą bardzo czułą, a dolna granica wykrywalności wynosi około 10-1000 komórek w badanej próbce. Pomimo swych niewątpliwych zalet posiada jednak szereg ograniczeń. Do najważniejszych należy rodzaj materiału do badania i stadium choroby, w którym został pobrany. Materiał genetyczny krętków częściej można wykryć w ostrej fazie choroby niż w jej okresie przewlekłym. DNA krętków wykrywa się w około 60-70% wycinków skóry pobranych z rumienia wędrującego i w około 60% wycinków ze zmian typu ACA [14,17,19]. U chorych z rumieniem wędrującym DNA *B. burgdorferi* we krwi stwierdza się nie częściej niż u około 18% chorych, w płynie mózgowo-rdzeniowym DNA wykrywa się w 38% przypadków w neuroboreliozie wczesnej i w 25% w neuroboreliozie późnej [8,9]. W zależności od stosowanych starterów czułość metody PCR w płynie stawowym wynosi od 48% dla starterów komplementarnych do sekwencji genu 16S rRNA do 96% dla starterów dla OspA [10]. Na wynik badania może mieć wpływ obecność w badanym materiale DNA pochodzącego z komórek gospodarza, jak i hamujący wpływ innych składników tkankowych takich jak hemoglobina, heparyna, porfiryny. Ograniczenia te mogą prowadzić do uzyskiwania wyników fałszywie dodatnich jak i fałszywie ujemnych. Poważny wpływ na otrzymany wynik mają też metody ekstrakcji DNA, gdyż ze względu na niewielką liczbę bakterii w badanym materiale może dochodzić do strat prowadzących do fałszywie ujemnego wyniku [14]. Ponadto startery zastosowane do reakcji muszą umożliwiać amplifikację fragmentów DNA charakterystycznych dla wszystkich chorobotwórczych i potencjalnie chorobotwórczych genogatunków *B. burgdorferi* sensu lato z tą samą czułością.

#### Hodowla

Klasyczne postępowanie w diagnostyce mikrobiologicznej, hodowla i izolacja czynnika etiologicznego nie spełnia warunków wymaganych w rutynowej diagnostyce. Aby wydać wynik hodowlę krętków prowadzi się do 3 miesięcy. Uzyskany po tym czasie ujemny wynik nie wyklucza zakażenia. Krętki *B. burgdorferii* można izolować ze zmian skórnych (bioptaty), płynu mózgowo-rdzeniowego, płynu stawowego i krwi. Czułość tej metody w II stadium choroby waha się od około 10 do 30%. Najczęściej dodatnie posiewy uzyskuje się z bioptatów skóry pobranych z rumienia (ok. 50-85%), rzadziej z płynu mózgowo-rdzeniowego (ok. 10%), z chrząstki stawowej; najmniej izolacji uzyskuje się z płynu stawowego i krwi.

Do hodowli krętków *B. burgdorferii* stosowane jest bardzo bogate podłoże BSK (Barbour'a, Stoenner'a, Kelly'ego) i jego różne modyfikacje, najczęściej podłoże BSK w skład którego wchodzi ponad 60 składników, takich jak aminokwasy, witaminy, elektrolity; dodatkowo jest wzbogacane surowicą króliczą (6%) [12]. Inokulum nie może być mniejsze niż 10 komórek bakteryjnych. Gęstość zawiesiny bakteryjnej w podłożu BSK-H po inkubacji 14 dni nie przekracza 1010 komórek w 1 ml, a czas między podziałami komórkowymi wynosi około 12 godzin. Na podłożach stałych bakterie te rosną jeszcze wolniej [7].

*B. burgdorferi* są bakteriami powoli rosnącymi na dostępnych obecnie sztucznych podłożach bakteriologicznych. Optymalna temperatura wzrostu krętków przy obniżonym poziomie tlenu wynosi 32-37°C.

### Hodowla i PCR

W porównaniu z zakażeniami innymi drobnoustrojami, liczba krętków w dostępnych do badania próbkach materiału klinicznego jest bardzo mała, na granicy wykrywalności metodą PCR. Ocenia się, że w płynie mózgowo-rdzeniowym liczba tych drobnoustrojów nie przekracza 50 komórek w 1 mL [8], i uzyskanie wystarczającej ilości DNA krętków do amplifikacji metodą PCR jest często niemożliwe. Można najpierw wykonać posiew, a następnie po hodowli przez 1-2 tygodnie, poszukiwać DNA *B. burgdorferi* sensu lato metodą PCR. Ma to szczególnie znaczenie w przypadkach klinicznego rozpoznania neuroboreliozy przy słabej odpowiedzi immunologicznej lub jej braku. Taki sposób postępowania z materiałem klinicznym, podnosi znacznie czułość badania diagnostycznego w kierunku boreliozy [2].

Tabela. Interpretacja wyniku badania metodą Western-blot z antygenami występujących w Europie genogatunków

Genogatunek*	Fracje antygenowe wykrywane przez przeciwciała klasy:	
	IgM	IgG
<i>B. afzelii</i>	Co najmniej jedna frakcja z: p39, OspC, p17 lub silna reakcja z antygenem p41	Co najmniej dwie frakcje z: p83/100, p58, p43, p39, p30, OspC, p21, DbpA (p17), p14
<i>B. garini</i>	Co najmniej jedna frakcja z: p39, OspC lub silna reakcja z antygenem p41	Co najmniej jedna frakcja z: p83/100, p39, p30, OspC, p21, DbpA (p17)
<i>B. burgdorferi</i> sensu stricto	Co najmniej jedna frakcja z: p39, OspC, p17 lub silna reakcja z antygenem p41	Co najmniej jedna frakcja z: p83/100, p58, p56, OspC, p21, DbpA (p17)
Antygeny rekombinowane	Co najmniej dwie frakcje z: p39, OspC, p41 int., p17 lub silna reakcja z antygenem OspC	Co najmniej dwie frakcje z: p83/100, p58, p39, OspC, p41 int., DbpA (p17)

\* genogatunek, z którego przygotowano antygen diagnostyczny

### Piśmiennictwo

- Centers for Disease Control and Prevention. Case definitions for public health surveillance. *Morbid. Mortal. Weekly Rep.* **39** (RR-13):19-21 (1990)
- Chmielewski T., Fiett J., Gniadkowski M., Tylewska-Wierzbnowska S. Improvement to laboratory recognition of Lyme borreliosis with the combination of culture and PCR methods. *Mol. Diagn.* **7** (3/4):155-162 (2003)
- Chmielewski T., Tylewska-Wierzbnowska S. Występowanie przeciwciał swoistych dla *Borrelia burgdorferi* u ludzi zdrowych na terenie Polski. *Przeg. Epidemiol.* **56**, 33-38 (2002)
- Chmielewski T., Tylewska-Wierzbnowska S. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* and HGE antibodies in forest workers in Poland. IX International Conference on Lyme Borreliosis and other tick-borne diseases. 18-22.08.2002. New York, USA.
- Coleman J.L., Benach J.L. Identification and characterization of an endoflagellar antigen of *Borrelia burgdorferi*. *J. Clin. Invest.* **84**, 322-330 (1989)
- Goetner G., Schulte-Spechtel U., Hillermann R., Liegl G., Wilske B., Fingerle V. Improvement of Lyme borreliosis serodiagnosis by a newly developed recombinant immunoglobulin G (IgG) and IgM line immunoblot assay and addition of VlsE and DbpA homologues. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 3602-3609.
- Kurti T.J., Munderloch U.G., Johnson R.C., Ahlstrand G.G. Colony formation and morphology in *Borrelia burgdorferi*. *J. Clin. Microbiol.* **25**, 2054-2058 (1987)
- 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.* **30**, 1646-1653 (1992)
- Nocton J.J., Bloom B.J., Rutledge B.J., Persing D.H., Logigian E.L., Schmid C.H., Steere A.C. Detection of *Borrelia burgdorferi* DNA by polymerase chain reaction in cerebrospinal fluid in Lyme neuroborreliosis. *J. Infect. Dis.* **174**, 623-627 (1996)
- Nocton J.J., Dressler F., Rutledge B.J., Rys P.N., Persing D.H., Steere A.C. Detection of *Borrelia burgdorferi* DNA by polymerase chain reaction in synovial fluid from patients with Lyme arthritis. *N. Engl. J. Med.* **330**, 229-234 (1994)

- Nohlmans M.K.E., Blaauw A.A.M., van den Bogaard A.E.J., van Boven C.P.A. Evaluation of nine serological tests for diagnosis of Lyme borreliosis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **13**, 394-400 (1994)
- Pollack R.J., Teleford III S.R., Spielman A. Standardization of medium for culturing Lyme disease spirochetes. *J. Clin. Microbiol.* **31**, 1251-1255 (1993)
- Robertson J., Guy E., Andrews N., Wilske B., Anda P., Grandstrom M., Hauser U., Moosmann Y., Sambri V., Schellekens J., Stanek G., Gray J. A European multicenter study of immunoblotting in serodiagnosis of Lyme borreliosis. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 2097-2102 (2000)
- Schmidt B.L. PCR in laboratory diagnosis of human *Borrelia burgdorferi* infections. *Clin. Microbiol. Rev.* **10**, 185-201 (1997)
- Schulte-Spechtel U., Lehnert G., Liegl G., Fingerle V., Heimerl C., Johnson B.J.B., Wilske B. Significant improvement of the recombinant Borrelia-specific immunoglobulin G immunoblot test by addition of VlsE and a DbpA homologue derived from *Borrelia garini* for diagnosis of early neuroborreliosis. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 1299-1303 (2003).
- Schutzer S.E., Coyle P.K., Belman A.L., Golightly M.G., Drulle J. Sequestration of antibody to *Borrelia burgdorferi* in immune complexes in seronegative Lyme disease. *Lancet* **335**:312-315 (1990)
- Schwartz I., Wormser G.P., Schwartz J.J., Cooper D., Weissensee P., Gazumyan A., Zimmermann E., Goldberg N.S., Bittker S., Campbell G.L., Pavia C.S. Diagnosis of early Lyme disease by polymerase chain reaction amplification and culture of skin biopses from erythema migrans lesions. *J. Clin. Microbiol.* **30**, 3082-3088 (1992)
- Stanek G., O'Connell S., Cimmino M., Aberer E., Kristofertsch W., Grandstrom M., Guy E., Gray J. European Union concerted action on risk assesment in Lyme borreliosis: clinical case definitions for Lyme borreliosis. *Wien. Klin. Wochenschr.* **108**, 741-747 (1996)
- von Stedingk L.V., Olsson I., Hanson H.S., Asbrink E., Hovmark A. Polymerase chain reaction for detection of *Borrelia burgdorferi* DNA in skin lesions of early and late Lyme borreliosis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **14**, 1-5 (1995)
- Wallich R., Moter S.E., Simon M.M., Ebnet K., Heiberger A., Kramer M.D. The *Borrelia burgdorferi* flagellum-associated 41-kilodalton antigen (flagellin): molecular cloning, expression, and amplification of the gene. *Infect. Immun.* **58**, 1711-1719 (1990).
- Wilske B. Diagnosis of Lyme borreliosis in Europe. *Vector-Borne Zoon. Dis.* **3**(4), 215-227 (2003)
- Wilske B., Fingerle V., Sculte-Spechtel U. Microbiological and serological diagnosis of Lyme borreliosis. *FEMS Immunol Med. Microbiol.* **49**, 13-21 (2007).
- 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.* **31**, 340-350 (1993)
- Wilske B., Preac-Mursic V., Jauris S., Hofmann A., Pradel I., Soutschek E., Schwab E., Will G., Wanner G. Immunological and molecular polymorphisms of OspC, an immunodominant major outer surface protein of *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Immun.* **61**, 2182-2191 (1993)

### Adres autorów

Państwowy Zakład Higieny  
Samodzielna Pracownia Riketsji, Chlamydii i Krętków  
Odwierających  
ul. Chocimska 24, 00-791 Warszawa  
tel. 022-5421261, e-mail: tchmielewski@pzh.gov.pl

**KOMUNIKAT RZECZNIKA DYSCYPLINARNEGO KIDL**  
Rzecznik Dyscyplinarny KIDL nie odpowiada na telefony  
i anonimowe pisma .

Uprzejmie informuję, że zainteresowane osoby i strony kierujące do Rzecznika Dyscyplinarnego KIDL (ul. Konopacka 4, 03-428 W-wa) skargi i pisma powinny przysyłać je pisemnie (!!!) z podaniem adresu do korespondencji, zaś w przypadku PT Diagnostów Laboratoryjnych, oprócz adresu, należy podać numer wpisu na listę diagnostów lab. DANE TE POZOSTAJĄ WYŁĄCZNIE W DYSPOZYCJI  
I DO INFORMACJI RZECZNIKA DYSCYPLINARNEGO KIDL  
Rzecznik Dyscyplinarny KIDL  
Ewa Tuszevska