

Justyna Dunaj*, Anna Moniuszko, Joanna Zajkowska, Sławomir Pancewicz

ZNACZENIE METODY PCR W DIAGNOSTYCE BORELIOZY Z LYME

Klinika Chorób Zakaźnych i Neuroinfekcji Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

STRESZCZENIE

Techniki biologii molekularnej odgrywają znaczącą rolę w diagnostyce wielu chorób zakaźnych. Metoda polimerazowej reakcji łańcuchowej (PCR) znalazła zastosowanie również w oznaczaniu zakażeń patogenami odkleszczowymi, w tym krętkami *Borrelia burgdorferi*. Poszerzenie diagnostyki boreliozy o metodę PCR, pozwala na potwierdzenie zakażenia krętkami już w pierwszych tygodniach infekcji, zanim organizm chorego zdąży wytworzyć wykrywalną ilość przeciwciał. Różnorodność materiału, który może zostać poddany badaniu (krew, płyn mózgowo-rdzeniowy, bioptaty skórne, płyn stawowy) oraz możliwość użycia kilku genów konserwatywnych dla genogatunków krętków *Borrelia* dodatkowo poszerzają możliwości wykorzystania testów PCR. Problemem jednak pozostaje rozbieżność wyników otrzymywanych w różnych ośrodkach naukowych i diagnostycznych. Dlatego istotne jest dążenie do standaryzacji molekularnej diagnostyki boreliozy z Lyme.

Słowa kluczowe: PCR, *Borrelia burgdorferi sensu lato*, borelioza z Lyme

WSTĘP

Borelioza z Lyme jest bakteryjną chorobą zakaźną przenoszoną na człowieka w wyniku pokłucia przez kleszcza z rodzaju *Ixodes*. Spośród bakterii kompleksu *Borrelia burgdorferi sensu lato* (*B. burgdorferi sl*), krętki wywołujące boreliozę z Lyme to przede wszystkim *Borrelia burgdorferi sensu stricto* (*B. burgdorferi ss*), *Borrelia afzelii* oraz *Borrelia garinii*, a także według niektórych doniesień *Borrelia valaisiana*, *Borrelia lusitanae*, *Borrelia spielmanii* oraz *Borrelia bissetti* (1-4).

Choroba z Lyme jest infekcją wielonarządową, w której objawy dotyczą najczęściej skóry (*Erythema migrans* - EM), *Acroderamatitis Chronica Atrophicans* - ACA), stawów (*Lyme arthritis* - LA), systemu nerwowego (neuroborelioza - NB), ale także serca (*Lyme carditis*), a nawet oczu (1, 3-6).

Zachorowalność na boreliozę w Polsce systematycznie i nieustannie wzrastała do 2009 roku, kiedy to osiągnęła poziom 10 313 przypadków, a w 2011 roku odnotowano 9 159 nowych zachorowań (www.pzh.gov.pl). Wskazuje to na stałe oraz nadal wysokie zagrożenie zakażeniem krętkami *B. burgdorferi* na terenie całego kraju.

W rozpoznaniu boreliozy odgrywają znaczącą rolę: wywiad epidemiologiczny, endemiczny rejon, w którym

doszło do ukąszenia przez kleszcza, sam fakt pokłucia oraz objawy kliniczne występujące u chorego, a także potwierdzenie laboratoryjne. Diagnostyka laboratoryjna choroby z Lyme opiera się na 2-stopniowym schemacie badań immunoserologicznych (1, 3, 7-10). Pierwszym etapem jest określenie miana swoistych przeciwciał metodą ELISA, a drugim testy potwierdzające Western blot lub Immunoblot. Badania immunoserologiczne należy wykonać, nie wcześniej niż po 4-6 tygodniach (7, 10) (produkcja przeciwciał IgM: 3-4 tydzień, szczyt po 6-8 tygodniach; produkcja przeciwciał IgG: 4-6 tydzień, najwyższe wartości po 4-6 miesiącach) zakażenia. Dlatego poszukiwane są metody diagnostyczne, które umożliwiłyby wcześniejsze potwierdzenie zakażenia.

METODA PCR W DIAGNOSTYCE BORELIOZY Z LYME

Zastosowanie metody PCR jest najbardziej zasadne we wczesnym etapie zakażenia krętkami *Borrelia burgdorferi*, kiedy to bakterie zostaną wprowadzone do organizmu po pokłuciu przez kleszcza (*B. garinii* wnika do organizmu człowieka w przeciągu 24h kontaktu z wektorem, podczas gdy *B. burgdorferi ss* po upływie 48h) (5), aż do czasu, gdy powstaną swoiste przeciwcia-

* Justyna Dunaj jest stypendystą w ramach projektu: „Studiuje, badam, komercjalizuję – program wsparcia doktorantów UMB”, poddziałanie 8.2.1 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki, współfinansowanego przez Unię Europejską w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego.

ła przeciwko antygenom bakterii (do 4-8 tygodni) (10-14). W boreliozie wczesnej (zlokalizowana i rozsiana) metoda PCR może służyć potwierdzeniu rozpoznania choroby oraz wykryciu koinfekcji innymi patogenami przenoszonymi przez kleszcze (3, 11). W późniejszym etapie może wspomagać diagnostykę laboratoryjną, szczególnie gdy metody immunoserologiczne zawodzą (defekty immunologiczne, choroby towarzyszące, wewnątrzkomórkowe bytowanie bakterii, obecność kompleksów immunologicznych we krwi krążącej) (8). *Ivacic* rozważa również możliwość stosowania metody PCR u pacjentów z reinfekcją *B. burgdorferi sl*, u których tradycyjna diagnostyka immunoserologiczna jest utrudniona ze względu na już obecne przeciwciała (13). Istotne dla badania PCR są wybór: materiału do badania, sposobu pobrania próby, metody izolacji DNA, sekwencji powielanej, sekwencji starterowych, rodzaju reakcji PCR, sposobu detekcji, rodzaju aparatury, w szczególności termocyklera (3, 13, 14).

MATERIAŁ DO BADANIA PCR

Należy zwrócić szczególną uwagę na sposób pobrania najbardziej reprezentatywnej próby do badania metodą PCR. Istotny jest jak najkrótszy czas przechowywania materiału, optymalnie w temperaturze +4°C (3). Należy unikać stosowania środków utrwalających, takich jak: etanol, parafina, formalina (3, 8), wielokrotnego zamrażania i odmrażania materiału lub otrzymanego izolatu DNA, co może doprowadzić do fragmentacji, a nawet całkowitej degradacji DNA (15).

Bioptaty skórne. Wycinek skórny (3, 15) można pobrać od pacjentów z granicy EM (zmiany wczesne ograniczone i rozsiane) już po 3 dniach od pokłucia przez kleszcza, a także od osób z ACA (16) (zmiany późne, przewlekłe) w celu potwierdzenia zakażenia krętkiem *Borrelia*. *Weber* i wsp. zwracają uwagę na pacjentów z tzw. mini EM, o średnicy w przedziale od 2 cm do 5 cm, które są objawami wczesnej boreliozy i mogą nie ulegać dalszemu powiększeniu (17). Natomiast *Brettschneider* i wsp. jako pierwsi wykazali iż wykrywalność DNA krętków *B. burgdorferi sl* jest wyższa w wycinkach skórnych z EM świeżo pobranych lub zamrożonych (79%) w porównaniu do utrwalonych w parafinie czy formalinie (44%) (3). Amplifikacja charakteryzuje się wysoką specyficznością (ok. 100%), a czułość w EM od 36 do 88% -średnio 69%, w ACA od 54 do 100% - średnio 76% (3).

Płyn stawowy. Dodatni wynik PCR w płynie stawowym u chorych z LA może potwierdzić rozpoznanie, świadczyć o przedłużającym się zakażeniu, a u chorych nieskutecznie leczonych antybiotykami potwierdzać ewntualnie tzw. odporne na leczenie LA (3, 9, 11). Specyficzność testu wynosi ok. 100%, przy czułości 42-100% (średnio 78%) (3).

Płyn mózgowo-rdzeniowy (pmr). Punkcja lędźwiowa należy do badań inwazyjnych, jednak przy podejrzeniu neuroboreliozy jest niezbędna. Pobrany, jałowy pmr musi zostać zbadany w kierunku wewnątrzoponowej syntezy przeciwciał. Może być również poddany testowi PCR, w kierunku wykrywania DNA *B. burgdorferi sl*. Ze względu na niewielką ilość krętków w pmr (8, 18), powinowactwo bakterii do struktur mielinowych (8), a także możliwość degradacji materiału genetycznego, ujemny wynik nie wyklucza zakażenia (4, 6, 10, 13). Prawdopodobieństwo wykrycia DNA krętków w pmr jest najwyższe we wczesnej neuroboreliozie (3, 4) i znacznie wzrasta w odwirowanym materiale (4, 12). *Lebech* i wsp. stwierdzili obecność DNA *B. burgdorferi sl* u 50% (7/14) pacjentów z wczesną neuroboreliozą, a u 13% (2/16) pacjentów po 2 tygodniach trwania choroby (15). Według przedstawionych przez *Mygland* i wsp. (19) wytycznych EFNS (European Federation of Neurological Societies), wykrywanie DNA krętków *Borrelia* w pmr ma znaczenie jedynie w diagnostyce bardzo wczesnej neuroboreliozy, w okresie do 6 tygodni, wtedy gdy brak w surowicy swoistych przeciwciał lub u pacjentów z niedoborami immunologicznymi. Natomiast ze względu na niską czułość i specyficzność metoda PCR nie jest rekomendowana do diagnostyki późnej neuroboreliozy oraz kontroli skuteczności leczenia (19). *Ornstein* i wsp. (20) zwrócili uwagę na znaczący wpływ pleocytozy pmr na wynik w badaniach PCR. Autorzy wykazali obecność DNA krętków *B. burgdorferi sl* w 7 z 36 (19,4%) pmr o wysokiej cytozie, natomiast we wszystkich 29 pmr o niskiej cytozie uzyskali wynik ujemny. (20). *Cerar* i wsp. (18) wykryli DNA *B. burgdorferi sl* przy użyciu primerów specyficznych dla genu *OspA* oraz przestrzeni międzygenowej *rrf-rrl* we krwi 16/135 (11,9%) chorych oraz w pmr 24/156 (15,4%) pacjentów. Jednocześnie obecność DNA krętków we krwi i pmr stwierdzili jedynie w 3 przypadkach. *Gooskens* i wsp. określili czułość metody PCR w diagnostyce neuroboreliozy na 50% i uznali ją za metodę potwierdzającą (4). Specyficzność PCR w badaniach pmr jest wysoka (ok. 100%), przy bardzo rozbieżnej w różnych ośrodkach czułości (12-100%, średnio 38%) (3).

Krew. Możliwość pobrania od każdego pacjenta po pokłuciu przez kleszcza, niezależnie od prezentowanych objawów sprawiają, że krew wydaje się najlepszym materiałem, w którym można oznaczać DNA *B. burgdorferi sl*. Jednak przejściowa i niska spirochetemia oraz wysoki tropizm tkankowy krętków (stawy, serce, opony mózgowo) mogą powodować uzyskiwanie negatywnych wyników (1, 3, 6, 10, 12, 18). Na wynik PCR mają także wpływ potencjalne inhibitory (heparyna, hemoglobina, etanol, DNA gospodarza) (18) oraz sposób pobrania krwi. Badanie krwi metodą PCR jest uzasadnione w okresie boreliozy wczesnej rozsianej,

gdy obecne są we krwi krętki rozprzestrzeniając się z miejsca wniknięcia (skóra) do różnych narządów i tkanek (2, 3). Jak podkreśla *Maraspin* i wsp. (13) spirochetemia częściej występuje po pokłuciu przez kleszcze, niż w późniejszym okresie choroby. *Dolan* i wsp. (2004) w badaniach przeprowadzonych na myszach zakażonych krętkami *B. burgdorferi sl*, potwierdzili, iż wykrywalność krętków we krwi jest największa we wczesnym etapie zakażenia (13). W okresie boreliozy późnej wykrywanie DNA krętków we krwi ma ograniczone zastosowanie i zawsze musi być interpretowane w korelacji z obecnością przeciwciał przeciw *B. burgdorferi sl* w surowicy krwi. Dodatkowo wyniki badania PCR u osób nieposiadających przeciwciał, najczęściej to wyniki fałszywie dodatnie (3). *Chmielewska-Badora* i wsp. w grupie 180 pacjentów ze zdiagnozowaną boreliozą z Lyme potwierdzili zakażenie metodą PCR u 20 osób (11,1%) i wykazali brak korelacji z obecnością przeciwciał w klasie IgM, przy znaczącej korelacji dodatniego wyniku PCR z obecnością antygenu VlsE w klasie IgG (21). *Cerar* i wsp. w grupie 48 pacjentów z potwierdzoną neuroboreliozą wykazali we krwi obecność DNA krętków *Borrelia* (gen *OspA*) u 10 (20,8%) osób, a genu *rrf-rrl* w 5 (10,4%) przypadkach. W 45-osobowej grupie osób z podejrzeniem neuroboreliozy obecność genu *OspA* potwierdzono u 5 (11,1%), a genu *rrf-rrl* u 7 (15,6%) osób (18). Według różnych ośrodków specyficzność PCR wynosi 100%, a czułość 0-100% (średnio 14%) (3).

Mocz. Mocz jest materiałem najlepiej dostępnym, ale badania wskazują na niską przydatność tego materiału do diagnostyki boreliozy z Lyme. Obecność licznych inhibitorów PCR oraz wątpliwa korelacja z objawami choroby, obniża czułość metody (3, 9, 14, 15). Opisano liczne przykłady amplifikacji niespecyficznych produktów PCR (15). *Lebech* i wsp. (15) w badaniach moczu w grupie pacjentów z EM określili czułość metody PCR na 13%, a u chorych z neuroboreliozą na zaledwie 7%. *Kondrusik* i wsp. wykazali brak DNA krętków *B. burgdorferi sl* w moczu wszystkich 86 pacjentów z EM (14). W chwili obecnej opublikowane standardy wykluczają wykorzystanie moczu do badań PCR z powodu niskiej specyficzności (1, 3, 6, 9, 14).

POLIMERAZOWA REAKCJA ŁAŃCUCHOWA

W wykrywaniu krętków *B. burgdorferi sl* przy pomocy metody PCR, proces izolacji DNA, dobór sekwencji starterowych oraz warunków reakcji nie odbiegają od powszechnie obowiązujących standardów, ale wybór sekwencji powielanej i rodzaj reakcji PCR mogą mieć kluczowe znaczenie.

Sekwencja powielana. Przy wyborze genu *B. burg-*

dorferi sl, który chcemy poddać amplifikacji istotny jest brak homologii z DNA innych mikroorganizmów (*Treponema*, *Leptospira*, *Escherichia coli*), a przede wszystkim z materiałem genetycznym człowieka (3, 6, 14, 17). Istnieje kilka zalecanych, swoistych fragmentów genomu *B. burgdorferi sl* (1, 9), chromosomalnych: gen *fla* (22), *recA*, 16S rDNA (14, 16, 22, 23), *p66* (3), *hbb* (4), *rpoB*, przestrzeń międzygenowa 5S 23S (19), i plazmidowych: *OspA* (4, 13, 16, 18), *OspB*, *OspC* (16, 24), *VlsE* (25).

Rodzaje reakcji PCR.

Do diagnostyki boreliozy z Lyme wystarczające są reakcje jakościowe typu End-Point: qPCR (qualitative PCR), nPCR (nested PCR) FEP PCR (Fluorescent End-Point PCR) (3, 4, 11, 14, 25), pozwalające wykryć DNA *B. burgdorferi sl*. Reakcje ilościowe Real-Time PCR określające ilość kopii DNA krętków *B. burgdorferi sl* w pobranym materiale mają praktycznie takie samo znaczenie diagnostyczne, ale jednak przy wyższych kosztach (3, 4, 11, 13).

Standardowy qPCR End-Point pozwala po 30-40 cyklach zwielokrotnić ilość wyjściowej matrycy DNA milion razy, co daje 0,2-2 µg określonego fragmentu genomu (3, 6). Gniazdowy nPCR End-Point dzięki zastosowaniu dwóch następujących po sobie reakcji PCR, gdzie w drugiej reakcji startery zlokalizowane są bliżej środka powielanego fragmentu, charakteryzuje się zwiększoną specyficznością i czułością, co pozwala wyeliminować wyniki fałszywie dodatnie. Jeżeli ponadto obie reakcje są przeprowadzane w jednej probówce (w tzw. układzie zamkniętym), to czułość wzrasta (16, 23). *Lee* i wsp. (23) udowodnili, iż zastosowanie nested PCR w ludzkim materiale zwiększa czułość reakcji od 100 do 1000 razy w stosunku do standardowego PCR i pozwala wykryć pojedynczą kopię DNA *B. burgdorferi sl*. Konwencjonalna reakcja PCR potrzebuje ok. 100 krętków, aby zakażenie zostało wykryte. Dołączenie kontroli wewnętrznej w każdej próbie eliminuje wyniki fałszywie ujemne, wyklucza obecność inhibitorów reakcji lub nieprawidłową izolację DNA (4, 13).

TRUDNOŚCI DIAGNOSTYCZNE

Prawidłowe przeprowadzenie diagnostyki technikami biologii molekularnej wymaga staranności, skupienia, zwrócenia uwagi na wiele aspektów w trakcie badania oraz przestrzegania fundamentalnych zasad (1, 16, 23) przez odpowiednio dobrany i właściwie przeszkolony personel. Problemy, jakie mogą się pojawić w czasie wykrywania DNA krętków *Borrelia*, stan kliniczny pacjenta, różnorodność i nakładanie się objawów, a także koinfekcje innymi patogenami po pokłuciu przez kleszcze, zawsze powinny być brane pod uwagę podczas interpretacji testu (11). W razie

jakichkolwiek wątpliwości, należy zawsze powtórzyć proces diagnostyczny.

Zanieczyszczenia próby badanej (kontaminacje).

Na każdym etapie diagnostyki PCR może dojść do zanieczyszczenia próby, już w momencie pobierania materiału do badań, aż po detekcję produktu amplifikacji. Źródłem zanieczyszczenia może być miejsce pobrania lub przestrzeń laboratoryjna, personel, pacjent, a nawet woda dodawana do odczynników. Najczęstszym źródłem skażenia: materiału, izolatu, mieszaniny reakcyjnej lub produktu amplifikacji, jest DNA innych patogenów (np. naturalna flora bakteryjna pacjenta), DNA własne pacjenta (gdy brak swoistych primerów), inne izolaty DNA, czy amplikony z poprzednich reakcji PCR, które mogą być obecne w całej przestrzeni laboratoryjnej (3, 6, 11, 14, 24). Zanieczyszczenia i niska specyficzność zastosowanej metody, najczęściej prowadzą do fałszywie dodatnich wyników PCR. Rygorystycznie przestrzeganie procedur pozwala wyeliminować wyniki fałszywie dodatnie (23). Lee i wsp. podkreślają, że ryzyko fałszywie dodatniego wyniku PCR w kierunku wykrywania *B. burgdorferi sl* prowadzi do postawienia mylnej diagnozy, zastosowania niewłaściwego leczenia (23). Jednocześnie wykluczają metodę nested PCR jako źródło krzyżowej kontaminacji, podkreślając iż podstawowymi przyczynami zanieczyszczenia jest niewłaściwie wyszkolony personel oraz brak przestrzegania reguł postępowania analitycznego. Metoda nPCR ogranicza możliwość potencjalnych błędów laboratoryjnych oraz pozwala wykluczyć uzyskanie wyników fałszywie dodatnich i fałszywie ujemnych (23).

Inhibitory PCR. W przebiegu reakcji PCR również często może dojść do kontaminacji, jak i inhibicji. Do inhibitorów należą związki, substancje i czynniki, które dostają się do próby badanej, izolatu bądź mieszaniny reakcyjnej na poszczególnych etapach diagnostyki i z różnym nasileniem wpływają hamująco na przebieg amplifikacji (3, 4, 6, 8, 22). Ludzka hemoglobina, heparyna, czy EDTA wpływają hamująco na termostabilną polimerazę katalizującą reakcję PCR głównie poprzez redukcję jej kofaktora (jony Mg^{++}), co ma największe znaczenie, gdy materiałem do badania jest krew (6, 8, 25). Badania Opel i wsp. (25) potwierdziły, że melanina zawarta w skórze i włosach oraz pochodne porfiryn (hem) blokują specyficzne wiązanie sekwencji starterowych do matrycy, ograniczając ilość matrycowego DNA podlegającego amplifikacji, co może skutkować wynikami fałszywie ujemnymi, gdy materiałem do badania są biopłaty skórne z granicy EM. Chlorek sodu, octan sodu, izopropanol, etanol, fenol, SDS, czy używane do utrwalania materiałów: parafina, formalina hamują reakcję PCR, podobnie jak czynniki fizyczne, na przykład promieniowanie UV (3, 6, 15, 25). Stąd istotny jest prawidłowy proces izolacji. Może on zostać połączony z oczyszczaniem wyekstrahowanego DNA, co niestety

wiąże się ze stratami DNA oraz dodatkowym nakładem czasu i kosztów (3, 25). Użycie kontroli wewnętrznej w reakcji PCR pozwala wyeliminować wpływ inhibitorów na przebieg amplifikacji i wykluczyć wyniki fałszywie ujemne (13).

Cechy własne krętków *Borrelia burgdorferi*. Na wynik metody PCR w kierunku wykrywania DNA krętków *Borrelia burgdorferi sl* znaczący wpływ mają indywidualne cechy tych bakterii. Przejściowe i krótkie bytowanie we krwi, pmr i innych płynach organizmu gospodarza, skłonność do łączenia się z komórkami gospodarza i zasiedlanie trudnodostępnych nisz organizmu (wysoki tropizm tkankowy do skóry, błony maziowej stawów, komórek śródbłonna, serca, osierdzia mózgu i opon mózgowych) wynikają między innymi z wyposażenia tych bakterii w receptory glikozoaminglikanów, dzięki którym mogą łączyć się z komórkami je posiadającymi (2, 8, 10). Utrudnia to potwierdzenie zakażenia na poziomie molekularnym (1, 2). Stąd negatywny wynik PCR nie wyklucza infekcji *Borrelia burgdorferi sl* (1). Istnieją również takie cechy *Borrelia burgdorferi sl*, które przemawiają za wykorzystaniem metody PCR. Białko OspC bakterii w połączeniu z proteiną Salp15 śliny kleszcza jest czynnikiem ułatwiającym zakażenie poprzez zahamowanie funkcji komórek dendrytycznych., produkcji cytokin prozapalnych i aktywacji limfocytów B, a więc komórkowej, jak i humoralnej odpowiedzi immunologicznej. Wydłuża to czas potrzebny do wyprodukowania przeciwciał, podczas gdy materiał genetyczny bakterii może być wykrywany za pomocą metody PCR (2).

Antybiotyko terapia. Jednym z najczęściej popełnianych błędów przedlaboratoryjnych jest pobranie materiału po zapoczątkowaniu leczenia antybiotykami. Badania Picha i wsp. wykazały, że wykrywalność DNA krętków *Borrelia* spada z 58,1 % do 41,7% po rozpoczęciu leczenia antybiotykami (16). Natomiast Kondrusik i wsp. (14) stwierdzili, iż kilkudniowa antybiotykoterapia nie obniża efektywności metody PCR, podczas gdy 4-tygodniowy kurs leczenia wpływa na spadek wykrywalności. W grupie pacjentów nieleczonych wykrywalność krętków *Borrelia* przed badaniem wynosiła 73,3%, a po 4 tygodniach antybiotykoterapii 52,3%. Podobnie w grupie pacjentów po 4-5 dniach farmakologicznego leczenia wykrywalność DNA krętków wynosiła 85,7% i spadła do 57,1% po 4-tygodniowym kursie antybiotykoterapii. Należy pamiętać iż dodatni wynik PCR jedynie stwierdza obecność DNA krętków *B. burgdorferi sl*, które może pochodzić z żywych, jak i z martwych bakterii (1, 11). Fragmenty DNA bakteryjnego mogą być wykrywane jeszcze do 4-6 tygodni po zakończeniu antybiotykoterapii, dlatego kontrolne badanie PCR zaleca się po upływie tego czasu (14, 22). Honegr i wsp. wykrywali materiał genetyczny krętków *Borrelia* jeszcze po 4-68 miesiącach od zakończenia

antybiotykoterapii (23).

Brak standaryzacji. Duża rozbieżność (11) rezultatów oznaczania DNA krętków *B. burgdorferi* *sl* w różnych ośrodkach badawczych i diagnostycznych z materiałów pobieranych od pacjentów jest podstawową przeszkodą do wprowadzenia tych badań do powszechnej diagnostyki boreliozy z Lyme (1, 24). Standaryzacja metod biologii molekularnej oraz przeprowadzanie na tym samym materiale minimalnie dwóch równoległych, niezależnie wykonanych amplifikacji według m.in. *Picha*, jest niezbędna w przypadku krętkowicy kleszczowej (16, 25). Natomiast *Cerar* i wsp. (18) podkreślają kluczowe znaczenie odpowiednio dobranej grupy kontrolnej przy diagnostyce boreliozy z Lyme, pozwalającej wykluczyć fałszywie dodatnie wyniki, jak i umożliwiającej potwierdzenie wysokiej specyficzności i czułości zastosowanej metody PCR, a w konsekwencji na jej standaryzację.

PRZYDATNOŚĆ DIAGNOSTYCZNA PCR W CHOROBY Z LYME - PODSUMOWANIE

Oznaczanie DNA krętków *B. burgdorferi* *sl* za pomocą metody PCR poszerza i przyspiesza możliwości diagnostyczne choroby Lyme. Po ukąszeniu przez kleszcza *Ixodes*, bez konieczności oczekiwania na wytworzenie przez organizm pacjenta swoistych przeciwciał (4-6 tygodni) możliwe jest wykrycie nawet pojedynczych kopii DNA krętków (4, 13, 22). Nie jest to jednak równoznaczne z aktywnym zakażeniem (6), a negatywny wynik nie pozwala ostatecznie wykluczyć infekcji. Również w późnym etapie zakażenia, gdy powinny już być obecne przeciwciała, można uzyskać pozytywny wynik badania PCR, szczególnie w fazie aktywnego zakażenia (LA, ACA, NB) oraz u pacjentów seronegatywnych (defekty immunologiczne wrodzone i nabyte, współzakażenia, bezobjawowy przebieg oraz utajony okres choroby-aktywacja zakażenia może nastąpić po miesiącach od

kontakty z wektorem) (16). Metoda PCR stwarza także dodatkowe możliwości w sposobie diagnozowania pacjentów z długotrwałe utrzymującymi się swoistymi przeciwciałami, szczególnie w klasie IgM (13).

Przeprowadzenie kontrolnego badania PCR w trakcie i po zakończeniu antybiotykoterapii (16, 22) może służyć monitorowaniu skuteczności leczenia zakażenia krętkami *Borrelia*.

Wielość materiału, który może zostać wykorzystany w badaniu PCR rozszerza możliwości diagnostyczne krętkowicy kleszczowej. Według *Stanek* i wsp. (1) w zmianach wczesnych typu EM i późnych typu ACA, gdzie materiałem badanym są bioptaty skórne, wykrywalność DNA *B. burgdorferi* *sl* jest dość wysoka (ponad 50-70%), w przypadku płynu stawowego (LA) wynosi ona ponad 50%, w płynie mózgowo-rdzeniowym jest dość niska (15-30%), natomiast we krwi ze względu na duże rozbieżności waha się ona od 0 do 100%. Nie jest zalecane w diagnostyce boreliozy z Lyme badanie moczu.

Wprowadzenie metody PCR do diagnostyki choroby z Lyme umożliwiłoby przede wszystkim wykrycie zakażenia we wczesnym jego etapie oraz u tych pacjentów, u których metody immunoserologiczne z różnych przyczyn zawodzą. W tym celu niezbędna jest standaryzacja metody i ujednoczenie schematów postępowania diagnostycznego.

Otrzymano: 10.07.2012 r.

Zaakceptowano do druku: 13.11.2012 r.

Adres do korespondencji:

Justyna Dunaj

Klinika Chorób Zakaźnych i Neuroinfekcji

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

ul. Żurawia 14, 15-540 Białystok

Tel. (85) 7409514

e-mail: neuroin@amwb.edu.pl