

Nested-PCR w czasie rzeczywistym, jako alternatywne molekularne narzędzie w detekcji *Borrelia burgdorferi* w porównaniu do klasycznej diagnostyki serologicznej krwi

Nested-PCR real time as alternative molecular tool for detection of *Borrelia burgdorferi* compared to the classical serological diagnosis of the blood

Agnieszka Sroka-Oleksiak¹, Krzysztof Ufir², Dominika Salamon¹, Małgorzata Bulanda¹, Tomasz Gosiewski³

¹Zakład Epidemiologii Zakażeń, Katedra Mikrobiologii, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum

²Uniwersytet Jagielloński

³Zakład Bakteriologii, Ekologii Drobnoustrojów i Parazytologii, Katedra Mikrobiologii, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum

Trudności w diagnostyce boreliozy spowodowane są głównie heterogennością genogatunków, strategiami życiowymi *Borrelia* spp, oraz deficytami diagnostyki serologicznej. W niniejszej pracy podjęto próbę zwiększenia czułości detekcji *B. burgdorferi* poprzez opracowanie metody nested-PCR w czasie rzeczywistym oraz porównania uzyskanych wyników z klasycznym PCR w czasie rzeczywistym i rutynowo stosowaną diagnostyką serologiczną.

Słowa kluczowe: borelioza, *Borrelia burgdorferi*, serologia, nested-PCR w czasie rzeczywistym, PCR real time, krew

ABSTRACT

Introduction: Lyme disease, caused by *Borrelia burgdorferi*, is a multisystem disease that often makes difficulties to recognize caused by their genetic heterogeneity. Currently, the gold standard for the detection of Lyme disease (LD) is serologic diagnostics based mainly on tests: ELISA and Western blot (WB). These methods, however, are subject to considerable defect, especially in the initial phase of infection due to the occurrence of so-called serological window period and low specificity. For this reason, they might be replaced by molecular methods, for example polymerase chain reaction (PCR), which should be more

sensitivity and specificity. In the present study we attempt to optimize the PCR reaction conditions and enhance existing test sensitivity by applying the equivalent of real time PCR - nested PCR for detection *B. burgdorferi* DNA in the patient's blood.

Methods: The study involved 94 blood samples of patients with suspected LD. From each sample, 1.5 ml of blood was used for the isolation of bacterial DNA and PCR real time amplification and its equivalent, in nested version. The remaining part earmarked for serological testing. Optimization of the reaction conditions made experimentally, using gradient of the temperature and gradient of the magnesium ions concentration for reaction real time in nested-PCR and PCR version.

Results: The results show that the nested-PCR real time, has a much higher sensitivity 45 (47.8%) of positive results for the detection of *B. burgdorferi* compared to the single-variant, without a preceding pre-amplification 2 (2.1%). Serological methods allowed the detection of infection in 41 (43.6%) samples.

Conclusions: These results support of the nested PCR method as a better molecular tool for the detection of *B. burgdorferi* infection than classical PCR real time reaction. The nested-PCR real time method may be considered as a complement to ELISA and WB mainly in the early stages of infection, when in the blood circulating *B. burgdorferi* cells. By contrast, the results of serological and molecular tests should always be carried out taking into account the patient's clinical status.

Key words: Lyme disease, *Borrelia burgdorferi*, serology, nested-PCR real time, PCR, blood

WSTĘP

Borelioza z Lyme jest wielonarządową chorobą wywołaną przez krętki *Borrelia burgdorferi* sensu lato (w Polsce są to przede wszystkim: *B. garinii*, *B. afzelii* i rzadziej *B. burgdorferi* sensu stricto), przenoszone przez kleszcze z rodzaju *Ixodes* (1, 3, 5, 6, 16). Obraz kliniczny w zależności od fazy zakażenia objawia się wystąpieniem rumienia wędrującego (stwierdzono u 80% pacjentów), zapaleniem stawów, objawami ze strony układu nerwowego (tzw. neuroborelioza) lub sercowo-naczyniowego (1, 4, 6, 20). Istotną rolę w rozpoznaniu boreliozy odgrywają: wywiad z pacjentem, sam fakt ukłucia przez kleszcza, objawy kliniczne występujące u chorego oraz pomocniczo badania laboratoryjnie (5, 17). W rutynowej diagnostyce boreliozy zaleca się zastosowanie dwustopniowego badania serologicznego, będącego złotym standardem. W pierwszym etapie wykazywana jest obecność przeciwciał w klasach IgM i IgG, przy użyciu metody ELISA. W przypadku wyników pozytywnych, lub wątpliwych wykonuje się test potwierdzenia techniką Western-blot (WB) (2, 7). Zarówno pierwsza jak i druga metoda uzupełniają się wzajemnie, ponieważ ELISA charakteryzuje się wysokością czułością i stosunkowo niską swoistością, natomiast WB cechuje wysoka swoistość przy niższej czułości (6, 7, 16). Metody te nie mają jednak zastosowania we wczesnej fazie zakażenia z uwagi na występowanie tzw. okienka serologicznego, które wynosi około 3 tygodni (2). Interpretacja wyników badań serologicznych często jest utrudniona, co wynika z różnorodnych strategii życiowych *Borrelia burgdorferi*, polegających m.in. na bytowaniu krętków w środowisku wewnątrzkomórkowym i zewnątrzkomórkowym, zmienności antygenowej oraz morfologicznej, umiejscawianiu się w strefach immunologicznie chronionych, czy wywoływaniu procesów autoimmuni-

zacyjnych (1, 21). Wymienione cechy mają wpływ na przebieg choroby i nawroty (10). Przyczyną niepowodzeń terapeutycznych jest także możliwość występowania odmiennego od typowego rozwoju odpowiedzi immunologicznej (23). Ukłucie kleszcza może pozostać niezauważone, a pierwsze rzekomo grypowe objawy boreliozy często są uznawane za infekcję wirusową. Kolejne symptomy pojawiające się w późniejszym okresie mogą być zróżnicowane zarówno pod względem ilości i intensywności jak i układu, w którym występują. Wówczas mylnie są interpretowane, jako np. młodzieńcze zapalenie stawów, choroba Reitera, toczeń rumieniowaty, wady serca lub choroby psychiczne, a nawet stwardnienie rozsiane, czy choroba Alzheimerera (10). Różne objawy chorobowych sprawiają, że przytoczone powyżej przykłady nie wyczerpują całej gamy możliwych pomyłek, a jedynie wskazują na te, które wymieniane są najczęściej. Z tego powodu nierzadko borelioza nazywana jest „wielkim imitatorem”.

Proponowanym rozwiązaniem, stanowiącym alternatywę dla tradycyjnych metod diagnostycznych, mogą być testy molekularne oparte o łańcuchową reakcję polimerazy (PCR). Argumentem przemawiającym za ich zastosowaniem jest przede wszystkim wyższa czułość oraz znacznie krótszy czas uzyskiwania wyników (5, 7, 13). Mimo, iż reakcje PCR stają się coraz częściej stosowanym narzędziem w laboratoriach (m.in. w identyfikacji jakościowej i ilościowej mikroorganizmów), to jednak do tej pory nie udaje się wprowadzić ich do rutynowej diagnostyki boreliozy. W dalszym ciągu problemem jest rozbieżność wyników otrzymywanych przy użyciu PCR, testów serologicznych, czy posiewu. W związku z tym, priorytetem w diagnostyce molekularnej boreliozy powinna być właściwa standaryzacja metod diagnostycznych oraz korelowanie uzyskiwanych wyników ze stanem klinicznym pacjenta oraz badaniami serologicznymi (23).

W niniejszej pracy podjęto próbę optymalizacji warunków reakcji RCR w czasie rzeczywistym oraz zwiększenia czułości badania poprzez zastosowanie nested PCR, tj. PCR zagnieżdżonego. Kolejnym celem była ocena i porównanie wyników, uzyskanych z zastosowaniem następujących metod badawczych: ELISA (potwierdzona testem WB), PCR w czasie rzeczywistym i nested-PCR w czasie rzeczywistym.

MATERIAŁ I METODY

Badane próbki. Materiałem poddanym analizom były próbki krwi, pochodzące od 94 pacjentów Pracowni Diagnostyki Mikrobiologicznej Katedry Mikrobiologii UJ CM w Krakowie, którzy zgłosili się do badań po ukłuciu przez kleszcze. Próbki podzielono na 2 części: 1,5 ml krwi przeznaczono do izolacji DNA i przeprowadzenia reakcji PCR oraz nested-PCR, a pozostałą ilość wykorzystano do badań serologicznych. Badania uzyskały akceptację Komisji Bioetycznej UJ (KBET/219/B/2013).

Badania serologiczne. Obecność specyficznych przeciwciał IgG i IgM skierowanych przeciwko *B. burgdorferi* oznaczano według dwuetapowego algorytmu postępowania diagnostycznego: metodą ELISA (Biomedica), a także testem Western-blot (Mikrogen). Oznaczenie przeprowadzono zgodnie z protokołem producenta powyższych zestawów.

Izolacja DNA. Bakteryjne DNA izolowano przy wykorzystaniu procedury poszerzonej o wstępną preparatykę krwi, w celu usunięcia inhibitorów polimerazy takich jak hem oraz lizę ścian komórkowych bakterii. Do próbki krwi dodano 0,17M NH_4Cl i inkubowano w temperaturze 37°C przez 20 min. Następnie próbki wirowano (5 000 rpm przez 10 min),

usuwano nadsącz, a osad zawieszano w buforze Tris-HCl z 100µl lizozymu (Sigma) (2 mg/ml) i poddano homogenizacji w urządzeniu FastPrep (MP Biomedicals) przy prędkości 4,0 m/s przez 20 sek. Ponownie inkubowano próbki w temp. 37°C przez 20 min. W kolejnych etapach postępowano zgodnie z protokołem dołączonym do komercyjnego zestawu do izolacji QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen).

Reakcja amplifikacji DNA metodą PCR.

Optymalizacja warunków reakcji. W celu optymalizacji warunków reakcji PCR w czasie rzeczywistym i jej odpowiednika w wersji nested przeprowadzono amplifikacje wzorcowego DNA *B. burgdorferi* DSM 4680, stosując gradient temperatury przyłączania starterów w zakresie od 52°C - 64°C (Tabela I), a następnie gradient stężenia jonów magnezu od 1,25 mM do 7,5 mM w pierwszej amplifikacji oraz od 1,5 mM do 14 mM w drugiej amplifikacji (Tabela II).

Tabela I. Zastosowany gradient temperatury dla starterów zewnętrznych i wewnętrznych

Startery zewnętrzne		Startery wewnętrzne	
Program amplifikacji	Gradient temperatury	Program amplifikacji	Gradient temperatury
	64,0°C		64,0°C
95°C - 5 min	63,3°C	95°C - 5 min	63,3°C
95°C - 15 s	62,0°C	95°C - 15 s	62,0°C
52,0/64,0 - 30 s	59,6°C	52,0/ 64,0 - 30 s	59,6°C
72°C - 30 s	54,4°C	72°C - 30 s	54,4°C
	52,8°C		52,8°C
	52,0°C		52,0°C

Tabela II. Zastosowany gradient stężenia jonów magnezu dla starterów zewnętrznych i wewnętrznych

Startery zewnętrzne		Startery wewnętrzne	
Program amplifikacji	Gradient MgCl ₂	Program amplifikacji	Gradient MgCl ₂
	1,25 mM		1,5 mM
95°C - 5 min	2,27 mM	95°C - 5 min	4,0 mM
95°C - 15 s	4,0 mM	95°C - 15 s	6,5 mM
55°C - 30 s	5,25 mM	55°C - 30 s	9,0 mM
72°C - 30 s	6,5 mM	72°C - 30 s	11,5 mM
	7,75 mM		14,0 mM

Optymalną temperaturę przyłączania starterów jak i optymalne stężenie jonów magnezu wyznaczano na podstawie sygnału liniowego przyrostu produktu amplifikacji, który przeciął arbitralnie ustaloną linię bazową na poziomie 100 RFU (angl. *relative fluorescence units*). Na podstawie ustalonych warunków reakcji przeprowadzono kontrolną amplifikację 0,1 ng – 1,0 ng wzorcowego DNA *B. burgdorferi* DSM 4680 metodami nested-PCR oraz PCR w czasie rzeczywistym, aby porównać wydajność amplifikacji obydwu metod.

Nested-PCR. skład mieszaniny reakcyjnej, zastosowanej zarówno w reakcji 1^o jak i 2^o przedstawiono w tabeli (Tabela III).

Tabela III. Skład mieszaniny reakcyjnej oraz profile termiczne dla reakcji nested-PCR w czasie rzeczywistym.

Nested-PCR w czasie rzeczywistym			
I AMPLIFIKACJA		II AMPLIFIKACJA	
Objętość końcowa 10 µl		Objętość końcowa 10 µl	
H ₂ O	0,3µl	JumpStart Taq ReadyMix	5,0 µl
JumpStart Taq ReadyMix	5,0 µl	FL- 571F (10µM)	0,2 µl
EXT_F1_Borelia (10µM)	0,2 µl	FL-662R (10µM)	0,2 µl
EXT_R1_Borelia (10µM)	0,2 µl	Sonda TaqMan (10µM)	0,3 µl
MgCl ₂ (4 mM)	1,5 µl	MgCl ₂ (6 mM)	2,5 µl
DNA	2,8 µl	DNA	1,8 µl

Pierwszą reakcję amplifikacji przeprowadzono w termocyklerze T100 (BioRad), a drugą, w czasie rzeczywistym przy użyciu termocyklera CFX96 (BioRad). Sekwencje starterów i sondy zamieszczono w Tabeli IV.

Tabela IV. Sekwencje oligonukleotydów zastosowanych w badaniu.

Startery	Sekwencja 5' → 3':	Źródło
FL- 571F	GCAGCTAATGTTGCAAATCTTTTC	D. Liveris i in. 2011
FL-662R	TGAGCTCCTTCCTGTTGA	
EXT_F1_Borelia	AAACAAATCTGCTTCTCAA	Zaprojektowane przez autorów
EXT_R1_Borelia	CACTTATCATTCTAATAGCATT	
Sonda	Sekwencja 5' → 3':	
FL-611P	FAM-AAACTGCTCAGGCTGCACCGTTC –MGB	D. Liveris i in. 2011

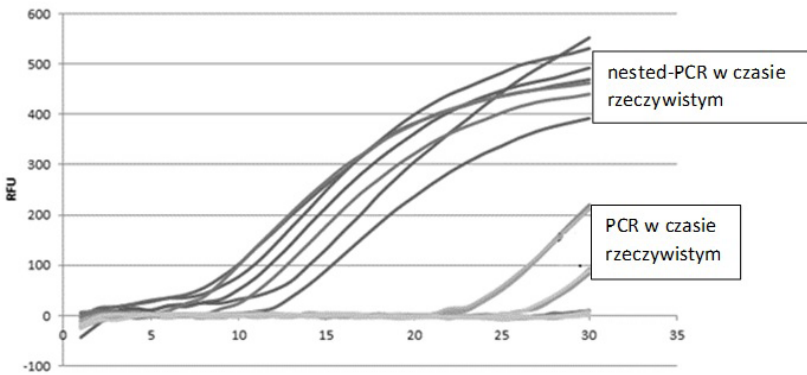
Izolaty DNA amplifikowano w dublecie stosując za każdym razem kontrolę pozytywną - DNA wyizolowane z krwi, sztucznie zakażonej bakteriami *B. burgdorferi* DSM 4680, oraz kontrolę negatywną – jałową wodę destylowaną, wolną od DNaz i RNaz.

Badanie próbek. Obydwie odmiany metody PCR zastosowano do przebadania próbek krwi pochodzących od pacjentów. Warunkiem uznania wyniku za pozytywny było przecięcie, arbitralnie ustalonej linii bazowej na poziomie 100 RFU przez liniowy przyrost produktu.

WYNIKI

Na potrzeby badania oprócz starterów opisanych w pracy *Livers`a* [14], zaprojektowano dodatkowo startery zewnętrzne, umożliwiające powielanie dłuższych odcinków DNA (Tabela IV). Doświadczalnie dostosowano optymalną temperaturę przyłączania starterów, która zarówno w 1^o amplifikacji jak i w 2^o wynosiła 55°C. Z kolei optymalne stężenie jonów magnezu w amplifikacji 1^o to 4,0 mM, zaś 2^o, 6,5 mM. Na podstawie analizy otrzymanych

wyników wykazano, że metoda nested-PCR w czasie rzeczywistym cechuje się wyższą czułością amplifikacji w porównaniu do PCR w czasie rzeczywistym (Ryc. 1), a także umożliwiła detekcję *B. burgdorferi* u 45 pacjentów (47,9%).

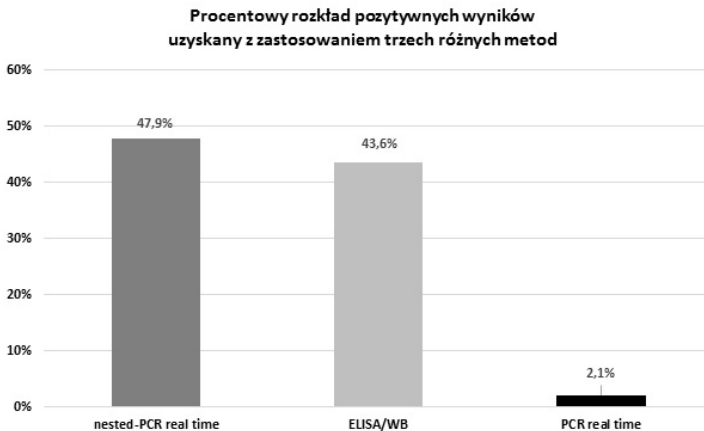


Ryc. 1. Porównanie czułości amplifikacji 0,1 ng – 1,0 ng wzorcowego DNA *B. burgdorferi* DMS 4680 metodą nested-PCR w czasie rzeczywistym i PCR w czasie rzeczywistym.

W przypadku metody PCR, bez poprzedzającej reakcji wstępnej, wynik pozytywny odnotowano jedynie u 2 pacjentów (2,1%). Dzięki zastosowaniu metod serologicznych wykazano 41 (43,6 %) pozytywnych wyników, z czego w odniesieniu do nested PCR – 18 (19,2%) było zgodnych, a 27 (28,7%) niezgodnych z metodą zagnieżdżonego PCR w czasie rzeczywistym (Tabela V), (Ryc. 2).

Tabela V. Zestawienie wyników uzyskanych metodami: nested-PCR w czasie rzeczywistym i ELISA/WB. Tabela nie uwzględniono rezultatów jedностopniowej reakcji PCR w czasie rzeczywistym ze względu na otrzymanie zaledwie dwóch pozytywnych wyników.

	ELISA/WB (+)	ELISA/WB (-)	TOTAL
NESTED-PCR (+)	18 (19,1%)	27 (28,7%)	45 (47,8%)
NESTED-PCR (-)	22 (23,4%)	27 (28,7%)	49 (52,1%)



Ryc. 2. Porównanie odsetka pozytywnych rezultatów w detekcji *B. burgdorferi* z krwi pacjentów przy użyciu metod: zagnieżdżonego-PCR w czasie rzeczywistym, ELISA/WB i PCR w czasie rzeczywistym

DYSKUSJA

Obecna diagnostyka wykrywania zakażeń wywoływanych przez *B. burgdorferi* jest wciąż niedoskonała ze względu na różnorodne objawy kliniczne, a także brak wiarygodnych testów diagnostycznych, skutecznych szczególnie w początkowym okresie zakażenia. Metody hodowlane są bezpośrednim dowodem na stwierdzenie obecności krętków w organizmie pacjenta, ale są rzadko prowadzone w laboratoriach diagnostycznych, ze względu na konieczność użycia bogatych w składniki odżywcze płynnych podłoży, na których bakterie wzrastają przez długi okres, sięgający nawet 5 tygodni w warunkach beztlenowych. Liczba uzyskiwanych hodowli krętków jest zazwyczaj niewielka, a stwierdzenie ujemnego wyniku nie wyklucza wcale zakażenia. Ponadto czułość tej metody dla większości materiałów klinicznych, z wyjątkiem bioapatów skórnych, jest niska (15, 17). Najczęściej stosowanymi testami w diagnostyce *Borrelia* są odczyny serologiczne, oparte o detekcję przeciwciał IgG i IgM (ELISA, WB). Niestety, mają one stosunkowo niską czułość we wczesnej fazie boreliozy. U pacjentów nieleczonych przeciwciała klasy IgM pojawiają się po około 3 tygodniach, a nawet później i na przestrzeni 4-6 miesięcy ich miano zmniejsza się do poziomu niewykrywalnego. Z kolei przeciwciała klasy IgG osiągają najwyższe miano w 4-6 miesiącu zakażenia i utrzymują się w późnej boreliozie, ale także są czasem stwierdzane u pacjentów jeszcze wiele lat po przebytej skutecznej antybiotykoterapii. Natomiast u pacjentów leczonych antybiotykami przeciwciała swoiste dla *B. burgdorferi* mogą w ogóle być niewykryte (15). Dodatkowo wyniki badań serologicznych należy interpretować ostrożnie, szczególnie, gdy wykryte przeciwciała występują w niskich stężeniach oraz wtedy, kiedy nie ma wyraźnej manifestacji klinicznej sugerującej boreliozę. Może to świadczyć o reakcjach krzyżowych związanych z zakażeniami wirusami *Herpes*, krętkiem *Treponema pallidum*, Gram-dodatnimi bakteriami *Bacillus subtilis*, lub chorobami autoimmunologicznymi. W przebiegu tych zakażeń produkowane są przeciwciała, które mogą być wykryte we krwi nawet wiele lat po przebyciu zakażenia (2). Wówczas brak klinicznych objawów, charakterystycznych dla boreliozy nie upoważnia do jej rozpoznania i leczenia (6). W obliczu dotychczasowych osiągnięć biologii molekularnej zasadnicze wydaje się być opracowanie i wdrożenie nowych testów, stanowiących uzupełnienie dla metod z zakresu diagnostyki serologicznej. Do tej pory opisano kilka odmian łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) w detekcji *B. burgdorferi*: qPCR (1, 8) nested-PCR (4, 20) czy PCR-RFLP (22). Argumentami przemawiającymi za ich zastosowaniem są m.in. wysoka swoistość czy możliwość detekcji krętków przede wszystkim we wczesnym etapie zakażenia z różnych próbek materiałów klinicznych (1, 2, 3, 16). Obecnie w wyjątkowych sytuacjach tj. w płynie mózgowo-rdzeniowym w początkowym stadium neuroboreliozy, wycinku skóry lub w płynie stawowym dopuszczalne jest wykrywanie DNA krętków przy użyciu reakcji PCR, ale metoda ta nie może być używana rutynowo w badaniach diagnostycznych, ze względu na brak odpowiedniej standaryzacji (5, 6, 17). Z tego powodu w dostępnej literaturze pojawia się coraz więcej doniesień, w których podejmowane są starania ujednoczenia warunków reakcji PCR w identyfikacji gatunków *Borrelia* (1, 2, 5, 9, 11, 18).

W niniejszej pracy opisano próbę zwiększenia czułości detekcji *B. burgdorferi* poprzez zastosowanie dwustopniowej reakcji nested-PCR w czasie rzeczywistym. W tym celu zaprojektowano startery zewnętrzne i przeprowadzono standaryzację metody amplifikacji DNA

B. burgdorferi. Przeprowadzenie wyłącznie jednostopniowej amplifikacji, bez reakcji poprzedzającej pozwoliło uzyskać zaledwie 2 pozytywne wyniki. W pracy *Niścigorskiej* i wsp. (16) na 52 próbki pochodzące od pacjentów nie uzyskano ani jednego pozytywnego rezultatu metodą PCR, a metodami serologicznymi zidentyfikowano obecność specyficznych przeciwciał u 32 pacjentów. Z kolei u *Chmielewskiej-Badory* i wsp. (3) uzyskane istotnie niższe odsetki wyników pozytywnych metodą PCR (11,1%) w stosunku do metod serologicznych (IgG-ELISA – 46,7%) wynikały prawdopodobnie z chronicznej postaci boreliozy i małej liczby krążących krętków we krwi. W odniesieniu do powyższych rezultatów metoda zagnieżdżonego PCR w czasie rzeczywistym wydaje się być lepszym rozwiązaniem, ponieważ w pierwszej amplifikacji dzięki starterom zewnętrznym o niskiej specyficzności powielane są dłuższe fragmenty DNA, a zastosowanie w drugiej reakcji starterów wewnętrznych, znajdujących się bliżej środka powielanego fragmentu, zapewnia wyższą specyficzność. Badania *Lee* i wsp. wykazały, że nested-PCR zwiększa czułość reakcji od 100 do 1000 razy w porównaniu do standardowej reakcji PCR i pozwala na wykrycie nawet pojedynczej kopii DNA *B. burgdorferi* (11, 13). Natomiast zastosowanie konwencjonalnej reakcji PCR wymaga obecności minimum 100 krętków, aby zakażenie zostało wykryte (5). Podobne badania do prezentowanych w naszej pracy przeprowadzili *Liveris* i wsp. (14). Pojedyncza reakcja PCR umożliwiła rozpoznanie zakażenia *B. burgdorferi* w przypadku 45% pacjentów, natomiast zastosowanie odpowiednika PCR w wersji nested, zwiększyło tę ilość do 65%. Wystąpienie rozbieżności w uzyskanych przez nasz zespół wynikach w stosunku do badań *Liveris* i wsp. mogło być spowodowane rodzajem materiału diagnostycznego. W badaniach *Liveris* wykorzystano surowicę krwi pacjentów, a w niniejszej pracy DNA izolowano z krwi pełnej, ponieważ, założyliśmy, że komórki *B. burgdorferii* mogą się znajdować również we wnętrzu komórek fagocytarnych krwi. Ponadto w naszej pracy zastosowano amplifikacje w czasie rzeczywistym, a nie klasyczną odmianę, z rozdziałem elektroforetycznym. W innej analizie zespół *Kondrusika* posłużył się metodą zagnieżdżonego PCR w czasie rzeczywistym do przebadania krwi pacjentów zgłaszających się z objawem wędrującego rumienia. Przeprowadzone przed wprowadzeniem leczenia testy oparte o metodę nested-PCR w czasie rzeczywistym pozwoliły na detekcję krętka u 73,3%, a po antybiotykoterapii ilość pozytywnych wyników wynosiła 52,3% (12). Kolejnym celem naszych badań było porównanie wyników uzyskanych metodami molekularnymi (PCR w czasie rzeczywistym oraz zagnieżdżony PCR w czasie rzeczywistym) i testami serologicznymi (ELISA potwierdzona testem WB). Na tym etapie nie można wnioskować o występowaniu istotnych różnic. Rozbieżności pojawiły się dopiero, gdy w próbce uzyskiwano wynik negatywny przy pomocy metody PCR, a testy serologiczne wskazywały na wynik dodatni. W niniejszej pracy odnotowano 22 (23,4%) takich przypadków. Przyczyną opisanych niezgodności mogło być późne stadium boreliozy i związany z nim tropizm krętka do tkanek (2, 3, 5). Wówczas większą wartość diagnostyczną mają materiały takie jak np. płyn stawowy lub płyn mózgowo-rdzeniowy. Wykrycie w tym okresie materiału genetycznego *Borrelia* we krwi jest utrudnione. Odwrotną sytuację, w której występowały ujemne wyniki testu ELISA, a dodatnie dla zagnieżdżonego PCR w czasie rzeczywistym zaobserwowano w 27 próbkach (28,7%). Niewykluczone, że w tej grupie byli pacjenci z wczesną fazą boreliozy, w trakcie, której organizm nie rozpoczął jeszcze produkcji swoistych przeciwciał. Kolejną przyczyną mogło być zbyt niskie miano przeciwciał spowodowane niewystarczającą obroną immunologiczną organizmu gospodarza (23), lub osłabienie odpowiedzi immunologicznej poprzez wdrożenie antybiotykoterapii.

Przedstawione w niniejszej pracy wyniki oraz przytoczone dane literaturowe potwierdzają przydatność nested-PCR w detekcji *B. burgdorferi* w porównaniu do jednostopniowej łańcuchowej reakcji polimerazy. Należy jednak pamiętać, że rezultaty uzyskane metodą nested-PCR nie umożliwiają wskazania stadium zakażenia, dlatego powinno się je wykonywać łącznie z testami serologicznymi, w celu uzyskania pełnej wartości diagnostycznej. Ponadto, pomimo wysokiej czułości i znacznego odsetka wyników pozytywnych, otrzymanie negatywnego wyniku nie jest równoznaczne z brakiem infekcji. Istnieje ryzyko wystąpienia wyników fałszywie negatywnych. Główna przyczyna tkwi w stopniu zaawansowania choroby i wspomnianym wcześniej tropizmie krętków do tkanek. Z tego powodu we właściwej detekcji boreliozy oprócz wystandaryzowanych i czułych metod zawsze największe znaczenie ma czas, rodzaj pobranego materiału oraz uwzględnienie stanu klinicznego pacjenta.

WNIOSKI

1. Odpowiednia standaryzacja oraz zastosowanie metody nested-PCR w czasie rzeczywistym umożliwiło zwiększenie czułości w wykrywaniu *B. burgdorferi* we krwi pacjentów w stosunku do pojedynczej reakcji PCR bez poprzedzającej amplifikacji.
2. Opracowana metoda nested-PCR w czasie rzeczywistym może mieć zastosowanie w diagnostyce *Borrelia burgdorferi*, we wczesnej fazie zakażenia, jako metoda uzupełniająca diagnostykę serologiczną.
3. Dodatnie oraz ujemne wyniki, uzyskane zarówno metodami molekularnymi jak i serologicznymi powinny być interpretowane ostrożnie, zawsze z uwzględnieniem stanu klinicznego pacjenta.

Badania sfinansowano z projektu statutowego Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum nr K/ZDS/004624.

PIŚMIENNICTWO

1. *Aguero-Rosenfeld ME, Wang G, Schwartz I, Wormser GP.* Diagnosis of Lyme Borreliosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 2005, 18: 484–509
2. *Bil-Lula I, Matuszek P, Pfeiffer T, Woźniak M.* Lyme Borreliosis - the Utility of Improved Real-Time PCR Assay in Detection of *Borrelia burgdorferi* Infections. *Advances in Clinical and Experimental Medicine* 2015; 24: 663–70.
3. *Chmielewska-Badora J, Cisak E, Buczek A, Dutkiewicz J.* Correlation of Tests for Detection of *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato in patients with diagnosed borreliosis. *Ann Agric Environ Med* 2006, 13, 307–11.
4. *Chu CY, Jiang BG, Liu W, Zhao QM.* Presence of Pathogenic *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato in Ticks and Rodents in Zhejiang, South-East China. *Journal of Medical Microbiology* 2008; 57(8): 980-5.
5. *Dunaj J, Moniuszko A, Zajkowska J, Pancewicz S.* The Role of PCR in Diagnostics of Lyme Borreliosis. *Przegl Epidemiol* 2013; 67: 35–9.
6. *Flisiak R, Panacewicz S.* Diagnostyka i Leczenie Boreliozy z Lyme. *Zalecenia Polskiego Towarzystwa Epidemiologów i Lekarzy Chorób Zakaźnych* 2011, 1-6.

7. *Liegl G.* 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. *Journal of Clinical Microbiology* 2005, 43: 3602–9.
8. *Gooskens J, Templeton KE, Claas EC, van Dam AP.* Evaluation of an Internally Controlled Real-Time PCR Targeting the ospA Gene for Detection of Borrelia Burgdorferi Sensu Lato DNA in Cerebrospinal Fluid. *Clinical Microbiology and Infection* 2006; 12(9): 894–900.
9. *Joss WL, Evans R, Mavin S, Chatterton J, Ho-Yen DO.* Development of Real Time PCR to Detect Toxoplasma Gondii and Borrelia Burgdorferi Infections in Postal Samples. *J Clin Pathol* 2008 61: 221–4.
10. *Klimaszewski A.* Borelioza i współinfekcje 2009, 1-119.
11. *Kim EJ, Bauer C, Grevelding CG, Quack T.* Improved PCR/nested PCR Approaches with Increased Sensitivity and Specificity for the Detection of Pathogens in Hard Ticks. *Ticks and Tick-borne Diseases* 2013; 4: 409–16.
12. *Kondrusik M, Grygorczuk S, Skotarczak B, Wodecka B.* Molecular and Serological Diagnosis of Borrelia Burgdorferi Infection among Patients with Diagnosed Erythema Migrans. *Annals of agricultural and environmental medicine* 2007; 14: 209–13.
13. *Lee SH, Vigliotti VS, Vigliotti JS, Jones W, Pappu S.* Increased Sensitivity and Specificity of Borrelia Burgdorferi 16S Ribosomal DNA Detection. *American Journal of Clinical Pathology* 2010, 133: 569–76.
14. *Liveris D, Schwartz I, McKenna D, Nowakowski J.* Quantitation of Cell-Associated Borrelial DNA in the Blood of Lyme Disease Patients with Erythema Migrans. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2012; 31: 791-5.
15. *Murray P, Rosenthal KS, Pfaller MA.* Mikrobiologia, Elsevier Inc, Wydanie VI, Wrocław 2011
16. *Niścigorska J, Skotarczak B, Wodecka B.* Borrelia Burgdorferi Infection among Forestry Workers - Assessed with an Immunoenzymatic Method (ELISA), PCR, and Correlated with the Clinical State of the Patients. *Annals of Agriculture and Environmental Medicine* 2003; 10: 15–9.
17. *Salamon D, Gosiewski T, Bulanda M.* Borelioza z Lyme- niebezpieczna pułapka *Zakażenia* 2015, 2: 69-75.
18. *Santino I, Berlutti F, Pantanella F, Sessa R.* Detection of Borrelia Burgdorferi Sensu Lato DNA by PCR in Serum of Patients with Clinical Symptoms of Lyme Borreliosis. *FEMS microbiology letters* 2008; 283: 30–5.
19. *Schmidt, BL.* PCR in Laboratory Diagnosis of Human Borrelia Burgdorferi Infections. *Clinical Microbiology Reviews* 1997; 10: 185–201.
20. *Sorouri R, Ranjbar R, Jonaidi N, Karami A.* Rapid detection of Borellia burgdorferi Strains by Nested Polymerase Chain Reaction. *Pakistan Journal of Biological Science* 2009, 12: 463–66.
21. *Witecka-Knysz E, Klimczak M, Lakwa K, Zajkowska J.* Borelioza: dlaczego diagnostyka jest tak trudna? *Diagnosta Laboratoryjny* 2007, 4: 1-4.
22. *Wodecka B, Leońska A, Skotarczak B.* A Comparative Analysis of Molecular Markers for the Detection and Identification of Borrelia Spirochaetes in Ixodes Ricinus.” *Journal of medical microbiology* 2010; 59: 309–14.
23. *Zajkowska J, Hermanowska T, Pancewicz S.* Borelioza z Lyme – Zasady Skutecznego Leczenia. *Zakażenia* 2007; 4: 2-7.

Otrzymano: 25 I 2016 r.

Adres Autora: 31-121 Kraków, ul. Czysta 18, Katedra Mikrobiologii
Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum