

Borelioza z Lyme

– najczęstsza choroba odkleszczowa ludzi i zwierząt

JAN WŁODAREK, ALEKSANDRA ŻURAW*, RAFAŁ WALCZAK**,
JAN DZIUBAN**, JĘDRZEJ M. JAŚKOWSKI

Katedra Weterynarii, Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu,
ul. Wojska Polskiego 52, 62-628 Poznań

*Department of Veterinary Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Freie Universität Berlin,
Robert-von-Ostertag-Straße 15, 14163 Berlin, Niemcy

**Zakład Mikroinżynierii i Fotowoltaiki, Wydział Elektroniki Mikrosystemów i Fotoniki, Politechnika Wrocławska,
ul. Zygmunta Janiszewskiego 11/17, 50-372 Wrocław

Włodarek J., Żuraw A., Walczak R., Dziuban J., Jaśkowski J. M.

Lyme Borreliosis: the most frequent tick-borne disease in humans and animals

Summary

Lyme borreliosis is the most frequent tick-borne disease in humans, as well as in animals. The main reservoir of its causative agent, *Borrelia burgdorferi*, are small rodents, but other domestic and wild mammals, as well as birds, can also be infected. The most common vector of these bacteria in Poland is the tick, *Ixodes ricinus*. Owing to significant difficulties of isolation and *in vitro* cultivation, it is almost impossible to detect this microorganism in a routine bacteriological examination. Because of great variety within the species, *B. burgdorferi* has been divided into different genospecies, some of which exist in Poland. The most common way for the bacteria to invade the host organism is through a tick bite, but they can also enter from tick feces through damaged skin or transplacentarily or through inhalation. Initially, the bacteria multiply at the site of a tick bite and then migrate to the bloodstream and different organs. The first phase of the disease is erythema migrans, and then such forms as neuroborreliosis, joint involvement, cerebral dural sinus thrombosis or the Alice in Wonderland syndrome can occur. In dogs most of *B. burgdorferi* infections are symptomless. They usually develop the disease after a reinfection, in which the musculoskeletal system, the neurological system and often the heart are involved. In horses, clinical signs appear very rarely. In the first phase of the disease a long-term antibiotic therapy is of great importance to prevent the occurrence of the chronic form. In dogs, vaccination can be used. Recently, thanks to new diagnostic methods, such as immunoenzymatic assays, flow cytometry and western blotting, the detection of the disease, also in animals, has increased significantly in the last decade. Molecular techniques involving microfluidic systems, the so-called "lab-on-chip" devices, are an early and unambiguous identification method of a *B. burgdorferi* infection. The aim of this method is to obtain and specifically multiply the desired DNA fragment with PCR. All this happens within an integrated microlaboratory (lab-on-chip) with the use of real-time fluorometric detection.

Keywords: *Borrelia burgdorferi*, *Ixodes ricinus*, Lyme borreliosis

Choroba z Lyme, nazywana również boreliozą z Lyme (LB), to przenoszona przez kleszcze infekcja ludzi i psów oraz w mniejszym stopniu koni, bydła i kotów. U ludzi została po raz pierwszy opisana po epidemii w 1975 r. w Lyme (Connecticut), gdzie u licznej grupy dzieci notowano przypadki zachorowań podobnych w swym przebiegu do młodzieńczego reumatoidalnego zapalenia stawów. U osób dorosłych choroba dodatkowo objawiała się zmianami na skórze oraz zaburzeniami układu nerwowego i krążenia (37). Prowadzone od tego czasu badania doprowadziły do odkrycia w 1982 r. czynnika etiologicznego nazwanego na cześć odkrywcy *Borrelia burgdorferi*. Obecnie borelioza ma zasięg ogólnosiwiatowy, a jej częstość dramatycznie wzrasta (42).

Etiologia

Borrelia burgdorferi jest gatunkiem bakterii Gram-ujemnych, zaliczanym do rzędu *Spirochaetales* z rodziny *Spirochaetaceae*, rodzaju *Borrelia* o spiralnym, nieregularnym kształcie (43). Borelie poruszają się ruchem rotacyjnym za pomocą pęczka kilkunastu rzęsek przebiegających wzdłuż osi długiej komórki. Jest to bakteria trudna do wyizolowania i hodowania *in vitro*. Namnaża się bardzo powoli w warunkach beztlenowych i tylko na specjalnych pożywkach, jest więc zarazkiem niemożliwym do wykrycia podczas rutynowego badania bakteriologicznego (37). Gatunek jest bardzo zróżnicowany i w związku z tym wyodrębniono jego genogatunki: *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. azelii*, *B. garinii*,

B. japonica i kilka innych. Niektóre z nich występują w Polsce. Prawdopodobnie liczba poznanych genogatunków nie jest zamknięta. Przy identyfikacji szczepu podaje się nazwę genogatunku lub w przypadku, gdy nie został on jeszcze oznaczony, nazwę gatunkową z określeniem *sensu lato* (*B. burgdorferi sensu lato*) (42, 45). Występujące w obrębie gatunku *B. burgdorferi* istotne różnice morfologiczne wynikają głównie ze zmienności białek pochodzących z błony zewnętrznej: OspA (outer surface proteins – białka powierzchniowe zewnętrzne) o masie cząsteczkowej 30-32 kDa, OspB 34-36 kDa oraz pC 21-22 kDa. Białka te charakteryzują się znaczną zmiennością masy cząsteczkowej oraz antygenowości. OspB jest często nieobecne lub słabo zaznaczone w izolatach szczepów europejskich, natomiast OspA występuje prawie we wszystkich szczepach. Na podstawie analizy obu tych białek u 25 szczepów rozróżniono 7 genotypów *B. burgdorferi*. Z drugiej jednak strony, bakterie te zawierają wiele białek krzyżowo reagujących z przeciwciałami dla innych gatunków krętków, np. leptospir. We wszystkich szczepach zbadanych do tej pory znajdują się dwa główne dwa białka o masie cząsteczkowej 41 i 60 kDa. Są to jednocześnie białka, które w znacznej mierze odpowiadają za powstawanie reakcji krzyżowych (42, 45, 46).

Występowanie, źródła i drogi zakażenia, rozpoznanie

Po odkryciu bakterii chorobę z Lyme notowano w wielu częściach świata. Obecnie borelioza jest najczęściej występującą chorobą odkleszczową na półkuli północnej (10, 42, 54). Rozwój nowych metod diagnostycznych w ostatniej dekadzie był powodem ujawnienia dramatycznego wzrostu liczby diagnozowanych przypadków LB w wielu krajach Europy oraz Stanach Zjednoczonych (1, 52). Częstość przypadków choroby z Lyme (chroniczne choroby powodowane infekcjami *Borrelia burgdorferi*) u ludzi wzrosła w Stanach Zjednoczonych w latach 1992-2006 blisko dwukrotnie. Trzydziestosięć procentowy wzrost zachorowań obserwowano w ostatnich pięciu latach m.in. w stanie Virginia, w którym przypadki boreliozy u ludzi należały dotychczas do rzadkości (dane ze strony internetowej www.vdh.state.va.us). W Europie boreliozę najczęściej diagnozowano w jej części środkowej oraz Skandynawii (155 przypadków na 100 tys. osób). Czynnikiem etiologicznym były takie gatunki krętka, jak: *B. burgdorferi sensu stricte*, *B. afzelii* oraz *B. garinii* (52). W Polsce borelioza występuje na terenie całego kraju, a brak choroby w danym regionie często wynika z nierozpoznania jej przez lekarzy (10). Rocznie w Polsce rejestrowanych jest około 8-9 tysięcy przypadków, a zapadalność na boreliozę wynosi 20 zachorowań na 100 tysięcy mieszkańców (43). Z danych Państwowego Instytutu Higieny wynika, że liczba osób zakażonych boreliozą systematycznie wzrasta. O ile w 2003 r. zgłoszono w Polsce 3574 przypadki, o tyle w 2010 r. ich liczba wyniosła 10 335, a w 2011 r. 9005 (dane

dostępne na stronie internetowej Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego). Stosując metodę ELISA badano częstość występowania przeciwciał swoistych u klinicznie zdrowych ludzi w Polsce; obecność przeciwciał stwierdzono u około 12% badanych. Potwierdza to możliwość bezobjawowego zakażenia po kontakcie z drobnoustrojem. Porównując wyniki badań przeprowadzonych w okresie wiosennym i jesiennym zaobserwowano wzrost częstości występowania przeciwciał klasy IgM we wrześniu, wskazujący na sezonowość występowania zakażeń i tym samym na możliwość zachorowań zgodną z cyklem biologicznej aktywności wektora, kleszcza *Ixodes ricinus* (8).

U zwierząt domowych chorobę stwierdzono w USA w latach 80. potwierdzając jej ścisły związek z boreliozą występującą u ludzi (24). W Stanach Zjednoczonych badano surowicę pobraną od psów i koni, u których potwierdzono kontakt z boreliozą. Przeciwciała dla *B. burgdorferi* notowano u 23% psów i 8% koni (46). U koni, u których stwierdza się obecność przeciwciał *B. burgdorferi sensu lato*, identyfikuje się głównie genogatunek *B. lusitaniae* (46). Badając próbki surowic pobranych od koni w kierunku *B. burgdorferi sensu lato* przy wykorzystaniu testu ELISA potwierdzono obecność przeciwciał dla tych drobnoustrojów u 29% badanych zwierząt (18). W Turcji, stosując metodę cytometrii przepływową, odnotowano przeciwciała dla borelii u 27,75% badanych psów oraz u 6,33% koni (4). Przeciwciała przeciw *B. burgdorferi* wykazano także u 54,9% krów w północno-wschodniej części Brazylii (15). W Polsce przeciwciała przeciw *B. burgdorferi* stwierdzono u 25,6% koni. Sytuacja ta była różna w kolejnych latach, w których przeciwciała stwierdzano u 16,6-66,6% zwierząt. W badaniach z wykorzystaniem metody western blot borelie stwierdzono w surowicy 60% koni i 83,3% krów ze schorzeniami aparatu ruchu (39).

Rezerwuary

Za główny rezerwuar *B. burgdorferi* uchodzą drobne gryzonie (myszy polne, normice), ale zakażonych może być też wiele gatunków wolno żyjących i domowych ssaków, jak: psy, koty, konie, bydło, jeleniowate itp., a także ptaki, które odgrywają istotną rolę w migracji choroby poprzez rozprowadzanie zakażonych kleszczy (23, 32). Z najnowszych badań francuskich (30) wynika, że cztery z nich – kos (*Turdus merula*), ruzdzik (*Erithacus rubecula*), drozd śpiewak (*Turdus philomelos*) i strzyżyk (*Troglodytes troglodytes*) są pośród ptaków gospodarzami więcej niż 90% kleszczy. Gatunki te, a w szczególności kos (*T. merula*), który jest gospodarzem wysokiego odsetka nimf, przyczyniają się przypuszczalnie do rozprzestrzeniania się patogenów wywołujących boreliozę z Lyme. Ogółem 2,8% ptaków było żywicielami kleszczy czarnonogich (*Ixodes scapularis*), z których 54,5% jest zakażonych drobnoustrojami wywołującymi chorobę z Lyme. Wszystkie zakażone ptaki pochodziły ze stanowisk stosunkowo ubogo zurbanizowanych (17).

Wektory

Zasięg terytorialny boreliozy z Lyme obejmuje obszar całej Polski. W Nigerii badano dwie grupy kleszczy: zbierane z roślinności oraz bytujące na ciele bydła. U stawonogów zbieranych z roślinności wykazano mieszane zakażenie chorobami odkleszczowymi, w tym boreliozą, z kolei od kleszczy bytujących na bydło nie wyizolowano krętków (33). Testem RLB (Reverse Line Blot), którym wykrywano obecność *B. burgdorferi sensu lato* u kleszczy zebranych z owiec i bydła w Chinach, wykazano, że *B. burgdorferi sensu stricto* i *B. afzelii* występują głównie w południowych rejonach kraju, podczas gdy *B. garinii* i *B. valaisiana* dominują w północnej jego części. Po raz pierwszy wykryto też *Borrelia spirochaetes* w kleszczach z grupy *Rhipicephalus spp.* Sugeruje to, że kleszcze te mogą odgrywać rolę w transmisji *Borrelia spirochaetes* (31).

W Polsce wyniki badań obejmujących kleszcze zebrane na terenie wielu województw wskazują, że rozpowszechnienie zakażonych krętkami kleszczy wynosi od 6% do 15% i dotyczy zarówno terenów wiejskich, jak i miejskich (43). Oceniając stopień zainfekowania kleszczy *Ixodes ricinus* krętkami *Borrelia burgdorferi sensu lato* na obszarze Śląska, stwierdzono obecność drobnoustroju u 14,2% tych pajączaków (40). Porównując wyniki badań serologicznych przeprowadzonych w okresie wiosennym i jesiennym u ludzi obserwowano wzrost częstości występowania przeciwciał klasy IgM we wrześniu, wskazujący na sezonowość występowania zakażeń i tym samym wyższe prawdopodobieństwo zachorowań zgodne z cyklem biologicznej aktywności kleszczy *Ixodes ricinus* (8).

Zakażenie i diagnostyka

W USA transmisja krętka na człowieka odbywa się głównie przez kleszcza jeleniowatych (*Ixodes scapularis*). Centra epidemiologiczne w tym kraju zalecają dwustopniową diagnostykę serologiczną choroby: a) przy użyciu testu immunoenzymatycznego i b) bardziej szczegółową metodę western blot (53). Wyniki badań serologicznych mają istotne znaczenie w diagnostyce boreliozy rozsianej i przewlekłej, natomiast ograniczone w pierwszym okresie choroby (44). Serologiczne wykładniki zakażenia *B. burgdorferi* wykryto u 113 spośród 212 chorych z boreliozą ograniczoną (9). Żywiciel może zostać zakażony krętkami jednak nie tylko poprzez bezpośrednie ssanie krwi przez kleszcza. Żywe drobnoustroje stwierdzano w wielu wydzielinach i wydalinach (moczu, nasieniu, ślinie, wysięku z nosa i w mleku). W nasieniu psów i buhajów krętka przeżywały w temperaturze przechowywania 5°C przez 48 godzin, a w temperaturze -196°C przez 12 tygodni (22). Prawdopodobna jest również droga pośrednia zakażenia poprzez wnikięcie żywych bakterii obecnych w odchodach kleszczy przez uszkodzoną skórę. Krętka mogą również przenosić się drogą transplacentaną oraz alimentarną (zjadanie narządów chorych gryzoni przez zwierzęta mięsożerne). Opisano przypadek zakażenia

boreliozą kota wydzieliną z worka spojówkowego innego chorego kota (7). Serologiczna diagnoza LB polega na detekcji przeciwciał IgG i IgM dla prezentowanych antygenów. W przypadku *Borrelia burgdorferi* zamiast screeningowego testu enzymimmunologicznego i potwierdzenia z zastosowaniem techniki western blot stosuje się test koralikowy oparty na złożonej analizie, polegającej na jednoczesnym przeprowadzaniu wielu odrębnych reakcji mogących zapewnić otrzymanie automatycznie szybkiego i wiarygodnego wyniku, uzyskanego w jednym cyklu poprzez technologię cytometru. Szeroki zakres, wysoka czułość i swoistość tych formatów znajduje zastosowanie w analizie płynu mózgowo-rdzeniowego przy indeksowaniu swoistości przeciwciał w przypadku podejrzenia neuroboreliozy. Intensywność fluorescencji reakcji koralikowej może być konwertowana do wartości ilościowych (U/ml) zarówno dla każdego pojedynczego antygeny, jak i dla całej grupy antygenów głównych. Dodatkowo różne reakcje pojedynczych populacji koralików można przekształcić do ekwiwalentów testu western blot. Wszelkie kontrole jakości dowodzą zalet tych złożonych systemów analitycznych i przydatności zastosowania ich w laboratorium diagnostycznym (13).

Patogeneza

Patogeneza boreliozy jest do tej pory dość słabo poznana. *Borrelia* początkowo namnaża się w skórze w okolicy miejsca wkłucia kleszcza, następnie przenika do krwiobiegu i dostaje się do narządów. Stwierdzana jest również w moczu, mazi stawowej i płynie mózgowo-rdzeniowym. Po około miesiącu od zakażenia w surowicy pojawiają się przeciwciała utrzymujące się przez co najmniej 1,5 roku. Eliminują one zarazek z krążenia, jednak w niektórych miejscach (OUN, stawy) krętka mogą przetrwać wewnątrzkomórkowo mimo odpowiedzi immunologicznej (10).

Podczas pierwszych 48 godzin żerowania kleszcza dochodzi do zmiany antygenów powierzchniowych krętków z białek OspA na OspC, co jest niezbędne do wywołania zakażenia. Jako pierwsze w odpowiedzi immunologicznej przeciw krętkom uczestniczą makrofagi oraz neutrofile. Lipoproteiny krętków wiążą się z receptorami makrofagów, co aktywuje uwalnianie prozapalnych cytokin (IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α). Te natomiast aktywują neutrofile, makrofagi, limfocyty cytotoksyczne oraz stymulują limfocyty B, prowadząc do miejscowej reakcji zapalnej. W tym samym czasie, pod wpływem białek zawartych w ślinie kleszcza, zmienia się profil miejscowej odpowiedzi immunologicznej, co ogranicza odpowiedź komórkową i ułatwia namnażanie bakterii w skórze żywiciela. Namnażające się krętka dostają się do krwi, a w wyniku uogólnienia zakażenia dochodzi do odpowiedzi limfocytów B, które już jako komórki plazmatyczne produkują przeciwciała przeciw krętkom (54).

Zarówno u immunokompetentnych ludzi, jak i psów nie dochodzi do rozwoju choroby po pierwszym zakażeniu (wyjątki: dzieci i szczenięta). Przy kolejnym

zakażeniu bądź obniżeniu odporności dochodzi do wystąpienia objawów klinicznych boreliozy (54).

Objawy

Borelioza z Lyme jest u ludzi chorobą wieloukładową. U człowieka wyróżnia się trzy główne stadia choroby.

Okres pierwszy, trwający około 30 dni po ukąszeniu, charakteryzuje się wystąpieniem rumienia. Do postawienia rozpoznania boreliozy pod postacią rumienia wędrującego wystarczają przesłanki epidemiologiczne i stwierdzenie charakterystycznych objawów klinicznych. Średni rozmiar rumienia wynosi 10,5 cm². Najczęściej zlokalizowany jest na kończynach dolnych, tułowi i kończynach górnych (10, 11). Występują również objawy ogólne: gorączka, uczucie zmęczenia, dreszcze, bóle głowy i stawów. Krętki mogą być również przyczyną wystąpienia łagodnej lymphocytomy skórnej lokalizującej się w okolicach o niskiej temperaturze ciała, jak okolica małżowiny usznej i będącej jedynym symptomem boreliozy (20). Po kilku tygodniach lub miesiącach od zakażenia choroba rozprzestrzenia się na wiele układów i narządów. W okresie tym przeważają objawy ze strony OUN (15%) (neuroborelioza). Wykazano, że spośród prób serologicznie pozytywnych 53,5% pochodziło od kobiet, najczęściej w wieku od 35 do 44 lat. Neuroborelioza była najczęściej (37,3%) obserwowaną postacią kliniczną (24, 25, 54). Objawy neurologiczne są konsekwencją zapalenia nerwów czaszkowych, zapalenia korzeni nerwowych oraz mózgu i opon mózgowo-rdzeniowych (5). Niezwykle rzadko spotyka się syndrom zakrzepicy zatok żylnych opony twardej (cerebral dural sinus thrombosis), w którym występuje ostra migrena związana z zespołem neurologicznym i fizycznym w postaci motorycznych ataków i połowicznych porażań (6). Być może, migrenowe bóle głowy są powiązane z agregacją erytrocytów wewnątrz naczyń krwionośnych. W pewnym stopniu wskazują na to badania przeprowadzone na myszach, które zakażano *B. crocidurae*, wywołująca u ludzi afrykańską gorączkę nawracającą, podczas której spirochety sklejają się z erytrocytami, powodując opóźnioną reakcję immunologiczną. Po zakażeniu myszy monitorowano przez 50 dni. *Spirochetes* obserwowano pozanaczyniowo 2 dni po infekcji. Dwa dni później widoczne były: pełna odpowiedź zapalna, śmierć komórek i uszkodzenia tkanek. Reakcja tkanki płucnej i kostnej była podobna, natomiast objawy patologiczne ze strony mózgu opóźnione, z mniej wyraźną reakcją zapalną. Mikrozątory stwierdzano w naczyniach krwionośnych prawdopodobnie jako efekt agregacji erytrocytów. Inwazja *B. crocidurae* pojawia się gwałtowniej i opisywana była dla choroby z Lyme wywoływanej przez *Borrelia species*. Pozanaczyniowa obecność *B. crocidurae* wskazuje na wędrowkę tych bakterii i wywoływanie uszkodzeń w organizmie zwierzęcych gospodarzy. Przypuszczalnie badania histopatologiczne pozwolą na wyjaśnienie objawów klinicznych towarzyszących gorączce nawracającej u ludzi (35).

Coraz częściej notuje się u ludzi zaburzenia psychiczne na tle zakażenia boreliozą. Obserwowano stany depresyjne, zaburzenia psychotyczne oraz poznawcze w powiązaniu z zaburzeniami koncentracji i pamięci (36). Niedawno opisano u dziecka pierwszy przypadek neuroboreliozy objawiający się jedynie syndromem Alicji w krainie czarów. Syndrom ten charakteryzuje się zaburzeniami psychosensorycznymi, halucynacjami oraz iluzjami percepcji i dotąd opisywany był głównie przy migrenach. Interesujące, że w opisanym przypadku był to jedyny objaw zakażenia (5). Rzadziej pojawiają się zaburzenia ze strony narządu ruchu (borelioza stawowa) oraz ze strony układu krążenia w postaci zaburzeń rytmu serca, łącznie z blokiem przedsionkowo-komorowym. Objawy krążeniowe manifestują się blokiem przedsionkowo-komorowym, zapaleniem mięśnia sercowego oraz niewydolnością lewokomorową (24, 43). Diagnostyka kardiologicznych postaci boreliozy z Lyme w wielu przypadkach napotyka na poważne trudności. We wczesnych okresach choroby wyniki testów mogą być negatywne, z kolei nie u wszystkich pacjentów z zaburzeniami kardiologicznymi i pozytywnymi wynikami badań serologicznych przyczyną obserwowanych objawów są krętki *Borrelia burgdorferi* (16).

Okres trzeci rozwija się w ciągu kilku miesięcy lub nawet lat od chwili zakażenia i obejmuje m.in. przewlekłe zapalenie stawów, głównie kolanowych (24, 38). W każdym okresie choroby mogą pojawiać się objawy ze strony narządu wzroku (zapalenie spojówek, zapalenie tęczówki, zapalenie tęczówki i ciała rzęskowego, zaćma oraz zanik nerwu wzrokowego) (29). Borelioza w formie przewlekłej jest trudna do zdiagnozowania klinicznego. Bardzo nieliczny odsetek lekarzy pierwszego kontaktu (2,1%) podejrzewa, diagnozuje i leczy przewlekłą formę boreliozy na podstawie objawów klinicznych (19).

Psy większość zakażeń przechodzą bezobjawowo (24). Nie występuje u nich, w odróżnieniu od człowieka, miejscowe zaczerwienienie skóry w stadium początkowym. Objawy skórne, zaburzenia czynności dróg moczowych oraz niedokrwistość notowano wyłącznie po eksperymentalnym zakażeniu (4). Przeważnie objawy choroby występują dopiero po reaktywacji zarazka z formy uśpionej lub po ponownym zakażeniu. Po kilku tygodniach lub miesiącach od ukąszenia kleszcza może pojawić się brak apetytu, wysoka gorączka, powiększenie węzłów chłonnych, kulawizna, obrzęk lub bolesność stawów, zapalenie wielostawowe, mięśni czy kręgosłupa (21, 24, 54). Na skutek niewydolności nerek dochodzi do proteinurii. Występuje zazwyczaj leukocytoza. Zmiany stawowe mają tło immunologiczne, a płyn stawowy pobrany przez punkcję stawu zawiera dużą liczbę neutrofilów. Obserwowano również ostre zapalenie skóry, zapalenie wielonerwowe z przeculicą w okolicy grzbietu oraz niedowład (30). Zmianami typowymi dla zajęcia mięśnia sercowego w przebiegu boreliozy są: blok przedsionkowo-komorowy o różnym stopniu nasilenia, bloki prawej lub lewej odnogi pęczka Hisa i inne zaburzenia przewodnictwa wewnątrz-

komorowego, cechy *myocarditis* lub *pericarditis*. Rzadziej stwierdza się zastoinową niewydolność serca. Znane są również sporadyczne, zakończone zgonem, przypadki *pancarditis*. Obraz kliniczny często sugeruje początkowo inną przyczynę choroby, jak: ostry zawał serca, częstoskurcz napadowy, kardiomiopatię zastoinową. W niektórych przypadkach powrót do zdrowia jest opóźniony lub pojawiają się późne powikłania, np. w postaci kardiomiopatii rozstrzeniowej. Tego rodzaju objawy notuje się nader często u psów w rejonach endemicznych północnej i wschodniej Ameryki. Cięższe przypadki choroby notowano w rejonie Kalifornii oraz stanach środkowozachodnich. Ostatnio boreliozę psów, obok anaplazmozy, babeszjozy, bartonellozy, dirofilariozy, ehrlichiozy, leiszmaniozy, riketsjozy i telazjozy, zakwalifikowano do tzw. chorób wektorowych (vector-borne diseases – CVBD). Choroby te poza zagrożeniem globalnym wykazują stałą tendencję wzrostową, wykraczając poza naturalne obszary geograficzne i ramy czasowe jako rezultat, z jednej strony, postępujących zmian klimatycznych, z drugiej – rozwoju komunikacji i podróży czworonogów eksponowanych na pierwotnie nieznanne infekcje (1).

U kotów nie obserwowano dotąd objawów klinicznych opisanych przy boreliozie z Lyme, a zakażenia rozpoznawano za pomocą immunofluorescencji, testu ELISA oraz western-blot (10, 21). W Stanach Zjednoczonych odsetek kotów seropozytywnych wynosił od 8,8% w okresie od maja do lipca do 33,3% od lutego do kwietnia. W badaniach klinicznych notowano podobny odsetek seropozytywnych kotów ze schorzeniami kończyn lub stawów, którym nie towarzyszyły: gorączka, anoreksja lub osłabienie i kotów z wszystkimi wyżej wymienionymi objawami, u których nie obserwowano kulawizny (27).

U koni objawy chorobowe występują bardzo rzadko. Opisano przypadki podwyższonej temperatury 38,5°C (101,3°F), ośpienia, a dotknięte chorobą zwierzęta stały z opuszczoną głową, niechętnie unosiły kończyny i wykazywały postępującą depresję. W przypadku obecności przeciwciał przeciw *Borrelia burgdorferi* stwierdzano wysoki poziom fibrynogenu w osoczu krwi oraz względną limfopenię. Badanie immunologiczne wykazywało ostrą limfopenię komórek B i niski surowiczy poziom IgM typowy dla pospolitego zmiennego niedoboru immunologicznego. Innymi objawami były stany patologiczne narządu wzroku. Oprócz zapalenia spojówek, zapalenia tęczówki czy całej gałki ocznej borelioza wymieniana jest jako jeden z czynników wywołujących nawracające zapalenie błony naczyniowej oka, czyli tzw. ślepotę miesięczną koni (3). Borelioza była również przyczyną wysokiej śmiertelności źrebiąt oraz wczesnej obumieralności zarodków (3, 26). W Chinach testy PCR na obecność *Borrelia burgdorferi sensu lato* wykazały obecność patogenu u 24,2% jaków i 39% owiec (12).

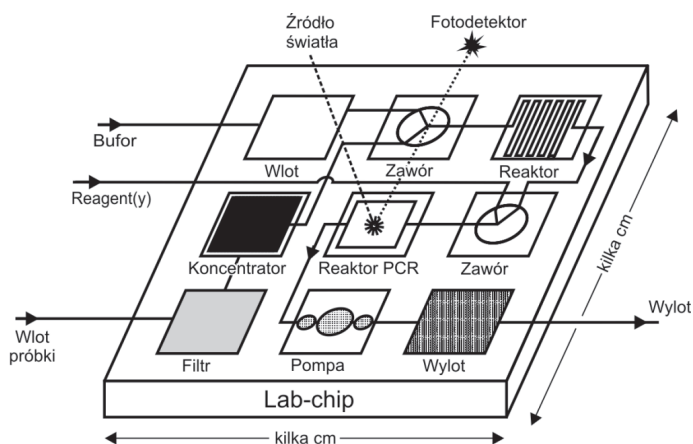
W Stanach Zjednoczonych *Borrelia coriaceae* jest przypuszczalnie jedną z przyczyn epizootycznych ro-

nień u bydła (EBA), której wektorem jest kleszcz *Ornithodoros coriaceus* (41).

Leczenie i profilaktyka

Ze względu na brak charakterystycznych objawów klinicznych boreliozy zarówno u ludzi, jak i zwierząt, w przypadku jej podejrzenia niezbędne jest wykonanie testów laboratoryjnych. Decyzja o rozpoznaniu i leczeniu boreliozy z Lyme powinna być podejmowana w oparciu o obraz kliniczny z uwzględnieniem wyników badań dodatkowych. Wyniki badań laboratoryjnych nie powinny zawierać żadnych sugestii terapeutycznych. We wczesnych stadiach choroby związanych z obecnością żywych bakterii w miejscu zapalenia terapia trwająca przynajmniej 21 dni opiera się na antybiotykoterapii, która, w zależności od postaci klinicznej choroby i tolerancji przez pacjenta, obejmuje przede wszystkim: doksycylinę, amoksycylinę, cefuroksym, ceftriaksone lub cefotaksym oraz niesterydowe środki przeciwzapalne. Pomimo antybiotykoterapii u części pacjentów dochodzi do przewlekłej choroby. Nie jest jasne, czy chodzi tu o konsekwencje stanu przewlekłego, procesu autozapalnego lub autoimmunologicznego, czy o postać fibromialgii (gośćca stawowo-mięśniowego) (14). Badania serologiczne nie mogą być wykorzystywane do oceny skuteczności leczenia, która powinna być analizowana wyłącznie na podstawie dynamiki obrazu klinicznego. Z racji braku szczepionki przeznaczonej dla człowieka podstawą zapobiegania boreliozie z Lyme jest ochrona ciała przed kleszczami podczas przebywania w rejonach ich występowania, stosowanie repelentów, oraz odpowiednio wczesne ich mechaniczne usuwanie (14). U psów dodatkowym sposobem zapobiegania zakażeniu jest immunizacja swoista poprzez zastosowanie inaktywowanej szczepionki.

Borelioza jest poważnym problemem medycznym, a jej wykrywanie jest trudne i często spóźnione. Wydaje się, że wczesną i jednoznaczną identyfikację zakażenia *B. burgdorferi* mogą zapewnić techniki molekularne, wykorzystujące metodę ekstrakcji, namnażania i identyfikacji materiału genetycznego swoście identyfikującego bakterię we wszystkich jej odmianach. W tym przypadku pojawia się problem metodologiczny, czyli dobór odpowiednich targetów genetycznych, co musi być połączone z identyfikacją zmienności genetycznej odmiany boreliozy. Krytycznym zagadnieniem jest opracowanie tanich i masowo stosowanych urządzeń diagnostycznych do przeprowadzenia procedury pozyskiwania i detekcji materiału genetycznego boreliozy. Jedynym rozwiązaniem jest wykorzystanie możliwości, jakie oferują systemy mikrofluidyczne do analizy genetycznej w skali mikro (micro-total-analysis-systems), tzw. laboratoriów chipowych PCR/DNA (lab-on-chip) i wspomaganą informatycznie detekcji sygnałów biologicznych metodami optycznymi (ryc. 1). Instrumenty typu lab-on-chip PCR/DNA, o których mowa, są intensywnie rozwijane na przestrzeni ostatnich lat w wielu wiodących ośrodkach, w wymiarze globalnym i według



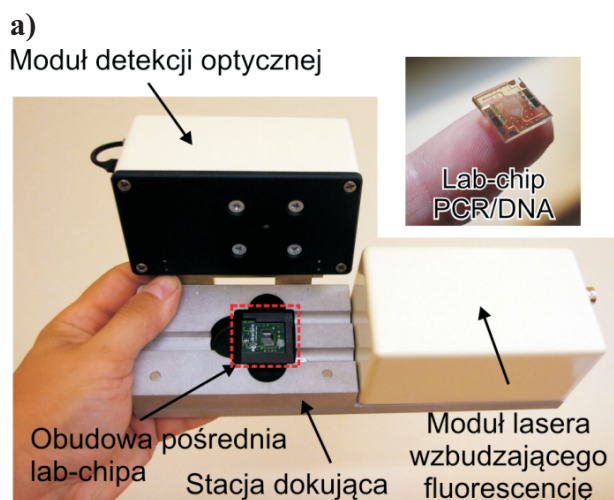
Ryc. 1. Schemat jednorazowego laboratorium chipowego dla reakcji real-time PCR realizującego strategię *sample in answer out*

wielu źródeł w nadchodzącej dekadzie zastąpią klasyczne instrumenty. Istotą jest pozyskiwanie i specyficzne namnożenie poszukiwanego DNA metodą PCR wewnątrz mikrolaboratorium zintegrowanego (lab-on-chip) z zastosowaniem detekcji fluorymetrycznej w czasie rzeczywistym (34, 48). Lab-on-chip posiada odpowiednią sieć mikrokanałów i mikropojemników reakcyjnych o objętości z zakresu pojedynczych mikrolitrów i jest wyposażony w mikropodzespoły (mikrozawory, mieszalniki, filtry, separatory itp.) umożliwiające pozyskanie i zarządzanie przepływami w skali mikro, w tym również deliofilizowanie koktajlu genetycznego dodanym chromoforem umieszczonym wewnątrz lab-on-chipa przez producenta i zmieszanie z badaną próbką. W omawianym przypadku należy wyssać zawartość wnętrza kleszcza i w kolejnych krokach wyekstrahować, oczyścić DNA bakterii boreliozy oraz przeprowadzić specyficzne namnażanie i detekcję materiału

genetycznego. W technice lab-on-chip (najczęściej jest to układ wielu warstw szklanych i/lub polimerowych) wytworzone są również mikropodzespoły elektryczne, umożliwiające precyzyjne zarządzanie temperaturą w funkcji czasu, co umożliwia prowadzenie cyklingu temperaturowego charakterystycznego dla metody PCR. W trakcie namnażania DNA obraz oświetlonego odpowiednim światłem laserowym mikroreaktora jest nagrywany przez wysokoczułą kamerę CCD i analizowany w celu wykrycia sygnału fluoroscencyjnego. Stosowane są wyszukane metody informatyczne.

Jest oczywiste, że lab-on-chip musi współpracować z tak zwaną stacją dokującą, która zbudowana jest najczęściej w formie małego urządzenia informatycznego lub telefonu komórkowego (znaczący wpływ rozwiązań typu iPhone i iPad firmy Apple) i zapewnia obsługę mikrofluidyczną, elektroniczną i informatyczną lab-on-chipa (ryc. 2) (48). Jak wspomniano wcześniej, opisywane rozwiązanie staje się dominantą w szybkich analizach genetycznych dla szeroko rozumianej biomedycyny. Jednorazowy lab-on-chip jest niszczone po wykorzystaniu. Dane analityczne są przedstawiane w formie wynikającej z potrzeby analitycznej: od ekspertyzy tak – nie do pełnego dostępu do obrazów i danych informatycznych. Szczególnie ważne jest przekazywanie zbiorów zapisanych w pamięci stacji dokującej danych analitycznych do zewnętrznego systemu eksperckiego, co umożliwi ponowną analizę danych i korekcję wyników.

Należy wyraźnie podkreślić, że opisane rozwiązania techniczne są intensywnie rozwijane i będą szeroko stosowane w analityce biomedycznej nadchodzących lat. Zespoły polskie są włączone w światowy nurt rozwoju biomedycznych instrumentów analitycznych, wykorzystujących instrumenty typu lab-on-chip od wielu lat



Ryc. 2. Miniaturowe instrumenty do detekcji materiału genetycznego metodą real-time PCR z wykorzystaniem lab-chipów PCR/DNA: a) opracowanie wykorzystywane do detekcji patogenów żywności, czas namnażania poniżej 20 minut (48), b) system (lab-chip w formie jednorazowej karty diagnostycznej, stacja dokująca oraz smartfon z oprogramowaniem) do detekcji patogenów żywności, ochrony środowiska i wspomaganie terapii onkologicznej z *on-chip* oczyszczaniem, przygotowaniem do namnażania i namnażaniem próbki w lab-chipie; całkowity czas analizy typu *sample in answer out* wynosi poniżej 60 minut (www.labonfoil.eu)

(47, 50), ze szczególnym uwzględnieniem przenośnych mikrocytometrów (50, 51) i instrumentów do wykrywania zanieczyszczeń bakteryjnych żywności (49), chorobotwórczych inwazji bakteryjnych u człowieka i zwierząt (2), detekcji żywności zmodyfikowanej genetycznie oraz mobilnego laboratorium do identyfikacji zagrożeń terrorystycznych. Ostatnio powołane zostało konsorcjum, którego celem jest zbudowanie instrumentu lab-on-chip i metody do szybkiego wykrywania obecności zarazków boreliozy w organizmie kleszczy.

Piśmiennictwo

- Baneth G., Bourdeau P., Bourdoiseau G., Bowman D., Breitschwerdt E., Capelli G., Cardoso L., Dantas-Torres F., Day M., Dedet J. P., Dobler G., Ferrer L., Irwin P., Kempf V., Kohn B., Lappin M., Little S., Maggi R., Miró G., Naucke T., Oliva G., Otranto D., Penzhorn B., Pfeffer M., Roura X., Sainz A., Shaw S., Shin S., Solano-Gallego L., Straubinger R., Traub R., Trees A., Truyen U., Démonceau T., Fitzgerald R., Gatti D., Hostetler J., Kilmer B., Krieger K., Mencke N., Mendão C., Mottier L., Pachnicke S., Rees B., Siebert S., Stanneck D., Mingote M. T., von Simson C., Weston S.: CVBD World Forum. Vector-borne diseases—constant challenge for practicing veterinarians: recommendations from the CVBD World Forum Parasit. Vectors. 2012, 20, 5-55.
- Bang Dang D., Dziuban J., Ruano-Lopez J., Wolff A., Dhumpa R., Cuong C., Florian L., Berganzo J., Walczak R., Liu Y., Bu M., Yi S.: A trip from a tube to a chip applied micro and nanotechnology in biotechnology, veterinary and life sciences. The Third Internat. Conf. on the Development of Biomedical Engineering in Vietnam, 11-14 January 2010, Springer: Berlin, s. 290-293.
- Bernard W. V., Cohen D., Bosler E., Zamos D.: Serologic survey for Borrelia burgdorferi antibody in horses referred to a mid-Atlantic veterinary teaching hospital. J. Am. Vet. Med. Assoc. 1990, 196, 1255-1258.
- Bhide M., Yilmaz Z., Golcu E., Torun S., Mikula I.: Seroprevalence of anti-Borrelia burgdorferi antibodies in dogs and horses in Turkey. Ann. Agric. Environ. Med. 2008, 15, 85-90.
- Binalsheikh I. M., Griesemer D., Wang S., Alvarez-Altalef R.: Lyme neuroborreliosis presenting as Alice in Wonderland syndrome. Pediatr. Neurol. 2012, 46, 185-186.
- Budak F., Bölükbasi O., Demirci A., Ozmenoğlu M., Komsuoğlu B.: Cerebral dural sinus thrombosis. A case report. Angiology 1995, 46, 541-545.
- Burgess E. C.: Experimentally induced infection of cats with Borrelia burgdorferi. Am. J. Vet. Res. 1992, 53, 1507.
- Chmielewski T., Tylewska-Wierzbowska S.: Występowanie przeciwciał swoistych dla Borrelia burgdorferi u ludzi zdrowych na terenie Polski. Przeg. Epid. 2002, 56, 33-38.
- Dybowska D.: Borelioza – narastający problem kliniczny. Wiad. Lek. 2006, 59, 1-2.
- Dzierżęcka M., Barszcz K.: Borelioza z Lyme u ludzi oraz zwierząt domowych i dziko żyjących. Kosmos 2010, 1-2, 91-98.
- Filipiuk J., Nowicka-Cieluszecka A., Tarasiuk J., Pancewicz S.: Występowanie rumienia wędrującego w powiecie hajnowskim w latach 2004-2009. Przeg. Epid. 2012, 66, 19-23.
- Fu Y., Liu Z., Guan G., Niu Q., Li Y., Yang J., Ren Q., Ma M., Liu A., Peng Y., Luo J., Yin H.: Development of real-time polymerase chain reaction for detection of Borrelia burgdorferi sensu lato in China. Vector Borne Zoonotic Dis. 2012, 12, 341-345.
- Gerritzen A., Brandt S.: Serodiagnosis of Lyme borreliosis with bead based immunoassays using multiplex technology. Methods 2012, 56, 477-483.
- Girschick H. J., Morbach H., Tappe D.: Treatment of Lyme borreliosis. Arthritis Res Ther. 2009, 11, 258.
- Guedes D. S. Jr., Araújo F. R., Silva F. J., Rangel C. P., Barbosa Neto J. D., Fonseca A. H.: Frequency of antibodies to Babesia bigemina, B. bovis, Anaplasma marginale, Trypanosoma vivax and Borrelia burgdorferi in cattle from the Northeastern region of the State of Pará, Brazil. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 2008, 17, 105-109.
- Grzesik P., Oczko-Grzesik B., Kępa L.: Objawy kardiologiczne w przebiegu boreliozy z Lyme. Przeg. Epid. 2004, 58, 589-596.
- Hamer S. A., Lehrer E., Magle S. B.: Wild birds as sentinels for multiple zoonotic pathogens along an urban to rural gradient in greater Chicago, Illinois. Zoonoses Public Health 2012, 59, 355-364.
- Hansen M. G., Christoffersen M., Thuesen L. R., Petersen M. R., Bojesen A. M.: Seroprevalence of Borrelia burgdorferi sensu lato and Anaplasma phagocytophilum in Danish horses. Acta. Vet. Scand. 2010, 18, 52-53.
- Johnson M., Feder H. M.: Chronic Lyme Disease: A Survey of Connecticut Primary Care Physicians. J. Pediatr. 2010, 157, 1025-1029.
- Keh S. M., Vestey J. P., Ho-Yen D., Cain A. J.: Ear presentation of Lyme borreliosis in a child. J. Laryngol. Otol. 2012, 21, 1-3.
- Krupka I., Straubinger R. K.: Lyme borreliosis in dogs and cats: background, diagnosis, treatment and prevention of infections with Borrelia burgdorferi sensu stricto. Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract. 2010, 40, 1103-1019.
- Kumi-Diaka J., Harris O.: Viability of Borrelia burgdorferi in stored semen. Br. Vet. J. 1995, 151, 221.
- Levi T., Kilpatrick A. M., Mangel M., Wilmers C. C.: Deer, predators, and the emergence of Lyme disease Proc. Natl Acad. Sci. USA 2012, 109, 10942-10947.
- Little S. E., Heise S. R., Blagburn B. L., Callister S. M., Mead P. S.: Lyme borreliosis in dogs and humans in the USA. Trends Parasitol. 2010, 26, 213-218.
- Lopes de Carvalho I., Nuncio M. S.: Laboratory diagnosis of Lyme borreliosis at the Portuguese National Institute of Health (1990-2004). Euro Surveill. 2006, 11, 257-260.
- Madigan J. E.: Lyme Disease (Lyme Borreliosis) in horses. Vet. Clin. North Am. Equine Pract. 1993, 9, 429-434.
- Magnarelli L. A., Anderson J. F., Levine H. R., Levy S. A.: Tick parasitism and antibodies to Borrelia burgdorferi in cats. J. Am. Vet. Med. Assoc. 1990, 197, 63-66.
- Marsot M., Henry P. Y., Voure'h G., Gasqui P., Ferquel E., Laignel J., Grysan M., Chapuis J. L.: Which forest bird species are the main hosts of the tick, Ixodes ricinus, the vector of Borrelia burgdorferi sensu lato, during the breeding season? Int. J. Parasitol. 2012, 42, 781-788.
- Mizak Z.: Borelioza u ludzi i psów. Życie Wet. 2004, 79, 479-481.
- Niemand H. G., Suter P. F.: Praktikum der Hundeklinik. Parey Buchverlag in MVS Medizinverlage, Stuttgart 2003, s. 354.
- Niu Q., Guan G., Yang J., Fu Y., Xu Z., Li Y., Ma M., Liu Z., Liu J., Liu A., Ren Q., Jorgensen W., Luo J., Yin H.: Detection and differentiation of Borrelia burgdorferi sensu lato in ticks collected from sheep and cattle in China. BMC Vet. Res. 2011, 29, 7-17.
- Reed K. D., Meece J. K., Henkel J. S., Shukla S. K.: Birds, migration and emerging zoonoses: west Nile virus, Lyme disease, influenza A and enteropathogens. Clin. Med. Res. 2003, 1, 5-12.
- Reye A. L., Arinola O. G., Hübschen J. M., Müller C. P.: Pathogen prevalence in ticks collected from the vegetation and livestock in Nigeria. Appl. Environ. Microbiol. 2012, 78, 2562-2568.
- Ruano-Lopez J., Olabarria G., Verdoy D., Bang Dang D., Bu M., Wolff A., Voigt A., Dziuban J., Walczak R., Berganzo J., Agirregabiria M.: The SmartBio-Phone, a point of care vision under development through two European projects: OPTOLABCARD and LABONFOIL. Lab on a Chip. 2009, 9, 1495-1499.
- Shamaei-Tousi A., Martin P., Bergh A., Burman N., Brännström T., Bergström S.: Erythrocyte-aggregating relapsing fever spirochete Borrelia crocidurae induces formation of microemboli J. Infect. Dis. 1999, 180, 929-938.
- Sno H. N.: Sings and significance of a tick-bite: psychiatric disorders associated with Lyme disease. Review 9Dutch Tijdschr. Psychiatr. 2012, 54, 235-243.
- Steere A. C.: Lyme disease. New Engl. J. Med. 1989, 321, 586-596.
- Steere A. C., Malawista S. E., Snyderman D. R., Shope R. E., Andiman W. A., Ross M. R., Steele F. M.: An epidemic of oligoarthritic arthritis in children and adults in three Connecticut communities. Arthritis Rheumatism 1977, 20, 7-17.
- Stefanciková A., Adaszek Ł., Petko B., Winiarczyk S., Dudínk V.: Serological evidence of Borrelia burgdorferi sensu lato in horses and cattle from Poland and diagnostic problems of Lyme borreliosis. Ann. Agric. Environ. Med. 2008, 15, 37-43.
- Strzelczyk J. K., Wiczowski A., Spausta G., Ciarkowska J., Zalewska-Ziob M., Izdebska-Straszak G., Strzelczyk J., Kasperczyk J.: Obecność krętków Borrelia burgdorferi sensu lato u kleszczy Ixodes ricinus na terenach rekreacyjnych okolic Tamowskich Gór i Zabrza w latach 2001-2003. Przeg. Epid. 2006, 60, 589-595.
- Teglas M. B., Mapes S., Hodzic E., Nieto N. C.: Co-infection of Ornithodoros coriaceus with the relapsing fever spirochete, Borrelia coriaceae, and the agent of epizootic bovine abortion. Med. Vet. Entomol. 2011, 25, 337-343.
- Tylewska-Wierzbowska S.: Borelioza z Lyme – wzrastający problem zdrowotny? Przeg. Epid. 1997, 51, 425-429.
- Tylewska-Wierzbowska S., Chmielewski T.: Zoonozy przenoszone przez kleszcze na terenie Polski. Post. Mikrobiol. 2010, 49, 191-197.
- Tylewska-Wierzbowska S., Kruszewska D.: Diagnostyka boreliozy z Lyme. Nowa Medycyna 1995, 1, 4-10.
- Verma A., Brisette C. A., Bowman A., Stevenson B.: Borrelia burgdorferi BmpA is a lamininbinding protein. Infect. Immun. 2009, 77, 4940-4946.
- Veronesi F., Laus F., Passamonti F., Tesse B., Piervili Fioretti D., Genchi C.: Occurrence of Borrelia lusitaniae infection in horses. Vet. Microbiol. 2012 Juni 27. [Epub ahead of print]. – dostępna tylko wersja elektroniczna – przed drukiem.
- Walczak R.: Przepływowe mikrosystemy analityczne: zarys technologii, [w:] Iwona Kątnik-Prastowska (red.): Immunochemia w biologii medycznej. Metody laboratoryjne. Wydawnictwo Naukowe PWN Warszawa 2009, 272-294.
- Walczak R.: Fluorescence detection by miniaturized instrumentation based on non-cooled CCD minicamera and dedicated for lab-on-a-chip applications. Biochip J. 2011, 5, 271-279.
- Walczak R., Dziuban J., Koszur J., Bang Dang D., Ruano-Lopez J.: Miniaturowy system do prowadzenia reakcji PCR czasu rzeczywistego do taniego i masowego wykrywania patogenów żywności. Elektronika 2008, 49, 242-244.
- Walczak R., Śniadek P., Dziuban J., Kempisty B., Jackowska M., Jaśkowski J. M.: Lab-on-a-chip spectrophotometric characterization of porcine oocytes. Sensors Actuators B 2012, 165, 38-43.
- Walczak R., Śniadek P., Dziuban J., Kluger J., Chelmońska-Soyta A.: Supravital fluorometric apoptosis detection in a single mouse embryo using lab-on-a-chip. Lab on a Chip. 2011, 11, 3263-3268.
- Wilske B.: Epidemiology and diagnosis of Lyme borreliosis. Ann. Med. 2005, 37, 568-579.
- Wright W. F., Riedel D. J., Tahwani R., Gilliam B. L.: Diagnosis and management of Lyme disease. Am. Fam. Physician. 2011, 85, 1086-1093.
- Zygnier W.: Borelioza psów. Życie Wet. 2008, 83, 816-818.